



ESTANDARIZACIÓN DE LA EXTRACCIÓN DE ADN Y VALIDACIÓN DE LA PCR MÚLTIPLE PARA DETECTAR *Listeria monocytogenes* EN QUESO, LECHE, CARNE DE RES Y POLLO

R. Poutou¹, M. Burbano², S. Sierra^{1,2}, K. Torres^{1,2}, A. K. Carrascal², M. Mercado^{2,3}

¹Laboratorio de Biotecnología Aplicada; ²Laboratorio de Microbiología de Alimentos. Grupo de Biotecnología Ambiental e Industrial; ³Grupo de Enfermedades Infecciosas
Departamento de Microbiología, Facultad de Ciencias, Pontificia Universidad Javeriana, Cra. 7ª No.
40-62 Bogotá, Colombia
rp000274@javeriana.edu.co

RESUMEN

Este trabajo validó la técnica de PCR para la detección de *L. monocytogenes* a partir de ADN de cultivos puros y en muestras de leches crudas, quesos frescos, carne de res y carne de pollo. En DNA de cultivos puros la sensibilidad, la especificidad y la reproducibilidad encontrada fue de 100%, 10¹UFC/ml y K=1, respectivamente. Para la extracción del ADN de los alimentos se emplearon dos métodos, el primero, basado en la precipitación alcohólica en presencia de NaI, lo que redujo en gran medida las grasas; permitiendo la detección directa de 10¹ UFC/ml en leche cruda y 10⁵ UFC/g en queso fresco. El segundo método, basado en la extracción con lisozima, proteinasa K y fenol-cloroformo, permitió establecer límites de detección de 10² y 10⁴ UFC/g para las carnes de res y pollo respectivamente. La PCR se basó en la especificidad de los iniciadores LI1/U1 que amplificaron una banda de 938 pb (identificación de género) característica del rDNA 16S y los iniciadores LF/LR que amplificaron una banda de 750 pb característica del gen *hlyA* (identificación de especie). Los resultados de la validación reportaron con relación al método "Gold Standard" una reproducibilidad, sensibilidad y especificidad del 100% en leches crudas. Para las muestras de queso frescos se reportó una reproducibilidad de 97%, sensibilidad 96.3% y especificidad del 100%, para la carne de pollo la reproducibilidad fue 98.43%, sensibilidad 96.9%, especificidad 100%, valor predictivo positivo 100% y valor predictivo negativo 100%, para la carne de res todos los parámetros fueron 100%. El método "Gold Standard" reportó 100% para todos los parámetros. El trabajo muestra que ambas técnicas pueden ser utilizadas para detectar *L. monocytogenes* en este tipo de alimentos y que la PCR reduce el tiempo de ensayo considerablemente.

Palabras clave: validación, PCR múltiple, *Listeria monocytogenes*, leches crudas, quesos frescos, carnes crudas de res y pollo

ABSTRACT

The object of this project was to validate the PCR technique for the detection of *Listeria monocytogenes* using DNA purified from pure cultures, samples of raw milk, fresh cheese, raw beef and chicken. In DNA from pure cultures the sensitivity, specificity and reproducibility were 100%, 10¹CFU/ml and K=1, respectively. Two DNA extraction procedures were used. The first was based on alcohol precipitation in the presence of NaI, which reduced the fat content considerably; allowing the direct detection of 10¹ CFU/ml in raw milk and 10⁵ CFU/g in fresh cheese. The second method was based on DNA extraction with lysozyme, proteinase K and phenol-chloroform. This method allowed the establishment of the detection limits at 10² and 10⁴ CFU/g for raw beef and chicken, respectively. The PCR was based on the specificity of primers LI1/U1 that amplified a 938bp band (genus identification) characteristic of 16S rDNA, and the primers LF/LR that amplified a 750 bp band characteristic of the *hlyA* gene (species identification). Validation results gave a reproducibility, sensitivity and specificity of 100% in relation to the Gold Standard method for raw milk. In fresh cheese there was a reproducibility of 97%, a sensitivity of 96.3% and a specificity of 100%. Raw beef tests gave a reproducibility of 98.43%, a sensitivity of 96.9%, a

specificity of 100%, a positive predictive value of 100% and a negative predictive value of 100%. Finally, for raw chicken all the aforementioned parameters were 100%. The Gold Standard method yielded 100% for all the parameters. This work shows that both techniques could be used to detect *L. monocytogenes* in these types of food and that PCR considerably reduced the assay time.

Key words: validation, PCR multiplex, *Listeria monocytogenes*, raw milk, fresh cheeses, beef, poultry

INTRODUCCIÓN

La listeriosis humana forma parte del grupo de enfermedades transmitidas por alimentos (ETA), esta enfermedad es esporádica y la ocasiona *Listeria monocytogenes*. Este microorganismo se ha convertido en un problema de salud pública, y aunque la incidencia está entre 4 y 8 casos por cada 1.000.000 personas, la tasa de mortalidad es alta en comparación con otras ETAs (20 - 30%), (ONU 2000; Torres *et al.*, 2004b). Entre las manifestaciones clínicas asociadas a listeriosis se encuentran: meningitis, encefalitis, septicemias y aborto entre otras (Torres *et al.*, 2004b). Los grupos poblacionales más susceptibles a la enfermedad son aquellos que tienen disminuida la inmunidad celular como los recién nacidos, las mujeres embarazadas, los ancianos, los enfermos de cáncer o SIDA y personas alcohólicas.

Los alimentos tales como carne cruda y curada, leche cruda y pasteurizada, queso y vegetales (Pinner *et al.*, 1992; Goulet, 1993; Qvist, 1994; Salvat, 1995; Ryser *et al.*, 1996; Ryser, 1999) han sido el vehículo principal de entrada de *L. monocytogenes* al organismo humano (Da Silva, 1995; Boerlin *et al.*, 1997). Los alimentos asociados con mayor frecuencia con la listeriosis humana son los productos listos para consumir, por ser productos con un tiempo de conservación prolongado a temperatura de refrigeración y que se consumen sin tratamiento listericida previo (Farber y Peterkin,

1992; Farber y Harwig, 1996; Farber, 2000).

Colombia no está ajena al panorama mundial, donde la infección por *L. monocytogenes* adquiere dimensiones importantes a causa de los brotes entéricos como consecuencia del consumo de alimentos contaminados (Vorster *et al.*, 1993; Hokanson, 1994; Torres *et al.*, 2004b). Durante 1996 en Colombia se estudió la incidencia de *L. monocytogenes*; los resultados indicaron para leches crudas 34% y 2% para leches pasteurizadas; resultados superiores en comparación con estudios realizados en países industrializados como Holanda con 4.4%, Francia 4.6% y Estados Unidos con 12% (Torres *et al.*, 2004b). De otro lado un estudio realizado en Antioquia, demostró una prevalencia en quesos blandos del 33.1% (Mosos *et al.*, 1997; Torres *et al.*, 2004b). Recientemente, un estudio realizado por el Laboratorio de Salud Pública del Distrito Capital, Bogotá, D.C., en muestras de derivados cárnicos de diferentes hospitales entre el año 2001 y el 2002, mostró una prevalencia del 14 y 5.08% para cada año respectivamente, y una prevalencia de 2.5% en carnes de res y de cerdo (Ramírez y Urquijo, 2002; Torres *et al.*, 2004b).

Actualmente, la identificación de *L. monocytogenes* se realiza por métodos convencionales, que requieren mínimo de 5 días para declarar si un alimento está libre de *Listeria* y 10 días adicionales para reconocer la especie *monocytogenes* (Allaert

y Escolá, 2002); sin embargo, en la industria de alimentos estos métodos no permiten la toma de decisiones rápidas, causando incrementos en el costo del producto final por concepto de cuarentena antes de su liberación. Por este motivo, se buscan técnicas rápidas y sensibles como la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) (Wan, 2003), que permitan detectar el patógeno en alimentos crudos o procesados. Estas técnicas permitirían 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 la técnica de PCR para la detección de *L. monocytogenes* en muestras de leches crudas, quesos frescos y carnes crudas de res y pollo. La técnica de PCR estuvo basada en la especificidad de los iniciadores LI1/U1 que amplificaron una banda de 938 pb (identificación de género) característica del rDNA 16S y los iniciadores LF/LR que amplificaron una banda de 750 pb característica del gen *hlyA* (identificación de especie) (Bansal, 1996).

