

Detección e identificación de bacterias causantes de enfermedades transmitidas por alimentos mediante la reacción en cadena de la polimerasa

Rafael Antonio Rojas-Herrera, Tania González-Flores*

RESUMEN

La lucha contra los microorganismos patógenos, causantes de enfermedades transmitidas por alimentos (ETA) requiere de procedimientos adecuados de inspección sanitaria, lo que ha llevado al desarrollo de métodos cada vez más rápidos y efectivos para la detección e identificación de bacterias nocivas en las áreas en las que la seguridad biológica es de mucha importancia. Las técnicas de identificación basadas en el cultivo y las características fenotípicas de las bacterias son laboriosas y pueden requerir varias semanas para obtener resultados, lo cual no resulta viable cuando se analizan alimentos perecederos como los lácteos y la carne fresca. La aplicación de métodos de detección independientes de cultivo, como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) puede ayudar a resolver los problemas antes mencionados, aun cuando es necesario que estos métodos cuenten con una validación internacional. En el presente trabajo se revisa la utilidad, ventajas y desventajas de la PCR como herramienta para la detección e identificación de bacterias patógenas en muestras de alimentos, así como las nuevas tendencias en el uso de estas herramientas moleculares de diagnóstico y los esfuerzos actuales tendientes a su estandarización internacional.

Palabras clave: PCR, detección, bacterias patógenas, alimentos.

ABSTRACT

Struggle against food-borne pathogenic microorganisms is based on plausible policies for sanitary inspection, thus leading to the development of faster and more effective methods for detecting and identifying hazardous bacteria in those areas where biological hazard pose a security problem. Identification techniques based on culture methods and phenotypic characteristics of bacteria are tedious and can overtake weeks, making them impractical for analyzing perishable foodstuff such as dairy, meat, poultry and fish. The application of culture-independent methods such as the polymerase chain reaction (PCR) can help to solve this problem. Current efforts are aimed to the establishment of international standards for the application of PCR-based methods for the detection of pathogenic bacteria in foods. In this paper, the usefulness and advantages/disadvantages of PCR as a tool for the identification of pathogenic bacteria in foodstuff, as well as the new trends of its application and current efforts toward international standardization of protocols are reviewed.

Key words: PCR, detection, pathogenic bacteria, food.

INTRODUCCIÓN

Las bacterias pueden ocasionar enormes pérdidas económicas no sólo porque deterioran los productos alimenticios, sino que, además, algunas patógenas re-

sultan extremadamente difíciles de eliminar de los alimentos, lo que origina diversas enfermedades en los consumidores.

Una de las principales fuentes de contagio con bacterias patógenas es el consumo de alimentos contami-

* Unidad Sureste. Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco, A. C. Av. Normalistas 800 S.H. Colinas de la Normal. Guadalajara, Jalisco, México.

Correspondencia:

Dr. Rafael Antonio Rojas-Herrera. Unidad Sureste. Calle 30 Núm. 151 x 7 y 7-A. Colonia García Ginerés. Mérida, Yucatán, México. 97070. e-mail: rrojas@ciatej.net.mx

Recibido: 02-06-2005

Aceptado: 07-02-2006

nados, entre los que se pueden mencionar pescados y mariscos,¹⁻⁴ productos cárnicos y avícolas, productos lácteos, vegetales,⁵ huevos frescos⁶ e incluso la miel de abeja.⁷ Se ha demostrado que los alimentos se pueden contaminar durante su procesamiento o por el empleo de materia prima contaminada pues algunas de estas bacterias constituyen parte de la flora normal de aves, cerdos y ganado. También se ha sugerido la posibilidad de contaminación en alimentos deshidratados, debido a un manejo doméstico inadecuado.⁸

Las enfermedades transmitidas por alimentos (ETA) continúan siendo una amenaza a la salud pública en todo el mundo y son una causa importante de morbilidad. Aunque la mayoría son leves y se asocian a síntomas gastrointestinales agudos tales como diarrea y vómito, en algunas ocasiones la ETA es mucho más severa y peligrosa para la vida, especialmente en niños, y la infección puede ocasionar enfermedades crónicas.⁵

En el presente trabajo se revisa la utilidad, ventajas y desventajas de la PCR como herramienta para la detección e identificación de bacterias patógenas en muestras de alimentos, así como las nuevas tendencias en el uso de estas herramientas moleculares de diagnóstico y los esfuerzos actuales tendientes a su estandarización internacional.

ETIOLOGÍA DE LAS ETA

En años recientes, la etiología de las ETA ha cambiado, a la vez han surgido patógenos nuevos o cepas más agresivas y resistentes a los antibióticos. Entre las enfermedades que son catalogadas como emergentes se incluyen la ocasionada por *Escherichia coli* enterohemorrágica (particularmente el serovar O157:H7), *Campylobacter jejuni* y *Salmonella typhimurium* del tipo definitivo (DT) 104.⁵ Las bacterias más frecuentemente asociadas a casos de infecciones por consumo de alimentos contaminados aparecen enlistadas en el *cuadro I*. La participación de *E. coli* en las enfermedades humanas ha sido reconocida prácticamente desde su descubrimiento. En años recientes la industria de alimentos ha reenfocado su atención sobre este microorganismo como una causa de morbilidad y mortalidad significativa y reconoce su valor como un indicador del estado higiénico de muchos tipos de alimentos. Por esa razón, *E. coli* es uno de los patógenos que mayor atención han recibido y hacia las cuales se ha dirigido la mayor parte de las investigaciones.

