

# EVALUACIÓN DEL COMPORTAMIENTO DE LOS PATÓGENOS ALIMENTARIOS *Listeria monocytogenes* Y *Vibrio parahaemolyticus* MEDIANTE TÉCNICAS MOLECULARES Y CULTIVO EN MATRICES ALIMENTARIAS

Ingrid J. Herrera Pérez, Yolanda Moreno Trigos<sup>1</sup>, María A. Ferrus Pérez<sup>1</sup>.

## RESUMEN

*Listeria monocytogenes* y *Vibrio parahaemolyticus* son microorganismos patógenos humanos transmitidos por alimentos, con la capacidad de introducirse y multiplicarse en la cadena alimentaria. Son capaces de adquirir el estado viable no cultivable (VBNC) que no es detectado por el método tradicional de cultivo en placa. En este estudio se utilizaron técnicas moleculares como la Hibridación in situ con sondas marcadas con fluorescencia (Fluorescent In Situ Hybridization, FISH), el método combinado Direct Viable Count (DVC) con la técnica FISH, la PCR y el cultivo tradicional en placa, para detectar y cuantificar las células viables de los patógenos mencionados en matrices alimentarias contaminadas artificialmente y sometidas a diferentes temperaturas: 4°C, 8°C y 22°C. Los resultados obtenidos para *V. parahaemolyticus* muestran como las bajas temperaturas producen una disminución logarítmica importante del microorganismo mientras que a 22°C prolifera rápidamente. En el caso de *L. monocytogenes* las temperaturas de 4°C y 8°C no detiene su crecimiento sino que con el paso de los días aumenta su carga inicial y a 22°C en menor tiempo aumenta su población. De acuerdo a todo ello podemos decir que el almacenamiento a temperaturas o tiempos inadecuados es un factor de riesgo importante para la infección por *L. monocytogenes* y *V. parahaemolyticus* por consumo de alimentos contaminados. Por otra parte, la técnica FISH combinada con DVC ha mostrado ser una herramienta útil para la detección y cuantificación de los patógenos estudiados en matrices alimentarias.

Palabras Claves: *L. monocytogenes*, *V. parahaemolyticus*, FISH, DVC, Alimentos.

## RESUM

*Listeria monocytogenes* i *Vibrio parahaemolyticus* són microorganismes patògens humans transmesos per aliments, amb la capacitat d'introduir-se i multiplicar-se en la cadena alimentària. Són capaços d'adquirir l'estat viable no cultivable (VBNC) que no és detectat pel mètode tradicional de cultiu en

<sup>1</sup>Departamento de Biotecnología, Universidad Politécnica de Valencia, Camino de Vera 14, 46022 Valencia, España.

placa. En este estudi es van utilitzar tècniques moleculars com la Hibridació in situ (Fluorescent In Situ Hybridization, FISH) , el mètode combinat Direct Viable Count (DVC) amb la tècnica FISH, la PCR i el cultiu tradicional en placa, per a detectar i quantificar les cèl·lules viables dels patògens mencionats en matrius alimentàries contaminades artificialment i sotmeses a diferents temperatures: 4°C, 8°C i 22°C. Els resultats obtinguts per a *V. parahaemolyticus* mostren com les baixes temperatures produeixen una disminució logarítmica important del microorganisme mentre que a 22°C prolifera ràpidament. En el cas de *L. monocytogenes* les temperatures de 4°C i 8°C no deté el seu creixement sinó que amb el pas dels dies augmenta la seua càrrega inicial i a 22°C en menor temps augmenta la seua població. D'acord amb tot això podem dir que l'emmagatzemament a temperatures o temps inadequats és un factor de risc important per a la infecció per *L. monocytogenes* i *V. parahaemolyticus* per consum d'aliments contaminats. D'altra banda, la tècnica FISH combinada amb DVC ha mostrat ser una ferramenta útil per a la detecció i quantificació dels patògens estudiats en matrius alimentàries.

Paraules Clau: *L. monocytogenes*, *V. parahaemolyticus*, FISH, DVC, Aliments.

## ABSTRACT

*Listeria monocytogenes* and *Vibrio parahaemolyticus* are human pathogenic microorganisms transmitted by food, with the ability to enter and spread in the food chain. They are able to enter a state in which they remain viable but cannot be detected by the traditional plating culture method (VBNC). In this study we used molecular techniques such as in situ hybridization (Fluorescent In Situ Hybridization, FISH), the combined Direct Viable Count (DVC) and FISH method, the PCR and the traditional culture plating to detect and quantify the viable cells of the mentioned pathogens in food matrices artificially contaminated and subjected to different temperatures: 4 ° C, 8 ° C and 22 ° C. The results obtained for *V. parahaemolyticus* show a large logarithmic reduction of microorganism at the lower temperature of 4 ° C, while at 22 ° C there is a rapid growth. In the case of *L. monocytogenes*, the lower temperatures of 4 ° C and 8 ° C not only does not stop the growth, but shows an increase of the population with time. At 22 ° C the spread of the pathogen is even more accelerated. According to our results, we can say that there is a high risk of infection with *L. monocytogenes* and *V. parahaemolyticus* by consuming food stored at inappropriate temperatures or times. On the other hand, we have identified the combined FISH-DVC technique as the most effective for the detection and quantification of pathogens in the food matrices studied.

Key words: *L. monocytogenes*, *V. parahaemolyticus*, FISH, DVC, Food.

## INTRODUCCIÓN

*Vibrio parahaemolyticus* es un bacilo gram-negativo, anaerobio facultativo, halófilo. No es considerado particularmente peligroso aunque, se considera un patógeno emergente en humanos ya que se ha registrado un aumento de casos clínicos en todo el mundo, sobre todo en Estados Unidos y Asia (Martinez-Urtaza *et al.*, 2004). Las infecciones causadas por este microorganismo provocan con frecuencia gastroenteritis bacteriana, que suele ir asociada al consumo de marisco y pescado fresco, consumido crudo o parcialmente cocido. Es por ello que los consumidores asiáticos son los más propensos a presentar una intoxicación debido a este patógeno. (Martinez-Urtaza *et al.*, 2004). Los brotes presentan estacionalidad, siendo más comunes en los meses cálidos ya que es cuando aumenta la densidad microbiana en el ambiente (un 94% de los casos se producen entre abril y octubre) (Miliotis *et al.*, 2005). La probabilidad de contraer la infección está determinada principalmente por la dosis de patógeno ingerida y sólo los casos más graves, de septicemia y muerte, se han producido en individuos comprometidos inmunológicamente (Miliotis *et al.*, 2005). Generalmente la concentración de *Vibrio parahaemolyticus* presente en los alimentos no supera  $10^3$  ufc (unidad formadora de colonia) por gramo, aunque puede aumentar si éstos han sido capturados en aguas especialmente cálidas (Pasolini *et al.*, 2004). Esto ligado a la alta tasa de replicación hace que *Vibrio parahaemolyticus* sea un organismo con una capacidad elevada para alcanzar rápidamente concentraciones capaces de provocar la enfermedad

*Listeria monocytogenes* es un bacilo gram-positivo no esporulado, aerobio o anaerobio facultativo ampliamente reconocida como el principal patógeno humano del género *Listeria* (de Valk *et al.*, 2005). La tasa de mortalidad puede alcanzar hasta un 75%. De hecho, tiene una tasa media de mortalidad de alrededor del 30%. Este patógeno es también responsable de las mayores tasas de hospitalización (alrededor de un 90%) entre las intoxicaciones alimentarias (Vitas *et al.*, 2004). En la actualidad, se estima que *L. monocytogenes* es la principal causa de muerte producida por bacterias de origen alimentario en Estados Unidos, aproximadamente se registran 2500 casos de listeriosis humana al año, produciendo 500 muertes (Mead *et al.*, 2005). Su amplia distribución en el ambiente y su capacidad para crecer en la superficie de la mayoría de los alimentos no ácidos, ofrece a *L. monocytogenes* oportunidades para introducirse en la cadena alimentaria y multiplicarse. Además, la habilidad de crecer a temperaturas de refrigeración y tolerar moderadas concentraciones de sal contribuye a que se encuentre en una amplia variedad de alimentos, especialmente en alimentos refrigerados listos para el consumo. Ejemplos de alimentos implicados en brotes epidémicos son: apio, tomates y lechuga (Ho *et al.*, 1986), coles, pepino, patatas y rábanos (Heisick *et al.*, 1989b). Productos lácteos tales como la leche, tanto la fresca como la pasteurizada, y los quesos blandos, se han relacionado con algunos de los principales brotes de

listeriosis. Otro estudio sugiere el salmón ahumado marinado refrigerado como fuente potencial de listeriosis en Suecia (Peiris et al, 2008).

