



Maestría en Tecnología e Higiene de Alimentos

Trabajo de Tesis realizado como requisito para optar al título de:
MAGISTER EN TECNOLOGIA E HIGIENE DE LOS ALMIENTOS

TITULO DEL TRABAJO:

“Desarrollo y validación de una metodología para la detección de *Listeria monocytogenes* en carne picada en carnicerías de Berisso”.

AUTOR: Camilo Andrés Reyes Alvarez

DIRECTOR: Dr. Gerardo Anibal Leotta

CO-DIRECTOR: Dra. Fabiana Moredo

LUGAR DE REALIZACION

Laboratorio de Microbiología de Alimentos (LaMA - FCV - UNLP)

AÑO 2013

DEDICATORIA

A mis padres Carlos Alonso Reyes Rodríguez y Flor Edith Álvarez Zambrano, que tanto los quiero y los llevo en mi corazón, ya que siempre me apoyan en el transcurrir mi vida.

A mis hermanos Manuel Alejandro Reyes Álvarez y Ricardo Andrés Medina Rengifo que son la inspiración y el motor de mi vida, porque son mi motivación para la realización de mis objetivos.

A mis amigos que son parte importante en mi vida porque con sus vivencias me llevaron siempre hacer una gran persona y sé que puedo contar con ellos a pesar del tiempo y las distancias.

AGRADECIMIENTOS

A Dios por permitirme vivir nuevas experiencias y acompañarme en cada momento de mi vida rodeándome de personas maravillosas, las cuales día a día me enriquecen con sus consejos y conocimientos.

A mis padres Carlos Alonso Reyes y Flor Edith Alvarez por apoyarme y compartir mis alegrías y tristezas, dándome siempre una voz de aliento.

A mis hermanos Manuel Alejandro y Ricardo Andrés por creer en mí y alentarme con sus palabras.

Al Laboratorio de Microbiología de Alimentos (LaMA) en especial a Juilo Copes y Gerardo Leotta; por la oportunidad de realizar la tesis en el laboratorio, por el apoyo, asesorías, acertada dirección, solidaridad y contribuir a mi crecimiento intelectual y personal en esta etapa de formación.

A mis compañeros de Laboratorio Luciano, Vicky, Lucia, Florencia, Virginia, Silvina, Yanina, Emanuel, Julian, Magdalena y Matias por los momentos de alegría, colaboración y asesoramiento en el trabajo realizado.

A la Universidad Nacional de la Plata y especialmente a la Maestría en Tecnología e Higiene de los por contribuir en mi formación integral.

A mis compañeros y amigos colombo-argentinos y cada una de las personas que me acompañaron y ayudaron durante esta fase de mi vida, muchas gracias.

INDICE DE CONTENIDOS

1. INTRODUCCION	8
1.1 ETAS (Enfermedades Trasmittidas por Alimentos).....	8
1.2 Antecedentes de la Enfermedad.....	9
1.3 La Listeriosis.....	11
1.4 Mecanismo de Acción.....	14
1.5 Taxonomía del Genero <i>Listeria</i>	17
1.6 Generalidades de <i>Listeria monocytogenes</i>	18
1.7 Métodos para la detección de <i>Listeria monocytogenes</i> en Alimentos.....	19
1.8 Métodos Convencionales Vs Métodos Rápidos.....	21
1.9 Reacción en Cadena de la Polimerasa.....	21
1.10 PCR en Tiempo Real.....	23
1.11 Validación de Métodos Analíticos.....	26
1.12 Prevención y Control.....	28
2 OBJETIVOS	30
2.1 Objetivo General.....	30
2.2 Objetivos Especificos.....	30
3 HIPOTESIS	31
4 MATERIALES Y METODOS	32
4.1 Desarrollo de la RT-PCR para la Detección del gen <i>hly</i>	32
4.1.1 Diseño de <i>primers</i> y sonda.....	32
4.1.2 Cepas.....	32
4.1.3 Extracción de ADN.....	32
4.1.4 Mezcla de Reacción de la PCR.....	33
4.1.5 Controles.....	33
4.1.6 Condiciones de la RT-PCR.....	34
4.1.7 Estandarización.....	34
4.2 Validación de la RT-PCR desarrollada a partir del caldo de enriquecimiento.....	35
4.2.1 Cepas.....	35
4.2.2 Metodología.....	35
4.2.2.1 Extracción de ADN.....	36
4.2.3 Parámetros a evaluar y análisis estadístico.....	37
4.3 Análisis de las carnicerías y obtención de las muestras.....	37
4.4 Análisis bacteriológico.....	38

4.5	Análisis estadístico.....	39
4.6	Capacitación a los expendedores de carne de Berisso.....	39
5	RESULTADOS	41
5.1	Desarrollo de la RT-PCR para la detección del gen <i>hly</i>	41
5.1.1	Desarrollo de la RT-PCR para la detección del gen <i>hly</i> Diseño de <i>primers</i> y sonda.....	41
5.1.2	Estandarización.....	42
5.1.2.1	Rango de trabajo y límite de corte.....	42
5.1.2.2	Robustez.....	43
5.2	Validación intra-laboratorio de la técnica RT-PCR desarrollada a partir del caldo de pre-enriquecimiento.....	43
5.2.1	Selectividad.....	43
5.2.2	Análisis estadísticos para los resultados.....	44
5.3	Análisis de muestras de carne picada obtenidas a nivel de boca de expendio.....	44
5.3.1	Detección de <i>L. monocytogenes</i> a partir de muestras de carne picada obtenidas a nivel de boca de expendio.....	44
5.3.2	Procedimiento microbiológico para la detección, identificación y aislamiento de <i>L. monocytogenes</i>	45
5.4	Capacitaciones a los manipuladores de carne de los comercios analizados para prevenir la presencia de microorganismos patógenos.....	46
6	DISCUSION	48
6.1	RT-PCR desarrollada y validada intra-laboratorio.....	48
6.2	Detección de <i>L. monocytogenes</i> en carne picada, a nivel de boca de expendio.....	52
6.3	Capacitación de los manipuladores de las carnicerías para prevenir la presencia de <i>L. monocytogenes</i> en la carne picada.....	54
7	CONCLUSIONES	59
8	REFERENCIAS	61
9	FIGURAS	74
10	TABLAS	80
11	ANEXOS	93

RESUMEN

Las Enfermedades Transmitidas por Alimentos (ETA), constituyen un problema en la salud pública. Es así como en las últimas décadas hay una preocupación por el aumento en la incidencia de estas enfermedades. La listeriosis transmitida por alimentos es una enfermedad relativamente poco común, pero grave, con tasas de letalidad altas (20-30%). La enfermedad afecta principalmente a segmentos específicos de la población cuya vulnerabilidad es mayor. *Listeria monocytogenes* es una bacteria que está ampliamente extendida en el ambiente y en los alimentos. El método convencional para el aislamiento de *L. monocytogenes* a partir de alimentos que ha ganado aceptación con propósitos reglamentarios internacionales es el ISO 11290-2:1996/Amd 1:2004. El objetivo de este trabajo fue prevenir la presencia de *L. monocytogenes* en carne picada bovina destinada a consumo minorista mediante el desarrollo y la validación de una técnica de PCR en tiempo real para la detección de *L. monocytogenes* en muestras de carne bovina picada, determinando su frecuencia a nivel de boca de expendio utilizando la técnica de PCR en tiempo real desarrollada y validada como tamizaje. Se diseñaron los *primers* y la sonda para el desarrollo y estandarización de la técnica realizada intra-laboratorio. Se utilizaron 50 cepas de *L. monocytogenes* y 30 cepas NO *L. monocytogenes* para su validación. Se determinaron los siguientes parámetros: a) rango de trabajo (límite de detección y límite de corte), b) selectividad (inclusividad y exclusividad), y c) robustez. El límite de corte fue de 10^2 UFC/20 μ l de mezcla de reacción de PCR. La técnica presentó 95,35% de inclusividad, 100% de exclusividad y 96,23% precisión analítica. Se comparó el desempeño de esta técnica contra la metodología de identificación y

“Desarrollo y validación de una metodología para la detección de *Listeria monocytogenes* en carne picada en carnicerías de Berisso”.

asilamiento convencional ISO 11290-2:1996/Amd 1:2004 mediante el análisis de 110 muestras de carne picada obtenidas de carnicerías de la ciudad de Berisso. Durante el muestreo se realizó una encuesta al responsable del comercio. Se obtuvieron que 57/110 (51,8%) fueron positivas para *L. monocytogenes* tanto para la RT-PCR desarrollada y validada intra-laboratorio como para la metodología convencional, pero con un resultado en tan solo de 24 horas para el método desarrollado intra-laboratorio. En las encuestas se encontraron problemas como: falta de trazabilidad de la carne, falta de procedimientos de sanitización estandarizados y carencias edilicias. El programa “Carnicerías Saludables” permitió detectar los puntos críticos en las etapas de triturado y expendio de la carne picada y de esta forma implementar estrategias de prevención y control de patógenos por medio de la capacitación de 167 manipuladores.

Palabras clave: *Listeria monocytogenes*, carne picada, RT-PCR, validación.

1. INTRODUCCION

1.1 ETA (Enfermedades Trasmitidas por Alimentos)

Los alimentos han sido durante siglos una parte fundamental para la existencia y subsistencia del hombre en la tierra. Proveen diferentes sustancias esenciales, que contribuyen a la salud y al funcionamiento adecuado del organismo. Sin embargo, también actúan como vehículos potenciales de diferentes sustancias tóxicas y agentes infecciosos, causantes de diversas enfermedades que ponen en riesgo la salud y la vida de miles de personas en todo el mundo (1).

Las Enfermedades Transmitidas por Alimentos (ETA), constituyen un problema en la salud pública. Es así, como en las últimas décadas, la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y Alimentación (*Food and Agriculture Organization*, FAO) y la Organización Mundial de la Salud (OMS) están preocupadas por el aumento en la incidencia de estas enfermedades. Se desconoce si es el resultado de una mejor vigilancia y utilización de metodologías con una mejor caracterización de los microorganismos (2).

El aumento de ETA, podría ser real, debido a las tendencias observadas en hábitos alimentarios, como el consumo de cierto tipo de alimentos (3, 4), el aumento de las poblaciones en riesgo (3, 2), como es el caso de personas inmunodeprimidas (3, 5) o la globalización de los mercados que hacen posible que un alimento contaminado con un patógeno, produzca una de estas enfermedades en un país diferente al de origen. Todo esto unido a una mejor vigilancia

epidemiológica y una mayor tecnificación en los métodos para aislar e identificar patógenos en los alimentos (6).

Se estima que cada año, un tercio de las poblaciones de los países desarrollados y al menos 2000 millones de personas en todo el mundo, se enferman por la ingesta de alimentos contaminados, en donde las enfermedades diarreicas transmitidas por agua y alimentos son las principales causas de morbilidad y mortalidad, enfermando hasta 2,2 millones de personas, en su mayoría niños. Algunos de los agentes más comúnmente relacionados a este tipo de enfermedades son *Salmonella* spp., *Campylobacter jejuni*, *Escherichia coli* enterohemorrágico (EHEC) y parásitos de los géneros *Criptosporidium*, *Criptospora* y *Trematodes*. Así mismo, destacan agentes causantes de numerosos brotes, como: *Cyclosporidium* sp, *Cyclospora* sp y *Listeria monocytogenes* (7), los cuales han sido considerados como los patógenos emergentes, descritos en las recientes décadas (1).

1.2 Antecedentes de la Enfermedad

La listeriosis transmitida por alimentos es una enfermedad relativamente poco común, pero grave, con tasas de letalidad altas (20-30%), comparadas con las de otros microorganismos patógenos transmitidos por alimentos, como la *Salmonella*. La enfermedad afecta principalmente a segmentos específicos de la población cuya vulnerabilidad es mayor. Básicamente, *L. monocytogenes* es un patógeno oportunista que casi siempre afecta a personas con una enfermedad o circunstancia subyacente grave (por ejemplo, inmunodepresión, VIH/SIDA,

“Desarrollo y validación de una metodología para la detección de *Listeria monocytogenes* en carne picada en carnicerías de Berisso”.

afecciones crónicas, como la cirrosis, que producen inmunodeficiencia); a mujeres embarazadas; a fetos y recién nacidos; y a personas mayores. *L. monocytogenes* está ampliamente extendida en el ambiente y en los alimentos. No obstante, la importancia de los alimentos como vía primaria de transmisión a los humanos, no se reconoció hasta la década de 1980, cuando se produjeron, en Norteamérica y Europa, varios brotes importantes de listeriosis de origen común (8).

L. monocytogenes se descubrió en 1926 pero recién se conoció y documentó la transmisión por alimentos en 1981, año en que se presentó el primer brote. Este se produjo por el consumo de ensalada de coles en Nueva Escocia, Canadá. Los coles habían sido conservados en refrigeración por un período prolongado, factor que originó el crecimiento de *L. monocytogenes*. Las coles se cultivaron en campos en los que habían pastado ovinos cuya materia fecal contaminó la tierra con *L. monocytogenes*. Este brote dio origen a numerosos estudios en todo el mundo y al reconocimiento de *L. monocytogenes* como microorganismo de transmisión por los alimentos (9).

En Argentina según el Departamento Bacteriología, Servicio Bacteriología Especial INEI – ANLIS “Dr. Carlos G. Malbrán” se presentaron 192 casos de listeriosis humana durante los años de 1992 a 2007 y puede ser mayor esto debido a los subregistros de casos y a que *L. monocytogenes* no es de reporte obligatorio en el país para las clínicas.

Algunos antecedentes documentados en la Provincia de Buenos Aires, presenta un estudio en el cual se analizaron 991 muestras de productos cárneos y lácteos, procedentes de establecimientos elaboradores y bocas de expendio. Este

trabajo se realizó en base a microorganismos indicadores de higiene y de contaminación fecal (coliformes totales, coliformes fecales y *E. coli*) y microorganismos patógenos (*Salmonella* spp., *L. monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* coagulasa positivo, *E. coli* O157:H7/NM). Del total de 19 muestras positivas a patógenos, se encontró que el 15,79 % de los aislamientos correspondió a *E. coli*, el 15,79 % a *E. coli* O157:H7, 15,79 % a *Salmonella* spp., el 10,53 % a *S. aureus* coagulasa positivo y la mayor frecuencia correspondió a *L. monocytogenes* con un 42,10 %. En referencia a los recuentos de patógenos, la contaminación más frecuente con *Salmonella* spp., es en carnes picadas y chacinados cocidos (10).

1.3 La Listeriosis

Existen dos formas de presentación clínica de la infección:

- a) Listeriosis perinatal.
- b) Listeriosis en el paciente adulto.

Las formas clínicas predominantes corresponden en ambos casos a la infección diseminada o a la infección localizada en el sistema nervioso central. Es la infección de origen alimentario con mayor tasa de mortalidad en humanos (20 al 30 % o mayor) a pesar del inicio del tratamiento antibiótico previo (11).

La infección generalmente comienza alrededor de las 20 horas después de la ingestión del alimento contaminado en los casos de gastroenteritis (12), mientras que el período de incubación para la forma invasiva es generalmente más larga, alrededor de 20 a 30 días (13). Los mismos períodos de incubación

han sido descritos para animales, tanto para la gastroenteritis como para la forma diseminada.

Los casos esporádicos tienen una tasa de incidencia muy baja, 2 a 8 casos anuales por millón de población en Europa y USA (14). Por este motivo, *L. monocytogenes* parece tener un potencial patógeno más bajo que otros microorganismos de transmisión alimentaria, lo cual está de acuerdo con la dosis letal 50 (DL50), relativamente alta. El valor determinado para el ratón infectado experimentalmente por vía oral es de 10^9 y por vía parenteral es de 10^5 a 10^6 . La dosis mínima requerida para la infección humana no ha sido determinada, pero el número de bacterias detectadas en alimentos responsables de casos esporádicos y epidémicos de listeriosis sugiere que es alto. Esta dosis también depende de otros factores como el estado inmunológico del huésped.

a) Listeriosis feto materno y listeriosis neonatal: La infección se produce por invasión del feto por vía placentaria y desarrollo de corioamnionitis. Como consecuencia, puede ocurrir el aborto, generalmente a partir de los 5 meses de embarazo, el parto prematuro o el nacimiento a término con infección generalizada del neonato, síndrome conocido como granulomatosis infantiséptica.

Se caracteriza por la presencia de microabscesos piogranulomatosos diseminados en el cuerpo y con alta mortalidad (15). En la madre, la infección es generalmente asintomática y puede presentarse como un síndrome gripal leve con escalofríos, fatiga, dolor de cabeza, muscular y articular alrededor de 2 a 14 días antes del aborto.

La listeriosis neonatal tardía se observa con menos frecuencia. Generalmente ocurre de 1 a 8 semanas posteriores al parto y se presenta con un síndrome febril acompañado por meningitis y en algunos casos gastroenteritis y neumonía. La vía de contaminación del neonato es por aspiración de exudados maternos contaminados durante el parto. También se han registrado casos intrahospitalarios en unidades de neonatología por transmisión horizontal a través de instrumental y las manos del personal de salud (16). La mortalidad de la listeriosis neonatal tardía es más baja (10 al 20%), pero al igual que la listeriosis temprana, puede dejar secuelas tales como hidrocefalia y retraso psicomotor (17).

b) Listeriosis del adulto: La infección más frecuente en el adulto es la invasión del sistema nervioso central (SNC) (55 al 70% de los casos). Desarrolla generalmente como meningoencefalitis acompañada por cambios severos de la conciencia, desordenes del movimiento y en algunos casos parálisis de los nervios craneales. La mortalidad de la infección del SNC es del 20%, pero puede ser del 40 al 60% si está asociada a una enfermedad de base.

En ciertos grupos de riesgo, como enfermos de cáncer, *L. monocytogenes* es la causa más frecuente de meningitis bacteriana (17).

Otra forma frecuente de listeriosis es la bacteriemia o septicemia que tiene una alta tasa de mortalidad (hasta el 70%), si está asociada a una enfermedad inmunosupresiva.

Hay otras formas clínicas atípicas (5 al 10% de casos) tales como endocarditis, miocarditis, arteritis, neumonía, pleuritis, hepatitis, colecistitis, peritonitis, abscesos localizados, artritis. En vacas la forma más frecuente es la

mastitis (18). Investigaciones de brotes alimentarios han dado la evidencia de que un síndrome gastrointestinal es la manifestación clínica de la infección por *L. monocytogenes* (19).

1.4 Mecanismo de Acción

Listeria monocytogenes es un parásito intracelular facultativo que entra en el hospedador de forma primaria a través del intestino. En los últimos años se han identificado un gran número de factores de virulencia involucrados en los pasos clave de este ciclo de vida intracelular (20). El ciclo incluye la fagocitosis inducida por el propio patógeno, la lisis de la vacuola fagocítica, el movimiento en el citoplasma y la diseminación a las células vecinas (21) (**Figura 1**).

El ciclo comienza con la adhesión a la superficie de la célula eucariota y la subsecuente penetración de la bacteria dentro de la célula hospedadora mediante fagocitosis. El único mecanismo conocido que permite la unión covalente de las proteínas de superficie de la pared celular de bacterias gram-positivas a la célula eucariota requiere proteínas con una secuencia conservada LPXTG (Leu-Pro-X-Thr-Gly, donde X es cualquier aminoácido). En el genoma de *L. monocytogenes* se han detectado 41 genes que codifican para proteínas LPXTG. Las primeras proteínas de este tipo identificadas fueron la internalina (o InIA) y la proteína InIB, codificadas ambas por el operón *inIAB* (22, 23); la primera interviene en la adhesión e invasión de células epiteliales polarizadas, como las intestinales, mientras que InIB lo hace en el caso de células epiteliales no polarizadas, como los hepatocitos (24). Posteriormente se han descrito numerosos genes que

codifican para proteínas del tipo de la internalina (*inlC*, *inlC2*, *inlD*, etc.). Existen muchas otras moléculas necesarias para la invasión y/o entrada de *L. monocytogenes* en la célula eucariota, entre las que se encuentran varias autolisinas (Ami, p60, Auto), una proteína fijadora de fibronectina (FbpA) y proteínas que también intervienen en fases posteriores del ciclo intracelular, como ActA (25) y la hemolisina o listeriolisina O (LLO) (20).

Una vez fagocitada, la bacteria es capaz de escapar del ambiente hostil del fagosoma gracias a la secreción de LLO, una hemolisina activa a bajo pH codificada por el gen *hly* y activada por tiol. LLO reconoce el colesterol de la membrana, forma poros y favorece la lisis de la membrana del fagolisosoma, lo que provoca la emigración de *L. monocytogenes* al citosol de la célula hospedadora (26, 27). La hemolisina de *L. ivanovii* tiene características que la diferencian de LLO (28, 29).

Además de esta toxina, *L. monocytogenes* secreta al medio extracelular dos fosfolipasas C asociadas con la virulencia, que pueden contribuir a dañar las membranas y a la correspondiente citolisis. Una de ellas, PI-PLC, tiene como sustrato específico al fosfatidilinositol (PI), está codificada por *plcA* y es capaz de romper los anclajes glicosil-PI. La otra, PC-PLC, es una lecitinasa codificada por *plcB*, que tiene un rango más amplio de sustrato, dado que hidroliza fosfatidilcolina, fosfatidilserina y fosfatidiletanolamina (30). La lecitinasa es activada y atraviesa la pared bacteriana gracias a una metaloproteasa específica (Mpl) codificada por el gen *mpl* (31).

