

VALIDACIÓN DE PCR PARA DETECCIÓN DE *Listeria monocytogenes* EN CARNES CRUDAS DE RES Y POLLO

Kirvis Torres¹, Raul Poutou^{2*}, Ana Carrascal¹, Sara Sierra¹, Marcela Mercado^{1,3}

¹Laboratorio de Microbiología de Alimentos. ²Laboratorio de Biotecnología Aplicada. Grupo de Biotecnología Ambiental e Industrial. ³Grupo de Enfermedades Infecciosas. Departamento de Microbiología, Facultad de Ciencias. Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá, D.C. Colombia.

*Correspondencia: E-mail:rp000274@javeriana.edu.co

RESUMEN

Listeria monocytogenes es un microorganismo zoonótico emergente en la industria de alimentos, resultando de gran interés para la salud pública. El objetivo de este trabajo fue validar la técnica de PCR para la detección de este microorganismo en carnes crudas de res y pollo. El procedimiento de extracción de ADN fue realizado con lisozima, proteinasa K y fenol-cloroformo a partir de muestras contaminadas artificialmente. La especificidad de los cebadores LI1 y U1 fue comprobada por la amplificación de una banda de 938pb correspondiente a un fragmento del ADNr 16S; de igual manera los cebadores LF y LR amplificaron una banda del gen *hlyA* de 750pb; lo que permitió la identificación de género (banda 938pb) y especie (banda de 750pb) respectivamente. Las cepas de los otros géneros bacterianos ensayados no amplificaron ninguna de las bandas específicas. El límite de detección para la PCR fue de 10^2 y 10^4 UFC/gr para carnes de res y pollo respectivamente; el «Gold Standard» reportó 10^2 UFC/ml para ambos alimentos. La comparación de la PCR vs., el método «Gold Standard» reportó en carne de pollo una concordancia observada de 98.43%, una sensibilidad del 96.9%, una especificidad de 100%, un valor predictivo positivo del 100% y un valor predictivo negativo del 97%; para la carne de res todos los parámetros anteriores fueron del 100%. Estos resultados demostraron la factibilidad de la PCR para el control de calidad de carnes crudas de res y pollo.

Palabras clave: Listeriosis; *Listeria monocytogenes*; validación de PCR, carne de pollo; carne de res.

PCR VALIDATION FOR DETECTION OF *Listeria monocytogenes* IN RAW BEEF AND CHICKENS

ABSTRACT

Listeria monocytogenes is a zoonotic emergent microorganism in the food industry, being from great interest for the public health. The aim of this work was to validate the PCR technique for the detection of *Listeria monocytogenes* in raw meats of beef and chicken. The DNA extraction procedure was carried out with lysozyme, proteinase K and phenol-chloroform, starting from artificially contaminates samples. The specificity of primers LI1 and U1 was verified by the amplification of a 938bp band corresponding to a fragment of rDNA 16S; in the same way the «primers» LF and LR amplified a band of 750bp corresponding to the *hlyA* gene; allowing the genus (938bp band) and species (750bp band) identification respectively. Other bacterial strains assayed did not amplify any of the *Listeria* specific bands. The detection limit for PCR was of 10^2 and 10^4 UFC/gr on beef and chicken meat respectively; the Gold Standard reported 10^2 UFC/ml in both cases. The comparison of the PCR versus the Gold

Standard method reported upon chicken meat an observed concordancy of 98,43%, a sensitivity of 96,9%, an specificity of 100%, a positive predictive value of 100% and a negative predictive value of 97%; for beef all the previously parameters were 100%. This results showed the feasibility of the PCR for the quality control on raw beef and chicken.

Key words: Listeriosis; *Listeria monocytogenes*; PCR validation, beef, poultry meat

INTRODUCCIÓN

La listeriosis humana forma parte del grupo de enfermedades transmitidas por alimentos (ETA) y es una enfermedad esporádica ocasionada por *L. monocytogenes*. Los alimentos han sido el vehículo principal de entrada de *L. monocytogenes* al organismo humano (Allmann 1995; Boerlin 1997; Da Silva 1995). La listeriosis es una enfermedad relativamente rara, en comparación con otras enfermedades; aunque la tasa de incidencia es de 4 a 8 casos por cada 1.000.000 de personas, la tasa de mortalidad está entre 20 y 30% de los pacientes hospitalizados; es una mortalidad elevada en comparación con otras enfermedades transmitidas por alimentos (Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación 2000; Torres 2004). A pesar de la ubicuidad de *Listeria monocytogenes*, la incidencia anual de listeriosis es de 0.7 por 100.000 habitantes, presentándose en tres picos: los pacientes con más de 70 años (2.1/100.000), las mujeres embarazadas (12/100.000) y los pacientes inmunosuprimidos.

L. monocytogenes puede ser aislada de un amplio grupo de alimentos, tales como carne cruda y curada, leche cruda, pasteurizada y queso (Goulet 1993; Qvist 1994; Salvat 1995). Los alimentos asociados más frecuentemente con listeriosis humana son los productos listos para consumir que promueven el crecimiento de *L. monocytogenes*, por ser productos que tienen un tiempo de conservación prolongado en condiciones de refrigeración y que se consumen sin tratamiento listericida (Farber 1994). Colombia no es ajena al panorama mundial, donde la infección por *L. monocytogenes* cobra dimensiones importantes a causa de la descripción de brotes entéricos como consecuencia del consumo de alimentos contaminados como leches, quesos y al aumento del consumo de carnes parcialmente cocidas y vegetales

crudos (Hokanson 1994; Torres 2004; Vorster 1993). Un estudio realizado por el Laboratorio de Salud Pública del Distrito Capital (Bogotá, D.C., Colombia) en muestras de derivados cárnicos procedentes de diferentes hospitales entre los años 2001 y 2002, mostró una incidencia de *L. monocytogenes* del 14 y 5.08%, respectivamente, en derivados cárnicos y una incidencia de 2.5% en carnes de res y cerdo (Ramírez 2002; Vera 2003).

Actualmente la identificación de *L. monocytogenes* se realiza por métodos convencionales, los cuales requieren, mínimo de 5 días para declarar si un alimento esta libre de *Listeria* y 10 días adicionales para reconocer la especie *monocytogenes* (Allaert 2002); sin embargo, en la industria de alimentos estos métodos no permiten tomar decisiones rápidas, lo que causa un incremento en el costo del producto final por los períodos largos de cuarentena antes de su liberación. Por este motivo son importantes las técnicas rápidas y sensibles como la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) (Wan 2003; Weon 2002), que permitan detectar este patógeno en materiales crudos y productos procesados, para llevar un control más eficiente del proceso de producción, monitorear las prácticas de limpieza e higiene y tomar decisiones a corto plazo.

El objetivo de este estudio fue validar una técnica de PCR para la identificación de *Listeria monocytogenes* en carnes crudas de res y pollo, alimentos donde no ha sido estandarizada la técnica.

MATERIALES Y MÉTODOS

Cepas: 42 cepas bacterianas divididas en 21 microorganismos gramnegativos y 21 grampositivos fueron usadas en este estudio (Tabla 1).

