

Diagnóstico de *Listeria monocytogenes* mediante qPCR.

René Ramírez G, MV, MSc; Giovanni Torres L, B, MSc; Manuela Henao J, Est MVZ;
Catherine Peña Est MV.

Grupo de Investigaciones en Ciencias de los Animales (INCA-CES),

Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad CES, Medellín, Colombia.

Abstract

Listeriosis is a zoonotic disease caused by gram positive intracellular bacteria, *Listeria monocytogenes* (*Lm*). This disease causes in ruminants encephalitis, septicemia, abortion, uveitis, mastitis, gastroenteritis, spinal myelitis and fever; *Lm* has been associated with the presentation of abortions in cattle, reproductive impairment that occurs in Colombian cattle without a final diagnosis in most cases. The presence of abortions in cattle is only related to diseases like Leptospirosis, Brucellosis, Bovine viral diarrhea, Infectious rhinotracheitis, among others. *Lm* has been associated with food intoxication in Colombia. This work standardized a diagnosis technique by the isolation of the pathogen agent in a selective agar base Oxford, in this agar were tasted ATCC 15313 reference strain and one field strain isolated from milk of usual milking, after extraction and purification procedure of DNA, positive controls were verified using electrophoresis in agarosa gel 2% later, molecular diagnostic technique. Chain reaction in real time polymerase was standardized (qPCR), using primers for the gene of the protein listeriolysin *hlyA*. The strain ATCC 15313 and the field strain of *Lm*, indicated differences at the DNA concentration, this was reflexed in the amplification cycles in the qPCR, showing a higher concentration of DNA in the strain ATCC 15313, amplifying from 5 cycles in the qPCR. Both strains were amplified as positives controls.

Key words: *Listeria monocytogenes*, listeriosis, cattle, qPCR, abortion, zoonosis.

Resumen

La listeriosis es una enfermedad zoonótica ocasionada por una bacteria intracelular gram positiva, *Listeria monocytogenes* (*Lm*). Esta enfermedad en rumiantes ocasiona encefalitis, septicemia, abortos, uveítis, mastitis, gastroenteritis, mielitis espinal y fiebre; *Lm* ha sido asociada con la presentación de abortos en bovinos, alteración reproductiva que se presenta en ganaderías colombianas sin obtener un diagnóstico final en la mayoría de los casos. La presentación del aborto en bovinos solo se relaciona con enfermedades como la Leptospirosis, Brucelosis, Diarrea viral bovina, Rinotraqueitis infecciosa, entre otras. *Lm* solo se ha asociado en Colombia con intoxicaciones alimentarias. Este trabajo realizó la estandarización de una técnica de diagnóstico directo mediante el aislamiento del agente patógeno en un medio selectivo Oxford, en este medio fueron probadas una cepa de referencia ATCC 15313 y una cepa de campo aislada a partir de leche de ordeño ordinario. Posterior al procedimiento de extracción y purificación de ADN, se verificaron los controles positivos empleando electroforesis en gel de agarosa al 2%, posteriormente fue estandarizada la técnica de diagnóstico molecular la reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (qPCR), utilizando cebadores para el gen *hlyA* de la proteína listeriolisina. La cepa ATCC 15313 y la cepa de campo de *Lm* presentaron diferencias en la concentración ADN, esto se reflejó en los ciclos de amplificación en la qPCR, presentando una mayor concentración de ADN la cepa ATCC 15313, amplificando a partir de 5 ciclos en la qPCR, ambas cepas amplificaron como controles positivos.

Palabras claves: *Listeria monocytogenes*, listeriosis, ganado bovino, qPCR, aborto, zoonosis.

Resumo

Listeriose é uma zoonose causada por uma bactéria gram-positiva intracelular, *Listeria monocytogenes* (*Lm*). Em ruminantes é caracterizada por ocasionar encefalite, septicemia, abortos, uveíte, mastite, gastroenterite, mielite espinal e febre. *Lm* tem sido associada com a apresentação de abortos em bovinos e deficiência reprodutiva que ocorre em fazendas colombianas, sem um diagnóstico definitivo na maioria dos casos. A apresentação do aborto em bovinos apenas está relacionada a doenças como a leptospirose, brucelose, diarreia viral bovina, rinotraqueíte infecciosa, entre outros. *Lm* só tem sido associada com intoxicação alimentar na Colômbia. Em nosso trabalho, ocorre a

padronização de uma técnica de diagnóstico direto pelo isolamento do patógeno em Oxford meio seletivo. Neste meio foram testados uma referência ATCC 15313 e uma cepa de campo isolada em leite ordenha regular. Após o procedimento de extração e purificação de DNA, os controles positivos foram verificados utilizando-se eletroforese em gel de agarose a 2%, sendo posteriormente padronizada reação em cadeia de diagnóstico molecular, técnica da polimerase em tempo real (qPCR), utilizando iniciadores para o gene *hlyA* proteína de listeriolisina. A estirpe ATCC 15313 e da estirpe de campo *Lm* diferiam na concentração de DNA, o que se reflete nos ciclos de amplificação no qPCR, com uma concentração mais elevada de DNA da estirpe ATCC 15313, com amplificação começando em 5 ciclos no qPCR ambas as estirpes amplificadas como controles positivos.