MATERIALES Y MÉTODOS

Tipo y lugar de estudio

Este estudio estadístico fue desarrollado en los laboratorios de Biotecnología Aplicada y Microbiología de alimentos del Grupo de Biotecnología Ambiental e industrial (GBAI) (Colciencias COL0001146) y Grupo de Enfermedades Infecciosas (Colciencias COL0004317), Departamento de Microbiología, Facultad de Ciencias, Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá, D.C., Colombia, y está enmarcado dentro de la línea de investigación "Microorganismos Emergentes en la Industria de Alimentos".

Microorganismos empleados en el estudio

Se utilizaron 21 géneros bacterianos distribuidos de la siguiente manera: *Listeria*: 9 cepas (17.65%), *Salmonella*: 8 cepas (15.69%), *Escherichia*: 6 cepas (11.77%), *Lactobacillus*: 4 cepas (7.84%), *Bacillus*: 3 cepas (5.89%), *Shigella*: 3 cepas (5.89%), *Enterococcus*: 2 cepas (3.92%), *Pseudomonas*: 2 cepas (3.92%), *Staphylococcus*: 2 cepas (3.92%), *Acinetobacter*: 1 cepa (1.96%), *Citrobacter*: 1 cepa (1.96%), *Clostridium*: 1 cepa (1.96%), *Enterobacter*: 1 cepa (1.96%), *Klebsiella*: 1 cepa (1.96%), *Lactococcus*: 1 cepa (1.96%), *Micrococcus*: 1 cepa (1.96%), *Moraxella*: 1 cepa (1.96%), *Oenococcus*: 1 cepa (1.96%), *Proteus*: 1 cepa (1.96%), *Streptococcus*: 1 cepa (1.96%) y *Vibrio*: 1 cepa (1.96%) para un total de 51 microorganismos entre contaminantes y/o biota normal de los alimentos ensayados (leches crudas, quesos frescos y carnes crudas de res y pollo) (tabla 1). Todas las cepas se encontraban previamente conservadas en el caldo de cultivo apropiado, suplementado con glicerol a diferentes concentraciones 10, 20 ó 30% (v/v) y almacenadas a -70°C (Amador *et al.*, 1994; Poutou *et al.*, 1994; Burbano, 2002; Meza *et al.*, 2004; Sierra, 2004; Torres, 2004).

Extracción de ADN cromosomal a partir de cultivos puros

Para la extracción de ADN, las cepas Gram negativas fueron cultivadas en caldo LB (triptona 10 g/l, extracto de levadura 5 g/l, NaCl 0.5 g/l) y las cepas Gram positivas en caldo BHI durante 12 horas a 37°C y 250 rpm. Un mililitro de cultivo fue centrifugado por 10 minutos a 6.000 rpm, para las cepas Gram positivas y las Gram negativas a 3.000 rpm, una vez obtenidas las células, se lavaron con tampón TE 1X (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8.0 ± 0.2). Para la lisis celular, el "pellet" resultante fue resuspendido

Tabla 1
Microorganismos utilizados en el estudio

No. Consecutivo	Código Interno	Cepas	Procedencia
1	L1	<i>Listeria monocytogenes</i> (Aislada de leche)	Lab. de Microbiología de Alimentos PUJ
2	L2	<i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 1915	
3	L3	<i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 4334	
4	L4	<i>Listeria monocytogenes</i> (Aislada de leche)	
5	L5	<i>Listeria innocua</i> suiza	
6	L6	<i>Listeria monocytogenes</i> (Suiza) ATCC 4640	
7	L7	<i>Listeria monocytogenes</i>	Lab. de Microbiología. Secretaría Distrital de Salud
8	L8	<i>Listeria monocytogenes</i> (Aislada de carne)	
9	L9	<i>Listeria monocytogenes</i> (Aislada de queso)	
10	1	<i>Proteus vulgaris</i>	Lab. de Microbiología Especializada PUJ
11	2	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Lab. de Microbiología. Secretaria Distrital de Salud
12	3	<i>Salmonella choleraesuis</i>	CDC ATLANTA
13	4	<i>Salmonella enteritidis</i>	Lab. de Microbiología Especializada PUJ
14	5	<i>Salmonella infantis</i>	CDC ATLANTA
15	6	<i>Shigella</i> spp. B4e	Lab. de Microbiología de Alimentos PUJ
16	7	<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 9212	Lab. de Microbiología. Secretaria Distrital de Salud.
17	8	<i>Shigella</i> spp.	Lab. de Microbiología de Alimentos PUJ
18	9	<i>E.coli</i> O126 B36	CDC ATLANTA
19	10	<i>Salmonella bredeney monophila</i>	Lab. de Microbiología de Alimentos PUJ
20	11	<i>Shigella</i> spp. B2b	
21	11E	<i>Enterobacter agglomerans</i>	Lab. de Microbiología Especializada PUJ
22	12	<i>E.coli</i> O127	CDC ATLANTA
23	13	<i>Salmonella paratyphi A</i>	
24	14	<i>Salmonella typhi</i>	Lab. de Microbiología de Alimentos PUJ
25	15	<i>Salmonella paratyphi B</i>	CDC ATLANTA
26	16	<i>E.coli</i> ATCC 8739	Lab. de Microbiología de Alimentos PUJ
27	17	<i>E.coli</i> de Leche	
28	18	<i>E.coli</i> O126 B16	CDC ATLANTA
29	19	<i>Salmonella tiphymurium</i>	Lab. de Microbiología de Alimentos PUJ
30	20	<i>Enterococcus faecalis</i>	Lab. de Microbiología Especializada PUJ
31	21	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	
32	22	<i>Bacillus subtilis</i>	Lab. de Microbiología de Alimentos PUJ
33	23	<i>Lactococcus lactis</i>	
34	24	<i>Bacillus licheniformes</i>	Lab. de Microbiología Especializada PUJ
35	25	<i>Lactobacillus casei</i>	Lab. de Microbiología de Alimentos PUJ
36	26	<i>Lactobacillus acidophilus</i>	
37	27	<i>Clostridium perfringens</i>	Lab. de Microbiología. Secretaria Distrital de Salud.
38	28	<i>Streptococcus agalactiae</i>	
39	29	<i>Citrobacter freundii</i>	Lab. de Microbiología Especializada PUJ
40	30	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27813	Lab. de Microbiología. Secretaria Distrital de Salud.
41	31	<i>E.coli</i> ATCC 25912	
42	32	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 29213	
43	33	<i>Acinetobacter baumannii</i>	
44	34	<i>Lactobacillus bavaricus</i>	Lab. de Microbiología de Alimentos PUJ
45	35	<i>Moraxella catharralis</i> ATCC 8176	Lab. de Microbiología Especializada PUJ
46	36	<i>Oenococcus oeni</i>	Lab. de Microbiología de Alimentos PUJ
47	37	<i>Bacillus cereus</i> ATCC 10876	
48	38	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027	Lab. de Microbiología. Secretaria Distrital de Salud.
49	39	<i>Vibrio cholerae</i> 1518-65	CDC ATLANTA
50	40	<i>Micrococcus luteus</i>	Lab. de Microbiología de Alimentos PUJ
51	41	<i>Lactobacillus plantarum</i>	Lab. de Microbiología UNIVALLE

en 200 µl de tampón TE 1X más 2 mg/ml de lisozima y se incubó durante 30' a 37°C. Posteriormente para lograr la degradación de las proteínas se añadieron 300 µl de tampón TE1X más 1% (p/v) de SDS y proteinasa K a una concentración final de 100 µg/ml, la mezcla se incubó a 65°C por 1 hora. Para eliminar los péptidos y lípidos residuales se adicionaron 84 µl de una solución 5 M de NaCl más 60 µl de CTAB (10% (p/v) disuelto en 0.7 M de NaCl) y se incubó nuevamente durante 20 minutos 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 isopropanol (2-propanol) para lograr la precipitación del ADN. El ADN precipitado se lavó con etanol al 70% (v/v), 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. Las mediciones se realizaron a 260 y 280nm con corrección de fondo "Background" a λ de 320 nm, según Sambroock (Sambrook *et al.*, 1989b; Simon, 1996; Poutou, 2000b; Poutou, 2000a).