La cepa de *E. coli* productora de la toxina Shiga (STEC), también conocida como *E. coli* verotoxigénica,

fue descubierta a finales de los años 70 en Canadá. Por otra parte, la cepa enterohemorrágica (EHEC) O157:H7 se aisló por primera vez en 1975 y se identificó en 1982 como un patógeno importante presente en los alimentos.⁹ Estas bacterias, además de las citotoxinas, pueden producir otros factores virulentos como la intimina, la hemolisina y proteínas asociadas a la virulencia.^{10,11}

De acuerdo al Servicio de Inspección y Seguridad Alimenticia (FSIS: *Food Safety Inspection Service*) del Departamento de Agricultura de los Estados Unidos (USDA), la presencia de al menos 1 unidad formadora de colonias (UFC) de *E. coli* O157:H7 en la carne molida de res constituye un factor de riesgo para el consumidor,¹² lo que implica entonces disponer de métodos con niveles de sensibilidad adecuados a estas exigencias.

Por otra parte, este microorganismo continúa siendo un desafío a la seguridad alimenticia debido a la amplia diversidad de tipos dentro de la especie, que van desde comensales inofensivos hasta patógenos humanos. Esta misma situación se observa entre las especies del género *Vibrio* con algunas cepas que son utilizadas como probióticos en la alimentación de camarones,¹³ mientras que *Vibrio cholerae* es el agente causal del cólera que puede transmitirse a los humanos por el consumo de pescado o mariscos contaminados. En otros géneros, como *Bacillus*¹⁴ y *Enterococcus*,¹⁵ también se incluyen bacterias útiles en la producción de alimentos y patógenas para los seres humanos.

DETECCIÓN DE PATÓGENOS EN ALIMENTOS

La detección y la enumeración de microorganismos en alimentos o en superficies que tienen contacto con alimentos constituyen una parte importante de cualquier esquema de control de calidad. Debido a esto es necesario implementar técnicas de detección para efectuar la vigilancia y el control de dichos microorganismos y prevenir las enfermedades que éstos producen. El establecimiento de medidas de control apropiadas requiere de métodos confiables de diferenciación entre bacterias patógenas y no patógenas, así como de bacterias ubicuas presentes en el suelo, el agua y el tracto gastrointestinal,¹⁶ lo cual implica que deben ser rápidos y sensibles pero sobre todo altamente específicos.

El interés general en los métodos alternativos de detección y/o cuantificación de microorganismos ha sido estimulado en parte por el incremento en la producción de alimentos y por la aplicación de procedi-

Cuadro I. Algunos protocolos basados en la reacción en cadena de la polimerasa desarrollados para la detección e identificación de bacterias patógenas en alimentos.

Microorganismo	Trastorno que ocasiona	Posible producto portador	Método utilizado	Secuencia blanco	Referencia
<i>Arcobacter</i> spp.	Diarrea, bacteremia	Carne de aves	ERIC-PCR, RAPD-PCR	Genes 16S y 23S.	50
<i>Bacillus cereus</i>	Diarrea, vómitos	Arroz, especias, productos lácteos y cárnicos	PCR simple	Gen <i>gyr B</i> (girasa), enterotoxinas y hemolisina.	35
<i>Campylobacter</i> spp.	Diarrea	Carne de aves, cerdo y res, leche cruda	PCR múltiple, PCR semi-anidado	Genes <i>hipO</i> , <i>glyA</i> y <i>sapB2</i> , <i>fla</i> .	51,52
<i>Clostridium botulinum</i>	Botulismo, vómitos	Pescado, miel, alimentos enlatados	PCR-ELISA, PCR simple	Regiones de los genes <i>bont</i> (codifican para las neurotoxinas botulínicas).	3,4,7
<i>Clostridium perfringens</i>	Diarrea, dolor abdominal	Carne de res y aves, salsas	PCR dúplex	Gen de la enterotoxina y de fosfolipasa.	41
<i>Escherichia coli</i>	Diarrea, colitis hemorrágica, síndrome hemolítico-urémico	Carne de res y productos lácteos	PCR múltiple, H-CM-PCR, PCR-TR, RT-PCR, QC-PCR	Genes de toxinas Shiga, shiga-like y verotoxigénica, <i>uidA</i> (β -glucuronidasa), factores de virulencia, genes del operón <i>rff</i> .	9,10,31,53-57
<i>Listeria</i> spp.	Listeriosis	Paté, leche, queso suave, carne, mariscos, ensalada de col	PCR múltiple, PCR - DGGE, RT-PCR, PCR simple, PCR-TR	Detección de factores de virulencia (gen <i>iap</i> , <i>hly</i> , <i>inlB</i> , <i>plcA</i> , etc.) o de proteínas de enlace (gen <i>fbp</i>).	58-60,42
<i>Salmonella</i> spp.	Gastroenteritis	Carne de res y aves, leche, huevos crudos	PCR simple	genes 16S y 23S, genes que codifican para las fimbrias.	61,42
<i>Shigella</i> spp.	Disentería bacilar, fiebre, calambres	Mayonesa, vegetales crudos, leche, aves, productos lácteos	PCR combinado con hibridación de ADN, PCR simple	gen <i>virA</i> .	62,42
<i>Staphylococcus aureus</i>	Intoxicación estafilocócica	Leche cruda	PCR múltiple-ELISA, PCR múltiple	Genes que codifican para toxinas pirogénicas.	63-66
<i>Vibrio cholerae</i>	Cólera	Ostras crudas, pescado	PCR-TR	Secuencia de hemolisina no clásica (<i>hlyA</i>), proteínas de membrana (<i>OmpW</i>).	67
<i>Yersinia enterocolitica</i>	<i>Yersiniosis</i>	Leche o agua contaminada, tofu, canales de cerdo	PCR-TR	Regiones del gen de invasión <i>ail</i> .	68