Tabla 1. Microorganismos utilizados en el estudio

No.	CÓDIGO	CEPAS	GRAM	PROCEDENCIA
1	L1	<i>Listeria monocytogenes</i> (Aislada de leche)	positivo	Lab. de Microbiología de Alimentos PUJ
2	L2	<i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 1915	positivo	ATCC
3	L3	<i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 4334	positivo	ATCC
4	L4	<i>Listeria monocytogenes</i> (Aislada de leche)	positivo	Lab. de Microbiología. Secretaría Distrital de Salud
5	L5	<i>Listeria innocua</i> suiza	positivo	Lab. de Microbiología. Secretaría Distrital de Salud
6	L6	<i>Listeria monocytogenes</i> suiza ATCC 4640	positivo	ATCC
7	L7	<i>Listeria monocytogenes</i>	positivo	Lab. de Microbiología. Secretaría Distrital de Salud
8	L8	<i>Listeria monocytogenes</i> (Aislada de carne)	positivo	Lab. de Bromatología. Secretaría Distrital de Salud
9	L9	<i>Listeria monocytogenes</i> (Aislada de queso)	positivo	Lab. de Bromatología. Secretaría Distrital de Salud
10	33	<i>Acinetobacter baumannii</i>	negativo	Lab. de Microbiología. Secretaria Distrital de Salud.
11	29	<i>Citrobacter freundii</i>	negativo	Lab. de Microbiología Especializada PUJ
12	11E	<i>Enterobacter agglomerans</i>	negativo	Lab. de Microbiología Especializada PUJ
13	9	<i>E.coli</i> O126 B36	negativo	CDC ATLANTA
14	18	<i>E.coli</i> O126 B16	negativo	CDC ATLANTA
15	16	<i>E.coli</i> ATCC 8739	negativo	Lab. de Microbiología de Alimentos PUJ
16	12	<i>E.coli</i> O127	negativo	CDC ATLANTA
17	31	<i>E.coli</i> ATCC 25912	negativo	Lab. de Microbiología. Secretaria Distrital de Salud.
18	17	<i>E.coli</i> de Leche	negativo	Lab. de Microbiología de Alimentos PUJ
19	2	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	negativo	Lab. de Microbiología. Secretaria Distrital de Salud
20	35	<i>Moraxella catharralis</i> ATCC 8176	negativo	Lab. de Microbiología Especializada PUJ
21	1	<i>Proteus vulgaris</i>	negativo	Lab. de Microbiología Especializada PUJ
22	30	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27813	negativo	Lab. de Microbiología. Secretaria Distrital de Salud.
23	10	<i>Salmonella bredeney monophila</i>	negativo	Lab. de Microbiología de Alimentos PUJ
24	3	<i>Salmonella choleraesuis</i>	negativo	CDC ATLANTA
25	4	<i>Salmonella enteritidis</i>	negativo	Lab. de Microbiología Especializada PUJ
26	5	<i>Salmonella infantis</i>	negativo	CDC ATLANTA
27	13	<i>Salmonella paratyphi A</i>	negativo	Lab. de Microbiología de Alimentos PUJ
28	15	<i>Salmonella paratyphi B</i>	negativo	Lab. de Microbiología de Alimentos PUJ
29	14	<i>Salmonella typhi</i>	negativo	Lab. de Microbiología de Alimentos PUJ
30	19	<i>Salmonella tiphymurium</i>	negativo	Lab. de Microbiología de Alimentos PUJ
31	24	<i>Bacillus licheniformes</i>	positivo	Lab. de Microbiología Especializada PUJ
32	22	<i>Bacillus subtilis</i>	positivo	Lab. de Microbiología de Alimentos PUJ
33	27	<i>Clostridium perfringens</i>	positivo	Lab. de Microbiología de Alimentos PUJ
34	7	<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 9212	positivo	Lab. de Microbiología. Secretaria Distrital de Salud.
35	20	<i>Enterococcus faecalis</i>	positivo	Lab. de Microbiología Especializada PUJ
36	26	<i>Lactobacillus acidophilus</i>	positivo	Lab. de Microbiología de Alimentos PUJ
37	34	<i>Lactobacillus bavaricus</i>	positivo	Lab. de Microbiología de Alimentos PUJ
38	25	<i>Lactobacillus casei</i>	positivo	Lab. de Microbiología de Alimentos PUJ
39	32	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 29213	positivo	Lab. de Microbiología. Secretaria Distrital de Salud.
40	21	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	positivo	Lab. de Microbiología Especializada PUJ
41	28	<i>Streptococcus agalactiae</i>	positivo	Lab. de Microbiología. Secretaria Distrital de Salud.
42	23	<i>Lactococcus lactis</i>	positivo	Lab. de Microbiología de Alimentos PUJ

Extracción de ADN cromosomal

Para la extracción de ADN las cepas Gramnegativas fueron cultivadas en caldo LB (triptona 10g/l, extracto de levadura 5g/l, NaCl 0.5g/l) y las cepas grampositivas en caldo BHI durante 12 horas a 37°C y 250r.p.m. Un mililitro de cultivo fue centrifugado por 10' a 6000r.p.m., para las grampositivas y las gramnegativas a 3000r.p.m., las células obtenidas se lavaron con tampón TE 1X (10mM Tris-HCl, 1mM EDTA, pH 8.0 +/-0.2). Para la lisis celular el "pellet" resultante fue resuspendido en 200µl de tampón TE 1X más 2mg/ml de lisozima y se incubó durante 30'a 37°C. Posteriormente para lograr la degradación de las proteínas se añadió 300µl de tampón TE1X más 1% (p/v) de SDS y proteinasa K a concentración final de 100µg/ml, la mezcla se incubó a 65°C por 1 hora. Para eliminar los péptidos y lípidos residuales se adicionó 84µl de una solución 5M de NaCl más 60µl de CTAB (10% (p/v) disuelto en 0.7M de NaCl) y se incubó 20' a 65°C. La suspensión resultante se trató con una mezcla 24:1 de fenol-cloroformo. Una vez separadas las fases por centrifugación, la fase acuosa se trató con 2-propanol para lograr la precipitación del ADN. El ADN precipitado se lavó con etanol al 70% (v/v) y fue secado a 37°C y resuspendido en tampón TE 1X. Para la determinación de la pureza y concentración de los ADN obtenidos se empleó un espectrofotómetro Biospec 1601 Shimadzu. Se aplicó corrección de fondo al de 320nm, según Sambrook, J. *et al.* 1989 (Poutou 2000; Poutou 2000; Sambrook 1983; Simon 1996).

Reacción de PCR

La reacción de PCR fue ligeramente modificada a partir de las condiciones empleadas por Bansal en 1996 y Burbano en el 2003 para ajustarla a las condiciones de ensayo (Bansal 1996; Burbano 2003). Para la PCR se emplearon los cuatro cebadores: L1 (CTCCATAAAGGTGACCCT), U1 (CAGCMGCCGCGGTAATWC), LF (CAAACGTTAACAACGCAGTA) y LR (TCCAGAGTGATCGATGTTAA) (Bansal 1996; Burbano 2003; Zamora 2000). El volumen final de la reacción de PCR fue de 30ml, conteniendo tampón de PCR 1X, 2.5mM de MgCl₂, 0.2 mM de cada dNTP, 20pmol de cada cebador y 2U de *Taq* - ADN

polimerasa (PROMEGA), más 3ml de ADN o muestra (~120ng para los ADN puros). Se empleó un termociclador BIORAD Gene Cycler™ programado de la siguiente manera: 1 minuto a 95°C, seguidos de 40 ciclos compuestos por 30s a 94°C, 20s a 51°C, 30s a 74°C y un paso final de extensión de 8'a 74°C.

Separación electroforética

Los productos de PCR y los ADN obtenidos en las extracciones fueron visualizados en geles de agarosa al 1% (p/v) en tampón TAE 1X (40mM Tris-acetato, 1mM EDTA pH 8 +/-0.2), teñidos con 0.3µg/ml de bromuro de etidio, corridos a 120V durante 1h hora y fotografiados bajo luz ultravioleta. Como marcador de peso molecular se empleó 100bp (Gibco BRL) (Sambrook 1989).

Análisis fisicoquímico y microbiológico de las muestras

Las muestras de pechuga de pollo y carne de res se recolectaron al azar de las neveras de almacenaje de cada dispensario, se colocaron en recipientes estériles y se llevaron en condiciones de refrigeración al laboratorio para su análisis fisicoquímico y microbiológico dentro de las 4 horas siguientes. Se sometieron las muestras crudas de pechuga de pollo y carne de res a análisis fisicoquímico para evaluar su calidad, según las técnicas recomendadas y estandarizadas por el INVIMA sobre la base de la Normas Técnicas Colombianas 3644-2 de 1998 y 1443 del 2002: determinación de pH, determinación de bases volátiles totales y determinación de gas sulfhídrico en carnes crudas de res. Para el análisis de carnes crudas de pollo se realizaron las técnicas anteriores más la determinación de formol (ICONTEC 1998; ICONTEC 1999). Para el análisis microbiológico, 25g de pechuga de pollo o de carne de res se llevaron a 225ml de caldo de preenriquecimiento para *Listeria* respectivamente (Caldo Palcam), se incubó a 37°C durante 24 horas. Posteriormente se realizó aislamiento en agar Palcam y se continuó el análisis según la técnica de Lee y MacClain ó método de la USDA-FSIS basado en la norma ISO 11290-1 (Allaert 2002).