Condiciones para la reacción de PCR

Para la reacción de PCR se emplearon los iniciadores L1 (CTCCATAAAGGTG AC CCT), U1 (CAGCMGCCGCGTAATWC), LF (CAACGTTAACAACGCAGTA) y LR (TCCAGAGTGATCGATGTTAA) (Bansal 1996; Zamora *et al.*, 2000). El volumen final de la reacción fue 30 µl, conteniendo tampón de PCR 1X, 2.5 mM de MgCl₂, 0.2 mM de cada dNTP, 20 pmol de cada iniciador y 2 U de TaqADNpol (PROMEGA), más 3 µ de ADN o muestra (~120 ng 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 min. a 74°C. Como

controles en todas las PCR se empleó el DNA purificado de las cepas L1, L8, L9 y L5.

Electroforesis de ADN

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

Estudio de la especificidad y sensibilidad de la PCR a partir de cultivos puros de los microorganismos

La especificidad de la técnica se demostró a través de un ensayo a doble ciego donde se inocularon 15 tubos de caldo Columbia con 10⁸ UFC/ml de *L. monocytogenes* ATCC 1915, 15 tubos de caldo Columbia con 10⁸ UFC/ml de *L. innocua* (suiza), 15 tubos de caldo Luria Bertani (LB) con 10⁸ UFC/ml de *E. coli* O127 y 15 tubos de caldo Columbia con 10⁸ UFC/ml de *S. aureus* ATCC 29213. Se dejaron crecer a 37°C toda la noche y posteriormente se realizó el proceso de extracción de ADN cromosomal y la PCR (Burbano, 2002; Sierra, 2004; Torres, 2004). De otro lado para el estudio de la sensibilidad se ensayaron diluciones seriadas de *L. monocytogenes* desde 10¹ hasta 10⁸ UFC/ml. Cada dilución fue utilizada para extracción de ADN y PCR, según se definió con anterioridad.

Estudio de la reproducibilidad de la PCR

La reproducibilidad de la técnica se evaluó mediante un ensayo piloto de 13 repeticiones de PCR para cada una de las cepas del estudio (51), bajo las mismas condiciones de manipulación, instrumentos y

reactivos, pero con 4 operarios diferentes (Burbano, 2002; Sierra, 2004; Torres, 2004).

Validación del PCR

Muestras de alimentos

Las muestras utilizadas en la validación fueron adquiridas en varios supermercados y expendios de alimentos de la ciudad de Bogotá. En el momento de la compra las muestras se encontraban a temperatura de refrigeración y debidamente empacadas y se transportaron a 4°C hasta el laboratorio. Los análisis fisicoquímicos y microbiológicos se realizaron dentro de las 4 horas siguientes.

Contaminación artificial de las muestras empleadas en el estudio

La metodología de contaminación artificial fue la siguiente: 12.5 ml de leche cruda se mezclaron con 12.5 ml de la suspensión adecuada de *L. monocytogenes* (L4) en agua peptonada tamponada (10 g/l peptona, 5 g/l NaCl y 423 ml/l NaH_2PO_4 1 M, 577 ml/l Na_2HPO_4 1 M para pH 7.0 ± 0.2). La mezcla fue homogeneizada en un digestor de cuchilla y se tomaron 200 µl para la extracción de ADN, el resto del homogeneizado fue utilizado para realizar el método tradicional o “Gold Standard” (Archer, 1988; Makino *et al.*, 1995; Burbano, 2002; FDA 2003; Rados, 2004). 25 g de queso fresco fueron mezclados con 25 ml de la suspensión adecuada de *L. monocytogenes* (L9) en agua peptonada tamponada. La mezcla fue homogeneizada en un digestor de cuchilla y a partir de ésta, se tomaron 200 µl para la extracción de ADN, el resto del homogeneizado fue utilizado para realizar el método tradicional o “Gold Standard” (Archer, 1988; Makino *et al.*, 1995; FDA, 2003; Rados, 2004; Sierra, 2004). 10 g de carne cruda de res o pollo fueron homogeneizados en un digestor de

cuchillas con la suspensión adecuada de *L. monocytogenes* (L8) en 50 ml de agua peptonada tamponada, luego se completó a 100 ml con agua peptonada tamponada y se incubaron a 37°C, durante 24h (enriquecimiento primario), pasado este tiempo 10 ml del cultivo fueron empleados para reinocular 90 ml de agua peptonada tamponada (fresca) e incubadas nuevamente por 24 h a 37°C (enriquecimiento secundario). Las muestras para extracción de ADN se tomaron a las 24 y 48 h de enriquecimiento (1 ml), el resto del cultivo fue analizado por el método tradicional o “Gold Standard” (Archer, 1988; FDA, 2003; Rados, 2004; Torres, 2004).

Extracción de ADN a partir de muestras contaminadas artificialmente

Muestras de leches crudas y quesos frescos. A los 200 µl de muestra se le adicionaron 400 µl de tampón de lisis (0.5% (p/v) N-laurylsacorsina, 50 mM Tris-HCl, 25 mM EDTA, pH, 8.0 ± 0.2), después se aplicó vortex por un minuto. La mezcla fue centrifugada a 15.000 rpm por 5 minutos. El “pellet” fue resuspendido en 200 µl de tampón de lisis conteniendo 0.03 mg/µl de glucógeno y 4 ml de proteinasa K (2 mg/µl). Se incubó la suspensión durante una hora a 37°C, se adicionaron 300 µl de NaI (6M NaI en 50 mM Tris-HCl, 25 mM EDTA, pH 8.0 ± 0.2) y 500 µl de isopropanol, se centrifugó a 15.000 rpm por 5 minutos. El “pellet” fue lavado con 200 µl de isopropanol al 35% (v/v), secado a 37°C por 5 minutos y suspendido en 20 µl de agua estéril para PCR (Makino *et al.*, 1995; Burbano, 2002; Sierra, 2004).

Muestras de carnes crudas de res y pollo.

Un mililitro del cultivo de las 24 y 48 h fue centrifugado por 10 minutos a 13.000 rpm, el medio de cultivo fue descartado y las células obtenidas se lavaron con 1 ml de tampón TE 1X. Una vez homogeneizada la

suspensión se pasó a otro tubo evitando la toma de los sólidos no disueltos (restos de alimento). Nuevamente se centrifugó durante 10 minutos a 6.000 rpm y se descartó el TE 1X. El resto del procedimiento se continuó a partir de la lisis celular según se describe en la sección “Extracción de ADN cromosomal a partir de cultivos puros” (Torres, 2004).

Determinación de la sensibilidad y la reproducibilidad (PCR vs. “Gold Standard”)

Se ensayaron un total de 472 muestras distribuidas de la siguiente manera: 124 de leches crudas (26.27%), de las cuales 62 fueron contaminadas con 10^1 UFC/g (50%), 17 con 10^2 UFC/g (13.71%) y 45 sin contaminar (36.29%); 140 de quesos frescos (29.66%), de las cuales 36 fueron contaminadas con 10^3 UFC/g (25.71%), 80 con 10^5 UFC/g (57.14%) y 24 sin contaminar (17.14%); 100 de carne cruda de pollo (pechuga) (21.19%), de las cuales 36 fueron contaminadas con 10^2 UFC/g (36%), 32 con 10^4 UFC/g (32%) y 32 sin contaminar (32%); 108 de carne cruda de res (22.88%), de las cuales 36 fueron contaminadas con 10^2 UFC/g (33.33%), 40 con 10^4 UFC/g (37.04%) y 32 sin contaminar (29.63%). Las muestras fueron extraídas utilizando los métodos descritos con anterioridad. El producto amplificado en la PCR fue analizado por electroforesis en gel de agarosa al 1% (p/v). En paralelo a las detecciones por PCR se utilizó el método “Gold Standard” (Archer, 1988; ICMSF, 1994; Lachica, 1996; Allaert y Escolá, 2002; FDA, 2003; Rados, 2004).