Abreviaturas:

ERIC = *Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus*

PCR-TR = PCR en tiempo real

RAPD = *Random Amplified Polymorphic DNA*

H-CM-PCR = Hibridación-captura magnética-PCR

QC-PCR = PCR competitivo cuantitativo

RT-PCR = PCR transcriptasa reversa

DGGE = *Denaturing Gradient Gel Electrophoresis*

mientos de análisis de riesgos e identificación y control de puntos críticos (ARICPC) por parte de las empresas productoras.¹⁷

Los avances en la instrumentación e implementación de los descubrimientos de la bioquímica y la biología molecular permiten utilizar la información genética de los microorganismos como herramientas de

identificación y cuantificación de aquéllos de interés para el hombre. Entre estos métodos destacan la reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

La invención de la reacción en cadena de la polimerasa¹⁸ permite la amplificación selectiva de secuencias específicas de ADN que se encuentran en cantidades muy pequeñas. Como su nombre indica, se

basa en la actividad de la enzima ADN polimerasa que es capaz de sintetizar una cadena de ADN complementaria a otra ya existente. El método de PCR utiliza dos secuencias cortas de oligonucleótidos llamadas iniciadores o cebadores que son complementarios a los extremos de la región de ADN que se pretende amplificar. Dado que en cada reacción ambas cadenas de ADN pueden servir de molde para la síntesis de su cadena complementaria, el número de eventos de replicación está dado por la expresión 2^n , donde n es el número de ciclos de amplificación. Puede notarse que después de 20 ciclos se tendrán más de un millón de copias del ADN original. Una explicación amena y detallada de la PCR se puede encontrar en Müllis (1999).¹⁹

Uno de los factores que llevan al éxito en la implementación de la PCR para la identificación de microorganismos patógenos es la elección correcta de la secuencia blanco. Esta secuencia debe permitir la identificación del microorganismo de interés independientemente de la presencia de otras fuentes de ADN (de microorganismos concomitantes o de la muestra misma). Las diferencias en la secuencia de genes ortólogos pueden servir como herramienta útil en la tipificación de diferentes cepas y serotipos de una misma especie o de especies cercanas filogenéticamente.

SELECCIÓN DE SECUENCIAS BLANCOS Y DISEÑO DE CEBADORES

Las secuencias más empleadas para el diseño de cebadores han sido las relacionadas con los genes que codifican para toxinas y proteínas antigénicas específicas (Cuadro I).

Para la detección y diagnóstico de *E. coli*, las secuencias blanco por excelencia han sido los genes *stx*₁ y *stx*₂ que codifican para las dos variantes de la toxina Shiga, *STX*₁ y *STX*₂ respectivamente. La *STX*₁ de *E. coli* es idéntica a la que produce *Shigella dysenteriae* mientras que la homología entre *STX*₁ y *STX*₂ es de 56%.²⁰ Numerosos autores reportan el uso de estas secuencias para el diseño de cebadores específicos para la detección y diagnóstico de STEC, así como de otros genes que codifican para proteínas de virulencia accesorias como la *eaeA* (intimina) y la *hlyA* (hemolisina).^{11,21-25}

El gen *wzy* (polimerasa) también puede ser un buen blanco para el diagnóstico de serotipos O de *E. coli*, pues posee muy baja homología con las secuencias depositadas en las bases de datos, pudiéndose así diferenciar los serotipos O111, O157 y O113.^{26,27} Otras regiones del operón *rfb* han sido usadas como

blancos para el diseño de cebadores específicos de los serotipos O111²⁸ y O157,²⁹⁻³¹ por mencionar algunos ejemplos. Los genes del operón *rfb* también son útiles para la identificación y diferenciación de los serogrupos A, B, C2 y D de *Salmonella*.³¹

VENTAJAS Y DESVENTAJAS DE LA PCR

Las principales ventajas del uso de la PCR en la detección e identificación de bacterias causantes de ETA radica en tres aspectos fundamentales: su sensibilidad, su especificidad y su capacidad de procesamiento de grandes cantidades de muestras.