Determinación de la especificidad y sensibilidad de la PCR

La especificidad y la sensibilidad de la técnica se demostró a través de un ensayo doble-ciego donde se contaminaron 15 tubos de caldo de cultivo Columbia con *Listeria monocytogenes*-1915, 15 tubos de caldo de cultivo Columbia con *Listeria innocua* suiza, 15 tubos de caldo de cultivo Luria-Bertani con *Escherichia coli* ATCC O127 y 15 tubos de caldo de cultivo Columbia con *Staphylococcus aureus* ATCC 29213. Se realizó el proceso de extracción de ADN cromosomal y la prueba de PCR. Los resultados obtenidos se analizaron en el programa *Epi-Info* (Programa Epi-info 6.0d) para determinar su significancia estadística (Burbano 2003).

Determinación de la reproducibilidad de la PCR

La reproducibilidad de la técnica se evaluó mediante tres repeticiones de PCR para cada una de las cepas del estudio, bajo las mismas condiciones de manipulación, instrumentos y reactivos.

Contaminación artificial de las muestras

Se homogenizaron 10g de alimento en un digestor de cuchillas con una suspensión de concentración conocida de *Listeria monocytogenes* en presencia de 50ml de agua peptonada tamponada (577ml/l de 1M Na_2HPO_4 , 423ml/l de 1M NaH_2PO_4 , 6g/l NaCl , 12g/l peptona especial, pH 7.0+/- 0.2), luego se completó a 100ml con agua peptonada tamponada y se incubaron a 37°C, durante 24h (enriquecimiento primario), pasado este tiempo 10ml del cultivo fueron empleados para reinocular 90ml de agua peptonada tamponada (fresca) e incubada nuevamente por 24h a 37°C (enriquecimiento secundario). Las muestras para PCR se tomaron a las 24 y 48h de enriquecimiento. De la misma manera, 25g de alimento se homogenizaron con la suspensión de *Listeria monocytogenes* para realizar el método tradicional o «Gold Standard».

Extracción de ADN a partir de muestras contaminadas artificialmente

Un mililitro del cultivo de 24 y 48 horas fue centrifugado por 10' a 13000 r.p.m., el medio de cultivo fue decantado y las células obtenidas se lavaron con 1ml de tampón TE 1X. Una vez homogenizada la suspensión se pasó a otro tubo evitando la toma de los sólidos no disueltos (restos de alimento). Nuevamente se centrifugó durante 10' a 6000 r.p.m. y se decantó el TE 1X. El resto del procedimiento se continuó a partir de la lisis celular según se describe en «Extracción de ADN Cromosomal».

Determinación de la sensibilidad y reproducibilidad de la técnica de PCR vs. el método «Gold Standard»

Se contaminaron 68 muestras de pechuga de pollo distribuidas en 32 muestras con 10^4 UFC/gr (16 muestras tomadas a las 24h de enriquecimiento y 16 muestras tomadas a las 48h de enriquecimiento) y 36 muestras con 10^2 UFC/gr (18 muestras tomadas a las 24h de enriquecimiento y 18 muestras tomadas a las 48h de enriquecimiento) y 76 muestras de carne de res distribuidas en 32 muestras con 10^4 UFC/gr (16 muestras tomadas a las 24h de enriquecimiento y 16 muestras tomadas a las 48h de enriquecimiento) y 36 muestras con 10^2 UFC/gr (18 muestras tomadas a las 24h de enriquecimiento y 18 muestras tomadas a las 48h de enriquecimiento). 32 muestras de pechuga de pollo y de carne de res sin contaminar se usaron como controles negativos. Se extrajo el ADN con el método de lisozima y proteinasa K tanto de las muestras contaminadas como de los controles negativos. Se realizó la PCR y el producto de PCR amplificado fue analizado por electroforesis en gel de agarosa. Paralelo al proceso de extracción de ADN y a la técnica de PCR se llevó a cabo el método tradicional (técnica de Lee y MacClain ó método de la USDA-FSIS basado en la norma ISO 11290-1) (Allaert 2002), para cada una de las muestras contaminadas y sin contaminar.

Análisis estadístico

Para calcular el número mínimo de muestras de carne de res y pechuga de pollo que se debían analizar (73), se aplicó la fórmula para la estimación de proporción de desacuerdos sin observaciones replicadas (Pérez 2001):

$$n = 4p_{Des} (1-p_{Des}) Z^2 1-a/2 / W^2p \quad (1)$$

Probabilidad de desacuerdo

$$(P_{Des}) = d/n \quad (2)$$

Donde: d es el número de desacuerdos entre los dos observadores y n es el número de sujetos evaluados por dos observadores o jueces. Dos jueces tuvieron una probabilidad de desacuerdo de aproximadamente 25% (0.25).

Como el valor de P_{Des} , denotado como p_{Des} , no fue cercano a cero y n fue razonablemente grande, para una amplitud específica Wp del intervalo de confianza de 20% (0.20), y una probabilidad de error tipo 1 de 0.05%, el tamaño de la muestra mínimo fue de 73 por tipo de carne. Los resultados obtenidos en la prueba piloto realizada en el ensayo de especificidad y sensibilidad de la técnica de PCR, se analizaron en el programa Eitable (programa Epi-Info 6.0d) para determinar su significancia estadística. Se evaluó el grado de concordancia de las mediciones, para estimar en que grado los dos sistemas de medida de una variable continua concuerdan. La estadística usada para medir la concordancia entre dos mediciones en una variable binaria fue el coeficiente Kappa (K) que se define como la concordancia más allá de la casualidad, dividida por la concordancia posible. Se tomaron como valores negativos las muestras ausentes de *Listeria monocytogenes* y como positivos las muestras con *Listeria monocytogenes*. Las categorías cualitativas otorgadas por algunos autores expertos de los Kappa, son: 0 - 0.2 = «débil»; 0.2 - 0.4 = «buena»; 0.4 - 0.6 = «moderado»; 0.6 - 0.8 = «sustancial»; 0.8 - 1 = «casi perfecta» (Sox 1987).

Los límites de detección obtenidos en los ensayos de sensibilidad del método de PCR vs. método tradicional a partir de muestras de carne cruda de res y pollo se

analizaron en el programa Eitable (Programa Epi - Info 6.0d) para determinar la significancia estadística de la proporción de detección de *Listeria monocytogenes* en cada uno de los alimentos según la técnica de PCR tras enriquecimiento de 24h y las características operativas de la prueba de PCR (Exactitud relativa o Concordancia observada, Sensibilidad, Especificidad y Valor predictivo positivo y negativo) utilizada en el experimento con respecto al «Gold Standard» por el método 2 x 2.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Las pruebas físico-químicas de las carnes crudas de res y pollo analizadas fueron normales, asegurando la calidad higiénica, por lo que pudieron utilizarse para el ensayo de contaminación artificial con *Listeria monocytogenes*. Las muestras de carne de res y de pechuga de pollo procesadas según el método tradicional para la detección de *Listeria monocytogenes* en alimentos fueron negativas.

El ADN cromosomal de las cuatro cepas empleadas en el ensayo a doble-ciego evidenciaron la alta especificidad y sensibilidad de la técnica, debido a que las cepas de ensayo de *Listeria monocytogenes* 1915, amplificaron las bandas de 938pb y 750pb - específicas para género y especie-; las de *Listeria innocua suiza*, amplificaron únicamente la banda de 938pb -producida por la hibridación de los cebadores LU1 y U1- con una secuencia específica de la región codificante del ADNr 16S del género *Listeria*, revelando la sensibilidad de la técnica para detectar los positivos reales en presencia de *Listeria monocytogenes*. Por su parte, las cepas de *Escherichia coli* ATCC O127 y *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 no amplificaron ninguna de las bandas, demostrando así la especificidad de la técnica de detectar negativos reales (Figura 1) (Scotter 2001). El ensayo piloto reveló que la técnica es altamente reproducible y estadísticamente confiable, ya que el análisis arrojó un valor para kappa de 1, valor que según algunos autores, permiten clasificarlo como «casi perfecto» en el grado de concordancia entre las variables de ensayo (Sox 1987) y otros lo clasifican como un valor kappa de concordancia total (Ortega 1995).

