



Tesis de grado, Licenciatura en Bioquímica

EFFECTO DE LA APLICACIÓN DE ÁCIDO LÁCTICO SOBRE EL CRECIMIENTO DE *LISTERIA SPP.* AISLADAS DE ESTABLECIMIENTOS FRIGORÍFICOS NACIONALES.

María Jesús Acquistapace Aguiar

Tutora: Dra. Caterina Rufo

Laboratorio de Alimentos y Nutrición

Instituto Polo Tecnológico de Pando- Facultad de Química

Diciembre 2015

ÍNDICE

	Página
1.0 RESUMEN.....	3
2.0 INTRODUCCION.....	5
2.1 Características microbiológicas de la carne.....	5
2.1.1 Microbiología de la carne en aerobiosis.....	5
2.1.2 Microbiología de la carne en anaerobiosis.....	6
2.2 Enfermedades transmitidas por alimentos (ETAs): Listeriosis.....	7
2.3 Listeria.....	8
2.3.1 Listeria spp.....	8
2.3.2 Listeria monocytogenes.....	8
2.4 Estrategias de control en plantas frigoríficas.....	10
2.5 Métodos para la identificación de <i>Listeria spp</i>	11
2.6 Situación de nuestro país.....	13
3.0 OBJETIVOS.....	15
3.1 Objetivo general.....	15
3.2 Objetivos específicos.....	15
4.0 MATERIALES Y MÉTODOS.....	16
4.1 Toma y tratamiento de muestras.....	16
4.2 Recuento de microorganismos indicadores presentes sobre la superficie de las medias reses....	17
4.3 Aislamiento de Listeria spp.....	17
4.4 Identificación de los aislamientos.....	18
4.4.1 Identificación molecular.....	18
4.4.1.1 Extracción de ADN genómico.....	18
4.4.1.2 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).....	18
4.4.1.3 Diseño de primer Grayi.....	20
4.4.1.4 Electroforesis en gel de agarosa.....	20
4.4.2 Identificación bioquímica.....	21
4.5 Estudio del efecto del ácido láctico en placa.....	21
4.5.1 Preparación del inóculo.....	22

4.5.2 Preparación de las diluciones de solución de AL comercial.....	22
4.5.3 Siembra en microplaca e interpretación de los resultados.....	22
4.5.4 Recuento de células viables	23
4.6 Estudio del efecto del AL sobre el crecimiento de LM (L20) en carne.....	23
4.6.1 Inoculación con L20.....	24
4.6.2 Aplicación del AL sobre trozos de carne.....	24
4.6.3 Recuentos de LM en trozos de carne.....	24
4.7 Recuentos de BALs en carne envasada al vacío.....	25
5.0 RESULTADOS.....	26
5.1 Recuento de microorganismos indicadores presentes sobre la superficie de las medias reses....	26
5.2 Búsqueda y aislamiento de <i>Listeria spp</i>	27
5.3 Identificación de <i>listeria spp</i>	28
5.3.1 Diseño primers.....	28
5.3.2 Identificación molecular de <i>Listeria spp</i>	28
5.3.3 Identificación bioquímica.....	29
5.4 Efecto del AL en microplaca.....	31
5.5 Efecto del AL sobre L20 en carne envasada al vacío.....	32
5.6 Recuentos de BAL en carne.....	34
6.0 DISCUSIÓN.....	36
7.0 CONCLUSIÓN.....	39
8.0 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	40
9.0 ANEXOS	45
9.1 Anexo I.....	45
9.2 Anexo II.....	46
9.3 ANEXO III.....	47

1.0 RESUMEN

La presencia de patógenos en alimentos causa a nivel mundial más de 6 millones de hospitalizaciones y aproximadamente 9 mil muertes cada año. Uno de los principales patógenos relacionados con las enfermedades transmitidas por alimentos (ETAs) es *Listeria Monocytogenes* (LM), responsable de la listeriosis. Si bien es una enfermedad relativamente poco común, el 27% de las muertes son causadas por esta bacteria.

LM es un aerobio facultativo, ubicuo, crece en un amplio rango de pH, y a temperaturas de refrigeración. Estas características hacen de LM un patógeno de difícil eliminación en la industria de alimentos y sobre todo en la industria cárnica. Entre las estrategias utilizadas para controlar patógenos en carnes está la aplicación de ácido láctico (AL) que posee efectos bacteriostáticos y bactericidas.

El objetivo de este trabajo fue estudiar el efecto del AL sobre el crecimiento de cepas de *Listeria* aisladas de planta frigorífica. Para ello se tomaron muestras en dos establecimientos frigoríficos: F1 y F2. En F1 se muestrearon 12 medias reses, se tomó un corte de asado y muestras de recortes al final del proceso del desosado. En el establecimiento F2 se tomaron 8 muestras de recortes de la sala de desosado.

Sobre la superficie de medias reses se estudiaron los siguientes microorganismos indicadores: *S. aureus*, Coliformes, Enterobacterias y Mesófilos Aerobios totales. Todos presentaron recuentos varios órdenes de magnitud por debajo de los límites establecidos por las normativas vigentes, confirmando el buen manejo de las medias reses durante la faena en la planta frigorífica.

Por otra parte, también se realizó búsqueda de *Listeria spp.* sobre las medias reses muestreadas y en las muestras tomadas de F1 y F2. Sobre la superficie de las medias reses no se recuperó *Listeria spp.*, sin embargo todas las muestras de carne analizadas presentaron *Listeria spp.* Posteriormente, se identificó género y especie de cada aislamiento mediante PCR convencional y multiplex respectivamente. De los 35 aislamientos 29 fueron de *Listeria innocua* (LI) y 6 LM.

Para evaluar el efecto del AL en el crecimiento de *Listeria* en microplaca, se seleccionaron 12 aislados de LI (L1, L2, L3, L4, L10, L23, L29, L38, L40, L44, L45, L46) y 6 de LM (L11, L20, L21, L22, L28, L43). Se observó que AL 0,3% inhibió el crecimiento de todos los aislados y a 0,7% no permitió el crecimiento.

En carnes inoculadas con LM (L20), envasada al vacío y conservada a 4°C, se observó que sin y con 5% AL, a las 7 semanas ambas alcanzaron cargas bacterianas similares, y redujeron 1.5 log con respecto al inóculo. Esto sugiere que la disminución no está dada únicamente por el AL. A su vez aumentaron los recuentos de bacterias ácido lácticas, desde 2.7 log ufc/g hasta valores por encima de 7 log ufc/g.

Estos resultados evidencian la presencia de LM en carnes uruguayas, y en las condiciones de envasado al vacío y refrigeradas a 4°C, el AL podría utilizarse como una estrategia más para el control de LM.

Palabras claves: Carne, Inocuidad, *Listeria monocytogenes*, Ácido Láctico.

2.0 INTRODUCCION

2.1 CARACTERÍSTICAS MICROBIOLÓGICAS DE LA CARNE

La carne es una excelente fuente de proteínas, vitaminas y minerales (Price et al., 1976), con bajo contenido de carbohidratos y alta actividad de agua (Doyle et al, 2007), lo que la hace un excelente medio de cultivo para el desarrollo de varios microorganismos (Carrillo et al., 2007). La carne disponible en el mercado es resultado de un largo proceso que incluye diferentes etapas (transporte, manipulación, faena y almacenamiento). En cada una de estas etapas la carne es susceptible a contaminación microbiana (Gill et al., 2000). Durante el proceso de faena se implementan diversas estrategias de control para lograr disminuir la contaminación del producto, sin embargo algunos microorganismos logran establecerse en el producto final. Algunos de estos microorganismos pueden causar deterioro de la carne y enfermedades infecciosas en humanos (Komba et al., 2012).

Dentro de la heterogeneidad de la microflora presente en carne fresca, se encuentran habitualmente *Pseudomonas*, géneros de la familia *Enterbacteriaceae*, *Brochotrix thermosphacta* y *Lactobacillus*. Mientras que entre las bacterias patógenas se pueden encontrar *Salmonella*, *Listeria monocytogenes* (LM), *Staphilococcus aureus* y *E. Coli* entre otras (Cardenas, et al., 2006).

La composición de la población microbiana variará en función de diferentes parámetros como pH, actividad del agua (aw), composición, temperatura y condiciones de almacenamiento (Ercolini et al., 2006; Li et al., 2006; Adu-Gyamfi et al., 2012), siendo la refrigeración el factor que más incide sobre la preservación y la inocuidad de la carne (Jay, 1996). Sumado a la refrigeración se utiliza el envasado al vacío para prolongar la vida útil manteniendo las características sensoriales y organolépticas de la carne (Gill et al., 1989; Rodas et al, 2011). Por lo tanto los microorganismos capaces de desarrollarse a bajas temperaturas y en anaerobiosis serán los causantes de deterioro y enfermedades en humanos.

2.1.1 Microbiología de la carne en aerobiosis

En carne refrigerada y almacenada en atmosfera aerobia, las *Pseudomonas spp.* son la población bacteriana predominante, siendo las responsables del deterioro de la misma (Ercolini et al., 2009). Las *Pseudomonas* son bacterias Gram negativas, móviles y aerobias estrictas. Presentan una distribución ubicua, y son pocos resistentes al calor. Algunas especies de este género son psicófilos, por tanto también pueden desarrollarse y causar deterioro a temperatura de

refrigeración. Estas bacterias son las responsables del mal olor en los alimentos cuando se encuentran en poblaciones de 10^6 ufc/g (Gill, 1983).

Dentro de los microorganismos aerobios también se encuentran los coliformes totales, pertenecientes a la familia *Enterobacteriaceae*, son bacilos Gram negativos, no formadoras de esporas. Dentro de este grupo se encuentran los coliformes fecales representados mayoritariamente por *E. Coli* (Hayes, 1993). Estos presentan una distribución ubicua, se encuentran en el intestino y en una amplia variedad de ambientes como suelo y plantas (Ramos et al., 2008). La presencia de coliformes fecales en carne es indicativa de contaminación fecal de origen humano o animal.

Así como los recuentos de *E. coli* indican contaminación fecal, el recuento de mesófilos aerobios totales se utiliza para indicar la calidad sanitaria del producto. Los microorganismos mesófilos aerobios agrupan todas las bacterias que son capaces de crecer en aerobiosis a una temperatura entre 20- 45°C.

Entre los patógenos que pueden desarrollarse en estas condiciones se encuentran *E. Coli*, *Salmonella*, *LM* y *Staphylococcus aureus*, entre otros.

2.1.2 Microbiología de la carne en anaerobiosis

La ausencia de O_2 elimina el crecimiento de microorganismos aerobios (Nychas et al., 2008) dando lugar al desarrollo de microorganismos Gram negativos de la familia *Enterobacteriaceae* (Brightwell et al., 2007) y Gram positivos como Bacterias ácido lácticas (BALs) (Rosset , 1982), y patógenos como LM (Jones et al, 2008).

Las BAL son bacterias Gram positivas, anaerobias estrictas o aerotolerantes (Madigan et al., 2004), generalmente inmóviles, no esporuladas ni pigmentadas y toleran concentraciones altas de sal y bajos valores de pH (Axelsson, 2004). Se dividen en 11 géneros y éstos a su vez se subdividen en más de dieciséis especies, dentro de las cuales siete (*Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Lactococcus*, *Enterococcus* y *Corynebacterium*) son capaces de producir bacteriocinas (Fiorentini et al., 2001). Al final de la vida útil de la carne, cuando el número de BALs es elevado, presentan aromas fuertemente ácidos, debido a la alta producción de AL.

En cuanto a patógenos, la capacidad tanto de supervivencia como de crecimiento de LM a temperaturas de refrigeración y en atmósferas con bajo nivel de oxígeno e incluso anaerobiosis (Mor-Mur et al., 2010) supone un problema a resolver por la industria de alimentos y en particular la cárnica.

2.2 ENFERMEDADES TRANSMITIDAS POR ALIMENTOS (ETAS): LISTERIOSIS

La presencia de patógenos en alimentos causa a nivel mundial más de 6 millones de hospitalizaciones y aproximadamente 9 mil muertes cada año (Mead et al., 1999). La Organización Mundial de la Salud (FAO/OMS, 2004) indica que el 30% de las personas en los países industrializados se ven afectadas anualmente.

En Uruguay el primer caso de ETAs fue en el año 1993 y a partir de la fecha los casos han ido en aumento (M.S.P, 1997), en el año 1999 se registraron 40 brotes de origen bacteriano (M.S.P, 1999). En Estados Unidos se estima que cada año ocurren 76 millones de casos de ETAs, 325.000 hospitalizaciones y 5.000 muertes (FAO/OMS, 1997).

Uno de los principales patógenos relacionados con las ETAs es LM (Rivera et al., 2006), responsable de la listeriosis. Si bien la listeriosis es una enfermedad relativamente poco común ya que solo representa el 0.1% de las ETAs, el 27% de las muertes son causadas por esta bacteria (Institute of Food Technologists., 2004). Dado su gravedad y el hecho de que está muy frecuentemente asociada a alimentos, es reconocida a nivel mundial como una de las ETAs de mayor relevancia social y económica (Roberts D., 1989; Chasseignaux et al., 2002).

LM afecta principalmente a mujeres embarazadas, recién nacidos, ancianos y personas inmunodeprimidas (McLauchlin et al., 2004). Si bien la listeriosis se puede transmitir de múltiples maneras: en forma vertical (de madre a hijo), zoonótica (de animal a persona) o nosocomial (contraída en un hospital), el 99% de los casos de listeriosis es de origen alimentario (Mead et al., 1999).

Al ser por medio de la ingesta de alimentos contaminados la mayor causa de contraer listeriosis, el tracto gastrointestinal es la principal puerta de entrada. Una vez que se ingiere LM, logra resistir el ambiente del estómago y llega al intestino, donde en pocos minutos atraviesa el epitelio intestinal e inicia su reproducción intracelular. La bacteria se multiplica y se transporta por la sangre o linfa hasta alcanzar el hígado, placenta o bazo (órganos diana predominantes de este patógeno) (Pilgrim et al., 2003), donde se replican dentro de las células epiteliales o macrófagos (Mengaud, 1988). Si la bacteria logra evadir las barreras del sistema inmune, y no se logra una efectiva respuesta adaptativa, ésta ingresa nuevamente al torrente sanguíneo y alcanza el cerebro o la placenta, llegando a causar infecciones altamente letales.

Esta enfermedad se puede presentar de dos formas: invasiva y no invasiva. En ésta última, los síntomas pueden ser leves (fiebre, dolores musculares y síntomas gastrointestinales), ocurriendo generalmente en personas sanas tras la ingestión de dosis altas de LM. En la forma invasiva, es capaz de producir aborto en mujeres gestantes, neumonías, granulomas diseminados en recién nacidos, meningitis, meningoencefalitis y septicemia (Rosaler, 2004). El periodo de incubación de esta enfermedad puede variar desde días hasta dos o tres meses, lo que dificulta la identificación de la fuente de contaminación.

2.3 LISTERIA

2.3.1 *Listeria spp.*

Según National Center for Biotechnology Information (NCBI) el género *Listeria* se divide en ocho especies: LM, *L. innocua* (LI), *L. ivanovii*, *L. seeligeri*, *L. welshimeri*, *L. grayi*, *L. marthii* y *L. rocourtiae*. Éstas dos últimas fueron recientemente identificadas (Graves et al., 2010; Leclercq et al., 2010) siendo LM la única especie patógena para el hombre (McLauchlin et al., 1999). Todas las especies del género *Listeria* son bacterias bacilares Gram positivas, no formadoras de esporas y presentan movilidad entre 20-25°C debido a la presencia de un flagelo polar, pero son inmóviles a 37°C (Maestre, 2014).

El género *Listeria* presenta una distribución ubicua, logra sobrevivir largos periodos de tiempo en diferentes ambientes como suelo, agua y ambientes de producción de alimentos (Pérez et al., 2008). Es capaz de crecer en un amplio rango de temperatura (incluso a temperatura de refrigeración), y en ambientes con altas concentraciones de sal, pero se inactiva con tratamientos térmicos de 60 °C durante 30 minutos.

2.3.2 *Listeria monocytogenes* (LM)

LM es morfológicamente similar a las demás especies de su género, solo la distinguen algunas características bioquímicas: presentan actividad B- hemolítica en agar sangre y genera el factor CAMP positivo con *S. aureus*.

En la tabla 1 se muestran algunas condiciones que limitan el crecimiento y supervivencia de LM.

Tabla 1. Condiciones de crecimiento de LM (FSAI, 2003) (UE, 2004, 2008).

Factor	Puede crecer			Puede sobrevivir pero no crecer
	Límite inferior	Optimo	Límite superior	
Temperatura (°C)	-1.5 - + 3.0	30.0-37.0	45.0	-18.0 °C
pH	4.2-4.3	7.0	9.4-9.5	3.3 – 4.2
Actividad agua(Aw)	0.90- 0.93	0.99	> 0.99	<0.90
Concentración de sal (%)	< 0.5	0.7	12- 16	≥20
Atmosfera	Es un anaerobio facultativo que puede crecer en ausencia de oxígeno.			

LM presenta 13 serovares distintos: 1/2a, 1/2b, 1/2c, 3a, 3b, 3c, 4a, 4ab, 4b, 4c, 4d, 4e y 7, de los cuales solo tres de ellos (1/2a, 1/2b and 4b) son los responsables del 90% de los casos de listeriosis en humanos (Gellin et al., 1989; Swaminathan et al., 2001). Según estudios realizados por Bosilevac y colaboradores (2007) en carnes uruguayas, los únicos serotipos encontrados de LM fueron 1/2a, 1/2b, 1/2c y 4b.

Existen serotipos de LM tanto virulentos como avirulentos y estas diferencias pueden deberse a polimorfismos en las secuencias nucleotídicas de sus genes, a mutaciones puntuales y/o la presencia o ausencia de algún gen de virulencia. Existen diferentes genes de virulencia en el cromosoma de LM siendo algunos de ellos: *prfA*, *plcA*, *hly*, *mpl*, *actA* y *plcB*.

El gen *iap* (invasion- associated protein) es común en todas las especies de *Listeria* y codifica la proteína p60 (Rodríguez et al., 2004). La proteína p60 es una proteína extracelular de 60 KDa, asociada a la adhesión de células de mamífero, se expresa durante el crecimiento de LM en el huésped (Kuhn et al., 1989) y está involucrada en la formación del septum durante la división celular. Además es la responsable de la invasión listerial en fagocitos no profesionales.