Palavras chave: *Listeria monocytogenes*, listeriose, gado, qPCR, aborto, zoonose.

Introducción

La *Listeria monocytogenes* (*Lm*) es una bacteria intracelular gram positiva, anaerobia facultativa, se multiplica en amplios rangos de temperatura, entre los 1 a 45°C. No esporula, pero tolera PH entre 5.5 y 9.5. Se encuentra en agua, vegetales, heces y es considerada uno de los más importantes agentes patógenos en enfermedades de transmisión alimentaria, como la listeriosis (1,2).

Los reservorios de *Lm* son el hombre, animales silvestres y domésticos, la mayoría de casos han sido reportados en rumiantes (3). Esta bacteria se transmite a los humanos por contacto directo con animales infectados o consumo de alimentos contaminados. En animales, la forma más común de infección es por vía oral o por consumo de alimentos contaminados como el pasto, siendo la fuente más importante de la infección (2). *Lm* en animales domésticos está asociada con cuadros clínicos de encefalitis, septicemia y abortos (4).

La Listeriosis es una zoonosis que se caracteriza por ocasionar en rumiantes, encefalitis, septicemia, abortos, uveítis, mastitis, gastroenteritis, mielitis espinal y fiebre (5,6); además ha sido asociada frecuentemente en abortos en bovinos (7), pero en Colombia no se ha reportado como responsable de estos. Existen reportes de aislamiento de *Listeria*

monocytogenes en derivados lácteos como quesos y tanques de leche de acopio en Colombia (8), la identificación de *Lm* en Colombia ha sido por medio de PCR en muestras tomadas leche y canales, lo que demuestra que es una bacteria presente en nuestro país (9,10).

La aparición de abortos por agentes infecciosos es un fenómeno que impacta negativamente la rentabilidad de los productores bovinos colombianos; sin embargo, en ocasiones no es posible realizar diagnósticos apropiados ya que el productor, por temor a encontrar algún patógeno importante, no reporta los casos, pues considera que se puede perjudicar, aún más, las utilidades del negocio. Para muchos de los abortos en bovinos no se emplean métodos de diagnóstico directo. En las escasas ocasiones en las que se lleva a cabo un diagnóstico de aborto bovino por otros agentes infecciosos, se atribuye a otras enfermedades como la Leptospirosis, Brucelosis, Diarrea viral bovina, Rinotraqueitis infecciosa bovina, Neosporosis bovina, entre otras (11), dejando a un lado a este microorganismo. *Lm* está asociada generalmente sólo con intoxicaciones alimentarias en Colombia y no existen reportes de aislamientos en fetos abortados.

La listeriosis en humanos aunque se asocia a una enfermedad gastrointestinal (4), también se ha reportado como una importante causa de abortos (12). En la cadena de transmisión de la enfermedad es importante relacionar el contacto con el microorganismo *Lm* a través de la ingesta de alimentos como derivados lácteos y cárnicos contaminados.

La reacción en cadena de la polimerasa PCR ha demostrado ser un método con alta sensibilidad y especificidad para el diagnóstico de listeriosis al ser comparado con métodos convencionales para el aislamiento y pruebas bioquímicas de clasificación de la bacteria (13).

Este trabajo busca estandarizar los protocolos de técnicas directas de diagnóstico, los cuales incluyen el uso de medios selectivos para aislamiento microbiológico y pruebas de diagnóstico molecular como qPCR, a partir de la extracción de ADN genómico y de esta manera ampliar el horizonte de pruebas de diagnóstico directo para nuestro medio que puedan ser ofrecidas al sector productivo ganadero Colombiano para la industria alimenticia a partir del control de calidad de cárnicos y productos lácteos.

Materiales y métodos

Metodología

Cepas de *Listeria monocytogenes*

Se utilizó una cepa comercial (ATCC 15313), y una cepa de campo obtenida en trabajos de investigación con mastitis en el departamento de Antioquia en la región del altiplano norte, estas muestras se obtuvieron de tanques de leche y fueron transportadas en medios Stuart bajo condiciones de refrigeración a 4°C (datos no publicados) y posteriormente fueron almacenadas en medio Skinmilk y refrigeradas a 4°C, luego fueron identificadas con medios de cultivo selectivo Oxford y mediante pruebas bioquímicas. Las cepas fueron descongeladas y reactivadas, empleando un agar de transporte enriquecido BHI (*Brain, heart infusión*), (ICMT- CES. Medellín. Colombia) e incubadas durante 24 horas a 37°C, las cepas fueron sembradas en el medio selectivo Oxford (Oxoid Microbiology products. Atlanta. USA) el cual contenía: base de agar sangre Columbia 39 g/L, aesculina 1 g/L, citrato de amonio ferrico 0,5 g/L, clorhidro de Litio 0,5 g/L y suplementado con *Selective Supplement for Listeria*. (Scharlau. USA) el cual contenía cycloheximida 200 mgr, colistin sulfato 10 mgr, acriflavina 2,5 mgr, cefotetan 1 mgr y fosfomicina 5 mgr. Las cepas fueron desprendidas del medio en 200 ul de PBS estéril y congeladas a -20°C.

