



Universidad Autónoma de Querétaro
Facultad de Ciencias Naturales
Licenciatura en Microbiología



NOMBRE DEL TRABAJO

Desarrollo, estandarización y validación de un ensayo molecular para la detección de *Listeria monocytogenes* en alimentos.

Tesis individual

Que como parte de los requisitos para obtener el grado de:

Licenciado en Microbiología

Presenta:

Javier Ortiz León

Dirigido por:

Dr. Gerardo M. Nava Morales

SINODALES

Dr. Gerardo M. Nava Morales

Presidente

M. en C. Yajaira Esquivel Hernández

Secretario

Dra. Karina Alethya Acevedo Whitehouse

Vocal

Dr. Fausto Arellano Carbajal

Suplente

Dra. Andrea Margarita Olvera Ramírez

Suplente

Centro Universitario

Querétaro, Qro.

15 / 02 / 2019

México



Dirección General de Bibliotecas y Servicios Digitales
de Información



Desarrollo, estandarización y validación de un ensayo
molecular para la detección de *Listeria*
monocytogenes en alimentos.

por

Javier Ortiz León

se distribuye bajo una [Licencia Creative Commons
Atribución-NoComercial-SinDerivadas 4.0
Internacional](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/).

Clave RI: CNLIN-237340



Universidad Autónoma de Querétaro
Facultad de Ciencias Naturales
Licenciatura en Microbiología



NOMBRE DEL TRABAJO

Desarrollo, estandarización y validación de un ensayo molecular para la detección de *Listeria monocytogenes* en alimentos.

Tesis individual

Que como parte de los requisitos para obtener el grado de:

Licenciado en Microbiología

Presenta:

Javier Ortiz León

Dirigido por:

Dr. Gerardo M. Nava Morales

SINODALES

Dr. Gerardo M. Nava Morales

Presidente

Firma

M. en C. Yajaira Esquivel Hernández

Secretario

Firma

Dra. Karina Alethya Acevedo Whitehouse

Vocal

Firma

Dr. Fausto Arellano Carbajal

Suplente

Firma

Dra. Andrea Margarita Olvera Ramírez

Suplente

Firma

Centro Universitario
Querétaro, Qro.
15 / 02 / 2019
México

DEDICATORIAS

Lleno de regocijo, de amor y esperanza, dedico este proyecto, a cada uno de mis seres queridos, quienes han sido mis pilares para seguir adelante.

Es para mí una gran satisfacción poder dedicarles a ellos, lo que con mucho esfuerzo, esmero y trabajo hemos logrado, pues en cada paso cada uno de ellos ha estado a mi lado, ellos son mi motivación y el orgullo de mi vida, son la razón de sentirme orgulloso de culminar esta meta, gracias a ellos por confiar siempre en mí.

A mis padres por su apoyo y amor incondicional, por su aliento, esfuerzo y consejos que día a día me brindaron los cuales forjaron la persona que soy el día de hoy. Espero poder siempre ser digno de su orgullo.

A Isaura, mi compañera en la ciencia y en la vida, por su amor y apoyo ante todo sin importar cuán difícil se tornará la situación, por sus palabras de aliento y consejo, por ser mi pilar y nunca dejarme caer ni vencer, por elegirme a mí como su acompañante en este largo camino que apenas comienza.

A mi hermana por sus consejos y opiniones, por brindarme calma y escuchar cuando lo necesitaba. A mis abuelos y a mis amigos, que siempre me han acompañado gracias por ser parte de mi vida y por permitirme ser parte de su orgullo.

AGRADECIMIENTOS

A mi director de tesis, el Dr. Gerardo M. Nava Morales por su confianza al recibirme en su laboratorio, por su apoyo y asesoría para la realización de este trabajo.

A mi asesora la M. en C. Yajaira Esquivel Hernández por su apoyo, esfuerzo y tiempo brindado para que se llevara a cabo la culminación de este trabajo.

A la facultad de Química de la Universidad Autónoma de Querétaro por otorgarnos la facilidad de utilizar sus equipos e instalaciones para la realización de este trabajo.

A mi alma mater, la Universidad Autónoma de Querétaro por formarme como Licenciado en Microbiología.

A mis maestros quienes fueron el pilar en mi formación

ÍNDICE GENERAL

	INTRODUCCIÓN	10
1.	ANTECEDENTES	12
1.1.	Enfermedades transmitidas por alimentos.....	12
1.2.	Panorama mundial.....	13
1.3.	Panorama nacional.....	16
1.4.	Género <i>Listeria</i>	18
1.4.1.	Características generales.....	19
1.4.2.	Especies.....	19
1.4.3.	Especies de relevancia médica.....	19
1.5.	<i>Listeria monocytogenes</i>	21
1.5.1.	Características.....	21
1.5.2.	Identificación microbiológica.....	22
1.5.3.	Patogenia.....	23
1.5.4.	Resistencia antibiótica.....	24
1.6.	Listeriosis.....	24
1.6.1.	Características.....	24
1.6.2.	Prevalencia a nivel mundial.....	26
1.6.3.	Prevalencia de Listeriosis en México.....	28
1.6.4.	Tratamiento.....	30
1.6.5.	Profilaxis.....	30
1.7.	Patobiología de <i>L. monocytogenes</i>	31
1.7.1.	Ciclo de vida intracelular de <i>L. monocytogenes</i>	31
1.8.	Técnicas de aislamiento e identificación de <i>L. monocytogenes</i> en matrices alimentarias.....	33
1.8.1.	Métodos de aislamiento.....	34
1.8.2.	Métodos de identificación.....	40
1.9.	Caracterización molecular de <i>L. monocytogenes</i>	43
1.10.	Relevancia del desarrollo de nuevas técnicas para la identificación de <i>L. monocytogenes</i> en alimentos.....	47
2.	JUSTIFICACIÓN	48
3.	HIPÓTESIS	48

4.	OBJETIVO GENERAL	49
4.1.	Objetivos específicos.....	49
5.	MATERIALES Y METODOS	49
5.1.	Materiales.....	49
5.1.1.	Equipo.....	49
5.1.2.	Medios de cultivo.....	49
5.1.3.	Soluciones.....	50
5.1.4.	Reactivos.....	50
5.1.5.	Material biológico.....	50
5.2.	Métodos.....	50
5.2.1.	Estandarización de extracción de ADN.....	50
5.2.2.	Estandarización de ensayos moleculares para la detección de <i>L. monocytogenes</i> en alimentos.	53
5.2.3.	Metodología de extracción de ADN genómico.....	52
5.2.4.	Estandarización de ensayo de PCR.....	53
6.	RESULTADOS	59
6.1.	Estandarización de extracción de ADN genómico	59
6.2.	Condiciones de uso de los iniciadores Lm20 para la detección de <i>L. monocytogenes</i>	60
6.3.	Detección de <i>L. monocytogenes</i> en matrices alimentarias.....	61
6.4.	Límite de detección de los iniciadores de la PCR Lm20 en la identificación de <i>L. monocytogenes</i> en muestras de brócoli.....	63
6.4.1.	Ensayos de PCR.....	65
7.	DISCUSIÓN	69
8.	CONCLUSIÓN	71
9.	ANEXOS	72
9.1.	Preparación de tubos con perlas para extracción de ADN.....	72
9.2.	Preparación de medios de cultivo y soluciones.....	72
9.3.	Cinética de crecimiento de <i>L. monocytogenes</i>	73
10.	BIBLIOGRAFÍA	74

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.	Lista de división de subregiones por continente.....	14
Figura 2.	Enfermedades intestinales atribuibles al consumo de alimentos.....	15
Figura 3.	Enfermedades Intestinales Atribuibles al Consumo de Alimentos.....	16
Figura 4.	Brotos en los que se ha identificado el alimento involucrado.....	16
Figura 5.	Árbol filogenético del género <i>Listeria</i>	17
Figura 6.	Infección humana por <i>Listeria monocytogenes</i>	24
Figura 7.	Distribución de casos confirmados de Listeriosis por cada 100 000 habitantes, UE / EEE, 2011-2015.....	25
Figura 8.	Representación del ciclo de vida intracelular canónico de <i>L. monocytogenes</i> , así como los factores de virulencia que orquestan las diversas etapas de su ciclo de vida intracelular.....	32
Figura 9.	Descripción general de los métodos de aislamiento, identificación y tipificación de <i>Listeria</i> y <i>L. monocytogenes</i> en matrices alimentarias y muestras ambientales.....	36
Figura 10.	Procedimiento para la detección cuantitativa y cualitativa de la <i>Listeria spp.</i>	37
Figura 11.	Resultados de la PCR múltiple llevada a cabo por Ryu et al., 2013 para la detección de seis tipos de <i>Listeria</i> (<i>L. grayi</i> , <i>L. innocua</i> , <i>L. ivanovii</i> , <i>L. monocytogenes</i> , <i>L. seeligeri</i> y <i>L. welshimeri</i>).....	41
Figura 12.	Resultados de la PCR múltiple llevada a cabo por Mazza et al., 2015 para la detección de seis tipos de <i>Listeria</i> (<i>L. grayi</i> , <i>L. innocua</i> , <i>L. ivanovii</i> , <i>L. monocytogenes</i> , <i>L. seeligeri</i> y <i>L. welshimeri</i>)	42
Figura 13.	Oligonucleótidos utilizados por Mazza et al., 2015 para la identificación de las seis especies de <i>Listeria</i> y <i>Listeria spp.</i>	42
Figura 14.	Secuencias y especificidad de los conjuntos de oligonucleótidos utilizados para la detección de <i>L. monocytogenes</i> en el estudio llevado a cabo por Tao et al., 2015	44
Figura 15.	Resultados de PCR que determinan la especificidad de los oligonucleótidos hly, prfA, lmo1030, Lm8, Lm13 y Lm20 en la identificación específica de <i>L. monocytogenes</i> llevado a cabo por Tao et al., 2015.....	45

Figura 16.	Tabla comparativa de la sensibilidad de oligonucleótidos específicos para la detección de <i>L. monocytogenes</i> con otros estudios, mostrada en el estudio llevado a cabo por Tao et al., 2015.....	46
Figura 17.	Concentraciones de ADN obtenido.....	59
Figura 18.	Gradiente de temperatura para la optimización de la PCR.....	60
Figura 19.	Evaluación de la calidad e integridad del material genético obtenido de la extracción de ADN genómico de lechuga romana (L), carne molida de res (C) y queso panela (Q), inoculados con <i>L. monocytogenes</i>	62
Figura 20.	Verificación de la especificidad de los iniciadores Lm20 en la detección de <i>L. monocytogenes</i> mediante ensayo de PCR.....	63
Figura 21.	Media de las concentraciones de ADN genómico obtenido tras la extracción de ADN de 30 alícuotas de brócoli inoculado artificialmente con diferentes concentraciones de <i>L. monocytogenes</i>	64
Figura 22.	Visualización mediante electroforesis en gel de agarosa de la presencia de producto de PCR amplificable del ADN genómico obtenido de las 30 alícuotas de brócoli inoculado con <i>L. monocytogenes</i>	65
Figura 23.	Visualización de producto de PCR amplificable mediante electroforesis en gel de agarosa evaluando la Taq ADN polimerasa “Maxima Hot Start Taq DNA Polymerase”	66
Figura 24.	Visualización de producto de PCR amplificable mediante electroforesis en gel de agarosa evaluando la Taq ADN polimerasa “Dream Taq DNA Polymerase”.	67
Figura 25.	Visualización de producto de PCR amplificable mediante electroforesis en gel de agarosa evaluando la Taq ADN polimerasa “Phire Hot Start II Taq DNA Polymerase”	68

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1.	Características fenotípicas de las especies de <i>Listeria</i>	19
Cuadro 2.	Información sobre la distribución ambiental, características genéticas, y linajes asociados de aislados de <i>Listeria monocytogenes</i>	20
Cuadro 3.	Principales brotes de Listeriosis transmitida por los alimentos desde 2008.....	26
Cuadro 4.	Estudios realizados sobre la frecuencia de aislamiento de <i>L. monocytogenes</i> en alimentos.....	27
Cuadro 5.	Protocolos estándar para el aislamiento de <i>Listeria monocytogenes</i> de diferentes fuentes.....	35
Cuadro 6.	Comparación de métodos para pruebas alimentarias, ambientales y clínicas para la identificación de <i>Listeria spp</i>	40
Cuadro 7.	AND Polimerasas utilizadas en los ensayos de PCR llevados a cabo en este estudio.....	49
Cuadro 8.	Material biológico bacteriano usado en este estudio.....	49
Cuadro 9.	Perlas utilizadas en el proceso de estandarización de la extracción del ADN genómico de <i>L. monocytogenes</i>	50
Cuadro 10.	Grupos de perlas utilizados en la extracción de ADN de <i>L. monocytogenes</i> ...	51
Cuadro 11.	Par de oligonucleótidos iniciadores de la PCR utilizados para la amplificación del gen <i>mpl</i> utilizados en este estudio.....	52
Cuadro 12.	Condiciones en las que se manejaron los oligonucleótidos iniciadores de la PCR Lm20.....	53
Cuadro 13.	Variantes de extracción probadas y cantidad de alícuotas de las matrices alimentarias procesadas destinadas por cada variante.....	54
Cuadro 14.	Volumen (μ L) de inóculo agregado a cada muestra de brócoli.....	56
Cuadro 15.	Condiciones en las que se manejaron los oligonucleótidos 8F Y 1510.....	57
Cuadro 16.	Cantidades de reactivo utilizado para la realización de ensayos de PCR correspondiente a una sola muestra acorde al uso de diferentes ADN polimerasas.....	58

INTRODUCCIÓN

Las enfermedades transmitidas por los alimentos son una causa importante de morbilidad y mortalidad, y un problema grave en países en vías de desarrollo.