La dosis infectiva de LM está relacionada tanto con la susceptibilidad del huésped como con el nivel de contaminación del alimento (Maukonen et al., 2003). Esta enfermedad afecta principalmente a ancianos, mujeres embarazadas, recién nacidos e inmunodeprimidos (McLauchlin et al., 1997) con dosis tan bajas de tan solo 100 células puede resultarles en una toxicoinfección (Institute of Food Technologists., 2004). Por otra parte, para adultos sanos resulta letal la ingesta de dosis de 10^5 y 10^6 ufc/g.

Debido a la capacidad que presenta LM de resistir diferentes condiciones ambientales se hace cada vez más difícil su eliminación en los procesos de elaboración de alimentos (Rivera et al.,

2006), aumentando el riesgo de transmitirse a una amplia variedad de alimentos (Medrano et al., 2006).

El ingreso de LM a las plantas de procesamiento puede ocurrir por diversas maneras ya sea, por tierra en los zapatos de los trabajadores, en la ropa y en equipos de transporte, por heces de animales contaminados con la bacteria y posiblemente por individuos portadores (Rocourt et al., 1997), llegando a establecerse transitoriamente o permanecer por meses o años en una planta o en una línea de producción (Lunden et al., 2000; Tompkin, 2002).

Además, esta bacteria es capaz de adherirse a superficies donde forma colonias protegidas por una capa de polisacáridos extracelulares denominada biofilms, haciendo a la bacteria más resistente a los agentes químicos y físicos, pudiendo sobrevivir por largos periodos con aportes mínimos de nutrientes. Estas colonias protegidas por biofilms, son más resistentes a los procesos de limpieza (Carpentier et al., 2004) haciendo difícil la eliminación de LM de las plantas de procesamiento de alimentos.

Dada la capacidad que presenta LM de crecer a temperaturas de refrigeración, en ausencia de oxígeno (Mor-Mur et al., 2010) y soportar el pH de la carne (5.4-5.8) resulta en un gran problema para la industria frigorífica. Los cortes cárnicos de exportación con mayor valor agregado son envasados al vacío y conservados a 0 - 4°C, condiciones en las que LM puede crecer, por lo tanto es de gran importancia implementar medidas para su control y así incrementar la inocuidad de la carne.

2.4 ESTRATEGIAS DE CONTROL EN PLANTAS FRIGORÍFICAS

Existen numerosos tratamientos tanto físicos como químicos para la descontaminación de carcasas. Entre las estrategias más utilizadas está la del lavado con agua caliente y la aplicación de una variedad de ácidos orgánicos tales como ácido acético, cítrico y láctico. Si bien el lavado con agua caliente logra buenos resultados, es una operación costosa (Buncic, et al., 2013). El ácido láctico (AL) es un descontaminante aceptable porque es una sustancia natural, no- toxico y es producido naturalmente por la bacteria ácido láctica (Coll et al., 2008). Produce efectos bacteriostáticos y bactericidas, útiles en la descontaminación de carcasas bovinas, cortes y productos cárnicos resultando en la extensión de la vida útil de la carne (Kozempel et al., 2003).

Estados Unidos permitió el uso de AL en carne desde 1999, no así la Unión Europea que no fue sino hasta el 26 de julio de 2011 que la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA) en su dictamen sobre la evaluación de la seguridad y la eficacia del AL para eliminar la contaminación microbiana de superficie de las canales, piezas y recortes de carne concluyó que tratamientos con AL no presentan riesgos para la salud de los consumidores, siempre que la sustancia cumpla las especificaciones en relación con los aditivos alimentarios y aprobó su uso en 2013.

La acción antimicrobiana del AL se debe a la alteración del pH en la superficie de la carne, ya que proporciona un bajo pH (Valencia, 2009). La eficacia va a depender de la concertación del ácido, la temperatura de la solución, el método y el tiempo de contacto (Shufiur, 2003) como también si la bacteria se encuentra cubierta por partes con grasa, además hay lugares en la carcasa donde el químico no llega a tener contacto.

El AL puede ser aplicado durante la faena después del desuello o evisceración pero debe ser antes de refrigerar las carcasas. Según la EFSA, tratamientos con AL, reducen significativamente la contaminación microbiológica de *E. coli* y *Salmonella* en comparación con tratamientos sin AL o con agua potable. El AL se debe utilizar únicamente en forma de pulverización o nebulización, en concentraciones entre 2% y 5%, a temperaturas inferiores a 55°C, siendo 2 % la concentración más utilizada en la industria (Dormedy et al, 2000).

A pesar que la industria frigorífica es tan importante para la economía del país, y las implicancias que presenta el hallazgo de LM. La mayoría de los estudios de AL están dirigidos a *E. Coli*, hay muy pocos datos sobre el efecto en *Listeria*.

La presencia de cualquier especie de *Listeria* en un alimento procesado, es indicativo de que su eliminación no se llevó a cabo de forma efectiva durante el procesamiento del alimento (Jinneman et al., 2003). En EE.UU. la Food and Drug Administration (FDA) y Food Safety Inspection Service (FSIS), tienen una política de tolerancia cero, es decir, un resultado negativo de LM en 25 g de producto listo para el consumo. Actualmente, existen distintos métodos que permiten la identificación de *Listeria spp.*, con distintos niveles de sensibilidad y rapidez.

2.5 MÉTODOS PARA LA IDENTIFICACIÓN DE *LISTERIA SPP.*

No todas las especies de *Listeria*, ni serotipos son responsables de causar listeriosis, y dadas las exigencias en el producto de tolerancia cero, es imprescindible del uso de técnicas que permitan su identificación y diferenciación. Existen diferentes métodos tanto bioquímicos como moleculares que

permiten la identificación y diferenciación de las distintas especies de *Listeria*. Entre los métodos bioquímicos se encuentran técnicas básicas como la tinción de Gram, catalasa, oxidasa, hidrólisis de la esculina que permiten una identificación rápida del género *Listeria*, además, existen otras técnicas que permiten la identificación y diferenciación de especies de *Listeria* (Tabla 2). Entre ellos el sistema de galerías API es un ensayo miniaturizado y estandarizado, que se basa en reacciones de fermentaciones de azúcares y ensayos enzimáticos. En cuanto a técnicas moleculares también es posible alcanzar diferentes niveles de identificación. Entre los métodos que permiten una caracterización tanto a nivel de género como de especies se encuentran la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), PCR a tiempo real (qPCR), técnica de Transcriptasa- Reversa (RT-PCR), métodos inmunológicos, fluorescencia y secuenciación de bases nitrogenadas. Por otra parte, la técnica de electroforesis en geles de campo pulsado (PFGE) permite una identificación a nivel de subespecie (Reissbrodt, 2004; Gall, 2001). Estos métodos se basan en genes involucrados en la patogenicidad de LM como el gen *iap*, *pfrA*, *hlyA*.

Tabla 2. Reacciones bioquímicas para la identificación de *Listeria spp.*

Especies	Hemólisis	Producción de ácido		Ensayo de CAMP	
		Rhamnosa	Xilosa	<i>S. aureus</i>	<i>R. equi</i>
<i>L. monocytogenes</i>	+	+	-	+	-
<i>L. innocua</i>	-	V	-	-	-
<i>L. ivanovii</i>	+	-	+	-	+
<i>L. seeligeri</i>	(+)	-	+	(+)	-
<i>L. welshimeri</i>	-	V	+	-	-
<i>L. grayi</i>	-	-	-	-	-
V: Reacción variable (+): Reacción débil +: > 90% de reacciones positivas -: sin reacción					

El método de PCR se basa en la amplificación de un fragmento específico de ADN, donde se generan millones de copias del mismo. Burt y colaboradores (1999), utilizaron la técnica de PCR Multiplex para la identificación y diferenciación de diferentes especies de *Listeria*, mediante amplificación del gen *iap*. Dicho gen es conservado en las distintas especies de *Listeria* y cada una de ellas presentan regiones características (Pilgrim et al., 2003) por tanto, una combinación de cinco cebadores permite la identificación y diferenciación de especies de *Listeria* (Mercado- Martinez et al., 2014). A pesar de ser una técnica muy sensible, es necesario una serie de pasos previos en la muestra, como pre- enriquecimientos, enriquecimientos selectivos y aislamientos, los cuales llevan mínimo 5 días. Otra desventaja de esta técnica es que no permite cuantificar.

La técnica qPCR es robusta, sensible y en comparación con el método convencional de PCR es más rápida y no requiere manipulación del producto de PCR luego de ser amplificado (Norton, 2002). La técnica de qPCR permite monitorear la aparición de ADN mediante el uso de fluoróforos, dado que libera fluorescencia cada vez que se realiza una nueva copia del ADN molde, y por tanto la fluorescencia es proporcional a la cantidad de ADN generado. En esta técnica se pueden ahorrar algunos pasos previos de enriquecimiento de la muestra, como también posibilita cuantificar la cantidad de ADN diana inicial en la muestra.

2.6 SITUACIÓN DE NUESTRO PAÍS

Según un informe en el año 2013 del Departamento de Agricultura de Estados Unidos (USDA), Uruguay se sitúa en el sexto país en el mundo con mayores exportaciones de carne, lo cual genera un importante aporte de divisas para nuestro país (INAC). Los cortes cárnicos de mayor valor se comercializan envasados al vacío y pueden ser conservados durante 4 meses si se mantienen a temperaturas de $0\pm 1^{\circ}\text{C}$ y un máximo de dos meses si se mantienen a $+4^{\circ}\text{C}$ dicha estrategia no previene el crecimiento de especies bacterianas psicrótrofas como bacterias ácido lácticas (Jones et al, 2008) ni patógenas como LM.

Hasta el momento no hay datos nacionales disponibles sobre prevalencia de LM en carne, sin embargo hay estudios internacionales donde se reporta la presencia del patógeno en carnes provenientes de nuestro país. Bosilevac y colaboradores (2007), compararon carnes uruguayas con carnes provenientes de Australia y Nueva Zelanda, siendo las uruguayas las que presentaron recuentos mayores de los microorganismos indicadores estudiados (bacterias lácticas, Enterobacterias, *E. Coli*, Coliformes y *Staphylococcus aureus*) y de *Listeria*. En el estudio se analizaron un total de 226 muestras de carnes uruguayas, de las cuales 66 fueron positivas para listeria. Si bien las carnes provenientes de Australia y Nueva Zelanda presentaron muestras positivas para LM (2,0% y 2,3% de respectivamente), las carnes uruguayas fueron las que presentaron una mayor prevalencia de LM (24%) (Bosilevac et al, 2007).

Sumado a esto, en el año 2012 se detectó la presencia de LM en carnes uruguayas con destino a Rusia, lo cual resultó en una suspensión preventiva en las exportaciones de los frigoríficos vinculados. A partir de estos hallazgos, el MGAP como medida de control implementó un plan de muestreo obligatorio de 5 muestras por contenedor para los establecimientos que exporten a dicho mercado. Uruguay como país exportador debe cumplir con la reglamentación requerida por los mercados compradores. Si bien en Estados Unidos se permite el lavado de las carcasas con AL desde

1993 (Koomarie et al 2005), recién a partir del año 2013 la Unión Europea aprobó su uso. Por tanto frigoríficos nacionales pueden sumar esta estrategia de lavado a las prácticas habituales con el fin de mejorar la inocuidad del proceso y producto.

La industria Nacional, actualmente se encuentra implementando esta intervención, por lo tanto se hace necesario comenzar a estudiar los parámetros de esta aplicación, para lograr que la misma cumpla con el objetivo final de garantizar la inocuidad de la carne. Debido a su incipiente aplicación, no hay datos nacionales que evalúen esta aplicación en nuestras condiciones de producción ni como afectaría el comportamiento de nuestras carnes envasadas al vacío y enfriadas a +4°C, como habitualmente se comercializan en el mercado local.

Uruguay como países productor de carne, resulta necesario tomar medidas de control que permitan mejorar la inocuidad de las carnes, tanto para prevenir enfermedades como para evitar pérdidas económicas para el país. Por tanto, este proyecto es un primer acercamiento para aislar y confirmar la presencia de *Listeria* en carne y conocer el alcance de la aplicación del AL, definiendo algunos parámetros básicos como la concentración mínima necesaria para inhibir el crecimiento de *Listeria*.

3.0 OBJETIVOS

3.1 Objetivo general

- Estudiar el efecto del AL sobre el crecimiento de cepas de *Listeria spp.* aisladas de plantas frigoríficas nacionales.

3.2 Objetivos específicos

- Aislar e identificar diferentes especies de *Listeria* presentes en las muestras analizadas.
- Determinar la mínima concentración de AL que inhibe el crecimiento de *Listeria spp.* en microplaca.
- Estudiar el efecto del ácido láctico sobre el crecimiento de *Listeria* en carne envasada al vacío.

4.0 MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 TOMA Y TRATAMIENTO DE MUESTRAS

Se utilizó un muestreo no probabilístico y dirigido al tipo de muestras en las cuales había una alta probabilidad de encontrar *Listeria*.

Las muestras se tomaron en diferentes días de la superficie de medias reses y de recortes de carne durante la faena en dos plantas frigoríficas nacionales F1 y F2. Las plantas frigoríficas seleccionadas son plantas que por su operativa son representativas de la producción nacional.

En el establecimiento F1 se muestrearon un total de 12 medias reses (cuatro en una faena y ocho en otro día de faena) y se tomó un corte de asado y muestras de recortes de carne durante el proceso del desosado. En el establecimiento F2 se tomaron 8 muestras de recortes de carne de la sala de desosado. En la tabla 3 se indica los tipos de muestra que se tomaron en F1 y F2.

Tabla 3. Cantidad y tipo de muestras que se tomaron en los frigoríficos F1 y F2.

Frigorífico	Muestras tomadas	
F1	12 Medias reses	1 corte de carne (asado), 1 muestra de recortes.
F2	-	8 muestras de recortes

El muestreo de la superficie de las medias reses, se realizó mediante el uso de esponjas estériles previamente hidratadas con 10 mL de Buffer Butterfield (BF) (anexo I). Se utilizó una esponja por cada media res, la superficie total muestreada fue de aproximadamente 8000cm² (Bosilevac et al., 2003) donde se muestrearon las zonas del pecho, nalga y falda. El muestreo por cada zona se realizó haciendo pases de arriba hacia abajo y de izquierda a derecha y viceversa.

Los recortes de carne se tomaron en las plantas frigoríficas en diferentes tiempos y lugares durante el proceso de desosado.

Las esponjas y recortes de carne se trasladaron inmediatamente refrigeradas hacia el laboratorio para su análisis. A las esponjas se les adicionó asépticamente 15 ml de BF y se homogeneizaron en stomacher Seward a 230 rpm durante un minuto. Los recortes de carne se fraccionaron en trozos de 10 gramos y cada trozo se colocó en bolsa para stomacher.

4.2 RECUESTO DE MICROORGANISMOS INDICADORES PRESENTES SOBRE LA SUPERFICIE DE LAS MEDIAS RESES

A partir del homogeneizado de las esponjas se realizaron diluciones decimales seriadas en BF. Se sembró 1 mL de cada dilución en Petrifilm 3M de acuerdo a las especificaciones del fabricante para el recuento de la siguiente flora acompañante:

- Petrifilm™ 3M para Mesofilos Aerobios Totales, se incubó 48 hs $\pm$ 3 hs a 35 °C $\pm$ 1°C. Colonias pueden presentar diferentes intensidades del tono rojo y diferentes tamaños.
- Petrifilm™ 3M para Coliformes, se incubó 24 hs $\pm$ 2 hs a 35°C $\pm$ 1°C, y para el recuento *Escherichia Coli* con un adicional de 24 hs $\pm$ 2 hs a 35°C $\pm$ 1°C. Las colonias características de Coliformes son rojas y azules con gas y para *Escherichia Coli* las colonias corresponden a las azules con gas.
- Petrifilm™ 3M para Enterobacterias se incubó 35°C $\pm$ 1°C durante 24hs $\pm$ 2 hs. Colonias características son rojas con zonas amarillas, rojas asociadas a burbujas de gas, como también rojas asociadas a una zona amarilla y a burbujas de gas.
- Petrifilm™ 3M para *Staphilococcus Aureus* se incubó 35° C $\pm$ 1° C durante 24h $\pm$ 2 hs, las colonias características son rojas-violetas. En caso de presentar colonias color negro éstas pueden ser o no *S. Aureus* para ello, se coloca disco confirmatorio y se re incubó 1- 3 horas a 35°C $\pm$ 1° C. Todas las zonas rosadas contar como *S. Aureus*.

Se realizó un ensayo de control negativo para cada tipo de Petrifilm.

4.3 AISLAMIENTO DE *LISTERIA SPP.*

Para el aislamiento de *Listeria spp.* de la superficie de medias reses y muestras de carne se procedió de igual manera, la única diferencia fue que en el caso de las medias reses se tomaron de 10 ml del homogeneizado de cada esponja y para la carne se tomaron 10 gramos por muestra. Tanto el caldo de las esponjas como los trozos de carne se colocaron en bolsas estériles para stomacher con 90 mL de medio Half Fraser (Oxoid), con suplemento Half Fraser SR0166 (Thermo), se incubaron a 30°C durante 24 $\pm$ 3 horas. Posteriormente se transfirieron 0,1 ml de los cultivos a 10 ml de medio de enriquecimiento secundario, Fraser (Oxoid), con agregado de suplemento Fraser SR0156 (Thermo) y se incubaron a 37°C durante 48h $\pm$ 3. Luego, se sembró por estrías una ansada sobre placas de agar Placam con agregado del suplemento selectivo para Palcam, código:

SR0150 (Thermo) y se incubaron 48 horas a 37° C. Las colonias características de *Listeria spp.* en agar Palcam presentan aproximadamente 2 mm de diámetro y una coloración verde- grisáceas con halo marrón oscuro-negro.

Las colonias con esta morfología se aislaron sucesivamente en placas con agar tripticasa de soja (TSA) (Oxoid) con el agregado de 0,6% de extracto de levadura (YE) (Oxoid) (anexo II) con el fin de obtener cultivos puros y se incubaron 18 horas a 37°C. Para la conservación de las mismas, se repicaron de a una colonia a un tubo de TSA-YE inclinado, y se incubaron 18 -20 horas a 37°C. Luego se mantienen refrigeradas (4±1°C) hasta el momento de su uso.