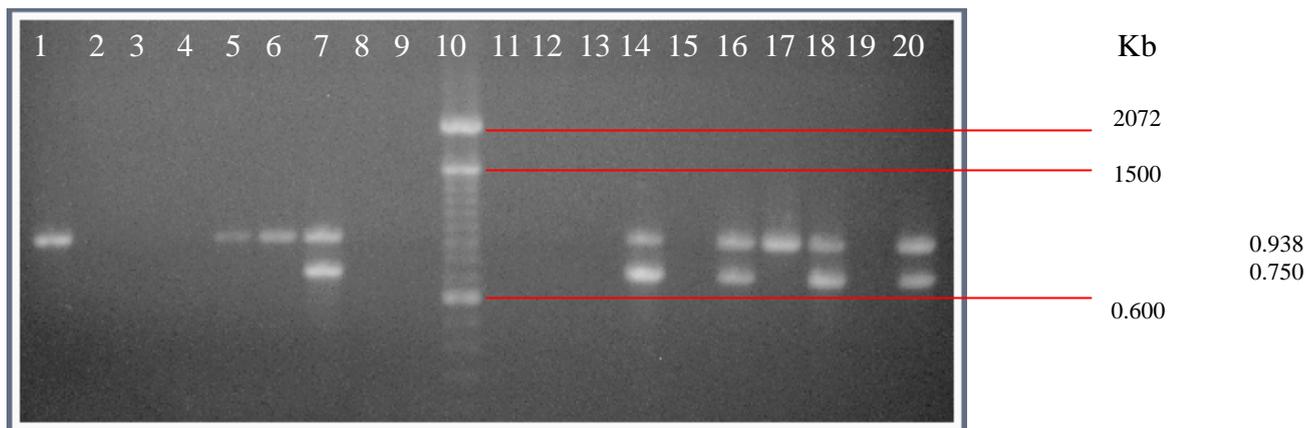


Figura 1. Electroforesis en gel de agarosa al 1% (p/v) en TAE IX. Teñido con 0.3µg/ml de bromuro de etidio. Especificidad de la Técnica de PCR. ADN de los microorganismos empleados en el estudio: Pozo 1: *Listeria innocua* suiza (L5), pozo 2: *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, pozo 3: *Escherichia coli* O127, pozo 4: *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, pozo 5: *Listeria innocua* suiza (L5), pozo 6: *Listeria innocua* suiza (L5), pozo 7: *Listeria monocytogenes* ATCC 1915 (L2), pozo 8: *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, pozo 9: *Escherichia coli* O127, pozo 10: Marcador de talla molecular 100pb (Gibco BRL), pozo 11: Blanco, pozo 12: *Escherichia coli* O127, pozo 13: *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, pozo 14: *Listeria monocytogenes* ATCC 1915 (L2), pozo 15: *Escherichia coli* O127, pozo 16: *Listeria monocytogenes* ATCC 1915 (L2), pozo 17: *Listeria innocua* suiza (L5), pozo 18: *Listeria monocytogenes* ATCC 1915 (L2), pozo 19: *Escherichia coli* O127, pozo 20: *Listeria monocytogenes* ATCC 1915 (L2).

Los cebadores LU1, U1 y LF, LR utilizados en el ensayo de PCR permitieron la detección simultánea del género *Listeria* y de la especie *monocytogenes*. Este hallazgo es importante en los casos en que la asociación de *L. monocytogenes* con otras especies de listeria y con otros géneros bacterianos puede ocurrir (Curiale 1994). Igualmente se demostró que los cebadores LU1, U1 y LF, LR, tienen una alta afinidad por la secuencia blanco correcta y son específicos y sensibles para *L. monocytogenes* (Zamora 2000).

En otros estudios se han utilizado cebadores que amplifican un único producto de alguno de los genes característicos de la especie *monocytogenes* y no descartan la reacción cruzada con otros géneros bacterianos presentes en la muestra (Dickinson 1995; Ingianni 2001; Manzano 1997; Paziak-Domanska 1999). En procariones, los genes ADN_r aparecen en copias múltiples. Puesto que el género *Listeria* posee seis copias idénticas de este gen, la sensibilidad es mayor en ensayos de PCR basados sobre esta secuencia (Sommer 2003). La amplificación del fragmento que identifica la especie *monocytogenes*, es importante para descartar reacciones cruzadas con la neumolisina de *Streptococcus pneumoniae* y estreptolisina O de *Streptococcus pyogenes*. Por otro lado, Makino *et al.* 1995; utilizaron cebadores LA1 y LB1 que amplificaban un fragmento de

626pb, que identificaba el género *Listeria* y no la especie, lo que permitía la amplificación de todos los miembros del género, excepto *Listeria seeligeri* y *Listeria grayi* (Makino 1995). Otros autores, han utilizado cebadores para identificar tanto el género *Listeria* como la especie *monocytogenes*, pero su especificidad, comparada con los que amplifican fragmentos del gen de la listeriolisina O (*hlyA*), ha sido menor (Bohnert 1992; Duffy 1999; Furrer 1991; Golsteyn. T 1991; Niederhauser 1992).

La reproducibilidad encontrada en el ensayo de doble-ciego fue de 100%, debido a que sólo las cepas de *Listeria monocytogenes* amplificaron las bandas de 938pb y 750pb; la cepa de *Listeria innocua* suiza amplificó la banda de 938pb (Figura 2). La reproducibilidad obtenida indicó que existe un 100% de probabilidad de encontrar el mismo resultado entre muestras idénticas en diferentes laboratorios, bajo condiciones de reproducibilidad estándar. Los resultados de los ensayos de reproducibilidad se obtuvieron con el mismo método de detección, sobre la misma muestra, con diferentes operarios, diferentes equipos de medida y en diferentes laboratorios.

Aunque varios métodos para extracción de ADN a partir de carne de res y pollo han sido reportados, el método de lisozima y proteinasa K usado en este estudio fue

