

DETERMINACIÓN MICROBIOLÓGICA Y MOLECULAR DE *Listeria sp.* Y *Listeria monocytogenes* EN CERDAS A NIVEL DE UNA PLANTA BENEFICIADORA EN EUA

Microbiological and Molecular Detection of *Listeria spp.* and *Listeria monocytogenes* in a Cull Sows Process Plant in USA

Fernando H. Rivera P.¹, Irene Wesley², Scott Hurd², David Simoes¹, Alix Sosa³ y Sergio Rivera¹

¹Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad del Zulia. Maracaibo, Venezuela. ²National Animal Disease Center, USDA-ARS, USA.

³Laboratorio de Referencia Las Naciones (LARNACA). Maracaibo, Venezuela. E-mail: privera@luz.edu.ve

RESUMEN

Con el objeto de comparar la técnica de PCR múltiple con el método microbiológico comercial para la determinación de la presencia de *Listeria spp.* y *Listeria monocytogenes* en alimentos, se llevó a cabo un muestreo en una planta procesadora de cerdas de descarte ubicada en Estados Unidos de Norteamérica (EUA). A 160 cerdas sacrificadas, se le tomaron muestras de ganglios sub-ilíacos, ganglios ileocecales, contenido cecal e hisopado de la superficie de las canales. Adicionalmente se tomaron muestras del ambiente de la planta y de cortes de carne. Un total de 708 muestras se procesaron con ambas técnicas. Mediante técnicas microbiológicas, el 5,2% resultaron positivas a *Listeria spp.* y el 0,14% a *L. monocytogenes*. Mediante la técnica de PCR 4,1% resultaron positivas a *Listeria spp.* y 0,85% positivas a *L. monocytogenes*. No se observó diferencias significativas ($P \geq 0,05$) entre estos valores. Se determinó una incidencia del 1,9% de *Listeria spp.* en los hisopados de la superficie de las canales de las cerdas evaluadas. Por otro lado, se identificó *L. monocytogenes*, en el 5% de las muestras de cortes de carne. En relación a los ganglios, los sub-ilíacos presentaron 6,3% de incidencia a *Listeria spp.* y de 1,3% a *L. monocytogenes* no encontrándose en ganglios ileocecales. Para el contenido cecal la incidencia a *Listeria spp.* fue de 19% y para *L. monocytogenes* fue de 2,5%. En el ambiente el 4,2% de las muestras resultaron positivas a *Listeria spp.* y ninguna a *L. monocytogenes*. Al comparar los resultados logrados entre ambas técnicas no hubo diferencia significativa entre los valores obtenidos con las muestras de los hisopados de las canales y la de los ganglios ileocecales. Si hubo diferencia significativa entre los resultados de contenido cecal

$P = 0,0168 < 0,05$ y de los ganglios sub-ilíacos $P = 0,0038 < 0,05$. La utilización de la técnica de PCR múltiple, permitió que los resultados se obtuvieran en 8 h, luego del segundo período de enriquecimiento de cada muestra, y con el método microbiológico convencional el procedimiento tomó 8 días. La incorporación de la metodología molecular en el proceso de verificación del status microbiológico en la industria de alimentos, resulta una mejora para la efectividad y la dinámica en los sistemas de seguridad alimentaria.

Palabras clave: Cerdos, *Listeria spp.*, *L. monocytogenes*, PCR múltiple, seguridad alimentaria, HACCP.

ABSTRACT

Listeria spp. and *Listeria monocytogenes* presence in a cull sows processor plant in USA, was evaluated by and PCR multiplex method. 160 cull sows were surveyed after slaughter. Samples were collected from sub-iliac node, iliiocecal node, cecal content and carcass swabs. Additionally samples were taken from environment plant and from raw meat ready to be processed. A total of 708 samples were processed. Using traditional microbiology method were found 5.2% of samples positive to *Listeria spp.* and 0.14% to *L. monocytogenes*. With PCR multiplex 4.1% were positive to *Listeria spp.* and 0.85% to *L. monocytogenes*. There was not significant difference ($P \geq 0.05$) in the results obtained with PCR multiplex and traditional microbiology procedures. In relation with the raw material that leaves the slaughter area to be processed inside the same plant, *Listeria spp.* was observed in 1.9% swabs carcass, and 5% of raw sow meat sampled. *Listeria spp.* was identified in 6.3% and *L. monocytogenes* in 1.3% of subiliac nodes. It was not any iliiocecal node positive to *Listeria*. Samples supposedly related with the infection source in the process plant, cecal

content sample were 19% positive to *Listeria* spp. and 2.5% to *L. monocytogenes*. Environmental samples were 4.2% positive to *Listeria* spp. There were not differences between the conventional microbiology procedure and PCR multiplex technique for this pathogen when carcass swabs and ilicecal node were evaluated with both techniques. Differences were observed between the samples from cecal content and sub-iliac node $P = 0.0168 < 0.05$ and $P = 0.0038 < 0.05$ respectively. With the PCR multiplex technique, results were obtained in 8 hours after the second enrichment culture period of the each sample. With traditional microbiological it took 8 days. The incorporation of molecular methodology in the verification process for microbiological controls in the food industry, would allow an important improvement of the effectiveness and dynamics in the food safety systems implanted at the food industries.

Key words: Cull sows, *Listeria* spp., *L. monocytogenes*, PCR multiplex, food safety, HACCP.

INTRODUCCIÓN

Listeria monocytogenes es un patógeno oportunista relacionado con las enfermedades transmitidas por los alimentos (ETA), el cual también afecta a los animales [17]. Desde 1911 los científicos han conocido de la infección en animales, por *Listeria*, y en 1.929 fue detectado el primer caso en humanos [33]. Hace veinte años se desconocía que este patógeno podía ser transmitido por los alimentos. Esto cambió cuando en los Estados Unidos ocurrieron los brotes de 1981 y 1985, los cuales fueron causados por la ingestión de alimento contaminado con *Listeria monocytogenes*. En 1985 el alimento implicado fue queso blando mexicano, hecho con leche sin pasteurizar [30]. A nivel mundial *L. monocytogenes* ha sido descrito como uno de los principales y más severos patógenos transmitidos por los alimentos [6, 10]. Es una bacteria Gram (+), no formadora de esporas. Su motilidad es debida a un flagelo polar, y puede crecer a temperaturas entre 0 y 42°C, aunque son eliminadas por medio de la pasteurización. También puede ser cultivada de medios con un amplio rango de pH, preferiblemente a pH neutro, por lo que puede encontrarse contaminando una gran variedad de alimentos [6, 15, 18]. Este género está dividido en 8 especies de las cuales sólo *L. monocytogenes* es considerada como un peligro para el hombre cuando se encuentra en los alimentos. Esta especie está subdividida en serotipos, siendo de importancia epidemiológica para los humanos la especie *L. monocytogenes* con serotipos conocidos como 1/2a, 1/2b y 4b. [7, 15, 29]. Todas las especies han demostrado ser positivas a la reacción de la esculina, produciendo en estos medios un halo negro alrededor de las colonias, las cuales además se presentan como colonias lisas, convexas blancas con aspecto de vidrio rayado y con un diámetro de entre 1 y 2,5 mm [1] (FIG. 2).

Entre los síndromes clínicos asociados a listeriosis se incluye la sepsis e infección localizada de los huesos, articula-

ciones, ojos, endocardio, cordón espinal, peritoneo y vesícula. Otras dos manifestaciones o síndromes propios y atribuibles son la meningoencefalitis y la granulomatosis infantiséptica [29].