La glucosa actúa de represor de los genes de virulencia de *L. monocytogenes*. La glucosa-1-fosfato (G1P), que no produce este efecto, es el metabolito precursor y el producto primario de degradación del glucógeno, por lo que es abundante en las células de mamífero. Se ha demostrado que la G1P es fundamental para el crecimiento intracelular de *L. monocytogenes* (32). La multiplicación intracelular precisa un transportador de hexosafosfato (Hpt), que es homólogo del transportador de glucosa-6-fosfato (G6P) de la célula eucariota responsable de la entrada de G6P en el retículo endoplásmico desde el citosol (33, 34). Esta proteína también es responsable de la entrada de fosfomicina en el interior de la célula bacteriana, lo que explica su sensibilidad *in vivo* asociada con resistencia *in vitro* (35).

Una vez alcanzado el citoplasma, la bacteria utiliza el citoesqueleto de la célula hospedadora para desplazarse en su interior. El movimiento intracelular tiene lugar como consecuencia de un ensamblaje direccional de monómeros de actina de la célula hospedadora en uno de los polos de la bacteria, fenómeno aparentemente dirigido por la proteína de superficie ActA (25). Finalmente, algunas bacterias alcanzan la periferia de la célula infectada, entran en contacto con la membrana celular y forman protuberancias hacia la célula colindante en forma de evaginaciones citoplásmicas que contienen en su extremo una bacteria. Estas estructuras invasoras son fagocitadas y la bacteria queda encerrada en un fagosoma de doble membrana, en cuya rotura parece jugar un papel fundamental la lecitinasa (**Figura 1**). Al ser un mecanismo que permite la diseminación de la bacteria por los tejidos del hospedador sin entrar en contacto con los efectores

humorales del sistema inmune, este fenómeno de paso directo de célula a célula es crucial en la patogénesis de la infección que causa *L. monocytogenes* (36).

1.5 Taxonomía del Genero *Listeria*

La clasificación taxonómica de *Listeria monocytogenes* es: Dominio: Bacteria, Filo: Firmicutes, Clase: Bacilli, Orden: Bacillales, Familia: Listeriaceae, Genero: *Listeria*. Hasta el año 2007, 6 especies de *Listeria* habían sido publicadas en la lista de validación del IJSEM (“International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology”): *Listeria monocytogenes*, *Listeria innocua*, *Listeria ivanovii* (subsp. *ivanovii* y *londoniensis*), *Listeria seeligeri* especie (37) y recientemente se ha validado *Listeria rocourtiae* (38).

L. monocytogenes ha sido durante mucho tiempo (1926-1974) la única especie reconocida dentro del género *Listeria*. La octava edición del Manual de Bergey (1974) amplió oficialmente el género a cuatro especies, añadiendo tres no patógenas: *L. denitrificans*, *L. grayi* y *L. murrayi* (descritas en 1963, 1966 y 1971, respectivamente). Sin embargo, la especie *L. monocytogenes* incluía cepas hemolíticas patógenas y no hemolíticas apatógenas, lo que implicaba la imposibilidad de diferenciar taxonómicamente cepas de origen epidémico de las apatógenas aisladas del medio ambiente. *L. monocytogenes* fue dividida en 1982 como consecuencia de un análisis fenotípico y epidemiológico detallado y el desarrollo de técnicas de hibridación DNA-DNA, en 5 especies: *L. monocytogenes*, débilmente hemolítica y patógena, *L. seeligeri* (39; 40; 41), débilmente hemolítica y

apatógena; *L. innocua* (41) y *L. welshimeri* (40), no hemolíticas y apatógenas; y un grupo que incluía las cepas de *L. monocytogenes* serovar 5, fuertemente hemolíticas y patógenas.

1.6 Generalidades de *Listeria monocytogenes*

El género *Listeria* comprende bacilos cortos Gram positivos de 0.4 a 0.5 μm de diámetro por 0.5 a 2 μm de largo, anaerobios facultativos, catalasa positivos, oxidasa negativos, rojo de metilo y Voges-Proskauer positivos, hidrolizan la esculina, móviles de 20-25°C por flagelos peritricos, pero no móviles a 37°C; no formadores de esporas y de bajo contenido de GC. Son microorganismos euritéricos, que se pueden desarrollar en intervalos de temperatura que van desde 1 hasta 45 °C con un óptimo de crecimiento entre 30 y 35°C. Además toleran condiciones de acidez y alcalinidad (pH entre 6 y 9) teniendo un crecimiento óptimo en pH neutro o ligeramente alcalino (42; 43, 44).

La prueba Christie–Atkins–Munch–Peterson (CAMP) es una herramienta muy útil que facilita la identificación de las especies de *Listeria* spp a partir de los aislamientos (**Tabla 1**). Se emplea en los protocolos ISO y de la AOAC y se considera opcional en los métodos de la FDA y del USDA-FSIS. La prueba es fácil de realizar e interpretar. Consiste en sembrar en estría una cepa β -hemolítica de *Staphylococcus aureus* (ATCC cepa 49444 o 25923, NCTC cepa 7428 o 1803) y de *Rhodococcus equi* (ATCC cepa 6939, NCTC cepa 1621) formando unas únicas líneas rectas y paralelas, en una placa de agar sangre de oveja o en una placa por la técnica de la doble capa de agar, con la capa de agar sangre superior muy

delgada. Las estrías deben tener la suficiente separación para permitir que las cepas de *Listeria* de prueba y de control se puedan sembrar perpendicularmente, entre los dos organismos indicadores, sin que los toquen (separados 1–2 mm) (Figura 2) (45).

1.7 Métodos para la detección de *L. monocytogenes* en Alimentos

Los métodos convencionales para el aislamiento de *L. monocytogenes* a partir de alimentos que han ganado aceptación con propósitos reglamentarios internacionales son el método de la Administración de Drogas y Alimentos de los Estados Unidos (FDA) (46), el método oficial de la Asociación Oficial de Químicos Analistas (AOAC) (47), los Estándares ISO 11290 (48, 49), el método del Servicio de Inspección y Seguridad Alimentaria (FSIS) del Departamento de Agricultura de los Estados Unidos (USDA) y los Estándares franceses (50, 51).

Dependiendo de la naturaleza de la muestra, un método particular puede ser más adecuado que otro. El Comité Técnico de la Organización Internacional para la Estandarización ISO/TC 34, Subcomité SC 9, Microbiología, de Productos Agroalimentarios, afirma que el Estándar ISO 11290, partes 1 y 2 (48, 49) puede utilizarse para la detección de *L. monocytogenes* en una gran variedad de alimentos y productos alimenticios. Aunque reconocen que este estándar puede no ser el más apropiado en ciertos casos, recomiendan que se lleve a cabo el máximo esfuerzo para aplicar este método, en lo posible.

Los métodos de la FDA y de la AOAC pueden utilizarse para el análisis de la leche y los productos lácteos. El método del USDA-FSIS se recomienda para la

“Desarrollo y validación de una metodología para la detección de *Listeria monocytogenes* en carne picada en carnicerías de Berisso”.

carne roja y carne de ave (cruda o lista para comer), huevos y derivados y muestras medioambientales. El procedimiento tradicional de aislamiento de *L. monocytogenes* a partir de tejidos animales consiste en la siembra directa de las muestras en placas con medio agar sangre de oveja u otro medio de cultivo rico y la utilización en paralelo de la técnica de “enriquecimiento en frío”, con subcultivos semanales durante 12 semanas (52, 53, 54). El aislamiento mediante siembra directa en placa es relativamente fácil si el microorganismo está presente en gran número en un lugar normalmente estéril, como sucede en el caso de la forma septicémica de la enfermedad, pero el aislamiento es difícil, sin embargo, cuando el microorganismo está presente en número reducido, como sucede en el caso de la forma encefálica o si las muestras están fuertemente contaminadas con otros microorganismos. La comparación de la eficacia de la siembra directa en placa, el enriquecimiento en frío y el método de la AOAC, ha establecido claramente la superioridad de este último sobre los otros dos, para el aislamiento de *L. monocytogenes* a partir de una amplia variedad de material procedente de la necropsia animal, tanto en términos de tiempo requerido para el aislamiento e identificación del microorganismo como en tasas de aislamiento (55).

Para la enumeración de *L. monocytogenes* se aplica el Estándar ISO 11290, parte 2 (49) tanto como los protocolos opcionales mencionados en los métodos de la FDA y del USDA-FSIS (46, 56).

1.8 Métodos Convencionales Vs Métodos Rápidos.

En la actualidad, existen varios métodos convencionales y rápidos disponibles para la detección e identificación de *L. monocytogenes* en muestras de alimentos. Los métodos bacteriológicos convencionales son importantes por varias razones: su empleo permite obtener el microorganismo en cultivo puro, lo que será útil con propósitos reglamentarios. Siguen siendo el *Gold Standard* frente a los cuales se comparan y validan otros métodos. Normalmente, son muy sensibles y no requieren equipamiento sofisticado o caro. Algunas desventajas de este grupo de métodos incluyen el periodo de tiempo relativamente largo que se necesita para finalizar los protocolos, la experiencia práctica que se precisa en varias manipulaciones, la necesidad de productos químicos, reactivos y medios muy diferentes, la posibilidad de que algunos microorganismos contaminantes enmascaren la presencia de las bacterias diana, incluyendo una posible falta de detección de variantes atípicas del organismo diana y la subjetividad relativa que supone la interpretación del crecimiento bacteriano en placas de agar con un medio selectivo y diferencial (57).

1.9 Reacción en Cadena de la Polimerasa.

La reacción en cadena de la polimerasa permite producir múltiples copias de un fragmento de ADN específico *in vitro*, incluso en presencia de millones de otras moléculas de ADN. Esta metodología se basa en la actividad de la enzima ADN polimerasa, que permite fabricar una cadena de ADN complementaria a otra ya existente. Esta enzima requiere de una secuencia corta de ADN con un

extremo 3' OH libre para comenzar a funcionar, denominada cebador. El material de inicio es ADN bicatenario (ADN templado o blanco). La mezcla de reacción (*master mix*) contiene un par de cebadores, la enzima ADN polimerasa (*Taq* polimerasa es la más utilizada), desoxinucleótidos (dNTPs), magnesio (Mg²⁺), *buffer* de PCR 10X, y agua tridestilada. Cada ciclo de la reacción de PCR se lleva a cabo en tres pasos: 1) desnaturalización, 2) hibridación, y 3) extensión. La repetición de los ciclos de PCR permite la amplificación del ADN en forma exponencial, pudiéndose obtener aproximadamente 1.000.000 de copias a partir de un solo fragmento de ADN original luego de 20 ciclos (58).

Si bien, las técnicas basadas en PCR son una poderosa herramienta para la detección de patógenos a partir de alimentos, pueden generar diferentes resultados entre laboratorios debido a la falta de validación de protocolos estandarizados, a la variabilidad de equipos y reactivos, y a la posible interferencia de la matriz con la reacción de PCR.

Para reconocer estos posibles inconvenientes se utilizan controles de sistema, controles externos y controles internos. Como control de sistema se usa la misma mezcla de reacción de PCR sin ADN templado. Los controles externos positivos y negativos son templados conocidos, que se analizan en tubos independientes del ADN problema (58).

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se utiliza tanto para tamizaje como para la identificación de microorganismos y sus factores de virulencia. Para hacer frente a las presiones regulatorias, la industria alimentaria debe utilizar métodos oficiales de referencia, como los recomendados por la ISO (*International*

Standards Organization) y AOAC (*International Association of Official Analytical Chemists*), entre otras. Actualmente, algunos métodos rápidos son recomendados como técnicas de tamizaje de *E. coli* O157:H7 por agencias regulatorias internacionales USDA/FSIS o para *Listeria* spp. y el uso de agares cromogénicos como ALOA mediante normativas como la ISO 11290-2:1998/Amd 1:2004.

1.10 PCR en Tiempo Real

La PCR en tiempo real (RT-PCR) es una técnica desarrollada a mediados de los años 90 con el objetivo principal de cuantificar ADN templado presente en una muestra de ADN. La RT-PCR se basa en la detección de una señal fluorescente proporcional al producto de amplificación en cada ciclo de PCR. La PCR cuantitativa se realiza en termocicladores de detección de fluorescencia y recolección de datos en tiempo real (59).

En la **Figura 3** se puede observar un diagrama representativo de PCR en tiempo real con diluciones seriadas de templado. Se representa el rango de detección de una PCR de punto final. Algunas diluciones con cantidades iniciales diferentes de templado posee la misma concentración en la fase plateau.

Existen dos alternativas en cuanto a la química de la fluorescencia de la PCR en tiempo real, la utilización de moléculas que se unen al ADN de cadena doble como el SYBR Green, el uso de oligonucleótidos fluorogénicos de secuencia específica.

Mecanismo de detección inespecíficos: Los colorantes (dyes) de unión al ADN son la base de los métodos inespecíficos de detección de PCR en tiempo

real. La mayoría de las moléculas fluorogénicas utilizadas interactúan con la hendidura menor de la doble hélice de ADN. Estos colorantes emiten una mínima fluorescencia cuando se encuentran libres en la solución pero generan una fuerte señal cuando se unen al ADN de cadena doble y son expuestas a una longitud de onda capaz de excitarlos. Uno de los colorantes más utilizados en RT-PCR es el SYBR Green (59).

Los métodos inespecíficos de marcaje fluorescente son relativamente menos costosos, ya que no requieren del diseño de oligonucleótidos o conjugados químicos y se encuentran mínimamente afectados por pequeños cambios en la secuencia blanco que pueden impedir la hibridación del oligofluorecente. Sin embargo, los dímeros de cebadores formados y otros productos de amplificación inespecífica compiten por la unión a los fluoróforos e interfieren en la interpretación de los resultados. Desafortunadamente, la formación de dímeros es más frecuente cuando existe un reducido número de copias iniciales de templado, hecho bastante frecuente en los estudios de búsqueda de microorganismos (59).

Mecanismos de detección específicos: La adopción de sondas de oligonucleótidos fluorescentes agrega un nuevo nivel de especificidad a la RT-PCR mediante la confirmación de un fragmento del amplificado en adición a la especificidad aportada por el par de cebadores externos.

Las metodologías de PCR cuantitativas de detección específica utilizan el efecto de transferencia energética de resonancia fluorescente (FRET, *Fluorescence Resonance Energy Transfer*). La FRET se basa en la proximidad e

interacción de un fluoroforo dador o “reporter” y un fluoroforo o “quencher”. Los fluoroforos dadores son moléculas que al absorber energía, pasan a un estado excitado, retornando al estado inicial mediante la liberación de energía en forma de fluorescencia. Los “*quenchers*” son moléculas que aceptan la energía emitida durante la des-excitación de un fluoroforo y la disipan en forma de calor más que en fluorescencia (59).

Aunque las técnicas de RT-PCR basadas en sondas FRET son mucho más específicas que los métodos de detección que utilizan SYBR Green, son más costosas y requieren una mayor validación y optimización.

Sondas TaqMan: Actualmente, las sondas TaqMan son las más utilizadas en la PCR en tiempo real. En adición a los cebadores externos, esta metodología utiliza un tercer oligonucleótido interno conocido como sonda. El colorante fluorescente dador, típicamente FAMTM, se encuentra unido al extremo 5' de la sonda y el aceptor, generalmente TAMRATM está unido al extremo 3'. Actualmente TAMRATM está siendo reemplazado por los dadores de tipo BHQ (*Black Hole Quenchers*) porque proveen una menor fluorescencia de fondo. En tanto que las moléculas dadoras y aceptoras se encuentran estrechamente cercanas (alrededor de 100 Å), la fluorescencia del dador es secuestrada por el colorante receptor y no es detectada. En las sucesivas etapas de extensión de la cadena de ADN la polimerasa encuentra y degrada el extremo 5' de la sonda híbrida a la cadena molde mediante su actividad 5'-3' exonucleasa. Como consecuencia de ello, los colorantes emisor y aceptor son

liberados por separado a la solución y la fluorescencia comienza a ser detectada (59).

En la siguiente **Figura 4** se representa el método de PCR en tiempo real TaqMan. En el diseño de la PCR se incluye una sonda doblemente marcada con un colorante emisor y otro aceptor que hibrida en el interior del ADN amplificado. La actividad exonucleasa 5' - 3' de la Taq ADN polimerasa permite el clivaje de la sonda, la separación espacial de los colorantes y la consiguiente emisión de fluorescencia (59).

1.11 Validación de métodos analíticos

Se define como validación a la confirmación de los resultados obtenidos por una determinada técnica mediante la provisión de evidencia objetiva, de que se cumplieron requisitos particulares para un uso pretendido y específico (60). Según la rigurosidad de las diferentes etapas de validación, es posible clasificar a los métodos analíticos de la siguiente manera: I) métodos del propio laboratorio, II) métodos de revistas científicas, III) métodos oficiales y IV) métodos estándar.

Se define como método cualitativo, a aquel cuya respuesta se basa en la presencia o ausencia del analito, detectado directa o indirectamente en una cierta cantidad de muestra (61). Según Trullols y col (60), para validar un método cualitativo se deben incluir los siguientes parámetros:

a) Rango de trabajo: Intervalo de concentración en el cual el analito puede determinarse con un adecuado nivel de confianza y precisión. Bajo el concepto de rango de trabajo se incluyen los términos límite de detección y límite de corte.

Límite de detección es la menor concentración de analito detectable, y límite de corte es la cantidad óptima de analito detectable. El límite de corte se establece mediante la concordancia entre un grupo de resultados obtenidos al aplicar repetida e independientemente el mismo método analítico en alícuotas de la misma muestra.

b) Selectividad: parámetro que permite ponderar la detección de la mayor cantidad de microorganismos especificados por parte de la técnica evaluada y la ausencia de reacción positiva con otros géneros y especies relacionados. La selección de un mínimo de 50 cepas puras de microorganismos relacionados y la selección de un mínimo de 30 cepas potencialmente competitivas deben ser analizadas como cultivos puros. Bajo el concepto de selectividad se incluyen los términos exclusividad e inclusividad (61, 62).

Exclusividad es la habilidad del método de no detectar un rango relevante de cepas relacionadas que pueden provocar reacciones cruzadas (61). Inclusividad es la habilidad del método alternativo de detectar un rango de cepas verdaderamente positivas para los analitos blanco (61).

c) Robustez: resistencia de un método al cambio de respuesta cuando se introducen pequeñas variaciones deliberadas a los parámetros del mismo. Deben especificarse las condiciones diferentes para poder identificar cuáles son los factores de la técnica que pueden afectar la robustez. Deben determinarse como mínimo 10 resultados y todos los pasos del método, incluidas la toma y preparación de la muestra, deben realizarse n veces (63).

1.12 Prevención y Control

Las recomendaciones para la prevención de alimentos contaminados por *L. monocytogenes* están vinculadas a la naturaleza de la bacteria, su medio y su resistencia a varias condiciones medioambientales. Por lo tanto deberá prestarse especial atención a la cocción de los alimentos crudos de origen animal, el lavado cuidadoso de las hortalizas y hierbas aromáticas crudas, la remoción de la capa dura de los quesos y a los productos listos para el consumo los cuales no han sido sometidos a un tratamiento listericida como puede ser un tratamiento térmico (64).

Asimismo, deberán cocinarse bien las carnes molidas y adoptar medidas que permitan la reducción del riesgo de la contaminación cruzada, tales como el almacenamiento de los alimentos crudos (carne, hortalizas, etc.) separados de los alimentos cocidos o listos para el consumo, y el lavado de las manos y utensilios de la cocina después de manipular los alimentos crudos.

Finalmente, otras recomendaciones más generales son: lavar y desinfectar la heladera con regularidad usando agua con cloro, controlar el funcionamiento de la misma a 4°C, observar la fecha de vencimiento de los alimentos y evitar las “ventas especiales” ofrecidas cerca del final del tiempo de conservación (65, 66).

La prevención de la listeriosis humana comienza en la granja y continúa durante todo el proceso de elaboración del producto hasta que es ingerido por el consumidor. La aplicación de medidas de control puede reducir el riesgo de la listeriosis transmitida por los alimentos.

“Desarrollo y validación de una metodología para la detección de *Listeria monocytogenes* en carne picada en carnicerías de Berisso”.

Consideramos que el conocimiento preciso de la presencia de *L. monocytogenes* en la etapa de comercialización de la carne bovina picada puede contribuir al conocimiento de los puntos de contaminación y multiplicación de este microorganismo. Asimismo, permitirán diseñar y promover estrategias de intervención a los efectos de disminuir el riesgo de infección por consumo de carne bovina picada y mejorar su calidad microbiológica.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GENERAL

Prevenir la presencia de *L. monocytogenes* en carne picada bovina destinada a consumo minorista mediante el desarrollo y la validación de una técnica de PCR en tiempo real para la detección de *L. monocytogenes* en muestras de carne bovina picada. Determinar la frecuencia de *L. monocytogenes* en carne bovina picada a nivel de boca de expendio utilizando la técnica de PCR en tiempo real desarrollada y validada como tamizaje.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Desarrollar una técnica de PCR en tiempo real para la detección *L. monocytogenes* a partir del pre-enriquecimiento.
- Validar la metodología desarrollada.
- Determinar la frecuencia de *L. monocytogenes* en carne bovina picada destinada al consumo minorista.
- Analizar muestras de carne bovina picada a nivel de boca de expendio mediante la norma ISO 11290-2:1998/Amd 1:2004.
- Capacitar a los manipuladores de carne de los comercios analizados para prevenir la presencia de *L. monocytogenes* y otros patógenos alimentarios.