Análisis estadístico

Para calcular el número mínimo de muestras a analizar (n), se aplicó la fórmula para la estimación de proporción de desacuerdos sin observaciones replicadas (Pérez, 2001):

$$n = 4\pi_{Des}(1-\pi_{Des})Z^2 1-\alpha/2 / W^2\pi \quad (1)$$

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 π_{Des} , no fue cercano a cero y n fue razonablemente grande, para una amplitud específica $W\pi$ 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 alimento. Los límites de detección obtenidos en los ensayos de sensibilidad del método de PCR vs. “Gold Standard”, se analizaron en el programa Epi –info 6.0d) para determinar la significancia estadística en la proporción de detección de *L. monocytogenes*. La exactitud relativa o concordancia observada y las características operativas de la prueba de PCR (sensibilidad, especificidad y valores predictivos positivo y negativo) fueron evaluados por el método 2×2 . La estadística usada para medir la concordancia entre dos mediciones en la variable binaria fue el coeficiente Kappa (K) que se define como la concordancia más allá de la casualidad, dividida por la concordancia posible. Como valores negativos se tomaron las muestras ausentes del analito y como positivos las muestras con el analito, teniendo en cuenta que las categorías cualitativas otorgadas por algunos autores para el coeficiente K 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).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El ensayo a doble ciego evidenció la alta especificidad de la técnica (100%), debido a que *L. monocytogenes* ATCC 1915, amplificó las bandas de 938 pb y 750 pb, específicas para género y especie; *L. innocua* (Suiza), amplificó únicamente la banda de 938 pb, producida por la hibridación de los iniciadores LU1/U1 con una secuencia específica de la región codificante del rDNA 16S del género *Listeria*, revelando la sensibilidad de la técnica para detectar los positivos reales. *E. coli* O127 y *S. aureus* ATCC 29213 no amplificaron ninguna de las bandas, demostrando así la especificidad de la técnica de detectar negativos reales (Scotter, 2001) (figura 1). La alta sensibilidad de la PCR a partir de ADN puro fue demostrada con la amplificación de todas las diluciones (10^1 hasta 10^8 UFC/ml) (resultados no mostrados) (Burbano, 2002).

Border y colaboradores en 1990, identificaron *L. monocytogenes* por PCR usando 5 iniciadores basados en el gen *hlyA* que codifica para la listeriolisina O (LLO) y otros 3 basados en el 16S ADNr. Los resultados mostraron la amplificación de un fragmen-

to de 702 pb (*hlyA*), poco diferenciable en talla molecular con el fragmento del género (Border *et al.*, 1990). Allman *et al.* (1995), usaron cuatro oligonucleótidos en tres reacciones sucesivas de PCR para reconocer el gen *hlyA* y producir amplificados de 234 pb (LO1/LO4), 207 pb (LO1/LO3) y 204 pb (LO2/LO4), resultando una metodología muy dispendiosa con tallas de productos amplificados demasiado cercanos entre sí, lo que podía afectar la resolución dependiendo de la concentración del gel. Por otro lado, Makino *et al.* (1995); utilizaron los iniciadores LA1/LB1 que amplificaban un fragmento de 626 pb, correspondiente al género *Listeria* y no la especie; lo que permitía la amplificación de todos los miembros del género, excepto *L. seeligeri* y *L. grayi* (Makino *et al.*, 1995). Otros autores, han utilizado iniciadores para identificar tanto el género como especie, pero la especificidad de los oligonucleótidos empleados, comparada con los que amplifican fragmentos del gen *hlyA*, ha sido menor (Furrer, 1991; Golsteyn, T. 1991; Bohnert, 1992; Niederhauser, 1992; Duffy, 1999). Moyra *et al.* (1996) utilizaron los iniciadores *prfA/prfB* complementarios al gen *prfA*, involucrado en la regulación de la síntesis de la LLO. En este trabajo, al

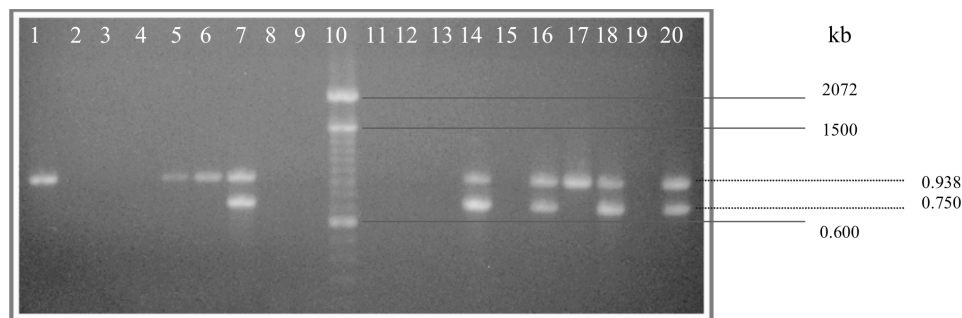


FIGURA 1. Electroforesis en gel de agarosa al 1% (p/v) en TAE IX, teñido en TAE IX con 0.3 µg/ml de bromuro de etidio. Especificidad de la técnica de PCR. ADN de los microorganismos empleados en el estudio: pozos 1, 5, 6, 17: *L. innocua* (Suiza) (L5), pozos 2, 4, 8, 13: *S. aureus* ATCC 29213, pozos 3, 9, 12, 15, 19: *E. coli* O127, pozos 7, 14, 16, 18, 20: *L. monocytogenes* ATCC 1915 (L2), pozo 10: marcador de talla molecular 100 pb (Gibco BRL), pozo 11: Blanco de la PCR (H_2O destilada).

igual que en el de Allman, sólo se identificó la especie *monocytogenes* lo que no garantiza que se elimine la interferencia por reacciones cruzadas (Moyra *et al.*, 1996) con la neumolisina de *S. pneumoniae* y la estreptolisina O de *S. pyogenes* (Zamora *et al.*, 2000; Burbano *et al.*, 2003).

Los ensayos de la prueba piloto (reproducibilidad) revelaron que la técnica es altamente reproducible y estadísticamente confiable, ya que el análisis en Epi-info 6.0d, arrojó un K = 1, “casi perfecto” en el grado de concordancia entre las variables de ensayo (concordancia total), demostrando que la PCR es reproducible y confiable (Sox, 1987; Pauker y Kassirer, 1995;

Burbano, *et al.*, 2003; Sierra, 2004; Torres *et al.*, 2004a) (figura 2).

Todas las muestras cumplieron satisfactoriamente con los análisis microbiológicos y fisicoquímicos (resultados no mostrados) (Burbano, 2002; Sierra, 2004; Torres, 2004); estos análisis se realizaron con el objetivo de descartar contaminación previa con *L. monocytogenes* y asegurar que las características fisicoquímicas y que las muestras cumplieran con los parámetros previstos reglamentados para el consumo humano (Niño *et al.*, 1988; MNS, 1989; MNS, 1996; ICONTEC, 1998; Pascual, 1999; ICONTEC, 2002). Únicamente después de evaluadas las características