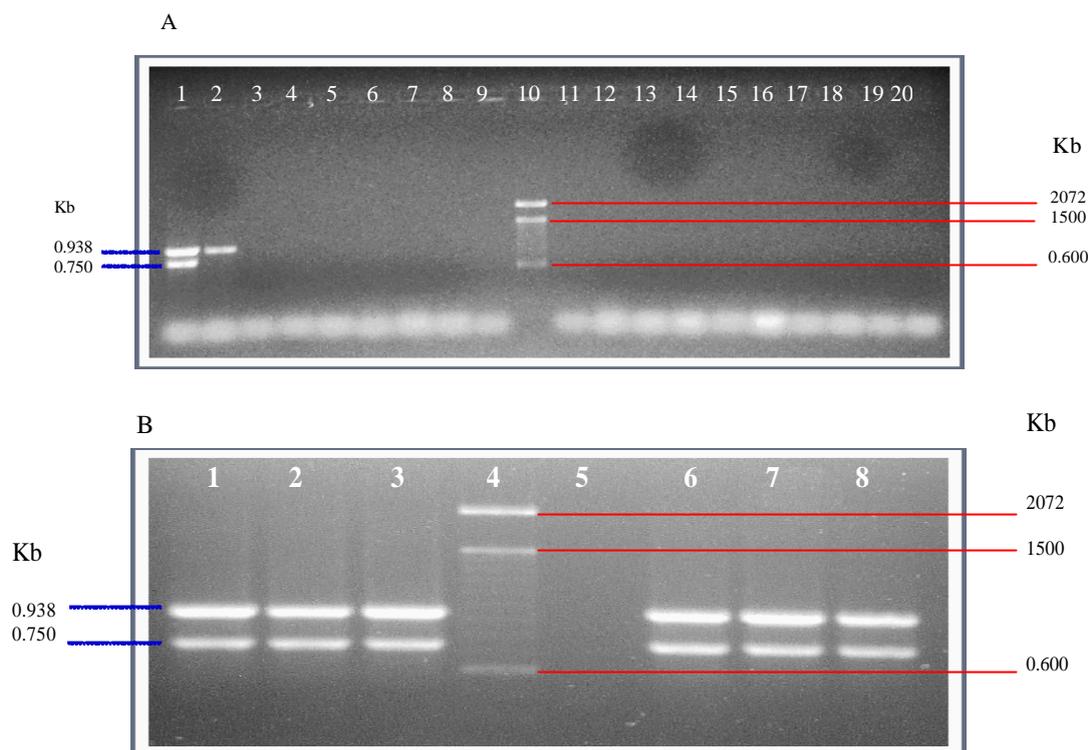


Figura 2. Electroforesis en gel de agarosa al 1% (p/v) en TAE IX. Teñido en 0.3µg/ml de bromuro de etidio. Reproducibilidad de la Técnica de PCR. ADN de los microorganismos empleados en el estudio: **A.** Pozo 1: *Listeria monocytogenes* (L1), pozo 2: *Listeria innocua* suiza (L5), pozo 3: Blanco, pozo 4: *Enterococcus faecalis* ATCC 9212, pozo 5: *Enterococcus faecalis*, pozo 6: *Staphylococcus epidermidis*, pozo 7: *Bacillus subtilis*, pozo 8: *Lactococcus lactis*, pozo 9: *Bacillus licheniformes*, pozo 10: Marcador de talla molecular 100pb (Gibco BRL), pozo 11: *Lactobacillus casei*, pozo 12: *Lactobacillus acidophilus*, pozo 13: *Clostridium perfringens*, pozo 14: *Streptococcus agalactiae*, pozo 15: *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, pozo 16: *Lactobacillus bavaricus*, pozo 17: *Proteus vulgaris*, pozo 18: *Salmonella choleraesuis*, pozo 19: *Salmonella enteritidis*, pozo 20: *Salmonella infantis*. **B.** Pozo 1: *Listeria monocytogenes* aislada de carne (L8), pozo 2: *Listeria monocytogenes* aislada de queso (L9), pozo 3: *Listeria monocytogenes* aislada de carne (L8), pozo 4: Marcador de talla molecular 100pb (Gibco BRL), pozo 5: Blanco, pozo 6: *Listeria monocytogenes* aislada de queso (L9), pozo 7: *Listeria monocytogenes* aislada de carne (L8), pozo 8: *Listeria monocytogenes* aislada de queso (L9).

más efectivo que los métodos de Ioduro de Sodio (Makino et al. 1995), de Tritón X-100 al 2% (Agersborg 1997) y el de extracción por ebullición (Kaclíková 2003) (datos no mostrados).

El tratamiento del ADN de *L. monocytogenes* a partir de carne cruda de res y pollo con lisozima y proteinasa K más extracción fenólica y precipitación con isopropanol, permitió la solubilización del ADN, mejoró la amplificación de bandas de ADN y ofreció una mayor reproducibilidad experimental, sin comprometer la sensibilidad del ensayo. En contraste a lo reportado por Rossen et al (1992) y Kaclíková et al (2003), no hubo pérdida del material purificado al realizar la extracción

fenólica del ADN y su precipitación con isopropanol, y no se comprometió la sensibilidad de la PCR por degradación del ADN o por inhibición de la PCR (Kaclíková 2003; Rossen 1992). La extracción de ADN de *L. monocytogenes* a partir de carne cruda de res y pollo con solventes orgánicos produce entre 90 y 95% de lisis celular y por ello es recomendada en técnicas que necesitan pureza y estabilidad del ADN (Miller 1999).

De las 32 muestras de carne de pollo contaminadas con 10⁴UFC de *Listeria monocytogenes*/gr (16 muestras tras enriquecimiento de 24 horas y 15 muestras tras enriquecimiento de 48 horas), todas amplificaron las bandas de 938pb y 750pb. En contraste, con las 32

muestras de carne de pollo contaminadas con 10^2 UFC de *Listeria monocytogenes*/gr (16 muestras tras enriquecimiento de 24 horas y 16 tras enriquecimiento de 48 horas), ninguna amplificó las bandas de 938pb y 750pb. Por otro lado, las 40 muestras de carne de res contaminadas con 10^4 UFC de *Listeria monocytogenes* por gramo de alimento (18 muestras tras enriquecimiento de 24 horas y 22 tras enriquecimiento de 48 horas), y las 36 muestras de carne de res contaminadas con 10^2 UFC de *Listeria monocytogenes* por gramo de alimento (18 muestras tras enriquecimiento de 24 horas y 18 tras enriquecimiento de 48 horas), amplificaron las bandas de 938pb y 750pb. La identificación de *L. monocytogenes* por el método tradicional fue positiva para las muestras contaminadas y negativa para las no contaminadas.

El análisis del límite de detección encontrado en carne de pollo por la técnica de PCR tras enriquecimiento de 24h, determinó una detección del 96%, para 10^4 UFC de *L. monocytogenes*/gr de carne de pollo ($p= 0.015$). Los datos obtenidos tras el análisis por el método 2 x 2 de la técnica de PCR vs. el método tradicional en el programa Eitable, con un intervalo de confianza de 95%, demostraron una exactitud relativa o concordancia observada de 98.43%, y unas características operativas de sensibilidad de 96.9%, especificidad de 100%, valor predictivo positivo de 100% y un valor predictivo negativo de 97%. Las muestras sin microorganismo no amplificaron, revelando la especificidad de la técnica para detectar negativos que verdaderamente son negativos (Scotter 2001). La concordancia observada o exactitud relativa obtenida para el método alternativo PCR, indicó que existe un 98.43% de concordancia entre la respuesta obtenida por el método de referencia y la respuesta obtenida por el método alternativo con muestras idénticas. El valor predictivo positivo obtenido para el método alternativo PCR, indicó que existe una confiabilidad del 100% de detectar las muestras positivas que realmente contienen el microorganismo, mientras que el valor predictivo negativo obtenido para el método alternativo PCR, indicó que existe una confiabilidad del 97% para detectar las muestras negativas que realmente no contienen el microorganismo en el análisis de muestras de carne cruda de pollo.

El análisis del límite de detección encontrado en carne de res por la técnica de PCR tras enriquecimiento de 24h, reportó una proporción de detección del 100%, para 10^2 UFC de *L. monocytogenes*/g ($p= 0.0026$). Los datos obtenidos tras el análisis por el método 2 x 2 de la técnica de PCR versus el método tradicional en el

programa Eitable, con un intervalo de confianza de 95%, demostraron una exactitud relativa o concordancia observada, y unas características operativas de sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo y valor predictivo negativo de 100%. Los resultados de sensibilidad evidenciaron similitud, debido a que sólo las muestras contaminadas con *Listeria monocytogenes* amplificaron las bandas de 938pb y 750pb. Las muestras sin el microorganismo no amplificaron, revelando la especificidad de la técnica para detectar negativos que verdaderamente son negativos y la sensibilidad de la técnica para detectar los positivos que realmente son positivos a la presencia del microorganismo (Scotter 2001). La concordancia observada o exactitud relativa obtenida para el método alternativo PCR, indicó que existe un 100% de concordancia entre la respuesta obtenida por el método de referencia y la respuesta obtenida por el método alternativo con muestras idénticas. El valor predictivo positivo obtenido para el método alternativo PCR, indicó que existe una confiabilidad del 100% para detectar las muestras positivas. Asimismo, el valor predictivo negativo obtenido para el método alternativo PCR, indicó que existe una confiabilidad del 100% de detectar las muestras negativas en muestras de carne de res cruda. Estos resultados muestran que la detección de *Listeria monocytogenes* a partir de carnes crudas de res y pollo, puede realizarse con cualquiera de los dos métodos ensayados, ya que comparten la misma especificidad. Los resultados fueron altamente reproducibles, ya que se observaron amplificadores de 938pb y 750pb, correspondientes a la identificación del género *Listeria* y la especie *monocytogenes* respectivamente, en el 96.8% de las muestras de carnes de pollo contaminadas y en el 100% de las carnes de res contaminadas; lo que significa probabilidades de 96.8% para carne de pollo y de 100% para carne de res, para encontrar el mismo resultado entre muestras idénticas analizadas en diferentes laboratorios, bajo condiciones de reproducibilidad estándar. Los resultados de los ensayos de reproducibilidad se obtuvieron con el mismo método de detección, sobre la misma muestra, con diferentes operarios, diferentes equipos de medida y en diferentes laboratorios.