Grandes esfuerzos en materia de prevención se han venido realizando para el control de las enfermedades transmitidas por los alimentos (ETA) por parte de la industria y de las agencias Federales de los Estados Unidos de América [1]. El departamento encargado de los servicios de inspección y de seguridad alimentaria de EUA (Food Safety and Inspection Service, FSIS) reporta en el año 2001, que la prevalencia de *L. monocytogenes* en canales y carne molida de cerdos, fue de 7,4%. Para el Departamento de Salud Pública de los Estados Unidos, la presencia de *L. monocytogenes* como ETA es de gran importancia, en los alimentos procesados listos para el consumo (Ready to eat food). La presencia de cualquier especie de *Listeria* en un alimento procesado, es indicativo de que su eliminación no fue llevada a cabo de forma efectiva durante el procesamiento del alimento [15]. En Europa, según la directriz 92/46/EC, *L. monocytogenes* no debe estar presente en 25 g de queso blando y los hallazgos positivos llevan a un reprocesamiento del producto. Así mismo, en EUA y Canadá tienen establecido dentro de su legislación la "Cero tolerancia" para este patógeno. En función a dicha legislación, para este agente en alimentos como leche y productos cárnicos, técnicas rápidas y altamente sensibles son necesarias para ser implementadas en su control a nivel de la industria, previos a la liberación de estos productos a los consumidores. La implementación de nuevos métodos es necesaria ya que las técnicas microbiológicas convencionales toman de 5 a 7 días para la detección e identificación del género *Listeria* y especie *L. monocytogenes* [23, 28]. Dentro del género *Listeria*, la *L. innocua* es detectada en los alimentos con mayor frecuencia que *L. monocytogenes*, y crece más rápido en medios de enriquecimiento selectivo. Esto pudiera permitir la obtención de presuntos falsos positivos, especialmente cuando crecen en medios en los cuales no se puede observar diferencias entre *L. monocytogenes* y las otras especies [16, 22].

El avance de la biotecnología ha permitido el desarrollo de nuevos métodos para la detección de este microorganismo en alimentos, los cuales proporcionan ventajas en cuanto a la eficiencia, sensibilidad y disminución del tiempo de detección. Estos métodos rápidos, por estar basados en la determinación de ácidos nucleicos, tienen la potencialidad de ser altamente específicos, y de determinar entre organismos muy cercanamente relacionados genéticamente. Tal es el caso de la técnica de Reacción en cadena de la Polimerasa (PCR), una tecnología molecular de amplificación *in vitro* del ADN [2], que se utiliza ampliamente hoy en día como un método rápido de diagnóstico, mediante el cual es posible obtener al mismo tiempo, la identificación de diferentes características genotípicas, como por ejemplo género y especie [24, 25].

Mediante estudios experimentales, realizados con la técnica de hibridación de ADN/ADN, se identificaron 5 grupos ge-

nómicos en Francia: *L. monocytogenes*, *L. ivanovii* (responsable de abortos en animales), *L. innocua*, *L. welshimeri* y *L. seeligeri* [18]. Se destacó que solo *L. monocytogenes* es la especie reconocida como patógena en humanos [15].

Estudios epidemiológicos han determinado que esta bacteria entra en la cadena de los alimentos por medio de los animales utilizados para el consumo humano, los cuales, actuando como reservorios y fuentes de infección, la introducen al ambiente por medio de la leche o sus heces.

Contaminaciones cruzadas por manejos impropios e inadecuada cocción de los alimentos contribuyen a la instauración de una infección por este patógeno en humanos [3].

La resistencia de *Listeria* spp. a diferentes tipos de condiciones ambientales, hace que su control en los procesos de elaboración de alimentos sea cada vez más difícil. Esta bacteria representa uno de los principales patógenos relacionado con las ETA en los Estados Unidos. En Venezuela estudios recientes detectaron *L. monocytogenes* en atún fresco [20]. A nivel mundial son variados los grupos de alimentos que han sido implicados en brotes, teniendo entre ellos las carnes, los productos lácteos, los productos del mar y vegetales.

La Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), con su variante múltiple, es una técnica que ofrece la posibilidad de determinar la presencia de *Listeria* spp. y verificar la especie de *L. monocytogenes* al mismo tiempo, reduciendo el tiempo de detección y aumentando la especificidad del diagnóstico. En la PCR múltiple se tiene la ventaja de poder amplificar secuencias que codifiquen por ejemplo, diferentes genes de una misma especie o de diferentes especies a la vez, lo que implica reducción de tiempo y del costo de la reacción [13].

Los objetivos de este trabajo fueron:

- Evaluar la presencia de *Listeria* spp. y *L. monocytogenes* en cerdas eliminadas como reproductoras (Cull sows) beneficiadas en un matadero utilizando las técnicas microbiológicas tradicionales solas o en combinación con la técnica de la PCR, con su variante múltiple, con el propósito de establecer el grado de beneficio que pudiera aportar a las industrias procesadoras de alimentos, la utilización de dicha técnica, versus a la metodología convencional en el diagnóstico de *Listeria* spp. y *L. monocytogenes*.
- Determinar la incidencia de *Listeria* spp. y *L. monocytogenes*, en la superficie de las canales de cerdas, cortes de carne y ambientes de un matadero especializado en el sacrificio y procesamiento de sus carnes, establecer el grado de beneficio que pudiera aportar a las industrias procesadoras de alimentos. Igualmente, evaluar diferentes procedimientos para la extracción del ADN de *Listeria* spp. y las condiciones de riesgo sanitario relacionado con la cepa patógena de *Listeria*.

MATERIALES Y MÉTODOS

El estudio se llevó a cabo en un matadero dedicado al sacrificio exclusivo de cerdas ubicado en el poblado de Water Town, del estado de Wisconsin-EUA. La planta tiene un sacrificio promedio de 500 cerdas por día, cuyas carnes eran en su totalidad procesadas en la misma planta, para la obtención de diferentes tipos de chorizos y salchichas.

Diseño de recolección de muestras

El tamaño de la muestra fue obtenido con ayuda del programa estadístico WINEPISCOP [9]. Para la obtención de la misma fueron considerados los siguientes valores en la opción del programa tamaño de la muestra:

- Tamaño de la población en estudio 2000 cerdas.
- Nivel de confianza de 95%.
- Error aceptado 5%.
- Prevalencia estimada 12%.

El programa arrojó un tamaño de muestra de 151, el mismo fue llevado a 160 cerdas muestreadas.

Los procedimientos estadísticos se llevaron a cabo aplicando para ello el estadístico Z corregido, prueba de dos colas.

El muestreo se llevó a cabo cada dos semanas. Cada día de toma de muestra se muestrearon 40 cerdas, evaluándose un total de 160 cerdas. Se consideró cuatro tipos de muestras en cada una de las cerdas: ganglio ileocecal, ganglio sub-ilíacos, hisopado (por medio de esponjas estériles) de la superficie de la canal, y contenido cecal.

Para evaluar el ambiente de trabajo se tomaron cada día de recolección, 12 muestras del ambiente, correspondientes a superficies del lugar de faenado (mesa de trabajo, piso, pared y correa transportadora de las vísceras). Igualmente se colectaron 5 muestras de cortes de carne de la sala de desposte, durante los cuatro días, para un total de 48 muestras del ambiente y 20 de carne.

Toma de muestra: Se conformaron tres equipos de trabajo, uno para tomar muestras de ganglios sub-ilíacos, otro para los ganglios ileocecales y contenido cecal, y un tercer equipo para la toma de las muestras de carne, ambiente e hisopado de la canal. Cada día, las 40 cerdas eran muestreadas en dos lotes de 20 cerdas, seleccionadas de forma consecutivas lo que permitió una mejor identificación y correspondencia entre las muestras. El muestreo comenzaba tomando las primera 20 cerdas, a partir de las 6:00 a.m., al iniciar la matanza en la planta. Posteriormente, luego de un período de espera, se reiniciaba la toma de muestras a las 9:00 a.m. con las 20 cerdas restantes. La recolección de las muestras fue planificada para realizarse los días martes y procesarlas el día siguiente de la semana correspondiente.