4.4 IDENTIFICACIÓN DE LOS AISLAMIENTOS

4.4.1 IDENTIFICACIÓN MOLECULAR

Para la identificación molecular de los aislamientos se procedió en primer lugar a la extracción del ADN genómico. Se realizó PCR convencional para la identificación del género *Listeria* seguida de PCR multiplex para identificar especie.

4.4.1.1 Extracción de ADN genómico

La extracción de ADN se realizó según el manual de procedimientos aislamientos, identificación y caracterización de *Listeria Monocytogenes* (OIE 2014). A partir de un cultivo joven de 18 horas en TSB-YE, se tomó una muestra con el asa y se sembró mediante estrías en placas de TSA-YE. Se incubaron a 37°C durante 18-24 horas. De esta palca se tomaron 5-7 colonias y se suspendieron en tubo eppendorf con 50 ul de buffer de lisis para PCR (anexo I). Se calentó a 99°C en termobloque (Thermomixer comfort) durante 15 minutos. Se dejó enfriar a temperatura ambiente y se agregó agua miliQ estéril, se centrifugó 1 minuto a máxima velocidad. El sobrenadante se utilizó como ADN molde para la reacción de PCR.

4.4.1.2 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

La reacción de PCR se realizó preparando una mezcla de Master Mix conteniendo buffer 1X, primers 100 ng (cada uno), desoxinucleotido trifosfato (dNTPs) 200 uM, MgCl₂ 1,5 mM y Taq polimerasa 1,5 U (ver tabla 4). Para su preparación, se multiplicó cada volumen de los reactivos por n+1, siendo n el número de reacciones de PCR a realizar. Se realizaron controles negativos

sustituyendo el ADN, por agua miliQ estéril, y como control positivo se utilizaron cepas de *Listeria innocua* (LI) cedidas por *ARS Culture Collection (NRRL)*. La reacción de PCR se realizó en un volumen final de 50 uL, el cual contenía 48 uL del Master Mix y 2 uL de ADN. La secuencia de los primers utilizados se muestra en la tabla 5. La reacción se realizó en termociclador Rotor –Gene Q y las condiciones de la corrida se muestran en la tabla 6.

Tabla 4. Reactivos utilizados en la Master Mix.

Reactivos	Volumen (uL)
Buffer PCR 1 X	5
MgCl 1.5 mM	3
Primers 100 ng (de cada uno)	2(x2)
dNTPs 200 uM	1
Taq pol. 1.5 U	0.3
Agua miliQ	34.7
Volumen final por tubo	48

Tabla 5. Secuencias de primers forward (Lis 1A) y reverse (Lis 1 B) utilizados en la amplificación del gen *iap* para la identificación del *Listeria*.

Primer	Secuencia 5´-3´	Tamaño de producto esperado (Kb)	Tm(°C)
Lis 1A	ATG AAT ATG AAA AAA GCA AC	1,6	48.2
Lis 1 B	TTA TAC GCG ACC GAA GCC AAC		61.3

Tabla 6. Condiciones de PCR convencional utilizadas para la identificación de *Listeria spp.*

Etapas	Temperatura (°C)	Tiempo (segundos)	Cantidad de ciclos
Desnaturalización	94	45	30
Hibridación	50	60	
Extensión	72	180	

Posteriormente se realizó identificación a nivel de especie mediante una adaptación del método PCR multiplex, descrita por Bubert y colaboradores (1999). En la tabla 7 se muestra las secuencias de los primers utilizados con su correspondiente temperatura de melting (Tm) y tamaño de producto esperado. Se utilizaron las secuencias de los primers descritos por Bubert, excepto la del primer grayi, que se procedió al diseño del mismo. En la tabla 8 se detallan las condiciones de la PCR multiplex.

Tabla 7. Secuencias de los primers forward (F) (Mono A, Ino 2, Siwi 2, Grayi 1) y reverse (R) Lis 1 B, con su correspondiente Tm y tamaño de producto esperado.

Primers	Especie	Secuencia 5´ - 3´	Tm (°C)	Producto esperado (pb)
Mono A (F)	<i>Monocytogenes</i>	CAA ACT GCT AAC ACA GCT ACT	57.1	660
Ino 2 (F)	<i>Innocua</i>	ACT AGC ACT CCA GTT GTT AAA C	58.4	870

Grayi 1 (F)	<i>Grayi</i>	GCT ACC AGC ACA CCA GCT AA	60.5	357
Siwi 2 (F)	<i>Ivanovii, Seeligeri, welshimeri</i>	TAA CTG AGG TAG CGA GCG AA	58.4	1200
Lis 1 B (R)		TTA TAC GCG ACC GAA GCC AAC	61.3	-

Tabla 8. Condiciones de PCR multiplex utilizadas para diferenciación de especies de *Listeria*.

Etapas	Temperatura (°C)	Tiempo (segundos)	Cantidad de ciclos
Desnaturalización	95	15	30
Hibridación	58	30	
Extensión	72	50	

4.4.1.3 Diseño de primer grayi

En base a la secuencia de ADN de *Listeria grayi* asociado a la proteína p60 (*iap*) gen obtenida de la base de datos NCBI (GenBank: JF967616.1), se diseñó el primer forward para *L. grayi*. Se alinearon secuencias del gen *iap* de diferentes especies de *Listeria* y se buscaron segmentos diferenciales que permitieran diseñar un primer específico para *L. grayi* y que genere un producto distinguible por su tamaño de los demás productos de PCR de las otras especies. Se seleccionó un primer que tuviera una Tm alrededor de los 60° C, compatible con los demás primers de la multiplex y de longitud entre 18 -24 bases. También se verificó que el contenido de G: C (Guanina: Citosina) estuviera entre el 40- 60%, y que no presente regiones auto- complementarias para evitar la formación de estructuras secundarias. A su vez se realizó el algoritmo BLAST para corroborar que el primer diseñado no presente complementariedad con las posibles secuencias involucradas en la reacción de PCR. El primer seleccionado fue sintetizado por MacroGen Inc. (Seoul, Korea).

4.4.1.4 Electroforesis en gel de agarosa

Los productos de PCR fueron visualizados mediante la realización de electroforesis en geles de agarosa al 1,2%. Los geles se prepararon utilizando 1.2 gramos de agarosa en 100 ml de buffer TAE 1X (ver anexo II) y teñidos con bromuro de etidio (1ug/ml). Los productos de PCR se sembraron junto con buffer Loading Dye 6X (Thermo Scientific) y se utilizó marcador de peso molecular 1 Kb (Thermo Scientific), para estimar el tamaño de los fragmentos de ADN. La corrida electroforética se realizó en cuba Enduro Gel XL Cat. E0160 Marca Labnet USA, a un campo eléctrico constante de 100 V, en buffer TAE 1X (anexo I) durante 40 minutos. Para la visualización de las bandas se utilizó un transiluminador de luz ultravioleta (DigiDoc-it™), donde se tomó registro fotográfico con cámara Canon PowerShot G9.

4.4.2 IDENTIFICACIÓN BIOQUÍMICA

La identificación bioquímica de los aislados se realizó mediante tres métodos: tinción de Gram, catalasa y galerías API (anexo II). Para la realización de los dos primeros se partió de una colonia de un cultivo joven (18-24 horas) de placas de TSA-YE.

En el sistema de galerías API *Listeria*, se suspendieron 3 colonias bien aisladas de cultivos jóvenes (18-24 horas) en una ampolla de API Suspension Medium (2ml) ajustando a una suspensión igual a 1 de Mc Farland. Se sembró 50 ul con dicha suspensión en todos los tubos de la galería, excepto en el ensayo DIM que se sembró 100ul. Se incubó 18-24 horas a 36°C ± 2°C en atmósfera aerobia (anexo II).

4.5 ESTUDIO DEL EFECTO DEL AL EN PLACA

El efecto inhibitorio y bactericida del AL sobre *Listeria spp.*, se determinó mediante la técnica de microdilución y posterior siembra en placas de agar Palcam para el recuento de viables. Este procedimiento se realizó con seis aislados de LM, ocho de LI y cuatro cepas de LI cedidas por *Agricultural Research Service (NRRL) Culture Collection* (tabla 9).

Tabla 9. Aislamientos de LI y LM utilizadas en ensayo en micoplaca con su correspondiente código.

Código de los aislamientos	Especie
L1	LI
L2	LI
L3	LI
L4	LI
L10	LI
L23	LI
L29	LI
L38	LI
L40	LI
L44	LI
L45	LI
L46	LI
L11	LM
L20	LM
L21	LM
L22	LM
L28	LM
L43	LM

En la técnica de microdilución se utilizaron placas de 96 pocillos, en cada pocillo se colocó una cantidad fija del microorganismo y concentraciones variables de AL. El ensayo se realizó por triplicado para cada cepa y los resultados se analizaron utilizando el programa IBM SPSS Statistics 20.

4.5.1 Preparación del inóculo

Los inóculos se prepararon a partir de cultivos en fase exponencial, ajustando la absorbancia (625nm) en un rango entre 0,08- 0,10 equivalente al patrón 0,5 de la escala de McFarland (1.5×10^8 ufc/ml). Posteriormente se realizó la dilución correspondiente en agua destilada estéril para llevar a una concentración final de 10^6 ufc/ml.

4.5.2 Preparación de las diluciones de solución de AL comercial

A partir de una solución comercial de AL 85% (Nortesur SA, Montevideo) se realizaron las diluciones correspondientes en agua destilada estéril. Se prepararon diluciones intermedias, de modo que luego del agregado del AL y TSB-YE se obtenga la concentración final deseada en el pocillo.

4.5.3 Siembra en microplaca e interpretación de resultados

Mediante el uso de pipeta multicanal, se colocaron 100 uL de TSB-YE en todos los pocillos de la microplaca, seguidos de 150 uL de AL a la concentración correspondiente en los pocillos de la primera fila, se homogeneizó, y se transfirieron 150 uL de la primera fila a los de la segunda fila, así sucesivamente hasta la sexta fila. Por último, se sembraron 100uL del inóculo 5×10^6 ufc/mL en todos los pocillos.

Se realizaron dos estudios, por un lado se utilizaron concentraciones finales de AL en el pocillo entre 5 y 2% y en el otro estudio entre 1,20 y 0,09% de AL, la concentración del inóculo final en el pocillo fue de $2,5 \times 10^6$ ufc/ml en ambos ensayos. Se realizaron controles positivos (inóculo + TSBYE) y controles negativos (la concentración más alta de ácido láctico + TSB-YE). Las placas se incubaron a 35°C durante 16- 20 horas. La lectura de absorbancia de la microplaca se realizó en lector de placas Multiskan Ex, Thermo Scientific® a 620 nm. Se considera la concentración mínima inhibitoria (CMI) a la mínima concentración de AL en donde no se observa desarrollo bacteriano (ausencia de turbidez).

4.5.4 Recuento de células viables

Para evaluar si el AL presenta acción bactericida sobre LM y LI, se sembró 100ul desde la mayor concentración de AL con presencia de turbidez hasta la concentración más alta de AL (sin turbidez), a placas de agar Palcam (figura 1). Las placas de agar Palcam se incubaron 24-48 horas a 37 °C. Se considera la concentración mínima bactericida (CMB) a la menor concentración de AL que en placas de agar es capaz de destruir el 99,99% del inoculo inicial de una muestra.

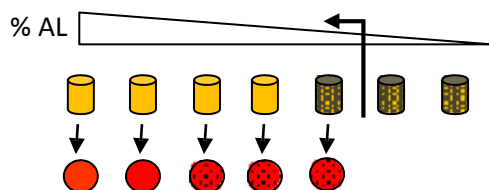


Figura 1. Representación de los pocillos de la microplaca (cilindros) y placas de agar Palcam (círculos), los puntos indican presencia de turbidez y crecimiento bacteriano respectivamente. La flecha indica el primer pocillo del cual se debería sembrar a placas de agar Palcam.

4.6 ESTUDIO DEL EFECTO DEL ÁCIDO LÁCTICO SOBRE EL CRECIMIENTO DE LM (L20) EN CARNE

La muestra utilizada fue un corte de bife angosto envasado al vacío adquirido en una carnicería de Montevideo. La muestra de carne se fraccionó en 80 trozos de 25 gramos aproximadamente cada uno, se separaron en dos grupos (A y B) de 40 trozos cada uno. El grupo A se inoculó con LM L20 de concentración conocida y se separaron en 5 subgrupos que se trataron con diferentes concentraciones de AL (0,0; 1,0; 2,5; 4,0 y 5,0%) generándose un total de ocho replicas para cada concentración de AL (figura 2). El grupo B no se inoculó con LM, solamente se trató con AL (0,0; 1,0; 2,5; 4,0 y 5,0%) generándose los mismos subgrupos que en grupo A. Todas las carnes se envasaron al vacío y se almacenaron a temperatura de refrigeración (4°C). Se analizaron cada 7 días durante 8 semanas.

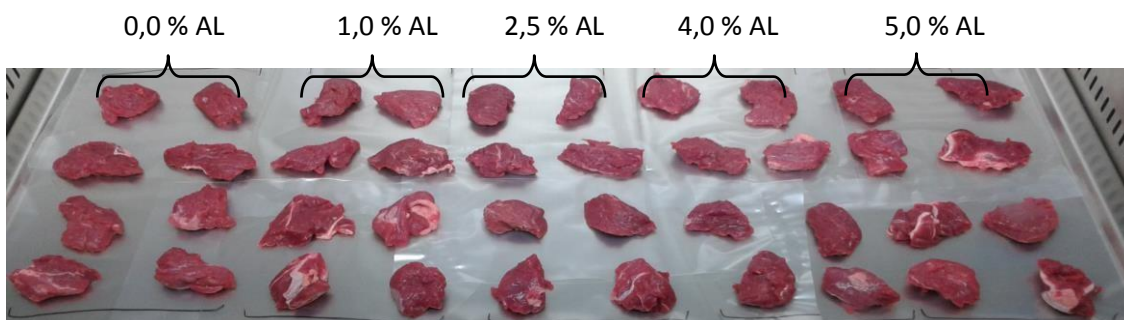


Figura 2. Trozos de carne de 25 gramos aproximadamente cada uno. Se generaron ocho replicas para cada concentración de AL.

4.6.1 Inoculación con L20

Los trozos de carne se colocaron sobre una superficie limpia, previamente expuesta a radiación UV durante 20 minutos. Estos se inocularon asépticamente con 1 ml de LM de 1×10^6 ufc/ml (preparado como se indica en el punto 5.1) y se dejaron 20 minutos a temperatura ambiente (22°C) para permitir la fijación del inóculo a la superficie de cada trozo (Carpenter et al. 2011).

4.6.2 Aplicación del AL sobre trozos de carne

Transcurridos los 20 minutos, las muestras se rociaron con la correspondiente concentración de AL (diluido como se indica en el punto 5.2, generando concentraciones de: 1,0; 2,5; 4,0 y 5,0%). La aplicación del AL se realizó según Carpenter et al, 2011, se roció cada trozo de carne por toda la superficie con una concentración determinada. Luego se dejaron 20 minutos para permitir la fijación del mismo, se envasaron al vacío individualmente en bolsas Cryovac T7335B en maquina envasadora (SAMMIC modelo V-410SGI) identificadas cada una con la concentración de AL a la que fueron tratadas. Se conservaron a $4^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ (para simular las condiciones de las carnes comercializadas en plaza) hasta su análisis, por un periodo máximo de 2 meses. Las muestras control (sin AL), se envasaron y almacenaron de la misma forma.

4.6.3 Recuentos de LM en trozos de carne

Los recuentos de LM se realizaron inmediatamente a la inoculación (tiempo 0) y cada siete días durante un período de dos meses.

Para el análisis de cada muestra se transfirió asépticamente el trozo de carne a bolsa estéril para stomacher y se homogeneizó con 225 mL de BF en Stomacher Seward 400C Lab Blenders, a 230 rpm durante 2 minutos. Se plaqueó 100 uL de dicho caldo en placas de agar Palcam sobre superficie y además se realizó dilución 1:10 en BF (dilución -1) que también se sembró 100uL. Las placas se incubaron a 37°C durante 24-48hs. Los resultados de los recuentos se analizaron utilizando el programa IBM SPSS Statistics 20.

4.7 RECuentOS DE BALS EN CARNE ENVASADA AL VAcÍO

El recuento de BALS se realizó tanto para el grupo A y B. El recuento de BALS se realizó a partir del mismo homogenizado del recuento para *Listeria*, con la diferencia que en este caso se realizaron diluciones -1, -2, -3 , -4 en BF y se sembró 1 ml de cada una de ellas en medio MRS agar mediante siembra incorporada. Las placas se incubaron a 25°C durante 72 horas. Las colonias de BALS en MRS generalmente son pequeñas, blancas-grisáceas, lisas o rugosas. Los resultados de los recuentos se analizaron utilizando el programa IBM SPSS Statistics 20.

5.0 RESULTADOS

5.1 RECuento DE MICROORGANISMOS INDICADORES PRESENTES SOBRE LA SUPERFICIE DE LAS MEDIAS RESES

Los microorganismos indicadores estudiados sobre la superficie de medias reses antes de entrar a la cámara de refrigeración fueron: *S. aureus*, Coliformes, Enterobacterias y Mesófilos Aerobios totales. Los recuentos de los mismos se visualizan en la Tabla 10, se expresaron como log ufc/100 cm² debido a los bajos valores encontrados. En la figura 3 se muestra de forma gráfica los recuentos (log ufc/100 cm²) de cada microorganismo estudiado, se observa una alta dispersión de los valores entre las medias reses para cada microorganismo.

Tabla 10. Recuento de microorganismos estudiados (log ufc/100 cm²) sobre la superficie de medias reses (media $\pm$ desviación estándar), con el número total de muestras.