3. HIPOTESIS

Hipótesis 1. La utilización de una nueva técnica para la detección de *L. monocytogenes* permite identificar en menor tiempo su presencia en carne bovina picada a nivel de boca de expendio.

Hipótesis 2. En la ciudad de Berisso la frecuencia de *L. monocytogenes* en carne bovina molida a nivel de boca de expendio, es menor al 50 %.

4. MATERIALES Y METODOS

4.1 Desarrollo de la RT-PCR para la detección del gen *hly*.

4.1.1 Diseño de *primers* y sonda.

A partir de la secuencia del gen *hly* de *L. monocytogenes*, se realizó la búsqueda de secuencias homologas en la base de datos de NCBI mediante el algoritmo BLAST. Con las secuencias homologas de *L. monocytogenes*. Se diseñaron los *primers* forward (F) y reverse (R) y la sonda, se utilizó el Software ABI Prism, Primer Express Versión 2.0.

4.1.2 Cepas

Se utilizaron 12 cepas de *L. monocytogenes* portadoras del gen *hly* (**Tabla 2**), estas cepas pertenecen al Laboratorio de microbiología de Alimentos (LaMA, FCV – UNLP). Se colocaron en 5 ml de caldo cerebro corazón (CCC) (Biokar Diagnostic, Beauvais, Francia) y se incubaron a 37°C durante 18 h.

4.1.3 Extracción de ADN

La extracción de ADN se realizó de acuerdo a la metodología utilizada por Leotta y col (67). 1 ml del caldo CCC fue centrifugado a 10000 x g durante 5 min. Se descartaron 950 µl de sobrenadante y se agregaron 150 µl de buffer triton (triton X-100 (Merck, Darmstadt, Germany) al 1% en buffer 1X (10mM-Tris HCl pH 8, 1mM EDTA pH 8) a cada tubo. Luego de colocar los tubos en el bloque térmico (Dri-Block® DB-ZD) durante 15 min a 95°C, estos fueron centrifugados a 10000 x

g durante 5 min. De esta manera se obtuvo el ADN templado que se utilizó para evaluar la RT-PCR desarrollada para la detección de *L. monocytogenes*.

4.1.4 Mezcla de Reacción de la PCR

La mezcla de reacción se realizó en una cabina exclusivamente utilizada para la preparación de mezclas de PCR (LaMA, FCV-UNLP). Se utilizó la mezcla de reacción *Master mix qPCR Probe* (PB-L Productos Bio-Logicos®). La cual posee un buffer de reacción con concentraciones optimizadas para obtener máxima sensibilidad y especificidad, también posee en su formulación de la mix la sonda ROX. La mix viene lista para agregar los *primers*, el molde y la sonda FAM (**Tabla 3**). El volumen final de cada mezcla de reacción fue de 20 µl.

4.1.5 Controles

Como control positivo se utilizó la cepa LaMA 732 confirmada bioquímicamente y por RT-PCR, como controles negativos 3 cepas de *Listeria seeligeri*, 3 cepas *Listeria welstimeri* y 3 cepas de *Listeria innocua* (**Tabla 4**). Cada una de las cepas se inoculó en 5 ml de CCC (Blokard Diagnostic) y se incubaron a 37°C durante 24 h. La extracción de ADN se realizó según el punto **4.1.3**. Además de los controles positivos y negativos, se utilizó un tubo sin ADN blanco como control del sistema.

4.1.6 Condiciones de la RT-PCR

Para la amplificación se utilizó el programa Mx3005P *Instrument Qualification Test 3*, se seleccionó la opción *Quantification PCR*. El perfil térmico consistió en: un ciclo a 95°C durante 3 min, 40 ciclos de 95°C de 15 seg de desnaturalización y 60°C por 30 seg de hibridación y extensión. El tiempo de análisis total fue de 1 h y 12 min (**Figura 5**).

4.1.7 Estandarización

La estandarización de la técnica de RT-PCR desarrollada para la detección del gen *hly* se realizó *in vitro* con cultivos puros de *L. monocytogenes* (**Tabla 2**) en diferentes concentraciones. Se determinó el rango de trabajo, el límite de corte y la robustez de la técnica desarrollada.

a) Rango de Trabajo y límite de corte: Se determinó la probabilidad de detección del gen *hly* al comparar el número de resultados positivos con la concentración de cada cepa analizada. Se utilizó el ADN templado de cada una de las cepas analizadas en un rango de 10^4 a 10^1 UDC/ μ l de mezcla de reacción de PCR. Los ensayos se realizaron por triplicado, por un mismo operador, en un intervalo de 1 a 2 días.

b) Robustez: Se utilizaron las 12 cepas enumeradas en la **Tabla 2**, además de los controles positivos y negativos. Se identificaron las variables que podrían afectar el desarrollo de la técnica, como realizar el ensayo en diferentes días y por diferente operador. Se empleó como blanco el ADN correspondiente al

límite de corte determinado. Los ensayos se realizaron por sextuplicado y se repitieron en las mismas condiciones, en 3 días consecutivos, por 2 operadores.

4.2 Validación de la RT-PCR desarrollada a partir del caldo de pre-enriquecimiento.

Se realizó la validación de la metodología según las recomendaciones de Feldsine y *col.* (61) y el Organismo Argentino de Acreditación (2003) (63) para estudios pre colaborativos, las cuales fueron avaladas por Trullols y *col.* (60).

4.2.1 Cepas

Se utilizaron 43 cepas de *L. monocytogenes* (**Tabla 5**) y 30 cepas de diferentes géneros bacterianos que pueden estar presentes en la carne bovina picada (**Tabla 6**), las cuales pertenecen a la colección del Laboratorio de Microbiología de los Alimentos (FCV-UNLP). Las distintas cepas se colocaron en 5 ml de CCC (Biokar Diagnostic) y se incubaron a 37°C durante 24 h.

4.2.2 Metodología

Se utilizaron 159 porciones de carne molida de 10 g cada una, previamente analizadas y libre de *L. monocytogenes*. 129 porciones fueron contaminadas experimentalmente con cepas de *L. monocytogenes*, en las siguientes concentraciones: 43 porciones con 10^1 UFC/10 g, 43 porciones con 10^2 UFC/10 g y 43 porciones con 10^3 UFC/10 g. 30 Porciones se contaminaron con cepas NO *L.*

monocytogenes en una concentración de 10^3 UFC/10 g. Las muestras fueron conservadas a -70°C .

Cada muestra de carne molida se incubo en 90 ml de Caldo Half Fraser (Becton, Dickinson) por 24 horas.

4.2.2.1 Extracción de ADN

Se fraccionaron 2 ml de cada caldo de pre-enriquecimiento en tubos Eppendorf para realizar la extracción del ADN. La extracción del ADN de las cepas se realizó a partir del kit de extracción comercial foodproof® Short Prep II (BIOTECON Diagnostics). El protocolo describe el aislamiento de DNA para 200 μl de volumen final a partir del caldo de pre-enriquecimiento, mediante vortexeo mecánico. 1. Homogenizar la muestra en caldo pre-enriquecimiento previamente incubado. 2. Transferir 200 μl de la muestra en los tubos listo para utilizar con el reactivo de lisis foodproof® Short Prep II, mezclar invirtiendo el tubo, asegurando que el tubo este firmemente cerrado. 3. Centrifugar por 5 min a 8000 g. 4. Descartar el sobrenadante mediante pipeta. Posteriormente se adiciona 200 μl foodproof® Short Prep II reactivo de re suspensión. 5. Vortexear por 8 min. 6. Incubar en el bloque térmico a 95°C por 5 min. 7. Remover cuidadosamente del bloque térmico. 8. Mezclar mediante vortex. 9. Centrifugar por 1 min a 13000 g. 10. El sobrenadante ahora contiene el extracto de DNA y puede ser usado directamente para PCR.

Las condiciones de la RT-PCR fueron las mismas anteriormente mencionadas en el punto **4.1.6**. Cada muestra fue analizada simultáneamente con la técnica de RT-PCR desarrollada y la marcha microbiológica convencional.

4.2.3 Parámetros a evaluar y análisis estadístico

La determinación de selectividad se realizó de acuerdo a los conceptos propuesto por Feldsine y col., 2002 (61). Se realizaron amplificaciones de todas las muestras contaminadas con las cepas mencionadas en la **Tabla 5** y **Tabla 6** por duplicado.

Para el análisis estadístico de los resultados se utilizó el programa Win Episcopo 2.0 (test evaluación utilizando nivel de confianza del 95%. Se utilizaron las siguientes formulas probabilísticas: inclusividad (%) = $A/A+B \times 100$, exclusividad (%) = $D/C+D \times 100$, precisión analítica (%) = $A+D/A+B+C+D \times 100$, valor predictivo positivo (%) = $A/A+C \times 100$, valor predictivo negativo (%) = $D/B+D \times 100$.

4.3 Análisis de las carnicerías y obtención de las muestras

Se evaluaron un total de 110 carnicerías de la municipalidad de Berisso, Provincia de Buenos Aires. Las muestras se colectaron en el transcurso de los meses entre Octubre del 2010 y Abril del 2011, se mantuvo la trazabilidad. Se tomaron muestras de carne picada cruda, se realizó una encuesta al responsable de cada establecimiento. Esta encuesta se diseñó y se dirigió a evaluar las buenas prácticas de manufactura en cada establecimiento, como así también las buenas

prácticas de higiene (**Anexo 2**). El muestreo se realizó en colaboración con inspectores bromatológicos del Municipio de Berisso. Las muestras se remitieron al Laboratorio de Microbiología de Alimentos (FCV-UNLP) donde fueron procesadas inmediatamente. Las muestras se procesaron según parámetros y metodología recomendada por el CAA. Se trabajó para la detección de *L. monocytogenes* la norma ISO 11290-2:1996/Amd 1:2004 y la RT-PCR desarrollada y validada intra-laboratorio. Finalmente se evaluó el desempeño de la RT-PCR validada, con los resultados obtenidos.

4.4 Análisis bacteriológico

Para la detección de *L. monocytogenes* se aplicó la norma ISO 11290-2:1996/Amd 1:2004 (E) (**Figura 6**) (68). 1. Se realizó un pre-enriquecimiento de la muestra con el caldo Half Fraser (Becton, Dickinson) en una dilución 1:10 y se incubó por 24 h a 30°C, 2. Se tomó 1ml de la muestra pre-enriquecida y se pasó a un caldo de enriquecimiento Fraser (Becton, Dickinson) en tubos de 10 ml y se incubó por 24 h a 37°C, 3. Se pasó una ansada por estría de agotamiento al medio sólido ALOA (Merck), se incubó por 24 h a 37°C 4. Se seleccionó una colonia característica y se pasó por estría de agotamiento en un medio sólido Agar Trypticase de Soya (Biokar Diagnostics), se incubó por 24 h a 37°C. 5. Los aislamientos obtenidos se caracterizaron por técnicas fenotípicas mediante pruebas de tipificación bioquímica y fisiológica: SIM (Becton, Dickinson), Tinción de GRAM (Britania S.A.), Fermentación de Xilosa (Standard) y Ramnosa (Anedra), Prueba de CAMP y hemólisis).

Para la detección de *Listeria*.spp a partir del pre- enriquecimiento se utilizó la técnica de detección desarrollada y validada en el laboratorio. La extracción de ADN, la preparación de la mezcla de reacción, las condiciones de la PCR y los controles utilizados se describen en el punto **4.1.6** y **4.2.2.1**.

4.5 Análisis estadístico

Los resultados obtenidos con la técnica de RT-PCR fueron contrastadas con los resultados obtenidos en el aislamiento (**Tabla 7**). El análisis estadístico de los resultados se realizó según el punto **4.2.3**.

4.6 Capacitación a los expendedores de carne de Berisso

Se realizaron capacitaciones colectivas e individuales a los manipuladores y expendedores de las 110 carnicerías de la ciudad de Berisso. El trabajo de capacitación se realizó de manera conjunta entre la Facultad de Ciencias Veterinarias (UNLP) y la municipalidad de Berisso.

Las capacitaciones se planificaron con base en los resultados obtenidos en las visitas a los comercios expendedores de carne, en los resultados de las encuestas a los responsables de cada comercio y en análisis microbiológico de carne molida fresca para la detección y aislamiento de *L. monocytogenes*.

En las jornadas colectivas se citaron a los manipuladores de carne entre 10 y 20 comercios. Las capacitaciones consistieron en tres charlas:

- Reglamento legal nacional, provincial y local relacionado con el expendio de carne.

“Desarrollo y validación de una metodología para la detección de Listeria monocytogenes en carne picada en carnicerías de Berisso”.

- Análisis de los resultados obtenidos en el conjunto de carnicerías convocadas y medidas de intervención dirigidas a resolver los problemas identificados.

Las capacitaciones individuales consistieron en comunicar en cada establecimiento los resultados obtenidos avalados por la Facultad de Ciencias Veterinarias y la Municipalidad de Berisso. Una vez que el personal de cada carnicería tomo conocimiento del informe, se identificaron los problemas asociados a las instalaciones, a las buenas prácticas de manipulación, buenas practica de higiene, transporte de materia prima y conservación de carne. Finalmente y en base a los problemas identificados se capacito al personal y se sugirieron medidas de intervención individualizadas.

5. RESULTADOS

5.1 Desarrollo de la RT-PCR para la detección del gen *hly*.

5.1.1 Diseño de *primers* y sonda.

Las siguientes fueron las secuencias utilizadas en el *Software ABI Prism, Primer Express Versión 2.0.*, para el diseño teórico de los *primers* y la sonda:

LOCUS NC_013768 1590 bp DNA linear BCT 29-JAN-2010
DEFINITION *Listeria monocytogenes* 08-5923, complete genome.
ACCESSION [NC_013768](#) REGION: 2788545..2790134
gene complement(1..1590) /gene="hly"

LOCUS CP001604 1590 bp DNA linear BCT 16-MAR-2010
DEFINITION *Listeria monocytogenes* 08-5923, complete genome.
ACCESSION [CP001604](#) REGION: 2788545..2790134
SOURCE *Listeria monocytogenes* 08-5923

LOCUS CP001602 1590 bp DNA linear BCT 16-MAR-2010
DEFINITION *Listeria monocytogenes* 08-5578, complete genome.
ACCESSION [CP001602](#) REGION: 2821497..2823086
SOURCE *Listeria monocytogenes* 08-5578

LOCUS CP001602 1590 bp DNA linear BCT 16-MAR-2010
DEFINITION *Listeria monocytogenes* 08-5578, complete genome.
ACCESSION [CP001602](#) REGION: 2821497..2823086
SOURCE *Listeria monocytogenes* 08-5578

LOCUS NC_013768 1590 bp DNA linear BCT 29-JAN-2010
DEFINITION *Listeria monocytogenes* 08-5923, complete genome.
ACCESSION [NC_013768](#) REGION: 2788545..2790134
SOURCE *Listeria monocytogenes* 08-5923

LOCUS CP001604 1590 bp DNA linear BCT 16-MAR-2010
DEFINITION *Listeria monocytogenes* 08-5923, complete genome.
ACCESSION [CP001604](#) REGION: 2788545..2790134
SOURCE *Listeria monocytogenes* 08-5923

Los *primers* y la sonda diseñados para la detección del gen *hly* de *L. monocytogenes* fueron los siguientes:

Primer forward (List F): CACAAGTGGTAAGTTCCGGTCA

Primer reverse (List R): TTGCCAGGTAACGCGAGAAA

Sonda TaqMan: CCGTTCTCCACCATTCCCAAGC

5.1.2 Estandarización

5.1.2.1 Rango de trabajo y límite de corte.

El límite de detección para la técnica de RT-PCR desarrollada para la detección de *L. monocytogenes*, fue establecida a partir de las diferentes concentraciones bacterianas en base a cultivos puros. Los resultados fueron positivos para las 12 cepas analizadas en concentraciones de 10^3 , 10^2 y 10^1 UFC. La mezcla de reacción de PCR fue de 20 μ l de volumen final.

Para el segundo ensayo donde se evaluaron 9 cepas de *Listeria* NO *monocytogenes* (3 *Listeria seeligeri*, 3 *Listeria welshimeri*, 3 *Listeria innocua*), los resultados fueron negativos para cada una de las cepas de *Listeria* NO *monocytogenes* en concentraciones de 10^3 UFC. La mezcla de reacción de PCR fue de 20 μ l de volumen final.

Por lo tanto se consideró como límite de corte 10^2 y límite de detección 10^1 de la técnica de RT-PCR. El control positivo (*L. monocytogenes*, LaMA 732) fue utilizado a partir de una alta concentración, para una mezcla de reacción de 20 μ l. Como control negativo se utilizó la mezcla de reacción completada con agua.

5.1.2.2 Robustez

Todos los resultados fueron reproducibles con una concentración bacteriana de 10^2 UFC para una mezcla de reacción de 20 μ l, para cada una de las 12 cepas de *L. monocytogenes* en 3 días consecutivos y por 2 operadores. La técnica fue robusta, ya que no se obtuvieron resultados anómalos al introducir variables externas.

5.2 Validación intra-laboratorio de la técnica RT-PCR desarrollada a partir del caldo de pre-enriquecimiento.

5.2.1 Selectividad

Inclusividad: Se seleccionaron (N=129) muestras de carne picada, las cuales fueron contaminadas en tres concentraciones diferentes (10^3 , 10^2 , 10^1 UFC/ml) de *L. monocytogenes*, todas (N=86) presentaron señal positiva en las primeras dos concentraciones (10^3 , 10^2 UFC/ml), mientras que 6/43 (14%) no produjeron señal para la mínima concentración (10^1 UFC/ml) (**Tabla 8**). Se observó que en el ciclo donde se comenzó a evidenciar la señal de fluorescencia específica (Ct), varió dependiendo de las distintas concentraciones en las que fueron contaminadas las carnes (**Figura 7**).

Exclusividad: Se seleccionaron (N=30) muestras de carnes picada, las cuales al ser contaminadas con la mayor concentración evaluada anteriormente (10^3 UFC/ml) de cepas NO *L. monocytogenes*, no se evidencio ningún ciclo de fluorescencia específica (Ct) en la RT-PCR, por tal razón las muestras no produjeron alguna amplificación, por lo que los resultados son negativos (**Tabla 9**).

5.2.2 Análisis estadísticos para los resultados.

La RT-PCR desarrollada para la detección de *L. monocytogenes* cumplió con los siguientes parámetros: 95,35% de inclusividad, exclusividad 100%, precisión analítica (valor predictivo positivo y valor predictivo negativo) 96,23%.

5.3 Análisis de muestras de carne picada obtenidas a nivel de boca de expendio.

Se realizó un muestreo en el transcurso del tiempo que comprendió los meses entre Octubre del 2010 y Abril del 2011, se analizaron y procesaron 110 muestras de carne picada. Las cuales se procesaron según parámetros y metodología recomendada por el CAA. Se trabajó para la detección de *L. monocytogenes* la norma ISO 11290-2:1996/Amd 1:2004 y la RT-PCR desarrollada y validación intra-laboratorio. Finalmente se evaluó el desempeño de la RT-PCR validada, con los resultados obtenidos. (**Tabla 10**).

5.3.1 Detección de *L. monocytogenes* a partir de muestras de carne picada obtenidas a nivel de boca de expendio.

De un total de 110 muestras de carne picada se obtuvieron 57/110 (51,8%) fueron positivas para *L. monocytogenes* por RT-PCR desarrollada y validada intra-laboratorio, de igual manera este resultado se presentó mediante la normativa ISO 11290-2:1996/Amd 1:2004, además de algunas otras especies de *Listeria* (**Tabla 10**).

5.3.2 Procedimiento microbiológico para la detección, identificación y aislamiento de *L. monocytogenes*.

De un total de 110 muestras de carne picada, se obtuvieron 57/110 (51,8%) aislamientos mediante la metodología ISO 11290-2:1996/Amd 1:2004 de *L. monocytogenes*, por medio del uso de medios de cultivos selectivos y diferenciales, como el agar cromogénico ALOA (Merck) (**Figura 8**) y la posterior confirmación bioquímica de las colonias sospechosas.

Caracterización Bioquímica: Los 57 aislamientos de *L. monocytogenes* fueron confirmados mediante pruebas bioquímicas de azúcares, movilidad, prueba de CAMP, catalasa y tinción Gram, según la normativa ISO 11290-2:1996/Amd 1:2004.

El perfil bioquímico para las distintas especies de *Listeria* que se obtuvieron a partir del muestreo de carne picada en las diferentes carnicerías, dio como resultado la siguiente distribución de especies 57/110 (51,8%) para *L. monocytogenes* y 53/110 (48,2%).

Análisis estadístico: Se contrastó los resultados de la RT-PCR desarrollada y validada intra-laboratorio, con el método convencional de aislamientos e identificación de *L. monocytogenes* (**Figura 11**) con una especificidad del 100%.

5.4 Capacitaciones a los manipuladores de carne de los comercios analizados para prevenir la presencia de microorganismos patógenos.

En el **Anexo 3** se muestran los resultados obtenidos de las encuestas realizadas en cada carnicería previa a la toma de muestra. Entre los problemas relacionados con la comercialización de la carne, el 91/110 (82,7%) de las carnicerías tiene la documentación que avala la procedencia de la misma y solo el 26/110 (23,6%) de las carnicerías tritura la carne en el momento de la venta. Cabe destacar dentro de los problemas relacionados con las características edilicias se encontró que el 94/110 (85,5%) de las carnicerías posee baño, 35/110 (31,8%) tienen ante baño y en el 25/110 (22,7%) el baño contacta con el lugar de expendio. En cuanto a la higiene de las carnicerías ninguna cuenta con un procedimiento de sanitización estandarizado y solo el 24/110 (21,8%) tiene agua caliente. De la inspección visual realizada por el inspector municipal se demostró que el lavado de manos de los carniceros fue insuficiente en el 108/110 (98,2%) y la sanitización general del comercio fue insuficiente en el 105 (95,5%).