Las enfermedades transmitidas por alimentos son causadas por la ingestión de alimentos contaminados con microorganismos patógenos o sustancias químicas tóxicas. La contaminación de alimentos puede producirse en cualquier etapa del proceso desde la producción hasta el consumo de los mismos, puede deberse a una diversidad de factores como la contaminación ambiental, (agua, tierra o aire), malas prácticas en los procesos de producción, almacenaje y distribución de los alimentos (Flores and Herrera, 2005; SINAVE, 2013).

En el informe “WHO Estimates of The Global Burden of Foodborne Diseases” publicado en 2015 por la Organización Mundial de la Salud (OMS) como iniciativa de la OMS para estimar la carga mundial de enfermedades transmitidas por los alimentos; se identificaron 31 peligros microbiológicos transmitidos por los alimentos que causan 32 enfermedades.

En los últimos años, se ha informado un aumento en el número de casos de Listeriosis en varios países europeos, principalmente en adultos ≥ 65 años de edad, no existiendo una correlación con geografía, género, etnia, factores socioeconómicos o serotipos infecciosos (Allerberger and Wagner, 2010). Entre las 17 especies de *Listeria* conocidas (Camargo et al., 2016; Orsi and Wiedmann, 2016; Tao et al., 2015), solo dos especies, *L. monocytogenes* y *L. ivanovii* son consideradas patógenos para mamíferos (Gasnov et al., 2005); siendo *L. monocytogenes* la mayormente asociada a infecciones en humanos (Mazza et al., 2015). La mayor parte de los casos ocurre en pacientes inmunosuprimidos (diabetes, nefropatías, entre otros, y personas mayores de 65 años), y mujeres gestantes donde la infección puede impactar de manera considerable al feto (desde parto prematuro, corioamnionitis, óbito fetal y sepsis neonatal con alta mortalidad).

En 2015 la Red Nacional de Vigilancia Epidemiológica (RENAVE) en España, publicó el informe anual 2015 “Resultados de la vigilancia epidemiológica de las enfermedades transmisibles”, donde se describe que la implementación de los sistemas “Enfermedades de Declaración Obligatoria” (EDO), y el Sistema de Información Microbiológica (SIM), lograron una disminución en el número de casos de Listeriosis con respecto a años anteriores: 104 casos en 2015, comparado con 122 casos en 2014 y 134 casos en 2013.

Así mismo, el “Annual Epidemiological Report for Listeriosis” publicado en 2015 por el European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC) reveló que en los 30 países de la UE se observaron 2 224 casos confirmados de listeriosis, con una tasa global de notificación de 0,5 casos por 100 000 habitantes, siendo Alemania y Francia los países que tuvieron el mayor número de casos notificados (580 y 412, respectivamente), lo que corresponde al 44,6% de todos los casos notificados en la UE (2018).

Listeria monocytogenes es un patógeno que causa desde una gastroenteritis febril hasta una enfermedad invasiva grave (Listeriosis), que conduce a septicemia, encefalitis, endocarditis, meningitis, abortos y mortinatos, entre otros síntomas (Rodríguez-López et al., 2018). *L. monocytogenes* causa brotes transmitidos por los alimentos con altas tasas de hospitalización y mortalidad en todo el mundo, especialmente en mujeres embarazadas, ancianos e individuos con sistemas inmunes comprometidos (Allerberger and Wagner, 2010; ECDC and European Food Safety Authority, 2018). La Listeriosis humana es una enfermedad que se asocia con una alta tasa de mortalidad de aproximadamente 20-30% (Castañeda-Ruelas and León-Félix, 2014; Paziak-Domańska et al., 1999).

Los métodos cultivo-dependientes y serológicos tradicionales, basados en la caracterización del perfil bioquímico de los aislamientos, son escasamente discriminatorios debido a la estrecha similitud de *L. monocytogenes* con otras especies del género *Listeria* (Allerberger and Wagner, 2010). Todas las pruebas fenotípicas, en general, presentan problemas, debido a que no todas las cepas de una misma especie presentan el mismo perfil fenotípico (Liu, 2006). Esto representa un problema grave para la detección de *Listeria* en brotes gastrointestinales asociados al consumo de alimentos (Bosshard et al., 2006). Por esta razón el presente trabajo tiene como objetivo desarrollar, estandarizar y validar de un ensayo molecular para la detección de *Listeria monocytogenes* en alimentos. Este método será fundamental para detectar oportunamente la presencia de este patógeno en matrices alimentarias.

Palabras clave: *Listeria monocytogenes*, Especie-específico, Iniciadores de la PCR, Lm20, Especificidad, Sensibilidad.

1. ANTECEDENTES

1.1. Enfermedades transmitidas por alimentos

Las enfermedades transmitidas por alimentos (ETA) se deben a la ingestión de alimentos contaminados por microorganismos o sustancias químicas. La contaminación de los alimentos puede producirse desde la producción hasta el consumo de alimentos y puede deberse a una diversidad de factores como lo puede ser la contaminación ambiental, ya sea del agua, la tierra o el aire, a las malas prácticas en los procesos de producción, almacenaje y distribución de los alimentos, en los cuales los procesos y estándares de calidad así como las prácticas de higiene para el proceso de alimentos son deficientes (Rodríguez-López et al., 2018) o inclusive debido al manejo inadecuado de los alimentos en casa como puede ser un lavado, cocción, manipulación inapropiados así como falta en la higiene personal.

La manifestación clínica más común de una enfermedad transmitida por los alimentos consiste en la aparición de síntomas gastrointestinales, pero estas enfermedades también pueden dar lugar a síntomas neurológicos, ginecológicos, inmunológicos y de otro tipo. La ingestión de alimentos contaminados puede provocar una insuficiencia multiorgánica, por lo que representa una carga considerable de discapacidad, así como de mortalidad (Flores and Herrera, 2005). En el mundo se enferman casi 600 millones de personas, alrededor de 220 millones son menores de 5 años, de los cuales mueren 96 mil por esta causa. Las ETA representan el 50% de la carga de enfermedad mundial (OMS, 2015; SINAVE, 2013).

1.2. Panorama mundial

Las enfermedades transmitidas por los alimentos son una causa importante de morbilidad y mortalidad, y un impedimento significativo para el desarrollo socioeconómico en todo el mundo, esto ya que en respuesta a brotes de enfermedades transmitidas por algún alimento, todo el alimento potencialmente contaminando tiene que ser retirado del mercado representando un claro ejemplo de las implicaciones para la salud pública ya que en la mayoría de los casos la magnitud y la carga de los alimentos inseguros, y especialmente la carga de contaminantes se desconoce (Ferreira et al., 2014).

En el informe “WHO Estimates of The Global Burden of Foodborne Diseases” publicado en 2015 por la Organización mundial de la salud (OMS) nos muestra las primeras estimaciones de la incidencia mundial de enfermedades transmitidas por los alimentos, destacando lo siguiente:

Se ajustó la mortalidad y la carga de enfermedad en términos de años de vida ajustados por discapacidad (DALYs).

Para las estimaciones mundiales, se incluyen 31 peligros transmitidos por los alimentos que causan 32 enfermedades, siendo 11 agentes de enfermedades diarreicas (1 virus, 7 bacterias, 3 protozoos), 7 agentes invasores de enfermedades infecciosas (1 virus, 5 bacterias, 1 protozoo), 10 helmintos y 3 productos químicos. En conjunto, los 31 peligros ocasionaron 600 (intervalo de incertidumbre del 95% [IU] 420-960) millones de enfermedades transmitidas por los alimentos y 420,000 (95% UI 310,000-600,000) muertes en 2010. Las causas más frecuentes de enfermedades transmitidas por los alimentos fueron los agentes de enfermedades diarreicas, particularmente norovirus y *Campylobacter spp.* Los agentes de enfermedades diarreicas transmitidas por los alimentos causaron 230,000 (95% UI 160,000-320,000) muertes, particularmente *Salmonella* entérica no tifoidea que causa enfermedad diarreica e invasiva.

Otras causas principales de muertes transmitidas por los alimentos fueron *Salmonella Typhi*, *Taenia solium*, virus de la hepatitis A y aflatoxina. La carga mundial de las enfermedades transmitidas por los alimentos por estos 31 riesgos fue de 33 (95% UI 25-46) millones de DALY's en 2010; El 40% de la carga de enfermedades transmitidas por los alimentos se dio entre niños menores de cinco años.

En todo el mundo, 18 (95% UI 12-25) millones de DALY's fueron atribuidos a agentes de enfermedades diarreicas transmitidas por los alimentos, particularmente *Salmonella* entérica no tifoidea y *Escherichia coli* entero patógena. Otros peligros transmitidos por los alimentos con una contribución sustancial a la carga mundial incluyen a *Salmonella Typhi*, *Taenia solium* y *L. monocytogenes*. Scallan et al. (2011), estimaron que este último patógeno de los alimentos causa aproximadamente 1,460 hospitalizaciones cada año en los Estados Unidos, resultando en aproximadamente 260 muertes. En los países desarrollados de todo el mundo, la incidencia de listeriosis es de 0,36 a 5 casos anuales por millón de personas; sin embargo, el número de casos

notificados puede ser muy bajo en países con vigilancia limitada para esta enfermedad (Ferreira et al., 2014).

La OMS en su informe publicado en 2015 señala que hay diferencias entre subregiones (**Figura 1**), delimitadas en función de la mortalidad infantil y adulta esto en cuanto a la carga de las enfermedades transmitidas por los alimentos. La carga más alta por población se observó en África (AFR) (subregiones AFR D y AFR E), seguida de la subregión D del sudeste asiático (SEAR) (subregiones SEAR B y SEAR D) y del Mediterráneo Oriental (EMR). Siendo los agentes de enfermedades diarreicas la principal causa de la carga de morbilidad transmitida por los alimentos en la mayoría de las subregiones. *Salmonella* entérica no tifoidea era una carga importante en todas las subregiones, particularmente en África. Otras causas diarreicas principales de la carga de enfermedades transmitidas por los alimentos fueron *Escherichia coli* entero patógena, *E. coli* enterotoxigénica y *Vibrio cholerae* en subregiones de bajos ingresos, y *Campylobacter spp.* en las subregiones de altos ingresos. La carga de aflatoxina fue alta en el AFR D, Pacífico occidental (WPR) subregiones B y SEAR D. En las subregiones B y D de las Américas (AMR), *Taenia solium* y *Toxoplasma gondii* contribuyeron significativamente a la carga de morbilidad transmitida por los alimentos. Destacando que la carga mundial de enfermedades transmitidas por los alimentos es considerable, con marcadas variaciones regionales.