Muestra	Recuento Petrifilms (log ufc/100 cm ²)			
	<i>S. aureus</i>	Coliformes	Aerobios	Enterobacterias
1	nd*	1,6	4,6	nd
2	nd	0,8	3,5	nd
3	nd	0,4	3,2	nd
4	nd	0,7	3,7	nd
5	1,8	0,5	3,1	0,8
6	1,7	0,6	3,1	0,8
7	0,7	0,8	3	1,2
8	0,4	0,5	2,6	0,5
9	1,3	0,6	3	2,1
10	1,3	0,3	3,1	0,5
11	2	1	3,4	1,4
12	1,4	0	2,6	0
Promedio $\pm$ DS**	1,3 $\pm$ 0,5	0,7 $\pm$ 0,3	3,2 $\pm$ 0,3	1,0 $\pm$ 0,6

*nd: no se determinó

**DS: Desviación estándar

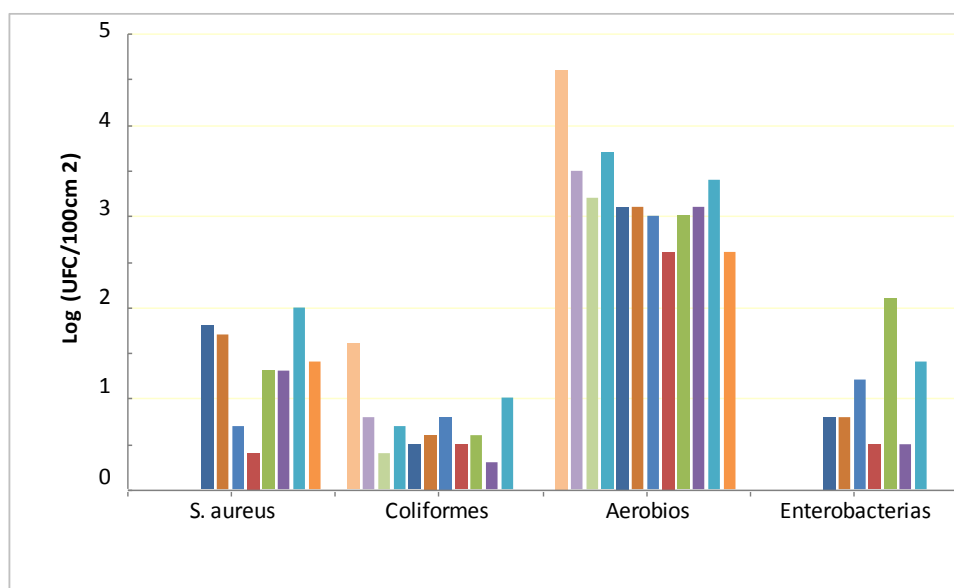


Figura 3. Recuento (log ufc/100 cm²) de los microorganismos indicadores estudiados sobre la superficie de medias reses.

5.2 BÚSQUEDA Y AISLAMIENTO DE *LISTERIA SPP.*

Del muestreo realizado sobre la superficie de las medias reses no se logró recuperar *Listeria spp.*, sin embargo todos los recortes y corte de carne en placas de agar Palcam presentaron colonias características de *Listeria spp.* Los cultivos que en caldo Fraser (segundo enriquecimiento) cambiaron de coloración hacia el negro (Figura 4), posteriormente en placas de agar Palcam presentaron crecimiento de colonias características de *Listeria spp.* (Figura 5). A partir de cada placa de agar Palcam se aislaron 1 -7 colonias para su posterior identificación totalizando en 35 aislamientos. En la tabla 11 se muestran los aislamientos realizados a partir de cada muestra.

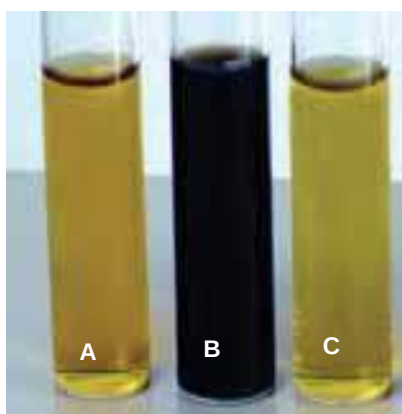


Figura 4. Tubos con caldo Fraser luego del periodo de incubación. Tubo A: no presentó cambio de coloración, tubo B: cambio de coloración hacia el negro, presuntiva presencia de *Listeria spp.*, tubo C: control negativo.

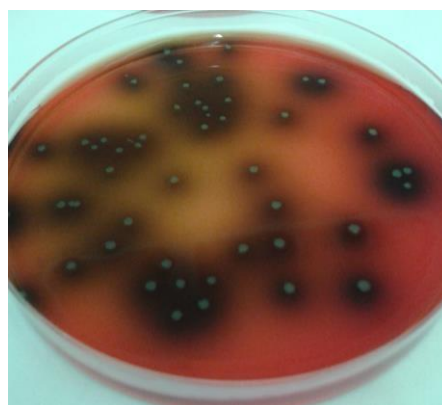


Figura 5. Colonias características de *Listeria spp.* en agar Palcam presentan coloración verde-grisácea con halo negro.

Tabla 11. Número de muestras que presentaron crecimiento en agar Palcam y aislamientos que se realizaron a partir de cada una de ellas, con su código correspondiente.

Numero de muestra	Tipo	Identificación del aislamiento
1	Corte de carne F1	L5
2	Recorte de carne F1	L6
3	Recorte de carne F2	L(10,15,34,37,38,39,43)
4	Recorte de carne F2	L(16,17,18,19)
5	Recorte de carne F2	L(11,20,21,28)
6	Recorte de carne F2	L(24,33,35,45,46)
7	Recorte de carne F2	L(36,44)
8	Recorte de carne F2	L(12,41,42)
9	Recorte de carne F2	L(22,23,29,30,40)
10	Recorte de carne F2	L(13,14,31,32)

5.3 IDENTIFICACIÓN DE *LISTERIA SPP.*

5.3.1. Diseño primers

Se diseñó un primer forward específico para *L. grayi* dentro del gen *iap*, cuyo tamaño de producto de PCR esperado es de 357 pb (tabla 12).

Tabla 12. Secuencia del primer forward para *L. Grayi* con su tamaño de producto esperado y valor de Tm.

Primer	Secuencia 5'-3'	%GC	Tm (°C)
Grayi	GCT ACC AGC ACA CCA GCT AA	55	60.5

El resultado del análisis BLAST mostró 100 % de homología con tres secuencia de *L. grayi*: JF967616.1 ATCC 25400, M80352.1 *Listeria grayi* extracellular protein y M95579.1 *Listeria grayi* *iap*-related gene, y no presentó homología con ninguna otra especie de *Listeria*.

Se alinearon las secuencias de las 6 especies de *Listeria* posibles presentes en la reacción de multiplex para corroborar que los primers sean específicos solamente para la especie que reconocen. Solamente los primers Lis 1A y Lis 1 B (específicos del género *Listeria*) presentaron secuencias complementarias en las cinco especies de *Listeria* (anexo III).

5.3.2 Identificación molecular de *Listeria spp.*

La caracterización de los aislamientos a nivel de género se realizó mediante PCR convencional utilizando primers específicos para la detección de *Listeria spp.* (Lis 1A- Lis 1B) dentro del gen *iap*. En todos los aislados al igual que en las cepas (L1, L2, L3, L4) cedidas por *Agricultural Research Service (NRRL) Culture Collection* se obtuvo un producto de PCR de 1600 pb, tamaño esperado del género *Listeria* (figura 6) confirmando que las colonias aisladas correspondían a este género. Posteriormente, mediante PCR multiplex se determinó que de los 35 aislamientos, 6 dieron un producto de PCR de 660 pb correspondiente a LM y 29 un producto de 870 pb correspondiente a LI (figura 7). Ningún aislamiento correspondió a *L. grayi*, *L. welshimeri*, *L. seeligeri* ni *L. ivanovii*.

Las cepas cedidas por *Agricultural Research Service (NRRL) Culture Collection* mediante PCR multiplex efectivamente presentaron un producto de PCR de 870pb correspondiente a LI.

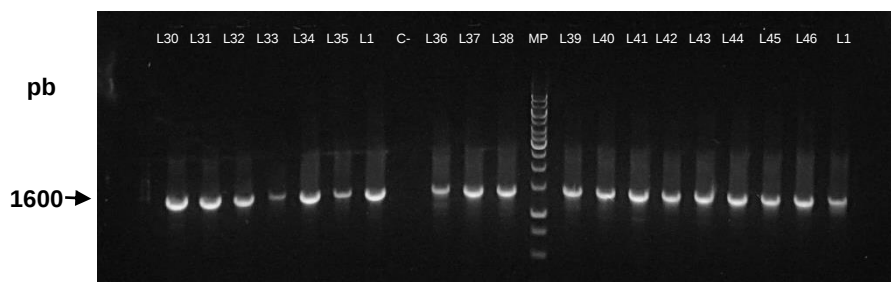


Figura 6. Identificación a nivel de género *Listeria* por PCR convencional utilizando primers Lis 1A- Lis 1B. Carril 1- 7, 9-11, 13-21 aislamientos; carril 8: control negativo; carril 12 marcador de peso molecular. Gel de agarosa 1,2% teñido con Bromuro de Etidio.

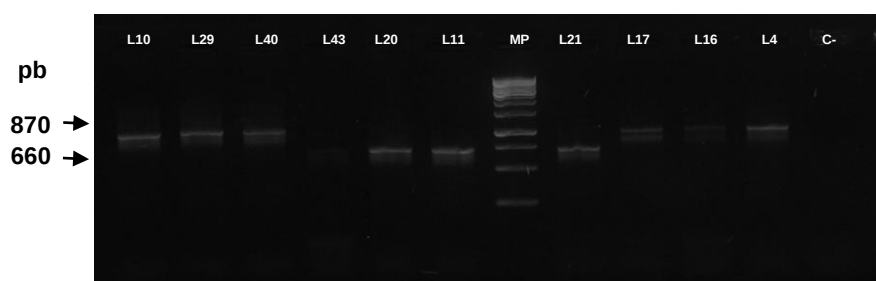


Figura 7. Identificación de especies de *Listeria* mediante PCR multiplex. Carril 1-6,8-10: aislamientos; carril 11: NRRL- ATCC 33090 (L4) carril 7: marcador de peso molecular; carril 12: control negativo. Gel de agarosa 1,2% teñido con Bromuro de Etidio.

5.3.3 Identificación bioquímica

Los aislamientos identificados por métodos moleculares se verificaron posteriormente por métodos bioquímicos. Se seleccionaron 19 aislamientos para este estudio: 13 de LI (cuatro correspondientes a cepas cedidas por *Agricultural Research Service (NRRL) Culture Collection* y 9 obtenidos del muestreo en carne) y 6 de LM (obtenidas del muestreo). Todas las cepas con la tinción de Gram presentaron coloración violeta (Gram positivas) con morfología bacilar y mostraron reacción positiva frente a la reacción de la catalasa (tabla 13).

Tabla 13. Cepas utilizadas en la identificación bioquímica, resultados obtenidos en la reacción de catalasa, tinción de Gram y morfología que presentaron. En asterisco se muestran las seleccionadas para el ensayo de galerías API *Listeria*.

Nº muestras	Código	Especie por PCR	Catalasa	Gram	Morfología	Fuente
1	L1	L.I	+	+	Bacilar	NRRL- B 33088
2	L2	L.I	+	+	Bacilar	NRRL- B 33551
3	L3	L.I	+	+	Bacilar	NRRL- B 33314
4	L4*	L.I	+	+	Bacilar	NRRL- ATCC 33090

5	L10*	L.I	+	+	Bacilar	Carne
6	L11*	L.M	+	+	Bacilar	Carne
7	L20*	L.M	+	+	Bacilar	Carne
8	L21*	L.M	+	+	Bacilar	Carne
9	L22*	L.M	+	+	Bacilar	Carne
10	L23	L.I	+	+	Bacilar	Carne
11	L24	L.I	+	+	Bacilar	Carne
12	L28*	L.M	+	+	Bacilar	Carne
13	L29*	L.I	+	+	Bacilar	Carne
14	L38	L.I	+	+	Bacilar	Carne
15	L40*	L.I	+	+	Bacilar	Carne
16	L43*	L.M	+	+	Bacilar	Carne
17	L44	L.I	+	+	Bacilar	Carne
18	L45	L.I	+	+	Bacilar	Carne
19	L46	L.I	+	+	Bacilar	Carne

Para el ensayo de galerías API se seleccionaron 6 aislados de LM (L11, L20, L21, L22, L28, L43) y 4 de LI (L4, L10, L29 y L40) (mostrados en asterisco en la tabla 13). Todas las cepas de LM y LI provenían de muestras de carne, excepto L4 que correspondía a NRRL ATCC® 33090™. Todos los aislados de LM como LI presentaron los mismos resultados en todos los test de galerías API, excepto para el test DIM (diferenciación *Innocua- monocytogenes*) que presentaron reacción negativa y positiva respectivamente (figura 8). La cepa L4 a diferencia de nuestros aislados de LI fue Rhamnosa positiva. En la tabla 14 se muestran los 10 test presentes en galerías API® Listeria con su reacción correspondiente y los resultados obtenidos para los aislados estudiados y L4. Todas los aislados de LM presentaron el perfil numérico 6510, los aislados de LI presentaron 7110 y la cepa L4 7510.

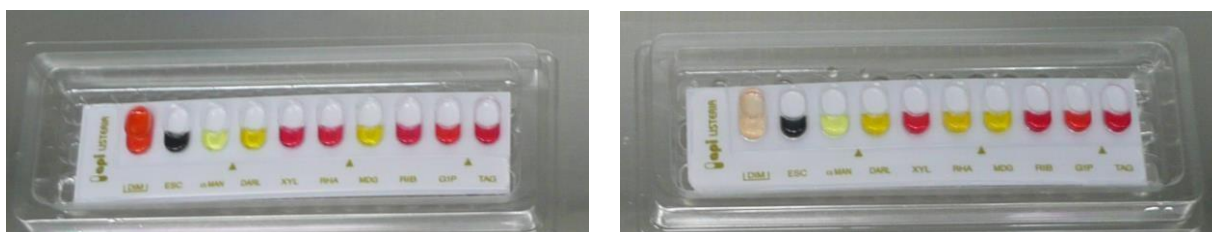


Figura 8. Galerías API® Listeria. A la izquierda: LI (L10), a la derecha: LM (L20).

En el ensayo DIM se visualiza la diferenciación entre LI y LM, los demás ensayos son comunes en ambas, excepto Rhamnosa que puede ser variable en LI.

Tabla 14. Test presentes en API® *Listeria* con su reacción correspondiente y los resultados obtenidos para nuestros aislados de LI y LM y cepa L4.

Test	Reacciones	Resultados		
		LI	L4	LM
DIM	Diferenciación LI/LM	+	+	-
ESC	Hidrólisis (Esculina)	+	+	+
α MAN	A- Manosidasa	+	+	+
DARL	Acidificación (D-Arabinol)	+	+	+
XYL	Acidificación (Xilosa)	-	-	-
RHA	Acidificación (Rhamnosa)	-	+	+
MDG	Acidificación (Metil – α D- Glucopiranosido)	+	+	+
RIB	Acidificación (Ribosa)	-	-	-
GP1	Acidificación (Glucosa-1-Fosfato)	-	-	-
TAG	Acidificación (Tagatosa)	-	-	-

5.4 EFECTO DEL ÁCIDO LÁCTICO EN MICROPLACA

En el ensayo realizado en microplaca, utilizando concentraciones de AL entre 2 y 5 % (permitidas para el tratamiento en carnes), macroscópicamente no se observó turbidez (crecimiento bacteriano) en ninguno de los pocillos de los aislados estudiados (L1, L4 y L10), a excepción de los controles positivos. Los valores de absorbancia en las diferentes concentraciones de AL no presentaron diferencias significativas con respecto al control negativo.

Sin embargo, para concentraciones de AL entre 1,2- 0,1%, para los aislamientos de LI (L1, L2, L3, L4, L10, L23, L29, L38, L40, L44, L45, L46) y LM (L11, L20, L21, L22, L28, L43) se observó turbidez indicativa de crecimiento bacteriano hasta la concentración de AL correspondiente al 0.2%, a partir de 0,3% el cultivo no presentó turbidez, asignando dicho valor a la CIM. En la figura 9 y 10 se muestran los gráficos de absorbancia en función de la concentración de AL para L4 y L20 respectivamente. En la tabla 15 se muestran los valores de pH en la microplaca luego del periodo de incubación para las distintas concentraciones de AL.

Por otra parte, al sembrar una alícuota (100ul) de los pocillos en placas de agar Palcam hubo crecimiento bacteriano hasta la concentración de AL correspondiente a 0.43%. A partir de 0.72% de AL ya no se recuperaron colonias (figura 11), asignando dicho valor a la CMB, poniendo en evidencia un efecto bactericida sobre *Listeria* a dicha concentración.

Los aislados de LM y LI utilizados en este ensayo presentaron comportamientos similares frente al AL: mismos valores de pH, CIM y CMB.

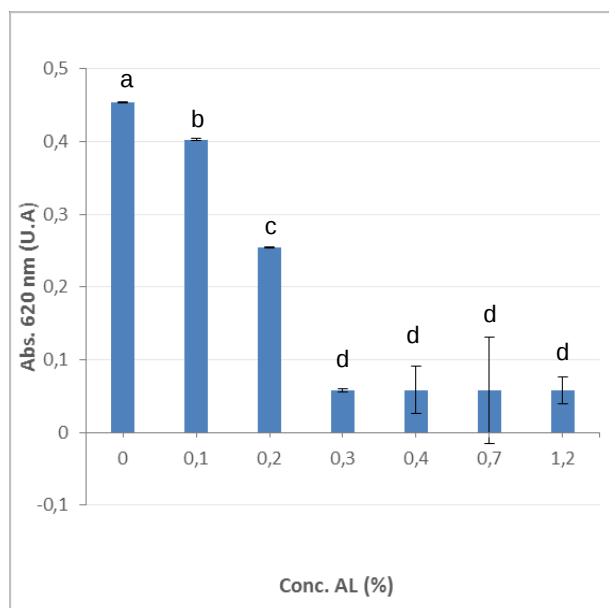


Figura 9. Valores de absorbancia en función de la concentración de AL (%) para L4. El ensayo se realizó por triplicado y se promediaron los valores, barras de error representan DS, letras (a, b, c y d) diferentes indican diferencia significativa.

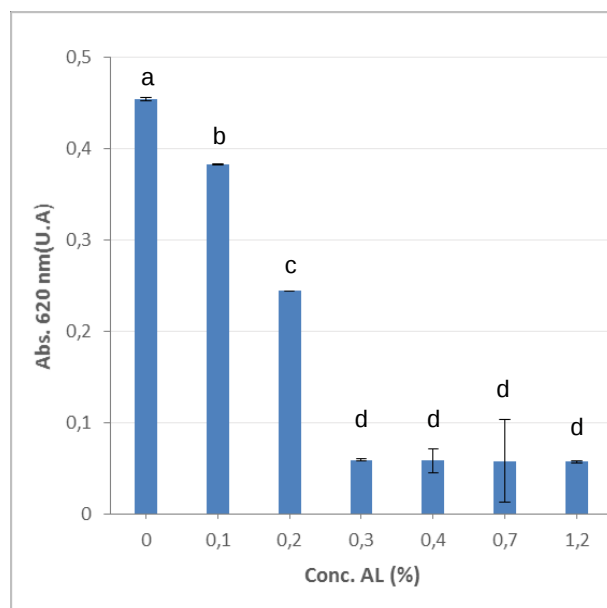


Figura 10. Valores de absorbancia en función de la concentración de AL(%) para L20. El ensayo se realizó por triplicado y se promediaron los valores, barras de error representan DS, letras (a, b, c y d) diferentes indican diferencia significativa.