Actualmente existen métodos de PCR establecidos para la detección de bacterias específicas que logran detectar niveles muy bajos de microorganismos, por ejemplo, para *E. coli* se ha reportado la utilización de medios de enriquecimiento seguidos de PCR para la detección de 1 UFC/g de carne de res (15 h de enriquecimiento)⁹ y de hasta 3 UFC/25 g de carne molida después de un enriquecimiento de 12 h.¹⁰ Adicionalmente estos métodos identifican microorganismos que no pueden ser estudiados por técnicas convencionales o que no pueden cultivarse en substratos artificiales.³²

Por otra parte, la PCR múltiple desarrollada por Chamberlain y cols. (1988),³³ permite la detección simultánea de diferentes toxinas y/o factores de virulencia en una sola reacción. Paton y Paton (1998)²¹ desarrollaron dos estrategias de PCR múltiple para la detección de *stx*₁, *stx*₂, *eaeA* y *hlyA* en un caso y para regiones del operón *rfb* de *E. coli* O111 y O157 en el otro. Ambos ensayos fueron efectivos para la detección directa y caracterización de 52 cepas de STEC (serotipos O), aislados de heces humanas, animales domésticos y alimentos. La sensibilidad de ambos ensayos fue de 10³ UFC.

El descubrimiento de las ADN polimerasas termoestables³⁴ permitió la automatización del proceso a la vez que redujo el tiempo de ejecución y permitió un aumento significativo en el número de muestras que se pueden procesar.

El desarrollo de métodos de detección que no requieren de la separación de los fragmentos mediante electroforesis ha permitido un aumento considerable en la capacidad de procesamiento de muestras de los protocolos de PCR. Entre estos métodos se pueden mencionar aquellos acoplados a detección con anticuerpos (ELISA-PCR) y el PCR en tiempo real.

Entre los factores que limitan la aplicación de la PCR en la identificación de microorganismos patógenos en muestras de alimentos destaca la presencia de sustancias que pueden ejercer un efecto inhibitorio

sobre la reacción. La existencia de tales inhibidores en muestras de alimentos, clínicas y ambientales ha sido reportada por varios autores^{4,7,35-38} y revisada por Wilson (1997)³⁹ y pueden actuar a diferentes niveles durante el proceso de extracción y amplificación de los ácidos nucleicos y, eventualmente, conducir a la obtención de falsos negativos,^{40,41} por lo que se deben tomar precauciones para impedir o limitar su efecto sobre la reacción.⁴² Entre los muchos compuestos identificados que ejercen un efecto negativo sobre la PCR se pueden citar: la hemoglobina, la lactoferrina,⁴³ los polisacáridos, las grasas, proteínas y iones metálicos presentes en las matrices alimenticias,⁴⁴ además, algunas sales usadas comúnmente en los protocolos de extracción de ácidos nucleicos también pueden inhibir la PCR⁴³ (ver Wilson³⁹ para más detalles).

Sin embargo, aunque los genes que codifican para los factores de virulencia de las EHEC pueden ser detectados por PCR con aceptable sensibilidad, esto no implica que el factor de virulencia se exprese. A este respecto, Kudva y cols. (1997)⁴⁵ demostraron que no todos los aislamientos *stx* positivos eran capaces de expresar la toxina Shiga, mientras que Kehl (2002)²⁰ ha señalado que la intimina no es un factor de virulencia esencial, lo que implica que la detección de tales secuencias puede conducir a resultados falsos o poco confiables.

Finalmente, el método de extracción del ADN influye notablemente en la ejecución y sensibilidad de la PCR. Por ejemplo, Cornejo y cols. (1998),⁴⁶ demostraron que con el ADN extraído de muestras de leche, utilizando métodos químicos, se obtiene una mejor amplificación que cuando el ADN se extrae utilizando microesferas de vidrio. Esto indica claramente la necesidad de estandarizar un método de extracción de ácidos nucleicos considerando la naturaleza de la muestra, para aumentar así la confiabilidad de los resultados.

ESTANDARIZACIÓN Y VALIDACIÓN DE LOS PROTOCOLOS BASADOS EN PCR

Aunque muchos laboratorios de diagnóstico alrededor del mundo han establecido métodos de PCR para la detección de patógenos, existen algunos parámetros que pueden afectar la eficiencia de la reacción, con lo que los resultados de las pruebas desarrolladas o publicadas por algún laboratorio en ocasiones pueden ser difíciles de reproducir en otros laboratorios. Por lo tanto, para la adopción exitosa de metodologías de diagnóstico basadas en PCR es necesario contar con pruebas de validación apropiadas y consensuadas.

En años recientes se ha desarrollado un proyecto europeo denominado "Food-PCR" cuyo objetivo es facilitar la implementación de PCR para la detección de los patógenos *Campylobacter* spp. termofílico, *E. coli* O157, *Yersinia enterocolítica*, *Listeria monocytogenes* y *Salmonella* spp., mediante la validación y estandarización de las metodologías de PCR.⁴⁷

Se han realizado algunos intentos de validación de pruebas de PCR no comerciales, por ejemplo, el grupo dirigido por Lübeck (2003) evaluó 17 cebadores y tres polimerasas para la detección de *Campylobacter* en alimentos y desarrollaron un método estandarizado y específico para la detección de tres de las cepas de este microorganismo más frecuentemente aisladas de los alimentos. Se estudiaron 15 cebadores de la secuencia de 16S rRNA y dos cebadores cuya región blanco es el gen 23S rRNA, los probaron contra 150 cepas del patógeno y encontraron que el par OTI559/18-1 es selectivo. También llegaron a la conclusión que la enzima más resistente a los inhibidores presentes en la carne de pollo fue la *Tth*.⁴⁸ Para evaluar la reproducibilidad del análisis de PCR desarrollado en el proyecto previo, doce laboratorios participaron en un ensayo de validación y concluyen que el PCR diseñado puede ser parte de las bases de una herramienta de búsqueda precisa, estandarizada y sólida para la determinación de cepas enteropatógenas de *Campylobacter* spp. en alimentos.⁴⁹