Muchos patógenos de origen alimentario son capaces de adquirir un estado viable no cultivable (VBNC) en condiciones de estrés. En este estado las células son viables (capacidad infectiva), pero han perdido su capacidad de formar colonias en medios de cultivo bajo condiciones de análisis, por lo cual no pueden ser detectadas por métodos culturales. Debido a que tanto *V. parahaemolyticus* como *L. monocytogenes* son capaces de adquirir un estado VBNC, se podría estar infravalorando el potencial de ambos patógenos como agentes infecciosos. Son muchos los métodos moleculares que se han utilizado como alternativa a los de cultivo para la detección de estas formas no cultivables. La hibridación *in situ* con sondas de oligonucleótidos de ADN marcadas con fluorocromos (FISH) es una técnica común para la detección e identificación de microorganismos en diferentes ambientes microbianos, incluyendo comunidades mixtas (Amann et al., 1995). La técnica FISH detecta secuencias de ácidos nucleicos mediante una sonda marcada por fluorescencia, la cual hibrida específicamente con la secuencia complementaria del ARN sin dañar la célula. Generalmente se emplea como blanco una región del ARN ribosómico (ARNr) 16S o 23S por su estabilidad genética, su estructura, en la que coexisten regiones conservadas con regiones variables, y su alto número de copias (Woese, 1987), lo que permite una amplificación de la señal fácilmente detectable. Este método presenta ventajas sobre otras técnicas, como la PCR, al no necesitar el cultivo previo de la bacteria ni la extracción de los ácidos nucleicos. Además, la hibridación inespecífica con otros microorganismos presentes en la muestra no es habitual y, por tanto, no se obtienen falsos resultados positivos. Otro aspecto positivo de la técnica es que no parecen existir sustancias inhibitoras que interfieran en la reacción de hibridación. Mediante la técnica FISH podemos obtener información que no ofrecen otros métodos, como son la morfología, el número y la distribución espacial de la bacteria en el medio en el que se encuentra (Cuesta, 2004). Es decir, se trata de una excelente herramienta, ya que combina la precisión de la genética molecular con la información visual de la microscopia, permitiendo la visualización e identificación de células microbianas individuales dentro de su microambiente natural o del tejido enfermo.

La técnica Direct Viable Count (DVC) se basa en la detección de elongación celular en respuesta a nutrientes a la presencia de un antibiótico inhibidor de la división celular. El antibiótico actúa inhibiendo la síntesis de ADN, previniendo la división celular pero sin afectar al resto de actividades metabólicas de la célula. Así las células viables siguen con su metabolismo normal pero sin llegar a la división celular, por lo que aparecen elongadas y/o más gruesas tras la incubación. Dependiendo de la cepa microbiana utilizada, los tiempos de incubación en el medio DVC y la concentración de antibiótico óptimas sufren variaciones.

La combinación del DVC con la técnica FISH permite la detección específica, que aporta la hibridación de las sondas, con la diferenciación

entre las células viables de las no viables, que es aportado por la diferente elongación de las mismas. Fue utilizada en un primer estudio por Villarino et al. (2000). Esta técnica requiere la previa incubación en medio DVC, y una vez transcurrido este tiempo, se procede al posterior análisis mediante el protocolo desarrollado para la detección por FISH. Hay diferentes estudios que utilizan la técnica de FISH combinada con el DVC para diferenciar células viables de las que no lo son. Así encontramos los estudios de Moreno et al (2007) o de Piqueres et al. (2005), que utilizaron dicha técnica para la detección de células viables de la bacteria *Helicobacter pylori* en aguas, o el estudio de Armisen y Servais (2004), que utilizaron la combinación de ambas técnicas para la detección de *Escherichia coli* en aguas también. En otro estudio, Moreno et al (2011) utilizaron dicha técnica para la detección de células viables de la bacteria *L. monocytogenes* en aguas residuales.

El objetivo de este trabajo fue utilizar métodos moleculares alternativos al cultivo en placa para determinar la viabilidad y evolución de los patógenos *Listeria monocytogenes* y *Vibrio parahaemolyticus* en muestras de alimentos.

## **MATERIAL Y MÉTODOS**

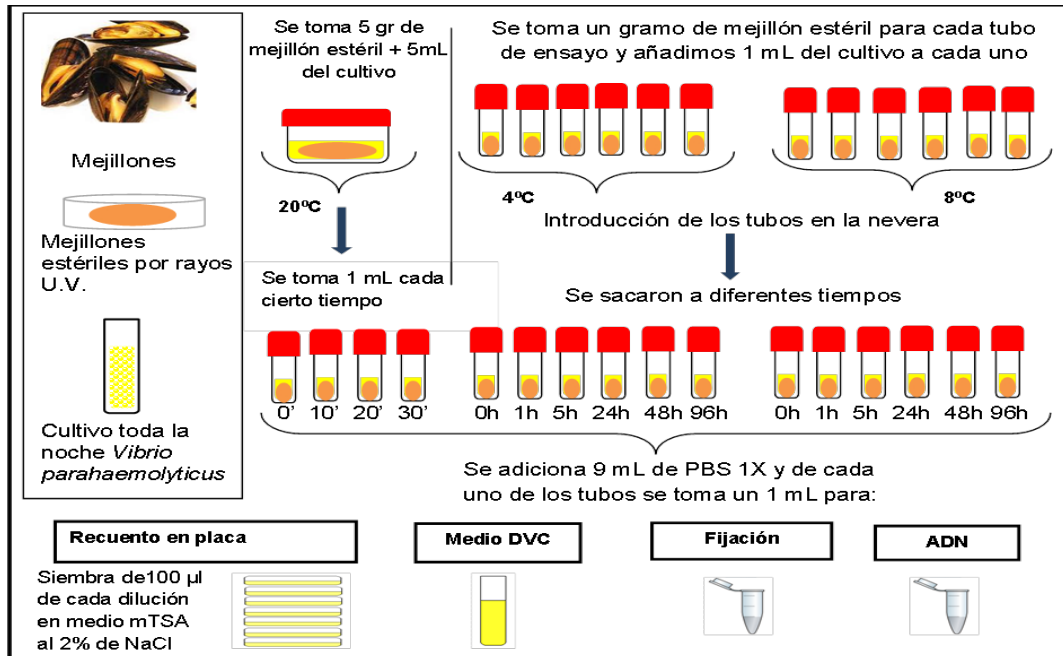
### **Cepas bacterianas**

Para la realización del presente estudio se emplearon las cepas de referencia *Listeria monocytogenes* 936CECT y *Vibrio parahaemolyticus*. 511CECT. Ambas cepas procedían de la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT). La cepa 936CECT se cultivó en TSA (Casein – Peptone Soy Meal - peptone for microbiology, Merck., Darmstadt, Germany) y el cultivo de la cepa 511CECT se llevó a cabo en medio mTSA (Trypic Soy Agar) con 2% de NaCl, ambas se incubaron en las condiciones recomendadas por la CECT.

### **Inóculo y análisis de *Vibrio parahaemolyticus* en mejillones.**

Se modelizaron condiciones reales de temperatura y tiempo en las que podrían encontrarse mejillones contaminados con *V. parahaemolyticus* y se analizó la evolución en la concentración de este microorganismo desde el mercado hasta que son consumidos. Los mejillones objeto del estudio fueron adquiridos en un supermercado y transportados hasta el laboratorio. Una vez allí, se extrajo la carne que se irradió bajo luz UV (260 nm) durante 45 minutos. Para comprobar que la esterilización había funcionado se sembró al inicio de cada ensayo una placa de medio TCBS (Agar-tiosulfato-citrato-sales biliares-sacarosa) con las muestras. En primer lugar se simuló el proceso que denominaremos “Transporte”, el tiempo que pasa el alimento a temperatura ambiente (22°C) desde la compra hasta su almacenaje en la

nevera. Posteriormente, se trató de simular los procesos microbiológicos que suceden cuando se deja el alimento almacenado en la nevera durante diferentes periodos de tiempo. Se intentó simular dos situaciones, la primera consideraba refrigeración a 4°C, mientras que la otra simulaba temperatura de refrigeración de 8°C. (Figura 1).

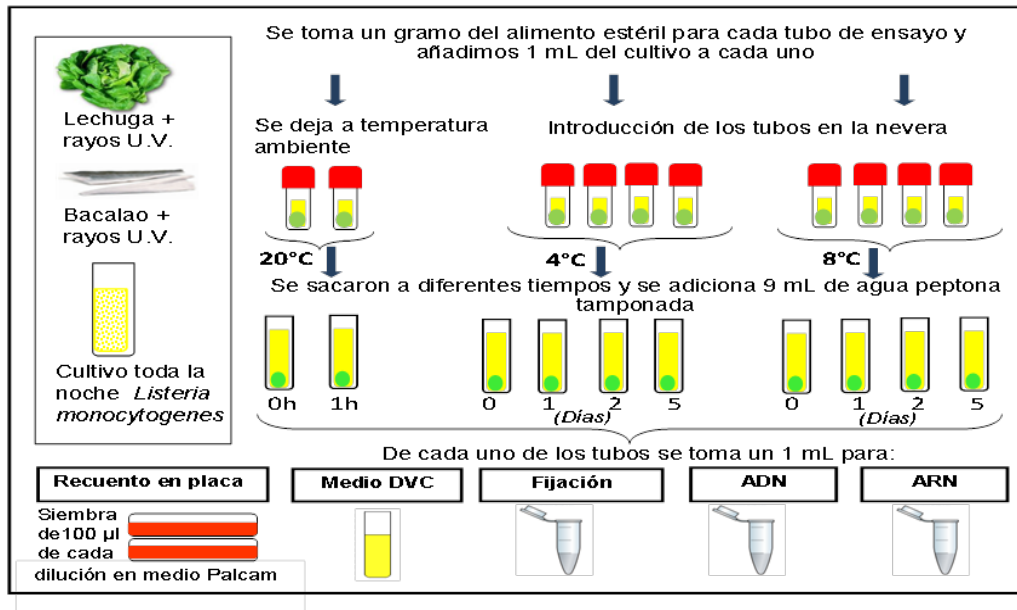


**FIGURA 1.** Simulación del comportamiento de *Vibrio parahaemolyticus* en mejillones durante el transporte, a 4°C y 8°C.