Tabla 15. Placas de agar palcam, a partir de 0.7% no hay crecimiento bacteriano.

Conc. AL (%)	pH
1.2	4.0
0.7	4.5
0.4	5.0
0.3	5.0
0.2	6.0
0.1	6.5
0.0	7.0

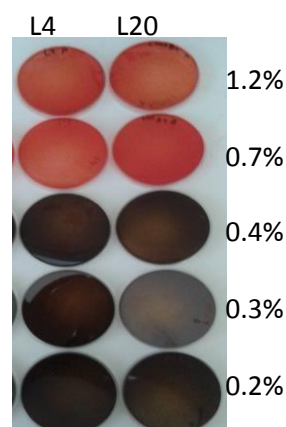


Figura 11. Placas de agar palcam provenientes del cultivo de la microplaca. A partir de 0.7% no hay crecimiento bacteriano, a concentraciones menores persisten células viables.

5.5 EFECTO DEL ÁCIDO LÁCTICO SOBRE L20 EN CARNE ENVASADA AL VACÍO

En carnes inoculadas con L20 (grupo A), los recuentos de *Listeria* en agar Palcam no se vieron afectados a concentraciones de AL inferiores al 4% . A concentraciones de 4 y 5% se observó un

disminución significativa en los recuentos con respecto al inóculo inicial. Dentro del grupo A, se compararon los recuentos de *Listeria* en carnes con 5% y sin AL a lo largo del tiempo, donde para las semanas uno y dos los recuentos fueron significativamente diferentes entre ellos. Sin embargo, a partir de la tercera semana no se observaron diferencias significativas en los recuentos entre los tratamientos (figura 12).

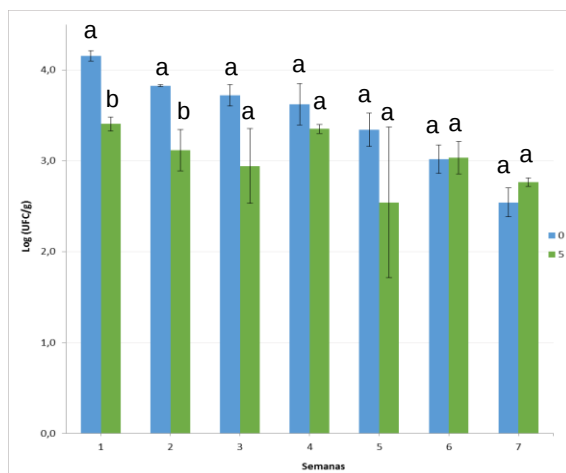


Figura 12. Recuentos de L20 (log ufc/g) a lo largo del tiempo, para carnes tratadas con (5%) AL en verde y sin AL (0%) en azul. Los valores son promedios de dos ensayos independientes, barras de error representan desviación estándar, letras (a y b) diferentes indican diferencia significativa ($p < 0.05$).

Al analizar la evolución del inóculo L20 en el tiempo se observa que en las carnes tratadas con 5% de AL la reducción en los recuentos con respecto al control (0% AL) se manifiesta en la primer semana de almacenamiento y no cambia con el tiempo (figura 13). Por otra parte en las carnes sin tratamiento con AL se observa una disminución en los recuentos en función del tiempo y al final de la semana 7 alcanzó recuentos 1.5 log menor respecto al inicial (figura 14) igualando el valor obtenido con 5% de AL.

Carnes que no fueron inoculadas con L20 (grupo B), no presentaron crecimiento de *Listeria* a lo largo del tiempo.

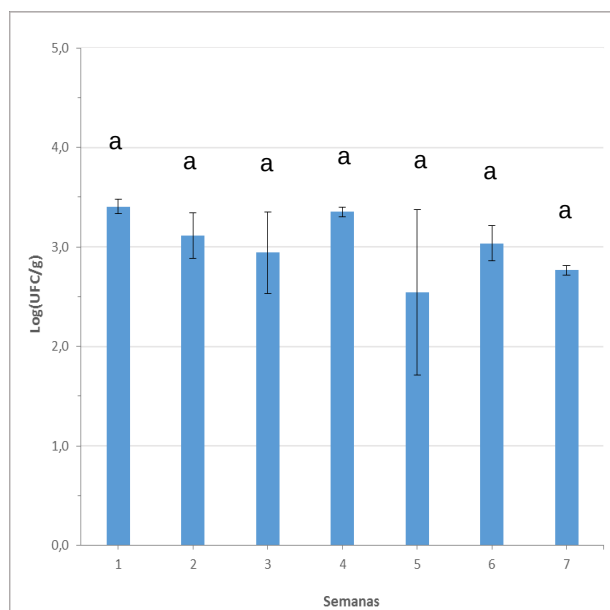


Figura 13. Recuentos de L20 (log ufc/g) a lo largo del tiempo, para carnes tratadas con 5 % de AL. Los valores son promedios de dos ensayos independientes, barras de error representan DS, letas (a y b) diferentes indican diferencia significativa.

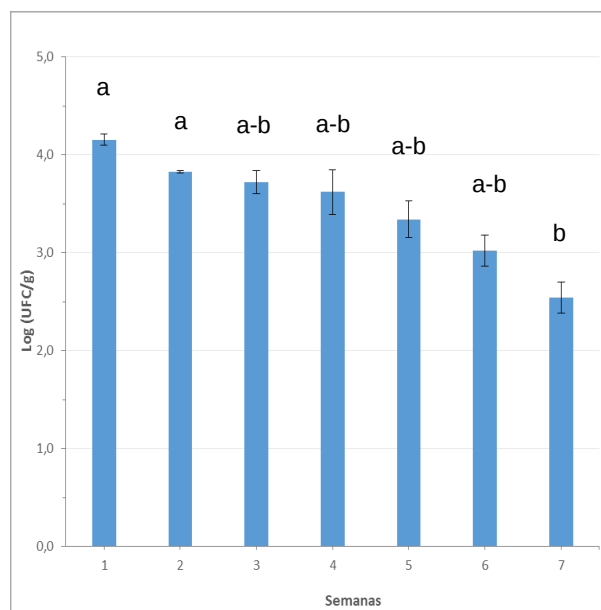


Figura 14. Recuentos de L20 (log ufc/g) a lo largo de tiempo, para carnes sin tratar con AL. Los valores son promedios de dos ensayos independientes, barras de error representan DS, letas (a y b) diferentes indican diferencia significativa.

5.6 RECuentOS DE BAL EN CARNE

Los recuentos de BALs no presentaron diferencias significativas entre los grupos A y B, como tampoco entre de las distintas concentraciones de AL en cada semana. Los recuentos en la población de BALs fueron en aumento a lo largo del tiempo. Se partió de una carga inicial de aproximadamente 2.7 log ufc/g, llegando a las 7 semanas a una carga superior a 7 log ufc/g (Figura 15). Este valor se alcanzó a la quinta semana y se mantuvo constante. A partir de la sexta semana las carnes presentaron un olor desagradable.

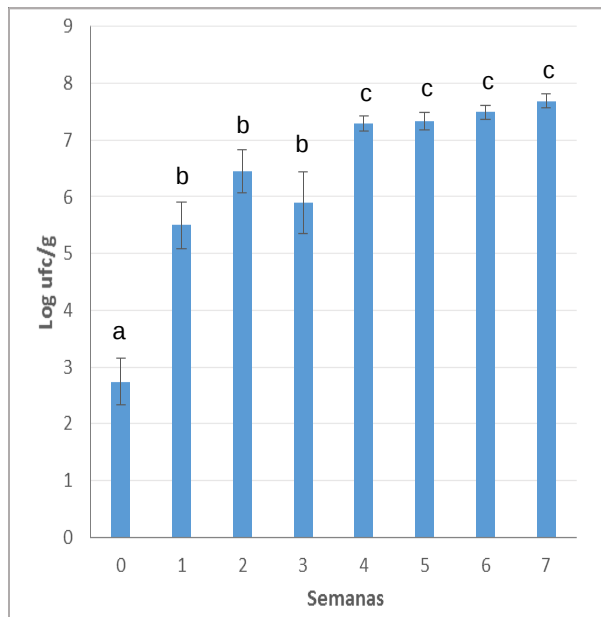


Figura 15. Recuentos de BALs (log ufc/g) vs semanas. El recuento de BALs se realizó durante siete semanas en carne envasada al vacío. Los valores son promedios de dos ensayos independientes, barras de error representan DS, letras (a y b) diferentes indican diferencia significativa

6.0 DISCUSIÓN

La calidad microbiológica de la carne es el resultado de las múltiples intervenciones que se realizan durante su producción en la planta frigorífica. Una forma sencilla de evaluarla es a través del recuento de microorganismos indicadores, éstos advierten oportunamente de un manejo inadecuado o contaminación que incrementan el riesgo de presencia de microorganismos patógenos. Las carcasas evaluadas en este estudio presentaron recuentos de microorganismos indicadores varios órdenes de magnitud por debajo de los límites establecidos por las normativas vigentes. Para aerobios mesófilos totales, indicador de higiene y condiciones de manejo, se obtuvo un recuento promedio de $3.2 \pm 0.3 \log \text{ ufc}/100 \text{ cm}^2$, significativamente menor que el valor límite establecido de $7 \log \text{ ufc}/100 \text{ cm}^2$ y para enterobacterias, indicador de contaminación con materia fecal, el recuento promedio fue $1.0 \pm 0.6 \log \text{ ufc}/100 \text{ cm}^2$, significativamente menor que el valor límite establecido de $4.5 \log \text{ ufc}/100 \text{ cm}^2$. Sumado a esto, los recuentos para coliformes y *S. aureus* también fueron bajos. Confirmando un buen manejo de las medias reses durante el proceso de faena por la planta frigorífica.

En cuanto a la *Listeria*, a pesar de su naturaleza ubicua (Norton, 2000), no se recuperó en las carcasas estudiadas pero si se encontró en todas las muestras de carne analizadas. Estos datos concuerdan con estudios realizados en otros países por Madden y colaboradores (2007), donde la diferencia entre la prevalencia de *Listeria* entre carcasas y carne puede deberse a que el ambiente y las superficies donde se manipula la carne durante el desosado son una fuente más probable de *Listeria* que el propio animal. Esto puede explicarse por la capacidad de la *Listeria* de formar biofilms sobre las superficies de trabajo y su resistencia a los agentes de limpieza, consistente con los resultados obtenidos por Nesbakken, Kapperud, and Caugant (1996). Estos resultados sugieren que en estas plantas frigoríficas la contaminación por *Listeria* se origina principalmente por recontaminación debido a la manipulación de los cortes cárnicos durante el desosado.

La estrategia de aislamiento en el medio selectivo Palcam e identificación por PCR multiplex resultó ser apropiada para la identificación de especies de *Listeria*. Todos los aislados de colonias características de *Listeria*, mediante identificación molecular por PCR se determinó que efectivamente pertenecían al género *Listeria*, de los cuales de un total de 35 aislamientos, 29 fueron LI y 6 LM. De ningún aislamiento se recuperó *L. grayi*, *L. welshimeri*, *L. ivanovii* ni *L. seeligeri*. Dado el bajo número de carnes muestreadas no es posible concluir que LI es la especie predominante de *Listeria* en la planta frigorífica, para ello se debería trabajar con un mayor número de muestras. Sin embargo, en el estudio realizado por Bosilevac y colaboradores (2006) en carnes uruguayas, LM fue la especie con mayor prevalencia. De 226 muestras analizadas, 66 fueron

positivas para *Listeria*, de las cuales 53 fueron LM y en menor medida se encontraron LI y *L. seeligeri*. Dentro de LM, el serotipo 4b fue el mayoritario, dicho serotipo es el responsable de la mayoría de los casos de listeriosis invasiva (Doumith M. et al., 2004; Mead P. S. et al., 2006). Sumado a esto, se encontró que dicho serotipo provenía de cuatro establecimientos distintos, sugiriendo que posiblemente su fuente sea el ambiente del procesamiento. Este es otro indicio de que la contaminación es debida principalmente al entorno de producción.

El método de PCR convencional es un método rápido sin embargo se necesita de una serie de pasos previos de la muestra, tales como enriquecimiento, aislamiento y extracción de ADN que llevan como mínimo seis días. Dicho período de tiempo resulta demasiado largo para las industrias alimentarias cuando necesitan obtener los resultados rápidos, ya sea para tomar decisiones preventivas (en caso de ser necesario) como para cumplir con la reglamentación requerida. Sumado a que solamente los subtipos 1/2a, 1/2b y 4b de los trece de LM son los responsables generalmente de causar listeriosis en humanos (Gellin, 1989), se hace necesario la implementación de métodos de detección más rápidos, precisos y que permitan la caracterización a nivel de subespecie. Actualmente en el laboratorio de Alimentos y Nutrición del Instituto Polo Tecnológico de Pando (IPTP) se está trabajando en la puesta a punto de los métodos moleculares qPCR y PFGE, para así lograr la identificación de los aislamientos de forma más rápida, con pasos más cortos de enriquecimientos selectivos previos de la muestra y como también lograr la subtipificación de los mismos.

Los aislamientos seleccionados para la identificación mediante técnicas bioquímicas presentaron morfología bacilar, Gram positivos y catalasa positivos, siendo todas éstas características propias del género *Listeria*. Por otra parte, el uso de galerías API permitió la diferenciación entre especies coincidiendo con los resultados obtenidos por PCR multiplex, como también se obtuvieron características bioquímicas adicionales de las cepas en estudio. Según Moreno y col. (2009), los perfiles numéricos más frecuentes en galerías API de LM aisladas de alimentos son 6510 y 6110, en este trabajo todos nuestros aislados de LM estudiadas presentaron únicamente el perfil numérico 6510, los de LI y la cepa L4 presentaron 7110 y 7510 respectivamente. Esta diferencia está dada por la acidificación de la ramnosa, ya que cepas de LI pueden presentar un perfil variable frente a este ensayo, y en este caso únicamente la cepa L4 acidificó la ramnosa.

Según estudios realizados por Marshall y colaboradores (1993), donde incubaron cepas de LM en caldo de TSB-YE a 35°C con distintas concentraciones de AL (0; 0,0625; 0,125; 0,25 y 0,5%) concluyeron que el AL 0,25% inhibe el crecimiento de LM. Resultados similares se obtuvieron en este trabajo, donde aislamientos de LI y LM fueron sensibles al tratamiento con AL mostrando inhibición de crecimiento en medio TSB-YE a partir de concentraciones de AL de 0,259%.

Por otra parte, el AL 0,7% presentó un efecto bactericida sobre las mismas cepas, atribuible principalmente al valor del pH, ya que en estas condiciones es el principal parámetro variable. A pH 4.5 no hubo crecimiento bacteriano, pH muy cercado al descrito por diversos autores en el cual no es posible el crecimiento de *Listeria* (Martin, S.E et al., 2000).

En el estudio en placa sobre el efecto del AL, si bien no se tiene en consideración algunos parámetros característicos de la carne (temperatura de almacenamiento, aw, flora acompañante) da idea del posible efecto del AL sobre cepas de *Listeria*. Con el fin de obtener una visión más representativa a la realidad, se realizó el experimento en trozos de carne utilizando concentraciones de AL entre 5 y 0%. En carnes envasadas al vacío y refrigeradas a 4°C tratadas con AL 5% la carga microbiana descendió en las primeras dos semanas y luego se mantuvo relativamente constante en el tiempo. Indicando una acción inmediata del AL, y que luego de cierto periodo de tiempo éste deja de actuar. Hwang y colaboradores (2012), indicaron que la acción del AL no mejora con inmersiones prolongadas del mismo. Por tanto su acción es inmediata e independiente del tiempo de contacto.

En carnes no tratadas con AL los recuentos de LM también disminuyeron en el tiempo, indicando un efecto inhibitorio independientemente de la aplicación del AL. Paralelamente a la disminución de *Listeria* aumentó la población de BALs. De hecho una de las limitantes de la vida útil de la carne envasada al vacío es el crecimiento de BALs por entre 6 y 8 log ya que a esos niveles se generan olores y sabores desagradables en la carne. Por otro lado, esta reportado en la literatura que las BALs son capaces de generar ácidos orgánicos y bacteriocinas (Izquierdo et al. 2008; Eijsink et al. 1998) y la producción de ácidos es lo que lleva a la disminución en el pH (Bredholt et al., 2001). Para algunas de estas bacteriocinas se ha demostrado un efecto sobre el crecimiento de *Listeria*. En un estudio realizado por Maragkoudakis P.A. y colaboradores (2009) sobre carne de pollo cruda, aplicando bacteriocinas (*Enterococcus faecium* PCD71 y *Lactobacillus Fermentum* ACA- DC179) observó una reducción significativa en el crecimiento de LM, además que no causaron deterioro de la carne. BALs del género *Enterococcus* son reconocidas como GRAS y se encuentran en el tracto intestinal de animales (Javed A., et al., 2011). En otro estudio realizado por Guerrieri E. y colaboradores (2009) también indicaron la importancia de las bacteriocinas en la inhibición de LM, y a la disminución del pH dado por la producción de AL. Además las BALs poseen acción bacteriostática (Cárdenas F. et al., 2005), lo cual mejora la calidad microbiológica de la carne ya que restringen el crecimiento de organismos no deseados (Chaillou et al., 2005; Chen et al., 2003; Holzapfel et al., 1995; Jones 2004). Toda esta evidencia sugiere que la disminución en los recuentos de LM en la carne envasada al vacío pueda estar relacionada con el aumento en los recuentos de BAL y su actividad antimicrobiana.