Se realizaron cuatro jornadas de capacitación colectiva a las que se invitó al personal de los comercios participantes. En total se capacitaron 167 manipuladores y expendedores de carne correspondiente a las 110 carnicerías. Estas capacitaciones se basaron en explicar la legislación vigente para luego abordar los problemas identificados en las encuestas en ese grupo de carnicerías. El análisis de los resultados asociado a la importancia de las ETA género que una mayor predisposición a la concientización por parte de los manipuladores y expendedores de carne.

“Desarrollo y validación de una metodología para la detección de Listeria monocytogenes en carne picada en carnicerías de Berisso”.

Una vez identificado claramente el problema se aportaron pautas para mejorar la trazabilidad de la carne, los hábitos de manipulación de carne, se describieron buenas prácticas de manufactura (BPM), procedimientos estandarizados de sanitización (POES) y el manejo integrado de plagas (MIP). A cada participante se le entregó material impreso para evacuar dudas y una lista de proveedores de desengrasantes, desinfectantes y equipamiento de carnicería en la zona de Berisso para que puedan consultar.

En una segunda etapa se realizó una capacitación individualizada en cada uno de los 110 comercios participantes. La misma consistió en observar y sugerir medidas para intervención tendientes a corregir los problemas identificados para cada caso particular.

6. DISCUSION

6.1 RT-PCR desarrollada y validad intra-labratorio.

En este trabajo se desarrolló, estandarizo y valido un protocolo para la rápida detección de *L. monocytogenes* en carne picada, minimizando la cantidad de tiempo utilizado en el método convencional (8 días aproximadamente) a tan solo 24 h, por lo cual representa una gran ventaja para una rápida detección de este microorganismos patógeno y una herramienta importante para los laboratorios de diagnóstico de patógenos, como para la industria. Además de detectarlo con una carga microbiana baja ($10^2 - 10^1$ UFC).

En cuanto a la reproducibilidad y especificidad de la técnica se obtuvo un 100% de efectividad para la identificación de *L. monocytogenes* mediante el gen *hly* (**Tabla 2, Tabla 4**). 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. Estos resultados coinciden con los estudios realizados G. Duffy y col (69) en el cual evaluó la especificidad del *primer* de Listerosilisina O contra una seria de *Listerias* spp., en caldos de cultivo. Se estableció que todos los serotipos de *L. monocytogenes* examinados arrojaron una banda 520 pb. Ninguna de las otras especies de *Listeria* investigadas, incluyendo *L. innocua*, *L. ivanovii*, *L. seeligeri*, *L. welshimeri*, *L. grayi* y *L. murrayi* produjo un

“Desarrollo y validación de una metodología para la detección de *Listeria monocytogenes* en carne picada en carnicerías de Berisso”.

producto de PCR detectable en la región de 520 pb. Lo que concuerda con la puesta punto de la RT-PCR desarrollada ya que tiene la misma especificidad que la PCR convencional anteriormente evaluada. El *primer* fue diseñado partiendo del mismo gen (*hly*), esto implica la obtención de resultados en un tiempo aún más corto por la técnica y más amigable con el operador, con la misma especificidad para la detección de *L. monocytogenes*.

Los resultados obtenidos en cuanto la evaluación de parámetros como rango de Trabajo, selectividad y robustez, fueron satisfactorios. Con un rango de trabajo bastante bajo 10^2 UFC, una inclusividad del 95,35%, exclusividad del 100% y precisión analítica del 96,23%. Resultados que concuerdan con el estudio de validación para una PCR múltiple de *Listeria monocytogenes* realizado por Poutou y col (70). Donde 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-info6.0d) encontrado en carne de res por PCR tras enriquecimiento de 24 h reportó una proporción de detección del 100%, para 10^2 UFC/g ($p=0.0026$). El valor predictivo positivo obtenido para el método alternativo, indicó que existe una confiabilidad del 100% para detectar las muestras positivas que realmente contienen el analito.

Los descensos en el porcentaje de inclusividad y la precisión analítica se debieron a que algunas carnes contaminadas con una concentración mínima de UFC (10^1), las cuales en una menor proporción no pudieron ser detectadas por la técnica. De igual forma es un margen muy pequeño de muestras sin detectar, ya que tan solo 6/43 (13,95%) con la mínima concentración de UFC de las carnes

“Desarrollo y validación de una metodología para la detección de *Listeria monocytogenes* en carne picada en carnicerías de Berisso”.

contaminadas, no pudieron ser detectadas mediante la RT-PCR desarrollada y validada. Lo cual corrobora que la técnica desarrollada y validada intra-laboratorio tiene un alto espectro en cuando a las concentraciones en las que se podría detectar este patógeno.

La puesta a punto de una técnica y su validación para el análisis de alimentos no es un trabajo fácil, tal como lo reporta Amagliani, G y col (71), el cual hace referencia a que una de las principales limitación asociada con la aplicación de PCR a los microorganismos que contaminan los alimentos se refiere a la presencia de sustancias inhibidoras que son extraídos simultáneamente con ADN y puede estar presente en la muestra, causando un fallo en la reacción de amplificación que conduce a un falso negativo resultados. Por lo tanto, la calidad y la pureza de los ácidos nucleicos extraídos son los requisitos principales para una detección basada en PCR ensayo y la selección de un método de extracción adecuado es determinante para un análisis acertado y válido de la PCR.

Algunos problemas para la puesta punto de la RT-PCR desarrollada y validada fue la evaluación de distintas master mix y la utilización de la extracción y purificación de ADN mediante Kit comercial. Esto pudo pasar debido en gran medida a la cantidad de inhibidores que tiene el caldo Fraser en su composición. Algunos caldos de enriquecimientos pueden ser tolerados, incluso cuando se añaden directamente a la mezcla de PCR. Otros componentes químicos de medios de cultivo como el citrato férrico de amonio, las sales biliares, la esculina y la acriflavina requieren una dilución previa (1/10 – 1/50) para no inhibir la reacción. Los detergentes iónicos también pueden tener efectos inhibitorios (72). Ya que *L.*

“Desarrollo y validación de una metodología para la detección de *Listeria monocytogenes* en carne picada en carnicerías de Berisso”.

monocytogenes es un muy mal competidor frente a otras bacterias y necesita en gran medida de componentes nutricionales e inhibidores de flora bacteriana diferentes a *Listeria* para garantizar su crecimiento. El crecimiento en otros caldos como el BPW no es tan efectivo como lo es con el Caldo Fraser o distintos caldos diseñados exclusivamente para el enriquecimiento de esta bacteria, ya que es mucho más selectivo por el número de antibióticos y elementos nutricionales que tiene en su composición como el citrato férrico de amonio entre otros. Esto implica que al momento de extraer y purificar el ADN no es factible utilizar metodologías caseras de extracción de DNA, y depender de los kit de extracción comerciales, los cuales son de un alto costo, pero permiten la extracción y purificación adecuada del DNA para este tipo de caldos de cultivos con tantos elementos que pueden llegar a inhibir la PCR. Los métodos de extracción caseros pueden usarse después de haberse aislado el microorganismo y tenerlo en cultivo puro, por lo cual la RT-PCR puede funcionar también como tamizaje, pero de este modo se estaría ampliando el espacio de tiempo el cual se estaría ganando en el análisis partiendo desde el caldo de pre-enriquecimiento, aunque la extracción por kit comercial desde el punto de vista económico no sea muy rentable, en cuanto al ahorro del tiempo y una rápida detección si puede ser mucho más efectiva. Un método rápido y simple para eliminar inhibidores de la ADN-Polimerasa según Walsh y col. (73), es la utilización de Chelex® 100, una resina quelante que tiene una gran afinidad por los iones metálicos polivalentes. Esta resina también tiene un efecto protector del DNA, ya que quela los iones metálicos que catalizan la

ruptura del ácido nucleico (74). También se ha observado una mejora de la lisis de bacterias gram-positivas con la utilización de Chelex® 100.

Otro de los inconvenientes en la puesta a punto de la RT-PCR desarrollada y validada intra-laboratorio estuvo en la adición del control interno de amplificación, ya que los IAC provenientes de plásmidos son muy dispendiosos al momento de sus aislamientos y dilución, además de la inestabilidad que presenta en el momento trabajar con estos. Además por cuestiones de tiempo no se pudieron realizar más ensayos para ponerlos a punto y darle una mayor solides a la RT-PCR, se consideró que los resultados obtenidos sin el IAC son óptimos y confiables, aunque se sugiere para investigaciones posteriores, poner a punto para una mayor solidez y confiabilidad, el control interno de amplificación.

6.2 Detección de *L. monocytogenes* en carne picada, a nivel de boca de expendio.

En este trabajo se analizaron muestras de carne picada de 110 carnicerías en la ciudad Berisso. Se utilizó para la detección de *L. monocytogenes* en la carne una RT-PCR desarrollada y validada intra-laboratorio a partir del caldo de pre-enriquecimiento en las muestras analizadas, y la metodología convencional ISO 11290-2:1996/Amd 1:2004, recomendada por los estándares internacionales para la detección, aislamiento e identificación de este patógeno alimentario.

Los resultados obtenidos mediante el uso de estas dos metodologías fueron muy equivalentes (**Tabla 10**) tanto para la RT-PCR desarrollada y validada como por el método convencional, con una alta tasa de prevalencia de este

“Desarrollo y validación de una metodología para la detección de *Listeria monocytogenes* en carne picada en carnicerías de Berisso”.

microorganismo patógeno en las carnicerías, resultado que concuerdan con el estudio realizado por Michelena (10) donde se analizaron 991 muestras de productos cárneos y lácteos, procedentes de establecimientos elaboradores y bocas de expendio en la Provincia de Buenos Aires para la identificación de microorganismos indicadores de higiene, entre los cuales el de mayor frecuencia en los establecimiento correspondió a *L. monocytogenes*. Igualmente de las grandes deficiencias halladas en cuanto las condiciones higiénicas que tuvieron los establecimientos, la aparición de esta bacteria podría explicarse también a que este microorganismo es de carácter ubicuo en el ambiente, tal como lo han reportado distintos autores, y está presente en bajo número en muchos alimentos. Además de encontrarse otros géneros *Listeria* en los aislamientos que en algunos casos esporádicos se ha reportado ser perjudiciales para el ser humano, los cuales se tienen que tener en alguna medida en caso de un alto recuento o en la trazabilidad de un alimento sospechoso de no ser inocuo.

La extracción de DNA mediante el kit comercial de extracción es una técnica rápida, de fácil uso y amigable con el analista, además de la obtención de un DNA de alta pureza y sin interferente para su posterior identificación. A pesar de ser una metodología bastante costosa, en la industria para la obtención de resultados a un corto plazo resulta ser muy adecuada para el uso de esta RT-PCR desarrollada y validada intra-laboratorio por la rápida identificación del patógeno, en comparación a la metodología convencional, ya que en tan solo 24 h se podría tener un resultado para la detección de *L. monocytogenes* en este tipo de matrices alimentarias. Una de las recomendaciones para optimizar los recursos en cuanto

la utilización de esta técnica de detección desarrollada, sería la puesta a punto de un método de extracción casera que purifique adecuadamente el DNA y permite la no acción de los interferente que inhiban la amplificación del DNA, ya que esta metodología bajaría ostensiblemente los costó en comparación del uso del kit comercial.

6.3 Capacitación de los manipulares de las carnicerías para prevenir la presencia de *L. monocytogenes* en la carne picada.

En alimentos, la relación microorganismos patógenos y enfermedad producida, es en esencia el principal problema para la salud pública, debido al contacto y posterior ingesta de los mismos. Diversos factores son tenidos en cuenta para considerarlo un problema de alto impacto en la población, el surgimiento de nuevas formas de transmisión, el aumento de población vulnerable y el impacto social y económico que ocasionan. Por lo tanto obliga a evaluar las técnicas de producción junto a la manipulación de alimentos para así ejercer un óptimo control de calidad en las distintas fases de la cadena de consumo.

La carne y sus derivados al ser uno de los principales grupos alimenticios en lo humanos, también es vehículo de un elevado grupo de microorganismo patógenos, entre los cuales se encuentra *L. monocytogenes*. La ingestión de derivados cárnicos o carne sin un adecuado tratamiento térmico de cocción, es la forma fundamental de cómo esta bacteria infecta la población humana.

Por este motivo se debe considerar de carácter obligatorio que en el código alimentario argentino, la *L. monocytogenes* sea considerada como parámetro de

“Desarrollo y validación de una metodología para la detección de *Listeria monocytogenes* en carne picada en carnicerías de Berisso”.

criterio obligatorio para muchas categorías de alimentos y en particular para los alimentos de origen animal. Teniendo como precedentes normativas latinoamericanas como la Peruana, países centroamericanos, o países los cuales tiene una legislación mucho más exigente respecto a *L. monocytogenes*, como es el caso de EE.UU., Japón, Canadá (**Anexo 1**) que establece tolerancia cero, para este microorganismo (75, 76, 77).

En el artículo 255 del CAA (78) se especifica que la carne picada debe prepararse en presencia del interesado, salvo aquellos casos en que por la naturaleza de los establecimientos o volumen de las operaciones sean autorizados expresamente, por la autoridad competente. Sin embargo en Argentina no se establece la búsqueda de bacterias patógenas para el consumidor en las superficies que contactan con la carne (58).

Otro de los factores de riesgo a nivel de boca de expendio de los productos cárnicos es que en las carnicerías además de las carnes, es frecuente comercializar fiambres y quesos que no sufren un proceso de cocción, por lo tanto es importante considerar la posibilidad de contaminación cruzada de estos productos a partir de la carne bovina. Además, los quesos y los chacinados si tienen criterios microbiológico que incluye *L. monocytogenes*, (**Anexo 2**) según la RESOLUCIÓN GMC N° 069/93 y el artículo 302 (CAA) (79), por lo cual en caso de una contaminación cruzada y una adecuada trazabilidad de los productos, incluir un criterio microbiológico como *L. monocytogenes* en la carne picada se hace necesarios para un control adecuado en un mismo establecimiento que comercializa distintos productos.

“Desarrollo y validación de una metodología para la detección de Listeria monocytogenes en carne picada en carnicerías de Berisso”.

La carne picada es una de las formas más comunes de consumo en la sociedad argentina. Debido al proceso secundario que lleva este producto en la picadora, se eleva el nivel de manipulación del mismo y junto con este, la probabilidad de contaminaciones cruzadas en el mismo. De tal manera, la formación del personal encargado de la manipulación de la carne debe girar en torno al uso de técnicas que permitan una buena higiene tanto personal como de los elementos utilizados para llevar a cabo el proceso. Es allí donde la supervisión del estado debe ser total para garantizar la inocuidad de la carne de alto consumo público.

En la ciudad de Berisso no se realiza el análisis de carne picada que se comercializa en las bocas de expendio minorista y es por ello que hasta la fecha no se realizaron estudios sistemáticos que permitan detectar los riesgos y puntos críticos de control en el proceso de triturado y envasado.

Un factor común entre las carnicerías evaluadas que facilita la labor en cuanto un seguimiento de la trazabilidad de la carne es que en su gran mayoría 91/110 (82,7%) de las carnicerías posee los documentos correspondientes para determinar el origen de la carne, pero se hace necesario que en su totalidad cumplan con este requisito para un adecuado control en cuanto al expendio de carne y su procedencia. Según el artículo 255 del CAA, solo el 26/110 (23,6%) de las carnicerías adelanta el proceso de triturado en el momento de la venta. Si se tiene en cuenta la higiene general de las carnicerías, todas carecen de un proceso de sanitización estandarizado y solo el 24/110 (21,8%) posee agua caliente; el chequeo general realizado por el inspector municipal, muestra que en cuanto al

“Desarrollo y validación de una metodología para la detección de Listeria monocytogenes en carne picada en carnicerías de Berisso”.

lavado de manos el 108/110 (98,2%) resulto insuficiente, mientras el 105/110 (95,5%) indico que la sanitización general del comercio también fue insuficiente (**Anexo 3**). Según estos resultados se observa principalmente una falta de presión de los entes de control y un poco conciencia de los manipuladores y expendedores del producto, bien sea por desconocimiento de las BPM o por simple falta de responsabilidad en la ejecución de su trabajo.

Con base en los resultados obtenidos a nivel de boca de expendio, la facultad de ciencias veterinarias (UNLP) y el municipio de la ciudad de Berisso, plantearon la realización de un trabajo colaborativo denominado “Carnicerías Saludables” que contribuye al conocimiento de los puntos críticos en las etapas de triturado y envasado de la carne picada, así como de la implementación de estrategias de prevención y control por medio de la capacitación del personal implicado en dicha tarea, a través del estudio de la calidad microbiológica de la carne picada destinada al consumo interno.

Las BPM son el camino a seguir para educar y concientizar tanto a los proveedores como a los manipuladores del papel preponderante que ellos desempeñan en cuanto a la calidad e inocuidad del producto que ellos manipulan. Las bases de una correcta manipulación aseguran mínimas pérdidas tanto económicas como sociales que el producto puede causar. Teniendo esto presente se brindó capacitación de las BPM a todos los involucrados en el proceso por medio charlas dirigidas a resolver los problemas identificados en las carnicerías de Berisso, teniendo siempre como objetivo principal la concientización de los participantes.

“Desarrollo y validación de una metodología para la detección de Listeria monocytogenes en carne picada en carnicerías de Berisso”.

Al ser un estudio de línea base, se recomienda el monitoreo constante de las variables para evidenciar adelantos o retrocesos que pueda sufrir los establecimiento evaluados en este proyecto. Teniendo en cuenta que el objetivo es el garantizar la inocuidad y la calidad del alimento para el consumo.

7. CONCLUSIONES

- Se desarrolló, validó y estandarizó en una etapa intra-laboratorio una RT-PCR para la detección de *L. monocytogenes* de manera rápida, precisa y confiable.
- Se estimó en las 110 carnicerías la prevalencia de *L. monocytogenes* en la carne picada a nivel de boca de expendio, mediante la técnica RT-PCR desarrollada y validada intra-laboratorio y la metodología convencional ISO 11290-2:1996/Amd 1:2004. Obteniendo una proporción de 57/110 (51,8%) de prevalencia de este microorganismo patógeno.
- La RT-PCR desarrollada y validada puede ser de gran ayuda para los laboratorios de diagnóstico y para la industria, debido a su fácil manejo y rapidez, confiabilidad en el resultado (24 h), como prueba de tamizaje a partir del caldo de pre-enriquecimiento. El desarrollo de la técnica podría mejorar mediante el estudio de una metodología más rentable de extracción y la implementación de un control interno de amplificación.
- Se sugiere el análisis de la carne picada no como una matriz aislada, sino como un elemento que hace parte de un ambiente, para así prevenir contaminaciones cruzadas con alimentos susceptibles de contaminación para este patógeno y de consumo en fresco.

“Desarrollo y validación de una metodología para la detección de Listeria monocytogenes en carne picada en carnicerías de Berisso”.

- Se identificó los principales problemas sanitarios a nivel de boca de expendio y se capacitaron a todos los manipuladores de carne la ciudad de Berisso para minimizar el riesgo transmisión de *L. monocytogenes* a través de la carne picada.

8. REFERENCIAS

1. **ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD (OMS).** Estrategia global de la OMS para la inocuidad de los alimentos. Octava sesión plenaria. Clasificación NLM: WA 695: Pags. 5-14. 2002.
2. **FOOD AND DRUG ADMINISTRATION, CENTER FOR FOOD SAFETY AND APPLIED NUTRITION, USDA/FOOD SAFETY AND INSPECTION SERVICE, CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION.** Draft assessment of the relative risk to public health from foodborne *Listeria monocytogenes* among selected categories of ready- to-eat foods. Interpretative summary pags 1-24, 2001.
3. **MUÑOZ, A.I., DÍAZ, G.** Listeriosis. Santafé de Bogotá: INVIMA; pag. 64. OMS para la inocuidad de los alimentos. Octava sesión plenaria. Clasificación NLM: WA 695 pags 5-14. 1998.
4. **WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO).** Food borne listeriosis. WHO Working group. Bull World Health Organ; 66: Pags 421-428. 1988.
5. **ROCOURT, J.** Risk factors for listeriosis. Food Control; 7: Pags195-202. 1996.
6. **MUÑOZ, A.L., VARGAS, M., OTERO, L., DÍAZ, G., GUZMÁN, V.** Presencia de *Listeria monocytogenes* en alimentos listos para el consumo, procedentes de plazas de mercado y delicatessen de supermercados de cadena, Bogotá, D.C, 2002-2008. Biomedica. Pags. 428-439. 2011.