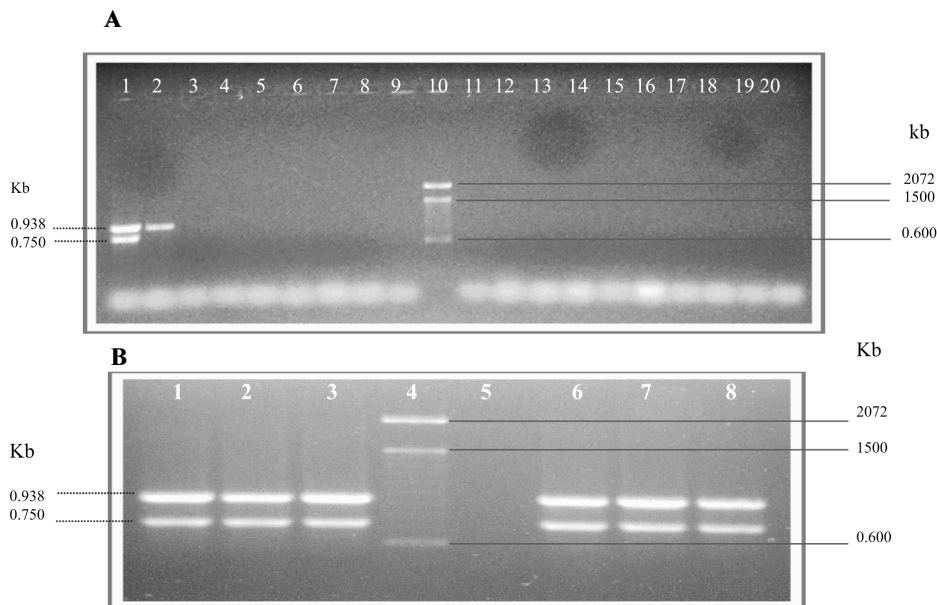


FIGURA 2. Electroforesis en gel de agarosa al 1% (p/v) en TAE IX, teñido en TAE IX con 0.3 µg/ml de bromuro de etidio. Reproducibilidad de la técnica de PCR. ADN de los microorganismos empleados en el estudio: **A.** Pozo 1: *L. monocytogenes* (L1), pozo 2: *L. innocua* (Suiza) (L5), pozo 3: Blanco de la PCR (H₂O destilada), pozo 4: *E. faecalis* ATCC 9212, pozo 5: *E. faecalis*, pozo 6: *S. epidermidis*, pozo 7: *B. subtilis*, pozo 8: *L. lactis*, pozo 9: *B. licheniformes*, pozo 10: Marcador de talla molecular 100 pb (Gibco BRL), pozo 11: *L. casei*, pozo 12: *L. acidophilus*, pozo 13: *C. perfringens*, pozo 14: *S. agalactiae*, pozo 15: *S. aureus* ATCC 29213, pozo 16: *L. bavaricus*, pozo 17: *P. vulgaris*, pozo 18: *S. choleraesuis*, pozo 19: *S. enteritidis*, pozo 20: *S. infantis*. **B.** Pozo 1: *L. monocytogenes* (L8), pozo 2: *L. monocytogenes* (L9), pozo 3: *L. monocytogenes* (L8), pozo 4: Marcador de talla molecular 100 pb (Gibco BRL), pozo 5: Blanco de la PCR (H₂O destilada), pozo 6: *L. monocytogenes* (L9), pozo 7: *L. monocytogenes* (L8), pozo 8: *L. monocytogenes* (L9).

fisicoquímicas y microbiológicas, las muestras fueron contaminadas artificialmente.

Los resultados obtenidos con las muestras de leches crudas contaminadas con 10^1 UFC/ml y 10^2 UFC/ml mostraron una sensibilidad del 100%, especificidad del 100%, valor predictivo positivo del 100% y valor predictivo negativo del 100%. Estos valores demostraron que la detección de *Listeria* spp., (analito) puede realizarse con cualquiera de los dos métodos (PCR o "Gold Standard"), ya que comparten la misma sensibilidad y especificidad pero sólo hasta 10^2 UFC/ml, debido a que el método tradicional no fue capaz de detectar 10^1 UFC/ml. Sin embargo, el 100% del valor predictivo para el PCR (método alterno), proporcionó una alta confiabilidad, permitiendo detectar las muestras positivas que realmente contenían el analito, descartando con 100% de fiabilidad las muestras

negativas. Las muestras contaminadas con *L. monocytogenes* amplificaron los fragmentos de 938 pb y 750 pb (figura 3A), mientras que los microorganismos restantes no amplificaron ningún fragmento de DNA.

Un factor decisivo en la industria de alimentos es el tiempo invertido en las pruebas de liberación del producto terminado; en este sentido la técnica tradicional arroja resultados presuntivos en los primeros 5 días, mientras que la PCR a partir de muestras de leches frescas generó resultados altamente confiables, más sensibles y reproducibles en 4 h de trabajo (Burbano, 2002).

Los resultados evidenciados tras la detección directa de *L. monocytogenes* a partir de 10^3 UFC/g de queso, (sensibilidad) mostraron que de las 36 muestras sólo 9 evi-

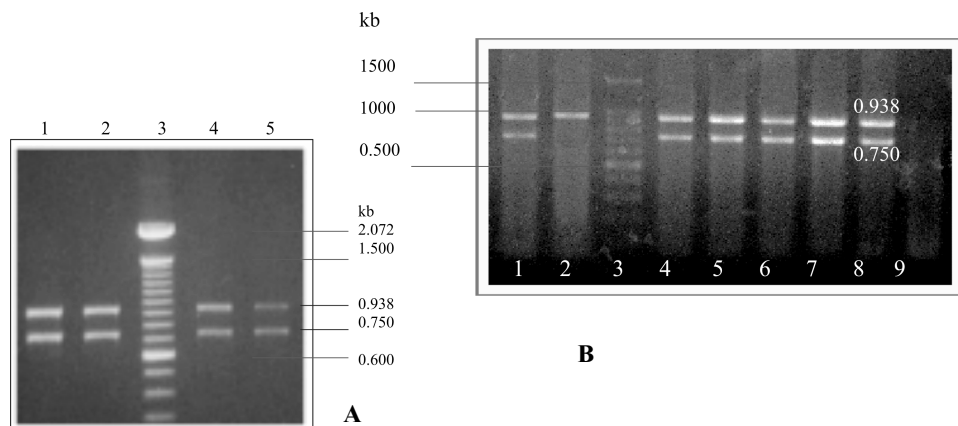


FIGURA 3. Electrofóresis en gel de agarosa al 1% (p/v) en TAE IX, teñido en TAE 1X con 0.3 µg/ml de bromuro de etidio. **A.** Extracción y PCR a partir de muestras de leche cruda. Pozo 1: muestra de leche contaminada con 10^2 UFC/ ml de *L. monocytogenes* (L1), pozo 2: muestra de leche contaminada con 10^2 UFC/ ml de *L. monocytogenes* ATCC 1915, pozo 3: marcador de talla molecular 100 bp (Gibco BRL), pozo 4: muestra de leche # 56 contaminada con 10^1 UFC/ml de *L. monocytogenes* ATCC 1915, 5: muestra de leche # 59 contaminada con 10^1 UFC/ml de *L. monocytogenes* (L1). **B.** Reproducibilidad de la Técnica de PCR, extracción de ADN a partir de muestras de quesos frescos contaminadas con *L. monocytogenes*: Pozo 1: ADN *L. monocytogenes* (L9), pozo 2: ADN de *L. innocua* (Suiza) (L5), pozo 3: Marcador de talla molecular 100 pb (PROMEGA), pozos 4-8: Extracción y PCR a partir de quesos contaminados con 10^5 UFC/g de L9, pozo 9: Blanco de la PCR (H_2O destilada).

denciaron las dos bandas, mientras que en las 27 muestras restantes se observó únicamente la banda de género (938 pb) o no hubo amplificación. Estos resultados significaron una exactitud relativa del 56% y una sensibilidad del 25% y no aportaron evidencia estadística significativa (<80%) para que esta concentración fuera establecida como límite de detección. Sin embargo, la detección directa en todas las muestras contaminadas con 10^5 UFC/g, logró evidenciar la amplificación de las bandas de 938 pb y 750 pb. Por esta razón se seleccionó esta concentración como límite de detección directo en quesos frescos (Hokanson, 1994; ICONTEC, 2001) (figura 3B).

Al completar el análisis de reproducibilidad se observaron las dos bandas en 78 de las 80 muestras contaminadas con 10^5 UFC/g. El análisis realizado en Epi-info 6.0d reportó una proporción de detección de 96.2%, con una $P = 0.0002$. De otro lado las muestras negativas para el analito (24 muestras) no amplificaron ninguna de las bandas, revelando la especificidad de la técnica de detectar negativos que verdaderamente lo son y los positivos que realmente son positivos para la presencia del analito.

La sensibilidad determinada a partir de la comparación de los resultados obtenidos por el método "Gold Standard" y en la PCR para las 80 muestras contaminadas con 10^5 UFC/g (límite de detección), y las 24 muestras sin inocular, demostraron una medida y asociación del 97% de concordancia observada, una sensibilidad del 96.2%, una especificidad del 100%, un valor predictivo positivo del 100% y un valor predictivo negativo del 87.5%. La reducción en tiempo de ensayo fue considerable (de 15 días a 4 horas) también para las muestras de quesos frescos.

El método de extracción de ADN empleando NaI a partir de las muestras de leches

crudas y quesos frescos, permitió la recuperación del ADN bacteriano. Este procedimiento es más seguro que las técnicas de extracción basadas en solventes orgánicos como fenol y más simple que los sistemas de fases acuosas. El límite de detección en leches de la PCR fue 10^1 UFC/ml, y no fue necesario realizar tratamientos posteriores a la extracción para eliminar la interferencia causada por las grasas presentes en los alimentos (figura 3).