Extracción y purificación de ADN de las cepas de *L. monocytogenes*

El ADN fue purificado a partir de los cultivos la bacteria en agar selectivo, se tomaron colonias del cultivo en 1000 ul de PBS, se centrifugaron y fueron eliminados los sobrenadantes, las bacterias fueron resuspendidas en 200 ul de PBS, el complejo de bacterias y PBS (200ul) fueron sometidos a 200 ul del tampón de lisis para bacterias Gram positivas (20 mM Tris-HCl, pH 8.0; 2 mM sodium EDTA; 1.2% Triton X-100; 20 mg/mL lysozyme) y posteriormente incubados a 37°C durante 30 minutos. Posteriormente se utilizó el kit de extracción de ADN DNeasy (Quiagen. Turnberry Lane Valencia. USA) empleando el protocolo para bacterias gram positivas; Las muestras fueron procesadas de acuerdo al protocolo del fabricante (Quiagen). El ADN fue diluido en el tampón final en 100 ul y posteriormente alicuotado para ser cuantificado empleando un equipo Nanodrop 2000 (Thermo Scientific. Wilmington. USA) y posterior valoración de su integridad mediante electroforesis. El ADN fue congelado a -20°C.

Las muestras del ADN purificadas fueron corridas en un gel de agarosa al 2 % a 100V durante 50 minutos y luego fueron reveladas en un equipo procesador de imagen Uvp (Biolimaging systems Cambridge UK). El tamaño del ADN genómico obtenido fue de 2000 pb.

Validación qPCR para *Listeria monocytogenes*

Las pruebas de qPCR se realizaron usando un volumen final de 25 µl que contenían 200 nM de cada cebador 0,5 µl de cebador forward y 0,5 µl de cebador reverse, 5 µl de ADN, 12,5 µl de 1X SYBR Green I PCR Master mix invitrogen™ (Invitrogen, USA) y se adicionaron 6,5 µl de H₂O DEPC. Los controles positivos se emplearon con dos diluciones 1/10 y 1/100. Las secuencias de los cebadores se obtuvieron de las bases de datos (GenBank, National Center for Biotechnology Information) de la secuencia del gen *hlyA* del genoma de *Lm*: Cebador forward: (PF) 5' TGC AAG TCC TAA GAC GCC A 3'; y Cebador reverse (PR) 5' CAC TGC ATC TCC GTG GTA TAC TAA 3' (14). Las temperaturas de alineamiento de los cebadores fueron 53,9°C y 54,9°C, respectivamente, con un peso molecular de 5.781,9 g/moles y 7.287,6 g/moles (Ver Tabla 1).

El perfil térmico de la qPCR fue el siguiente: una fase de desnaturalización de 95°C/15 minutos, seguido de una fase de 35 ciclos a 94°C/30 segundos, 55°C/40 segundos, 72°C/60 segundos y una fase de elongación de 72°C/3 minutos, con rango de temperatura para la curva de Melt de 65 a 85°C. La prueba qPCR se realizó empleando un equipo Rotor-Gene™ 6000 real- time rotary analyzer (Corbett Research. Australia). Los resultados de amplificación en tiempo real se analizaron usando el software Rotor- Gene 6000 series 1,7. Las curvas de qPCR y la normalización de la fluorescencia se establecieron mediante un Ct (Threshold value) de 0,02.

Tabla 1. Descripción de cebadores empleados en la qPCR para la secuencia del gen *hlyA* de *Listeria monocytogenes*

Cebador							
Secuencia (5'->3')		TM	Longitud	Densidad óptica	Escala	Contenido GC	Peso molecular
Cebador F.	TGC AAG TCC TAA GAC GCC A	53.9°C	19	10.0 OD	0.2umoles	52.6%	5781.9 g/mole
Cebador R.	CAC TGC ATC TCC GTG GTA TAC TAA	54.9°C	24	11.0 OD	0.2umoles	45.8%	7287.6 g/mole

Resultados

Producción de cepas de Listeria monocytogenes

El crecimiento de las cepas presento un cambio de color del agar selectivo, las colonias se observaron color negro brillante, con bordes definidos de 4 mm, las cepas de *Lm* posteriormente fueron sometidas a tinción diferencial de Gram, logrando obtener microorganismos Gram positivos pleomorficos, cocobacilares compatibles con *Lm* (Ver Figura 1).



Figura 1. Crecimiento en 24 horas a 37°C de la cepa ATCC 15313 de *Listeria monocytogenes*.

Extracción y concentración de ADN

Los resultados de la cuantificación presentaron concentraciones en la cepa ATCC 15313 de 57,8 ng/ul y la cepa de campo 30,6 ng/ul, la cepa de campo presento una concentración menor que la cepa de referencia, estos resultados fueron corroborados en el gel de agarosa al observar las bandas de ADN y en la curva de amplificación de fluorescencia en la qPCR, la concentración de ADN de la cepa de campo presento una relación 260 - 280 de 1,91 y 260 - 230 de 2,41. Para la cepa ATCC 15313 la relación 260 - 280 fue de 1,93 y la relación 260 - 230 de 3,25.