7.0 CONCLUSIÓN

- Se registraron hallazgos de *Listeria Monocytogenes* en carnes uruguayas.
- En microplaca el ácido láctico presenta actividad inhibitoria al 0.3% y bactericida al 0.7% sobre cepas de *Listeria Monocytogenes* y *Listeria Innocua*.
- A pH menor de 4.5 en microplaca no es posible el crecimiento de *Listeria Monocytogenes* ni *Listeria Innocua*.
- El uso del ácido láctico al 5% sobre carne puede utilizarse como una estrategia más para el control de *Listeria Monocytogenes*.
- El ácido láctico actúa en forma inmediata, su efecto no perdura el tiempo.
- En carnes envasadas al vacío sin AL, se produce una disminución del crecimiento de *Listeria Monocytogenes* que podría estar dada principalmente por el crecimiento en la población de BALs. Se necesitan más estudios a este respecto.

8.0 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Adu-Gyamfi A.**, Torgby-Tetteh W., Appiah V. 2012. Microbiological Quality of Chicken Sold in Accra and Determination of D10-Value of *E. coli*. *Food Nutr. Sci.* 3: 693-698.
- Axelsson L.** 2004. Lactic Acid Bacteria: Classification and physiology. In: *Lactic Acid Bacteria, Microbiological and Functional Aspects*. Marcel Dekker, New York 1-66
- Bosilevac J.**, Guerini M., Britcha-Harhay D., Arthur T., Koohmaraie M. 2007. Microbiological characterization of imported and domestic boneless beef trim used for ground beef. *J Food Prot.* 70: 440-449.
- Bredholt S.**, Nesbakken T., Holck A. 2001. Industrial application of an antilisterial strain of *Lactobacillus sakei* as a protective culture and its effect on the sensory acceptability of cooked, sliced, vacuum-packaged meats. *Int. J Food Microbiol.* 66(3): 191-196.
- Buncic S.**, Nychas G., Lee M., Koutsoumanis K., Hébraud M., Desvaux M., Chorianopoulos N., Bolton D., Blagojevic B., Antic D. 2013. Microbial pathogen control in the beef chain: Recent research advances. *Meat Science*.
- Bubert A.**, Hein I., Rauch M., Lehner A., Yoon B., Goebel W., Wagner M. 1999. Detection and Differentiation of *Listeria* spp. by a Single Reaction Based on Multiplex PCR. *Applied and environmental Microbiology.* 65: 4688-4692.
- Cardenas F.**, Giannuzzi L. 2005. Influencia del envasado en flora cárnica. *La Industria Cárnica Latinoamericana.* 137: 40 - 45.
- Cárdenas F.**, Giannuzzi L., Zaritzky N. 2006. Modelling microbial growth in meat broth with under refrigerated storage. *International journal of food science and technology* 42: 175- 184.
- Carpentier B.**, Chassaing D. 2004. Interactions in biofilms between *Listeria monocytogenes* and resident microorganisms and resident microorganisms from food industry premises. *J. Food Microbiol.* 111-122.
- Carrillo L.r y M.** Carina Audisio, Noemí V. Bejarano, Silvia E. Gómez Molina, E.Gustavo Ancasi y Marcelo R. Benítez Ahrendts. 2007. *Manual de Microbiología de los Alimentos (capítulo 10)*. 102-116.
- Chaillou S.**, Champomier-Verge's M.C., Cornet M., Le Coq A.M., Dudez A.M., Martin V., Beaufile S., Dardon-Rongère E., Bossy R., Loux V., Zagorec M. 2005. The complete genome sequence of the meat-borne lactic acid bacterium *Lactobacillus sakei* 23K. *Nat. Biotechnol.* 1527-1533
- Chasseignaux E.**, Salvat G., Colin P., Ermel G., Gerault P., Toquin M. 2002. Ecology of *Listeria monocytogenes* in the environment of raw poultry meat and raw pork meat processing plants. *Microbiol.* 271-275.
- Chen H.**, Hoover D. 2003. Bacteriocins and their food applications. *Food Sci. Food Saf.* 82-100
- Coll Cardenas F.**, Giannuzzi L., Zaritzky N.E. 2008. Mathematical modelling of microbial growth in ground beef from Argentina. Effect of lactic acid addition, temperature and packaging film. *Science Direct.* 79: 509-520
- Dormedy E.**, Brashears M., Cutter N., y Burson E. 2000. Validation of acid washes as critical control points in hazard analysis and critical control points systems. *Journal of food protection.* 63 (12): 1676-1680.

- Doumith, M.**, C. Buchrieser, P. Glaser, C. Jacquet, and P. Martin. 2004. Differentiation of the major *Listeria monocytogenes* serovars by multiplex PCR. *J. Clin. Microbiol.* 42:3819–3822.
- Doyle M.** 2007. Losses and control strategies. *Microbial food spoilage*.
- Eijsink V.G.**, Skeie M., Middelhoven P.H., Brurberg M.B., Nes I.F. Comparative studies of class IIa bacteriocins of lactic acid bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 1998; 64: 3275-81.
- Ercolini D.**, Russo F., Torrieri E., Masi P., Villani F. 2006. Changes in the spoilage-related microbiota of beef during refrigerated storage under different packaging conditions. *Appl Environ Microbiol.* 72: 4663–4671.
- FAO/OMS. 2004.** World Health Organization/Food and Agriculture Organization of the United Nation. Risk assessment of *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat foods. Technical report. Microbiological risk assessment series 5. Rome, Italy.
- Fiorentini A.**, Sant Anna Ernani E., Porto A. 2001. Influence of bacteriocins produced by *Lactobacillus plantarum* in the shelf – life of refrigerated bovine meat. *Braz J Microbiol.* 42-46
- FSAI (2003).** Food Safety Authority of Ireland. HACCP a food safety management system: Terminology explained.
- Gellin B.**, Broome C. 1989. Listeriosis. *JAMA.* 1313-1320.
- Gill C.O.**, Bryant J., Brereton D.A. 2000. Microbiological conditions of sheep carcasses from conventional or inverted dressing processes. *J Food Prot.* 63: 1291-1294.
- Graves L.M.**, Helsel L.O., Steigerwalt A.G., Morey R.E., Daneshvar M.I., Roof S.E., Orsi R.H., Fortes E.D., Milillo S.R., Bakker H.C., Wiedmann M., Swaminathan B., Sauders B.D. 2010. *Listeria marthii* sp. nov., isolated from the natural environment. *International Journal of systematic and evolutionary microbiology.* 1280-1288.
- Guerrieri E.**, Niederhäusern S., Messi P., Sabia C., Iseppi R., Anacarso I., Bondi M. 2009. Use of lactic acid bacteria (LAB) biofilms for the control of *Listeria monocytogenes* in a small-scale model. *Food Control* 20. 861–865.
- Hayes.** 1993. *Microbiología e higiene de los alimentos.* ACRIBIA.
- Holzappel W.**, Geisen R., Schillinger U. 1995. Biological preservation of foods with reference to protective cultures, bacteriocins and food grade enzymes. *Food Microbiol.* 343-362.
- Hwang C.**, Huang L. Sheen S., Juneaj V. 2012. Effects of Lactic Acid on the Growth Characteristics of *Listeria monocytogenes* on Cooked Ham Surfaces. *Journal of Food Protection.* 75.8:1404-1410.
- Izquierdo E.**, Marchioni E, Aoude-Werner D, Hasselmann C, Ennahar S. Smearing of soft cheese with *Enterococcus faecium* WHE 81, a multi-bacteriocin producer, against *Listeria monocytogenes*. *Food Microbiol* 2009; 26: 16-20.
- Institute of Food Technologists.** Scientific Status Summary. August 2004.
- Javed, A.**, Masud T., Ain Q., Imran M., Maqsood S. 2011. Enterocins of *Enterococcus faecium*, emerging natural food preservatives. *Ann Microbiol.* 61: 699–708.

- Jay M** .1996. Microorganisms in fresh ground meats: The relative safety of products with low versus high numbers. *Meat Science*, 43: 59-66.
- 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. 2003. Evaluation and interlaboratory validation of selective agar for phosphatidylinositol- specific phospholipase C activity using a chromogenic substrate to detect *Listeria monocytogenes* from food. *Journal of Food Protection*. 441- 445
- Jones R.** 2004. Observations on the sucesión dynamics of lactic acid bacteria populations in chill- stored vacuum – Packaged beef. *Food Microbiol.*273-282.
- Jones R. J.**, Hussein H. M., Zagorec M., Brightwell G., Tagg J. R. 2008. Isolation of lactic acid bacteria with inhibitory activity against pathogens and spoilage organisms associated with fresh meat. *Food Microbiology*. 25:228–234
- Komba E.**, Komba E.V., Mkupasi E.M., Mbyuzi A.O., Mshamu S., Luwumbra D., Busagwe Z., Mzula A. 2012. Sanitary practices and occurrence of zoonotic conditions in cattle at slaughter in Morogoro Municipality, Tanzania: implications for public health. *Tanzania J Health Res*, 14.
- Kozempel M.**, Goldberg N., Craig J. 2003. The cacuum/steam/vacuum process. *Food technology*. 30-33.
- Kuhn, M**; Goebel, W. 1989. Identification of an extracellular protein of *Listeria monocytogenes* possibly involved in intracellular up take by mammalian cells- *Infect. Immun.*55-61
- Li M. Y.**, Zhou G. H., Xu X. L., Li C. B., Zhu W. Y. 2006. Changes of bacterial diversity and main flora in chilled pork during storage using PCR- DGGE. *Food Microbiol.* 23: 607-611.
- Lunden J.**, Miettinen M., Autio T., Korkeala H. 2000.Persistent *Listeria monocytogenes* strains show enhanced adherence to food contact surface after short contact times. *J. Food Prot.*1204-1207.
- Madden R.H.**, Murray K.A, Gilmour A. 2007. Carriage of four bacterial pathogens by beef cattle in Northern Ireland at time of slaughter. *Letters in Applied Microbiology*. 44:115–119.
- Maestre M.**2014. Influencia de tratamientos combinados de calor y antimicrobianos naturales en la viabilidad de distintos microorganismos. Universidad Politécnica de Cartagena. 1-193
- Maragkoudakis P.A.**, Konstantinos C. Mountzouris K.C, Psyras D., Cremonese S., Fischer J., Mette D., Cantor M.D., Tsakalidou E. 2009.Functional properties of novel protective lactic acid bacteria and application in raw chicken meat against *Listeria monocytogenes* and *Salmonella enteritidis*. *International Journal of Food Microbiology*. 130: 219–226.
- Marshall D.L.**, Deog-Hwan O.1993. Antimicrobial activity of ethanol, glycerol monolaurate or lactic acid against *Listeria monocytogenes* *International Journal of Food Microbiology*. 20: 39-246
- Martin, S.E.**, Fisher, C.W. 2000. *Listeria monocytogenes*. En: *Encyclopedia of Food Microbiology*. Editores: Robinson, R.K., Batt, C.A. y Patel, P.D.Academic Press. Londres, Gran Bretaña. 1228-1233.
- Maukonen J.**, Matto J., Wirtanen E., Raaska L., Mattila T., Saarela E. 2003. Methodologies for the characterization of microbes in industrial environments. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*327-356.

- McLauchlin J.** 1997. The pathogenicity of *Listeria monocytogenes*: a public health perspective. *Reviews in Medical Microbiology*. 1-14
- McLauchlin J., R.T. Mitchell, W.J. Smerdon, K. Jewell.** 2004. *Listeria monocytogenes* and listeriosis: a review of hazard characterisation for use in microbiological risk assessment of foods. *International Journal of Food Microbiology* 92:15 – 33
- Mead P., Slutsker L., Dietz V., McCaig L., Bresee J., Shapiro C.** 1999. Food related illness and death in the United States. *Emerging Infectious Diseases*. 607-625
- Medrano M., Restrepo S., Vanegas M.** 2006. Tipificación molecular de *Listeria monocytogenes* aisladas de muestras clínicas y alimentos. *Biomedica*. 26:442-450.
- Mengaud J., Vicente M.F., Chenevert J., Pereira J.M., Geoffroy C., Gicquel-Sanzey B., Baquero F., Perez-Diaz J.C., Cossart P.** 1988. Expression in *Escherichia coli* and sequence analysis of the listeriolysin O determinant of *Listeria monocytogenes*. *Infect Immun*. 56(4):766-72.
- Mercado- Martinez P., Zavaleta D., Arroyo V.** 2014. Identification of *Listeria monocytogenes* by iap gene amplification from cultures of *Listeria* sp. From places of sale of meat, fish and vegetables in Trujillo (Peru). *Rebiol*
- Moreno Y., Ballesteros Y., Ferrús MA, Cuesta G, Cañigral I.** 2009. Caracterización Fenotípica y Genotípica de cepas de *Listeria monocytogenes* aisladas de vegetales congelados. XVI Congreso Nacional de Microbiología de los Alimentos. Libro de ponencias. 136-137.
- Mor-Mur M., Yuste J.** 2010. Emerging Bacterial Pathogens in Meat and Poultry: An Overview. *Food Bioprocess Technol*. 3:24–35.
- M.S.P.** 1997. Sistema de vigilancia epidemiológica de las enfermedades transmitidas por alimentos. Savio. M., Lindner, C. Atención Primaria de Salud. N.29.
- M.S.P.** 1999. 1er. Taller Nacional del Sistema VETA. Ed. OPS, OPS/HCP/HCV/FOS/URU.03/2000. Montevideo.
- Nesbakken T., Kapperud G., Caugant D.A.** 1996. Pathways of *Listeria monocytogenes* contamination in the meat processing industry. *Int J Food Microbiol*. 31: 161-171.
- Norton D.M., Meghan A., Mccamey M.A., Gall K., Scarlett J.M., boor K.J, Wiedmann A.** 2000. Molecular Studies on the Ecology of *Listeria monocytogenes* in the Smoked Fish Processing Industry. *Applied and Environmental Microbiology*. 198–205.
- Norton, D.** 2002. Polymerase chain reaction-based methods for detection of *Listeria monocytogenes*: toward real- time screening for food and environmental samples. *J AOAC*. 505-515.
- Nychas G.J., Skandamis P.N., Tassou C. C., Koutsoumanis K.P.** 2008. Meat spoilage during distribution. *Meat Science*. 78: 77–89
- Pérez C., Mercado M., Carrascal A.** 2008. Incidencia de *Listeria* spp. En carcasas de pollo congelado en un supermercado del nororiente de Bogotá. *NOVA- Publicación científica en ciencias biomédicas*. 141-146.

Pilgrim S., Kolb-Maüurer A., Gentschev I., Goebel W, Kuhn M. 2003. Deletion of the Gene Encoding p60 in *Listeria monocytogenes* Leads to Abnormal Cell Division and Loss of Actin-Based Motility. American Society for Microbiology. 71:3473–3484.

Price, J., Schweigert, B. 1976. Ciencia de la carne y de los productos cárnicos. Zaragoza, Acribia, 592.

Ramos L.M., Vidal L., Vilardy S., Saavedra L. 2008. Análisis de la contaminación microbiológica (coliformes totales y fecales) en la bahía de santa marta, caribe colombiano. Acta biol. Colomb., 13 : 3. 87- 98.

Rivera F., Wesley I., Simoes D., Sosa A., Rivera S. 2006. Determinacion microbiologica y molecular de *Listeria* sp y *Listeria monocytogenes* en cerdas a nivel de una planta benediciadora en EUA. Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad del Zulia (FCV-LUZ). 297-307.

Roberts D. 1989. *Listeria monocytogenes* in food. Journal of Applied Bacteriology. Journal of Applied Bacteriology.

Rocourt J., Cossart P. 1997. Food microbiology. Fundamentals and frontiers. American Society for Microbiology. 337-352.

Rodas-González A., Narváez-Bravo C., Brashears M.M., Rogers H.B., Tedford J.L., Clark G.O., Brooks J.C., Johnson B.J., Rathmann R.J., Miller M.F. (2011). Evaluation of the storage life of vacuum packaged Australian beef. Meat Science 88 :128–138.

Rodríguez D., Hernaández M., Pla M. 2004. Simultaneous quantitative detection of *Listeria* spp. And *Listeria monocytogenes* using a duplex real-time PCR-based assay. FEMS Microbiology Letters 233; 257–267.

Rosaler M. 2004. Listeriosis. Epidemics Deadly Diseases. Throughout History.

Rosset R. 1982. Chilling freezing and thawing. Meat Microbiology. London. Applied Science Publishers 265-318.

Sakaridis I., Soutos N., Dovas C., Papavergo E., Ambrosiadis I., Koidis P. 2012. Lactic acid bacteris from chicken carcasses with inhibitory activity against *Salmonella* spp. And *Listeria monocytogenes*. Science Direct. 62-66.

Shufiur R. 2003. Manual de conservacion de los alimentos. Zaragoza-España Acribia 729-744.

Swaminathan B., Gerner- Smidt P. 2001. The epidemiology of human listeriosis. Microbes Infect. 1236-1243.

Tompkin R. 2002. Control of *Listeria monocytogenes* on the food- processing environment. J. Food Prot. 709-725.

UE. (2004). Corrigendum to Regulation (EC) No 852/2004 of the European Parliament and of the Council of 29 April 2004 on the hygiene of foodstuffs. DO L 226 de 25 de junio de 2004, pp: 3

UE. (2008). Guidance document on *Listeria monocytogenes* shelf-life studies for ready-to-eat foods, under regulation (EC) No 2073/2005 of 15 November 2005 on microbiological criteria for foodstuffs

Valencia V. 2009. Análisis comparativo entre ácido láctico, ácido peroxiacético e hipoclorito de sodio en la desinfección de canales bovinas en el frigorífico San Martín en bogotá. Facultad de Ciencias Agropecuarias- Bogotá. Tesis de grado.

9.0 ANEXOS

9.1 ANEXO I

REACTIVOS Y SOLUCIONES

Buffer butterfield (solución stock)

Pesar 43 g KH_2PO_4 y disolver en 500 mL de H_2O destilada.

Ajustar el pH entre 6.6-7.2 con aproximadamente 175mL de NaOH 1M (40g/L)

Diluir a 1 L con H_2O destilada

Almacenar en refrigerador (descartar en caso de cambio en el valor del pH de la solución)

Buffer butterfield diluido

Realizar una toma de 1.25 mL de solución stock y diluir a 1 L con H_2O destilada.

Autoclavar a 121°C durante 15 minutos en botellas de vidrio.

Buffer para lisis

SDS 10% 2,5ml

NaOH 1 N 5,0ml

Agua mili Q 100ml

Preparar y almacenar a temperatura ambiente en frasco estéril con tapa a rosca

Buffer Tris acetato (TAE) Solución madre 50X

Tris base 242 g

Ácido acético glacial 57.1 g

EDTA 0.5M (pH 8) 100 ml

Solución de trabajo (TAE)

TAE 50X 10 ml

Agua tridestilada estéril 500 ml

9.2 ANEXO II

PROTOCOLOS

Tinción de Gram

Preparación del frotis

Colocar una gota de agua sobre el portaobjetos, tomar una colonia con el ansa y tocar la gota, quemar el ansa y luego de enfriada, mezclar bien con el agua para lograr una suspensión homogénea. Dejar secar al aire. Pasar el portaobjetos tres veces cerca de la llama del mechero para fijar.