A pesar de que Makino en 1995 empleó la misma técnica de extracción de ADN y la aplicó en muestras de quesos, el límite de detección encontrado en nuestro trabajo (1×10^5 UFC/g), resultó ser una unidad logarítmica inferior al límite de detección reportado por Makino, lo que podría indicar que nuestras condiciones favorecen que la técnica sea una unidad logarítmica más sensible. El hecho de haber detectado el analito directamente en muestras de queso contaminadas con 10^5 UFC de *L. monocytogenes*/g, se debió en gran medida a la combinación entre el procedimiento de extracción, las condiciones de la reacción de PCR y la selección de un juego de cebadores con alta especificidad sin descartar la naturaleza intrínseca de la muestra; naturaleza que al parecer es afectada dependiendo de la condición del alimento (líquido o sólido) ya que en leche se logró mayor sensibilidad. De otro lado es importante tener en cuenta las posibles diferencias en la composición de los quesos utilizados en los estudios de Makino y en el nuestro.

Otros autores han utilizado algunas modificaciones como la filtración del cultivo, el aumento del volumen de la mezcla de lisis celular o la centrifugación del cultivo después de la lisis para extraer el ADN a partir del alimento. Con algunas de estas modificaciones ha sido posible la detección del microorganismo en concentraciones de 10 UFC/ml (McLauchlin, 1990; Rudolf, 2001;

Ha, 2002). Otros trabajos realizados han demostrado que el método de extracción con solventes orgánicos no es recomendado para quesos, debido a que no se obtiene la reproducibilidad deseada. A diferencia, el método con NaI no necesita modificaciones para mejorar la sensibilidad, disminuyendo así el tiempo de extracción y de análisis de la muestra. De esta manera, el primer método de extracción de ADN estandarizado en este trabajo, podría ser implementado en la detección de otros patógenos transmitidos por lácteos.

Algunos autores han señalado la importancia del preenriquecimiento para aumentar la confiabilidad (Midelet, 2002). Teniendo en cuenta que la legislación exige cero tolerancia, para *L. monocytogenes*, se inició un estudio piloto dirigido a disminuir aún más el límite de detección en quesos frescos (aumentar la sensibilidad); los ensayos preliminares realizados en este estudio han

permitido la disminución del límite de detección a 10^2 UFC/g de queso presentando una confiabilidad del 94% (datos no mostrados). Por ser esta una prueba piloto se hace necesario incrementar en el número de réplicas, para que los resultados obtenidos a partir de una contaminación inicial inferior y la metodología implementada (10^2 UFC/g de queso ® preenriquecimiento ® PCR) puedan considerarse validadas; resultados que serán presentados y discutidos en un próximo trabajo.

Con relación a las 32 muestras de carne de pollo contaminadas con 10^4 UFC/g, 31 amplificaron las bandas de 938 pb y 750 pb, en contraste con las 32 muestras contaminadas con 10^2 UFC/g, que no amplificaron las bandas esperadas. La identificación de *L. monocytogenes* por el método tradicional fue positiva para todas las muestras contaminadas y negativa para las no contaminadas (figuras 4A, B).

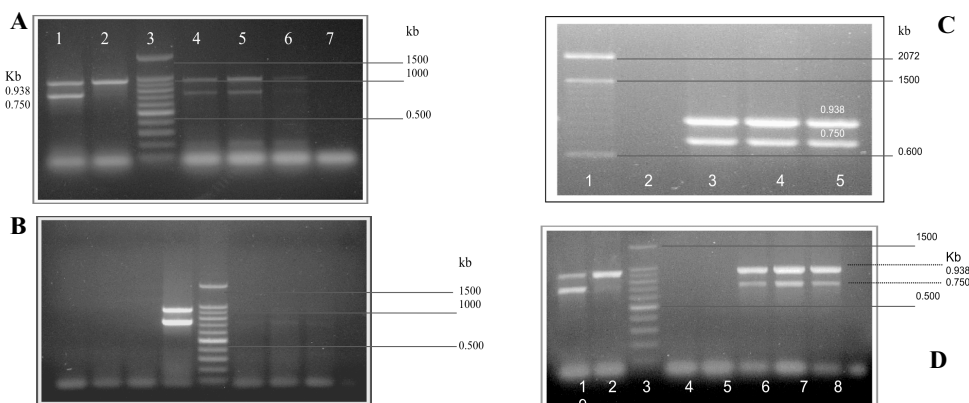


FIGURA 4. Electroforesis en gel de agarosa al 1% (p/v) en TAE IX, teñido en TAE IX con 0.3 μ g/ml de bromuro de etidio. Sensibilidad de la técnica de PCR. *Carne de pollo*. **A.** Pozo 1: ADN de *L. monocytogenes* (L8), pozo 2: ADN de *L. innocua* (suiza) (L5), pozo 3: Marcador de talla molecular 100 pb (Promega), pozos 4,5 y 6: muestras contaminadas con 10^2 UFC/g de pollo, pozo 7: Blanco de la PCR (H_2O destilada). **B.** Pozo 1: muestra sin contaminar, pozos 2 y 3: muestras contaminadas con 10^2 UFC/g de pollo, 4: ADN de *L. monocytogenes* (L8), pozo 5: Marcador de talla molecular 100 pb (Promega), pozos 6, 7 y 8: muestras contaminadas con 10^2 UFC/g de pollo, pozo 9: Blanco de la PCR (H_2O destilada). *Carne de res*. **C.** pozo 1: ADN de *L. monocytogenes* (L8), pozos 2 y 3: muestras contaminadas con 10^4 UFC/g de res, pozo 4: Blanco de la PCR (H_2O destilada), pozo 5: Marcador de talla molecular 100pb (Gibco BRL). **D.** pozo 1: ADN de *L. monocytogenes* (L8), pozo 2: ADN de *L. innocua* (Suiza) (L5), pozo 3: Marcador de talla molecular 100 pb (Promega), pozos 4 y 5: muestras sin contaminar, pozos 6, 7 y 8: muestras contaminadas con 10^3 UFC/g de res, pozo 9: Blanco de la PCR (H_2O destilada).

El análisis del límite de detección encontrado en carne de pollo por la técnica de PCR tras enriquecimiento de 24h, reportó una proporción de detección del 96%, para 10^4 UFC/g de pollo ($p=0.015$). El método 2 x 2 de la técnica de PCR vs. el método tradicional, demostró una exactitud relativa del 98.43%, sensibilidad de 96.9%, especificidad de 100%, valor predictivo positivo de 100% y valor predictivo negativo de 100%. Las muestras no contaminadas no amplificaron, revelando la especificidad de la técnica para detectar negativos que verdaderamente son negativos (Scotter, 2001). La exactitud relativa obtenida para la PCR, indicó que existe 98.43% de concordancia entre la respuesta obtenida por el método de referencia y la respuesta obtenida por el método alterno con muestras idénticas. El valor predictivo positivo obtenido para la PCR, mostró que existe una confiabilidad del 100% de detectar las muestras positivas que realmente contienen el analito, mientras que, el valor predictivo negativo obtenido para el método alterno PCR, indicó que existe una confiabilidad del 97% para detectar las muestras negativas que realmente no contienen el analito.

De otro lado, el 100% de las muestras de carne de res (10^4 UFC/g y 10^2 UFC/g) amplificaron las bandas de 938 pb y 750 pb. El análisis del límite de detección (Epi-info 6.0d) encontrado en carne de res por PCR tras enriquecimiento de 24h reportó una proporción de detección del 100%, para 10^2 UFC/g ($p=0.0026$). Los datos obtenidos tras el análisis por el método 2 x 2 de la técnica de PCR vs. el método tradicional demostraron una exactitud relativa o concordancia observada, y unas características operativas de sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo y valor predictivo negativo de 100%. Las muestras contaminadas amplificaron las bandas de 938 pb y 750 pb (figuras 4C, D). Las muestras sin el analito no amplificaron, revelando la espe-

cificidad 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 analito (Scotter, 2001). La concordancia observada o exactitud relativa obtenida para el método alterno (PCR), indicó 100% de concordancia entre la respuesta obtenida por el método de referencia y la respuesta obtenida por el método alterno con muestras idénticas. El valor predictivo positivo obtenido para el método alterno, indicó que existe una confiabilidad del 100% para detectar las muestras positivas que realmente contienen el analito. De la misma manera, el valor predictivo negativo obtenido para la PCR, mostró una confiabilidad del 100% para detectar las muestras negativas que realmente no contienen el analito.