Verificación de la integridad de ADN

En gel de agarosa al 2% para observar la integridad de ADN, se puede observar la formación adecuada de bandas en la cepa ATCC 15313, se observa una intensidad de banda mayor a la cepa de campo, no se observó degradación de ninguna de las muestras evaluadas (Ver Figura 2).

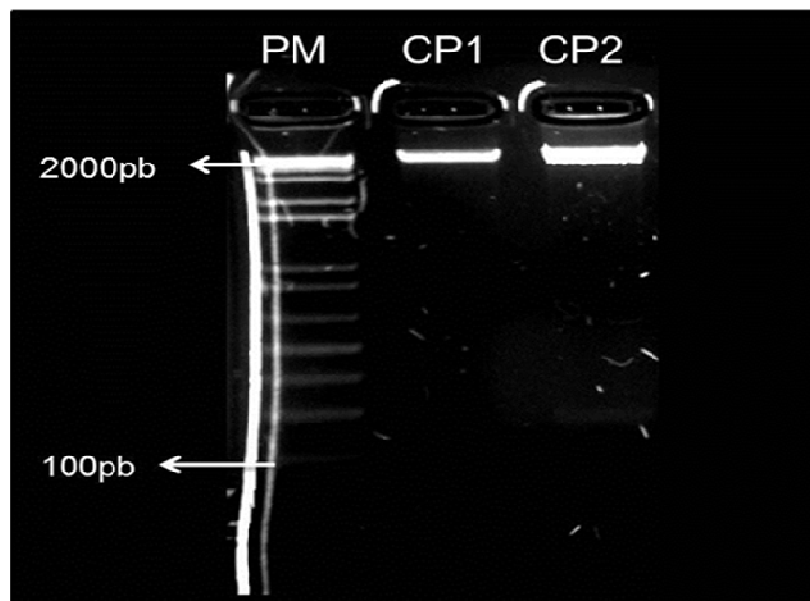


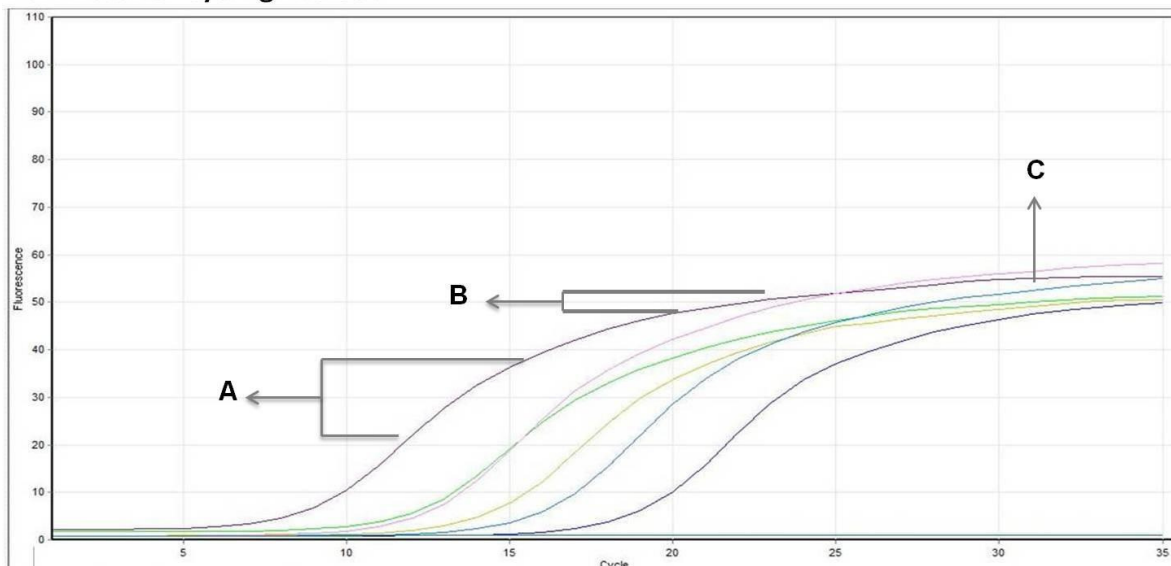
Figura 2. Electroforesis en gel de agarosa 2% de ADN de *Listeria monocytogenes*. PM marcador de peso molecular 100 pb, CP1 ADN de cepa nativa de *Listeria monocytogenes*, CP2 ADN de cepa ATCC 15313 de *Listeria monocytogenes*.

qPCR de la secuencia del gen *hlyA*

Las pruebas de qPCR presentaron una amplificación de los segmentos de ADN del gen *hlyA* a partir del quinto ciclo, la primera muestra de ADN que presentó niveles de amplificación de la secuencia del gen *hlyA* fue la muestra de ADN sin dilución de la cepa ATCC 15313, la muestra de ADN que obtuvo el mayor pico de fluorescencia fue la dilución 1/ 10 de la misma cepa. El ADN de las cepas de campo presentó la amplificación de la secuencia del gen *hlyA* después del décimo ciclo (Ver Figura 3). En el proceso de amplificación de la secuencia del gen *hlyA* se observa en la fase inicial de crecimiento geométrico como la cepa ATCC 15313 y sus diluciones realizan esta fase antes que la cepa nativa (Ver Figura 3 A). En la fase lineal y estacionaria el comportamiento de las

cepas es el mismo, en la dilución de la cepa ATCC 15313 1/10, se observa como la fase lineal supera la misma fase de la cepa pura ATCC 15313.