Región y estrato de mortalidad general	Descripción	Clasificación	Estados miembros
ÁFRICA			
Afr-D	Países africanos con mortalidad en la niñez alta y mortalidad de adultos alta	En desarrollo con alta mortalidad	Angola, Argelia, Benín, Burkina Faso, Cabo Verde, Camerún, Chad, Comoras, Gabón, Gambia, Ghana, Guinea, Guinea-Bissau, Guinea Ecuatorial, Liberia, Madagascar, Malí, Mauricio, Mauritania, Níger, Nigeria, Santo Tomé y Príncipe, Senegal, Seychelles, Sierra Leona, Togo
Afr-E	Países africanos con mortalidad en la niñez alta y mortalidad de adultos muy alta	En desarrollo con alta mortalidad	Botswana, Burundi, Congo, Côte d'Ivoire, Eritrea, Etiopía, Kenya, Lesotho, Malawi, Mozambique, Namibia, República Centroafricana, República Democrática del Congo, República Unida de Tanzania, Rwanda, Sudáfrica, Swazilandia, Uganda, Zambia, Zimbabw
LAS AMÉRICAS			
Amr-A	Países de las Américas con mortalidad en la niñez muy baja y mortalidad de adultos muy baja	Desarrollados	Canadá, Cuba, Estados Unidos de América
Amr-B	Países de las Américas con mortalidad en la niñez baja y mortalidad de adultos baja	En desarrollo con baja mortalidad	Antigua y Barbuda, Argentina, Bahamas, Barbados, Belice, Brasil, Chile, Colombia, Costa Rica, Dominica, El Salvador, Granada, Guyana, Honduras, Jamaica, México, Panamá, Paraguay, República Dominicana, Saint Kitts y Nevis, Santa Lucía, San Vicente y las Granadinas, Suriname, Trinidad y Tabago, Uruguay, Venezuela (República Bolivariana de)
Amr-D	Países de las Américas con mortalidad en la niñez alta y mortalidad de adultos alta	En desarrollo con alta mortalidad	Bolivia, Ecuador, Guatemala, Haití, Nicaragua, Perú
ASIA SUDORIENTAL			
Sear-B	Países de Asia Sudoriental con mortalidad en la niñez baja y mortalidad de adultos baja	En desarrollo con baja mortalidad	Indonesia, Sri Lanka, Tailandia
Sear-D	Países de Asia Sudoriental con mortalidad en la niñez alta y mortalidad de adultos alta	En desarrollo con alta mortalidad	Bangladesh, Bhután, India, Maldivas, Myanmar, Nepal, República Popular Democrática de Corea, Timor-Leste
EUROPA			
Eur-A	Países de Europa con mortalidad en la niñez muy baja y mortalidad de adultos muy baja	Desarrollados	Alemania, Andorra, Austria, Bélgica, Chipre, Croacia, Dinamarca, Eslovenia, España, Finlandia, Francia, Grecia, Irlanda, Islandia, Israel, Italia, Luxemburgo, Malta, Mónaco, Noruega, Países Bajos, Portugal, Reino Unido de Gran Bretaña e Irlanda del Norte, República Checa, San Marino, Suecia, Suiza
Eur-B	Países de Europa con mortalidad en la niñez baja y mortalidad de adultos baja	Desarrollados	Albania, Armenia, Azerbaiyán, Bosnia y Herzegovina, Bulgaria, Eslovaquia, Ex República Yugoslava de Macedonia, Georgia, Kirguistán, Polonia, Rumania, Serbia y Montenegro, Tayikistán, Turkmenistán, Turquía, Uzbekistán
Eur-C	Países de Europa con mortalidad en la niñez baja y mortalidad de adultos alta	Desarrollados	Belarús, Estonia, Federación de Rusia, Hungría, Kazajstán, Letonia, Lituania, República de Moldova, Ucrania
MEDITERRANEO ORIENTAL			
Emr-B	Países del Mediterráneo Oriental con mortalidad en la niñez baja y mortalidad de adultos baja	En desarrollo con baja mortalidad	Arabia Saudita, Bahrein, Emiratos Árabes Unidos, Irán (República Islámica del), Jamahiriya Árabe Libia, Jordania, Kuwait, Líbano, Omán, Qatar, República Árabe Siria, Túnez
Emr-D	Países del Mediterráneo Oriental con mortalidad en la niñez alta y mortalidad de adultos alta	En desarrollo con alta mortalidad	Afganistán, Djibouti, Egipto,* Iraq, Marruecos, Pakistán, Somalia, Sudán, Yemen
PACÍFICO OCCIDENTAL			
Wpr-A	Países del Pacífico Occidental con mortalidad en la niñez muy baja y mortalidad de adultos muy baja	Desarrollados	Australia, Brunei Darussalam, Japón, Nueva Zelandia, Singapur
Wpr-B	Países del Pacífico Occidental con mortalidad en la niñez baja y mortalidad de adultos baja	En desarrollo con baja mortalidad	Camboya,** China, Fiji, Filipinas, Islas Cook, Islas Marshall, Islas Salomón, Kiribati, Malasia, Micronesia (Estados Federados de), Mongolia, Nauru, Niue, Palau, Papua Nueva Guinea,** República de Corea, República Democrática Popular Lao,** Samoa, Tonga, Tuvalu, Vanuatu, Viet Nam

Figura 1. Lista de división de subregiones por continente. Obtenido de OMS, Lista de Estados Miembros por regiones de la OMS y estratos de mortalidad, 1999).

1.3. Panorama nacional

La Comisión Federal para la Protección contra Riesgos Sanitarios (COFEPRIS) sobre el tema “Enfermedades transmitidas por alimentos (ETA)”, se menciona la siguiente información, según las proyecciones de población 2005-2050, llevado a cabo por el Consejo Nacional de Población (CONAPO), en enero de 2015 la población de México alcanzó los 111 millones de personas, de las cuales poco más de 11 millones corresponden a niños de 5 años o menos y 11.1 millones a adultos de 60 años o más. Lo que representa casi el 20% de población altamente vulnerable a las Enfermedades Transmitidas por Alimentos (ETA). Una estimación señala que, si ocurren alrededor de 5 millones de casos anuales de enfermedades diarreicas en México, y un ajuste conservador señala que sólo 50% son causadas directamente por alimentos, con un subregistro de 1 por cada 100 episodios, el número real de casos sería de alrededor de 250 millones de eventos al año, ¡equivalente a 2.5 episodios por persona por año!

En la **Figura 2** se muestra el número total de casos de enfermedades intestinales atribuibles al consumo de alimentos durante el periodo 2010-2015 así como el número de casos por agente patógeno causante (**Figura 3**) de los cuales se tiene registro de igual forma durante el periodo 2010-2015, en donde se puede observar que los años en los que se presentó un mayor número de casos reportados fueron en 2012 y 2013 siendo la causa principal, paratifoidea y otras salmonelosis.



(1) Cólera, Fiebre Tifoidea y otras Salmonelosis, infecciones intestinales por virus y otras mal definidas, Shigelosis, Intoxicaciones alimentarias

* Hasta la semana epidemiológica 33

Figura 2. Enfermedades Intestinales Atribuibles al Consumo de Alimentos. Obtenido de Cofepris, 2015.

	2010	2011	2012	2013	2014	2015*
Cólera	0	5	4	0	0	11
Tifoidea	58,639	61,694	70,536	53,134	52,128	30,395
Paratifoidea y otras						
Salmonelosis	119,374	121,510	128,434	84,866	87,289	56,161
Shigelosis	11,283	9,891	8,209	7,164	5,847	2,705
Infecciones intestinales por virus y otros	4,945,894	4,267,813	5,462,919	5,296,143	4,893,190	3,184,795
Intoxicaciones alimentarias	39,988	43,670	46,595	42,232	36,599	20,543
TOTAL	5,175,178	4,504,583	5,716,412	5,483,539	5,075,053	3,294,610

Figura 3. Enfermedades Intestinales Atribuibles al Consumo de Alimentos. Obtenido de Cofepris, 2015.

Para los casos en los que se ha podido identificar el alimento involucrado, la Cofepris, gracias a la base de datos de la Gerencia de Atención de Emergencias nos arroja el siguiente estadístico (**Figura 4**), en el cual se puede observar que la principal causa de enfermedades transmitidas por alimentos han sido los alimentos preparados.

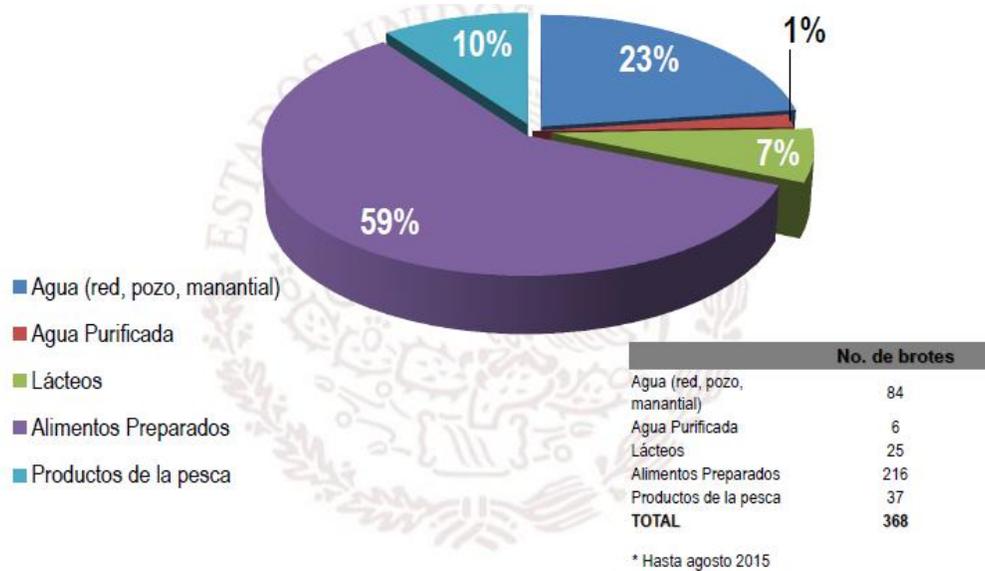


Figura 4. Brotes en los que se ha identificado el alimento involucrado. Cofepris, 2015.

1.4. Género *Listeria*

La mayoría de las especies dentro del género *Listeria* están bien documentadas para ser ampliamente distribuidas y se encuentran comúnmente en diferentes ambientes. *L. monocytogenes* ha sido aislado en todo el mundo, incluso en América del Norte, América del Sur y Europa (Orsi et al., 2011). En general, no hay una indicación clara de que las diferentes especies de *Listeria* se encuentren preferiblemente en ciertos ambientes, a pesar de que los estudios individuales han identificado asociaciones estadísticas entre diferentes ambientes y el aislamiento de especies específicas de *Listeria* (Orsi and Wiedmann, 2016).

Árbol filogenético del género *Listeria* (**Figura 5**), en donde se puede apreciar que las especies de *Listeria* forman un restringido grupo monofilético dentro del género *Listeria* lo que nos dice que las diferentes especies de *Listeria* mantienen entre ellas una relación de estrecha de similitud.

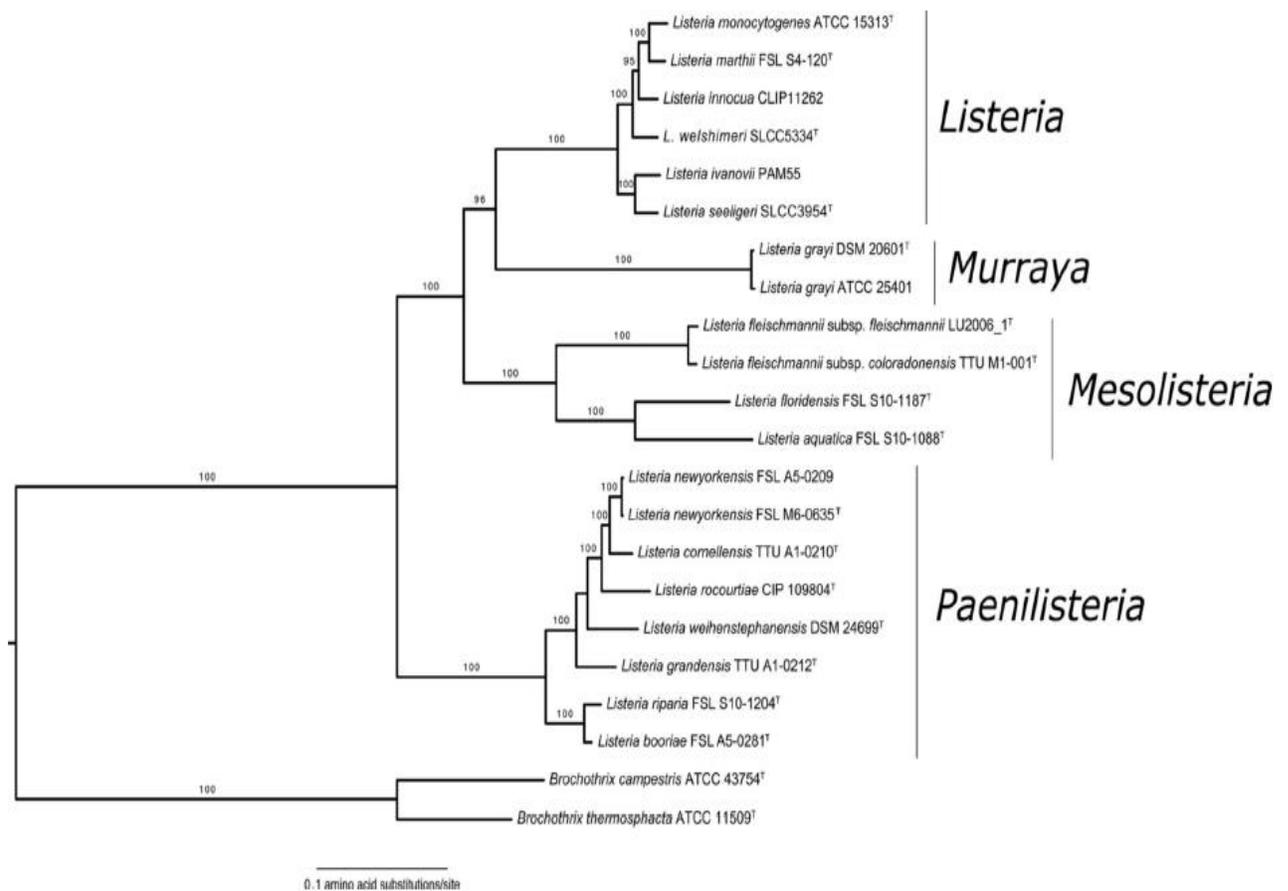


Figura 5. Árbol filogenético del género *Listeria*. Obtenido de (Orsi and Wiedmann, 2016). En donde se observa que la máxima verosimilitud de filogenia está basada en secuencias de aminoácidos concatenados de 325 genes de copia única presentes en todas las especies de *Listeria*. Los valores en las ramas representan valores de arranque (> 70%) basados en 250 réplicas de arranque. Los nombres de nuevos géneros propuestos se muestran cerca de grupos monofiléticos. Bar, 0.1 sustituciones de aminoácidos por sitio.