El método de PCR desarrollado en esta investigación, también puede utilizarse como 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 la detección de este microorganismo en 8 días y 21 horas, lo que permitiría incrementar el número de muestras examinadas en la industria y optimizar el proceso de inspección y seguridad de los alimentos.

CONCLUSIONES

La técnica de PCR a partir de cultivos puros empleada en este estudio resultó ser altamente reproducible, y estadísticamente confiable con un valor $K = 1$, en el grado de concordancia entre las variables de ensayo. El tiempo de preparación y detección directa de *L. monocytogenes* en muestras de leches crudas se redujo de 15 días a 4 h con una sensibilidad y especificidad encontrada del 100%, valor predictivo positivo y negativo de 100% y límite de detección de 10^1 UFC/ml. El tiempo de pre-

paración y detección directa de *L. monocytogenes* en muestras de quesos frescos también se redujo de 15 días a 4 h con una sensibilidad del 96.2%, una especificidad del 100%, un valor predictivo positivo del 100% y un valor predictivo negativo del 87.5% y límite de detección de 10⁵ UFC/ml. El tiempo de preparación y detección de *L. monocytogenes* en muestras de carnes crudas de res y pollo después de enriquecimiento se redujo de 15 días a ~30 h con 95% de intervalo de confianza, demostraron una exactitud relativa o concordancia observada de 98.43%, sensibilidad de 96.9%, especificidad de 100%, valor predictivo positivo de 100% y valor predictivo negativo de 97% para carne de pollo. Para las muestras de carne de res se encontró que todos estos parámetros cumplen con el 100% con un límite de detección de 10² UFC/g.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen a los Laboratorios de Microbiología de la Secretaría Distrital de Salud y de la Universidad del Valle por la donación de parte de las cepas empleadas en este estudio y a la Pontificia Universidad Javeriana, por la financiación de este estudio a través de los proyectos No. 1053 y 1600.

LITERATURA CITADA

- ALLAERT, C. y ESCOLÁ, M. 2002. Métodos de análisis microbiológicos de alimentos, Díaz de Santos S.A., 123-126.
- AMADOR, E.; ALMAZÁN, M.; QUINTANA, M.; POUTOU, R.A.; CANDELARIO, M. 1994. Estudio preliminar de la estabilidad de los bancos de células primarios para la producción de interferón alfa recombinante. *Biotecnología Aplicada*, 11 (1): 60-63.
- ARCHER, D.L. 1988. Review of the Latest FDA information on the presence of listeria in foods. Foodborne Listeriosis, Génova, Italia, WHO Working Group on Notermans, 15-19.
- BANSAL, N.S. 1996. Development of a Polymerase Chain Reaction Assay for the Detection of *Listeria monocytogenes* in Foods. *Applied Microbiology*, 22: 353-356.
- BOERLIN, P.; BANNERMAN, E.; BILLE, J.; JEMMI, T. 1997. Typing *Listeria monocytogenes* isolates from fish products and human listeriosis cases. *Applied and Environmental Microbiology*, 63 (4): 1338-1343.
- BOHNERT, M.; DILASSER, F.; DALET, C.; MENGAUD, J.; COSSART, P. 1992. Use of specific oligonucleotides for direct enumeration of *Listeria monocytogenes* in food samples by colony hybridization and rapid detection by PCR. *Result Microbiology*, 143: 271-280.
- BORDER, P.M.; HOWARD, J.J.; PLASTOW, G.S.; SIGGENS, K.W. 1990. Detection of listeria species and *Listeria monocytogenes* using polymerase chain reaction. *Letter Applied Microbiology*, 11: 158-162.
- BURBANO, E.M. 2002. Validación de PCR Para la detección de *Listeria monocytogenes* en leches. Departamento de Microbiología. Tesis de maestría. Pontificia Universidad Javeriana. Bogotá, D.C. 117 p.
- BURBANO, E.M.; CARRASCAL, A.K.; MERCADO, M.; POUTOU, R.A. 2003. Validación de PCR para *Listeria monocytogenes* en leches. *Normas y Calidad* (57): 39-48.
- DA SILVA, M.C.; TIBANA, A. 1995. *Listeria monocytogenes* em alimentos: seu significado nos dias atuais. *Higiene Alimentar* 9: 7-10.
- DUFFY, G.; CLOAK, O.M.; SHERIDAN, J.J.; BLAIR, I.S.; McDOWELL, D.A. 1999. The development of a combined surface adhe-

- sion and polymerase chain reaction technique in the rapid detection of *Listeria monocytogenes* in meat and poultry. *International Journal of Food Microbiology*, 49: 151-159.
- FARBER, J.M. 2000. Present situation in Canadá Regarding *Listeria monocytogenes* and Ready-to-eat Seafood Products. *International Journal of Food Microbiology*, 62: 247-251.
- FARBER, J.M. y HARWIG, J. 1996. The Canadian position on *Listeria monocytogenes* en Ready-to-eat Foods. *Food Control*, 7 (4): 253-258.
- FARBER, J.M. y PETERKIN, P.I. 1992. Incidence and behavior of *Listeria monocytogenes* in meat products. *Listeria, Listeriosis and Food Safety*. Ryser, E.T., Marth, E.H. New York, Marcel Dekker, 505-564.
- FDA 2003. *Listeria monocytogenes* Risk Assessment. Questions and Answers. *FDA News*: 4.
- FURRER, B.; CANDRIAN, U.; HOFELIN, CH.; LUTHY, J. 1991. 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*, 70: 372-379.
- GOLSTEYN T., E.J.; KING, R.K.; BURCHAK, J.; GANNON, V.P.J. 1991. Sensitive and specific detection of *Listeria monocytogenes* in milk and ground beef with polymerase chain reaction. *Applied and Environmental Microbiology* 57 (9): 2576-2580.
- GOULET, V.; LÉPOUTRE, A.; ROCOURT, J.; COURTIEU, A.L.; DEHAUMONT, P.; VEIT, P. 1993. L'épidémie de Listériose en France. Bilan Final et Résultats de L'enquête Épidémiologique. *Bulletin Épidémiologie Hebdomadaire*, 4: 13-14.
- HA, K.S.; PARK, S.J.; SEO, S.J.; PARK, J.H.; CHUNG, D.H. 2002. Incidence and polymerase chain reaction assay of *Listeria monocytogenes* from raw milk in gyeongnam province of Korea. *Journal of Food Protection*, 65 (1): 111-115.
- HOKANSON, G.C. 1994. A Life Cycle Approach to the validation of analytical methods during pharmaceutical product development, Part Y: The Initial Method Validation Process. *Pharmaceutical Technology*, 118-130.
- ICMSF, 1994. Choice of sampling plan and criteria for *Listeria monocytogenes*. *International Journal of Food Microbiology*, 22: 89-96.
- ICONTEC, 1998. Industrias alimentarias. Pollo beneficiado. Norma Técnica Colombiana 3644-2. Bogotá, Instituto Colombiano de Normas Técnicas y Certificación, 1-78.
- ICONTEC, 2001. Microbiología de alimentos y alimentos para animales. Protocolo para la Validación de Métodos Alternos. Norma Técnica Colombiana de 066. Bogotá, Instituto Colombiano de Normas Técnicas y Certificación: 1-87.
- ICONTEC, 2002. Productos de la pesca, pescado entero, medallones y trozos, refrigerados o congelados. Norma Técnica Colombiana 1443. Bogotá, Instituto Colombiano de Normas Técnicas y Certificación.
- LACHICA, R.V. 1996. Hemolytic activity reevaluation of putative nonpathogenic *Listeria monocytogenes* Strains. *Applied and Environmental Microbiology*, 62 (11): 4293-4295.
- MAKINO, S.; OKADA, Y.; MARUYAMA, T. 1995. A new method for direct detection of *Listeria monocytogenes* From Food by PCR. *Applied and Environ-*