Raw Data For Cycling A.Green



No.	Colour	Name	Genotype	Peak 1	Peak 2	Peak 3	Peak 4	Peak 5	Peak 6	Peak 7	Peak 8	Peak 9	Peak 10	Peak 11
1	Green	DNA puro M1		65,75	68,15	70,50	77,75	81,00	87,00	89,00	90,50	92,50		
2	Yellow	DNA 1/10 M1		66,25	69,00	78,00	83,75	87,65	90,50	92,75				
3	Blue	DNA 1/100 M1		68,75	70,90	78,10								
4	Purple	DNA puro M2		66,50	68,65	70,90	75,00	77,90	86,15	89,50	92,15	93,25		
5	Pink	DNA 1/10 M2		66,25	69,40	72,50	75,25	78,00	83,25	85,25	90,25	92,90		
6	Cyan	DNA 1/100 M2		66,00	67,75	69,75	72,25	75,50	78,15	83,90	86,90	89,25	91,50	94,10
7	Teal	CN		66,35	69,25	73,00	77,75	80,35	82,75	85,65	87,75	90,50	92,75	

Cycle	Cycle Point
Hold @ 95°C, 15 min o secs	
Cycling (35 repeats)	Step 1 @ 94°C, hold 30 secs
	Step 2 @ 55°C, hold 45 secs
	Step 3 @ 72°C, hold 50 secs, acquiring to Cycling A([Green][1][1])
Hold 2 @ 72°C, 3 min o secs	
Melt (65-95°C), hold secs on the 1 st step, hold 5 secs on next steps, Melt A([Green][1][1])	

Figura 3. Curva de florescencia de la secuencia amplificada del gen *hlyA* de *Listeria monocytogenes*. A. Fase geométrica o exponencial B. Fase lineal C. Fase estacionaria.

La curva de Melt de la secuencia del gen *hlyA* presento para todos los controles positivos y sus diluciones un descenso con la misma tendencia y sin diferencia aparente en los niveles de florescencia (Ver Figura 4).