7. **KAEFERSTEIN, F., ABDUSSALAM, M.** La inocuidad de los alimentos en el siglo XXI. Boletín de la Organización Mundial de la Salud. 77 (4): Pags 347-351. 2001.
8. **BROOME, C.V., GELLIN, B., SCHWARTZ, B.** Epidemiology of listeriosis in the United States. Págs. 61–65, en: A.J. Miller, J.L. Smith y G.A. Somkuti (eds.). *Foodborne Listeriosis*. Nueva York, Estados Unidos, Elsevier Science Pub. Roberts, T. y Pinner, R. 1990. Economic impact of disease caused by *L. monocytogenes*. Págs. 137–149; en: Miller, Smith y Somkuti, 1990, q.v. 1990.
9. **SILVIA MICHANIE.** *Listeria monocytogenes* la bacteria emergente de los 80. Ganado y carnes. 2004.
10. **MICHELENA.** Producción segura de cárneos y lácteos. Análisis de la contaminación. (Tesis de Maestría en Salud Pública Orientación Sistemas de Salud). La Plata: Laboratorio Central de Salud Pública de la Provincia de Buenos Aires; 2008.
11. **MCLAUHLIN, J.** Human listeriosis in Britain, 1967 – 1985, a summary of 722 cases. 2. Listeriosis in non-pregnant individuals, a changing of infection and seasonal incidence. *Epidemiol Infect.* 104: Pags 191–201; 1990.
12. **DALTON, C.B., AGUSTIN, C.C., SOBEL, J., HAYES, P.S., BIBB, W.F., GRAVES, L.M., SWAMINATHAN, B., PROCTOR, M.E., GRIFFIN, P.M.,** An outbreak of gastroenteritis and fever due to *Listeria monocytogenes* in milk. *N Engl J Med.* 336: Pags. 100 – 105; 1997.
13. **LINNAN, M.J., MASCOLA, L., LOU, X.D., GOULET, V., MAY, S., SALMINEN, C., HIRD, D.W., YONEKURA, M.L., HAYES, P., WEAVER, R.,**

- AUDURIER, A., PLIKAYTIS, B.D., FANIN, S.L., KLEKS, A., BROOME, C.V.** Epidemic listeriosis associated with Mexican-style cheese. *N Engl J Med.* 319: Pags 823–828. 1988.
14. **FARBER, J.M., PETERKIN, P.I.** *Listeria monocytogenes*, a food-borne pathogen. *Microbiol Rev.* 55: Pags 476–511. 1991.
15. **KLATT, E.C., PAVLOVA, Z., TEBERG, A.J., YONEKURA, M.L.** Epidemic neonatal listeriosis at autopsy. *Hum Pathol.* 17: Pags 1278–1281. 1986.
16. **FARBER, J.M., PETERKIN, P.I., CARTES, A.O., VARUGHESE, P.V., ASHTON, F.E., EWAN, E.P.** Neonatal listeriosis due to cross-infection confirmed by isoenzyme typing and DNA fingerprinting. *J Infect Dis.* 163: Pags 927-928. 1991.
17. **LORBER, B.** Listeriosis. *Clin Infect Dis.* 24: Pags 1 – 11. 1996.
18. **BLENDEN, D.C., KAMPELMACHER, E.H., TORRES-ANJEL, M.J.** Listeriosis. *J Am Vet Med Assoc.* 191: Pags 1546–1551. 1987.
19. **AURELI, P., FIORUCI, G.C., CAROLI, D., MARCHIARO, G., NOVARA, O., LEONE, L., SALMASO, S.** An outbreak of fabrile gastroenteritis associated with corn contaminated by *Listeria monocytogenes*. *N Engl J Med.* 342 Pags 1236-241. 2000.
20. **DUSSURGET, O., PIZARRO-CERDA, J., COSSART, P.** Molecular determinants of *Listeria monocytogenes* virulence. *Annu Rev Microbiol;* 58: Pags 587-610. 2004.
21. **VAZQUEZ-BOLAND, J.A., KUHN, M., BERCHE, P., CHAKRABORTY, T., DOMINGUEZ-BERNAL, G., GOEBEL, W.** *Listeria* pathogenesis and

- molecular virulence determinants. Clin Microbiol Rev; 14: Pags 584-640. 2001.
22. **BRAUN, L., DRAMSI, P., DEHOUX, P., BIERNE, H., LINDAHL, G., COSSART, P.** InlB: an invasion protein of *Listeria monocytogenes* with a novel type of surface association. Mol Microbiol; 25: Pags 285-94. 1997.
23. **LECUIT, M., VANDORMAEL-POURNIN, S., LEFORT, J., HUERRE, M., GOUNON, P., DUPUY, C.** A transgenic model for listeriosis: role of internalin in crossing the intestinal barrier. Science; 292: Pags 1722-1725. 2001.
24. **PIZARRO-CERDA, J., COSSART, P.** Subversion of cellular functions by *Listeria monocytogenes*. J Pathol; 208: Pags 215-223. 2006.
25. **SUAREZ, M., GONZALEZ-ZORN, B., VEGA, Y., CHICO-CALERO, I., VAZQUEZ-BOLAND, J.A.** A role for ActA in epithelial cell Invasion by *Listeria monocytogenes*. Cell Microbiol; 3: Pags 853-864. 2001.
26. **KAYAL, S., CHARBIT, A.** Listeriolysin O: a key protein of *Listeria monocytogenes* with multiple functions. FEMS Microbiol Rev; 30: Pags 514-529. 2006.
27. **MENGAUD, J., VICENTE, M.F., COSSART, P.** Transcriptional mapping and nucleotide sequence of the *Listeria monocytogenes hlyA* region reveal structural features that may be involved in regulation. Infect Immun; 57: Pags 3695-3701. 1989.
28. **GONZALEZ-ZORN, B., DOMINGUEZ-BERNAL, G., SUAREZ, M., RIPIO, M.T., VEGA, Y., NOVELLA, S.** The smcL gene of *Listeria ivanovii* encodes a

- sphingomyelinase C that mediates bacterial escape from the phagocytic vacuole. *Mol Microbiol*; 33: Pags 510–523. 1999.
29. **GONZALEZ-ZORN, B., DOMINGUEZ-BERNAL, G., SUAREZ, M., RIPIO, M.T., VEGA, Y., NOVELLA, S.** SmcL, a novel membrane-damaging virulence factor in *Listeria*. *Int J Med Microbiol*; 290: Pags 369-374. 2000.
30. **VÁZQUEZ-BOLAND, J.A., KOCKS, C., DRAMSI, S., OHAYON, H., GEOFFROY, C., MENGAUD, J.** Nucleotide sequence of the lecithinase operon of *Listeria monocytogenes* and possible role of lecithinase in cell-to-cell spread. *Infect Immun*; 60: Pags 219-230. 1992.
31. **YEUNG, P.S., ZAGORSKI, N., MARQUIS, H.** The metalloprotease of *Listeria monocytogenes* controls cell wall translocation of the broad-range phospholipase C. *J Bacteriol*; 187: Pags 2601-2608. 2005.
32. **RIPIO, M.T., BREHM, K., LARA, M., SUAREZ, M., VAZQUEZ-BOLAND, J.A.** Glucose-1-phosphate utilization by *Listeria monocytogenes* is PrfA dependent and coordinately expressed with virulence factors. *J Bacteriol*; 179: Pags 7174 - 7180. 1997.
33. **CHICO-CALERO, I., SUAREZ, M., GONZALEZ-ZORN, B., SCORTTI, M., SLAGHUIS, J., GOEBEL, W.** Hpt, a bacterial homolog of the microsomal glucose-6-phosphate translocase, mediates rapid intracellular proliferation in *Listeria*. *Proc Natl Acad Sci USA*; 99: Pags 431–436. 2002.
34. **GOETZ, M., BUBERT, A., WANG, G., CHICO-CALERO, I., VAZQUEZ-BOLAND, J.A., BECK, M.** Microinjection and growth of bacteria in the cytosol of mammalian host cells. *Proc Natl Acad Sci USA*; 98: Pags 1221-1226. 2001.

35. **SCORTTI, M., LACHARME-LORA, L., WAGNER, M., CHICO-CALERO, I., LOSITO, P., VAZQUEZ-BOLAND, J.A.** Coexpression of virulence and fosfomicin susceptibility in *Listeria*: molecular basis of an antimicrobial in vitro-in vivo paradox. *Nat Med*; 12: Pags 515-517. 2006.
36. **COSSART, P., MENGAUD, J.** *Listeria monocytogenes*. A model system for the molecular study of intracellular parasitism. *Mol Biol Med*; 6: Pags 463-474. 1989.
37. **GRAVES, L.M., HELSEL, L.O., STEIGERWALT, A.G., MOREY, R.E., DANESHVAR, M.I., ROOF, S.E., ORSI, R.H., FORTES, E.D., MILILLO, S. R., DENBAKKER, H.C., WIEDMANN, M., SWAMINATHAN, B., SAUDERS, B.D.** *Listeria marthii* sp. nov., isolated from the natural environment, Finger Lakes National Forest. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 60: Pags 1280–1288. 2010.
38. **LECLERCQ, A., CLERMONT, D., BIZET, C., GRIMONT, P. A. D., LE FLÈCH E-MATÉOS, A., ROCHE, S. M., BUCHRIESER, C., CADET-DANIEL, V., LE MONNIER, A., LECUIT, M., ALLERBERGER, F.** *Listeria rocourtiae* sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 60: Pags 2210–2214. 2010.
39. **RALOVICH, B., EMÖDY, L., MERÖ, E.** Biological properties of virulent and avirulent *Listeria monocytogenes* strains. *Acta Microbiol. Acad. Sci. Hung.* 19: Pags 323-326. 1972.
40. **ROCOURT, J. GRIMONT, P.A.D.** *Listeria welshimeri* sp. nov. and *Listeria seeligeri* sp. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 33: Pags 866-869. 1983.

41. **SEELIGER, H.P.R.** Nonpathogenic *Listeriae*: *L. innocua* sp. n. (Seeliger et Schoofs, 1977). *Zentralbl. Bakteriolog. Parasitenkd. Infectiolog. Abt. 1 Orig. Reihe A* 249: Pags 487-493. 1981.
42. **FARBER, J.M., PETERKIN, P.I.** *Listeria monocytogenes*, a Food-Borne Pathogen. *Microbiol. Rev.* 55 (3): Pags 476-511. 1991.
43. **SEELIGER, H.P.R., JONES, D.** The genus *Listeria*. Balows, A., H. G. M. Dworkin, W. Harder, K.H. Schleiser (Ed). En the prokaryotes. A handbook on the biology of bacteria: edophydiology, isolation, identification, and applications. 2a edition. Springer-berlang. New York. Pags1595-1616. 1992.
44. **SCHUCHAT, A., WAMNATHAN, B., BROOME, C.V.** Epidemiology of human listeriosis. *Clin Microbiol Rev*; 4: Pags 169-183. 1991.
45. **ORGANIZACION MUNDIAL DE SANIDAD ANIMAL (OIE).** Manual de la OIE sobre animales terrestres, Capitulo 2,10,14 *Listeria monocytogenes*; Pags 1222–1237. 2004.
46. **HITCHINS, A.D.** *Listeria monocytogenes*. En: Bacteriological Analytical Manual, US Food and Drug Administration, AOAC INTERNATIONAL, Gaithersburg, MD, EE.UU., Pags 10.01–10.11. 1998.
47. **AOAC OFFICIAL METHOD 993.12.** *Listeria monocytogenes* in Milk and Dairy Products. Selective Enrichment and Isolation Method. Official Methods of Analysis of AOAC INTERNATIONAL. En: Official Methods of Analysis of AOAC INTERNATIONAL, Volumen I, Agricultural Chemicals; Contaminants; Drugs, Horwitz W., ed. AOAC INTERNATIONAL, Gaithersburg, MD, EE.UU., Pags 138–141. 2000.

48. INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION (ISO).

Microbiology of food and animal feeding stuffs – Horizontal method for the detection and enumeration of *Listeria monocytogenes* – Part 1: Detection method. International Standard ISO 11290-1, Geneva, Switzerland. 1996.

49. INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION (ISO).

Microbiology of food and animal feeding stuffs – Horizontal method for the detection and enumeration of *Listeria monocytogenes* – Part 2: Enumeration method. International Standard ISO 11290-2, Geneva, Suiza. 1998.

50. AFNOR¹. Norme Française NF V 08-055. Microbiologie des aliments.

Recherche de *Listeria monocytogenes*. Méthode de Routine. Paris, Francia. 1997.

51. ASSOCIATION FRANÇAISE DE NORMALISATION (AFNOR). Normalisation

Française XP V 08-062. Microbiologie des aliments. Méthode de dénombrement de *Listeria monocytogenes*. Méthode de Routine. Paris, Francia. 2000.

52. GRAY, M.L., STAFSETH, J., THORP, JR. F., SHOLL, L.B., RILEY, W.F. A

new technique for isolating *Listerellae* from the bovine brain. J. Bacteriol., 55, Pags 471–476. 1948.

53. NORTON, D.M. Polymerase chain reaction-based methods for detection of

Listeria monocytogenes: toward real-time screening for food and environmental samples. J. AOAC Int., 85 (2), Pags 505–515. 2002.

54. **WALKER, R.L.** *Listeria*. En: Veterinary Microbiology, Hirsh D.C. & Zee Y.C., eds. Blackwell Science, Malden, Massachusetts, EE.UU., Pags 225–228. 1999.
55. **ELD, K., DANIELSSON-THAM, M.L., GUNNARSSON, A. THAM, W.** Comparison of a cold enrichment method and the IDF method for isolation of *Listeria monocytogenes* from animal autopsy material. Vet. Microbiol., 36: Pags 185–189. 1993.
56. **UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE – FOOD SAFETY AND INSPECTION SERVICE (FSIS).** Isolation and Identification of *Listeria monocytogenes* from Red Meat, Poultry, Egg and Environmental Samples, Revision 03, April 29, 2002. En: Microbiology Laboratory Guidebook On Line, <http://www.fsis.usda.gov/OPHS/microlab/mlgbook.htm>, MLG 8.03. Pags 1–20. 2002.
57. **ANDREWS, W.** Current State of Conventional Microbiological Methodology for the Examination of Food. In: Workshop 102–15. Microorganisms in Foods: Now What? American Society for Microbiology, Washington, DC, USA. 2002.
58. **LEOTTA, G.A.** Validación de una técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para la detección de *Escherichia coli* productor de toxina shiga en alimentos cárnicos. Tesis de maestría. Universidad Nacional de San Martín. 2006.
59. **LEOTTA, G.A., COPES, J., ALIVERTI, V., ALIVERTI, F., BRUSA, V., PACHECO, S., ORTEGA, E., DE LA TORRE, J.H., LIRON, J.P.** Manual de métodos rápidos para la detección, caracterización y subtipificación de

patógenos bacterianos presentes en alimentos. Curso Métodos Rápidos. Maestría en Tecnología e Higiene de Alimentos. Universidad Nacional de La Plata. 2011.

60. **TRULLOLS, E., RUISÁNCHEZ, I., RIUS, X.** Validation of qualitative analytical methods. *Trends in Analytical Chemistry*; 23: Pags137-145. 2004.
61. **FELDSINE, P., ABEYTA, C., ANDREWS, W.** AOAC International Methods Committee Guidelines for Validation of Qualitative and Quantitative Food Microbiological Official Methods of Analysis. *J. AOAC Internat.* 85: Pags1187-1200. 2002.
62. **NORDVAL C/O DEPARTMENT OF MICROBIAL FOOD SAFETY DANISH INSTITUTE FOR FOOD AND VETERINARY RESEARCH VALIDATION.** Protocol for the validation of alternative microbiological methods. NV-DOC.D-2004-01-01. Morkhoj Bygade 19 DK-1860 Soborg Denmark. 2004.
63. **ORGANISMO ARGENTINO DE ACREDITACIÓN.** Guía para validación de métodos de ensayo. Código DC-LE-05: Pags 1-16. 2003.
64. **RED NACIONAL DE LABORATORIOS OFICIALES DE ANALISIS DE ALIMENTOS (ReNaLOA).** Análisis microbiológico de los alimentos – Metodología analítica oficial. Vol 1: Pags 101–102. 2011.
65. **ICMSF.** Microorganisms in Food, Microbiological Specifications of Food Pathogens. Chapter 8, *Listeria monocytogenes*. Pag 141. 1996.
66. **CAC/GL.** Directrices sobre la Aplicación de Principios Generales de Higiene de los Alimentos para el Control de *Listeria monocytogenes* en los Alimentos. 2007.

67. **LEOTTA, G.A., CHINEN, I., EPSZTEYN, S., MILIWEBSKY, E., MELAMED, I.C., MOTTER, M.** Validación de una técnica de PCR múltiple para la detección de *Escherichia coli* productor de toxina Shiga. Rev. Arg. Microbiol.; 37: Pags1-10. 2005.
68. **INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION (ISO).** Microbiology of food and animal feeding stuffs – Horizontal method for the detection and enumeration of *Listeria monocytogenes* – Part 1: Detection method. Amendment 1: Modification of the isolation media and the hemolysis test, and inclusion of precision data. Geneva, Switzerland. 2004.
69. **DUFFY, G., CLOAK, O.M., SHERIDAN, J.J. , BLAIR, I.S. , MCDOWELL, D.A.** 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, Amsterdam, v. 49, Pags 151-159, 1999.
70. **POUTOU, R.A., CARRASCAL, A.K., SIERRA, S.C., MERCADO, M.** Validación de PCR para detección de *Listeria monocytogenes* en carnes crudas de res y pollo. MVZ Córdoba 9 (2): Pags 414-427. 2004.
71. **AMAGLIANI, G., GIAMMARINI, C., OMICCIOLI, E., BRANDI, G., MAGNANI, M.** Detection of *Listeria monocytogenes* using a comercial PCR kit and different DNA extraction methods. Food Cont; 18: Pags1137-1142. 2007.
72. **WEYANT, R.S., EDMUNDS, P., SWAMINATHAN, B.** Effect of ionic and noionic detergents on the Taq polymerase. Biotechniques 9. Pags 308-309. 1990.

73. **WALSH, P.S., METZGER, D.A., HIGUCHI, R.** Chelex 100 as a medium for simple extraction of DNA for PCR-based typing from forensic material. Biotechniques 10. Pags 506-513. 1991.
74. **SINGER-SAM, J., TANGUAY, R.L., RIGGS A.D.** Use of Chelex to improved the PCR signal from small number of cell. Amplification 3. Pags 11.
75. **MINISTERIO DE SALUD PERU.** Norma sanitaria sobre criterios microbiológicos de calidad sanitaria e inocuidad para los alimentos y bebidas de consumo humano. Artículo 15. Pags 1-21. Disponible en <http://190.187.112.90/promamazonia/SBiocomercio/Upload/Lineas/Documentos/362.pdf>.
76. **REGLAMENTO TÉCNICO CENTROAMERICANO RTCA 67.04.50:08. ALIMENTOS.** Criterios microbiológicos para la inocuidad de Alimentos. Pag 1-36. Disponible en http://meic.go.cr/reglatec/descargas/RTCA_criterios_microbiologicos_17-10-08.pdf.
77. **ELIKAGAIEN ARAU MIKROBIOLOGIKOAK.** Normas microbiológicas de los alimentos. Pags 1-50. Disponible en https://www.euskadi.net/r33-2709/es/contenidos/informacion/sanidad_alimentaria/es1247/adjuntos/NORMICRO2013.pdf.
78. **CÓDIGO ALIMENTARIO ARGENTINO (CAA).** Código Alimentario Argentino (CAA) capítulo VIII artículo 255. Disponible en www.alimentosargentinos.gov.ar.

79. **CÓDIGO ALIMENTARIO ARGENTINO (CAA).** Código Alimentario Argentino (CAA) RESOLUCIÓN GMC N° 069/93 y el artículo 302. Disponible en www.alimentosargentinos.gov.ar.

9. FIGURAS

Figura 1: Ciclo de vida intracelular y factores de virulencia de *Listeria monocytogenes* (20,21).