1.4.1. Características generales

Las bacterias pertenecientes al género *Listeria* son bacilos gram-positivos cortos, regulares, no esporulados ni ramificados, que suelen observarse en disposición individual o formando cadenas cortas. En cultivos viejos pueden aparecer formando filamentos de 6-20 mm de longitud. Presentan de 1 a 5 flagelos peritricos que les confieren movilidad a 28°C (Liu, 2006; Orsi and Wiedmann, 2016). Los genomas de *Listeria* comparten características como el contenido de G + C varía de 34.6 a 41.6%; los tamaños del genoma varían de 2.8 a 3.2 Mb, y los genomas de *Listeria* son altamente sintéticos (es decir, el orden de los genes está altamente conservado en diferentes especies).

El genoma de *Listeria* se ha estimado aproximadamente en 6500 genes, de los cuales el 17% están involucrados en el metabolismo de nucleobases, nucleótidos, nucleósidos y ácidos nucleicos, 14% de los cuales están involucrados en el metabolismo macromolecular celular, y 10% de los cuales están involucrados en el proceso metabólico de las proteínas (Gasánov et al., 2005; Orsi and Wiedmann, 2016).

Las colonias son pequeñas (de 1 a 2 mm tras uno o dos días de incubación) y lisas. Al observarse a la lupa con epi-iluminación, con un ángulo de la luz de 45°-60°, se observan reflejos de color azul-verdoso sobre una superficie finamente granular. Su temperatura óptima de crecimiento está entre 30°C y 37°C, pero pueden crecer a 4°C en pocos días (Murray et al., 2009).

Listeria spp. son anaerobias facultativas, catalasa positivas y oxidasa negativas. Las reacciones de Voges-Proskauer y rojo de metilo son positivas. Hidrolizan la esculina en pocas horas, pero no la urea ni la gelatina; no producen indol ni SH₂. Producen ácido de la D-glucosa y de otros azúcares (**Cuadro 1.**) (Koneman and Allen, 2008; MacFaddin, 2003; Orsi and Wiedmann, 2016).

1.4.2. Especies

Hasta ahora, el género *Listeria* está formado por 17 especies reconocidas: *Listeria monocytogenes*, *Listeria innocua*, *Listeria ivanovii*, *Listeria seeligeri*, *Listeria welshimeri*, *Listeria grayi*, *Listeria marthii*, *Listeria rocourtiae*, *Listeria fleischmannii*, *Listeria weihenstephanensi*, *Listeria floridensis*, *Listeria aquatic*, *Listeria cornellensis*, *Listeria riparia*, *Listeria grandensis*, *Listeria booriae* and *Listeria newyorkensis* (Camargo et al., 2016; Orsi and Wiedmann, 2016; Tao et al., 2015).

1.4.3. Especies de relevancia médica

En general, se considera que solo dos especies del género *Listeria* son patógenas, *L. monocytogenes* que pueden infectar una variedad de especies animales, incluidos los humanos y *L. ivanovii* que tiene importancia epidemiológica restringida a los rumiantes (Camargo et al., 2016; Gasánov et al., 2005). Aunque la mayoría de los brotes de listeriosis humana y el 85% de los casos de animales son causados por *L. monocytogenes*, algunos autores informaron casos de infección por *Listeria seeligeri*, *Listeria ivanovii* y *Listeria innocua* (Mazza et al., 2015).

<i>Listeria</i> species	Voges-Proskauer red	Methyl red reduction	Nitrate reduction	Motility	Growth at 4 °C	Hemolysis	PLC	PLC	Acyamidase	α-Mannosidase	Fermentation of Mannosidase of	D-Arabinose	D-Xylose	L-Rhamnose	α-Methyl-D-glucoside	D-Ribose	D-Glucose-1-phosphate
<i>Listeria</i> sensu stricto																	
<i>L. monocytogenes</i>	+	-	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	-	-
<i>L. marthii</i>	+	-	-	+	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	+	-	-
<i>L. innocua</i>	+	-	-	+	+	-	-	-	+	+	+	-	-	V	+	-	-
<i>L. welshimeri</i>	+	-	-	+	+	-	-	-	V	+	+	+	+	V	+	-	-
<i>L. ivanovi</i>	+	-	-	+	+	-	-	-	V	+	+	+	+	-	+	+	V
<i>L. seeligeri</i>	+	-	-	+	+	-	-	-	+	-	+	+	+	-	+	-	-
<i>Listeria</i> sensu lato, possible new genus <i>Murraya</i>																	
<i>L. grayi</i>	+	+	V	+	+	-	-	-	+	V	+	+	-	-	+	+	-
<i>Listeria</i> sensu lato, possible new genus <i>Mesolisteria</i>																	
<i>L. fletcherianae</i>	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-
<i>L. floridensis</i>	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-
<i>L. aquatica</i>	V	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+	-	+	-
<i>Listeria</i> sensu lato, possible new genus <i>Paenulisteria</i>																	
<i>L. novyorkensis</i>	-	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	V	+	+	-
<i>L. cornulanae</i>	-	V	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-
<i>L. rocourtae</i>	-	V	+	-	+	-	-	-	-	+	-	-	+	+	+	+	-
<i>L. welshimeri</i>	-	V	+	-	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-
<i>L. weihenstephanensis</i>																	
<i>L. grandensis</i>	-	+	+	-	+	-	-	-	-	-	V	+	+	-	+	+	-
<i>L. riparia</i>	-	V	+	-	+	-	-	-	-	+	-	+	+	+	+	V	-
<i>L. boorbiae</i>	-	+	+	-	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	V	-

<i>Listeria</i> species	D-Tagatose	D-Mannitol	Sucrose	Turanose	Glycerol	D-Galactose	L-Sorbitose	Inositol	Methyl-α-D-mannose	Maltose	Lactose	Melibiose	Inulin	D-Melezitose	D-Lyxose	D-Glucose
<i>Listeria</i> sensu stricto																
<i>L. monocytogenes</i>	-	-	+	-	V	V	V!	-	-	+	+	V!	V!	V	V	V!
<i>L. marthii</i>	-	-	-	+	-	-	V!	-	-	+	+	V	-	-	-	V!
<i>L. innocua</i>	-	-	+	V	-	-	V!	-	-	+	+	V!	V!	V	V	V!
<i>L. welshimeri</i>	+	-	-	-	+	-	-	-	ND	+	+	-	-	V	V	+
<i>L. ivanovi</i>	-	-	+	-	+	V	V!	-	ND	+	+	-	-	V	-	V!
<i>L. seeligeri</i>	-	-	+	-	+	-	-	-	ND	+	+	-	-	V	-	+
<i>Listeria</i> sensu lato, possible new genus <i>Murraya</i>																
<i>L. grayi</i>	-	+	-	-	V	+	V!	-	+	+	+	-	-	-	V	+
<i>Listeria</i> sensu lato, possible new genus <i>Mesolisteria</i>																
<i>L. fletcherianae</i>	-	V	V	V	+	-	V	V	V	+	+	V	-	V	-	+
<i>L. floridensis</i>	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	+	-	-	-	+	+
<i>L. aquatica</i>	+	-	-	-	V	-	-	V	-	-	-	-	-	-	+	+

Cuadro 1. Características fenotípicas de las especies de *Listeria*. Obtenido de (Orsi and Wiedmann, 2016).

1.5. *Listeria monocytogenes*

1.5.1. Características

Incluso aunque su incidencia es relativamente baja, en comparación con otros patógenos transmitidos por los alimentos como *Salmonella spp.* (a nivel mundial 93.8 millones de casos de gastroenteritis al año son causados por infecciones por *Salmonella spp.*) y *Campylobacter*, su tasa de mortalidad oscila entre 20 y 30%, lo que ubica a este patógeno entre las causas más frecuentes de muerte debido a enfermedades transmitidas por los alimentos (Garrido-Maestu et al., 2018; Paziak-Domańska et al., 1999). *Listeria monocytogenes* es un bacilo Gram positivo, pequeño (0,4 a 0,5 µm de ancho × 0,5 a 1,5 µm de largo) no ramificado y anaerobio facultativo, (Liu, 2006; Murray et al., 2009), capaz de proliferar en un amplio rango de temperaturas (4 °C a 40 °C), además, de que son relativamente tolerantes a las tensiones ambientales, como una alta concentración de NaCl y un pH bajo [3 ^ 7] (Paziak-Domańska et al., 1999). Es catalasa positivo y no presenta cápsula ni espora. Tiene flagelos peritricos, gracias a los cuales presenta movilidad a 30 °C o menos, pero es inmóvil a 37 °C, temperatura a la cual sus flagelos se inactivan (Murray et al., 2009). En su membrana celular tiene una pared celular de mureína y peptidoglucano que contiene ácido meso-diaminopimérico que se encuentra fijo a la membrana celular por el ácido teicoico y el ácido lipo teicoico presentes en la membrana celular (Murray et al., 2009).

L. monocytogenes contempla los serotipos 1/2a, 1/2b, 1/2c, 3a, 3b, 3c, 4a, 4b, 4ab, 4c, 4d, 4e y 7, todos potencialmente patógenos. Éstos conforman los linajes I (1/2b, 3b, 3c, 4b), II (1/2a, 1/2c, 3a), III (4a, 4b, 4c), y IV (4a, 4b, 4c), (**Cuadro 2**). Los cuales presentan diferencias en su transmisión y capacidad para causar enfermedad. El linaje II se aísla frecuentemente de alimentos y del ambiente, y es responsable de casos esporádicos de listeriosis; sin embargo, en la mayoría de los brotes se ha identificado la participación del linaje I, particularmente del serotipo 4b (Castañeda-Ruelas and León Félix, 2014). Identificando la participación del linaje I, particularmente del serotipo 4b (Castañeda-Ruelas and León-Félix, 2014).

Linaje	Identificación inicial	Serotipos	Características genéticas	Distribución
I	Piffaretti et al. (1989)	1/2b, 3b, 3c, 4b	La menor diversidad entre los linajes; Niveles más bajos de recombinación entre los linajes	Comúnmente aislado de varias fuentes; sobre representados entre los humanos.
II	Piffaretti et al. (1989)	1/2a, 1/2c, 3a	Más diverso, los niveles más altos de recombinación.	Representaciones en exceso entre los alimentos y los entornos relacionados con los alimentos, así como los entornos naturales; El serotipo 1 / 2a se está volviendo común en los humanos.
III	Rasmussen et al. (1995)	4a, 4b atípico, 4c	Muy diverso; Niveles de recombinación entre los linajes I y II.	La mayoría de los aislamientos obtenidos de rumiantes
IV	Described by Roberts et al. (2006); first reported as lineage IV by Ward et al. (2008)	4a, 4b atípico, 4c	Pocos aislados analizados hasta la fecha.	La mayoría de los aislamientos obtenidos de rumiantes

Cuadro 2. Información sobre la distribución ambiental, características genéticas, y linajes asociados de aislados de *Listeria monocytogenes*. Obtenido de (Camargo et al., 2016).