Malorny y cols. (2003)⁴⁷ realizaron la validación de la metodología de detección de *Salmonella* entre 16 laboratorios europeos y encontraron que los cebadores más efectivos fueron el 139-141, cuya secuencia blanco es el gen *invA*. Se probaron 364 cepas de *Salmonella* y se obtuvo una inclusividad del 99.6% y una exclusividad del 100%, por lo que después de este análisis exhaustivo, el grupo de trabajo propone utilizar esta metodología como un estándar internacional.

SITUACIÓN ACTUAL DEL USO DE LA PCR

Actualmente existen 3 fabricantes de estuches comerciales basados en PCR para la detección de microorganismos causantes de ETA.¹⁷ El denominado BAX® (Qualicon, USA) utiliza reactivos en tabletas y un termociclador convencional. Las muestras positivas son visualizadas como bandas en un gel de electroforesis. El sistema no requiere de la extracción de ADN. La inclusividad y la exclusividad del sistema BAX® alcanzan casi el 100%, significando que las tasas de falso positivo y falso negativo son casi cero. Existen estuches de BAX® para *Salmonella*.

lla, géneros de *Listeria*, *Listeria monocytogenes* y *E. coli* O157:H7. Las pruebas para *Salmonella* y *E. coli* han recibido el "Status of Performance Tested" del Instituto de Investigaciones de la Asociación Oficial de Químicos Analíticos (AOACRI, por sus siglas en inglés).

El segundo método comercial disponible es el estuche Probelia (Sanofi, France), el cual emplea PCR convencional seguido de un inmunoensayo y un sistema de detección colorimétrica, esta metodología sirve para la detección de *Salmonella* y *Listeria*. El sistema intenta eliminar la contaminación del producto de PCR al sustituir timina por uracilo durante el protocolo de PCR.

El último es el TaqMan (Perkin Elmer, USA), el cual usa un sistema novedoso de sondas e incorpora el marcador TaqMan que no es fluorescente en su forma nativa pero la actividad exonucleasa de la ADN polimerasa libera un producto fluorescente, el cual es detectado y cuantificado con un sistema específico de detección. Los estuches de TaqMan están disponibles para *Salmonella* y están desarrollándose los de *Listeria* y *E. coli* O157; sin embargo, uno de los aspectos más interesantes del TaqMan es su potencial para cuantificar el microorganismo de interés.

CONCLUSIONES

Para disminuir el riesgo de infección por patógenos se necesita un control microbiológico estricto en la cadena de producción de alimentos. La disponibilidad de pruebas confiables, rápidas e internacionalmente aceptadas para la determinación de microorganismos patógenos se ha vuelto importante para la industria alimenticia, así como para la regulación de la seguridad alimenticia. La amplificación del ADN mediante la PCR parece ser una herramienta poderosa en el diagnóstico microbiológico.

El desarrollo de los métodos basados en el ADN tanto para la detección e identificación/caracterización de microorganismos patógenos han proporcionado nuevas herramientas a los microbiólogos de alimentos y no hay duda que estas investigaciones pueden continuar proporcionando mecanismos analíticos significativos que actualmente son difíciles de imaginar.

A pesar de que la PCR está siendo aplicada ampliamente en la mayoría de laboratorios de investigación y de que su utilidad como técnica de detección de patógenos en alimentos ha sido demostrada, todavía existen reservas respecto a su aplicación en el análisis

rutinario de alimentos. Su incorporación en el sector de la industria alimenticia todavía requiere de la formación del personal técnico y la adaptación de los protocolos descritos en la bibliografía científica a la práctica de un laboratorio de análisis.