### Inóculo y análisis de *Listeria monocytogenes* en Brotes de Lechuga y Bacalao ahumado

Del mismo modo que para *V. parahaemolyticus*, se simularon condiciones reales por las que pasarían alimentos como lechuga y lonchas de bacalao ahumado contaminado con *L. monocytogenes*, desde que se adquieren hasta su consumo, dejando el alimento por un periodo de tiempo a temperatura ambiente (que puede suceder cuando se compra y se rompe su cadena de frío o es preparado y expuesto antes de su consumo). También los procesos microbiológicos que suceden cuando el alimento contaminado está almacenado a 4°C y 8°C. Se decidió escoger los brotes y el bacalao como alimentos modelos ya que son alimentos refrigerados que pueden encontrarse contaminados con *L. monocytogenes* y además se trata de alimentos que se consumen directamente sin ningún tipo de tratamiento. Las muestras objeto del estudio fueron adquiridas en un supermercado y transportadas hasta el laboratorio. Una vez allí, se cortaron en piezas más pequeñas y se esterizaron bajo luz UV (260 nm) durante 45 minutos y luego se inoculó con un cultivo de toda la noche de *L. monocytogenes*. Para comprobar que la esterilización había funcionado se sembró al inicio de cada

experimento una placa en agar selectivo Palcam con las muestras antes de inocularlas. (Figura 2).



**FIGURA 2.** Simulación del crecimiento de *Listeria monocytogenes* en Brotes de Lechuga y Bacalao ahumado

Todas las muestras se inocularon con 1 mL de una concentración conocida de la bacteria problema. En el momento de la inoculación se determinó la cantidad de inóculo en la muestra (t:0). Se tomaron alícuotas y se procesaron para la detección de cada patógeno mediante FISH, DVC-FISH, PCR y cultivo en cada uno de los tiempos establecidos.

### Recuento en placa

Para *V. parahaemolyticus* se utilizó el medio mTSA 2% NaCl y para *L. monocytogenes* Agar PALCAM (Scharlau 064-PA0070). Para su aislamiento a partir de las muestras de alimento, se realizaron diluciones seriadas de cada muestra en agua estéril y se inocularon 100 µl en las placas, se incubaron a 37°C por 24 horas.

### Incubación DVC (*Direct Viable Count*)

Se tomó 1 mL de cada una de las muestras y se colocaron en 9 ml medio DVC (para *V. parahaemolyticus* fue caldo mTSB al 2% NaCl con 0,75 µl solución de ciprofloxacino 1mg/mL y para *L. monocytogenes* fue caldo BHI con 5 µl del antibiótico ciprofloxacino de concentración 2 mg/mL). Se llevó a incubación a 37°C, 6 horas. Tras el tiempo de incubación necesario, se recogió 1 mL de cada uno de los medios y se fijaron para el análisis mediante FISH tal como se describe arriba.

## Hibridación *In situ* con sondas fluorescentes (FISH)

### SONDAS

Se empleó una combinación de tres sondas EUB338 complementarias de una región del dominio 16S del ARN ribosómico de *Eubacteria* (Amann et al., 1995). Estaban marcadas con 5 (6)-carboxyfluorescein-N-hydroxysuccinimide ester (FLUOS), que emite en el espectro verde. El uso de esta sonda nos permitía distinguir las bacterias, hibridadas en color verde, de los artefactos presentes en la muestra. Para la detección del género *Vibrio* se empleó una sonda complementaria a una región específica del ARN ribosómico 16S (VIB: 5'-ACAGTACTCTAGTCTGCGAG-3'), diseñada en un trabajo previo, marcada con CY3, que emite en el espectro del rojo (534 nm) y para *L. monocytogenes* se empleó la sonda *Lmon* (Moreno et al, 2011) marcada también con CY3 viéndose así las bacterias de color rojizo en el microscopio de fluorescencia Olympus BX 50 con los filtros U-MWB, U-MWIB y U-MWIG.

### FIJACIÓN E HIBRIDACIÓN

Las muestras con *L. monocytogenes* se fijaron según el protocolo descrito para bacterias GRAM+ por Moreno *et al.* (2007). Brevemente, 1 ml de las muestras se centrifugó 10 minutos a una velocidad de 8.000 rpm. El precipitado resultante se resuspendió en 1 ml de PBS 1X (130 mM sodium chloride, 10 mM sodium phosphate, [pH 7.2]). A continuación se volvió a realizar un segundo lavado. Finalmente el precipitado obtenido se resuspendió en PBS 1X y etanol absoluto en proporción 1:1 y se almacenó a - 20°C. Para *V. parahaemolyticus* se fijaron según el protocolo descrito para bacterias GRAM- por Moreno *et al.* (2001) que varió en el protocolo para Gram+ en que después de la segunda centrifugación, las células se resuspendieron en 250 µl de PBS 1X y 750 µl de paraformaldehído (PFA) y se dejó en la nevera a 4°C como mínimo durante 3 horas.

Una vez fijadas las muestras, se procedió a la hibridación depositando las mismas sobre los pocillos de los portaobjetos de hibridación cubiertos con teflón, y tratados previamente con solución de gelatina 0,1%. Después de secar, se deshidrata en volúmenes de 50, 80 y 100% de etanol durante un periodo de 3 minutos en cada uno de ellos, se cubre cada pocillo con 10 µl del tampón de hibridación (0,9 M/l de NaCl, 0,01% de SDS (Dodecilsulfato sódico), 20 mM/l de Tris-HCl y un 30% de formamida a un pH de 7,6) con un contenido de 50 ng de sonda marcada con el correspondiente fluorocromo. Se procedió al lavado del portaobjetos con la solución de lavado (0,9 M/l de NaCl al 0,5 M, 2,0 mM/l de Tris-HCl, 0,01% de SDS, 5 mM/l de EDTA) atemperada a 48°C, se introdujo el portaobjetos en un tubo de 50 mL que contenía la solución de lavado y se incubó durante 15 minutos a 48°C en oscuridad para eliminar el resto de sonda que no se hubiera unido al ARNr. Por último se montaron con FluoroGuard Antifade Reagent (Bio-Rad) entre cubre y portaobjetos y se visualizó. Las fotografías se realizaron con la cámara DP-10 de Olympus. Para la hibridación de *L. monocytogenes*, antes de las deshidrataciones en etanol se adicionó Lisozima [10 mg/ml]



(Realpure Extracción ADN Genómico) durante un periodo de tiempo de 10 min, se lavó con agua destilada una vez transcurrido el tiempo indicado.

### **Extraccion de RNA**

Las muestras extraídas de las simulaciones se trataron inmediatamente para la extracción del RNA, se centrifugaron a 14000 x g, 5 minutos, se eliminó el sobrenadante y se procesaron mediante sistema comercial High Pure RNA Isolation Kit (Roche) según instrucciones del fabricante. Se conservó a -80°C. Posteriormente se realizó el paso de RNA a cDNA por medio del sistema comercial "Transcriptor First Strand cDNA Syntethesis Kit" (Roche). Se procedió según el protocolo del comerciante y se guardó a -20°C.

### **Extracción de DNA**

A partir de todas las muestras se procedió a la extracción de DNA bacteriano. Se recogieron las células por centrifugación a 14000 x g durante 5 minutos, se eliminó el sobrenadante y se extrajo el DNA mediante sistema comercial "Real Pure Extracción DNA genómico" (RBMEG02, Durviz, Paterna, Spain) el cual incluye los productos necesarios y el protocolo a seguir, diferenciando entre bacterias Gram positivas (*L. monocytogenes*) y Gram negativas (*V. parahaemolyticus*). El DNA fue concentrado en etanol, seguido de una centrifugación a 14000 x g durante 2 minutos, se eliminó todo el etanol y se rehidrató resuspendiendo el ADN con 200 µl de solución de Hidratación. El DNA concentrado se guardó a -20°C.