El transporte de las muestras, desde la planta hasta el laboratorio, se realizó en cavas refrigeradas con hielo, y conservadas en cavas refrigeradas (4°C) hasta el momento de su procesamiento.

Procedimiento microbiológico

Se utilizó el procedimiento microbiológico convencional para la detección de *Listeria* utilizado por la unidad de "Pre-Harvest Food Safety and Enteric Disease" del Centro Nacional de enfermedades animales en USA (National Animal Disease Center, NADC) perteneciente al Departamento de Agricultura de los Estados Unidos (USDA), para el análisis de muestras provenientes de carnes rojas, muestras de la industrias avícola incluyendo los huevos, y para muestras proveniente del ambiente [17, 26, 32, 33], (FIG. 1).

Los protocolos aplicados fueron los siguientes:

Protocolo 1. Contenido cecal: Se tomaron 10 g de la muestra y se agregó 90 mL de caldo selectivo para *L. monocytogenes*, Universidad de Vermont Modificado (UVM) (CM 863 Oxoid), más suplemento selectivo UVM I (UVM I, SR 142 Oxoid). Se incubaron a 37°C por 48 horas. Se tomó una alícuota de 100 µL de la muestra en caldo UVM I, y se inoculó en 9,9 mL de caldo UVM más suplemento selectivo UVM II (UVM II, SR 143, Oxoid). Se incubó a 37°C por 48 horas.

Posteriormente, se tomó una alícuota de 100 µL de la muestra en caldo UVM II, y se sembró en agar Palcam (CM 0877, Oxoid) más suplemento selectivo (SR 0150 Oxoid), e incubó a 37°C por 48 horas. Luego, se seleccionaron 5 colonias putativas de *L. monocytogenes* (FIG. 2), las cuales fueron confirmadas por medio de la prueba de la hidrólisis de la esculina [32], utilizando para ello el mismo agar Palcam con su suplemento selectivo, y determinando positivas a *Listeria* spp. aquellas colonias que presentaban un halo oscuro alrededor de las mismas (FIG. 2). Por último, se verificaron y diferenciaron las colonias antes confirmadas, en cuanto al género y especie (*Listeria* spp., *L. monocytogenes*), por medio de la técnica de PCR múltiple.

Protocolo 2. Hisopado con esponja (canales de las cerdas y ambiente): Se prehidrató la esponja estéril (Nasco, Whirl-Pak, Speci-Sponge, B01324WA) (5 × 10 × 1 cm) con 10 mL de agua peptonada 0,1%. Se realizó barrido con ambas caras de la esponja por el área definida (superficie de la canal del animal o del ambiente de trabajo) para la toma de la muestra y se regresó al empaque original para su transporte al laboratorio. Se colocó la esponja en 30 mL de caldo UVM I, y se incubó a 37°C por 48 horas. Toma de la muestra para PCR múltiple. Se continuó de forma similar al protocolo 1.

Protocolo 3. Cortes de carne: Se colocaron 25 g de la carne en una bolsa estéril de plástico resistente. Con un martillo de goma, se trituroó la carne y se le agregó 250 mL de caldo UVM I. Se mezcló con el stomacher durante 1 min y se incubó a 37°C por 48 horas.

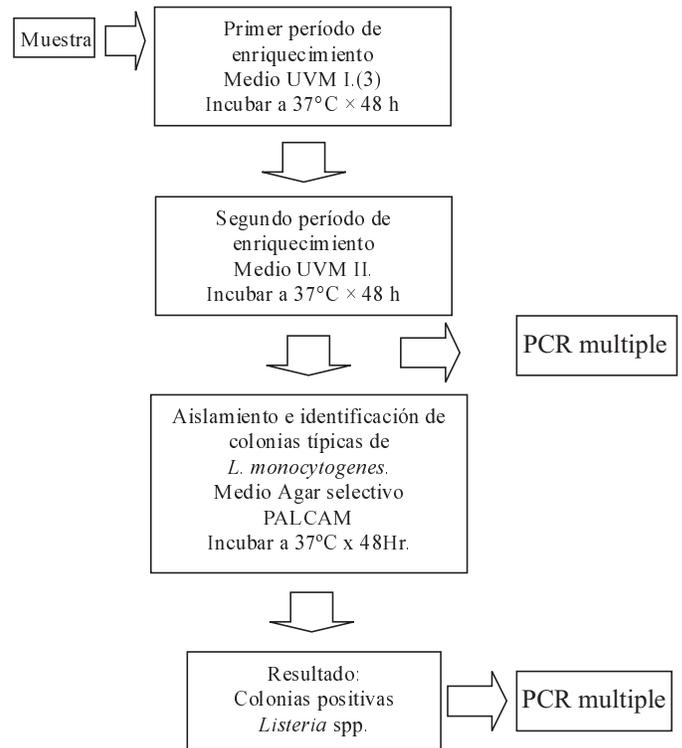


FIGURA 1. ESQUEMA DEL PROCEDIMIENTO PARA EL AISLAMIENTO DE *Listeria* spp. Y *L. monocytogenes* POR MEDIO DEL MÉTODO MICROBIOLÓGICO CONVENCIONAL Y EL ENSAYO DE REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA VARIANTE MÚLTIPLE (PCR múltiple) / SCHEME TO GROWTH *Listeria* spp. AND *L. monocytogenes* BY CONVENTIONAL MICROBIOLOGICAL METHOD AND BY A POLYMERASE CHAIN REACTION MUTIPLEX ASSAY.

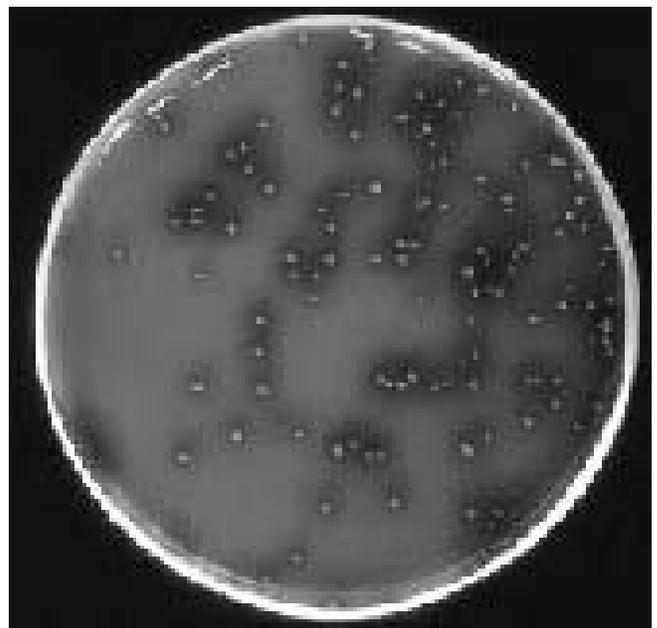


FIGURA 2. COLONIAS DE *Listeria monocytogenes* EN AGAR SELECTIVO PALCAM (CATÁLOGO OXOID) / *Listeria monocytogenes* GROWTH ON PALCAM AGAR.

Se inocularon 100 µL de la muestra en caldo UVM I en 9,9 mL de caldo UVM II y se incubó a 37°C por 48 horas. Toma de la muestra para PCR múltiple. Se continuó de forma similar al protocolo 1.