En esta investigación no se ensayó la detección directa por PCR a partir de carnes crudas de res y pollo, debido a que la naturaleza sólida de las muestras hace más difícil la manipulación, generando un homogenizado viscoso con muchos restos de alimento, difíciles de retirar. Existen estudios de detección directa por PCR en su gran mayoría de muestras líquidas como la leche (Burbano 2003). Los reportes de detección directa por PCR a partir

de carnes crudas de res y pollo son escasos (Dickinson 1995; Makino 1995). Algunos autores han reportado que la detección directa de *L. monocytogenes* por PCR de alimentos como las carnes, puede ser limitada por la presencia de inhibidores de la reacción de PCR, ácidos nucleicos de otras bacterias, número bajo de carga microbiana en el alimento y/o por la naturaleza propia del alimento (Duffy 1999; Golsteyn. T 1991; Rossen 1992). El número de microorganismos de *L. monocytogenes* en muestras de alimentos es bajo ($<10^2$ UFC/gr). Sin embargo, en alimentos con un tiempo de refrigeración prolongado como las carnes crudas de res y pollo, se puede incrementar el número de células de *L. monocytogenes* a $10^6 - 10^8$ UFC/gr de alimento (Beumer 2003; Golsteyn. T 1991; Ingianni 2001).

Un período de enriquecimiento de 24 horas es importante para asegurar la identificación de bacterias viables, impedir la detección de *L. monocytogenes* no

viables y evitar resultados falsos negativos, especialmente cuando el número de bacterias contaminantes es bajo (Agersborg 1997; Beumer 2003). Adicionalmente, *L. monocytogenes* comparada con microorganismos gramnegativos, tiene una pared celular más rígida y un tiempo de generación de 1,5 días, lo que limita la recuperación de ADN genómico sin período de enriquecimiento previo, cuando el número de células de *L. monocytogenes* presentes en el alimento es bajo (Burtscher 1999; Jung 2003; Uyttendaele 1996). Según la literatura, los períodos de enriquecimiento tradicionales para la recuperación de *L. monocytogenes* a partir de carnes son al menos de 48 horas (24 horas a 30°C y 24 horas a 37°C) (Allaert 2002). En este estudio se logró la detección de 10^2 UFC de *L. monocytogenes*/g en 10g de carne de res y 10^4 UFC de *L. monocytogenes*/g en 10g de carne de pollo tras un enriquecimiento estático de 24 horas a 37°C (Figuras 3 y 4).

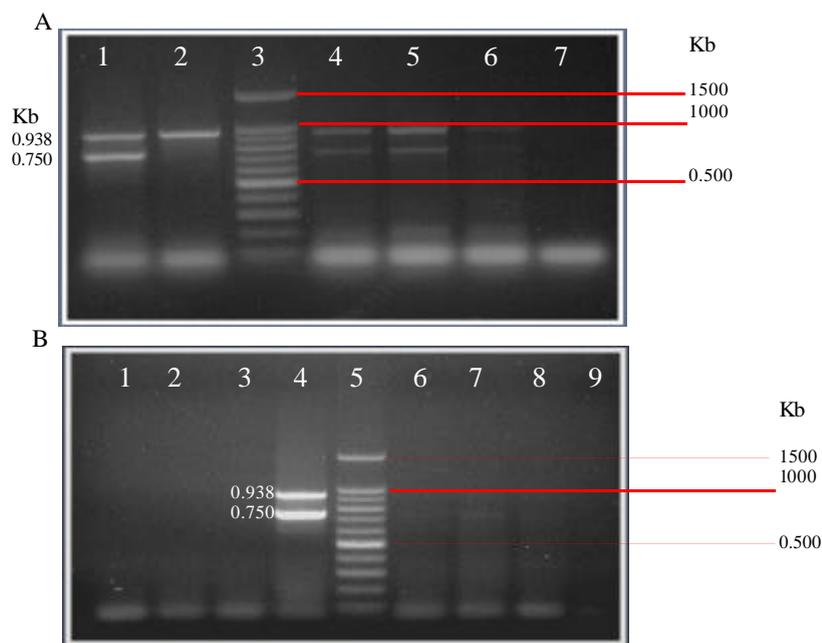


Figura 3. Electroforesis en gel de agarosa al 1% (p/v) en TAE IX. Teñido en 0.3µg/ml de bromuro de etidio. Sensibilidad de la Técnica de PCR en Carne de Pollo. **A.** Pozo 1: ADN de *Listeria monocytogenes* aislada de carne (L8), pozo 2: ADN de *Listeria innocua* suiza (L5), pozo 3: Marcador de talla molecular 100pb (Promega), pozos 4,5 y 6: muestras contaminadas con 10^4 UFC/gr de alimento, pozo 7: Blanco. **B.** Pozo 1: muestra sin contaminar, pozos 2 y 3: muestras contaminadas con 10^2 UFC/gr de alimento, 4: ADN de *Listeria monocytogenes* aislada de carne (L8), pozo 5: Marcador de talla molecular 100pb (Promega), pozos 6, 7 y 8: muestras contaminadas con 10^2 UFC/gr de alimento, pozo 9: Blanco.

Los resultados obtenidos por Manzano *et al.* en 1997, Ingianni *et al.*, en el 2001 y Kaclikova *et al.*, en el 2003 en la detección de *L. monocytogenes* en carnes por PCR directa y PCR tras enriquecimiento, confirman que bajas concentraciones de *L. monocytogenes* únicamente pueden ser detectadas usando un enriquecimiento corto

y un ensayo de PCR. Adicionalmente, el protocolo de enriquecimiento incrementa el número de *L. monocytogenes* y produce suficiente ADN para eliminar efectos inhibitorios de la PCR por componentes del alimento (Allaert 2002; Ingianni 2001; Kacliková 2003). El límite de detección encontrado para la técnica de

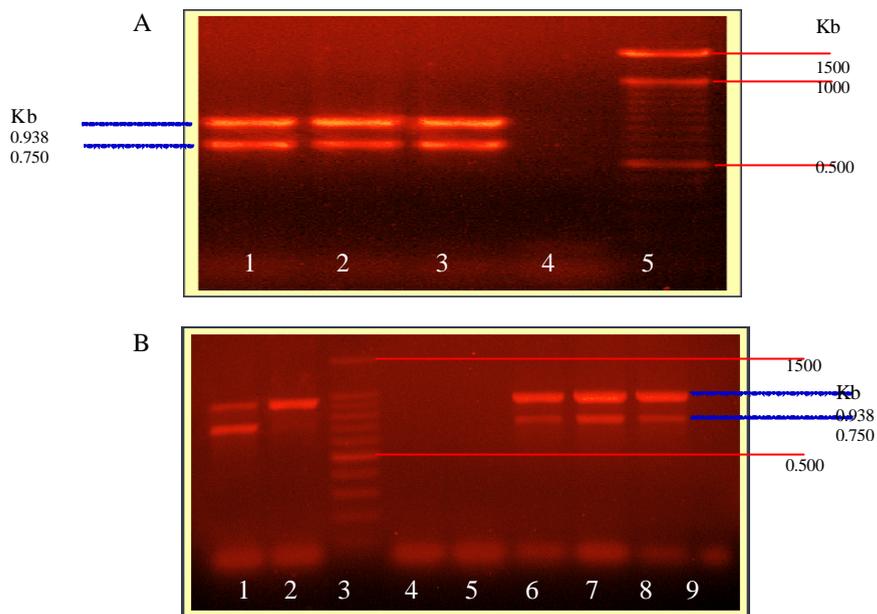


Figura 4. Electroforesis en gel de agarosa al 1% (p/v) en TAE IX. Teñido en 0.3µg/ml de bromuro de etidio. Sensibilidad de la Técnica de PCR en Carne de Res. **A.** Pozo 1: ADN de *Listeria monocytogenes* aislada de carne (L8), pozos 2 y 3: muestras contaminadas con 10⁴ UFC/gr de alimento, pozo 4: Blanco, pozo 5: Marcador de talla molecular 100pb (Promega). **B.** Pozo 1: ADN de *Listeria monocytogenes* aislada de carne (L8), pozo 2: ADN de *Listeria innocua* suiza (L5), pozo 3: Marcador de talla molecular 100pb (Promega), pozos 4 y 5: muestras sin contaminar, pozos 6, 7 y 8: muestras contaminadas con 10² UFC/gr de alimento, pozo 9: Blanco.