1.5.2. Identificación microbiológica

Listeria monocytogenes se desarrolla de forma adecuada en agar sangre generando colonias negras-grisáceas y presentando beta hemolisis. Es un bacilo catalasa positivo, móvil y se evidencia en medios de cultivo semisólido donde a los 25 °C el microorganismo forma una especie de sombrilla. (Murray et al., 2009). Se desarrolla de manera adecuada en bilis, por lo que se utilizan medios con agar bilis esculina. Esta prueba consiste en determinar la capacidad que tiene *Listeria monocytogenes* de hidrolizar la esculina a esculina y la glucosa en presencia de sales biliares, la esculina generada reacciona con los iones de hierro que contiene el cloruro férrico en el medio y genera una coloración negra, siendo esta positiva (Liu, 2006; MacFaddin, 2003).

Listeria monocytogenes presenta un metabolismo fermentativo al generar ácido a partir de la glucosa y por producir acetona, lo que conlleva a una reacción de Voges-Proskauer positiva y no fermenta la xilosa. La fermentación de estos azúcares se evidencia por la técnica de voges-proskauer, la cual consiste en identificar si *L. monocytogenes* genera ácidos y diacetilo ya que el medio contiene azúcares fermentables. Para ver la reacción se utilizan los reveladores alfa-naftol y KOH. Si la suspensión se torna color rosa la prueba es positiva (Koneman and Allen, 2008) (MacFaddin, 2003). De igual forma la prueba de CAMP es utilizada para la identificación de *Listeria monocytogenes*, aunque inicialmente no fue diseñada para la detección de este microorganismo si no para la identificación presunta de estreptococos del grupo B (*Streptococcus agalactiae*) Groves utilizó por primera vez una versión de la prueba CAMP para identificar *Listeria monocytogenes*. Descubrió que *Listeria monocytogenes* también era positiva para la prueba CAMP (Groves and Welshimer, 1997). La cual consiste en sembrar en agar sangre una estría en forma horizontal de *Listeria monocytogenes* y una perpendicular a esta de *S. aureus* sin unirse entre sí.

El resultado esperado será que *Listeria monocytogenes* genere el factor CAMP el cual produce un sinergismo con la beta lisina producida por *Staphylococcus aureus* sobre los eritrocitos generando una lisis de estos (GROVES and WELSHIMER, 1997; Liu, 2006; MacFaddin, 2003).

1.5.3. Patogenia

A pesar de ser patogénico a nivel de especie, *L. monocytogenes* se compone de un espectro de cepas o genotipos con potencial patógeno variable. Mientras que muchas cepas de *L. monocytogenes* son altamente patógenas y algunas veces mortales, otras son relativamente virulentas y causan poco daño en el huésped (Liu, 2006), pero principalmente la patogenia de *L. monocytogenes* se basa en lo siguiente:

Listeria monocytogenes es un patógeno facultativo intracelular que puede crecer en los macrófagos, las células epiteliales y los fibroblastos en cultivo (Koneman and Allen, 2008).

Un problema significativo para la industria alimentaria con *L. monocytogenes* es su capacidad de poder persistir durante meses o incluso años en suelos y equipos e incluso desagües de instalaciones de procesamiento de alimentos debido principalmente a su capacidad para sobrevivir

en condiciones alimentarias que son estresantes para otras bacterias, como temperaturas de refrigeración, desecación, calor y alto contenido de sal y así como a su capacidad para formar biopelículas (Camargo et al., 2016; Ferreira et al., 2014; Rodríguez-López et al., 2018). De la misma forma en la que *L. monocytogenes* persiste en suelo o equipo durante un largo periodo de tiempo tras la ingesta de alimentos contaminados, *L. monocytogenes* puede sobrevivir a la exposición a enzimas proteolíticas, ácido gástrico y sales biliares, esto debido que posee una proteína denominada internalina la cual interactúa con el receptor de las células del huésped para la adhesión celular, esta se denomina E-cadherina la cual induce la fagocitosis, siendo estas específicas para cada tejido (Koneman and Allen, 2008). La presencia de internalinas facilita la entrada del microorganismo a las células. Para lo cual el organismo reacciona creando una especie de fagosoma con el fin de encapsular la bacteria la cual produce una toxina citolítica y hemolítica que actúa como un factor de virulencia importante llamado listeriolisina O que se trata de una proteína de 52 kD que se secreta a pH bajo y baja concentración de hierro, condiciones presentes en el interior del fagolisosoma; así como fosfolipasa C que le permiten destruir el fagosoma hidrolizando los lípidos de su membrana ya que se fija al colesterol y rompe la membrana del fagolisosoma. Esta listeriolisina está codificada por el gen *hly*. Al estar dentro del citosol *L. monocytogenes* utiliza una proteína de superficie denominada ActA la cual genera la polimerización intracelular de la actina. Pudiendo ser este mecanismo el principal factor que favorece la supervivencia intracelular de *L. monocytogenes*, así como una de las características patogénicas más definitorias de *L. monocytogenes* (Koneman and Allen, 2008; Oteo and Alós).

1.5.4. Resistencia antimicrobiana

Generalmente, *L. monocytogenes* es sensible a una amplia gama de antibióticos como penicilina, ampicilina, gentamicina, eritromicina, tetraciclinas, rifampicina, cotrimoxazol y vancomicina. En cuanto a la actividad las fluoroquinolonas actuales y las cefalosporinas, especialmente las de tercera y cuarta generación como cefotaxima y cefepima presentan una actividad pobre ante *L. monocytogenes* y casi todas las cepas son resistentes a fosfomicina (Allerberger and Wagner, 2010). Se han descrito resistencias a macrólidos y a tetraciclinas en algunos aislamientos; suelen estar codificadas por plásmidos, aunque también hay casos de resistencia a tetraciclinas codificada por el cromosoma. La rifampicina tiene muy buena actividad *in vitro*, pero se seleccionan cepas resistentes durante el tratamiento con mucha facilidad. Existe un caso de resistencia a trimetoprim en una cepa de *L. monocytogenes*, por un mecanismo desconocido hasta ahora (Oteo and Alós). Aunque se han descrito fracasos clínicos en tratamientos con penicilina o ampicilina, no se ha encontrado ninguna cepa resistente a estos antibióticos (Allerberger and Wagner, 2010; Blanot et al., 1997).

La mayor parte de los antibióticos se muestran bacteriostáticos frente a *L. monocytogenes*. En particular los β -lactámicos. Sólo se ha observado actividad bactericida en los aminoglucósidos, glucopéptidos y cotrimoxazol (principalmente asociada al trimetoprim) (Oteo y Alós).

1.6. Listeriosis

1.6.1. Características

La listeriosis es una de las enfermedades de transmisión alimentaria más graves, aunque relativamente tiene una baja prevalencia (0,1 a 10 casos anuales por millón de personas, dependiendo del país y la región) (OMS, 2018). La alta tasa de mortalidad del 20 a 30% (Castañeda-Ruelas and León-Félix, 2014; Paziak-Domańska et al., 1999) de esta infección la convierte en un importante problema de salud pública, afectando principalmente a niños, personas de la tercera edad, mujeres embarazadas y personas con sistemas inmunes comprometidos.

Los principales tipos de Listeriosis son la invasiva y la no invasiva o gastro intestinal.

La no invasiva o gastrointestinal (gastroenteritis febril por *Listeria*) es una forma leve que afecta sobre todo a personas sanas (sin trastornos inmunes). Los síntomas son náuseas, diarrea, fiebre, vómitos, cefalea, así como dolores musculares. El periodo de incubación es breve y puede oscilar entre las 20 horas posteriores a la ingestión del alimento o algunos días (Castañeda-Ruelas and León-Félix, 2014; OMS, 2018). Mientras que la Listeriosis invasiva es más grave ya que afecta a determinados grupos denominados de alto riesgo, como mujeres embarazadas, pacientes en tratamiento por cáncer, sida o trasplantes de órganos, así como las personas de la tercera edad y los lactantes, se presenta entre 20 y 30 días después de la ingestión del patógeno, esta se caracteriza por síntomas graves; las formas clínicas incluyen septicemias, infecciones del sistema nervioso central (meningitis, meningoencefalitis), endocarditis e infecciones localizadas; de los cuales de 20 a 50% de los casos son mortales (Castañeda-Ruelas and León-Félix, 2014).

Diferentes tipos de alimentos están implicados en la transmisión del patógeno a los seres humanos, principalmente alimentos listos para el consumo (ej. salchichas, patés, salmón ahumado), así como productos lácteos (quesos frescos, leche y helados no pasteurizados), ensaladas preparadas (ensaladas con repollo y germinados), frutas y hortalizas frescas (Mazza et al., 2015). Pero debido al prolongado periodo de incubación hace que resulte difícil identificar el alimento que está en el origen de la infección. **Figura 6**, proceso de infección causado por *Listeria monocytogenes* en el humano descrito por (Camargo et al., 2016).

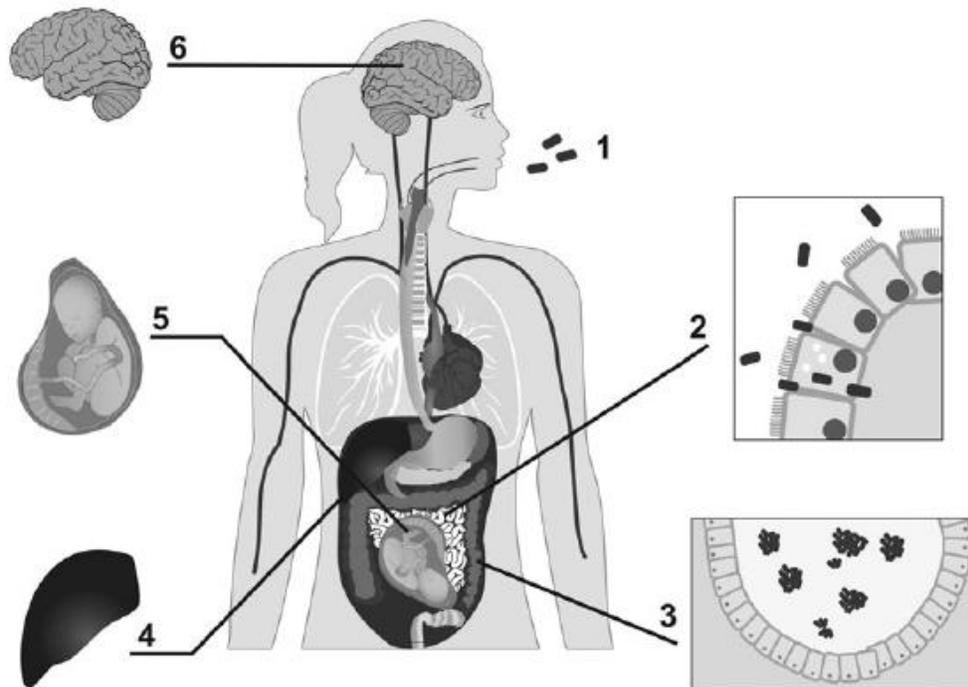


Figura 6. Infección humana por *Listeria monocytogenes*. Obtenido de (Camargo et al., 2016).

- (1) Ingestión de alimentos contaminados; (2) La colonización del tracto digestivo por *Listeria* que puede provocar síntomas, como diarrea y fiebre; las bacterias cruzan la barrera intestinal, debido a la producción de InI, alcanzando los ganglios linfáticos mesentéricos y accediendo al sistema circulatorio; (3) *Listeria* puede formar agregados, dependientes de ActA, lo que favorece la persistencia a largo plazo en la luz del ciego; (4) Los primeros órganos afectados son el hígado y el bazo (que son reservorios de persistencia bacteriana): estos órganos liberan esta bacteria en el sistema sanguíneo, lo que produce septicemia; (5) *L. monocytogenes* puede atravesar la barrera placentaria que lleva al aborto o infección neonatal generalizada (que causa neumonía, sepsis o meningitis); y (6) Además, *L. monocytogenes* puede cruzar la barrera hematoencefálica y llegar al cerebro, causando meningitis, meningoencefalitis y rombencefalitis.