Protocolo 4. Ganglios. Se colocaron 3 g del ganglio en una bolsa estéril de plástico resistente. Con un martillo de goma, se trituró el contenido (ganglio) y se le agregó 30 mL de caldo UVM I. Se mezcló con el stomacher durante 1 min y se incubó a 37°C por 48 horas. Se inocularon 100 µL de la muestra en caldo UVM I en 9,9 mL de caldo UVM II y se incubó a 37°C por 48 horas. Toma de la muestra para PCR múltiple. Se continuó de forma similar al protocolo 1.

Procedimiento molecular

Se aplicó la técnica de PCR múltiple para la determinación de *Listeria* spp. y *L. monocytogenes*. Los iniciadores o primers seleccionados han sido reportados previamente [4, 7, 32, 33]. Estos amplifican específicamente la región del gen 16S rRNA altamente conservada en la *Listeria* spp. [5, 12, 14] y la región del gen que codifica para el listeriolisina O (*hly A*) única para *L. monocytogenes* [8]. Estos primers amplifican regiones de 938 y 174 pares de bases respectivamente [17, 34] (TABLA 1).

Extracción del ADN

En este estudio se evaluó tres procedimientos para la extracción del ADN de una muestra proveniente de caldo UVM II, sospechosa de *Listeria* spp. o *L. monocytogenes*.

Procedimientos:

I. Se transfirió una alícuota de 1,5 mL del cultivo de *L. monocytogenes* en caldo UVM II a un tubo eppendorf de 1,6 µL; se centrifugó a 8000 r.p.m. por 2 min y se descartó el sobrenadante. Se resuspendió el pellet en 500 µL de agua destilada, se mezcló en vortex durante 30 seg y se centrifugó a 5000 r.p.m. durante 1 min. Se repitió el paso 2 y se resuspendió el pellet en 250 µL de agua destilada. Se utilizaron 5 µL como muestra de ADN para el PCR.

II. Igual al procedimiento I. Se resuspendió el pellet en 500 µL de agua destilada, se mezcló en vortex durante 30 seg y se centrifugó a 8000 r.p.m. por 2 min. Se descartó el sobrenadante. Se resuspendió el pellet en 500 µL de agua destila-

da, se calentó a temperatura de ebullición durante 15 min. Luego se colocó la muestra en hielo durante 2 min y se centrifugó a 8000 r.p.m. durante 3 min. Se utilizó 5 µL del sobrenadante como muestra de ADN para el PCR.

III. Se repitió el paso 1 del Procedimiento I. Se resuspendió el pellet en 250 µL de agua destilada. Se añadieron 10 µL de lisozima (50 mg/mL in 10 mM Tris-HCl. pH 8.0). Se incubaron a 37°C durante 1 h. Se agregaron 40 µL (20mg/mL) proteínasa K. Se incubó a 72°C por 30 min y luego a 95°C durante 10 min. Se agregaron 300 µL de isopropanol helado, se mezcló durante 3 min y se incubó a -70°C por 15 min. Se centrifugó a 8000 r.p.m. por 2 min y se descartó el sobrenadante. Se resuspendió el pellet en 300 µL de etanol al 70%, y se centrifugaron a 8000 r.p.m. durante 1 min. Se secó el pellet conteniendo el DNA. Se reconstituyó en 200 µL de agua destilada. Se utilizó 5 µL como muestra de ADN para el PCR.

Reacción de PCR múltiple

El protocolo para esta reacción de PCR múltiple se realizó de la siguiente forma: 0,5 ng del ADN de la muestra, 50 pmol de cada uno de los iniciadores (U1, LI1, Lis-1 y Lis-2), 1,25 U de Taq-polimerasa (Roche), 200 µM de cada nucleótido (dATP, dCTP, dTTP y dGTP), 10 mM Tris-HCl, 50 mM KCl y 6,5 mM de MgCl₂ [31], en un volumen de reacción de 50 µL.

En el termociclador (9700 Applied Biosystems, EUA), el ciclo de temperaturas fue el siguiente: Un primer período de desnaturalización de 94°C x 5 min, luego 25 ciclos de 94°C x 30 seg, 60°C x 30 seg y 72°C x 30 seg. Al final, 72°C durante 7 min para la extensión final y luego 4°C la temperatura final de mantenimiento del producto del PCR [34, 35].

Los productos de PCR se separaron por electroforesis en geles de agarosa al 2% (95 V x 1 h) con Tris-borato-EDTA (TBE), previamente teñidos con bromuro de etidio, se registraron con el sistema Gel Doc 1000 (Bio-Rad, Richmond, California, EUA).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La especificidad de los primers para la detección de *Listeria* spp. y *L. monocytogenes* se confirmó con los resultados obtenidos y reflejados en la FIG. 3, donde se evidencian los

TABLA 1
PRIMERS DESCRITOS POR WESLEY Y COL. PARA LA APLICACIÓN DE LA TÉCNICA DE PCR MÚLTIPLE EN LA CONFIRMACIÓN SIMULTÁNEA DE *Listeria* spp. y *L. monocytogenes* / PRIMERS REPORTED BY WESLEY et al., TO AMPLIFY SEQUENCE OF *Listeria* spp. AND *L. monocytogenes*

Gen	Primers	Secuencia 5'-3'	Pb.
16S-rRNA	U1	CAGCMGCCGCGGTAATWC M = A o C y W = A o T	938
	LI1	CTCCATAAAGGTGACCCT	
<i>hly A</i>	Lis1	GCATCTGCATTCAATAAAGA	174
listeriolysin O	Lis2	TGTCAGTGCATCTCCG	

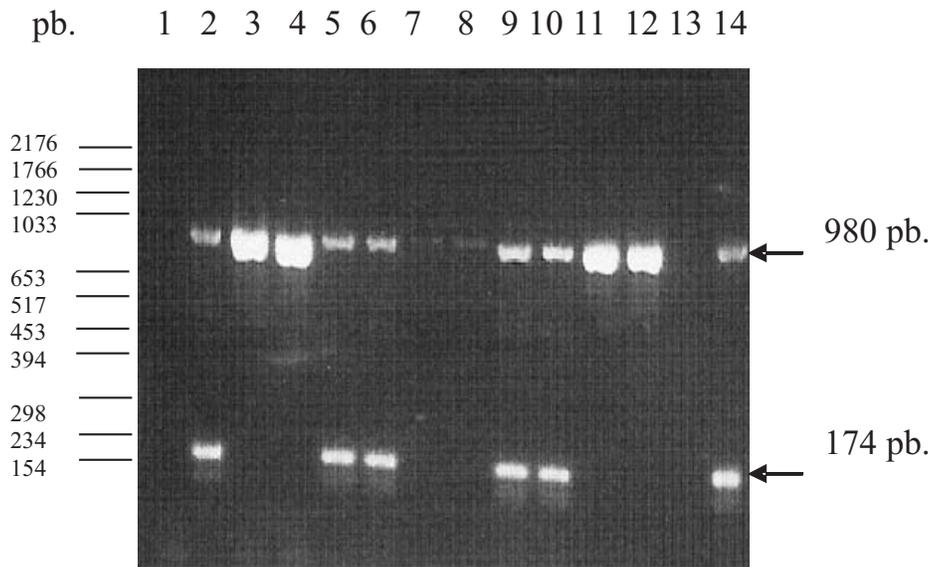


FIGURA 3. PCR MÚLTIPLE PARA *Listeria* spp. Y *L. monocytogenes*. PRODUCTOS DE AMPLIFICACIÓN POR PCR MÚLTIPLE DE AISLADOS DE CULTIVOS PUROS. LÍNEAS 1 Y 13: CONTROL DE LA REACCIÓN DE PCR MÚLTIPLE SIN ADN; LÍNEA 2,14: CONTROLES POSITIVO DE *L. monocytogenes*; LÍNEA 3: *L. welshimeri*; LÍNEA 4: *L. ivanovi*; LÍNEA 5,6: (*L. monocytogenes*); LÍNEA 7,8: *L. GRAYII*; LÍNEA 9,10: *L. monocytogenes*; LÍNEA 11: *L. murrayi*; LÍNEA 12 *L. seelegeri* / PCR MULTIPLEX TO DETECT *Listeria* spp. AND *L. monocytogenes*. AMPLIFICATION OF DNA PREVIOUSLY ISOLATED FROM *Listeria* spp. AND *L. monocytogenes* PURE CULTURE.

productos de amplificación de los genes *16S rRNA* y *hyl A*, los cuales codifican para género y especie respectivamente.