Coloración de Gram

- 1) Cubrir el portaobjetos con solución de cristal violeta y dejar 1 min. Lavar suavemente con agua.
- 2) Cubrir con lugol y dejar 1 min. Lavar con agua.
- 3) Cubrir con etanol 95% y dejar 30 seg. moviendo suavemente la lámina. Continuar lavando con etanol hasta que no se arrastre más colorante. Lavar con agua.
- 4) Cubrir con solución de safranina y dejar 15 seg. Lavar y secar.
- 5) Observar al microscopio con lente de inmersión (100x).

Reacción de Catalasa

Colocar una pequeña gota de peróxido de hidrogeno al 3% sobre la superficie de un portaobjetos y transferir con un palillo de madera estéril una colonia bien aislada y emulsionar bien. La formación inmediata de burbujas indica reacción positiva.

Galerías API

Luego del periodo de incubación de las galerías, colocar una gota del reactivo ZYM solamente al ensayo DIM. Pasados 3 minutos leer todas las reacciones. Dependiendo del color de cada reacción la prueba se considera positiva o negativa. En la siguiente tabla se muestra el resultado de cada test dependiendo de la coloración de la reacción.

Test	Resultados	
	Negativo	Positivo
DIM	Naranja pálido	Naranja
ESC	Amarillo pálido	Negro
α MAN	incoloro	Amarillo
DARL	Rojo/ rojo anaranjado	Amarillo / amarillo anaranjado
XYL		
RHA		
MDG		
RIB		
GP1		
TAG		

9.3 ANEXO III

ALINEAMIENTO MULTIPLE

Alineamiento múltiple de secuencias de seis especies de *Listeria* (*iap* gen) obtenidas del GenBank implicadas en la PCR multiplex.

INNOCUA: gi|52550798|gb|AY729925.1|
MONOCYTOGENES: gi|347014916|gb|JF967608.1|
IVANOVII: gi|347547510_c553784-552155
SEELIGERI: gi|289433373_c521599-520028
WELSHIMERI: gi|116871422_c585392-583818
GRAYI: gi|347014932|gb|JF967616.1|

gi 52550798 gb AY729925.1	CTTACTTACA	CCTTAAAGGA	CTCCCCAGCA	GTACATCTCA	AGCCCTAAGA	
gi 347014916 gb JF967608.1						
gi 347547510_c553784-552155						
gi 289433373_c521599-520028						
gi 116871422_c585392-583818						
gi 347014932 gb JF967616.1						50

gi 52550798 gb AY729925.1	ATGCACGTTT	GCTTTTAAAT	TGTTACAGTT	TCATTACAAA	TAGTTGGTAT	
gi 347014916 gb JF967608.1						
gi 347547510_c553784-552155						
gi 289433373_c521599-520028						
gi 116871422_c585392-583818						
gi 347014932 gb JF967616.1						100

gi 52550798 gb AY729925.1	AGTCCGCTAT	CTCTCTTTAT	AACAGCTTTT	ATCTATTTGT	TTTTTGCGTA	
gi 347014916 gb JF967608.1						
gi 347547510_c553784-552155						
gi 289433373_c521599-520028						
gi 116871422_c585392-583818						
gi 347014932 gb JF967616.1						150

gi 52550798 gb AY729925.1	AAACTGGGT	AAACTAAGTA	TTAATCACTA	TAAATTAAT	TCTCAATTAC	
gi 347014916 gb JF967608.1						
gi 347547510_c553784-552155						
gi 289433373_c521599-520028						
gi 116871422_c585392-583818						
gi 347014932 gb JF967616.1						200

gi 52550798 gb AY729925.1	TAATTGCGTA	CTGAGATTTT	CTGAAAAAAA	GAGAGGAGTT	TTATGAATAT	
gi 347014916 gb JF967608.1					..ATGAATAT	
gi 347547510_c553784-552155				...AGGAGTT	TTATGAATAT	
gi 289433373_c521599-520028					..ATGAATAT	
gi 116871422_c585392-583818					..ATGAATAT	
gi 347014932 gb JF967616.1					..ATGAATAT	250

Lis_1A

gi 52550798 gb AY729925.1	GAAAAAAGCA	ACTATCG...	CGGCTACAGC	TGGGATTGCG	GTTACAGCAT	
gi 347014916 gb JF967608.1	GAAAAAAGCA	ACTATCG...	CGGCTACAGC	TGGGATTGCG	GTAACAGCAT	
gi 347547510_c553784-552155	GAAAAAAGCA	ACTATCG...	CGGCTACAGC	TGGGATTGCG	GTCACAGCAT	
gi 289433373_c521599-520028	GAAAAAAGCA	ACTATCG...	CGGCTACAGC	CGGGATTGCG	GTTACAGCAT	
gi 116871422_c585392-583818	GAAAAAAGCA	ACTATCG...	CGGCTACAGC	CGGGATTGCG	GTTACAGCAT	
gi 347014932 gb JF967616.1	<u>GAAAAAAGCA</u>	ACGATCGTTT	CCGCTGCTGC	TGGAATAGCT	GTCACAGCAT	300

gi 52550798 gb AY729925.1	TTGCTGCACC	AACATATCGCA	TCCGCAAGCA	CAGTAGTAGT	TGAAGCTGGA	
gi 347014916 gb JF967608.1	TTGCTGCTCC	AACAATCGCA	TCCGCAAGCA	CTGTAGTAGT	CGAAGCTGGT	
gi 347547510_c553784-552155	TTGCTGCACC	AACATATCGCA	TCCGCAAGCA	CTGTAGTAGT	TGAAGCTGGA	
gi 289433373_c521599-520028	TTGCTGCTCC	AACATATCGCA	TCCGCAAGCA	CTGTAGTAGT	TGAAGCTGGA	
gi 116871422_c585392-583818	TTGCTGCACC	AACATATCGCA	TCCGCAAGCA	CTGTAGTAGT	TGAAGCTGGA	
gi 347014932 gb JF967616.1	TCGCTGCTCC	ATCGGTTGTC	TCAGCAAATA	CAGTGGTTGT	CGCATCTGGT	350

gi 52550798 gb AY729925.1	GATACACTTT	GGGGTATCGC	TCAGAGCAAA	GGGACTACTG	TTGACGCCAT	
gi 347014916 gb JF967608.1	GATACTCTTT	GGGGTATCGC	ACAAAGTAAA	GGGACTACTG	TTGACGCAAT	
gi 347547510_c553784-552155	GATACTCTTT	GGGGTATTGC	TCAAGATAAG	GGGACAACCTG	TTGACGCACT	

gi 289433373_c521599-520028	GATACTCTTT	GGGGTATTGC	TCAAGATAAT	GGCACAACTG	TTGACGCATT	
gi 116871422_c585392-583818	GATACTCTTT	GGGGTATTGC	TCAAAGTAAA	GGGACAACTG	TTGACGCACCT	
gi 347014932 gb JF967616.1	GATACACTTT	GGGGGATCGC	TTCCAAAACCT	GGTACTACCG	TTGACCAACT	400
gi 52550798 gb AY729925.1	TAAAAAAGCA	AACAATTTAA	CCACTGATAA	AATCGTACCA	GGTCAAAAAC	
gi 347014916 gb JF967608.1	TAAAAAAGCA	AACAATTTAA	CAACAGATAA	AATCGTACCA	GGTCAAAAAT	
gi 347547510_c553784-552155	TAAAAAAGCG	AACAATCTAA	CATCTGATAA	AATCGTACCT	GGTCAAAAAT	
gi 289433373_c521599-520028	AAAAAAAGCT	AACAAACTAA	CAACTGATAA	AATTGTACCT	GGTCAAAAAT	
gi 116871422_c585392-583818	TAAAAAAGCA	AACAATCTAA	CATCTGATAA	AATCGTACCT	GGTCAAAAAT	
gi 347014932 gb JF967616.1	AAAACAACCTC	AATAAACTTG	ACTCTGATAG	AATCGTACCG	GGACAAAAT	450
gi 52550798 gb AY729925.1	TACAAGTAAA	CGAGGTTGCT	ACTGAAGAAA	AAGCAGAGAA	ATCTGTTAGC	
gi 347014916 gb JF967608.1	TACAAGTAAA	TGAGGTTGCT	GCTGCTGAAA	AAACAGAGAA	ATCTGTTAGC	
gi 347547510_c553784-552155	TACAAATTAAC	TGAGGTAGCA	AGCG...AAA	AAACAGAGAA	ATCTGTTACT	
gi 289433373_c521599-520028	TACAAGTAAAC	TGAGGTAGCG	AGCG...AAA	AAACAGAGAA	ATCTGTTAGC	Siwi_2
gi 116871422_c585392-583818	TACAAGTAAAC	TGAGGTAGCT	AGCG...AAA	AAACAGAGAA	ATCTGTTAGC	
gi 347014932 gb JF967616.1	TAACAATCAA	AGAAGTAGCT	GCTC...AAA	AAGTAGAAAA	ATCTGTTAGT	500
gi 52550798 gb AY729925.1	GCAACTTGGC	TTAATGTACG	TTCTGGCGCT	GGAGTTGACC	ACAGCATTCT	
gi 347014916 gb JF967608.1	GCAACTTGCT	TAAACGTTTCG	TAGTGGCGCT	GGTGTGATA	ACAGTATTAT	
gi 347547510_c553784-552155	GCTACTTGCT	TGAATGTACG	TTCTGGCGCT	GGAGTTGATA	ACAGTATCGT	
gi 289433373_c521599-520028	GCAACTTGCT	TAAACGTACG	TTCAAGCGCT	GGAGTTGATA	ACAGTATTGT	
gi 116871422_c585392-583818	GCTACTTGCT	TAAATGTTTCG	TTCTGGTCT	GGAGTTGACA	ATAGTATTGT	
gi 347014932 gb JF967616.1	GCAACATGGC	TGAATGTTTCG	TCATGCTCCT	GACGCAAATG	AAAAAATACT	550
gi 52550798 gb AY729925.1	TACTTCCATT	AAAGGTGGAA	CCAAAGTAAC	TGTTGAAACA	ACAGAATCAA	
gi 347014916 gb JF967608.1	TACGTCAATC	AAAGGCGGAA	CAAAAGTAAC	TGTTGAATCA	ACCGAATCTA	
gi 347547510_c553784-552155	CACTTCTTTA	AAAGGTGGCA	CGAAAGTAAC	TGTTGAATCT	ACGGAAGCAA	
gi 289433373_c521599-520028	CACTTCTTTA	AAAGGTGGCA	CTAAAGTAAC	TGTTGAATCT	ACAGAAGCAA	
gi 116871422_c585392-583818	TACTTCCCTA	AAAGGCGGTA	CAAAAGTAAC	TGTCGAAGCA	GCTGAATCCA	
gi 347014932 gb JF967616.1	TACTTCCCTA	AAAGGCGGTA	CAGTTGTCAA	AGTAGAAAGT	TCTGAAGCTA	600
gi 52550798 gb AY729925.1	ACGGTTGGCA	CAAAATTACT	TACAATGATG	GAAAAACTGG	TTACGTAAAC	
gi 347014916 gb JF967608.1	ATGGCTGGAA	CAAAATTACT	TACAACGACG	GGGAAACTGG	TTTCGTAAAC	
gi 347547510_c553784-552155	ATGGCTGGAA	CAAAATTTCA	TATGGCGAAG	GAAAAACTGG	TTATGTAAAT	
gi 289433373_c521599-520028	ATGGCTGGAA	CAAAATCACT	TATGGTGAAG	GAAAAACAGG	CTACGTAAAT	
gi 116871422_c585392-583818	ATGGCTGGAA	TAAATTTTCT	TATGGCGAAG	GAAAAACTGG	TTATGTAAAT	
gi 347014932 gb JF967616.1	ATGGTTGGAA	CAAGATCTCT	TTTGACAATG	GTAAAACTGG	TTATGTAAAC	650
gi 52550798 gb AY729925.1	GGTAAATACT	TAACAGACAA	AGCAACTAGC	ACTCCAGTTG	TT...AAACA	Ino_2
gi 347014916 gb JF967608.1	GGTAAATACT	TAACGTACAA	AGTAGCAAGC	ACTCCTGTTG	CACCAACACA	
gi 347547510_c553784-552155	GGCAAATACT	TAGGTACTAC	TGTAACAAGT	GCCCC....	.T...GCACC	
gi 289433373_c521599-520028	GGCAAATACT	TAGGTAATGC	TGTAACAAGT	GCTCCGTCTG	CT...ACACC	
gi 116871422_c585392-583818	GGCAAATACT	TAGGTGATGC	TGTGACAAGT	GCTCCTGTTG	CT...AAACA	
gi 347014932 gb JF967616.1	GGAAAATACT	TATCTGACGC	AAAAGTCGCT	GCTCCTGTC.		700
gi 52550798 gb AY729925.1	AGAAGTGAAA	AAAGAAACGA	CA.....CA	ACAAGTTAAA	CCTGCTACAG	
gi 347014916 gb JF967608.1	AGAAGTGAAA	AAAGAAACTA	CTACT...CA	ACAAGCTGCA	CCTGCTGCAG	
gi 347547510_c553784-552155	AGAAGTAAAA	GAAGAAACAA	CTACTCAAGC	GCAAGCGGCA	CCTGCTGCTG	Iva_1
gi 289433373_c521599-520028	AGAAGTTAAA	CAAGAGGAAA	CTAC.....	ACAAGCGGCT	CCTGCTCAAC	Sel_1
gi 116871422_c585392-583818	AGAAGTAAAA	CAAGAAACGA	CAAA.....	ACAAACTGCA	CCTGCTGCAG	
gi 347014932 gb JF967616.1					...GTTACGA	750
gi 52550798 gb AY729925.1	AAGCAAAAAC	AGAAGTAAAA	CAACCAACTA	CACAACAAAC	TGCTCTGCAG	
gi 347014916 gb JF967608.1	AAACAAAAC	TGAAGTAAAA	CA...AACTA	CACAAGCAAC	TACACCTGCA	
gi 347547510_c553784-552155	AAACGAAACC	AGAAGTAAAA	CA...ATCTA	CACCAGCAAC	TGTTCTTCCT	
gi 289433373_c521599-520028	AAACTAAAAC	AGAAGTTAAA	CA...AGCTA	CACCAGCAGC	AACTACTGAA	
gi 116871422_c585392-583818	AAACTAAAAC	AGAAGTGAAA	CA...ATCAA	CACCTGCCCC	TACTGCTCCA	Wel_1
gi 347014932 gb JF967616.1	AAGCAGTGAC	CCA...CAAAG	CA....GAAG	CAAAAGTCGC	TGCTACTTCG	800
gi 52550798 gb AY729925.1	CCAAAAGCAG	CTGAAACTAA	AGAA...GCT	CCAGTAGTAG	ACCAAAATGC	
gi 347014916 gb JF967608.1	CCTAAAGTAG	CAGAAACGAA	AGAA...ACT	CCAGTGGTAG	ATCAAAATGC	

gi 347547510_c553784-552155	AAAG..... CGGAAACAAA AACAGAAACT CCTGCTGTAG ATACAACTGC	
gi 289433373_c521599-520028	AAAGATGCAG TAGAACTAA AACAACTGCT CCTGCGGTAG ATACAAATGC	
gi 116871422_c585392-583818	<u>AAAG...CAG</u> <u>CG</u> GAACTAA AACA...GCA CCAGTAGTAG ATACTAATGC	
gi 347014932 gb JF967616.1	ACACA..... .CGCAGTTAA A..... GTGG ATACGAACGC	850

gi 52550798 gb AY729925.1	TACTACACAT AACGTTAAAA GCGGCGACAC AATTTGGGCA TTATCCGTGA	
gi 347014916 gb JF967608.1	TACTACACAC GCTGTTAAAA GCGGTGACAC TATTTGGGCT TTATCCGTAA	
gi 347547510_c553784-552155	TTCAACATAC ACTGTTAAAA GTGGTGACAC AATTTGGGCA TTATCCAGTA	
gi 289433373_c521599-520028	AACAACATCAT ACCGTTAAAA GTGGCGATAC AATTTGGGCA TTATCCGTGA	
gi 116871422_c585392-583818	TACTACTCAT ACTGTAAAAA GCGGTGACAC AATTTGGGCG TTATCCGTGA	
gi 347014932 gb JF967616.1	TTCTACTTAC AAAGTAAAAA GCGGTGATAC GATCTGGGCT TTATCTGTCA	900

gi 52550798 gb AY729925.1	AGTACGGTGT TTCTGTTCAA GATATTATGT CATGGAATAA TTTATCTTCT	
gi 347014916 gb JF967608.1	AATACGGTGT TTCCGTTCAA GACATTATGT CATGGAATAA TTTATCTTCT	
gi 347547510_c553784-552155	AATATGGCAC TTCTGTTCAA AACATAATGT CATGGAATAA TTTATCTTCT	
gi 289433373_c521599-520028	AATACGGCGC TTCTGTTCAA GACCTAATGT CATGGAATAA TTTATCTTCT	
gi 116871422_c585392-583818	AATACGGCGC TTCAGTTCAA GATTTAATGT CATGGAATAA TTTATCTTCT	
gi 347014932 gb JF967616.1	AATATGGCGT TCCTGTTCAA AAATTGATCG AATGGAATAA TCTTTCTTCT	950

gi 52550798 gb AY729925.1	TCTTCTATTT ATGTAGGTCA AAAATTAGCT ATTAACAAC ..CAACTAA	
gi 347014916 gb JF967608.1	TCTTCTATTT ATGTAGGTCA AAAACTTGCT ATTAACAAC <u>...CAGCCAA</u>	Mono_A
gi 347547510_c553784-552155	TCTTCTATTT ATGTAGGACA AGTTCTTGCT GTTAAACAGG AAGCTGCTAA	
gi 289433373_c521599-520028	TCTTCTATTT ATGTGGGTCA AAATATCGCA GTAAACAAC GTGCTGCTAA	
gi 116871422_c585392-583818	TCTTCTATTT ATGTAGGACA AAAAATTGCT GTTAAACAAC GCGCTGCTAA	
gi 347014932 gb JF967616.1	TCTTCGATCT ATGTTGGTCA AACGATCGCA GTAAAGAAG CGGCTGCTAA	1000