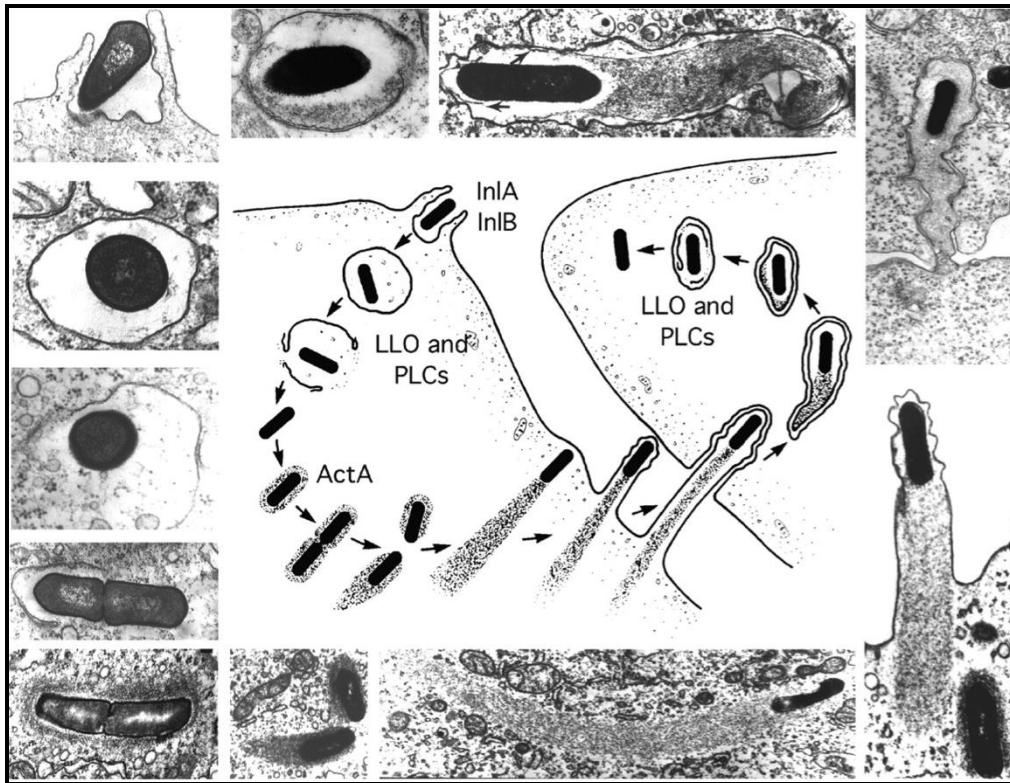
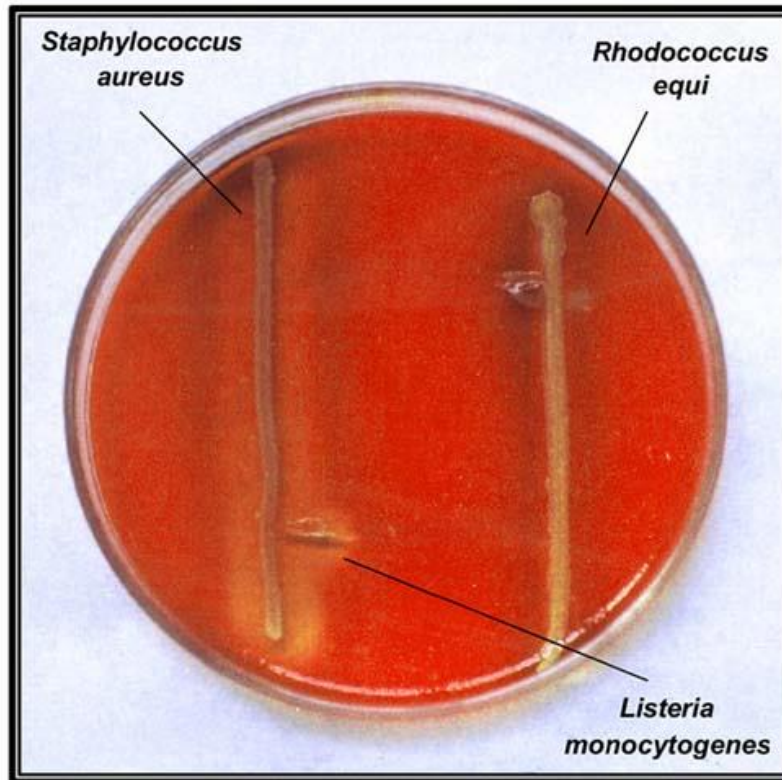


Figura 2: Prueba Christie–Atkins–Munch–Peterson (CAMP), factor de CAMP para distintas especies de *Listeria*.



“Desarrollo y validación de una metodología para la detección de *Listeria monocytogenes* en carne picada en carnicerías de Berisso”.

Figura 3: Ciclos de fluorescencia específica (Ct) en diluciones seriadas de una cepa amplificada por RT-PCR.

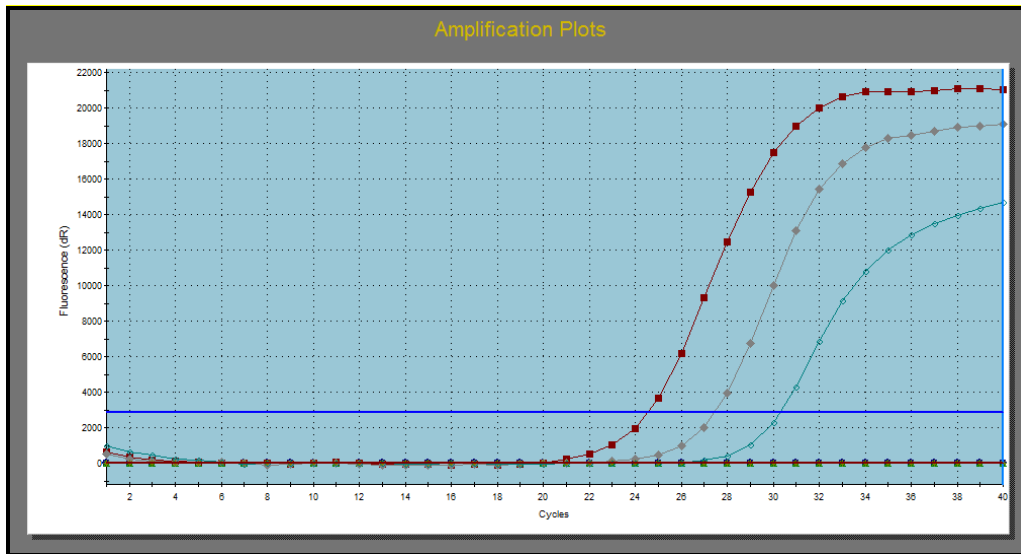
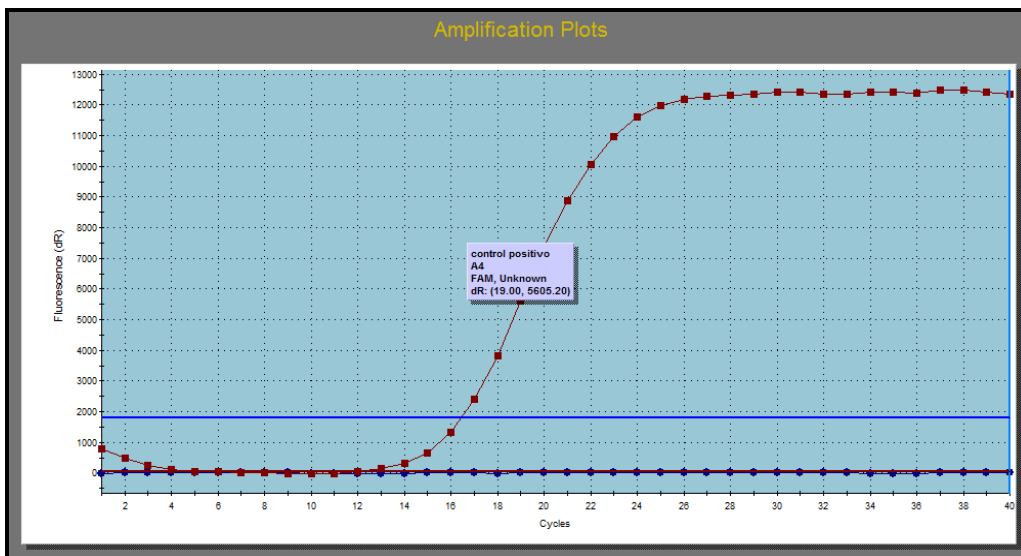


Figura 4: Espectro RT-PCR mediante el uso de sonda Taqman.



“Desarrollo y validación de una metodología para la detección de *Listeria monocytogenes* en carne picada en carnicerías de Berisso”.

Figura 5: Perfil termino RT-PCR validad y desarrollada intra-laboratorio, para *Listeria monocytogenes*.

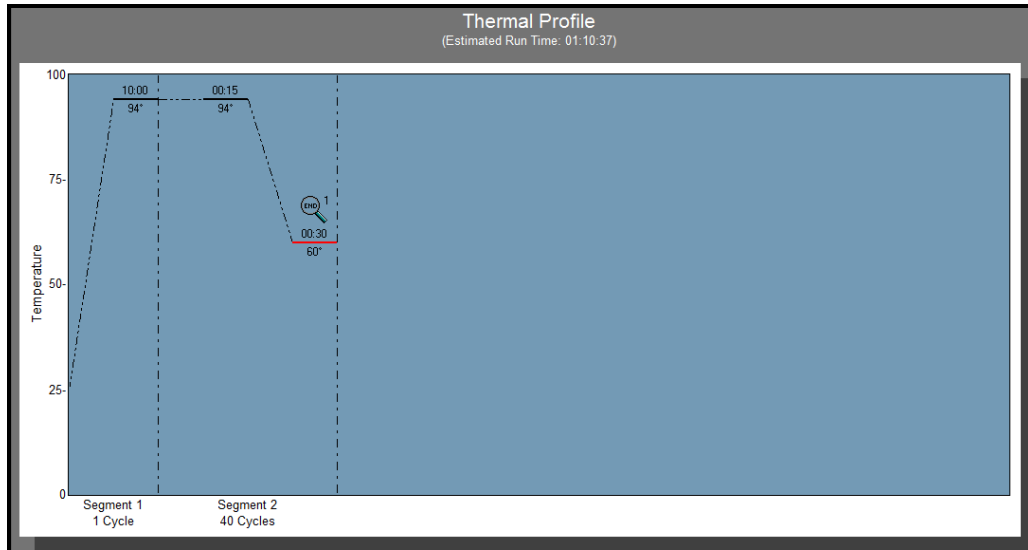


Figura 6. Flujograma Norma ISO 11290-2:1996/Amd 1:2004, para la detección de *Listeria monocytogenes* en alimentos.

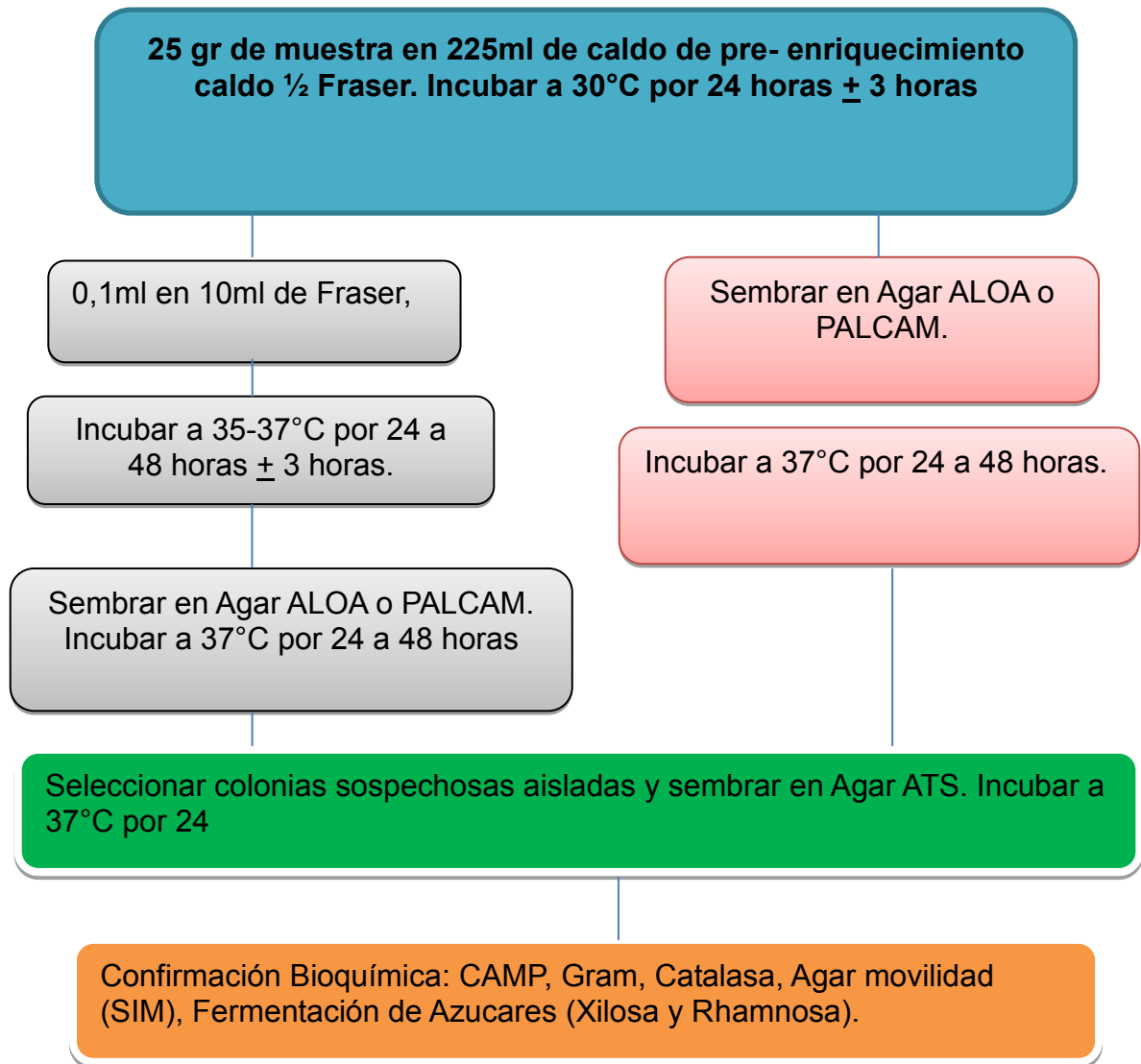


Figura 7. Ciclos de fluorescencia específica (Ct), mediante cepas de *Listeria monocytogenes* contaminada en tres distintas diluciones ($10^3, 10^2, 10^1$) /20 μ l de mezcla de PCR. Validación RT-PCR intra-laboratorio.

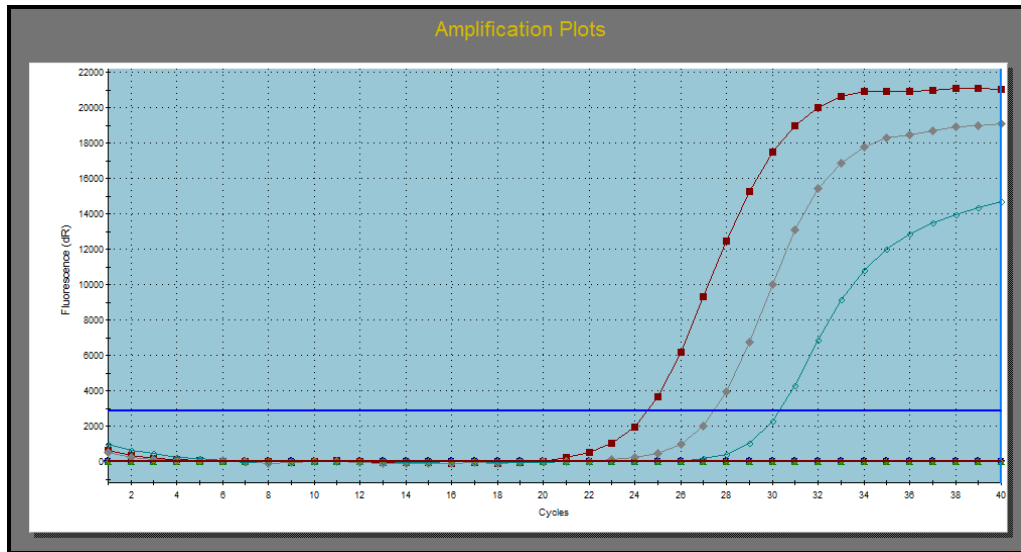
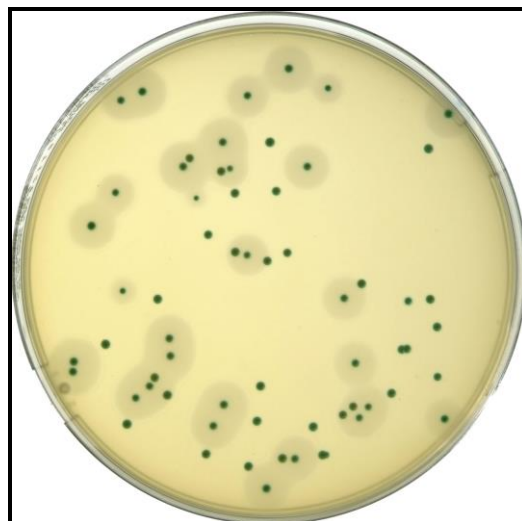


Figura 8. Colonias sospechosas *Listeria monocytogenes*, Agar ALOA, medio sugerido para el aislamiento y caracterización mediante la normativa Norma ISO 11290-2:1996/Amd 1:2004.



“Desarrollo y validación de una metodología para la detección de *Listeria monocytogenes* en carne picada en carnicerías de Berisso”.

10. TABLAS

Tabla 1. Pruebas bioquímicas para la identificación de distintas especies de *Listeria*.

ESPECIE	HEMOLISIS	PRODUCCIÓN DE ACIDO		PRUEBA DE CAMP	
		Rhamnosa	Xilosa	<i>S.aureus</i>	<i>R.equi</i>
<i>L. monocytogenes</i>	+	+	-	+	-
<i>L. innocua</i>	-	V	-	-	-
<i>L. ivanovii</i>	+	-	+	-	+
<i>L. seeligeri</i>	(+))	-	+	(+))	-
<i>L. welshimeri</i>	-	V	+	-	-
<i>L. grayi Subsp. Grayi</i>	-	-	-	-	-
<i>L. grayi Subsp. Murrayi</i>	-	V	-	-	-

Tabla 2. Cepas de *Listeria monocytogenes*, puesta a punto RT-PCR.

CEPAS	GRAM	Cat	Mov	Ram	Xil	CAMP			CARACTERIZACIÓN	RESULTADO RT-PCR
						B-hem	<i>R.eq</i>	<i>S.au</i>		
LaMA 412	Cocos Gram +	+	+	+	-	+	+	+	<i>Listeria monocytogenes</i>	+
LaMA 413	Cocobacilos Gram +	+	+	+	-	+	-	+	<i>Listeria monocytogenes</i>	+
LaMA423	Cocobacilos Gram +	+	+	+	-	+	-	+	<i>Listeria monocytogenes</i>	+
LaMA424	Cocobacilos Gram +	+	+	+	-	+	-	+	<i>Listeria monocytogenes</i>	+
LaMA 553	Cocobacilos Gram +	+	+	+	-	+	-	+	<i>Listeria monocytogenes</i>	+
LaMA 554	Cocobacilos Gram +	+	+	+	-	+	-	+	<i>Listeria monocytogenes</i>	+
LaMA 557	Bacilos cortos Gram +	+	+	+	-	+	-	+	<i>Listeria monocytogenes</i>	+
LaMA 666	Cocobacilos Gram +	+	+	+	-	+	-	+	<i>Listeria monocytogenes</i>	+
LaMA707	Cocos Gram +	+	+	+	-	(+))	-	+	<i>Listeria monocytogenes</i>	+
LaMA708	Bacilos Gram +	+	+	+	-	+	-	+	<i>Listeria monocytogenes</i>	+
LaMA709	Cocobacilos Gram +	+	+	+	-	(+))	-	+	<i>Listeria monocytogenes</i>	+
LaMA711	Bacilos Gram +	+	+	+	-	+	-	+	<i>Listeria monocytogenes</i>	+

(Cat) catalasa, (Mov) movilidad, (Ram) Rhamnosa, (Xil) Xilosa, (B-Hem) Hemolisis, (*R.eq*) *Rhodococcus equi*, (*S.au*) *Staphylococcus aureus*.

“Desarrollo y validación de una metodología para la detección de *Listeria monocytogenes* en carne picada en carnicerías de Berisso”.

Tabla 3. Mezcla de reacción para la RT-PCR desarrollada y validada intra-laboratorio.

MEZCLA DE REACCION REACTIVOS	MUESTRA 1X
Agua	5 µl
Master mix	10 µl
Primer Fw	0,4 µl
Primer Rv	0,4 µl
Sonda FAM	0,2 µl
ADN	4 µl
Vol. Final	20 µl

Tabla 4. Puesta a punto de los controles para la RT-PCR desarrollada y validada intra-laboratorio.

CEPAS	GRAM	Cat	Mov	Ram	Xil	CAMP			CARACTERIZACIÓN	RESULTADO RT-PCR
						B-hem	R.eq	S.au		
LaMA 732	Bacilos Gram +	+	+	+	-	+	-	+	<i>Listeria monocytogenes</i>	+
LaMA 260	Cocobacilos Gram +	+	+	-	+	+	-	+	<i>Listeria seeligeri</i>	-
LaMA 410	Cocobacilos Gram +	+	+	-	+	+	-	+	<i>Listeria seeligeri</i>	-
LaMA 419	Cocobacilos Gram +	+	+	-	+	+	-	+	<i>Listeria seeligeri</i>	-
LaMA 406	Cocobacilos Gram +	+	+	+	+	-	-	-	<i>Listeria welshimeri</i>	-
LaMA 415	Bacilos Gram +	+	+	-	+	-	-	-	<i>Listeria welshimeri</i>	-
LaMA 555	Bacilos Gram +	+	+	-	+	-	-	-	<i>Listeria welshimeri</i>	-
LaMA 577	Bacilos cortos Gram +	+	+	-	-	-	-	-	<i>Listeria innocua</i>	-
LaMA 699	Cocobacilos Gram +	+	+	-	-	-	-	-	<i>Listeria innocua</i>	-
LaMA 667	Cocobacilos Gram +	+	+	+	-	-	-	-	<i>Listeria innocua</i>	-

(Cat) catalasa, (Mov) movilidad, (Ram) Rhamnosa, (Xil) Xilosa, (B-Hem) Hemolisis, (R.eq) *Rhodococcus equi*, (S.au) *Staphylococcus aureus*.

“Desarrollo y validación de una metodología para la detección de *Listeria monocytogenes* en carne picada en carnicerías de Berisso”.

Tabla 5. Cepas de *Listeria de monocytogenes* utilizadas para determinar la inclusividad de la técnica de RT-PCR desarrollada y validez intra-laboratorio.