Métodos de extracción del ADN

En la FIG. 4, pozos 9 y 10, los resultados muestran las bandas que indican la amplificación de las secuencias esperadas, en las muestras evaluadas, utilizando el ADN aislado mediante el procedimiento III. En comparación con el ADN obtenido en el procedimiento I, se observan las bandas amplificadas tanto de especie como del género de forma muy delgada y con poca intensidad en los pozos 3 y 4.

Con respecto al procedimiento II, en donde se utilizó como ADN blanco tanto el pellet corrido en los pozos 5 y 6, como el sobrenadante (producto del mismo proceso de extracción), corridos en los pozos 7 y 8, en ambos resultaron ampliificaciones débiles para el gen *hyl A*, así como negativas, para el gen *16S rRNA*.

En consecuencia, se seleccionó el procedimiento III, para la extracción del ADN de las muestras a ser evaluadas en este estudio por medio de la técnica de PCR múltiple.

Estudio microbiológico para *Listeria* spp.

El procedimiento microbiológico anteriormente descrito en materiales y métodos (FIG. 1), aplicado a la totalidad de las muestras reveló un total de 42 positivas a *Listeria* spp., solamente las muestras provenientes de ganglio subilíaco resultaron negativas. La mayor proporción de muestras positivas (20%, rango 0,6 a 20%), se observaron en aquellas provenientes de contenido cecal (TABLA II).

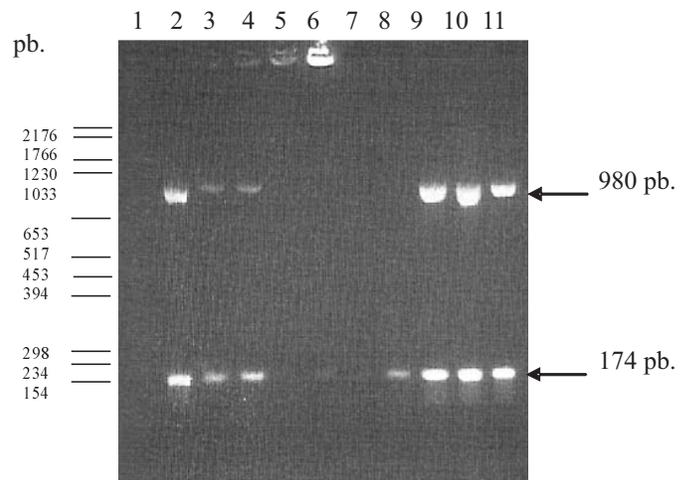


FIGURA 4. COMPARACIÓN DE TRES DIFERENTES PROCEDIMIENTOS DE EXTRACCIÓN DEL ADN PARA LA DETECCIÓN DE *L. monocytogenes* Y *Listeria* spp. UTILIZANDO PCR MÚLTIPLE. PRODUCTOS DE AMPLIFICACIÓN POR PCR MÚLTIPLE DE CULTIVOS PUROS. LÍNEA 1: CONTROL DE LA REACCIÓN SIN ADN, LÍNEAS 2,11: CONTROL POSITIVO A *L. monocytogenes*, LÍNEAS 3,4: PROCEDIMIENTO I DE EXTRACCIÓN DE ADN; LÍNEAS 5,6: PROCEDIMIENTO II DE EXTRACCIÓN DE ADN, USANDO EL PELLETT RESUSPENDIDO; LÍNEAS 7,8: PROCEDIMIENTO II, UTILIZANDO EL SOBRENADANTE COMO ADN BLANCO; LÍNEAS 9,10; PROCEDIMIENTO III DE EXTRACCIÓN DE ADN / COMPARISON OF THREE DIFFERENT METHODS TO EXTRACT DNA FROM *Listeria* spp. AND *L. monocytogenes* PURE CULTURE, AMPLIFIED BY PCR MULTIPLEX.

Comparación entre los resultados obtenidos por la técnica PCR múltiple a dos etapas del procesamiento microbiológico

Cuando se aplicó la técnica del PCR múltiple directamente a todas las muestras, luego del enriquecimiento en caldo UVM II, los resultados fueron los siguientes: Para las Canales, 3/160 de las muestras resultaron positivas a *Listeria* spp. y ninguna a *L. monocytogenes*; en Contenido cecal, 15/160 fueron *Listeria* spp. y 4/160 *L. monocytogenes*. Los ganglios ileocecales resultaron todos negativos. De los ganglios subilíacos, 10/160 resultaron *Listeria* spp. y 2/160 dieron positivos a *L. monocytogenes*. Las 20 muestras de carne resultaron negativas. De las muestras colectadas del ambiente, 2/48 resultaron positivas a *Listeria* spp. (TABLA III).

Las muestras identificadas positivas a *Listeria* spp., fueron evaluadas por medio de la técnica PCR múltiple al final del procedimiento microbiológico, tomando el ADN de las colonias seleccionadas como *Listeria* spp. Las 3 muestras positivas aisladas de las canales, resultaron igualmente positivas a *Listeria* spp. por medio de la técnica del PCR múltiple. Todas las 31 muestras positivas a *Listeria* spp., aisladas del contenido ce-

cal, se confirmaron por PCR múltiple como positivas a *Listeria* spp. Del total de las muestras positivas de los ganglios ileocecal y subilíaco evaluados, una sola muestra presuntiva a *Listeria* spp., resultó negativa con el ensayo de PCR múltiple (FIG. 5). Con respecto a los cortes de carne, la única muestra positiva a *Listeria* spp., fue confirmada de la especie *L. monocytogenes*, con el uso de la técnica de PCR múltiple (TABLA III).

Las hipótesis planteadas refieren una comparación entre proporciones, relacionadas con los valores obtenidos de la aplicación a dos tiempos diferentes de la técnica PCR múltiple, de las muestras provenientes de las cerdas beneficiadas:

$$H_0: P_1 = P_2; H_1: P_1 \neq P_2$$

En estos resultados, no se obtuvieron diferencias significativas ($P \geq 0,05$) entre el resultado del PCR múltiple, a los 4 días del procesamiento microbiológico (segundo período de enriquecimiento Medio UVM II) y la PCR múltiple aplicada a las colonias positivas *Listeria* spp. al final del proceso, al aplicarlos en las muestras de ganglios ileocecales e hisopados de las superficies de las canales de las cerdas. Por otro lado, si

TABLA II
RESULTADOS MICROBIOLÓGICOS EN LA DETERMINACIÓN DE *Listeria* spp. / *Listeria* spp. POSITIVE SAMPLES BY MICROBIOLOGICAL CONVENTIONAL METHOD

Muestras	n	(+)	%
Canal	160	5	3,1
Contenido cecal	160	32	20,0
Ganglio ileocecal	160	1	0,6
Ganglio subilíaco	160	0	-
Carne	20	1	5,0
Ambiente	48	3	6,3

TABLA III
APLICACIÓN DE LA TÉCNICA DE LA PCR MÚLTIPLE, EN LA DETERMINACIÓN DE LA INCIDENCIA DE *Listeria* spp. Y *L. monocytogenes*, EN MUESTRAS PROVENIENTES DE CERDAS DE REEMPLAZO A NIVEL DE PLANTA BENEFICIADORA EN EUA / APPLICATION OF PCR MULTIPLEX TO DETERMINE *Listeria* spp. AND *L. monocytogenes* INCIDENCE IN USA CULL SOWS

Muestra	n	PCR múltiple*				PCR múltiple**			
		<i>Listeria</i> spp.		<i>L. monocytogenes</i>		<i>Listeria</i> spp.		<i>L. monocytogenes</i>	
		(+)	%	(+)	%	(+)	%	(+)	%
Canal	160	3	1,9	0	0	3	1,9	0	-
Contenido cecal	160	15 ^a	9,4	4	2,5	31 ^b	19,4	0	-
Ganglio ileocecal	160	0	-	0	-	0	-	0	-
Ganglio subilíaco	160	10 ^a	6,3	2	1,3	0 ^b	-	0	-
Carne	20	0	-	0	-	0	-	1	5
Ambiente	48	2	4,2	0	-	2	4,2	0	-

* Muestras en UVM II. ** Confirmación de resultados microbiológicos.