### **Identificación mediante PCR**

Se realizó una PCR para detectar y comprobar la estabilidad del ADN en las células de *V. parahaemolyticus*, para lo que se utilizaron los iniciadores L-tl y R-tl que amplifican un fragmento de 450 pb de la secuencia del gen *tl* que codifica la hemolisina termolábil. TLH y es muy específico para la amplificación por PCR de este gen (Luan et al., 2007). La sensibilidad y especificidad de los iniciadores, así como las condiciones de los ciclos de amplificación se ensayaron en un estudio previo (Cañigral et al, 2010). Para *L. monocytogenes* se realizó una PCR múltiple con los iniciadores específicos descritos por Bansal et al. (1996), que amplifica un fragmento del gen 938 pb del rDNA 16S específico del género *Listeria sp.* y los iniciadores que amplifican el fragmento de 750 pb que corresponde al gen *hlyA* de *L. monocytogenes* (Zamora et al. 2000) según las condiciones de Moreno et al. (2011). Las reacciones se llevaron a cabo en un termociclador automático PHC-3 Thermal Cycler (Techne Corporation, Cambridge, UK).

Los productos de la PCR se visualizaron en geles de agarosa al 1.2 %, preparados a partir de una solución de 100 mL de tampón TAE 1 X y 1.2 gr de agarosa (Roche Diagnostics Inc.). Se utilizó el marcador de peso molecular “GeneRuler™ 100 bp Ladder” (Fermentas Inc Ref: SM0323). Se realizó la electroforesis a 100 V durante 90 minutos. Al finalizar, se tiñó el gel con bromuro de etidio en TAE 1X (0.5 µg/mL) durante 15-20 minutos y se visualizaron las bandas de ADN en un transiluminador con luz ultravioleta.

### Análisis estadístico

El tratamiento estadístico de los resultados se realizó por medio de un análisis ANOVA multifactor en el programa Statgraphics Centurion XVI. El procedimiento ANOVA descompone la variabilidad de los recuentos (ufc/g ó células/mL) en contribuciones debidas a varios factores. Puesto que se ha escogido la suma de cuadrados Tipo III (por omisión), la contribución de cada factor se mide eliminando los efectos de los demás factores. Los valores-P prueban la significancia estadística de cada uno de los factores. En todos los casos se tomó como límite de la significatividad estadística una  $p < 0.05$ . Se realizó un análisis comparativo de todos los parámetros estudiados en los dos ensayos: recuentos en placa, FISH y DVC-FISH tanto a 4 como a 8°C.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Supervivencia de *Vibrio parahaemolyticus* en mejillones.

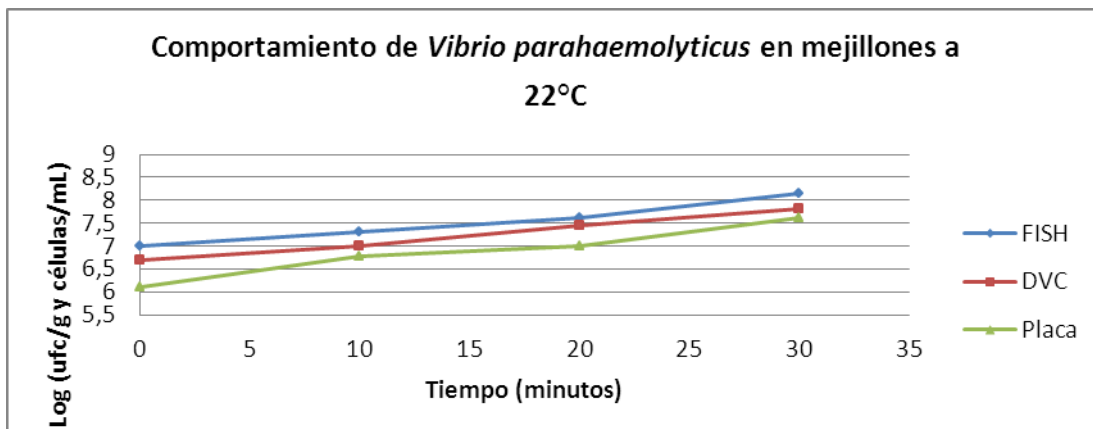
La temperatura de la simulación del transporte fue la temperatura ambiente del laboratorio, unos 22°C. Los resultados se pueden observar en la tabla 1 y gráfica 1. El cultivo inicial contenía  $1,30 \cdot 10^6$  ufc/mL.

**TABLA 1:** Recuentos de la simulación de transporte.

Tiempo (minutos)	Placa (ufc/g)	FISH (células/mL)	DVC-FISH (células/mL)
0	$1,30 \cdot 10^6$	$9,76 \cdot 10^6$	$4,88 \cdot 10^6$
10	$6,90 \cdot 10^6$	$2,07 \cdot 10^7$	$9,76 \cdot 10^6$
20	$9,70 \cdot 10^6$	$4,02 \cdot 10^7$	$2,80 \cdot 10^7$
30	$4,10 \cdot 10^7$	$1,42 \cdot 10^8$	$6,58 \cdot 10^7$

Como se puede ver en la tabla 1 y gráfica 1, la cantidad de ufc por gramo de mejillón y la carga microbiana fue aumentando conforme pasaban los minutos. Aunque la tendencia fue la misma, la media de los recuentos en DVC resultaron ligeramente superiores que los que se obtuvieron por cultivo,

lo que sugirió la presencia de formas VBNC. Por todo ello se puede decir que a temperatura ambiente (22°C) *V. parahaemolyticus* mostró un crecimiento bastante rápido en los mejillones, llegando a aumentar un orden de magnitud en treinta minutos.



**GRAFICA 1:** Representación gráfica de los recuentos en placa, por FISH y mediante DVC-FISH en la simulación del transporte.

Para la simulación a 4°C se partió de un cultivo inicial de  $1,65 \cdot 10^7$  ufc/mL y  $1,78 \cdot 10^6$  a 8°C. Los resultados se pueden ver en la tabla 2 y gráfica 2.

**TABLA 2:** Recuentos de la simulación a 4°C y 8°C en Mejillones.

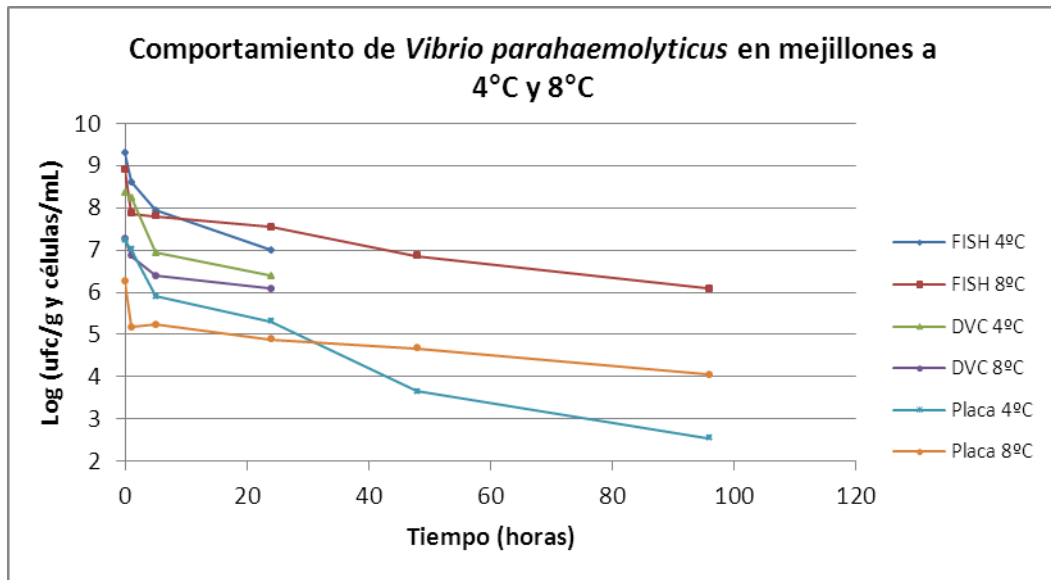
Tiempo (días)	4°C			8°C		
	Placa (ufc/g)	FISH (células/mL)	DVC-FISH (células/mL)	Placa (ufc/g)	FISH (células/mL)	DVC-FISH (células/mL)
0	$1,65 \cdot 10^7$	$1,97 \cdot 10^9$	$2,23 \cdot 10^8$	$1,78 \cdot 10^6$	$7,80 \cdot 10^8$	$1,83 \cdot 10^7$
1	$1,02 \cdot 10^7$	$3,97 \cdot 10^8$	$1,74 \cdot 10^8$	$1,50 \cdot 10^5$	$7,19 \cdot 10^7$	$7,32 \cdot 10^6$
5	$8,10 \cdot 10^5$	$8,54 \cdot 10^7$	$8,54 \cdot 10^6$	$1,70 \cdot 10^5$	$6,34 \cdot 10^7$	$2,44 \cdot 10^6$
24	$2,06 \cdot 10^5$	$9,76 \cdot 10^6$	$2,44 \cdot 10^6$	$7,70 \cdot 10^4$	$3,53 \cdot 10^7$	$1,22 \cdot 10^6$
48	$4,50 \cdot 10^3$	ND	NDV	$4,70 \cdot 10^4$	$7,32 \cdot 10^6$	NDV
96	$3,50 \cdot 10^2$	ND	NDV	$1,10 \cdot 10^4$	$1,22 \cdot 10^6$	NDV

\*ND: no se han detectado células hibridadas

\*NDV: no se han detectado formas elongadas hibridadas

Los resultados mostraron como, con el paso de las horas, la concentración del cultivo y la carga microbiana fue decreciendo de una forma rápida (gráfica 2), observándose que en 5 horas a 4°C disminuyó en dos órdenes respecto la concentración inicial. A partir de las 48 horas en refrigeración no se detectaron más células viables mediante la técnica DVC-FISH ya que probablemente la concentración de las células se encontraba por debajo del límite de detección de la técnica, determinado en un estudio previo en  $10^4$

cel/mL (Caballero 2011). Por cultivo en placa se detectaron células hasta las 96 horas a ambas temperaturas, aunque el número había descendido en 5 órdenes de magnitud. A pesar de que se ha demostrado que la técnica DVC puede ser más eficaz ya que mostró la existencia de células viables no cultivables que no se detectaron por recuento en placa, en el caso de que la concentración de *Vibrio* en el mejillón, al estar por debajo del límite de detección de esta técnica, no sería adecuada su utilización o por lo menos debe de utilizarse junto con otro método más sensible.