1.6.2. Prevalencia a nivel mundial

En los últimos años, se ha informado una tasa creciente de listeriosis en varios países europeos según el “Annual Epidemiological Report for 2015” publicado por el “European Centre for Disease Prevention and Control” (ECDC), en 2015, 30 países de la UE / EEE informaron 2 224 casos confirmados de listeriosis (**Figura 7**), con una tasa global de notificación de 0,5 casos por 100 000 habitantes siendo Alemania y Francia los países con el mayor número de casos notificados (580 y 412, respectivamente), lo que corresponde al 44,6% de todos los casos notificados en la UE / EEE. En España (0,9 / 100 000), Malta (0,9 / 100 000), Suecia (0,8 / 100 000) y Estonia (0,8 / 100 000).

Países con el mayor número de casos notificados

Países con las tasas más altas de incidencia estandarizadas por edad.

Country	2011		2012		2013		2014		2015				
	Confirmed cases		Confirmed cases		Confirmed cases		Confirmed cases		National coverage	Reported cases	Confirmed cases		
	Number	Rate	Number	Rate	Number	Rate	Number	Rate			Number	Rate	ASR
Austria	26	0.3	36	0.4	36	0.4	49	0.6	Y	38	38	0.4	0.4
Belgium	70	-	83	0.7	66	0.6	84	0.7	Y	83	83	0.7	0.7
Bulgaria	4	0.1	10	0.1	3	0.0	10	0.1	Y	5	5	0.1	0.1
Croatia	-	-	0	0.0	0	0.0	4	0.1	Y	2	2	0.0	0.0
Cyprus	2	0.2	1	0.1	1	0.1	0	0.0	Y	0	0	0.0	0.0
Czech Republic	35	0.3	32	0.3	36	0.3	38	0.4	Y	36	36	0.3	0.3
Denmark	49	0.9	50	0.9	51	0.9	92	1.6	Y	44	44	0.8	0.7
Estonia	3	0.2	3	0.2	2	0.2	1	0.1	Y	11	11	0.8	0.8
Finland	43	0.8	61	1.1	61	1.1	65	1.2	Y	46	46	0.8	0.7
France	282	0.4	346	0.5	369	0.6	373	0.6	Y	412	412	0.6	0.6
Germany	331	0.4	414	0.5	463	0.6	598	0.7	Y	662	580	0.7	0.6
Greece	10	0.1	11	0.1	10	0.1	10	0.1	Y	31	31	0.3	0.2
Hungary	11	0.1	13	0.1	24	0.2	39	0.4	Y	38	37	0.4	0.4
Ireland	7	0.2	11	0.2	8	0.2	15	0.3	Y	19	19	0.4	0.4
Italy	129	0.2	112	0.2	143	0.2	132	0.2	Y	153	153	0.3	0.2
Latvia	7	0.3	6	0.3	5	0.2	3	0.1	Y	8	8	0.4	0.4
Lithuania	6	0.2	8	0.3	6	0.2	7	0.2	Y	5	5	0.2	0.2
Luxembourg	2	0.4	2	0.4	2	0.4	5	0.9	Y	0	0	0.0	0.0
Malta	2	0.5	1	0.2	1	0.2	1	0.2	Y	4	4	0.9	0.9
Netherlands	87	0.5	73	0.4	72	0.4	90	0.5	Y	71	71	0.4	0.4
Poland	62	0.2	54	0.1	58	0.2	87	0.2	Y	70	70	0.2	0.2
Portugal	-	-	-	-	-	-	-	-	Y	28	28	0.3	0.3
Romania	1	0.0	11	0.1	9	0.0	5	0.0	Y	12	12	0.1	0.1
Slovakia	31	0.6	11	0.2	16	0.3	29	0.5	Y	18	18	0.3	0.4
Slovenia	5	0.2	7	0.3	16	0.8	18	0.9	Y	13	13	0.6	0.6
Spain	91	0.8	109	0.9	140	1.0	161	0.8	45%	207	206	1.0	0.9
Sweden	56	0.6	72	0.8	93	1.0	125	1.3	Y	88	88	0.9	0.8
United Kingdom	164	0.3	183	0.3	192	0.3	201	0.3	Y	187	186	0.3	0.3
EU	1516	0.4	1720	0.4	1883	0.4	2242	0.5	94%	2291	2206	0.5	0.4
Iceland	2	0.6	4	1.3	1	0.3	4	1.2	Y	0	0	0.0	0.0
Liechtenstein	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Norway	21	0.4	30	0.6	21	0.4	29	0.6	Y	18	18	0.3	0.4
EU/EEA	1539	0.4	1754	0.4	1905	0.4	2275	0.5	-	2309	2224	0.5	0.4

Source: Country reports. Legend: Y = yes, N = no, C = case based, A = aggregated, * = no data reported, ASR = age-standardised rate, - = no notification rate calculated.

Figura 7. Distribución de casos confirmados de Listeriosis por cada 100 000 habitantes, UE / EEE, 2011-2015. Obtenido de (ECDC, 2018).

L. monocytogenes es persistente en ambientes o alimentos entre ellos las carnes listas para el consumo, los productos lácteos como vehículos predominantes y en menor medida frutas y vegetales los cuales se han visto involucrados en los principales brotes de Listeriosis que han ocurrido desde 2008 (**Cuadros 3 y 4**), (Castañeda-Ruelas and León-Félix, 2014; Rodríguez-López et al., 2018).

En la actualidad el control de la contaminación de alimentos por *L. monocytogenes* (causa de los diversos brotes de Listeriosis en diferentes países) presenta una principal complicación y esta radica en la disparidad en los criterios microbianos establecidos por diferentes agencias reguladoras como por ejemplo el Departamento de Agricultura de los Estados Unidos (USDA) y la Administración de Alimentos y Medicamentos (FDA) los cuales implementaron una política de "tolerancia cero" para la contaminación de alimentos listos para el consumo por *L. monocytogenes*, en contraste a el Reglamento N.º 2073/2005 de la Comisión Europea el cual permite niveles de *L. monocytogenes* de hasta 100 UFC/g en alimentos listos para el consumo, en Canadá, Australia y Nueva Zelanda de igual forma se permiten niveles de *L. monocytogenes* inferiores a 100 UFC/g en alimentos listos para el consumo (Rodríguez-López et al., 2018).

AÑO	PAÍS	PRODUCTO ALIMENTICIO	CASOS	HOSPITALIZACIONES	MUERTES
2008	CANADÁ	EMBUTIDOS	57	47	24
2009-2010	AUSTRIA, ALEMANIA Y REPÚBLICA CHECA	QUESO DE LECHE AGRIA (QUARGEL CHEESE)	34	34	8
2009-2012	PORTUGAL	QUESOS FRESCOS	30	30	11
2010	TEXAS (ESTADOS UNIDOS)	APIO EN CUBOS	10	10	5
2011-2012	28 ESTADOS PERTENECIENTES A ESTADOS UNIDOS	MELONES	147	143	33
2012	14 ESTADOS PERTENECIENTES A ESTADOS UNIDOS	QUESO MARCA RICOTTA SALTA	22	20	4
2012	ESPAÑA	QUESOS FRESCOS ESTILO LATINO	2	2	2
2013-2014	SUIZA	ENSALADA	32	32	4
2013-2014	DINAMARCA	PRODUCTOS CÁRNICOS	41	41	17
2014-2015	12 ESTADOS PERTENECIENTES A ESTADOS UNIDOS	MANZANAS ACARAMELADAS	35	34	7
2015	10 ESTADOS PERTENECIENTES A ESTADOS UNIDOS	QUESOS SUAVES	30	28	3
2016	9 ESTADOS PERTENECIENTES A ESTADOS UNIDOS	ENSALADAS EMPAQUETADAS	19	19	1
2016	4 ESTADOS PERTENECIENTES A ESTADOS UNIDOS	VERDURAS CONGELADAS	9	9	3

Cuadro 3. Principales brotes de Listeriosis transmitida por los alimentos desde 2008, obtenido de (Rodríguez-López et al., 2018).

Alimento	Muestras/total	%	País
Carne de res cruda	3/17	18	Portugal
	4/157	3	China
Carne de pollo cruda	9/15	60	Portugal
	57/158	36	España
Carne de puerco cruda	20/185	11	China
Pescado crudo	3/25	12	Portugal
Mariscos	31/268	12	Chile
	2/204	1	China
Salmón ahumado	28/100	28	España
Leche cruda	1/6	17	Portugal
Leche pasteurizada	0/28	28	Portugal
Queso fresco	2/50	4	Portugal
	2/256	1	Chile
Helado	21/603	4	Chile
Delicatesen	35/396	9	España
	23/634	4	Chile
Salchichas	7/93	8	EUA
	17/24	71	EUA
Vegetales frescos	31/1750	2	España
Vegetales congelados	35/271	13	Portugal

Cuadro 4. Estudios realizados sobre la frecuencia de aislamiento de *L. Monocytogenes* en alimentos, obtenido de (Castañeda-Ruelas and León-Félix, 2014).

1.6.3. Prevalencia de Listeriosis en México

En México, los estudios epidemiológicos sobre la incidencia y formas clínicas de la Listeriosis, así como la presencia de *L. monocytogenes* en los alimentos son escasos debido a que la información con la que se cuenta es insuficiente. En una revisión realizada de 1982 a 2006 sobre la Listeriosis en México fueron registrados 14 casos reportados por Castrejón-Alba, et. al, 1997; Bonfil AA., et. al, 1997; afectando principalmente a mujeres, con una tasa de mortalidad del 50%, así como un caso de deceso reportado por Espinoza-Gómez F., et. al, 2006. (Castañeda-Ruelas and León-Félix, 2014).

En estudios recientes, aunque se ha realizado la caracterización mediante perfiles genéticos y serotipificación de cepas de *L. monocytogenes* de origen alimentario, no se ha logrado establecer su participación como agente responsable de ETA. Los datos de estos estudios sugieren la necesidad de que el sector salud y la industria alimentaria implementen un marco legal para la búsqueda obligatoria del patógeno, lo cual conlleve al control de éste en México (Castañeda-Ruelas and León-Félix, 2014; Flores and Herrera, 2005).

En diferentes estados de la República Mexicana se han reportado prevalencias de este patógeno del 2-10% en diferentes productos alimenticios. Por ejemplo, Sánchez y colaboradores reportaron el 2% de las muestras positivas a *Listeria* en una planta congeladora

Sánchez y colaboradores reportaron la presencia de *L. monocytogenes* en el 2% de las muestras de alimentos preparados (enchiladas, quesadillas, tacos de carne, hamburguesas de carne, hamburguesas de pollo, emparedados de jamón con queso y emparedados de ensalada de pollo, materia prima animal (queso, carne de res y carne de pollo) y vegetales (zanahorias, cebolla, chícharos, elote), de una planta congeladora en Nuevo León. En el mismo estado, Heredia y colaboradores refieren aislamiento de *L. monocytogenes* en el 20% de las muestras de carne de res cruda. Rodas-Suárez y colaboradores aislaron *L. monocytogenes* en el 5% de las muestras de pescado obtenidas de la laguna de Pueblo Viejo, en Baja California. Silva y colaboradores detectaron el patógeno en el 1 y 10% de las muestras de salchichas y jamón, respectivamente, en la misma región. Respecto a productos lácteos, Vázquez-Salinas y colaboradores detectaron *L. monocytogenes* en el 3% (39/1300) de las muestras de leche cruda obtenidas de granjas del Distrito Federal. Reportando el aislamiento de cepas perteneciente a los serogrupos I y IV; de éstos, el serogrupo I resultó virulento en ensayos con murino.

1.6.4. Tratamiento

En la actualidad, el tratamiento para cualquier tipo de listeriosis se realiza con una asociación sinérgica de dosis altas de β -lactámicos (penicilina o ampicilina sola), o en combinación con gentamicina, son considerados los fármacos de elección. Como antibiótico alternativo, se ha propuesto Trimetoprim-sulfametoxazol. Algo que se tiene que destacar es que en años recientes se ha incrementado la emergencia de cepas de *L. monocytogenes* resistentes a antibióticos de uso común lo que representa un problema aún más grave para la salud pública (Allerberger and Wagner, 2010; Castañeda-Ruelas and León-Félix, 2014).

1.6.5. Profilaxis

El sistema de Análisis de Peligros y de Puntos Críticos de Control (HACCP por sus siglas en inglés) es un procedimiento que se implementó para el control del riesgo que puede ocurrir en el procesamiento de los alimentos con el fin de garantizar la inocuidad de los alimentos.

En Estados Unidos, la "Food and Drugs Administration" (FDA) y el "United States Department of Agricultural" (USDA) hacen obligatoria la aplicación del sistema HACCP en la industria alimentaria (Castañeda-Ruelas and León-Félix, 2014).