Letras diferentes (a, b), muestran diferencias estadísticamente significativas ($P \leq 0,05$).

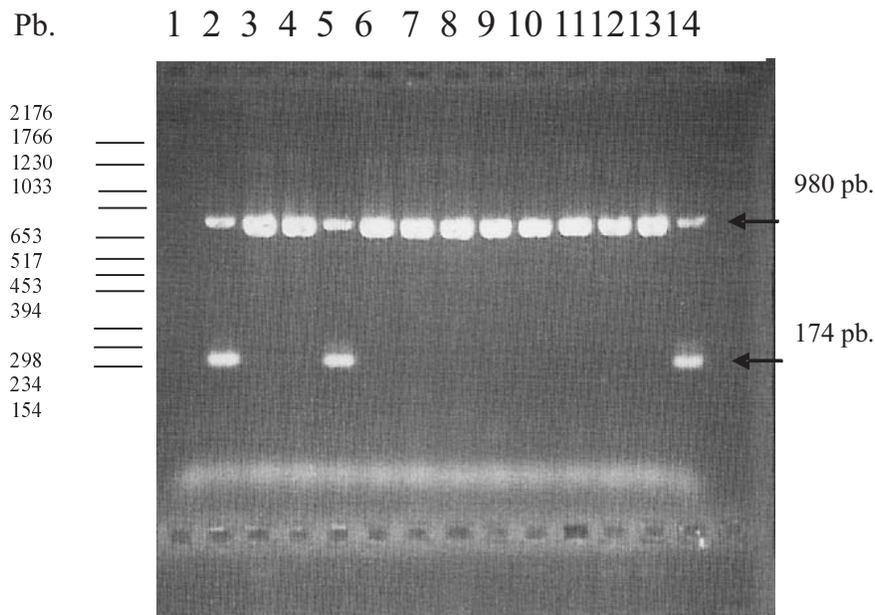


FIGURA 5. PRODUCTO DE LA AMPLIFICACIÓN DE ADN DE *Listeria* spp. Y *L. monocytogenes* EN MUESTRAS POSITIVAS PROVENIENTE DE CERDAS A NIVEL DE MATADERO. AMPLIFICACIÓN POR PCR MÚLTIPLE. LÍNEA 1. CONTROL DE LA REACCIÓN SIN ADN; LÍNEA 2,14: CONTROL POSITIVO *L. monocytogenes*.; LÍNEAS 3,4, Y 6 AL 13: MUESTRAS POSITIVAS A *Listeria* spp.; LÍNEA 5. MUESTRA DE CARNE POSITIVA A *L. monocytogenes* / AMPLIFICATION OF DNA FROM *Listeria* spp. Y *L. monocytogenes* OBTAINED FROM POSITIVE FIELD SIMPLES OF CULL SOWS.

se observó diferencia significativa de $P = 0,0168 < 0,05$ y $P = 0,0038, < 0,05$, para las muestras de contenido cecal y ganglio sub-ilíaco, respectivamente.

Incidencia de *Listeria* spp. y *L. monocytogenes*

La incidencia reportada en este estudio resultó del compendio de los valores positivos a *Listeria* spp. y *L. monocytogenes*, obtenidos de las diferentes muestras procesadas, tomando en cuenta todos los hallazgos logrados por las técnicas PCR múltiple, durante todo el proceso del análisis microbiológico de las muestras. En el contenido cecal, el 19,4% de las muestras resultaron positivas a *Listeria* spp. y el 2,5% a *L. monocytogenes*. Al evaluar los ganglios subilíacos, el 6,3% mostraron *Listeria* spp. y el 1,3% *L. monocytogenes*, no observándose ningún resultado positivo para muestras provenientes de los ganglios iliocecales. Por otro lado, en cuanto a los hisopados de las canales de las cerdas, solo se logró el aislamiento de *Listeria* spp. en el 1,9% de las muestras. Igualmente, para las muestras tomadas del medio ambiente, solo se aisló *Listeria* spp. en el 4,2% de las mismas. Por último, el 5% de las muestras de carne resultaron positivas a *L. monocytogenes*.

En concordancia con los resultados reportados por Wesley y col. [17,34], al utilizar la técnica de PCR múltiple y los primers por ellos reportados, se logró detectar en este estudio *Listeria* spp. y *L. monocytogenes* en diferentes tipos de muestras tomadas en el matadero. Sin embargo Wesley y col.[17], en muestras similares de cerdos de engorde, obtuvieron menores porcentajes de positividad para *L. monocytogenes* (1%)

con la técnica del PCR múltiple que con la metodología microbiológica convencional (2,4%), la cual resultó ser la misma empleada en el presente estudio.

Al igual que lo reportado por Manzano y col. [19], no se evidenció diferencia con la técnica microbiológica convencional y la técnica del PCR múltiple. Estos autores adicionalmente reportan haber logrado estos resultados en un período de 8 horas, coincidiendo con el presente estudio, donde el tiempo utilizado para el procesamiento de las muestras por la técnica de PCR múltiple fue similar. Cabe destacar que el método microbiológico aplicado, consumió 8 días.

Los hisopados de las superficies de canales de las cerdas evaluados en este estudio resultaron negativos mediante ambas técnicas, a diferencia del 1,5% que reportó Wesley y col. [17] en muestras de hisopado de superficie de canales de cerdos de engorde.

En las muestras de contenido cecal, usando el método microbiológico, se logró aislar colonias de *Listeria* spp. en un número mayor que con la aplicación de la técnica molecular. Sin embargo, la PCR múltiple permitió identificar, de manera exclusiva, un número importante de muestras positivas para *L. monocytogenes*, en un período considerablemente menor que con la metodología tradicional. En este tipo de muestras Wesley y col. [17] no obtuvieron resultados positivos con ninguna de las metodologías utilizadas.

En las muestras de ganglio sub-ilíaco, con el procedimiento de microbiología convencional no se aisló ninguna co-

lonia putativa de *Listeria* spp. y por tanto de *L. monocytogenes*. En este caso, la PCR múltiple permitió identificar muestras positivas tanto para *Listeria* spp. como para *L. monocytogenes*. A diferencia de lo reportado por Wesley y col. [17], quienes lograron identificar la presencia de este patógeno por ambas metodologías en las muestras de ganglios sub-ilíacos de los cerdos. Este mismo grupo de investigadores, tomó muestras de carne molida de diferentes plantas procesadoras de cerdos de engorde y encontraron resultados positivos para el patógeno en estudio. Utilizando las mismas metodologías que se realizaron en este estudio, sus resultados positivos variaron entre el 21% y el 92% de las muestras. Esto contrasta con lo detectado en la planta evaluada en la presente investigación, donde se encontró en los cortes de carnes, un 5% de las muestras positivas a *L. monocytogenes*. Estas diferencias de la condición microbiológica de carnes obtenidas en ambas plantas pudieran estar relacionadas con alta densidad de mananza por hora (1.100 cerdos/hora) con respecto a una planta como la estudiada en este trabajo, donde no se sacrifican más de 500 animales por día.