Melt data for Melt A.Green

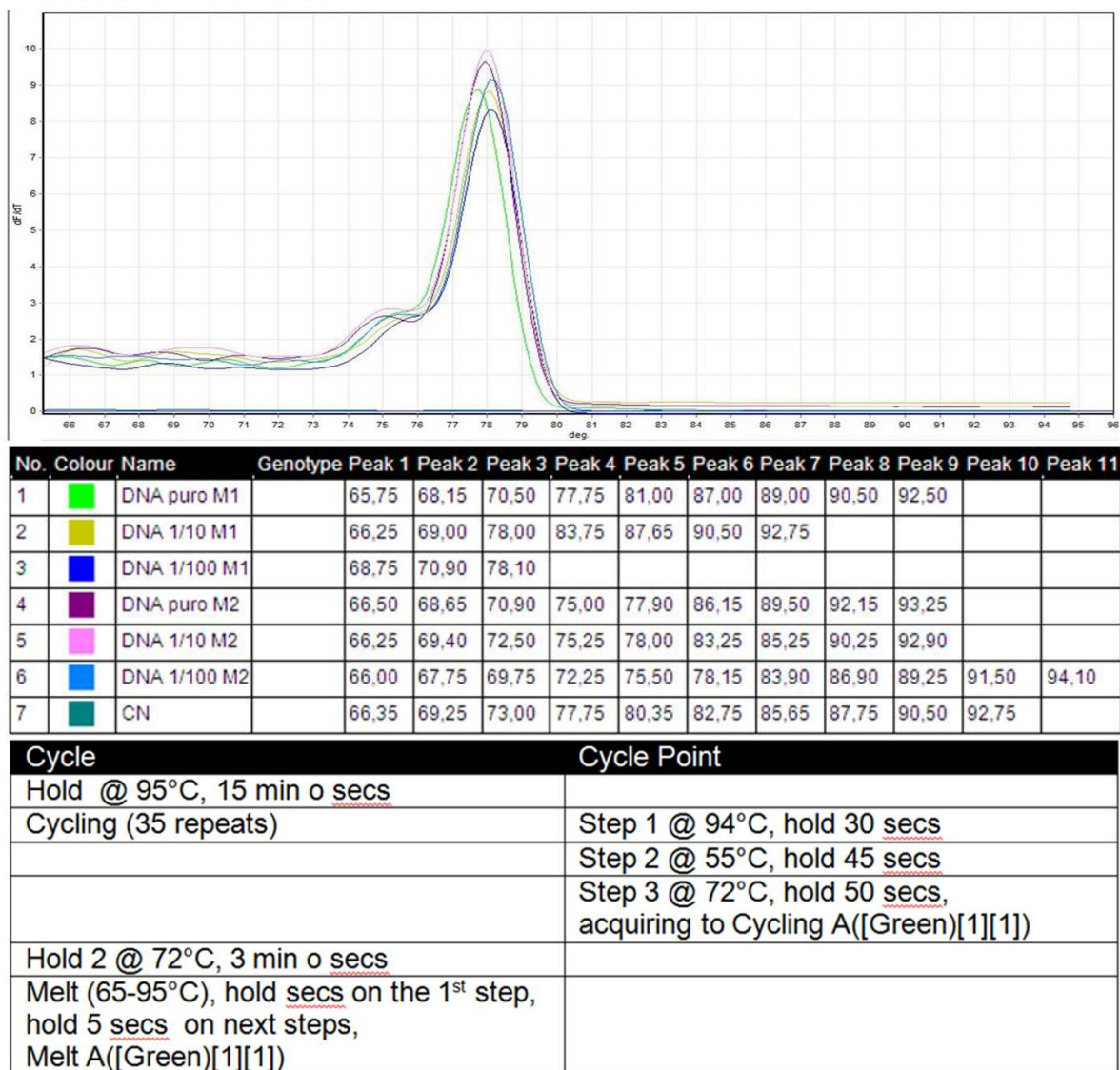


Figura 4. Curva de Melt de la secuencia amplificada del gen *hlyA* de *Listeria monocytogenes*.

El valor de Ct (Threshold cycle) o ciclo donde se empieza detectar la amplificación de la prueba fue de 0,02 (Ver Figura 5), la eficiencia de la prueba fue calculada empleando el software LinRegPCR y fue calculada en 100%.

Quantitation data for Cycling A.Green

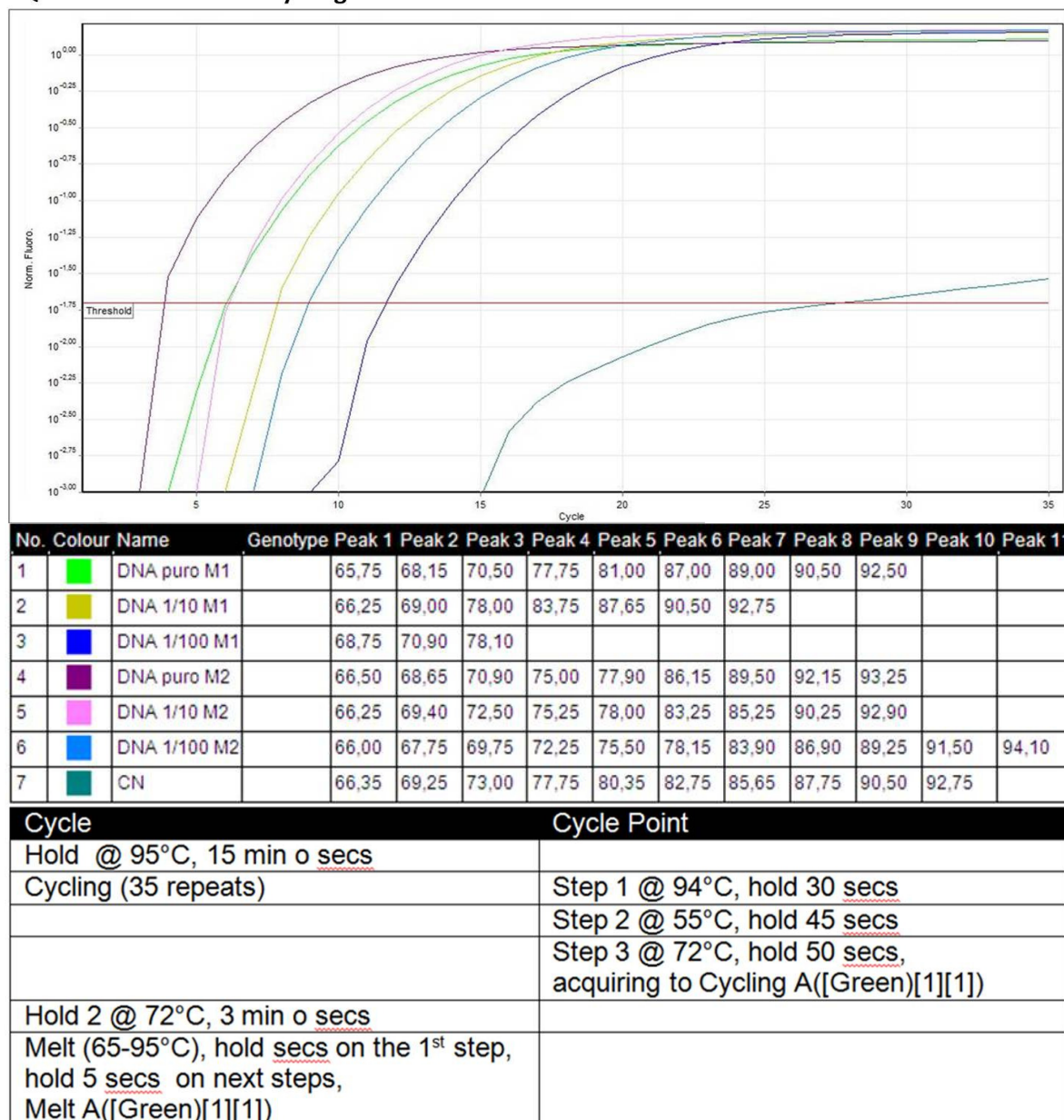


Figura 5. Curva de fluorescencia de la secuencia amplificada del gen *hlyA* de *Listeria monocytogenes* y la línea de Ct con valor de 0,02.