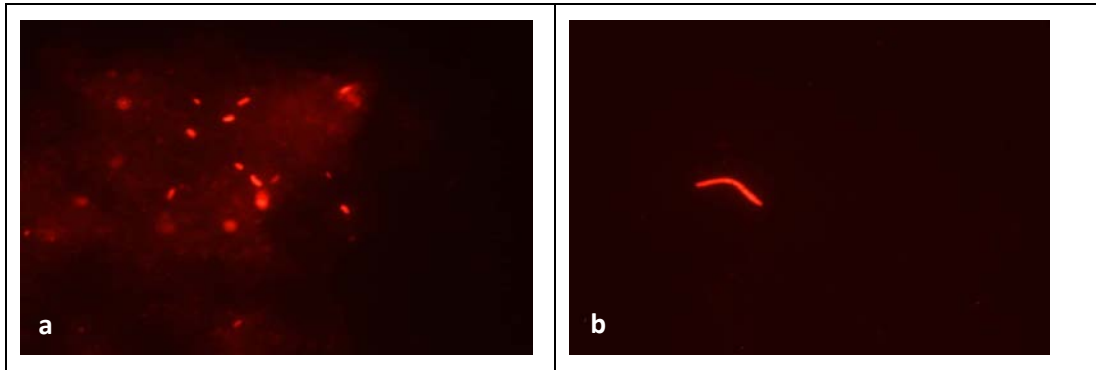


**GRAFICA 2:** Representación gráfica de los recuentos en placa, por FISH y DVC-FISH a 4°C y 8°C en mejillones.

Se observó una disminución en la concentración de las células y en la carga microbiana cuando las muestras de mejillón se introdujeron en la nevera a 8°C (gráfica 2). Los resultados mostraron cómo se produjo un decrecimiento en la cantidad del cultivo de *V. parahaemolyticus* de una forma similar a 4° y 8°C. No obstante, a las 48 horas de almacenaje a 8°C, *V. parahaemolyticus* disminuyó su población y por DVC no se detectó, ya que el recuento probablemente estaba por debajo del límite de detección de la técnica. Esto sucedió porque el inóculo inicial es de menor concentración que el utilizado en la simulación a 4°C. Al igual que en las anteriores simulaciones, la técnica DVC-FISH mostró la presencia de células viables no cultivables que no se detectaron por recuento en placa, tal y como se puede ver en los recuentos de la tabla 2. Mediante FISH se observan células ( $10^6$ ) hasta después de 96 h a 8°C a pesar de que el orden de cultivables a disminuido hasta  $10^4$  y el DVC-FISH no muestra ninguna célula elongada, es decir con metabolismo activo.

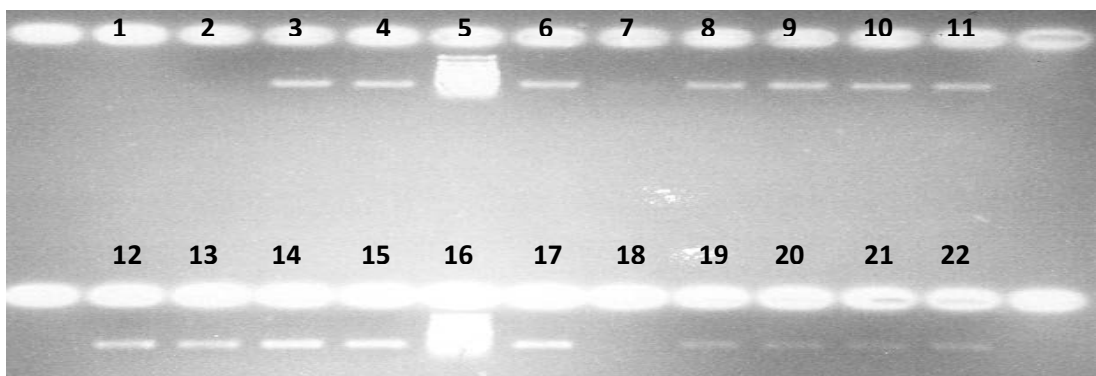
El tratamiento estadístico mostró que para las temperaturas ensayadas 4°C y 8°C, los recuentos de *V. parahaemolyticus* no presentan diferencias estadísticamente significativas con un valor-P (0,902), mientras que las técnicas empleadas DVC-FISH, FISH y placa si presentan diferencias

estadísticamente significativas con un valor  $-P$  (0,026) y con un nivel de confianza del 95%.



**FIGURA 3:** Células hibridadas de *V. parahaemolyticus*: a) FISH (muestra mejillón transporte 30' a 22°C) y b) DVC-FISH (muestra mejillón 5 horas a 4°C).

Por último, se extrajo el ADN de todas las muestras recogidas durante la simulación de los procesos y se realizó una PCR y una posterior electroforesis para comprobar la estabilidad del ADN de *V. parahaemolyticus*. La amplificación específica para el gen *tlh* de *V. parahaemolyticus* se detectó en todos los ensayos y tiempos analizados (Figura 4). La intensidad de las bandas de ADN en gel de agarosa también se mantuvo constante. Por lo tanto no se aprecian diferencias en el producto en función de las condiciones, lo que indica que pese a que la temperatura afecta al crecimiento del cultivo, el ADN se mantiene estable sin degradarse. Estos resultados concuerdan con los obtenidos por Weichart *et al.* (1997) en el que se demuestra que el ADN se mantiene estable durante un largo periodo de tiempo a pesar de que la bacteria haya perdido su viabilidad. Esto demuestra que la PCR no es útil para determinar la presencia de células viables y diferenciarlas de las no viables.



**FIGURA 4.** PCR del fragmento del gen *tlh* de *V. parahaemolyticus* de las muestras del ensayo. 5,16: marcador; 6,8-11: simulación a 4°C (1, 5, 24, 48, 96 horas); 17,19-22: simulación a 8°C (1, 5, 24, 48, 96 horas); 12-15: transporte (0, 10, 20 y 30 minutos); 4: cultivo inicial; 3: control positivo; 2: control negativo.

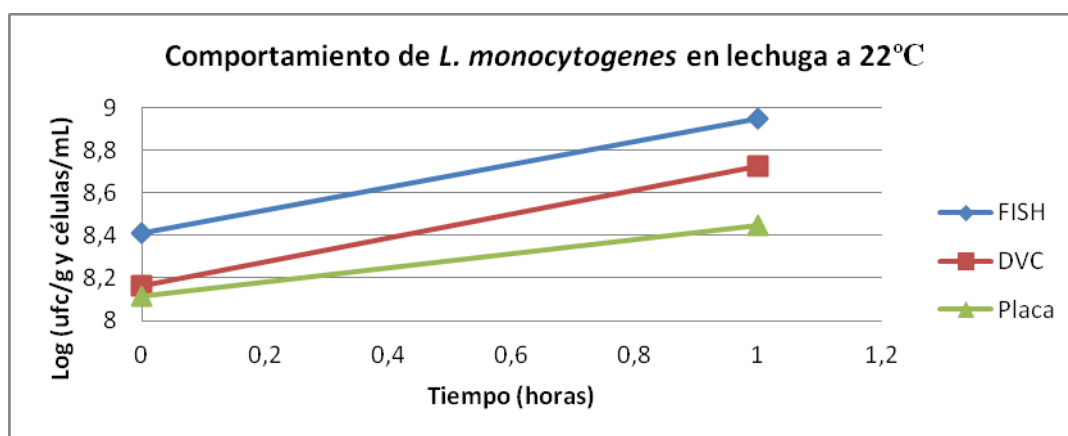
En general *V. parahaemolyticus* presentó un crecimiento muy rápido a temperaturas de 22°C y del mismo modo temperaturas bajas (refrigeración) disminuyen o como mínimo controlan el crecimiento de *Vibrio*. Por todo ello, es necesario que cuando se transportan y manipulan alimentos se mantenga la cadena de frío para evitar la proliferación de *V. parahaemolyticus*, que puede causar intoxicaciones alimentarias. Cuando se trata de alimentos de consumo muy poco cocidos, como es el caso de los mejillones, esta medida es de suma importancia para garantizar la seguridad del alimento.