REFERENCIAS

1. Autio T, Hielm S, Miettinen M, Jöberg A-M, Aarnisalo K, Björkroth J, et al. Sources of *Listeria monocytogenes* contamination in a cold-smoked rainbow trout processing plant detected by pulsed-field gel electrophoresis typing. *Appl Environ Microbiol* 1999; 65: 150-155.
2. Venkateswaran K, Dohmoto N, Harayama S. Cloning and nucleotide sequence of the *gyrB* gene of *Vibrio parahaemolyticus* and its application in detection of this pathogen in shrimp. *Appl Environ Microbiol* 1998; 64: 681-687.
3. Hielm S, Björkroth J, Hyytiä E, Korkeala H. Prevalence of *Clostridium botulinum* in Finnish trout farms: pulsed-field gel electrophoresis typing reveals extensive genetic diversity among type E isolates. *Appl Environ Microbiol* 1998; 64: 4161-4167.
4. Fach P, Perelle S, Dilasser F, Grout J, Dargaignaratz C, Botella L, et al. Detection by PCR-enzyme-linked immunosorbent assay of *Clostridium botulinum* in fish and environmental samples from a coastal area in northern France. *Appl Environ Microbiol* 2002; 68: 5870-5876.
5. Blackburn C, McClure P. Introduction. En: Blackburn, C y McClure, P. *Foodborne pathogens. Hazards, risk analysis and control*. Boca Raton, FL: CRC Press; 2002: 3-12.
6. Agron P, Walker R, Kinde H, Sherilyn J, Hayes D, Willard J, et al. Identification by subtractive hybridization of sequences specific for *Salmonella enterica* serovar Enteritidis. *Appl Environ Microbiol* 2002; 67: 4984-4991.
7. Nevas M, Hielm S, Lindström M, Horn H, Koivulehto K, Korkeala H. High prevalence of *Clostridium botulinum* types A and B in honey samples detected by polymerase chain reaction. *Int J Food Microbiol* 2002; 72: 45-52.
8. Abushelaibi A, Sofos J, Samelis J, Kendall P. Survival and growth of *Salmonella* in reconstituted infant cereal hydrated with water, milk or apple juice and stored at 4°C, 15°C and 25°C. *Food Microbiol* 2003; 20: 17-25.
9. Chen J, Johnson R, Griffiths M. Detection of verotoxigenic *Escherichia coli* by magnetic capture-hybridization PCR. *Appl Environ Microbiol* 1998; 64: 147-152.
10. Chen S, Xu R, Yee A, Wu H, Wang C, Read S, et al. An automated fluorescent PCR method for detection of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in foods. *Appl Environ Microbiol* 1998; 64: 4210-4116.
11. Fagan P, Hornitzky M, Bettelheim K, Djordjevic S. Detection of Shiga-like toxin (*stx1* and *stx2*), intimin (*eaeA*), and enterohemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC) hemolysin (EHEC *hlyA*) genes in animal feces by multiplex PCR. *Appl Environ Microbiol* 1999; 65: 868-872.
12. Johnson J, Brooke C, Fritschel S. Comparison of the BAX for screening *E. coli* O157:H7 method with conventional methods for detection of extremely low levels of *Escherichia coli* O157:H7 in ground beef. *Appl Environ Microbiol* 1998; 64: 4390-4395.
13. Vandenberghe J, Verdonck L, Robles-Arozarena R, Rivera G, Bolland A, Balladares M, et al. Vibrios associated with