gi 52550798 gb AY729925.1	AACAGTAGCT CCAAAAGCAG AAACAAAAAC TCAAGCTCCT GCAGCTGAAA	
gi 347014916 gb JF967608.1	<u>CACAGCTACT</u> CCAAAAGCAG AAGTGAAAAA AGAAGCTCCA GCAGCTGAAA	
gi 347547510_c553784-552155	AACAGCTTCA CCAAAAGCGG AAGTGAAAAA GGAAGCTCCA ACAGCTGAAA	
gi 289433373_c521599-520028	AAACACTGCT CCAAAAGCTG AAGCCAAAAAC AGAAGCTCCA GCAGCAGAAA	
gi 116871422_c585392-583818	AACAGCTGCT CCAAAAGCAG AAGTGAAAAA AGAAGCTCCA GCAGTTGAAA	
gi 347014932 gb JF967616.1	AGCTGCTCCA ACAACTGTAA AACAAAGCCGC TCCTGCTAAA GTCGCTCCGA	1050

gi 52550798 gb AY729925.1	AACAAACA.. .GCTCCAGCA GTAAAAGA.A AATTCAAATG CGAATAC...	
gi 347014916 gb JF967608.1	AACAAGCT.. .GCACCAGTA GTTAAAGA.A AATACTAACA CTAACACAAA	
gi 347547510_c553784-552155	AACAAGTATC TGCTCCAGTA GTAAAAGA.A AATACTCAAA CT.....	
gi 289433373_c521599-520028	AACAAACAGC TGCACCAGTA GTAAAAGA.A AGCACTAACA CTTCTAC...	
gi 116871422_c585392-583818	AAGAACTTC TACTCCAGTG GTAAAAGA.A AATACAAATA CT.....	
gi 347014932 gb JF967616.1	AACAAGAAGT GAAGCAAAACA GCACCGGCTA AACAAAGAACA AGCAAAACC.	1100

gi 52550798 gb AY729925.1	TGCTACTACT GAGAAAAAAG AACTGCAAC GGAACAACAA ACACTACTA	
gi 347014916 gb JF967608.1	TGCTACTACA GAGAAAAAAG AAA...CAAC ACAACAACAA ACAGCACCTA	
gi 347547510_c553784-552155	...ACAACA GCGAAAAAAG AAGTTACACC TCAAAAACAA ACAAAATACAC	
gi 289433373_c521599-520028	TACTACAAC TTTAAAAAAG AAACAACAAC TGAAAAACAA ACTTCTACAA	
gi 116871422_c585392-583818	ACA GTGAAAAAAG AAGTAACTAC ACAAAACAA ACAAAACTA	
gi 347014932 gb JF967616.1	GGCTGCTAAA GAAACAGTGA AACCAGCTGT TTCCAAGCCA AAAGCAGCTA	1150

gi 52550798 gb AY729925.1	...AAGCACC AACTCAAGCT GCGAAACCAG CTCC.....	
gi 347014916 gb JF967608.1	...AAGCACC AACAGAAGCT GCAAAACCAG CTCC.....	
gi 347547510_c553784-552155	...AAGCACC GGCACAAGCT GCAAAACCAG CCCC.....	
gi 289433373_c521599-520028	CAAAAGCACC TGCTCAAGCT GCAAAACCAG CTCC.....	
gi 116871422_c585392-583818	CTAAAGCGCC TGCTCAAGCT GCAAAACCAG CTCCGGCTCC	
gi 347014932 gb JF967616.1	CACC AGCCCTTACA GCGAAACCAG CTGTAGAACA AAAAGTAAGT	1200

gi 52550798 gb AY729925.1	GCTCCGTCTA CTAACACAAA T..... AA AACA...AA	
gi 347014916 gb JF967608.1	GCACCATCTA CAAACACAAA TGCT..... AATAA AACG...AA	
gi 347547510_c553784-552155	GCTCCAACCTG TTAACACTAA CGCTTCTTCT TACACAGTAA AAAGCGGCGA	
gi 289433373_c521599-520028	GCTCCAACAG TTAATACAAA CGCTTCTTCT TACACAGTAA AAAGTGGCGA	
gi 116871422_c585392-583818	GCACCAACAG TTAACACAAA TGCATCTACT TATACTGTAA AAAGTGGTGA	
gi 347014932 gb JF967616.1	ACACCTGCAG TTGACACAAG CGCTGCTACT TATAAAGTAC AAAATGGTGA	1250

gi 52550798 gb AY729925.1	CACAACAAAC AACCAATAC..	AAATGC
---------------------------	------------------------------	------------

gi 347014916 gb JF967608.1	TACGAATACA	AACAATAC..			TAATAC
gi 347547510_c553784-552155	CACTTTAAGC	AAAATTGCTA	CAACATTTGG	AACTACAGTT	TCCAAAATTA
gi 289433373_c521599-520028	TACATTAGGC	AAAATTGCTT	CTACATTTGG	AACTACTGTT	TCTAAAATTA
gi 116871422_c585392-583818	TTCTCTAAGT	AAGATTGCTA	ACACATTTGG	AACAAGCGTT	TCCAAAATCA
gi 347014932 gb JF967616.1	TTCCCTTGGG	AAAATCGCTT	CTCTATTCAA	AGTTTCAGTA	GCTGATCTAA 1300

gi 52550798 gb AY729925.1	AAGCAC....		A	CCATCAA...	
gi 347014916 gb JF967608.1	AAGTAC....		A	CCATCTA...	
gi 347547510_c553784-552155	AAGCACTTAA	TGGCTTAAAT	..AGTGATAA	CCTTCAA.GT	TAGACAAGTG
gi 289433373_c521599-520028	AAGCACTTAA	CGGCTTAACA	..AGTGATAA	CCTTCAA.GT	TGGAGATGTT
gi 116871422_c585392-583818	AAGCACTTAA	TAACCTAACT	..AGCGATAA	TCTACAA.GT	TGGAACTGTG
gi 347014932 gb JF967616.1	CAAACTGGAA	CAACTTGAAT	GCAACCAGCA	CGATCTATGC	TGGTCAAGAA 1350

gi 52550798 gb AY729925.1		AAAACACAAA	CACAAATACT	AACACGAACA	
gi 347014916 gb JF967608.1		AAAATACCAA	TACTAATACA	AACCTCAATA	
gi 347547510_c553784-552155	TTAAAAGTAA	AAGGTACAGT	ACCAACTGCT	AATACAAACA	GTAATAGCAA
gi 289433373_c521599-520028	TTAAAAGTAA	AAGGTACTGT	CCCAGCTACA	AATACCAATA	CT.....
gi 116871422_c585392-583818	TTAAAAGTGA	AAGGTACTGT	ACCAACTACT	AACACAAACA	ATAACAGTAA
gi 347014932 gb JF967616.1	TTGAGCGTAA	AAGCCAGTGC	TGCAAAACCA	AAAAGTGCTG	CTCCTGCGAA 1400

gi 52550798 gb AY729925.1		CGA	ATACTAACAC	AAAC.....	
gi 347014916 gb JF967608.1		CGA	ATACAAACTC	AAATACGAAT	GCTAAT....
gi 347547510_c553784-552155	TGCTACTGCT	CCAACAACGA	ACACAAATAA	TAATACTTCA	AATACAAGTA
gi 289433373_c521599-520028	.GCAACTGCT	CCAACAACAA	ATACAAATAA	TAATACAAGT	TCATCTAATA
gi 116871422_c585392-583818	TACAACTGCA	CCAACAACAA	ATACAAGCAA	CAACAATACT	AGTCTAATA
gi 347014932 gb JF967616.1	ACCAGCAGTT	TCTAGACCTG	CTACCAGCAC	ACCAGCTAA	GTAACACCAA 1450

Gra_1

gi 52550798 gb AY729925.1	CAAGG..TTC	CACTAACAAT	G.....		
gi 347014916 gb JF967608.1	CAAGG..TTC	TTCTAA	CAAT AA		 Mono_B
gi 347547510_c553784-552155	CAAGTACACC	TTCTAAAAAC	ACCAATACAA	ACTCTAATGC	TAGCCAAGGT
gi 289433373_c521599-520028	CAAGTACTCC	TTCTAAGAAT	AACAACAC..		TAATCAAAGT
gi 116871422_c585392-583818	CAAGTACTCC	TTCAAAAAAC	ACAAACACAA	A.....TAC	TAACCAAGGT
gi 347014932 gb JF967616.1	CTAATACAAC	AAATAACAGC	ACGCCAACAA	CAAATGTAA	CAACAATACT 1500

gi 52550798 gb AY729925.1		CGAG	CGCAAGTGCT	TTAATCGCTG	AAGCTCAAAA
gi 347014916 gb JF967608.1		CA	GCAATTCAAG	TGCGAGTGCT	ATTATTGCTG
gi 347547510_c553784-552155	TCTAG...CA	GCAGCGCAAG	CGCAAGTTCT	CTTATCGCTG	AAGCTCAAAA
gi 289433373_c521599-520028	TCAAG...CA	ACAGCTCTAG	TGCAAGTGCA	ATCATTGCCG	AAGCTCAAAA
gi 116871422_c585392-583818	TCAAG...CA	ACAGCGCAAG	TGCAAGTGCT	CTTATAGCTG	AAGCTCAAAA
gi 347014932 gb JF967616.1	TCGCAGTCTA	GCAATGCAAG	CTTCTCTGCA	TTATATGCAG	AAGCTAAAAA 1550

gi 52550798 gb AY729925.1	ACATCTTGGA	AAAGCTTACT	CTTGGGGTGG	TAACGGACCA	ACTACATTTG
gi 347014916 gb JF967608.1	ACACCTTGGA	AAAGCTTATT	CATGGGGTGG	TAACGGACCA	ACTACATTTG
gi 347547510_c553784-552155	ACATCTTGGA	AAAGCTTATT	CATGGGGTGG	TAACGGGCCA	ACTACATTCTG
gi 289433373_c521599-520028	ACACCTTGGA	AAAGCTTATT	CATGGGGTGG	AAATGGACCA	ACTACATTTG
gi 116871422_c585392-583818	ACATCTTGGA	AAAGCTTATT	CATGGGGCGG	AAACGGACCA	ACTACATTTG
gi 347014932 gb JF967616.1	ACACTTAGGC	AAACCTTATA	CTTGGGGAGC	TAGAGGCCCA	AGCACATTTG 1600

gi 52550798 gb AY729925.1	ATTGCTCCGG	TTTCACTAAA	TATGTATTCTG	CTAAATCTGG	AATTTCTCTT
gi 347014916 gb JF967608.1	ATTGCTCTGG	TTACACTAAA	TATGTATTTG	CTAAAGCGGG	AATCTCCCTT
gi 347547510_c553784-552155	ATTGCTCCGG	TTTCACTAAA	TATGTATTTG	CTAAATCCGG	CGTTACATTA
gi 289433373_c521599-520028	ACTGCTCTGG	TTTCACTTCT	TACGTATTTG	CTCAATCAGG	CATTACACTT
gi 116871422_c585392-583818	ATTGTTCTGG	TTTCACTTCT	TATGTTTTTG	CTAAATCTGG	TATTTCTCTT
gi 347014932 gb JF967616.1	ACTGCTCTGG	TTTCACTAGC	TATGTTTTCA	ATCAAGTAGG	TCTTAGCCTT 1650

gi 52550798 gb AY729925.1	CCACGTA	CTGGCGCACA	ATACGCTAGC	ACTACAAGAA	TTTCCGAATC
gi 347014916 gb JF967608.1	CCACGTA	CTGGCGCACA	ATACGCTAGC	ACTACAAGAA	TCTCTGAATC
gi 347547510_c553784-552155	CCACGTA	CCGGTGCTCA	ATATGCTAGC	TCAACAAAGA	TCTCTGAATC
gi 289433373_c521599-520028	CCACGTA	CCGGCGCTCA	ATATGCTAGC	ACAACATAAG	TATCTGAATC
gi 116871422_c585392-583818	CCTCGTACAT	CTGGCGCGCA	ATATGCTAGT	ACATCAAGAA	TCTCTGAATC
gi 347014932 gb JF967616.1	TCTGGAAACT	CTGGCGACACA	ATATGCACAC	TCTATAAAGA	TATCTAAATC 1700

gi 52550798 gb AY729925.1	ACAAGCAAAA	CCTGGTGATT	TAGTATTCTT	TGACTATGGT	AGCGGAATTT	
gi 347014916 gb JF967608.1	TCAAGCAAAA	CCTGGTGATT	TAGTATTCTT	TGACTATGGT	AGCGGAATTT	
gi 347547510_c553784-552155	GCAAGCAAAA	CCTGGTGATT	TAGTATTCTT	TGATTATGGT	AACGGAATTG	
gi 289433373_c521599-520028	AGAGGCACAA	CCTGGTGATT	TAGTATTCTT	TGATTATGGT	AGCGGAATTG	
gi 116871422_c585392-583818	TCAAGCAAAA	CCTGGTGATT	TAGTATTCTT	TGATTATGGT	AGCGGAATTG	
gi 347014932 gb JF967616.1	GCAAGCACAA	CCAGGCGACT	TGGTATTCTT	TAACACGGC	AAAGGCATTG	1750

gi 52550798 gb AY729925.1	CTCACGTTGG	TATTTACGTT	GGTAATGGTC	AAATGATTAA	CGCGCAAGAC	
gi 347014916 gb JF967608.1	CTCACGTTGG	TATCTACGTT	GGTAATGGTC	AAATGATTAA	CGCGCAAGAC	
gi 347547510_c553784-552155	CTCACGTTGG	GATTTATGTT	GGTAATGGTC	AAATGATTAA	CGCACAAGAC	
gi 289433373_c521599-520028	CTCACGTTGG	TATTTATGTA	GGTAATGGTC	AAATGATTAA	TGCACAAGAC	
gi 116871422_c585392-583818	CTCACGTTGG	TATCTATGTA	GGAAATGGTC	AAATGATTAA	CGCACAAGAC	
gi 347014932 gb JF967616.1	CCCACGTTGG	TATCTACATC	GGCGGTGGAC	AAATGATCGA	TGCACAAGAT	1800

gi 52550798 gb AY729925.1	AATGGCGTTA	AGTATGATAA	TATCCACGGC	GCTGGCTGGG	GTAAATTCCT	
gi 347014916 gb JF967608.1	AATGGCGTTA	AATACGATAA	CATCCACGGC	TCTGGCTGGG	GTAAATATCT	
gi 347547510_c553784-552155	AACGGTGTTA	AATACGATAA	TATTCACGGT	TCAGGATGGG	GTCAATTCCT	
gi 289433373_c521599-520028	AACGGCGTTA	AATATGATAA	TATTCACGGC	TCTGGATGGG	GTCAATATCT	
gi 116871422_c585392-583818	AATGGCGTTA	AATACGATAA	TATCCACGGT	TCAGGCTGGG	GTAAATATCT	
gi 347014932 gb JF967616.1	AACGGCGTTT	CTATCGATAA	TATCTATGGA	ACTGGCTGGG	GAAATATATCT	1850

Lis_1B

gi 52550798 gb AY729925.1	AGTTGGATTC	GGTCGCGTAT	AATTAATTAA	TAATTTAAAG	TAACCTGTGG	
gi 347014916 gb JF967608.1	AGTTGGCTTC	GGTCGCGTAT	AA.....			
gi 347547510_c553784-552155	TGTTGGATTC	GGTCGCGTAT	AATTAAT...	.AATTGAATG	AAACCTGTGG	
gi 289433373_c521599-520028	AGTTGGCTTT	GGTCGCGTAT	AA.....			
gi 116871422_c585392-583818	AGTTGGCTTT	GGTCGCGTAT	AA.....			
gi 347014932 gb JF967616.1	AGTTGGCTTC	GGTCGCGTAT	AA.....			1900

gi 52550798 gb AY729925.1	AGCAGGAAGT	TCGCTTCACA	GGTTTTTTGT	TGGAAATTTT	ATCTTAATGA	
gi 347014916 gb JF967608.1						
gi 347547510_c553784-552155	AGCAGGAATT	TCGCTCCACA	GG.....			
gi 289433373_c521599-520028						
gi 116871422_c585392-583818						
gi 347014932 gb JF967616.1						1950

gi 52550798 gb AY729925.1	AAGACGGTGC	ATGATGAAAA	ACTCGATAAA	ACTAAAACTA	TTTCCTAAGT	
gi 347014916 gb JF967608.1						
gi 347547510_c553784-552155						
gi 289433373_c521599-520028						
gi 116871422_c585392-583818						
gi 347014932 gb JF967616.1						2000

gi 52550798 gb AY729925.1	TTACAAAAGG	CTATAAAGAA	GGCTATCCTT	TAATTCTAAA	AGAACGTTTC	
gi 347014916 gb JF967608.1						
gi 347547510_c553784-552155						
gi 289433373_c521599-520028						
gi 116871422_c585392-583818						
gi 347014932 gb JF967616.1						

gi 52550798 gb AY729925.1	GAAAAATGGC	CAAAAGATCT	ACAGGAAGGC	GACCTAGTAG	AATTAATAGA	
gi 347014916 gb JF967608.1						
gi 347547510_c553784-552155						
gi 289433373_c521599-520028						
gi 116871422_c585392-583818						
gi 347014932 gb JF967616.1						

gi 52550798 gb AY729925.1	TACGAATGGT	CAATTTATAG	CTCGTGGGTA	TCACGGAAAA	CAAAATAAAG
gi 347014916 gb JF967608.1					
gi 347547510_c553784-552155					
gi 289433373_c521599-520028					
gi 116871422_c585392-583818					
gi 347014932 gb JF967616.1					

gi 52550798 gb AY729925.1	GCGATGGCTG	GCTTTTCACC	TGGGATAAAC	AACAGCAACT	TGATGAGCAC
gi 347014916 gb JF967608.1					
gi 347547510_c553784-552155					
gi 289433373_c521599-520028					
gi 116871422_c585392-583818					
gi 347014932 gb JF967616.1					

gi 52550798 gb AY729925.1	TTTTTAACAA	CT
gi 347014916 gb JF967608.1		..
gi 347547510_c553784-552155		..
gi 289433373_c521599-520028		..
gi 116871422_c585392-583818		..
gi 347014932 gb JF967616.1		..