### Supervivencia de *Listeria monocytogenes* en lechuga.

Primero se simuló la lechuga contaminada artificialmente a temperatura ambiente (22°C) por un periodo de 1 hora, tiempo en que las ensaladas o comidas con este alimento pueden estar expuestas antes de su consumo. Los resultados obtenidos del recuento en placa, FISH y DVC-FISH se detallan en la tabla 3 y gráfica 3. El cultivo inicial tenía una concentración de  $1,31 \times 10^8$  ufc/mL. En la tabla 3 y gráfica 3 se observa que la cantidad de ufc por gramo de lechuga y la carga microbiana aumentó después de 1 hora a temperatura ambiente, pero sin cambiar el orden de magnitud. Se observó un mayor recuento en la técnica FISH porque hibrida todas las células vivas o muertas del microorganismo. Por DVC-FISH los recuentos resultaron ligeramente superiores que los obtenidos por cultivo, lo que sugiere presencia de células viables no cultivables (VBNC). En cualquier caso, por las 3 técnicas se detectó el aumento de la carga inicial.

**TABLA 3:** Recuentos de la simulación a 22°C en lechuga.

Tiempo (horas)	Placa (ufc/g)	FISH (células/mL)	DVC-FISH (células/mL)
0	$1,31 \times 10^8$	$2,58 \times 10^8$	$1,46 \times 10^8$
1	$2,81 \times 10^8$	$8,84 \times 10^8$	$5,28 \times 10^8$

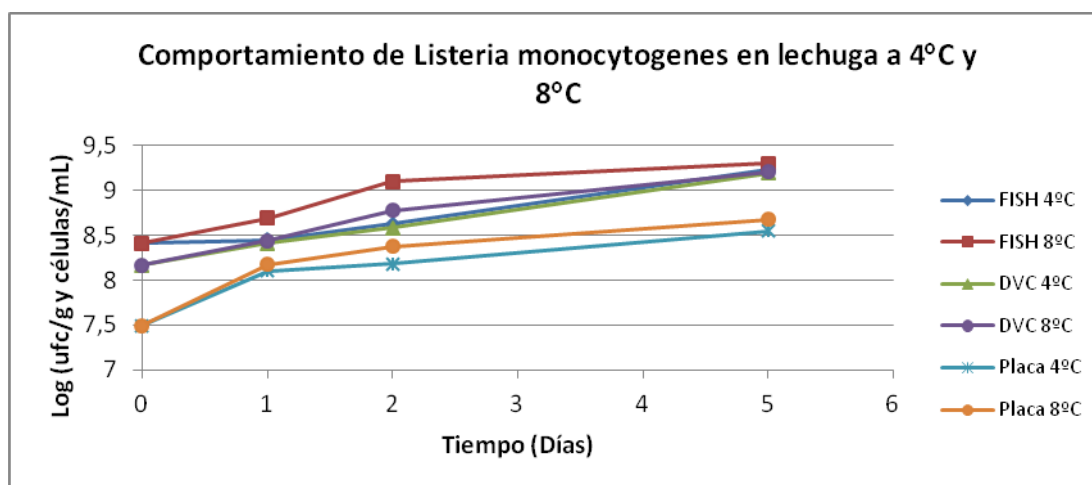


**GRAFICA 3:** Representación gráfica de los recuentos en placa, por FISH y mediante DVC a 22°C en lechuga.

Posteriormente se obtuvieron los recuentos en placa, FISH y DVC-FISH de las simulaciones en lechuga a 4°C y 8°C (tabla 4 y gráfica 4). Los resultados mostraron como con el paso de los días, la concentración del patógeno fue aumentando de forma gradual hasta en un orden de magnitud respecto la carga inicial, los recuentos fueron muy similares en las dos temperaturas aunque un poco superiores en el ensayo a 8°C (gráfica 4).

**TABLA 4:** Recuentos de la simulación a 4°C y 8°C en lechuga.

Tiempo (días)	4°C			8°C		
	Placa (ufc/g)	FISH (células/mL)	DVC-FISH (células/mL)	Placa (ufc/g)	FISH (células/mL)	DVC-FISH (células/mL)
0	3,10x10 <sup>7</sup>	2,58x10 <sup>8</sup>	1,46x10 <sup>8</sup>	3,10x10 <sup>7</sup>	2,58x10 <sup>8</sup>	1,46x10 <sup>8</sup>
1	1,26x10 <sup>8</sup>	2,78x10 <sup>8</sup>	2,56x10 <sup>8</sup>	1,50x10 <sup>8</sup>	4,88x10 <sup>8</sup>	2,73x10 <sup>8</sup>
2	1,51x10 <sup>8</sup>	4,25x10 <sup>8</sup>	3,85x10 <sup>8</sup>	2,37x10 <sup>8</sup>	1,26x10 <sup>9</sup>	5,95x10 <sup>8</sup>
5	3,55x10 <sup>8</sup>	1,72x10 <sup>9</sup>	1,56x10 <sup>9</sup>	4,75x10 <sup>8</sup>	2,01x10 <sup>9</sup>	1,60x10 <sup>9</sup>



**GRAFICA 4:** Representación gráfica de los recuentos en placa, por FISH y mediante DVC en la simulación a 4°C y 8°C en lechuga.

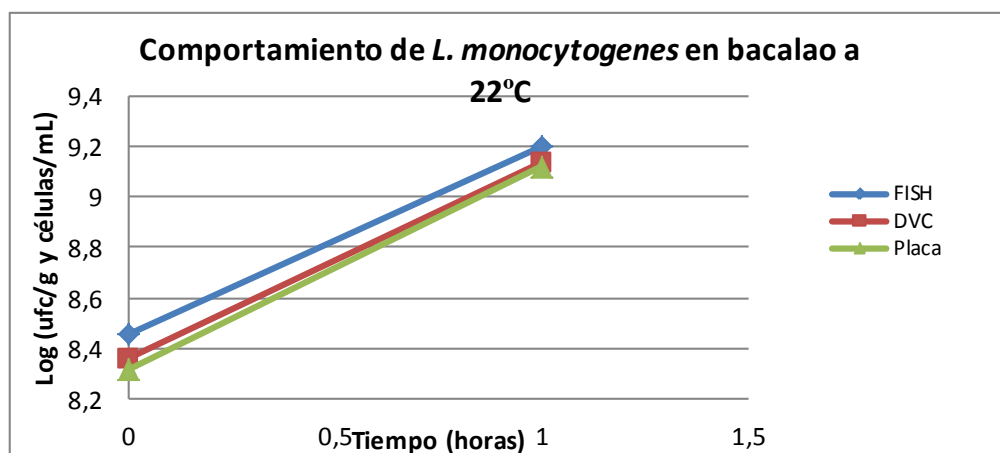
Estadísticamente, para las temperaturas ensayadas 4°C y 8°C los recuentos de *L. monocytogenes* no presentan diferencias significativas, con un valor-P (0,078), mientras que las técnicas empleadas DVC, FISH y placa si presentan diferencias estadísticamente significativas con un valor -P (0,002) y con un nivel de confianza del 95%.

### Supervivencia de *Listeria monocytogenes* en lonchas de bacalao.

Los resultados obtenidos del recuento en placa, FISH y DVC-FISH de las lonchas de bacalao contaminados artificialmente a temperatura ambiente (22°C) por un periodo de 1 hora, se muestran en la tabla 5 y gráfica 5. El cultivo inicial tenía una concentración de  $2,07 \times 10^8$ . Se observó que en el tiempo de una hora a 22°C *L. monocytogenes* aumentó en un orden de magnitud con respecto a la carga inicial en este alimento, a diferencia de los brotes de lechuga en los que se observó crecimiento pero sin aumentar el orden de magnitud. Con respecto a las técnicas empleadas los valores del recuento presentaron la misma tendencia que en el caso de la lechuga, como se observa en el grafico 5.

**TABLA 5:** Recuentos de la simulación a 22°C en bacalao.

Tiempo (horas)	Placa (ufc/g)	FISH (células/mL)	DVC-FISH(células/mL)
0	$2,07 \times 10^8$	$2,85 \times 10^8$	$2,29 \times 10^8$
1	$1,32 \times 10^9$	$1,57 \times 10^9$	$1,36 \times 10^9$



**GRAFICA 5:** Representación gráfica de los recuentos en placa, por FISH y mediante DVC en la simulación a 22°C en bacalao.