Discusión

Actualmente los métodos diagnóstico moleculares se convierten en una buena alternativa para el diagnóstico de enfermedades infecciosas. La importancia del diagnóstico en los procesos de aislamiento en medios selectivos específicos y realizar pruebas moleculares como qPCR a partir de ADN obtenido de muestras de tejidos, secreciones sospechosas, incluso productos de la industria de alimentos, ayudan a diagnosticar el microorganismo *Listeria monocytogenes*. Este proceso diagnóstico demostró que la utilización de ADN de cepas nativas de *Lm* y cepas de referencia ATCC como controles positivos en las pruebas de amplificación de la secuencia del gen *hlyA*, no presenta diferencias en los resultados de las pruebas de qPCR, aunque se presenten concentraciones diferentes de ADN. Estos resultados posibilitan la implementación de la técnica de diagnóstico molecular qPCR para el diagnóstico de *Lm* a partir de muestras de campo sin requerir el aislamiento del microorganismo, lo cual representa una ventaja respecto al tiempo que se requiere para el aislamiento microbiológico, además de poder contar con una prueba de alta sensibilidad y especificidad como la prueba de qPCR.

Este procedimiento diagnóstico de *Lm* es de interés en el campo de las enfermedades de origen veterinario transmitidas por alimentos a los humanos. En Colombia ya se ha trabajado con diagnóstico molecular para la bacterias del género *Listeria*, en un trabajo de investigación realizado con derivados lácteos no se reportó la presencia de *Lm*, mediante la implementación de pruebas moleculares como PCR (3), este trabajo realizado en quesos provenientes de mercados de la región norte del país, presentó como mayor agente patógeno diagnosticado en estos quesos a *L. ivanovii* en un 14.75% (3), no obstante en la industria alimenticia cárnica y láctea se realizan controles estrictos de la presencia de *Lm* en los procesos de control de calidad microbiológica, debido a la presencia del agente como contaminante proveniente de los sistemas productivos animales (10). Poder realizar diagnósticos precisos en casos sospechosos en animales con la ayuda de técnicas moleculares, ayudara a controlar factores de riesgo asociados a contaminación de alimentos e impactar en la casuística reportada en humanos, especialmente en mujeres gestantes con partos prematuros, abortos involuntarios, sepsis neonatal y muerte fetal como posible efecto por la infección por *Lm* (15,16).

La listeriosis en otros países como estados unidos presenta un índice de mortalidad de 19% en humanos infectados y representa una de las tres infecciones alimentarias más

importantes en este país (17). En Colombia se presenta un sub registro de casos, no existen muchos reportes sobre la infección alimentaria, pero existe un reporte de 26% de mortalidad en casos presentados por la contaminación y transmisión de la enfermedad desde la industria de alimentos (10). Esto indica que la circulación del microorganismo es una realidad y que *Lm* se encuentra en sistemas productivos bovinos especialmente, asociados a la producción de carne y leche como parte de la cadena de transmisión de la enfermedad y el aborto bovino es un importante mecanismo de contaminación de alimentos por el manejo que reciben fetos abortados, secundinas y animales en tratamiento. Poseer técnicas moleculares que permitan realizar diagnósticos de la presencia de *Lm* en estos animales o en la industria alimenticia ayudara a controlar la infección hacia los humanos.

Las principales ventajas del diagnostico mediante la técnica molecular qPCR para *Lm* son: el nivel de detección del segmento del genoma de *Lm* es mínimo , debido a que la sensibilidad de las pruebas moleculares es muy alta al igual que la especificidad, esto se debe a que es posible lograr la amplificación de segmentos altamente específicos de la bacteria a partir de bajas cantidades de genoma bacteriano, por este motivo se reduce la presentación de muestras clínicas con resultados falsos positivos o negativos y en muestras de campo, donde la cantidad de bacterias puede ser mínima, podría efectuarse un diagnostico preciso a partir de baja cantidad de ADN. Otra importante ventaja del uso de qPCR es la reducción del uso de sustancias contaminantes como el bromuro de etidio empleado en la electroforesis de la técnica de PCR convencional, mediante el uso de qPCR no es necesario realizar electroforesis, disminuyendo los riesgo de contaminación del personal especializado en el diagnostico de enfermedades. Las desventajas del diagnóstico de *Lm* mediante qPCR, sin duda es el alto valor económico de la prueba, debido al costo de los termocicladores empleados para el diagnostico en tiempo real y algunos reactivos. Otra desventaja de la prueba es que se requiere de personal altamente calificado en el procesamiento de muestras y en la implementación de la técnica, debido a que existen muchas variables que deben manejarse con sumo cuidado para obtener resultados apropiados

Este trabajo pretende además llamar la atención sobre la importancia de los métodos diagnósticos, presentar alternativas a los métodos tradicionales, como el aislamiento de microorganismos relacionados con la transmisión de enfermedades por alimentos de origen

animal y resaltar la importancia de las pruebas moleculares como qPCR para el diagnóstico de *Lm*.