El determinar la presencia de *L. monocytogenes* en centros de procesamiento de materias primas de origen animal, se ha convertido en los Estados Unidos en un procedimiento de rutina dentro de las medidas y estrategias que deben ser adoptadas por la industria de alimentos. Esto con el fin de cumplir con la normativa, establecida por las autoridades sanitarias del país, para obtener y mantenerse bajo la legislación de "Cero tolerancia" [32].

La planta bajo estudio es una industria de procesamiento y producción de alimentos, específicamente de alimentos de alto riesgo, porque sus productos son elaborados con carnes frescas obtenidas mediante el sacrificio de cerdas como parte del proceso en la misma planta y luego, porque son comercializados en su mayoría, de forma de productos frescos bajo refrigeración.

Entre estos productos están los chorizos, los cuales tienen a favor, que su consumo debe llevarse a cabo, luego de su total cocimiento, por lo cual, las altas temperaturas van a lograr la eliminación de cualquier tipo de bacteria presente en los mismos. Gande y Muriana [11] concluyeron que la pasteurización es una herramienta efectiva para el control de *L. monocytogenes* en la superficie de productos cárnicos.

En este sentido, Southwick y Purisch [29], han evaluado el riesgo que representa cuando grandes volúmenes de materias primas son procesados dentro de las industrias de alimentos, ya que de igual forma, mayores serán los riesgos de contaminación con *Listeria* spp., al que se están sometiendo los sistemas de producción y más difícil será prevenir su entrada al proceso.

Belceil y col. [4] y Skovgaard y Norrung [27], coinciden en que los cerdos portadores de *L. monocytogenes* en sus intestinos, se constituyen en la principal fuente de contaminación de sus canales. Adicionalmente, el peligro se incrementa, al colonizar y establecerse en los diferentes ambientes a los

cuales se expone, ya que su capacidad para adaptarse a los mismos es muy amplia, logrando constituir los llamados biofilms.

La evidencia lograda en este estudio de aislar células viables de *L. monocytogenes* de ganglios, confirma lo planteado por Southwick y Purisch [29]; al describir el riesgo que representan los órganos linfoides de animales como fuentes de esta bacteria, y dependiendo del grado de infección del animal, su presencia en una gran variedad de células del mismo [31].

Esto evidencia las posibilidades de entrada de este patógeno a las áreas de producción de la planta, sobrepasando la mayoría de las barreras de control sanitario instaladas para tal fin. Ganglios linfáticos infectados, y prácticas de eliminación inadecuadas durante el procesamiento, pudieran producir la contaminación de estas carnes.

Duffy y col., revisado por Wesley y col. [17], en un estudio realizado en 6 áreas metropolitanas de EUA, no detectaron *L. monocytogenes* en carne molida de cerdo colectada a nivel de las plantas procesadoras, pero posteriormente 27% del producto vendido fue diagnosticado positivo a este patógeno. En este tipo de hallazgo pudiera estar combinado la contaminación post-proceso y también, la característica que tiene *Listeria* de invadir diferentes tipos de órganos linfoides y células en general.

Aunque las carnes de estas cerdas en particular no representan un riesgo realmente grande como fuente de contaminación en la elaboración de las salchichas en ese establecimiento, no se puede descuidar la vigilancia para con *L. monocytogenes*, sobre todo conociendo su patogenicidad sobre las células del hospedador [21].

CONCLUSIONES

No se encontró evidencia de *Listeria monocytogenes* sobre la superficie de las canales de las cerdas evaluadas en el matadero seleccionado.

Las cerdas pueden ser portadoras de *L. monocytogenes*, tanto en sus heces como en sus ganglios, convirtiéndose en fuente de contaminación de este patógeno en el sistema de producción de alimentos.

El sistema de control higiénico sanitario establecido en esta planta de producción, si bien mantiene un grado de contaminación bajo sobre el ambiente, no impidió el paso del patógeno hacia las carnes a ser procesadas.

Los procedimientos microbiológicos convencionales nunca serán desplazados totalmente, dentro de los esquemas para el control microbiológico, ya que sus principios hoy en día son necesarios para complementar la aplicación de la técnica del PCR en todas sus variantes, en muestras de alimentos.

La técnica de PCR múltiple puede ser ofrecida, como metodología alternativa para la verificación del estatus micro-

biológico en la industrias de alimentos, al permitir la identificación de *Listeria* spp. y *L. monocytogenes* de forma confiable y mucho más rápida.