En México, la NOM-251-SSA1-2009, Prácticas de higiene para el proceso de alimentos, bebidas o suplementos alimenticios establece los requisitos mínimos de buenas prácticas de higiene que deben observarse en el proceso de alimentos, bebidas o suplementos alimenticios y sus materias primas a fin de evitar su contaminación a lo largo de su proceso, la cual se basa principalmente en la aplicación del sistema HACCP, así mismo en México las normas oficiales NOM-091-SSA1-1994, NOM-121-SSA1-1994, NOM-184-SSA1-2002, NOM-213-SSA1-2002, NOM-242-SSA1-2009, NOM-243-SSA1-2010, NMX-F-016-SCFI-2007, NMX-F-165-SCFI-2007, PROY-NMX-F-548-SCFI-2010, regulan la inocuidad de los alimentos en relación con *L. monocytogenes*, para lo cual cuando la Secretaría de Salud, de acuerdo al muestreo y los resultados del análisis microbiológico detecte la presencia de *Listeria monocytogenes*, ordenará por protocolo la realización de un plan de trabajo por parte del fabricante o importador para controlar la presencia de dicho microorganismo.

La Organización Mundial de la Salud (OMS) enlista las medidas generales para prevenir la Listeriosis mismas que para prevenir otras enfermedades de transmisión alimentaria:

1. Mantener la limpieza.
2. Separar alimentos crudos y cocinados.
3. Cocinar completamente.
4. Mantener los alimentos a temperaturas seguras.
5. Usar agua y materias primas seguras.

(OMS, 2018).

1.7. Patobiología de *L. monocytogenes*

1.7.1. Ciclo de vida intracelular de *L. monocytogenes*

El ciclo de vida intracelular de *L. monocytogenes* (**Figura 8.**) es crítico para su patogénesis ya que las cepas de *L. monocytogenes* que no pueden infectar las células del hospedero no pueden causar la enfermedad. Por lo que se han dedicado grandes esfuerzos al descubrimiento de los factores de virulencia de *L. monocytogenes* así como a los mecanismos de virulencia que orquestan la invasión de la célula huésped (Seveau, 2014).

L. monocytogenes es una bacteria que ha evolucionado durante un largo período para adquirir una diversa colección de moléculas, cada una con propiedades y funciones únicas y específicas, las cuales contribuyen al éxito de *L. monocytogenes* como un patógeno intracelular. Tras la ingestión por el huésped a través de alimentos contaminados, *L. monocytogenes* resiste la exposición a enzimas proteolíticas del hospedero, el ambiente ácido del estómago (pH 2.0), sales biliares y ataques inflamatorios no específicos, esto en gran parte a través de las acciones de varios genes de estrés y respuesta como *opuCA*, *Imo1421* y *bsh* y proteínas relacionadas (Liu, 2006).

L. monocytogenes es fagocitado con alta eficacia por fagocitos, los cuales expresan múltiples receptores fagocíticos como complemento, inmunoglobulina y receptores scavenger (receptores en macrófagos y otras células que se unen a numerosos ligandos cuya función principal es la de participar en la eliminación de sustancias extrañas y materiales de desecho en el cuerpo) (Kindt et al., 2007). Esto en contraste con las células normalmente no fagocíticas que ingieren a *L. monocytogenes* con una eficacia menor, por lo que *L. monocytogenes* produce varios factores de virulencia entre los que destaca PrfA el cual es el principal regulador de la virulencia en *L. monocytogenes* y controla la isla de patogenicidad de *L. monocytogenes* 1 (LIPI-1) a partir de la cual se expresan LLO, PlcA, PlcB, ActA y metaloproteínasa de zinc (Mpl) (necesaria para la propagación de *L. monocytogenes* de una célula a otra) (Alvarez and Agaisse, 2016) ; para promover su unión a células normalmente no fagocíticas y activar su internalización (Radoshevich and Cossart, 2017; Seveau, 2014).

Habiendo sobrevivido a esta etapa inicial, *L. monocytogenes* se adhiere y es internalizado por las células huésped con la ayuda de una familia de proteínas de superficie llamadas internalinas. Las internalinas más notables son InIA e InIB codificadas por el operón inIAB. Mientras que InIA (una proteína de 88 kDa codificada por inIA) interactúa con E-cadherina para mediar la entrada de *L. monocytogenes* en las células epiteliales, InIB (una proteína de 65 kDa codificada por inIB) reconoce C1q-R (o Met) para facilitar la entrada de *L. monocytogenes* en un rango mucho más amplio de tipos de células huésped, incluidos hepatocitos, fibroblastos y células epiteloides. Al ingresar a las células hospederas, *L. monocytogenes* evade las funciones de vigilancia inmune del huésped (Camargo et al., 2016; Liu, 2006). Después de la internalización en células fagocíticas o no fagocíticas, la bacteria se localiza en una endosoma, llamado vacuola primaria, la cual es lisada rápidamente por la actividad de dos moléculas asociadas a la virulencia de *L. monocytogenes* y estas son la listeriolisina O (LLO) y la fosfatidilinositol-fosfolipasa C (PI-PLC) responsables de igual forma del posterior escape de *L. monocytogenes*. La LLO (una proteína de 58 kDa codificada por hly) es una toxina activada por tiol formadora de poros que es esencial para la virulencia de *L. monocytogenes* (Camargo et al., 2016; Liu, 2006).

El PI-PLC (una proteína de 33 kDa codificada por plcA), actúa en sinergia con la fosfatidilcolina-fosfolipasa C (PC-PLC, una proteína de 29 kDa codificada por PlcB), en la lisis de las vacuolas primarias. (Seveau, 2014) (Liu, 2006). Después de la lisis de las vacuolas primarias, *L. monocytogenes* se libera al citosol, donde experimenta crecimiento y multiplicación intracelular. La movilidad intracelular y la propagación de célula a célula de *L. monocytogenes* requieren otra proteína de superficie, ActA (una proteína de 67 kDa codificada por actA), que se cotranscribe con PC-PLC y media la formación de colas de actina polarizadas que impulsan a las bacterias hacia la membrana citoplásmica. En la membrana, las bacterias se envuelven en estructuras de tipo filopodio que son reconocidas y englobadas por las células adyacentes, lo que resulta en la formación de

vacuolas secundarias de doble membrana. Una lisis exitosa de las vacuolas secundarias de doble membrana para lo cual también es necesaria la acción de LLO indica el comienzo de un nuevo ciclo de infección, que depende de PC-PLC tras la activación por Mpl (una metaloproteasa de 60 kDa codificada por *mpl*) (Liu, 2006). Los genes que codifican las proteínas asociadas a virulencia PI-PLC, LLO, Mpl, ActA y PC-PLC están ubicados en un grupo de genes de virulencia de 9.6 kb, que están principalmente regulados por un regulador de virulencia pleiotrópico, PrfA (una proteína de 27 kDa codificada por *prfA*). PrfA se une a una secuencia palindrómica de 14 pares de bases río arriba de la región promotora para regular positivamente la transcripción de los principales genes de virulencia de *L. monocytogenes*, que forman el regulón PrfA. La expresión y actividad de PrfA están reguladas en los niveles transcripcional, traslacional y postraducciona. Entre los diversos factores que controlan la expresión o actividad de PrfA, se encuentra la temperatura, la fuente de carbono, la fase de crecimiento bacteriano y las tensiones ambientales las cuales desempeñan un papel importante ya que el ARNm de *prfA* funciona como un termo sensor que permite selectivamente la traducción de PrfA a 37 ° C una vez que la bacteria está dentro de su huésped animal. La región no traducida del ARNm 5 '(UTR) de *prfA* adopta una estructura en horquilla que enmascara el sitio de unión al ribosoma a temperaturas inferiores a 30 ° C, mientras que esta estructura se desnaturaliza o descompone a la temperatura del hospedero (37 ° C), lo que lleva a la síntesis PrfA y transcripción de *hly* y otros genes de virulencia. Además, el promotor *hly* es más activo cuando la bacteria está dentro de las células del huésped. Esto es independiente de PrfA y requiere el *hly5* 'UTR, pero el mecanismo subyacente sigue siendo desconocido. Los genes que codifican *InIA* e *InIB* están situados en otra parte del genoma. Como los genes *inIA* e *inIB* poseen un sitio de unión a la transcripción similar al reconocido por PrfA, también pueden estar parcialmente regulados por PrfA. en la virulencia y patogenicidad de *L. monocytogenes*. (Camargo et al., 2016; Liu, 2006; Radoshevich and Cossart, 2017; Seveau, 2014)

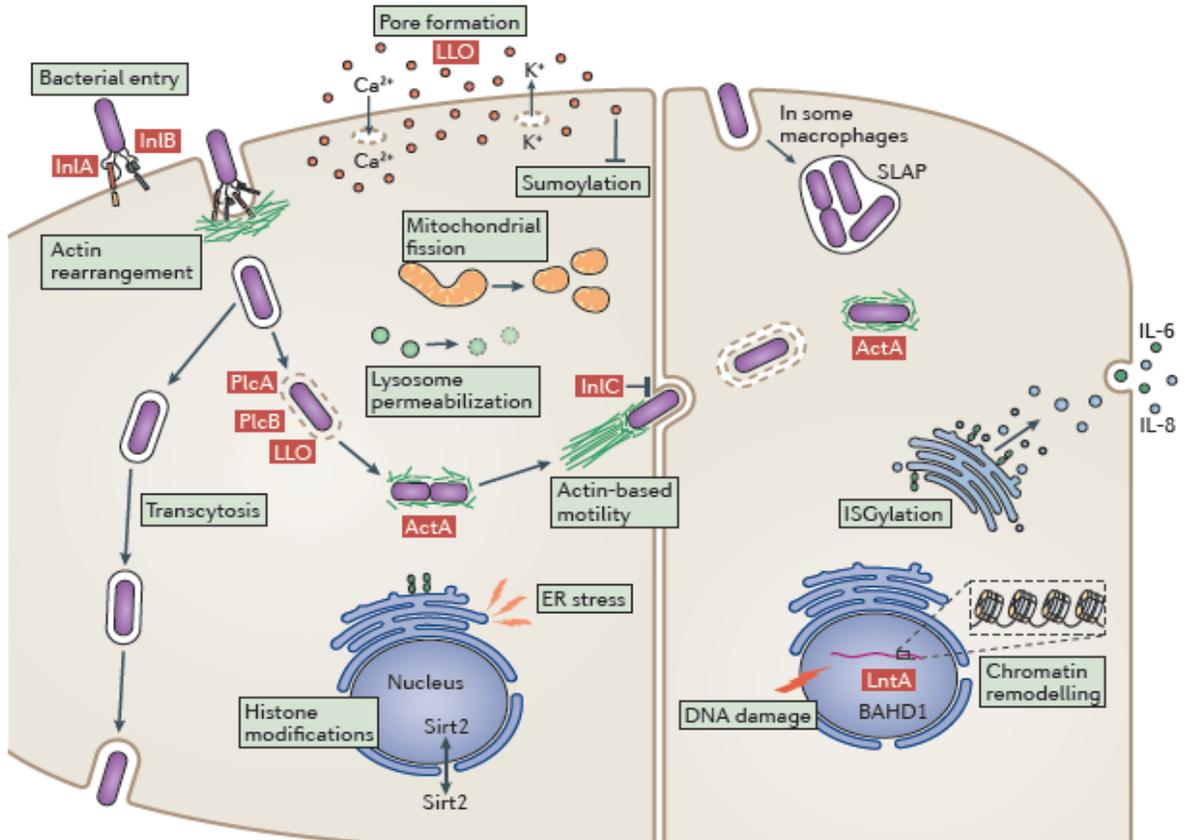


Figura 8. Representación del ciclo de vida intracelular de *L. monocytogenes*, así como los factores de virulencia que orquestan las diversas etapas de su ciclo de vida intracelular. Obtenido de (Radoshevich and Cossart, 2017).

1.8. Técnicas de aislamiento e identificación de *L. monocytogenes* en matrices alimentarias. Desde el reconocimiento de *L. monocytogenes* como un patógeno transmitido por los alimentos, se han producido rápidos avances en el desarrollo de métodos adecuados para el aislamiento y la identificación. Los intentos iniciales de aislar *Listeria* de muestras de alimentos basados en procedimientos clínicos tales como el plaqueo directo en agar sangre no tuvieron éxito, por lo que se han producido avances significativos no solo en los procedimientos selectivos de enriquecimiento de cultivos, sino también en la disponibilidad de muchos métodos de detección nuevos y rápidos basados en las tecnologías moleculares e inmunológicos, sin embargo, un reto importante para la detección molecular del patógeno aún continúa siendo la interferencia del microbioma o la presencia de sustancias inhibitoras (ej. proteína, grasa y ácidos orgánicos) presentes en los alimentos (Gasanov et al., 2005).