PCR a partir de carnes de res en este trabajo fue similar al obtenido por Ingianni et al (2001) e inferior al obtenido por Manzano et al (1997), Duffy et al (1999) y Fitter et al (1992); y en el caso de carnes de pollo el límite de detección encontrado para la técnica de PCR fue similar al obtenido por Manzano et al (1997), Duffy et al (1999) y Fitter et al (1992) y superior al obtenido por Ingianni et al (2001); autores que analizaron simultáneamente carne de res y pollo (Duffy 1999; Fitter 1992; Ingianni 2001; Manzano 1997).

El método de cultivo tradicional requiere un mínimo de 5 días para determinar si el alimento está libre de *Listeria* y de 10 días para reconocer si es *Listeria spp.* o *L. monocytogenes*. La PCR desarrollada en esta investigación, puede utilizarse como una herramienta diagnóstica para monitorear la seguridad de productos alimenticios como las carnes crudas de res y pollo en sólo 29 horas y 40 minutos, acortando con ello el diagnóstico de este microorganismo en 8 días y 21 horas; además, permite incrementar el número de muestras examinadas en la industria para optimizar el proceso de inspección y seguridad alimentaria. En esta

investigación se diseñó un ensayo de PCR, que permitió la detección e identificación simultánea del género *Listeria* y de la especie *monocytogenes*, en carnes crudas de res y pollo e incluyó un protocolo de extracción de ADN con el cual se concentró el número de bacterias en la muestra de alimento, se obtuvo mayor eficiencia en la lisis celular, se disminuyó la influencia de los inhibidores de la muestra y se logró la detección rápida del microorganismo.

La técnica de PCR para detección de *L. monocytogenes* en carnes crudas de res y pollo validada en este estudio, tuvo una sensibilidad y especificidad comparable con el método convencional, y resolvió el problema de interpretación de la bioquímica clásica. En comparación a otros métodos de PCR documentados para detección de *Listeria monocytogenes* en carnes, el método validado en este estudio no requirió de pasos de preparación de la muestra como separación inmunomagnética y captura por membrana de células de *L. monocytogenes* antes de la reacción de PCR, ni análisis de los productos de PCR que involucraran digestión con enzimas de restricción o hibridación de los productos de PCR con

sondas de ADN. La PCR desarrollada en este estudio con una sensibilidad de 96.87% y 100% para carne de pollo y res respectivamente y especificidad de 100% para ambos alimentos, permite detectar con precisión las muestras positivas que realmente están contaminadas y considerar las muestras que no están contaminadas con listeria como verdaderas negativas; descartando falsos positivos y falsos negativos que puedan darse por interferencias. Con estos resultados se demuestra que

la opción de seleccionar el método de detección de *L. monocytogenes* por PCR para carnes crudas de res y pollo es viable en Colombia, tanto por la especificidad, la sensibilidad, la confiabilidad y la rapidez de la técnica.

Agradecimientos. Este estudio fue financiado por la Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá, D.C., (proyectos No. 1053 y 1600).

BIBLIOGRAFÍA

1. Agersborg A, Dahl R, Martinez I. Sample Preparation and DNA Extraction Procedures for Polymerase Chain Reaction Identification of *Listeria monocytogenes* in Seafoods. *International Journal of Food Microbiology* 1997; 35:275 - 280.
2. Allaert C, Escolá M. Métodos de Análisis Microbiológicos de Alimentos, Díaz de Santos S.A. 2002
3. Allmann M, Hofelein C, Koppel E, Luthy J, Meyer R, Niederhauser C, Wegmuller B, Candrian U. Polymerase Chain Reaction (PCR) for Detection of Pathogenic Microorganisms in Bacteriological Monitoring of Dairy Products. *Research Microbiology* 1995; 146:85 - 97.
4. Bansal N S. Development of a Polymerase Chain Reaction Assay for the Detection of *L. monocytogenes* in Foods. *Applied Microbiology* 1996; 22:353 - 356.
5. Beumer R R, Hazeleger V C. *Listeria monocytogenes*: Diagnostic Problems. *FEMS Immunology and Medical Microbiology* 2003; 35: 191 - 197.
6. Boerlin P, Bannerman E, Bille J, Jemmi T. Typing *L. monocytogenes* Isolates from Fish Products and Human Listeriosis Cases. *Applied and Environmental Microbiology* 1997; 63(4):1338 - 1343.
7. Bohnert M, Dilasser F, Dalet C, Mengaud J, Cossart P. Use of Specific Oligonucleotides for Direct Enumeration of *Listeria monocytogenes* in Food Samples by Colony Hybridization and Rapid Detection by PCR. *Result Microbiology* 1992; 143: 271-280.
8. Burbano E, Carrascal A, Mercado M, Poutou R. Validación de PCR para *Listeria monocytogenes* en Leches. *Normas y Calidad - PUJ* 2003; (57):39 - 48.
9. Burtscher C, Fall P, Wilderer P, Wuertz S. Detection of *Salmonella spp.* and *Listeria monocytogenes* in Suspected Organic Waste by Nucleic Acid Extraction and PCR. *Applied and Environmental Microbiology* 1999; 65:2235 - 2237.
10. Curiale M, Lewus C. Detection of *Listeria monocytogenes* in Samples Containing *Listeria innocua*. *Journal of Food Protection* 1994; 57: 1048 - 1051.
11. Da Silva M C, Tibana A. *Listeria monocytogenes* em Alimentos: Seu Significado Nos Dias Atuais. *Higiene Alimentar* 1995; 9: 7-10.
12. Dickinson J, Kroll R, Grant K. The Direct Application of the Polymerase Chain Reaction to DNA Extracted From Foods. *Letters in Applied Microbiology* 1995; 20:212 - 216.
13. Duffy G, Cloak O, Sheridan J, Blair I, McDowell D. The Development of a Combined Surface Adhesion and Polymerase Chain Reaction Technique in the Rapid Detection of *Listeria monocytogenes* in Meat and Poultry. *International Journal of Food Microbiology* 1999; 49:151 - 159.
14. Farber J, Daley E. Presence and Growth of *Listeria monocytogenes* in Naturally Contaminated Meats. *International Journal of Food Microbiology* 1994; 22:33 - 42.