MICROORGANISMO		MICROORGANISMO	
<i>L. MONOCYTOGENES</i>	CEPA	<i>L. MONOCYTOGENES</i>	CEPA
1	LaMA 592	22	LaMA 654
2	LaMA 590	23	LaMA 920
3	LaMA 591	24	LaMA 744
4	LaMA 810	25	LaMA 735
5	LaMA 891	26	LaMA 890
6	LaMA 743	27	LaMA 424
7	LaMA813	28	LaMA 416
8	LaMA 814	29	LaMA 423
9	LaMA 815	30	LaMA 722
10	LaMA 816	31	LaMA 400
11	LaMA 655	32	LaMA 694
12	LaMA 733	33	LaMA 433
13	LaMA695	34	LaMA 724
14	LaMA 812	35	LaMA 666
15	LaMA 594	36	LaMA 405
16	LaMA 734	37	LaMA 412
17	LaMA 732	38	LaMA 693
18	LaMA 893	39	LaMA 721
19	LaMA 811	40	LaMA 812
20	LaMA 745	41	LaMA 809
21	LaMA 919	42	LaMA 554

		43	LaMA 413
--	--	----	----------

Tabla 6. Cepas NO *Listeria de monocytogenes* utilizadas para determinar la exclusividad de la técnica de RT-PCR desarrollada y validad intra-laboratorio.

MICROORGANISMO NO <i>L. MONOCYTOGENES</i>	CEPA	MICROORGANISMO NO <i>L. MONOCYTOGENES</i>	CEPA
1. <i>Pseudomona aeruginosa</i>	LaMA 1	16. <i>Proteus mirabilis</i>	LaMA 16
2. <i>Yersinia enterocolitica</i>	LaMA 2	17. <i>Shigella flexneri</i>	LaMA 17
3. <i>Shigella sonnei</i>	LaMA 3	18. <i>Proteus vulgaris</i>	LaMA 18
4. <i>Salmonella entérica</i>	LaMA 4	19. <i>Escherichia coli</i>	LaMA 19
5. <i>Shigella flexneri</i>	LaMA 5	20. <i>Shigella dysenteriae</i>	LaMA 20
6. <i>Edwardsiella tarda</i>	LaMA 6	21. <i>Morganella morganii</i>	LaMA 21
7. <i>Salmonella entérica</i>	LaMA 7	22. <i>Escherichia coli</i>	LaMA 22
8. <i>Salmonella entérica</i>	LaMA 8	23. <i>Salmonella entérica</i>	LaMA 23
9. <i>Escherichia coli</i>	LaMA 9	24. <i>Salmonella entérica</i>	LaMA 24
10. <i>Shigella flexneri</i>	LaMA 10	25. <i>Klebsiella pneumoniae</i>	LaMA 25
11. <i>Salmonella entérica</i>	LaMA 11	26. <i>Escherichia coli</i>	LaMA 26
12. <i>Escherichia coli</i>	LaMA 12	27. <i>Hafnia alvei</i>	LaMA 27
13. <i>Pseudomona aeruginosa</i>	LaMA 13	28. <i>Enterobacter cloacae</i>	LaMA 28
14. <i>Escherichia coli</i>	LaMA 14	29. <i>Shigella dysenteriae</i>	LaMA 29
15. <i>Shigella flexneri</i>	LaMA 15	30. <i>Escherichia coli</i>	LaMA 30

“Desarrollo y validación de una metodología para la detección de *Listeria monocytogenes* en carne picada en carnicerías de Berisso”.

Tabla 7. Tabla de contingencia para el análisis estadístico de resultados.

		AISLAMIENTO			
		Positivo	Negativo	Total	
		A	B	A+B	
TAMIZAJE	Positivo	Verdadero Positivo	Falso Positivo		
	Negativo	C	D	C+D	
			Falso Negativo	Verdadero Negativo	
	Total	A+C	B+D	A+B+C+D	

“Desarrollo y validación de una metodología para la detección de *Listeria monocytogenes* en carne picada en carnicerías de Berisso”.

Tabla 8. Resultados de inclusividad de la RT-PCR validada y desarrollada intra-laboratorio, con cepas de *Listeria monocytogenes* en 3 distintas diluciones.

Cepas de <i>L. monocytogenes</i>	CT RT-PCR Diluciones			Resultado ISO 11290-1:1996/Amd 1:2004		
	10 ³	10 ²	10 ¹	10 ³	10 ²	10 ¹
LaMA 592	25,32	27,73	30,29	+	+	+
LaMA 590	24,62	28,06	28,97	+	+	+
LaMA 591	24,72	27,7	29,98	+	+	+
LaMA 810	24,62	26,98	29,88	+	+	+
LaMA 891	25,45	30,04	30,07	+	+	+
LaMA 743	24,76	28,68	31,03	+	+	+
LaMA813	28,37	29,73	30,05	+	+	+
LaMA 814	26,38	29,88	31,9	+	+	+
LaMA 815	26,37	28,86	31,05	+	+	+
LaMA 816	27,39	30,21	30,94	+	+	+
LaMA 655	25,52	27,63	32,15	+	+	+
LaMA 733	26,53	27,63	30,92	+	+	+
LaMA695	25,56	28,05	30,96	+	+	+
LaMA 812	26,13	27,48	-	+	+	+
LaMA 594	28,42	30,2	33,83	+	+	+
LaMA 734	27,44	28,54	29,85	+	+	+
LaMA 732	24,84	27,47	31,39	+	+	+
LaMA 893	29,88	32,17	37,43	+	+	+
LaMA 811	26,62	27,82	31,22	+	+	+
LaMA 745	27,49	29,47	32,89	+	+	+

“Desarrollo y validación de una metodología para la detección de *Listeria monocytogenes* en carne picada en carnicerías de Berisso”.

LaMA 919	28,58	30,04	33,22	+	+	+
LaMA 654	26,67	29,2	30,26	+	+	+
LaMA 920	28,22	32,83	-	+	+	+
LaMA 744	28,65	29,29	32,7	+	+	+
LaMA 735	27,06	29,67	34,98	+	+	+
LaMA 890	26,03	28,74	31	+	+	+
LaMA 424	27,92	30,18	-	+	+	+
LaMA 416	26,78	28,74	33	+	+	+
LaMA 423	29,3	30,03	37,68	+	+	+
LaMA 722	26,66	28,83	32,86	+	+	+
LaMA 400	30,36	31,16	-	+	+	+
LaMA 694	26,45	27,91	31,41	+	+	+
LaMA 433	28,84	29,03	34	+	+	+
LaMA 724	27,38	28,93	31,6	+	+	+
LaMA 666	26,46	29,91	34,12	+	+	+
LaMA 405	29,36	31,69	37,34	+	+	+
LaMA 412	27,78	31,34	-	+	+	+
LaMA 693	26,65	28,78	31,65	+	+	+
LaMA 721	26,05	28,46	32	+	+	+
LaMA 812	29,96	34,19	35,76	+	+	+
LaMA 809	32,33	33,96	35,33	+	+	+
LaMA 554	36,57	36,57	-	+	+	+
LaMA 413	33,14	33,15	36,48	+	+	+

“Desarrollo y validación de una metodología para la detección de *Listeria monocytogenes* en carne picada en carnicerías de Berisso”.

Tabla 9. Resultados de exclusividad de la RT-PCR validada y desarrollada intra-laboratorio, con cepas de *Listeria monocytogenes* en 3 distintas diluciones.

MICROORGANISMO NO <i>L. MONOCYTOGENES</i>	CEPA	CT RT-PCR	ISO 11290-1:1996/ Amd 1:2004
1. <i>Pseudomona aeruginosa</i>	LaMA 1	-	-
2. <i>Yersinia enterocolitica</i>	LaMA 2	-	-
3. <i>Shigella sonnei</i>	LaMA 3	-	-
4. <i>Salmonella entérica</i>	LaMA 4	-	-
5. <i>Shigella flexneri</i>	LaMA 5	-	-
6. <i>Edwardsiella tarda</i>	LaMA 6	-	-
7. <i>Salmonella entérica</i>	LaMA 7	-	-
8. <i>Salmonella entérica</i>	LaMA 8	-	-
9. <i>Escherichia coli</i>	LaMA 9	-	-
10. <i>Shigella flexneri</i>	LaMA 10	-	-
11. <i>Salmonella entérica</i>	LaMA 11	-	-
12. <i>Escherichia coli</i>	LaMA 12	-	-
13. <i>Pseudomona aeruginosa</i>	LaMA 13	-	-
14. <i>Escherichia coli</i>	LaMA 14	-	-
15. <i>Shigella flexneri</i>	LaMA 15	-	-
16. <i>Proteus mirabilis</i>	LaMA 16	-	-
17. <i>Shigella flexneri</i>	LaMA 17	-	-
18. <i>Proteus vulgaris</i>	LaMA 18	-	-
19. <i>Escherichia coli</i>	LaMA 19	-	-
20. <i>Shigella dysenteriae</i>	LaMA 20	-	-

“Desarrollo y validación de una metodología para la detección de *Listeria monocytogenes* en carne picada en carnicerías de Berisso”.

21. <i>Morganella morgnani</i>	LaMA 21	-	-
22. <i>Escherichia coli</i>	LaMA 22	-	-
23. <i>Salmonella entérica</i>	LaMA 23	-	-
24. <i>Salmonella entérica</i>	LaMA 24	-	-
25. <i>Klebsiella pneumoniae</i>	LaMA 25	-	-
26. <i>Escherichia coli</i>	LaMA 26	-	-
27. <i>Hafnia alvei</i>	LaMA 27	-	-
28. <i>Enterobacter cloacae</i>	LaMA 28	-	-
29. <i>Shigella dysenteriae</i>	LaMA 29	-	-
30. <i>Escherichia coli</i>	LaMA 30	-	-

“Desarrollo y validación de una metodología para la detección de *Listeria monocytogenes* en carne picada en carnicerías de Berisso”.

Tabla 10. Resultados obtenidos luego del muestreo y procesamiento de 110 muestras de carne picada utilizando como métodos de detección la RT-PCR Desarrollada y validada intra-laboratorio, y la metodología tradicional ISO 11290-1:1996/Amd1:2004.

N° carnicería	N	APTO	fecha toma de muestra	Detección de <i>L. Monocytogenes</i> RT-PCR Desarrollada y validada	Aislamiento y Caracterización ISO 11290-1:1996 /Amd 1:2004
17	1	0	26/10/2010	+	<i>Listeria monocytogenes</i>
29	1	0	02/11/2010	+	<i>Listeria monocytogenes</i>
30	1	0	02/11/2010	+	<i>Listeria monocytogenes</i>
31	1	0	02/11/2010	+	<i>Listeria monocytogenes</i>
32	1	0	09/11/2010	+	<i>Listeria monocytogenes</i>
30	1	0	09/11/2010	+	<i>Listeria monocytogenes</i>
34	1	0	09/11/2010	+	<i>Listeria monocytogenes</i>
35	1	0	17/11/2010	+	<i>Listeria monocytogenes</i>
36	1	0	17/11/2010	+	<i>Listeria monocytogenes</i>
37	1	1	17/11/2010	+	<i>Listeria monocytogenes</i>
38	1	0	23/11/2010	+	<i>Listeria monocytogenes</i>
39	1	1	23/11/2010	+	<i>Listeria monocytogenes</i>
40	1	0	23/11/2010	+	<i>Listeria monocytogenes</i>
41	1	0	01/12/2010	+	<i>Listeria monocytogenes</i>
42	1	1	01/12/2010	+	<i>Listeria monocytogenes</i>
43	1	0	01/12/2010	+	<i>Listeria monocytogenes</i>
44	1	0	07/12/2010	+	<i>Listeria monocytogenes</i>
27	1	0	07/12/2010	-	<i>Listeria spp</i>
46	1	0	07/12/2010	-	<i>Listeria spp.</i>
25	1	0	14/12/2010	-	<i>Listeria spp</i>
48	1	0	14/12/2010	-	<i>Listeria spp</i>
49	1	0	14/12/2010	-	<i>Listeria spp</i>
15	1	0	20/12/2010	-	<i>Listeria spp</i>
51	1	0	20/12/2010	-	<i>Listeria spp</i>
20	1	0	20/12/2010	-	<i>Listeria spp</i>
53	1	0	27/12/2010	-	<i>Listeria spp</i>
54	1	1	27/12/2010	-	<i>Listeria spp</i>
55	1	0	27/12/2010	-	<i>Listeria spp</i>
56	1	1	04/01/2011	+	<i>Listeria monocytogenes</i>

“Desarrollo y validación de una metodología para la detección de *Listeria monocytogenes* en carne picada en carnicerías de Berisso”.

57	1	1	04/01/2011	+	<i>Listeria monocytogenes</i>
18	1	0	04/01/2011	+	<i>Listeria monocytogenes</i>
59	1	0	10/01/2011	-	<i>Listeria spp</i>
60	1	0	10/01/2011	+	<i>Listeria monocytogenes</i>
4	1	0	10/01/2011	+	<i>Listeria monocytogenes</i>
5	1	0	17/01/2011	-	<i>Listeria spp</i>
63	1	1	17/01/2011	-	<i>Listeria spp</i>
64	1	1	17/01/2011	+	<i>Listeria monocytogenes</i>
65	1	0	24/01/2011	+	<i>Listeria monocytogenes</i>
7	1	1	24/01/2011	-	<i>Listeria spp</i>
67	1	0	24/01/2011	-	<i>Listeria spp</i>
68	1	0	31/01/2011	-	<i>Listeria spp</i>
69	1	0	31/01/2011	+	<i>Listeria monocytogenes</i>
9	1	0	31/01/2011	-	<i>Listeria spp</i>
71	1	0	07/02/2011	+	<i>Listeria monocytogenes</i>
72	1	0	07/02/2011	+	<i>Listeria monocytogenes</i>
73	1	0	07/02/2011	-	<i>Listeria spp</i>
8	1	0	14/02/2011	-	<i>Listeria spp</i>
75	1	0	14/02/2011	-	<i>Listeria spp</i>
76	1	0	14/02/2011	+	<i>Listeria monocytogenes</i>
1	1	0	23/02/2011	-	<i>Listeria spp</i>
78	1	0	23/02/2011	+	<i>Listeria monocytogenes</i>
79	1	0	23/02/2011	-	<i>Listeria spp</i>
80	1	0	02/03/2011	+	<i>Listeria monocytogenes</i>
81	1	0	02/03/2011	-	<i>Listeria spp</i>
82	1	1	02/03/2011	-	<i>Listeria spp</i>
83	1	0	14/03/2011	+	<i>Listeria monocytogenes</i>
16	1	0	14/03/2011	+	<i>Listeria monocytogenes</i>
85	1	0	14/03/2011	-	<i>Listeria spp</i>
24	1	0	27/03/2011	-	<i>Listeria spp</i>
87	1	0	27/03/2011	+	<i>Listeria monocytogenes</i>
26	1	0	27/03/2011	-	<i>Listeria spp</i>
10	1	0	04/04/2011	-	<i>Listeria spp</i>
90	1	0	04/04/2011	-	<i>Listeria spp</i>
91	1	0	04/04/2011	-	<i>Listeria spp</i>
12	1	0	11/04/2011	-	<i>Listeria spp</i>
93	1	0	11/04/2011	+	<i>Listeria monocytogenes</i>
94	1	1	11/04/2011	+	<i>Listeria monocytogenes</i>
6	1	1	24/04/2011	-	<i>Listeria spp</i>
96	1	1	24/04/2011	+	<i>Listeria monocytogenes</i>

“Desarrollo y validación de una metodología para la detección de *Listeria monocytogenes* en carne picada en carnicerías de Berisso”.

97	1	0	24/04/2011	+	<i>Listeria monocytogenes</i>
98	1	1	03/05/2011	-	<i>Listeria spp</i>
99	1	0	03/05/2011	-	<i>Listeria spp</i>
100	1	0	03/05/2011	-	<i>Listeria spp</i>
19	1	0	10/05/2011	-	<i>Listeria spp</i>
102	1	0	10/05/2011	-	<i>Listeria spp</i>
103	1	0	10/05/2011	-	<i>Listeria spp</i>
11	1	0	17/05/2011	+	<i>Listeria monocytogenes</i>
105	1	0	17/05/2011	+	<i>Listeria monocytogenes</i>
106	1	0	17/05/2011	-	<i>Listeria spp</i>
107	1	1	31/05/2011	-	<i>Listeria spp</i>
108	1	1	31/05/2011	+	<i>Listeria monocytogenes</i>
29	1	0	31/05/2011	+	<i>Listeria monocytogenes</i>
2	1	1	15/06/2011	-	<i>Listeria spp</i>
111	1	1	15/06/2011	+	<i>Listeria monocytogenes</i>
23	1	0	15/06/2011	+	<i>Listeria monocytogenes</i>
113	1	1	28/06/2011	-	<i>Listeria spp</i>
13	1	1	28/06/2011	+	<i>Listeria monocytogenes</i>
115	1	0	28/06/2011	-	<i>Listeria spp</i>
116	1	1	05/07/2011	-	<i>Listeria spp</i>
117	1	0	05/07/2011	-	<i>Listeria spp</i>
118	1	0	05/07/2011	-	<i>Listeria spp</i>
119	1	0	02/08/2011	-	<i>Listeria spp</i>
3	1	1	02/08/2011	-	<i>Listeria spp</i>
121	1	1	02/08/2011	+	<i>Listeria monocytogenes</i>
122	1	1	09/08/2011	+	<i>Listeria monocytogenes</i>
123	1	1	09/08/2011	-	<i>Listeria spp</i>
124	1	0	16/08/2011	+	<i>Listeria monocytogenes</i>
125	1	0	16/08/2011	+	<i>Listeria monocytogenes</i>
126	1	0	16/08/2011	+	<i>Listeria monocytogenes</i>
14	1	0	23/08/2011	+	<i>Listeria monocytogenes</i>
128	1	0	23/08/2011	+	<i>Listeria monocytogenes</i>
129	1	0	23/08/2011	-	<i>Listeria spp</i>
22	1	0	30/08/2011	-	<i>Listeria spp</i>
131	1	0	30/08/2011	+	<i>Listeria monocytogenes</i>
132	1	0	30/08/2011	+	<i>Listeria monocytogenes</i>
133	1	0	06/09/2011	+	<i>Listeria monocytogenes</i>
134	1	0	06/09/2011	-	<i>Listeria spp</i>
135	1	0	06/09/2011	+	<i>Listeria monocytogenes</i>
21	1	0	13/09/2011	+	<i>Listeria monocytogenes</i>

“Desarrollo y validación de una metodología para la detección de *Listeria monocytogenes* en carne picada en carnicerías de Berisso”.

137	1	0	13/09/2011	+	<i>Listeria monocytogenes</i>
	110	25		57	
PORCENTAJE		22,7		51,8	

Tabla 11. Análisis estadísticos tabla de contingencia. Comparación resultados obtenidos con la RT-PCR Desarrollada y validad intra-laboratorio y los aislamientos obtenidos mediante la marcha microbiológica convencional.

		AISLAMIENTO		
		Si	No	TOTAL
RT-PCR DESARROLLADA Y VALIDADA INTRALABORATORIO	Positivo	57	0	57
	Negativo	0	53	53
	TOTAL	57	53	110

“Desarrollo y validación de una metodología para la detección de *Listeria monocytogenes* en carne picada en carnicerías de Berisso”.

11. ANEXOS

Anexo1. Criterios microbiológicos para carne picada en distintas partes del mundo.

- Norma sanitaria sobre criterios microbiológicos de calidad sanitaria e inocuidad para los alimentos y bebidas de consumo humano (**PERU**).

8.0 Grupo de Alimento: Carnes y productos cárnicos. Esta categoría incluye todos los tipos de productos cárnicos, de aves de corral y caza, en piezas y cortados o picados, frescos y procesados, carnes congeladas, incluyendo empanizados y rebosados y carnes enlatadas.						
8.1 Subgrupo del alimento: Productos cárnicos crudos (empacados y sin empacar). No incluidas materias primas.						
8.1.1 Subgrupo del alimento: Productos cárnicos crudos diferentes al pollo						
Parámetro	Plan de muestreo				Límite	
	Tipo de riesgo	Clase	n	c	m	M
<i>Escherichia coli</i> O157H7/25g (carne molida, picada y tortas para hamburguesas)	A	2	5	0	Ausencia	---
<i>Salmonella ssp</i> /25 g		2		0	Ausencia	---
<i>Listeria monocytogenes</i> /25 g		2		0	Ausencia	---
<i>Escherichia coli</i>		3		1	10 UFC/g	10 ³ UFC /g

- Criterios microbiológicos para la inocuidad de Alimentos (**CENTROAMERICA**).

10.4 Carnes Molidas							
Agentes microbianos	Categoría	Clases	n	C	Límite por g/mL		
					m	M	
Coliformes termotolerantes	3	3	5	2	10 ³	10 ⁴	
<i>Staphylococcus aureus</i> coagulasa +	6	3	5	1	10 ²	10 ³	
<i>Salmonella</i> en 25g.	10	2	5	0	0	---	
<i>Listeria monocytogenes</i>	10	2	5	0	10 ²	--	
<i>Clostridium perfringens</i>	6	3	5	1	10 ²	10 ³	
<i>Escherichia coli</i> 0157:H7 (*)	10	2	5	0	0	---	
(*) Solo para productos importados							

“Desarrollo y validación de una metodología para la detección de *Listeria monocytogenes* en carne picada en carnicerías de Berisso”.

- Normas microbiológicas de los alimentos (**COMUNIDAD EUROPEA**).