- mental Microbiology, 61 (10): 3745-3747.
- McLAUCHLIN, J.; GREENWOOD, M.H.; PINI, P.N. 1990. The occurrence of *Listeria monocytogenes* in cheese from a manufacturer associated with a case of listeriosis. *International Journal of Food Microbiology*, 10: 255-262.
- MEZA, R.A.; MONROY, A.F.; MERCADO, M.; POUTOU, R.A.; RODRÍGUEZ, P.; PEDROZA, A.M. 2004. Study of the Stability in Real Time of Cryopreserved Strain Banks. *Universitas Scientiarum*, 9 (2): 35-42.
- MIDELET, G.; CARPENTIER, B. 2002. Transfer of microorganisms, including *Listeria monocytogenes*, from various materials to beef. *Applied and Environmental Microbiology*, 68 (8): 4015-4024.
- MNS, 1989. Normas y procedimientos reglamentarios de la industria de alimentos. Decreto 1804. Bogotá, Ministerio Nacional de Salud.
- MNS, 1996. Normas y procedimientos reglamentarios de la industria de alimentos. Decreto 2310. Bogotá, Ministerio Nacional de Salud.
- Mosos, R.; Ochoa, M.N.; Estrada, S. 1997. Importancia de los aislamientos de *Listeria monocytogenes* en quesos y quesitos elaborados en algunos municipios del departamento de Antioquia. *Boletín Epidemiológico de Antioquia*.
- MOYRA, C.; SIMON, D.; GRAY, N.C. 1996. DNA extraction and PCR methods for the detection of *Listeria monocytogenes* in Cold Smoked Salmon. *Applied and Environmental Microbiology*, 62: 822-824.
- Niederhauser, C.; Candrian, U.; Hofelein, C.; Jermini, M.; Buhler, H.P.; Luthy, J. 1992. Use of Polymerase Chain Reaction for Detection of *Listeria monocytogenes* in Food. *Applied and Environmental Microbiology*, 58 (5): 1564-1568.
- Niño, L.; Acosta, E.; Arias, M. 1988. Análisis fisicoquímico y microbiológico de la leche. Bogotá, Ministerio de Salud - Instituto Nacional de Salud, 56.
- ONU, 2000. Informe de la consulta mixta FAO/OMS de expertos sobre la evaluación de riesgos asociados a los peligros microbiológicos en los alimentos. Roma, Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación: 27-30.
- PASCUAL, M.; CALDERÓN, V. 1999. Microbiología alimentaria. Madrid, Díaz de Santos: 171-208.
- PAUKER, S. y KASSIRER, J. 1995. Therapeutic decision making: a cost - benefit analysis. a threshold approach to therapeutic decision making. *New England Journal of Medicine*, 293: 229-234.
- PÉREZ, A.; RODRÍGUEZ, N.; GIL, J.F.; RAMÍREZ, G.A. 2001. 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.
- PINNER, R.W.; SCHUCHAT, A.; SWAMINATHAN, B.; HAYES, P.; DEEVER, K.; WEAVER, R.; PLIKAYTIS, B.; REEVES, M.; BROOME, C.; WENGER, J. 1992. Role of foods in Sporadic Listeriosis II. Microbiologic and epidemiologic investigation. *Journal of the American Medical Association*, 267: 2046-2050.
- POUTOU, R.; MÁTTAR, S. 2000a. Amplificación al azar del polimorfismo del ADN (RAPD) de cepas de *E. coli* O157:H7 aisladas de pacientes pediátricos. *Pediatría*, 35 (3): 259-263.

- POUTOU, R.; MÁTTAR, S.; DEL PORTILLO, P.; VISBAL, J.; BERMÚDEZ, A. 2000b. RAPD fingerprinting of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 Isolates in Santa Fe de Bogotá, DC, Colombia. *Medical Science Research*, 28: 29-32.
- POUTOU, R.A., AMADOR, E., CANDELARIO, M. 1994. Banco de Células Primario (BCP): Caracterización y papel en la producción de proteínas recombinantes. *Biotecnología Aplicada*, 11: 55-59.
- QVIST, S., SEHESTED, K., ZEUTHEN, P 1994. Growth suppression of *Listeria monocytogenes* in a Meat Product. *International Journal of Food Microbiology*, 24: 283-293.
- RADOS, C. 2004. Preventing Listeria Contamination in Foods. *FDA Consumer* 38 (1): 10-11.
- RAMÍREZ, L.J. y URQUIJO, G.A. 2002. Inspección, vigilancia y control de las carnes de bovinos y porcinos en Bogotá, D.C. *Boletín Epidemiológico Distrital*, 7 (5): 2-11.
- RUDOLF, M.; SCHERER, S. 2001. High incidence of *Listeria monocytogenes* in European Red Smear Cheese. *International Journal of Food Microbiology*, 63: 91-98.
- RYSER, E.T. 1999. Foodborne listeriosis. Listeria, listeriosis and food safety. Ryser, E.T., Marth, E.H. New York, Marcel Dekker Inc, 299-358.
- RYSER, E.T.; ARIMI, S.M.; MARIE-CLAIRE, M.; DONELLY, C.W. 1996. Recovery of different listeria ribotypes from naturally contaminated, raw refrigerated meat and poultry products with two primary enrichment media. *Applied and Environmental Microbiology*, 62 (5): 1781-1787.
- SALVAT, G.; TOQUIN, M.T.; MICHEL, Y.; COLIN, P. 1995. Control of *Listeria monocytogenes* in the delicatessen industries: the lessons of a listeriosis outbreak in France. *International Journal of Food Microbiology*, 25: 75-81.
- SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F.; MANIATIS, T. 1989a. Gel electrophoresis of DNA. Molecular cloning: a laboratory manual. New York, Cold Spring Harbor Laboratory Press. 1: 1-62.
- SAMBROOK, J.; MANNIATIS, T.; FRITSCH, E.F. 1989b. Molecular cloning: a laboratory manual. New York, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 458-459.
- SCOTTER, S.L.; LANGTON, S.; LOMBARD, B.; SCHULTEN, S.; NAGELKERKE, N.; IN'T VELD, P.H.; ROLLIER, P.; LAHELLEC, C. 2001. Validation of ISO Method 11290 Part 1. Detection of *Listeria monocytogenes* in foods. *International Journal of Food Microbiology*, 64: 295-306.
- SIERRA, S.C. 2004 Validación del PCR para la detección de *Listeria monocytogenes* en quesos frescos. Microbiología. Tesis de maestría. Pontificia Universidad Javeriana. Bogotá, D.C., 165 p.
- SIMON, M.; GRAY, D.; COOK, N. 1996. DNA Extraction and PCR methods for the detection of *L. monocytogenes* in cold - Smoked Salmon. *Applied and Environmental Microbiology*, 62 (3): 822-824.
- SOX, H.C. 1987. Common diagnostic tests use and interpretation. Philadelphia, American College of Physicians: 260-290.
- TORRES, K.J. 2004 Validación de PCR para detección de *Listeria monocytogenes* en carnes crudas de res y pollo. Microbiología. Tesis de maestría. Pontificia Universidad Javeriana. Bogotá D.C., 251 p.
- TORRES, K.J.; POUTOU, R.A.; CARRASCAL, A.K.; SIERRA, S.C.; MERCADO, M. 2004a. Validación de PCR para detección de *Listeria monocytogenes* en carnes crudas de res y pollo. *MVZ Córdoba* 9 (2): 414-427.

- TORRES, K.J.; SIERRA, S.C.; POUTOU, R.A.; VERA, H.; CARRASCAL, A.K.; MERCADO, M. 2004B. Incidencia y diagnóstico de *Listeria monocytogenes*; microorganismo zoonótico emergente en la industria de alimentos. *Revista UDCA Actualidad & Divulgación Científica* 7 (1): 25-57.
- VORSTER, S.M.; GREEBE, R.P.; NORTJÉ, G.L. 1993. The incidence of listeria in processed meats in South Africa. *Journal of Food Protection*, 58: 169-175.
- WAN, J.; KING, K.; FORSYTH, S.; COVENTRY, M.J. 2003. Detection of *Listeria monocytogenes* in salmon using the probelias polymerase chain reaction system. *Journal of Food Protection*, 66 (3): 436-440.
- ZAMORA, A.; OSSA, H.; CARRASCAL, A.; POUTOU, R.; JIMÉNEZ, D. 2000. Identificación preliminar de *L. monocytogenes* por PCR. *Laboratorio Actual*, 17 (33): 38-41.
- Recibido: 12.01.2005
Aceptado: 11.09.2005