15. Fitter S, Heuzenroeder M, Thomas C J. A Combined PCR and Selective Enrichment Method for Rapid Detection of *Listeria monocytogenes*. Journal of Applied Bacteriology 1992; 73:53 - 59.
16. Furrer B, Candrian U, Hofelein Ch, Luthy J. Detection and Identification of *Listeria monocytogenes* in Cooked Sausage Products and in Milk by in Vitro Amplification of Haemolysin Gene Fragments. Journal of Applied Bacteriology 1991; 70:372 - 379.
17. Golsteyn T E J, King R K, Burchak J, Gannon V P J. Sensitive and Specific Detection of *Listeria monocytogenes* in Milk and Ground Beef with Polymerase Chain Reaction. Applied and Environmental Microbiology 1991; 57(9):2576-2580.
18. Goulet V, Lepoutre A, Rocourt J, Courtieu A L, Dehaumont P, Veit P. Lépidémie de Listériose en France. Bilan Final et Résultats de L'enquête Épidémiologique. Bulletin Epidémiologie Hebdomadaire 1993; 4:13 - 14.
19. Hokanson G C. A Life Cycle Approach to the Validation of Analytical Methods During Pharmaceutical Product Development, Part Y: The Initial Method Validation Process. Pharmaceutical Technology: 1994; 118 - 130.
20. ICONTEC. Industrias Alimentarias. Pollo Beneficiado. Norma Técnica Colombiana 3644-2. Bogotá, Instituto Colombiano de Normas Técnicas y Certificación: 1998; 1-78.
21. ICONTEC. Microbiología de Alimentos y Alimentos para Animales. Método Horizontal para la Detección de *Listeria monocytogenes*. Norma Técnica Colombiana 4666. Bogotá, Instituto Colombiano de Normas Técnicas y Certificación: 1999; 1-25.
22. Ingianni A, Floris M, Palomba P, Madeddu M A, Quartuccio M, Pompei R. Rapid Detection of *Listeria monocytogenes* in Foods, by a Combination of PCR and DNA Probe. Molecular and Cellular Probes 2001; 15:275 - 280.
23. Jung Y S, Frank J F, Brackett R E, Chen J. Polymerase Chain Reaction Detection of *Listeria monocytogenes* on Frankfurters Using Oligonucleotide Primers Targeting the Genes Encoding Internalin AB. Journal of Food Protection 2003; 66(2):237 - 241.
24. Kaclíková E, Pangallo D, Drahovská H, Oravcová K, Kuchta T. Detection of *Listeria monocytogenes* in Food, Equivalent to ISO 11290-1 or ISO 10560, by a Three Days Polymerase Chain Reaction Based Method. Food Control 2003; 14: 175 - 179.
25. Makino S, Okada Y, Maruyama T. A New Method for Direct Detection of *L.monocytogenes* From Food by PCR. Applied and Environmental Microbiology 1995; 61(10):3745 - 3747.
26. Manzano M, Cocolin L, Ferroni P, Cantoni C, Comi G. A Simple and Fast PCR Protocol to Detect *Listeria monocytogenes* from Meat. Journal of the Science of Food and Agriculture 1997; 74:25 - 30.
27. Miller D, Bryant J, Madsen E, Ghiorse W. Evaluation and Optimization of DNA Extraction and Purification Procedures for Soil and Sediment Samples. Applied and Environmental Microbiology 1999; 65(11):4715 - 4724.
28. Niederhauser C, Candrian U, Hofelein C, Jermini M, Buhler H P, Luthy J. Use of Polymerase Chain Reaction for Detection of *Listeria monocytogenes* in Food. Applied and Environmental Microbiology 1992; 58(5):1564 - 1568.
29. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación. Informe de la Consulta Mixta FAO/OMS de Expertos sobre la Evaluación de Riesgos Asociados a los Peligros Microbiológicos en los Alimentos. Roma, Consulta de Expertos AD HOC sobre la Evaluación de Riesgos Asociados a los Peligros Microbiológicos en los Alimentos: 2000; 27-30.
30. Ortega C, Noordhuizen J P T M, Starks M, Thrusfield M. Manual Interactivo de Epidemiología, Red Europea de Epidemiología Veterinaria y Economía; 1995.
31. Paziak-Domanska B, Boguslawska E, Wieckowska-Szakiel M, Kotlowski R, Rózalska B, Chmiela M, Kur J, Dabrowski W, Rudnicka W. Evaluation of the API Test, Phosphatidylinositol-specific Phospholipase C activity and PCR Method in Identification of *Listeria monocytogenes* in Meat Foods. FEMS Microbiology Letter 1999; 171:209 - 214.
32. Pérez A, Rodríguez N, Gil J F, Ramírez G A. Tamaño de la Muestra. Versión 1.1. Programa Sistematizado para el Cálculo del Tamaño de la Muestra y el Poder

- en Diseños de Investigación, Facultad de Medicina. Unidad de Epidemiología Clínica y Bioestadística. Pontificia Universidad Javeriana; 2001.
33. Poutou R, Máttar S. Amplificación al Azar del Polimorfismo del ADN (RAPD) de Cepas de E.coli O157:H7 Aisladas de Pacientes Pediátricos. *Pediatría* 2000; 35(3):259 - 263.
 34. Poutou R, Máttar S, Del Portillo P, Visbal J, Bermúdez A. RAPD Fingerprinting of Enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 Isolates in Santafé de Bogotá, DC, Colombia. *Medical Science Research* 2000; 28:29 - 32.
 35. Qvist S, Sehested K, Zeuthen P (1994). Growth Suppression of *Listeria monocytogenes* in a Meat Product. *International Journal of Food Microbiology* 24: 283-293.
 36. Ramírez L J, Urquijo G A. Inspección, Vigilancia y Control de las Carnes de Bovinos y Porcinos en Bogotá, D.C. *Boletín Epidemiológico Distrital* 2002; 7(5): 2-11.
 37. Rossen L, Norskov P, Holmstrom K, Rasmussen O F. Inhibition of PCR by Components of Food Samples, Microbial Diagnostic Assays and DNA-extraction Solutions. *International Journal of Food Microbiology* 1992; 17:37 - 45.
 38. Salvat G, Toquin M T, Michel Y, Colin P. Control of *Listeria monocytogenes* in the Delicatessen Industries: The Lessons of a Listeriosis Outbreak in France. *International Journal of Food Microbiology* 1995; 25:75 - 81.
 39. Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. Gel Electrophoresis of DNA. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. New York, Cold Spring Harbor Laboratory Press.1989; 1: 1-62.
 40. Sambrook J, Maniatis T, Fritsch E F. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. New York, Cold Spring Harbor Laboratory Press 1983.
 41. Scotter S L, Langton S, Lombard B, Schulten S, Nagelkerke N, In't Veld P H, Rollier P, Lahellec C. Validation of ISO Method 11290 Part 1. Detection of *Listeria monocytogenes* in Foods. *International Journal of Food Microbiology* 2001; 64:295 - 306.
 42. Simon M, Gray D, Cook N. DNA Extraction and PCR Methods for the Detection of *L.monocytogenes* in Cold - Smoked Salmon. *Applied and Environmental Microbiology* 1996; 62(3):822 - 824.
 43. Somer L, Kashi Y. A PCR Method Based on 16S rRNA Sequence for Simultaneous Detection of the Genus *Listeria* and the Species *Listeria monocytogenes* in Food Products. *Journal of Food Protection* 2003; 66(9):1658 - 1665.
 44. Sox H C. *Common Diagnostic Tests Use and Interpretation*. Philadelphia, American College of Physicians 1987.
 45. Torres K J, Sierra S C, Poutou R A, Vera H, Carrascal A K, Mercado M. Incidencia Y Diagnóstico De *Listeria Monocytogenes*; Microorganismo Zoonótico Emergente En La Industria De Alimentos. *UDCA Actualidad & Divulgación Científica* 2004; 7(1):25 - 57.
 46. Uyttendaele M, Schukkink B, Gemen B, Debevere J. Influence of Bacterial Age and pH of Lysis Buffer on Type of Nucleic Acid Isolated. *Journal of Microbiological Methods* 1996; 26: 133 - 138.
 47. Vera H. Comunicación Personal. Referente de Ambiente, Secretaría Distrital de Salud, Bogotá, Colombia. Santa Fé de Bogotá 2003.
 48. Vorster S M, Greebe R P, Nortjé G L. The Incidence of *Listeria* in Processed Meats in South Africa. *Journal of Food Protection* 1993; 58: 169 - 175.
 49. Wan J, King K, Forsyth S, Coventry M J. Detection of *Listeria monocytogenes* in Salmon Using the Probelia Polymerase Chain Reaction System. *Journal of Food Protection* 2003; 66(3): 436 - 440.
 50. Weon S C, Chong-Hae H. Rapid Enumeration of *Listeria monocytogenes* in Milk Using Competitive PCR. *International Journal of Food Microbiology* 2003 In press.
 51. Zamora A, Ossa H, Carrascal A, Poutou R, Jimenez D. Identificación Preliminar de *L. monocytogenes* por PCR. *Laboratorio Actual* 2000; 17(33):38 - 41.

Recibido: Julio 5 de 2004; Aceptado: Noviembre 20 de 2004