Alimentos	Legislación o Recomendación	Aerobios mesófilos	Enterobacterias Coliformes	E. coli	S. aureus	Salmonella Shigella Mohos Listeria monocytogenes	Otros límites. Comentarios.
Carne separada mecánicamente (CSM)	Reglamento C.E. 2073/2005 modificado por reglamento C.E. 1441/2007	n= 5, c= 2 m = 5 x 10 ⁵ M = 5 x 10 ⁶ g.		n= 5, c=2 m = 50 M = 500 g.		Salmonella n=5, c=0, Aus/10 g	Fases de aplicación del criterio: Salmonella: de aplicación en productos comercializados durante su vida útil. Aerobios y E.coli: de aplicación en los productos al final del proceso de fabricación. El Reglamento 853/2004 define la carne separada mecánicamente (CSM): el producto extrayendo la carne de los huesos carnosos después del desuesado, o de las canales de las aves, por medios mecánicos que ocasionan la pérdida o alteración de la estructura de la fibra muscular. Se recurre al E.coli como indicador de contaminación fecal. Ver en el Capítulo 3 del Reglamento CE 1441/2007 las normas, frecuencias de muestreo e interpretación de los resultados.
Carne picada elaborada por carnicerías	Como referencia O.14/1/86 BOE 21/1/86				10 ³ ufc/g	Salmonella Shigella Ausencia / 25 g.	Clostridium perfringens: 10 ² u.f.c./g. Los criterios microbiológicos de la Orden del 14/01/1986 han sido derogados por R.D. 135/2010 B.O.E. 25/02/2010. Sin conservar de un día para otro. T° mantenimiento entre -3° C y 4° C.
Carne picada destinada a ser consumida en crudo	Reglamento C.E. 2073/2005 modificado por reglamento C.E. 1441/2007 D.O.U.E. 07/12/2007	n= 5, c= 2 m = 5 x 10 ⁵ M = 5 x 10 ⁶ g.		n= 5, c=2 m = 50 M = 500 g.		Salmonella n=5, c=0, Aus/25 g.	El Reglamento CE 853/2004 define carne picada como la carne desuesada que ha sido sometida a una operación de picado en trozos y que contiene menos de 1% de sal. Fase de aplicación del criterio: Salmonella: productos comercializados durante su vida útil. Aerobios y E.coli: final del proceso de fabricación. El criterio para aerobios no se aplicará a la carne picada producida para el comercio al por menor cuando la vida útil del producto sea inferior a 24 horas. Se recurre al E.coli como indicador de contaminación fecal. Ver el Capítulo 3 del Reglamento CE 1441/2007 las normas y frecuencias de muestreo. El R.D. 1916/1997 BOE 13/1/98 derogado por el R.D.640/2006 establecía también criterios para S.aureus que el Reglamento 2073/05 no establece.
						<i>Listeria monocytogenes</i> n=5, c=0, Aus/25 g	De aplicación sólo si puede favorecer el crecimiento de <i>Listeria monocytogenes</i> y en la fase anterior a la que el alimento haya dejado el control inmediato del explotador de la empresa alimentaria que lo ha producido. Véase la página 5
						<i>Listeria monocytogenes</i> n=5, c=0, 100 u.f.c/ g	Fase de aplicación del criterio: Productos comercializados durante su vida útil. Véase criterio en la página 5.

- Código alimentario argentino (**ARGENTINA**)

Artículo 255 – (Resolución Conjunta SPRyRS N° 79/04 y SAGPyA N° 500/04)

Con la designación de Carne triturada o picada, se entiende la carne apta para el consumo dividida finamente por procedimientos mecánicos y sin aditivo alguno.

Debe prepararse en presencia del interesado, salvo aquellos casos en que por la naturaleza de los establecimientos o volumen de las operaciones sean autorizados expresamente por la autoridad competente.

La carne picada fresca deberá responder a las siguientes especificaciones microbiológicas:

Criterio complementario:

Determinación	Resultados	Métodos de Análisis
Recuento de Aerobios Mesófilos /g	n=5 c=3 m=10 ⁶ M= 10 ⁷	ICMSF o equivalente Microorganismos de los Alimentos-Vol I- Técnicas de análisis microbiológicos -ParteII- Enumeración de microorganismos aeróbios mesófilos- Métodos de Recuento en Placa
Recuento de <i>Escherichia coli</i> /g	n=5 c=2 m=100 M=500	ICMSF o equivalente Microorganismos de los Alimentos-Vol I- Técnicas de análisis microbiológicos -ParteII- Bacterias coliformes
Recuento de <i>Staphylococcus aureus</i> coagulasa positiva /g	n=5 c=2 m=100 M=1000	ICMSF o equivalente Microorganismos de los Alimentos-Vol I- Técnicas de análisis microbiológicos -ParteII- S. aureus- Recuento de estafilococos coagulasa positiva

“Desarrollo y validación de una metodología para la detección de *Listeria monocytogenes* en carne picada en carnicerías de Berisso”.

Criterio obligatorio:

Determinación	Resultados	Métodos de Análisis
<i>Escherichia coli</i> O157:H7/NM	n=5 c=0 Ausencia/65g	USDA-FSIS Guía de Laboratorio de Microbiología- capítulo5- Detección, aislamiento e identificación de <i>E. coli</i> O157:H7/NM en productos cárnicos o equivalente
<i>Salmonella spp.</i>	n= 5 c=0 Ausencia/ 10 g	Manual de Bacteriología Analítica de FDA (BAM) Capítulo 5 Salmonella o equivalente

Podrán investigarse otros microorganismos cuando las circunstancias lo hicieran necesario.

Anexo 2. Criterios microbiológicos según CCA para distintos tipos de alimentos que pueden ser comercializados en el lugar de expendio de carne.

- Criterio microbiológico quesos CCA RESOLUCIÓN GMC N° 069/93

2.- Definición

Los requisitos microbiológicos definidos en esta norma, han sido establecidos conforme a los criterios y planes de muestreo para aceptación de lotes de la Comisión Internacional de Especificaciones Microbiológicas de los Alimentos (ICMSF).

Los métodos analíticos especificados responden a la metodología internacionalmente aceptada. Los quesos fueron clasificados según el contenido de humedad de la pasta, otras características distintivas y tecnologías de fabricación.

3.- Requisitos

3.1.- Quesos de baja humedad (humedad < 36%)

Microorganismos	Criterio de Aceptación	Categoría ICMSF	Métodos de Ensayo
Coliformes/g(30°C)	n=5 c=2 m=200 M=1000	5	FIL 73A: 1985
Coliformes/g(45°C)	n=5 c=2 m=100 M=500	5	APHA 1992, c.24 (1)
Estafilococos coag.pos./g	n=5 c=2 m=100 M=1000	5	FIL 145: 1990
<i>Salmonella spp</i> /25g	n=5 c=0 m=0	10	FIL 93A: 1985

3.2 Quesos de mediana humedad (36% <Humedad< 46%)

Microorganismos	Criterio de Aceptación	Categoría ICMSF	Métodos de ensayo
Coliformes/g (30°C)	n=5 c=2 m=1000 M=5000	5	FIL 73A: 1985
Coliformes/g (45°C)	n=5 c=2 m=100 M=500	5	APHA 1992, c.24 (1)
Estafilococos coag.pos./g	n=5 c=2 m=100 M=1000	5	FIL 145: 1990
<i>Salmonella spp</i> /25g	n=5 c=0 m=0	10	FIL 93A: 1985
<i>Listeria monocytogenes</i> /25g	n=5 c=0 m=0	10	FIL 143: 1990

“Desarrollo y validación de una metodología para la detección de *Listeria monocytogenes* en carne picada en carnicerías de Berisso”.

3.3 Quesos de alta humedad (46% < Humedad < 55%) exceptuando los Quesos Cuartirolo, Cremoso, Criollo y Minas Frescal.

Microorganismos	Criterio de Aceptación	Categoría ICMSF	Métodos de Ensayo
Coliformes/g (30°C)	n=5 c=2 m=5000 M=10000	5	FIL 73A: 1985
Coliformes/g (45°C)	n=5 c=2 m=1000 M=5000	5	APHA 1992, c.24 (1)
Estafilococos coag.pos./g	n=5 c=2 m=100 M=1000	5	FIL 145: 1990
Salmonella spp/25g	n=5 c=0 m=0	10	FIL 93A: 1985
Listeria monocytogenes/25g	n=5 c=0 m=0	10	FIL 143: 1990

3.4 Quesos Cuartirolo, Cremoso, Criollo y Minas Frescal (46% < Humedad < 55%)

Microorganismos	Criterio de Aceptación	Categoría ICMSF	Métodos de Ensayo
Coliformes/g (30°C)	n=5 c=2 m=10000 M=100000	5	FIL 73A: 1985
Coliformes/g (45°C)	n=5 c=2 m=1000 M=5000	5	APHA 1992, c.24 (1)
Estafilococos coag.pos./g	n=5 c=2 m=100 M=1000	5	FIL 145: 1990
Salmonella spp/25g	n=5 c=0 m=0	10	FIL 93A: 1985
Listeria	n=5 c=0 m=0	10	FIL 143: 1990

3.5 Quesos de muy alta humedad con bacterias lácteas en forma viable y abundantes (Humedad > 55%)

Microorganismos	Criterio de Aceptación	Categoría ICMSF	Métodos de Ensayo
Coliformes/g (30°C)	n=5 c=3 m=100 M=1000	4	FIL 73A: 1985
Coliformes/g (45°C)	n=5 c=2 m=10 M=100	5	APHA 1992, c.24 (1)
Estafilococos coag.pos./g	n=5 c=2 m=10 M=100	5	FIL 145: 1990
Hongos y Levaduras/g	n=5 c=2 M=500 M=5000	2	FIL 94B: 1990
Salmonella spp/25g	n=5 c=0 m=0	10	FIL 93A: 1985
Listeria monocytogenes/25g	n=5 c=0 m=0	10	FIL 143: 1990

3.6 Quesos de muy alta humedad sin bacterias lácticas en forma viable y abundantes (Humedad > 55%).

Microorganismos	Criterio de Aceptación	Categoría ICMSF	Métodos de Ensayo
Coliformes/g (30°C)	n=5 c=2 m=100 M=1000	5	FIL 73A: 1985
Coliformes/g (45°C)	n=5 c=2 m=50 M=500	5	APHA 1992,c.24 (1)
Estafilococos coag.pos./g	n=5 c=1 m= 10 M=100	8	FIL 145: 1990
Hongos y Levaduras/g	n=5 c=2 m=500 M=5000	2	FIL 94B: 1990
Salmonella spp/25g	n=5 c=0 m=0	10	FIL 93A: 1985
Listeria monocytogenes/25g	n=5 c=0 m=0	10	FIL 143: 1990

“Desarrollo y validación de una metodología para la detección de *Listeria monocytogenes* en carne picada en carnicerías de Berisso”.

3.7 Queso Rallado

Microorganismos	Criterio de Aceptación	Categoría ICMSF	Métodos de Ensayo
Coliformes/g (30°C)	n=5 c=2 m=200 M=1000	5	FIL 73A: 1985
Coliformes/g (45°C)	n=5 c=2 m=100 M=1000	5	APHA 1992, c.24 (1)
Estafilococos coag.pos./g	n=5 c=2 m=100 M=1000	5	FIL 145: 1990
Hongos y Levaduras/g	n=5 c=2 m=500 M=5000	2	FIL 94B: 1990
Salmonella spp/25g	n=5 c=0 m=0	10	FIL 93A: 1985

3.8 Quesos Fundidos o Reelaborados y Quesos Procesados por UHT o UAT

Microorganismos	Criterio de Aceptación	Categoría ICMSF	Métodos de Ensayo
Coliformes/g(30°C)	n=5 c=2 m=10 M=100	5	FIL 73A: 1985
Coliformes/g (45°C)	n=5 c=2 m=< 3 M=10	5	APHA 1992, c.24 (1)
Estafilococos coag.pos./g	n=5 c=2 m=100 M=1000	5	FIL 145: 1990

(1) Compendium of Methods for the Microbiological Examinations of Food 3º Edición. Editado por Carl Vanderzant y Don F.Splittstoesser

- Criterio microbiológico chacinados embutidos y no embutidos Artículo 302 – (Resolución Conjunta SPRel N° 179/2012 y SAGyP N° 715/2012)

Se entiende por Chacinados, los productos preparados sobre la base de carne y/o sangre, vísceras u otros subproductos animales que hayan sido autorizados para el consumo humano, adicionados o no con sustancias aprobadas a tal fin.

Los chacinados clasificados en embutidos (frescos, secos y cocidos) y no embutidos (frescos y cocidos) deberán cumplir con las siguientes especificaciones microbiológicas de acuerdo a su clasificación según las siguientes tablas:

CHACINADOS	EMBUTIDOS			Metodología (1)
	FRESCOS	SECOS	COCIDOS	
Parámetro	Criterio de aceptación	Criterio de aceptación	Criterio de aceptación	
Recuento de aerobios mesófilos (UFC/g)	no considerar	no considerar	n=5, c=2, m=10 ⁴ , M=10 ⁵	ISO 4833:2003 BAM-FDA:2001
Recuento de <i>E. coli</i> (NMP/g) (2)	n=5, c=2, m=10 ² , M=10 ³	n=5, c=0, m<3	n=5, c=0, m<3	ISO 16649-3:2005 ICMSF (método1) BAM-FDA:2002 (método 1) (2)
Recuento de Estafilococos coagulasa positiva (UFC/g)	n=5, c=2, m=10 ² , M=10 ³	n=5, c=1, m=10 ² , M=10 ³	n=5, c=1, m=10 ² , M=10 ³	ISO 6888-1:1999 ICMSF
Recuento de hongos y levaduras (UFC/g)	no considerar	no considerar	n=5, c=2, m=10 ² , M=10 ³	ISO 21527-2:2008; BAM-

“Desarrollo y validación de una metodología para la detección de *Listeria monocytogenes* en carne picada en carnicerías de Berisso”.

Recuento de anaerobios sulfito reductores (UFC/g)	n=5, c=2, m=10 ² , M=10 ³	n=5, c=1, m=10 ² , M=10 ³	n=5, c=1, m=10 ² , M=10 ³	ISO 15213:2003
<i>E. coli</i> O157:H7/NM	n=5, c=0 ausencia en 65 g	n=5, c=0 ausencia en 65 g	n=5, c=0 ausencia en 65 g	USDA-FSIS:2010 ISO 16654:2001 BAM-FDA:2011
<i>Salmonella</i> spp.	n=5, c=0 ausencia en 10 g	n=5, c=0 ausencia en 25 g	n=5, c=0 ausencia en 25 g	ISO 6579:2002; Co: 2004 BAM-FDA:2011 USDA-FSIS: 2011
<i>Listeria monocytogenes</i>	no considerar	n= 5, c=0, ausencia en 25 g	n= 5, c=0, ausencia en 25 g	ISO:11290-1:1996 Amd: 2004 BAM-FDA:2011 USDA-FSIS:2009
	FRESCOS	COCIDOS		
Parámetro	Criterio de aceptación	Criterio de aceptación	Metodología (1)	
Recuento de aerobios mesófilos (UFC/g)	no considerar	n=5, c=2, m=10 ⁴ , M=10 ⁵	ISO 4833:2003 BAM-FDA:2001	
Recuento de <i>E. coli</i> (NMP/g) (2)	n=5, c=2, m=10 ² , M=10 ³	n=5, c=0, m<3	ISO 16649- 3:2005 ICMSF (método1) BAM-FDA:2002 (método1) (2)	
Recuento de Estafilococos coagulasa positiva (UFC/g)	n=5, c=2, m=10 ² , M=10 ³	n=5, c=1, m=10 ² , M=10 ³	ISO 6888-1:1999 ICMSF	
Recuento de hongos y levaduras (UFC/g)	no considerar	n=5, c=2, m=10 ² , M=10 ³	ISO 21527-2:2008; BAM-FDA:2001, APHA:2001	
Recuento de anaerobios sulfito reductores (UFC/g)	n=5, c=2, m=10 ² , M=10 ³	n=5, c=1, m=10 ² , M=10 ³	ISO 15213:2003	
<i>E.coli</i> O157:H7/NM	n=5, c=0 ausencia en 65 g	n=5, c=0 ausencia en 65 g	ISO 16654:2001 USDA-FSIS:2010	

“Desarrollo y validación de una metodología para la detección de *Listeria monocytogenes* en carne picada en carnicerías de Berisso”.

<i>Salmonella</i> spp.	n=5, c=0 ausencia en 10 g	n=5, c=0 ausencia en 25 g	ISO 6579:2002; Co: 2004 BAM-FDA:2011 USDA-FSIS:2011
<i>Listeria monocytogenes</i>	no considerar	n= 5, c=0, ausencia en 25 g	ISO:11290- 1:1996, Amd: 2004 BAM-FDA:2011 USDA-FSIS:2009

(1) o su versión más actualizada

(2) para chacinados frescos, embutidos y no embutidos, se puede utilizar técnica de recuento en placa según ISO 16649-2, expresando el resultado UFC/g.

Anexo 3. Encuesta utilizada en las visitas a los comercios expendedores de carne.

Ítem	SI	NO
Carne con documentación que avala su procedencia		
Hay un lugar donde se pueda realizar la higiene y desinfección de manos y utensilios.		
El local tiene baño		
El baño ¿tiene antebañó?		
El baño ¿contacta con el lugar del expendio?		
¿Posee filtro sanitario?		
¿Posee un procedimiento de desinfección estandarizado?		
El desposte ¿Se realiza en el establecimiento?		
La carne ¿Se pica en el momento?		
Ropa completa (bota, pantalón, casaca, gorro)		
Posee cofia		
Usa guantes		
Presencia de animales		
Posee agua de red		
Agua caliente		

En el establecimiento visitado, existen otros productos tales como:

Productos cocidos	Si – No	Verduras	Si – No
Pescado	Si – No	Fiambres	Si – No
Quesos	Si – No		

Limpieza de pisos (inspección visual) Muy buena/Buena/Regular/Mala

“Desarrollo y validación de una metodología para la detección de *Listeria monocytogenes* en carne picada en carnicerías de Berisso”.

Limpieza de superficies que no contactan con el producto (inspección visual)
Muy buena/Buena/Regular/Mala

Limpieza de superficies que contactan con el producto:

Mesada	Muy buena	Buena	Regular	Mala
Cuchillos	Muy buena	Buena	Regular	Mala
Picadora	Muy buena	Buena	Regular	Mala
Bandeja	Muy buena	Buena	Regular	Mala

Estado sanitario de la ropa del personal: Muy buena/Buena/Regular/Mala

Preguntas al personal

¿Cómo se lava las manos? Sera evaluado por el inspector según lo estipulado anteriormente. Suficiente Insuficiente

¿Cómo realiza la sanitización del lugar? Sera evaluado por el inspector según lo estipulado anteriormente. Suficiente Insuficiente

NOMBRE COMERCIAL DEL LOCAL:

DIRECCION:

RESPONSABLE:

Anexo 3. Resultados de las encuestas realizadas en 110 establecimientos expendedores de carne en la ciudad de Berisso.

Ítem	Comercios	%
Carne con documentación que avala su procedencia	91	82,7
Hay un lugar donde se puede realizar la higiene y desinfección de manos y utensilios	100	90,9
El local tiene baño	94	85,5
El baño ¿tiene antebaño?	35	31,8
El baño ¿contacta con el lugar d expendio?	25	22,7

“Desarrollo y validación de una metodología para la detección de *Listeria monocytogenes* en carne picada en carnicerías de Berisso”.

¿Posee filtro sanitario?	8	7,3
¿Posee un procedimiento de sanitización estandarizado	0	0,0
El desposte ¿se realiza en el establecimiento	98	89,1
La carne ¿se tritura en el momento?	26	23,6
Ropa completa (bota, pantalón, casaca, gorro)	25	22,7
Posee cofia	11	10,0
Usa guantes	1	0,9
Presencia de animales	15	13,6
Posee agua de red	110	100
Agua Caliente	24	21,8

Comercios que comercializan otros alimentos además de carne fresca.

Productos	Comercios	%
Productos cocidos	45	40,9
Pescado	16	14,5
Quesos	34	30,9
Verduras	22	20,0
Fiambres	43	39,1

Resultados obtenidos de la inspección visual respecto a la sanitización de los pisos de los comercios expendedores de carne fresca.

“Desarrollo y validación de una metodología para la detección de Listeria monocytogenes en carne picada en carnicerías de Berisso”.

Sanitización	Comercios	%
Muy buena	0	0
Buena	32	29,1
Regular	60	54,5
Mala	16	14,5

Resultados obtenidos de la inspección visual respecto de la sanitización de las superficies que no contactan con los alimentos

Sanitización	Comercios	%
Muy buena	0	0
Buena	31	28,2
Regular	70	63,6
Mala	7	6,4

Resultados obtenidos de la inspección visual respecto de la sanitización de las superficies que no contactan con los alimentos

Mesadas		
Sanitización	Comercios	%
Muy buena	0	0
Buena	22	20,0
Regular	76	69,1
Mala	12	10,9

“Desarrollo y validación de una metodología para la detección de Listeria monocytogenes en carne picada en carnicerías de Berisso”.

Cuchillos		
Sanitización	Comercios	%
Muy buena	0	0
Buena	19	17,3
Regular	80	72,7
Mala	11	10

Picadora		
Sanitización	Comercios	%
Muy buena	0	0
Buena	18	16,4
Regular	82	74,5
Mala	10	9,1

Bandejas		
Sanitización	Comercios	%
Muy buena	0	0
Buena	20	18,2
Regular	78	70,9
Mala	11	10,0

“Desarrollo y validación de una metodología para la detección de Listeria monocytogenes en carne picada en carnicerías de Berisso”.

Resultados obtenidos de la inspección visual respecto del estado sanitario de la ropa del personal.

Sanitización	Comercios	%
Muy buena	0	0
Buena	25	22,7
Regular	77	70,0
Mala	7	6,4

- Preguntas al personal:

Lavado de manos

Suficiente 2 (1,8%) Insuficiente 108 (98,2%)

Sanitización general del comercio

Suficiente 5 (4,5%) Insuficiente 105 (95,5%)