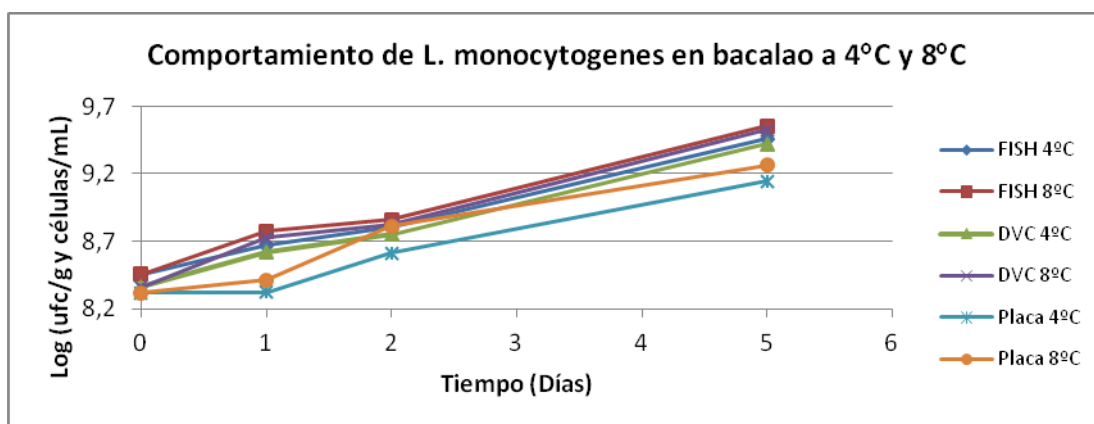
Posteriormente se obtuvieron los recuentos en placa, FISH y DVC-FISH de las simulaciones de lonchas de bacalao a 4°C y 8°C (tabla 6 y gráfica 6). El crecimiento de *Listeria* a 4°C y 8°C presentó el mismo comportamiento: Con el paso de los días fue aumentando progresivamente hasta el día 5, en el que se observó el cambio en un orden de magnitud en el número del microorganismo. Igualmente se observó, como en las anteriores simulaciones, que el recuento por DVC-FISH fue mayor que el obtenido en el cultivo, por lo que podemos pensar de nuevo en la presencia de formas



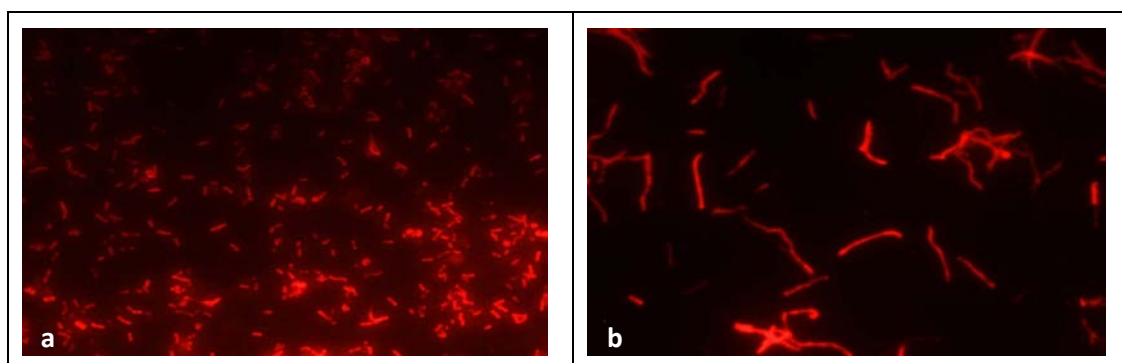
VBNC del microorganismo. En este ensayo, tanto para las temperaturas 4°C y 8°C como para las técnicas empleadas DVC-FISH, FISH y placa, los recuentos de *L. monocytogenes* si presentan diferencias estadísticamente significativas con un valor-P (0,012) y (0,000) respectivamente y un nivel de confianza del 95%.

**TABLA 6:** Recuentos de la simulación a 4°C y 8°C en bacalao.

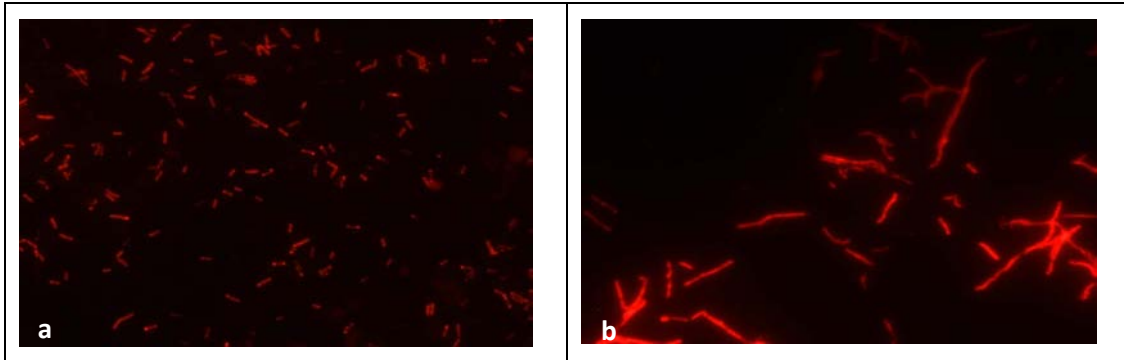
Tiempo (días)	4°C			8°C		
	Placa (ufc/g)	FISH (células/mL)	DVC-FISH (células/mL)	Placa (ufc/g)	FISH (células/mL)	DVC-FISH (células/mL)
0	2,07x10 <sup>8</sup>	2,85x10 <sup>8</sup>	2,29x10 <sup>8</sup>	2,07x10 <sup>8</sup>	2,85x10 <sup>8</sup>	2,29x10 <sup>8</sup>
1	2,10x10 <sup>8</sup>	4,67x10 <sup>8</sup>	4,18x10 <sup>8</sup>	2,60x10 <sup>8</sup>	5,97x10 <sup>8</sup>	5,35x10 <sup>8</sup>
2	4,10x10 <sup>8</sup>	6,44x10 <sup>8</sup>	5,66x10 <sup>8</sup>	6,50x10 <sup>8</sup>	7,25x10 <sup>8</sup>	6,71x10 <sup>8</sup>
5	1,39x10 <sup>9</sup>	2,86x10 <sup>9</sup>	2,62x10 <sup>9</sup>	1,84x10 <sup>9</sup>	3,59x10 <sup>9</sup>	3,36x10 <sup>9</sup>



**GRAFICA 6:** Representación gráfica de los recuentos en placa, por FISH y mediante DVC en la simulación a 4°C en bacalao.

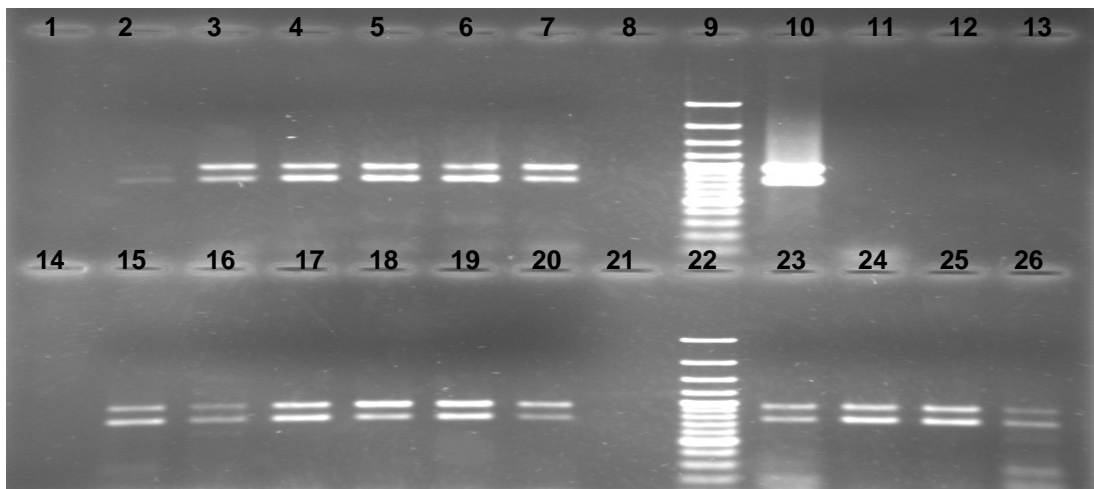


**FIGURA 5:** Células hibridadas de *L. monocytogenes* por: **a)** FISH (muestra lechuga 1h a 22°C) y **b)** DVC-FISH (muestra lechuga 2 días a 4°C).



**FIGURA 6:** Células hibridadas de *L. monocytogenes*: **a)** FISH (muestra bacalao 1 día 8°C) y **b)** DVC-FISH (muestra bacalao 0 días a 4°C)

La amplificación específica para el gen 938 pb del rDNA 16S del género *Listeria sp.* y un fragmento de 750 pb específico para la especie de *L. monocytogenes* que corresponde al gen *hlyA* se detectó (figura 7) en todos los ensayos y tiempos analizados. Por tanto, se volvió a comprobar que el DNA no es un parámetro que indique viabilidad bacteriana. En este caso también se analizó el RNA con estos mismos iniciadores obteniéndose el mismo resultado que para DNA y por tanto no siendo tampoco este parámetro adecuado para comprobar la viabilidad bacteriana.