Conclusiones

Se logró el diagnóstico de *Listeria monocytogenes* mediante la técnica molecular qPCR, empleando una cepa de campo y una cepa de referencia ATCC 15313 como controles positivos. Los resultados demuestran que los cebadores empleados para el diagnóstico de *Lm* qPCR reconocen cepas de campo y cepas ATCC, lo que indica que esta prueba es reproducible y puede ser útil para el diagnóstico del microorganismo *Lm* en nuestro medio. Este método diagnóstico es novedoso y ayuda a detectar de manera eficaz y segura la presencia de *Listeria monocytogenes* en los hatos ganaderos de Colombia. Este es un método diagnóstico de alto valor económico al compararlo con otros métodos, no obstante existe una tendencia mundial con el uso de tecnologías más seguras con el medio ambiente, logrando disminuir el riesgo de contaminación ambiental, incluso la contaminación del personal de laboratorio encargado de procesar muestras clínicas como ocurre con el uso de PCR convencional, cuando se emplea el bromuro de etidio como sustancia intercalante en la electroforesis.

La utilización de qPCR para el diagnóstico de *Lm* se podría emplear en muestras clínicas de secreciones, leche, tejidos y hasta cultivos de microorganismos en medios no selectivos, ayudando con el diagnóstico final en muestras clínicas y en muestras provenientes de la industria alimenticia.

Referencias

1. Allerberger F, Wagner M. Listeriosis: a resurgent foodborne infection. *Clinb Microbiol Infect.* 2010;16:16-23.
2. Wesley g.n. Listeriosis in animals. *In: listeria, listeriosis, and food safety*, ryser e. & marth e; Eds. Marcel dekker, nueva york, ny, EE.UU. 1999:39–73.
3. Gallegos J, Arrieta G, Máttar S, Poutou R, Trespalacios A, Carrascal A. Frecuencia de *Listeria* spp., en quesos Colombianos costeños. *Revista MVZ Córdoba.* 2007;12(2):996-1012.
4. Shayna LW, Jackeline B, Jung KL, Swetta R, Michelle B, Jim C. Clinical, pathological and genetic characterization of *Listeria monocytogenes* causing sepsis and necrotizing typhocolitis and hepatitis in a foal. *Journal of veterinary diagnostic investigation.* 2012;24(3):581-586.
5. Walker RL. *Listeria.* *In: Veterinary Microbiology*, Hirsh D.C. & Zee Y.C; Eds. Blackwell Science, Malden, Massachusetts, EE.UU. 1999:225–228.
6. Hird DW, Genigeorgis C. *In: Listeriosis in Food Animals: Clinical Signs and Livestock as a Potential Source of Direct (Nonfoodborne) Infection for Humans.* Eds. Elsevier, Amsterdam, Países Bajos. 1990:31–39.
7. Akpavie SO, Ikheola JO: An outbreak of listeriosis in cattle in Nigeria. *Rev Elev Med Vet Pay Trop* 1992, 45(3-4): 263-4.
8. Sánchez RA, Andrade RJ, Pulido MO. Determinación de la presencia de *Listeria monocytogenes* en hatos lecheros del altiplano boyacense. *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias.* 2009;22(3):478-479.
9. Poulsen KP, Czuprinsky CJ. Pathogenesis of listeriosis during pregnancy. *Anim Health Res Rev.* 2013;25:1-10.
10. Torres KJ, Sierra SC, Poutou RA, Vera H, Carrascal AK, Mercado M. Incidencia y diagnostico de *Listeria monocytogenes*, microorganismo zoonotico emergente en la induatria de alimentos. *Rev UDCA Act Divulg ciento* 2004, 7(1): 25-57.
11. Zambrano J, Cotrino V, Jimenez C, Romero M, Guerrero B. Evaluación serológica de *Neospora caninum* en bovinos en Colombia. *Revista Acovez.* 2001;26:5-10.
12. Shalaby MA, Mohamed MS, Mansour MA, Abd- El-Haffis SS. Comparison of polymerase chain reaction and conventional methods for diagnosis of *Listeria monocytogenes* isolated from different clinical specimens and food stuffs. *Clin Lab.* 2011;57(11-12):919-2.

13. Farber JM, Peterquin PI. *Listeria monocytogenes*, a food-borne pathogen. Microbiol Rev. 1991;55:476-511.
14. Yang HQuL, Wimbrow AN, Jiang X, Sun Y. Rapid detection of *Listeria monocytogenes* by nanoparticle-based immunomagnetic separation and real-time PCR. Int J Food Microbiol. 2007;118(2):132–138.
15. Azevedo I, Regalo M, Mena C, Almeida G, Carneiro L, Teixeira P, Hogg T, Gibbs P: Incidence of *Listeria* spp. in domestic refrigerators in Portugal. Food Control 2003, 16(2):121–124.
16. Von Laer AE, Lima ASL, Trindade PS, Andriguetto C, Destro MT, Silva WP: Characterization of *Listeria monocytogenes* isolated from a fresh mixed sausage processing line in Pelotas-RS by PFGE. Braz J Microbiol 2009 40:574–582.
17. Scallan E, Hoekstra RM, Angulo FJ, Tauxe RV, Widdowson MA, Roy SL, Jones JL, Griffin PM: Foodborne illness acquired in the United States—major pathogens. Emerg Infect Dis 2011, 17(1):7–15.