- Litopenaeus vannamei* larvae, postlarvae, roodstock, and hatchery probionts. *Appl Environ Microbiol* 1999; 65: 2592-2597.
14. Daffonchio D, Borin S, Frova G, Gallo R, Mori E, Fani R, et al. A randomly amplified polymorphic DNA marker specific for the *Bacillus cereus* group is diagnostic for *Bacillus anthracis*. *Appl Environ Microbiol* 1999; 65: 1298-1303.
15. Eaton T, Gasson M. Molecular screening of *Enterococcus* virulence determinants and potential for genetic exchange between food and medical isolates. *Appl Environ Microbiol* 2001; 67: 1628-1635.
16. Coetsier C, Vannuffel P, Blondeel N, Denef J, Cocito C, Gala J. Duplex PCR for differential identification of *Mycobacterium bovis*, *M. avium*, and *M. avium* subsp. *paratuberculosis* in formalin- fixed paraffin-embedded tissues from cattle. *J Clin Microbiol* 2000; 38: 3048-3054.
17. Betts R, Blackburn C. Detecting pathogens in food. In: Betts R y Blackburn C. *Foodborne pathogens: Hazards, risk analysis and control*. Boca Raton, FL: CRC Press; 2002: 13-52.
18. Saiki R, Scharf S, Faloona F, Mullis K, Horn G, Erlich H, et al. Enzymatic amplification of β -globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* 1985; 230: 1350-1354.
19. Mullis K. The unusual origin of the polymerase chain reaction. *Sci Am* 1999;36-43.
20. Kehl S. Role of the laboratory in the diagnosis of enterohemorrhagic *Escherichia coli* infections. *J Clin Microbiol* 2002; 40: 2711-2715.
21. Paton A, Paton J. Detection and characterization of shiga toxigenic *Escherichia coli* by using multiplex PCR assays for *stx1*, *stx2*, *eaeA*, enterohemorrhagic *E. coli* *hlyA*, *rfbO111* and *rfbO157*. *J Clin Microbiol* 1998; 36: 598-602.
22. Reischl U, Youssef M, Kilwinski J, Lehn N, Zhang W, Karch H, et al. Real-time fluorescence PCR assays for detection and characterization of shiga toxin, intimin, and enterohemolysin genes from shiga toxin-producing *Escherichia coli*. *J Clin Microbiol* 2002; 40: 2555-2565.
23. Paton A, Paton J. Direct detection and characterization of shiga toxigenic *Escherichia coli* by multiplex PCR for *stx1*, *stx2*, *eae*, *ehxA*, and *saa*. *J Clin Microbiol* 2002; 40: 271-274.
24. Wang G, Clark C, Rodgers F. Detection in *Escherichia coli* of the genes encoding the major virulence factors, the genes defining the O157:H7 serotype, and components of the type 2 Shiga toxin family by multiplex PCR. *J Clin Microbiol* 2002; 40: 3613-3619.
25. Normanno G, Dambrosio P, Quaglia N, Montagna D, Chiocco D, Celano G. Typing of *Escherichia coli* O157 strains isolated from fresh sausage. *Food Microbiol* 2004; 21: 79-82.
26. Paton A, Paton J. Direct detection of shiga toxigenic *Escherichia coli* strains belonging to serogroups O111, O157, and O113 by multiplex PCR. *J Clin Microbiol* 1999; 37: 3362-3365.
27. Paton A, Paton J. Molecular characterization of the locus encoding biosynthesis of the lipopolysaccharide O antigen of *Escherichia coli* Serotype O113. *Infect Immun* 1999; 67: 5930-5937.
28. Wang L, Curd H, Qu W, Reeves P. Sequencing of *Escherichia coli* O111 O-antigen gene cluster and identification of O111-specific genes. *J Clin Microbiol* 1998; 36: 3182-3187.
29. Desmarchelier P, Bilge S, Fegan N, Mills L, Vary J, Tarr P. A PCR specific for *Escherichia coli* O157 based on the *rfb* locus encoding O157 lipopolysaccharide. *J Clin Microbiol* 1998; 36: 1801-1804.
30. Wang L, Reeves P. Organization of *Escherichia coli* O157 O antigen gene cluster and identification of its specific genes. *Infect Immun* 1998; 66: 3545-3551.
31. Maurer J, Schmidt D, Petrosko P, Sánchez S, Bolton L, Lee M. Development of primers to O-Antigen biosynthesis genes for specific detection of *Escherichia coli* O157 by PCR. *Appl Environ Microbiol* 1999; 65: 2954-2960.
32. Scheu P, Berghof K, Stahl U. Detection of pathogenic and spoilage microorganisms in food with the polymerase chain reaction. *Food Microbiol* 1998; 15: 13-31.
33. Chamberlain J, Gibbs R, Rainer J, Nguyen P, Caskey C. Deletion screening of the Duchenne muscular dystrophy locus via multiplex DNA amplification. *Nucleic Acids Res* 1988; 16: 11141-11156.
34. Saiki R, Gelfand D, Stoffel S, Scharf S, Higuchi R, Horn G, et al. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 1988; 239: 487-491.
35. Yamada S, Ohashi E, Agata N, Venkateswaran K. Cloning and nucleotide sequence analysis of *gyrB* of *Bacillus cereus*, *B. thuringiensis*, *B. mycoides*, and *B. anthracis* and their application to the detection of *B. cereus* in rice. *Appl Environ Microbiol* 1999; 65: 1483-1490.
36. Sharma V, Carlson S. Simultaneous detection of *Salmonella* strains and *Escherichia coli* O157:H7 with fluorogenic PCR and single-enrichment-broth culture. *Appl Environ Microbiol* 2000; 66: 5472-5476.
37. Lindstrom M, Keto R, Markkula A, Nevas M, Hielm S, Korkeala H. Multiplex PCR assay for detection and identification of *Clostridium botulinum* Types A, B, E, and F in food and fecal material. *Appl Environ Microbiol* 2001; 67: 5694-5699.
38. Knutsson R, Lofstrom C, Grage H, Hoorfar J, Radstrom P. Modeling of 5' nuclease real-time responses for optimization of a high-throughput enrichment PCR procedure for *Salmonella enterica*. *J Clin Microbiol* 2002; 40: 52-60.
39. Wilson I. Inhibition and facilitation of nucleic acid amplification. *Appl Environ Microbiol* 1997; 63: 3741-3751.
40. Gentry-Weeks C, Hutcheson H, Kim L, Bolte D, Traub-Dargatz J, Morley P, et al. Identification of two phylogenetically related organisms from feces by PCR for detection of *Salmonella* spp. *J Clin Microbiol* 2002; 40: 1487-1492.
41. Fach P, Popoff M. Detection of enterotoxigenic *Clostridium perfringens* in food and fecal samples with a duplex PCR and the slide latex agglutination test. *Appl Environ Microbiol* 1997; 63: 4232-4236.
42. Lampel K, Orlandi P, Kornegay L. Improved template preparation for PCR-based assays for detection of food-borne bacterial pathogens. *Appl Environ Microbiol* 2000; 66: 4539-4542.
43. Al-Soud W, Radstrom P. Purification and characterization of PCR-inhibitory components in blood cells. *J Clin Microbiol* 2001; 39: 485-493.
44. Rossen L, Norskov P, Holmstrom K, Rasmussen O. Inhibition of PCR by components of food samples, microbiological diagnosis assays and DNA-extraction solutions. *J Food Microbiol* 1992; 17: 37-45.
45. Kudva I, Hatfield P, Hovde C. Characterization of *Escherichia coli* O157:H7 and other Shiga toxin-producing *E. coli* serotypes isolated from sheep. *J Clin Microbiol* 1997; 35: 892-899.
46. Cornejo B, Sahún-Ruiz A, Suárez-Güemes F, Thornton C, Ficht T, Adams L. Comparison of C18-carboxypropylbetaine and glass bead DNA extraction methods for detection of