**FIGURA 7.** PCR de los fragmentos de gen de *Listeria monocytogenes* a partir de la extracción de ADN. 9,22: marcador; 25-26: lechuga 22°C (0 y 1 hora); 23-24: bacalao 22°C (0 y 1 hora); 15-20: bacalao 4°C y 8°C (1,2 y 5 días); 2-7: lechuga 4°C y 8°C (1,2 y 5 días); 11: control negativo; 10: control positivo.

En general los resultados mostraron de una forma clara que *L. monocytogenes* presentó un crecimiento muy rápido a temperaturas de 22°C, fue mayor en las lonchas de bacalao que en la lechuga. Temperaturas bajas (refrigeración) no detienen el crecimiento del microorganismo, sino que este fue aumentando y tras 5 días logró aumentar

un orden de magnitud con respecto al número de la carga inicial. Es indispensable mantener la cadena de frío para evitar la proliferación de este patógeno, que puede causar intoxicaciones alimentarias y causar la muerte en poblaciones más susceptibles. Hay que tener en cuenta que esta es una medida indispensable para garantizar la seguridad de estos alimentos que son de consumo directo como es el caso de la lechuga y de las lonchas de bacalao.

## CONCLUSIONES

El método combinado de DVC-FISH es una herramienta muy útil y rápida para la detección y cuantificación de formas viables y VBNC de *L. monocytogenes* y *V. parahaemolyticus* en alimentos, pudiendo ser una alternativa a los métodos convencionales en muestras muy contaminadas.

La combinación de los métodos tradicionales de cultivo con métodos moleculares como FISH o DVC-FISH parece la estrategia más efectiva para la detección y cuantificación de *V. parahaemolyticus* y *L. monocytogenes* en matrices alimentarias.

El ADN se mantiene estable en condiciones de estrés que provoquen la muerte celular, por lo que la PCR no es una técnica útil para la detección diferenciada de células viables y no viables en muestras de alimentos.

Tanto *V. parahaemolyticus* como *L. monocytogenes* proliferan rápidamente a temperatura ambiente, aunque en el caso de *Listeria* la matriz parece influir en su crecimiento.

Aunque las temperaturas de refrigeración afectan a la viabilidad de *V. parahaemolyticus* en mejillones, los ensayos a 4°C y 8°C no presentan diferencias estadísticamente significativas.

Las temperaturas de refrigeración no comprometen la viabilidad de *L. monocytogenes*, siendo capaz de multiplicarse en estas condiciones. Los ensayos a 4°C y 8°C no presentan diferencias estadísticamente significativas en lechuga mientras que los recuentos en bacalao si presenta diferencias estadísticamente significativas, obteniéndose mayor crecimiento a 8°C.

El almacenamiento a temperaturas o tiempos inadecuados es un factor de riesgo importante para la infección por *Listeria monocytogenes* y *Vibrio parahaemolyticus* por consumo de alimentos contaminados. Es indispensable que los controles y programas para garantizar la inocuidad y seguridad de los alimentos se lleven a cabo con eficiencia en la cadena de producción así como en la cadena de transporte, manipulación y preparación de estos alimentos.

## REFERENCIAS

Amann, R. I., Ludwig, W. Schleifer, K. H. 1995. Phylogenetic identification and *in situ* detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*; 59: 143-169.

Armisen, T. G. and Servais, P. 2004. Combining direct viable count (DVC) and fluorescent *in situ* hybridisation (FISH) to enumerate viable *E. coli* in rivers and wastewaters. *Water Science and Technology*; 50(1):271-275.

Bansal, N.S., McDonell, F.H.Y., Smith, A., Arnold, G., Ibrahim, G.F. 1996. Multiplex PCR assay for the routine detection of *Listeria* in food. *Int. J. Food Microbiol.* 33, 293-300.

Caballero, E. 2011. Aplicación de la técnica DVC-FISH para evaluar la supervivencia en ostras de *Vibrio parahaemolyticus* y *Vibrio vulnificus* a diferentes temperaturas. Trabajo final de carrera. Universidad Politécnica de Valencia.

Cañigral I, Moreno Y, Alonso JL, González A, Ferrús MA. 2010. Detection of *Vibrio vulnificus* in seafood, seawater and wastewater samples from a Mediterranean coastal area. *Microbiology Research*; 165(8): 657-64

Cuesta, G. 2004. Detección y caracterización por métodos fenotípicos y moleculares de *Mycolata* formadores de espumas en estaciones depuradoras de aguas residuales domésticas con sistemas de fangos activos. Tesis doctoral. Universidad Politécnica de Valencia. Escuela Técnica Superior de Ingenieros Agrónomos. Valencia, España.

de Valk H et al. (2005). Surveillance of *Listeria* infections in Europe. *Eurosurveillance* 10:251-5

Heisick, J.E., Wagner, D.E., Niermand, M.L. and Peeler, J.T. (1989b) *Listeria* spp. Found on fresh market produce. *Appl. Environ. Microbiol.* 44, 1925-1927.

Ho, J.L., Shands, K.N., Friedland, G., Eckind, P. and Fraser, D.W. (1986) An outbreak of type 4b *Listeria monocytogenes* infection involving patients from eight Boston hospitals. *Arch. Intern. Med.* 146, 520-524.

Luan X. Y., Chen J. X., Zhang X. H., Jia J. T., Sun F. R. and Li Y. 2007. Comparison of different primers for rapid detection of *Vibrio parahaemolyticus* using the polymerase chain reaction. *Letters in Applied Microbiology*; 44: 242-247.

Martinez-Urtaza, J., Lozano-Leon, A., DePaola, A., et al. 2004. Characterization of pathogenic *Vibrio parahaemolyticus* isolates from clinical sources in Spain and comparison with Asian and North American pandemic isolates. *Journal of Clinical Microbiology*; 42(10): 4672-4678.

Mead PS, Dunne EF, Graves L, Wiedmann M, Patrick M, Hunter S, et al. Nationwide outbreak of listeriosis due to contaminated meat. *Epidemiol Infect* 2005; 1: 1-8.

Miliotis, M., Dennis, S. and Buchanan, R. 2005. *Vibrio parahaemolyticus* risk assessment: II. Hazard Identification. U.S. Food and Drug Administration (FDA).

Moreno, Y., Ferrús, M. A., Medina, E., Jiménez, A., Martínez, M. and Hernández, J. 2001. Direct detection of *Helicobacter pylori* in clinical samples by *in situ* hybridization. *Clinical Microbiology and Infection*, 7 (1): 1537.

Moreno, Y., Piqueres, P., Alonso, J. L., Jiménez, A., González, A. and Ferrús, M. A. 2007. Survival and viability of *Helicobacter pylori* after inoculation into chlorinated drinking water. *Water Research*; 41(15): 3490-3496.

Moreno Y., Ballesteros L., García-Hernández J., Santiago P., González A. Ferrús M.A., 2011. Specific detection of viable *Listeria monocytogenes* in Spanish wastewater treatment plants by Fluorescent In Situ Hybridization and PCR. *Water Research*; 45: 4634-4640

Pasolini, B., Alessi, E., De Medici, D. 2004. Workshop di aggiornamento su problematiche emergenti nel settore dei prodotti ittici. Istituto Superiore di Sanità. Roma. Rapporti ISTISAN 05/24. ISS 1123-3117.

Peiris et al. (2008). Gravad (Gravlax) and cold-smoked salmon, still a potential source of listeriosis. *Journal of foodservice*, 20 :15-20

Piqueres, P. 2005. Desarrollo de técnicas moleculares de alta precisión para la detección y cuantificación de especies patógenas de *Helicobacter* en muestras ambientales: evidencia del potencial de transmisión de aguas y alimentos. Tesis doctoral. Universidad Politécnica de Valencia. Escuela Técnica Superior de Ingenieros Agrónomos. Valencia, España.

Villarino, A., Bouvet, O.M.M., Regnault, B., Martin-Delautre, S., Grimont, A.D. 2000. Exploring the frontier between life and death in *Escherichia coli*: evaluation of different viability markers in live and heat-or UV-killed cells. *Research in Microbiology*; 151: 755-760.

Vitas AI, Aguado V, García-Jalón I. (2004). Occurrence of *Listeria monocytogenes* in fresh and processed foods in Navarra (Spain) *Int J Food Microbiol*, 90:349-356.

Weichart, D., McDougald, D., Jacobs, D. and Kjelleberg, S. 1997. In situ analysis of nucleic acids in cold-induced nonculturable *Vibrio vulnificus*. *Applied and Environmental Microbiology*; 63(7): 2754-2758.

Woese, C.R. 1987. Bacterial evolution. *Microbiological Reviews*; 51: 221-271.

Zamora A, Ossa H, Carrascal A, Poutou R, Jimenez D. (2000). Identificación Preliminar de *L. monocytogenes* por PCR. *Laboratorio Actual*, 17(33):38-41.