AGRADECIMIENTO

Los autores extienden su mas cordial agradecimiento al National Animal Diseases Center (NADC), USDA, en Ames, Iowa. EUA., así como también a la Iowa State University.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] ACHESON, D. Bringing foodborne disease into focus. **Food Quality**. Noviembre/Diciembre. 34-37 pp. 2000
- [2] BARTLETT, J.; STIRLING, D. **Methods in Molecular Biology. PCR Protocols**. Vol 226. 2nd Ed. Humana Press. New Jersey. 545.pp. 2003.
- [3] BASSLER, H.A.; FLOOD, S.J.; LIVAK, K.J.; MARMARO, J.; KNORR, R.; BATT, C. Use of a fluorogenic probe in a PCR-Based assay for the detection of *Listeria monocytogenes*. **Appl. Environ. Microbiol.** 61(10):3724-3728. 1995.
- [4] BELCEIL, P.A.; FRAVALO, P.; CHAUVIN, C.; FABLET, C.; SALVAT, G.; MADEC, F. Epidemiology and quality assurance in pig production unit. **J. Vet. Med. B. Infect Dis. Vet. Public Health**. 50(4): 155-60. 2003
- [5] BORDER, P.M.; HOWARD, J.J.; PLASTOW, G.S.; SIGGENS, K.W. Detection of *Listeria monocytogenes* using polymerase chain reaction. **Lett. Appl. Microbiol.** 11:158-162. 1990.
- [6] CHASSEIGNAUX, E.; GERAULT, P.; TOQUIN, M.; SALVAT, G.; COLIN, P.; ERMEL, G. Ecology of *Listeria monocytogenes* in the environment of raw poultry meat and raw pork meat processing plants. **Microbiol Lett.** 210: 271-275. 2002
- [7] CHASSEIGNAUX, E.; TOQUIN, M.; RAGIMBEAU, C.; SALVAT, G.; COLIN, P.; ERMEL, G. Molecular epidemiology of *Listeria monocytogenes* isolates collected from the environment raw meat and raw products in two poultry-and pork processing plants. **J.of Appl. Microbiol.** 91: 888-899. 2001
- [8] DENEER, H.; BOYCHUK, I. Species-Specific detection of *Listeria monocytogenes* by DNA amplification. **Appl. and Environ. Microbiol.** 57(2):606-609. 1991.
- [9] Facultad Veterinaria Medicine School of Zaragoza-Spain; University of Edinburgh; Wageningen University. Netherlands. Computer programs in veterinary epidemiology. <http://www.clive.ed.ac.uk/winepiscope/2001>.
- [10] FORSYTHE, S. **The Microbiology of Safe Food**. 1st. Ed. Oxford, Londres. Blackwell Science Editorial. 412 pp. 2000.
- [11] GANDE, N.; MURIANA, P. Prepacking surface pasteurization of ready-to-eat meats with a radiant heat oven for reduction of *Listeria monocytogenes*. **J. of Food Prot.** 66(9): 1623-30. 2003.
- [12] GLASER, P.; FRANGEUL, L.; BUCHRIESER, C.; RUSNIOK, C.; AMEND, A.; BAQUERO, F.; BERCHE, P.; BLOECKER, H.; BRAND, P.; CHAKRABORTY, T.; CHARBIT, A.; CHETOUANI, F.; COUVÉ, E.; DE DARUVAR, A.; DEHOUX, P.; DOMANN, E.; DOMINGUEZ-BERNAL, G.; CUCHAUD, E.; DURANT, L.; DUSSURGET, O.; ETIAN, K.; FSIHI, H.; GARCIA DEL P, F.; GARRIDO, P.; GAUTIER, L.; GOEBER, W.; GOMEZ-LOPEZ, N.; HAIN, T.; HAUF, J.; JACKSON, D.; JONES, L.; KAERST, U.; KREFT, J.; KUHN, M.; KUNST, F.; KURAPKAT, G.; MADUEÑO, E.; MAITOURNAM, A.; VICENTE, J.; NG, E.; NEDJARI, H.; NORDSIEK, G.; NOVELLA, S.; DE PABLOS, B.; PEREZ, J.; PURCELL, R.; REMMEL, B.; ROSE, M.; SCHLUETER, T.; SIMOES, N.; TIERREZ, A.; VÁZQUEZ, J.; VOSS, H.; WEHLAND, J.; COSSART, P. Comparative Genomics of *Listeria species*. **Science**. 294: 849-852. 2001.
- [13] HENEGARIU, O.; HEEREMA, N.; DLOUHY, S.; VANCE, G.; VOGT, P. Multiplex PCR: critical parameters and step-by-step protocol. **Biotech.** 23(3): 504-511. 1997.
- [14] INNIS, M.; GELFAND, D.; SNINSKY, J. London Academic Press. 566 pp. 1999.
- [15] JINNEMAN, K.; HUNT, J.; EKLUND, CH.; WERNBERG, J.; SADO, P.; JOHNSON, J.; RICHTER, R.; TORRES, S.; AYOTTE, E.; ELIASBERG, S.; ISTAFANOS, PH.; BASS, D.; KEXEL-CALABRESA, N.; LIN, W.; BARTON, C. Evaluation and interlaboratory validation of a selective agar for phosphatidylinositol-specific phospholipase C activity using a chromogenic substrate to detect *Listeria monocytogenes* from foods. **J. of Food Prot.** 66(3): 441-445. 2003.
- [16] JOHANSSON, T.; AHOLA-LUTTILA, H.; PIRHONEN, T.; TAIMISTO, A.; HAARIO, H.; LAINE, M.; SALKINOJASALONEN, M. Improved detection of *Listeria monocytogenes* in soft mould ripened cheese. **J. of Appl. Microbiol.** 88:870-876. 2000.
- [17] KANUGANTI, S.; WESLEY, I.V.; REDDY, P.G.; MCKEAN, J.D.; HURD, H.S. Detection of *Listeria monocytogenes* in pigs and pork. **J. of Food Prot.** 65: 1470-1474. 2002.
- [18] MANZANO, M.; COCOLIN, L.; CANTONI, C.; COMI, G. Temperature gradient gel electrophoresis of the amplified product of a small 16S rRNA gene fragment for the identification of *Listeria* species isolated from food. **J. of Food Prot.** 63(5): 659-661. 2000.
- [19] MAMZANO, M.; COCOLIN, L.; CANTONI, C.; COMI, G. A rapid method for the identification and partial serotyping of *Listeria monocytogenes* in food by PCR and re-

- striction enzyme analysis. *Inter. J. of Food Microbiol.* 42: 207-212. 1998.
- [20] MARTINEZ, R.; VILLALOBOS DE B., L. Aislamiento de *Listeria monocytogenes* en atún fresco expedido en la ciudad de Cumaná, Venezuela. *Rev. Científ., FCV/LUZ.* XIV(4): 354-357. 2004.
- [21] McLAUCHLIN, J.; MITCHELL, R.; SMERDON, W.; JEWELL, K. *Listeria monocytogenes* and listeriosis: a review of hazard characterization for use in microbiological risk assessment of foods. *J. of Food Microbiol.* 92(1): 15-13. 2004.
- [22] NOGVA, H.; RUDI, K.; NATERSTAD, K.; HOLCK, A.; LILLEHAUG, D. Application of 5'nuclease PCR for quantitative detection of *Listeria monocytogenes* in pure cultures, water, skim milk and unpasteurized whole milk. *Appl. and Environ. Microbiol.* 66(10): 4266-4271. 2000.
- [23] NORTON, D.M. Polimerase chain reaction –based methods for detection of *Listeria monocitogenes*: toward real-time screening for food and environmental samples. *J. of AOAC Internat.* 85(2): 505-515. 2002.
- [24] NORTON, D.M.; BATT, C.A. Detection of Viable *Listeria monocytogenes* with a 5' nuclease PCR assay. *Appl. Environ. Microbiol.* 65(5): 2122-2127. 1999.
- [25] O'CONNOR, L.; JOY, J.; KANE, M.; SMITH, T.; MAHER, M. Rapid polymerase chain reaction/DNA probe membrane-based assay for the detection of *Listeria* and *Listeria monocytogenes* in food. *J. of Food Prot.* 63(3):337-342. 2000.
- [26] SILK, T., ROTH, T.; DONNELLY, C. Comparison of growth kinetics for healthy and heat-injured *Listeria monocytogenes* in eight enrichment broths. *J. of Food Prot.* 65(8): 1333-1337. 2002.
- [27] SKOVGAARD, N.; NORRUNG, B. The incidence of *Listeria sp.* in feces of Danish pigs and in minced pork meat. *Int. J. Food Microbiol.* 8: 59-63. 1989.
- [28] SOMER, L; KASHI, Y. A PCR method based on 16S rRNA sequence for simultaneous detection of the genus *Listeria* and species *Listeria monocytogenes* in food products. *J. of Food Prot.* 66(9): 1658-1665. 2003.
- [29] SOUTHWICK, F.; PURICH, D. Intracellular pathogenesis of listeriosis. Review articles. *The New England J. of Med.* 334(12): 770-776. 1996.
- [30] TORRES, D.; BARRIER, M.; BIHL, F.; QUESTNIAUX, V.J.F.; MAILLET, I.; AKIRA, SH.; RIFLE, B.; ERARD, F. Toll-Like receptor 2 is required for optimal control of *Listeria monocytogenes* infection. *Infect and Immun.* 72(4): 2131-2139. 2004.
- [31] US. DEPARTMENT OF AGRICULTURE/ Food safety and inspection service, office of public health and service. Isolation and identification of *Listeria monocytogenes* from red meat, poultry, eggs and environmental samples. MLG 8,03. Revisión 03. 20 pp. 2002.
- [32] US. DEPARTMENT OF AGRICULTURE/ Food safety and inspection service; department of health and human service / food and drug administration. Preventing Food-born Listeriosis. <http://vm.cfsan.fda.gov/~mow/FSISLIST.html>. 9 pp. 2002.
- [33] WESLEY, I.; HARMON, K.; DICKSON, J.; SCHWARTZ, A. Application of a multiplex polymerase chain reaction assay for the simultaneous confirmation of *Listeria monocytogenes* and other *Listeria* species in turkey sample surveillance. *J. of Food Prot.* 65[5]:780-785. 2002.
- [34] WESLEY, I.V.; HARMON, K.M.; RAMOS, A.; DICKSON, J.; Application of a multiplex PCR assay for the simultaneous confirmation of *Listeria especies* and *Listeria monocytogenes*. *J. of Food Prot.* 65: 780-785. 2001.