- Mycobacterium bovis* in bovine milk samples and analysis of samples by PCR. *Appl Environ Microbiol* 1998; 64: 3099-3101.
47. Malorny B, Hoorfar J, Bunge C, Helmuth R. Multicenter validation of the analytical accuracy of *Salmonella* PCR: Towards an international standard. *Appl Environ Microbiol* 2003; 69: 290-296.
48. Lubeck P, Wolffs P, On S, Ahrens P, Radstrom P, Hoorfar J. Toward an international standard for PCR-based detection of food-borne thermotolerant campylobacters: Assay development and analytical validation. *Appl Environ Microbiol* 2003; 69: 5664-5669.
49. Lubeck PS, Cook N, Wagner M, Fach P, Hoorfar J. Toward an international standard for PCR-based detection of food-borne thermotolerant campylobacters: Validation in a multicenter collaborative trial. *Appl Environ Microbiol* 2003; 69: 5670-5672.
50. Houf K, De Zutter L, Van Hoof J, Vandamme P. Assessment of the genetic diversity among arcobacters isolated from poultry products by using two PCR-based typing methods. *Appl Environ Microbiol* 2002; 68: 2172-2178.
51. Waage A, Vardund T, Lund V, Kapperud G. Detection of small numbers of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* cells in environmental water, sewage, and food samples by a seminested PCR assay. *Appl Environ Microbiol* 1999; 65: 1636-1643.
52. Lai-King N, Bin Kingombe C, Yan W, Taylor D, Hiratsuka K, Malik N, et al. Specific detection and confirmation of *Campylobacter jejuni* by DNA hybridization and PCR. *Appl Environ Microbiol* 1997; 63: 4558-4563.
53. Venkateswaran K, Kamijoh Y, Ohashi E, Nakanishi H. A simple filtration technique to detect enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 and its toxins in beef by multiplex PCR. *Appl Environ Microbiol* 1997; 63: 4127-4131.
54. Lehmacher A, Meier H, Aleksic S, Bockemühl J. Detection of hemolysin variants of shiga toxin-producing *Escherichia coli* by PCR and culture on vancomycin-cefixime-cefsulodin blood agar. *Appl Environ Microbiol* 1998; 64: 2449-2453.
55. Oberst R, Hays M, Bohra L, Phebus R, Yamashiro C, Pascho-Kolva C, et al. PCR-based DNA amplification and presumptive detection of *Escherichia coli* O157:H7 with an internal fluorogenic probe and the 5' nuclease (TaqMan) assay. *Appl Environ Microbiol* 1998; 64: 3389-3396.
56. Li W, Drake M. Development of a quantitative competitive PCR assay for detection and quantification of *Escherichia coli* O157:H7 cells. *Appl Environ Microbiol* 2001; 67: 3291-3294.
57. McIngvale S, Elhanafi D, Drake M. Optimization of reverse transcriptase PCR to detect viable Shiga-toxin-producing *Escherichia coli*. *Appl Environ Microbiol* 2002; 68: 799-806.
58. Cocolin L, Rantsiou K, Iacumin L, Cantoni C, Comi G. Direct identification in food samples of *Listeria* spp. and *Listeria monocytogenes* by molecular methods. *Appl Environ Microbiol* 2002; 68: 6273-6282.
59. Nogva H, Rudi K, Naterstad K, Holck A, Lillehaug D. Application of 5'-nuclease PCR for quantitative detection of *Listeria monocytogenes* in pure cultures, water, skim milk, and unpasteurized whole milk. *Appl Environ Microbiol* 2000; 66: 4266-4271.
60. Klein P, Juneja V. Sensitive detection of viable *Listeria monocytogenes* by reverse transcription-PCR. *Appl Environ Microbiol* 1997; 63: 4441-4448.
61. Cohen H, Mechanda S, Lin W. PCR amplification of the *fimA* gene sequence of *Salmonella typhimurium*, a specific method for detection of *Salmonella* spp. *Appl Environ Microbiol* 1996; 62: 4303-4308.
62. Villalobo E, Torres A. PCR for detection of *Shigella* spp. in mayonnaise. *Appl Environ Microbiol* 1998; 64: 1242-1245.
63. Omoe K, Ishikawa M, Shimoda Y, Hu D, Ueda S, Shinagawa K. Detection of *seg*, *seh*, and *sei* genes in *Staphylococcus aureus* isolates and determination of the enterotoxin productivities of *S. aureus* isolates harboring *seg*, *seh*, or *sei* genes. *J Clin Microbiol* 2002; 40: 857-862.
64. Sharma N, Rees C, Dodd C. Development of a single-reaction multiplex PCR toxin typing assay for *Staphylococcus aureus* strains. *Appl Environ Microbiol* 2000; 66: 1347-1353.
65. Monday S, Bohach G. Use of multiplex PCR to detect classical and newly described pyrogenic toxin genes in *Staphylococcal* isolates. *J Clin Microbiol* 1999; 37: 3411-3414.
66. Becker K, Roth R, Peters G. Rapid and specific detection of toxigenic *Staphylococcus aureus*: Use of two multiplex PCR enzyme immunoassays for amplification and hybridization of staphylococcal enterotoxin genes, exfoliative toxin genes, and toxic shock syndrome toxin 1 gene. *J Clin Microbiol* 1998; 36: 2548-2553.
67. Lyon W. TaqMan PCR for detection of *Vibrio cholerae* O1, O139, Non-O1, and Non-O139 in pure cultures, raw oysters, and synthetic seawater. *Appl Environ Microbiol* 2001; 67: 4685-4693.
68. Jourdan A, Johnson S, Wesley I. Development of a fluorogenic 5' nuclease PCR assay for detection of the *ail* gene of pathogenic *Yersinia enterocolitica*. *Appl Environ Microbiol* 2000; 66: 3750-3755.