1.8.1. Métodos de aislamiento

Los métodos microbiológicos convencionales son indispensables para el aislamiento e identificación de *Listeria spp.* Tanto de fuentes ambientales, así como de productos alimenticios y muestras clínicas y es por eso que existen diversos métodos estándar para el aislamiento de diferentes las fuentes, los cuales han sido descritos por agencias reguladoras como la Organización Internacional de Normalización (ISO), la Administración de Alimentos y Fármacos (FDA), la Federación Internacional de Lechería (FIL), el Departamento de Agricultura de los EE. UU. - Servicio de Inspección y Seguridad Alimentaria (USDA-FSIS) y Protección de la Salud Branch (HPB) (Camargo et al., 2016).

Para todos los métodos, las muestras se preincuban en un medio basal para la recuperación de células lesionadas, seguido de un enriquecimiento en caldos suplementados selectivos/diferenciales, tales como el caldo de enriquecimiento de listeria tamponado, caldo de media frotación (HFB) y caldo de Fraser. Después del enriquecimiento selectivo primario, los cultivos obtenidos se rayan en agares selectivos; los medios de cultivo más comunes utilizados en este paso son PALCAM agar base en el cual *Listeria spp.* Desarrolla pequeñas colonias marrones / negras rodeadas de halos negros debido a la hidrólisis de la esculina, en el agar selectivo Oxford *Listeria* desarrolla las mismas colonias características observadas en PALCAM, y en el medio cromogénico, el agar selectivo de *Listeria* ALOA, *Listeria spp.* Desarrolla colonias azules / verdes, además de que *L. monocytogenes* presenta una característica adicional: un halo blanco opaco debido a su actividad de lecitinasa). Después del aislamiento, cuando se incuba en agar soja tripticasa, los cultivos puros aparecen como no pigmentados y translúcidos presentando color azulado cuando se ve bajo iluminación oblicua. Es importante tomar en cuenta que acorde con el protocolo adoptado las indicaciones tanto de los caldos de enriquecimiento como de los medios de cultivo alternativos pueden variar (Camargo et al., 2016; Gasanov et al., 2005).

Las pruebas consideradas para su aprobación por las agencias reguladoras antes mencionadas deben poder detectar un organismo de *Listeria* por cada 25 g de alimento. En general, esta sensibilidad solo puede lograrse mediante el uso de métodos de enriquecimiento (como los descritos con anterioridad), en los que el organismo puede crecer a un nivel detectable de $\sim 10^4$ 10^5 UFC ml⁻¹. Un aspecto importante que tomar en cuenta es que las células de *Listeria* son de crecimiento lento y pueden ser rápidamente superadas por la competencia, por lo tanto, los agentes bacteriostáticos, como acriflavina y ácido nalidíxico que actúan específicamente para suprimir la microflora competidora, se han introducido en medios de enriquecimiento y agares selectivos. Estos dos agentes están incorporados en todos los métodos estándar utilizados para aislar *Listeria* de alimentos y muestras ambientales (Gasanov et al., 2005).

Dos de los métodos de referencia de cultivo más ampliamente utilizados para la detección de *Listeria* en todos los alimentos son el método bacteriológico y analítico de la FDA (BAM) y el método de la Organización Internacional de Estándares (ISO) 11290 (**Cuadro 5 y Figura 9**) (Gasánov et al., 2005).

Según la metodología citada por el BAM (Bacteriological Analytical Manual) de la FDA, la muestra se enriquece durante 48 horas a 30 ° C con *Listeria*. El caldo de enriquecimiento (formulación LEB, FDA BAM) que contiene los agentes selectivos acriflavina, ácido nalidíxico y el agente antifúngico cicloheximida se coloca en placas sobre agar selectivo (Oxford, PALCAM, MOX o LPM). El método ISO 11290 se basa en un proceso de enriquecimiento en dos etapas: la muestra de alimento se enriquece en caldo Half-Fraser durante 24 h, luego se transfiere una alícuota a caldo Fraser completo para un mayor enriquecimiento. El caldo Fraser también contiene los agentes selectivos acriflavina y ácido nalidíxico, así como esculina, que permite la detección de la actividad de la β -D-glucosidasa por *Listeria*, causando un ennegrecimiento del medio. Tanto el caldo enriquecido primario como el secundario son cultivados en agares Oxford y PALCAM. (Gasánov et al., 2005; Hitchins et al., 2017).

Entre otros métodos de referencia ampliamente utilizados, se encuentra el protocolo propio del Departamento de Agricultura de los Estados Unidos o USDA el cual suele ser el método de elección para muestras de carne, huevos, aves de corral y medioambientales (**Cuadro 5 y Figura 9**). Este método de enriquecimiento en dos etapas utiliza una modificación del Medio Universidad de Vermont (UVM) que contiene acriflavina y ácido nalidíxico para enriquecimiento primario, seguido de enriquecimiento secundario en caldo Fraser y Agar Oxford Modificado (MOX) que contiene los agentes selectivos moxalactama y sulfato de colistina. El método de la Asociación de Químicos Analíticos AOAC / IDF 993.12 es comúnmente el método de elección para el análisis de productos lácteos. Este método también utiliza enriquecimiento selectivo en un caldo que contiene acriflavina y ácido nalidíxico durante 48 h, seguido de un plaqueo en agar Oxford (Gasánov et al., 2005).

Protocolo	Fuente	Pre- enriquecimiento (condiciones)	Enriquecimiento (condiciones)	Agar selectivo/diferencial (condiciones)	Referencia
AOAC/IDF	ES y comida	BLEB, acriflavina y ácido nalidixico (48 h a 30 °C)		OXA (arriba de 48 h a 35 °C)	AOAC (1996), AOAC (2000)
ISO 11290 Part 1	Queso, carne molida, huevo seco en polvo.	HFB (24 h a 30 °C)	FB (48 h a 37 °C)	OXA, PALCAM (arriba de 48 h a 30 °C or 37 °C, respectivamente)	Scotter et al. (2001a)
ISO 11290 Part 2	Queso, carne, huevo seco en polvo.	BLEB or HFB (24 h a 35 °C)	FB or ONE (24 h a 35 °C)	OXA, PALCAM/ ALOA (arriba de 48 h a 35 °C)	Scotter et al. (2001b)
FDA/BAM	Comida	BLEB (24 h a 30 °C)	BLEB (48 h a 30 °C)	OXA, MOX, PALCAM, LPM/BCM, ALOA, CHROMagar <i>Listeria</i> , o medio rápido <i>L. mono</i> (arriba de 48 h a 35 °C)	Hitchins and Jinneman (2011)
USDA-FSIS	ES, carnes rojas, pollo, productos de huevo	UVM (20–26 h a 30 °C)	MOPS-BLEB, FB (18–24 h a 35 °C)	MOX (arriba de 48 h a 35 °C)	USDA (2013)
HPB	ES y comida	UVM (24 y 48 h a 30 °C)	FB (24–48 h a 35 °C)	LPM or PAL (arriba de 48 h a 30 °C)	Farber et al. (1994)

ALOA, Agar *Listeria* Ottaviani y Agosti Medium; **AOAC**, Métodos Oficiales de Análisis; **BAM**, Manual de Análisis Bacteriológico; **BCM**, medio cromogénico de biosíntesis; **BLEB**, Caldo de enriquecimiento de *Listeria* tamponado; **ES**, muestras ambientales; **FB**, Caldo Fraser; **FDA**, Administración de Alimentos y Medicamentos; **HFB**, medio caldo Fraser; **HPB**, Rama de Protección de la Salud; **FID**, Federación Internacional de Lechería; **ISO**, Organización Internacional de Normalización; **LiCl**, cloruro de litio; **LPM**, medio de cloruro de litio-feniletanol-moxalactama; **mFB**, caldo Fraser modificado; **MOPS-BLEB**, Caldo de enriquecimiento de *Listeria* tamponada con ácido morfolina-propanosulfónico; **MOX**, Agar selectivo de Oxford *Listeria* modificada; **UNO**, Caldo de enriquecimiento de la novela oxid; **OXA**, Medio Oxford; **PALCAM**, **PALCAM**, Agar selectivo de *Listeria*; **USDA-FSIS**, Departamento de Agricultura de los Estados Unidos — Servicio de Seguridad e Inspección de los Alimentos; **UVM**, Universidad modificada del caldo de Vermont.

Cuadro 5. Protocolos estándar para el aislamiento de *Listeria monocytogenes* de diferentes fuentes. Obtenido de (Camargo et al., 2016).

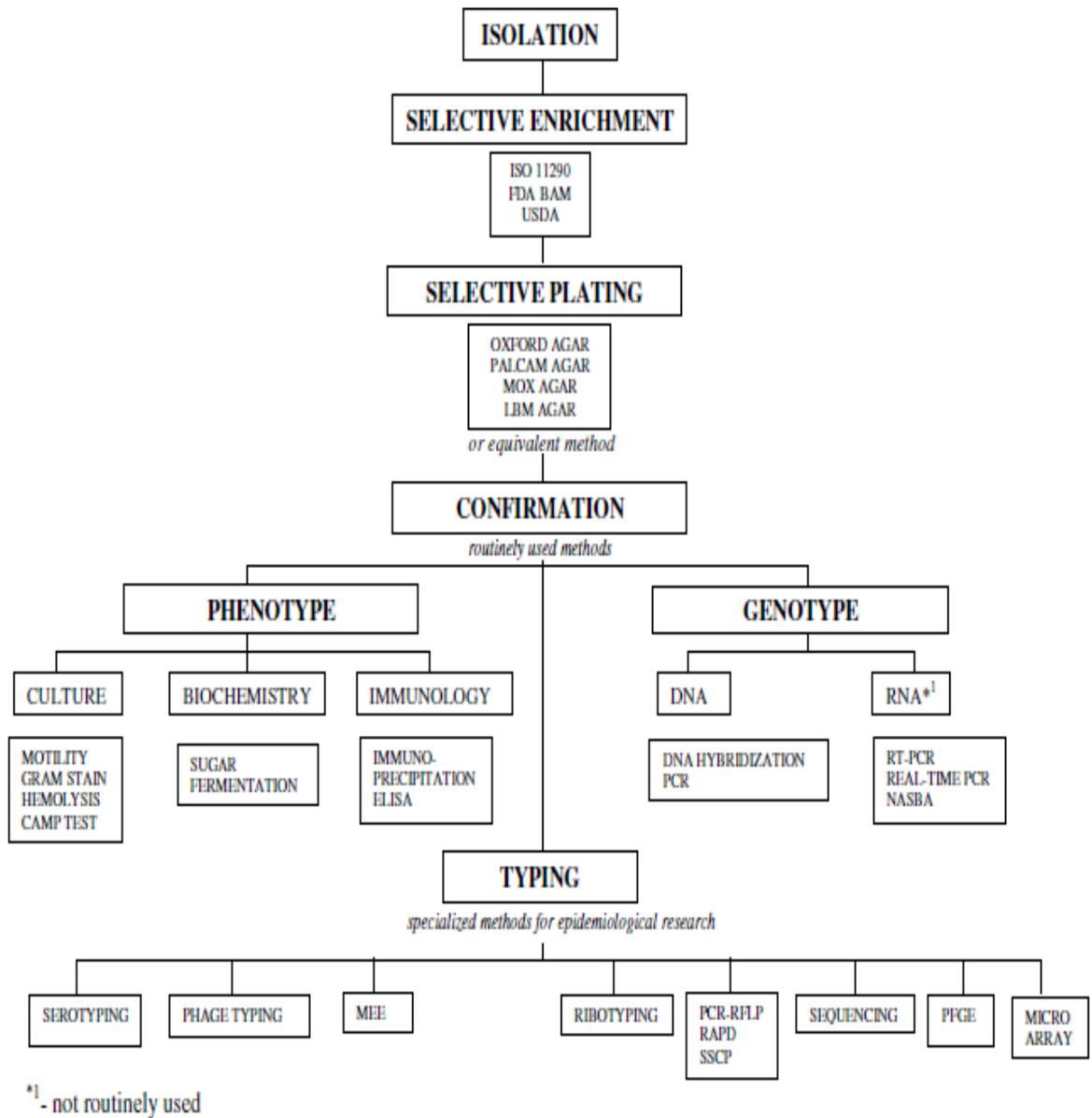


Figura 9. Descripción general de los métodos de aislamiento, identificación y tipificación de *Listeria* y *L. monocytogenes* en matrices alimentarias y muestras ambientales. Obtenido de (Gasnov et al., 2005)

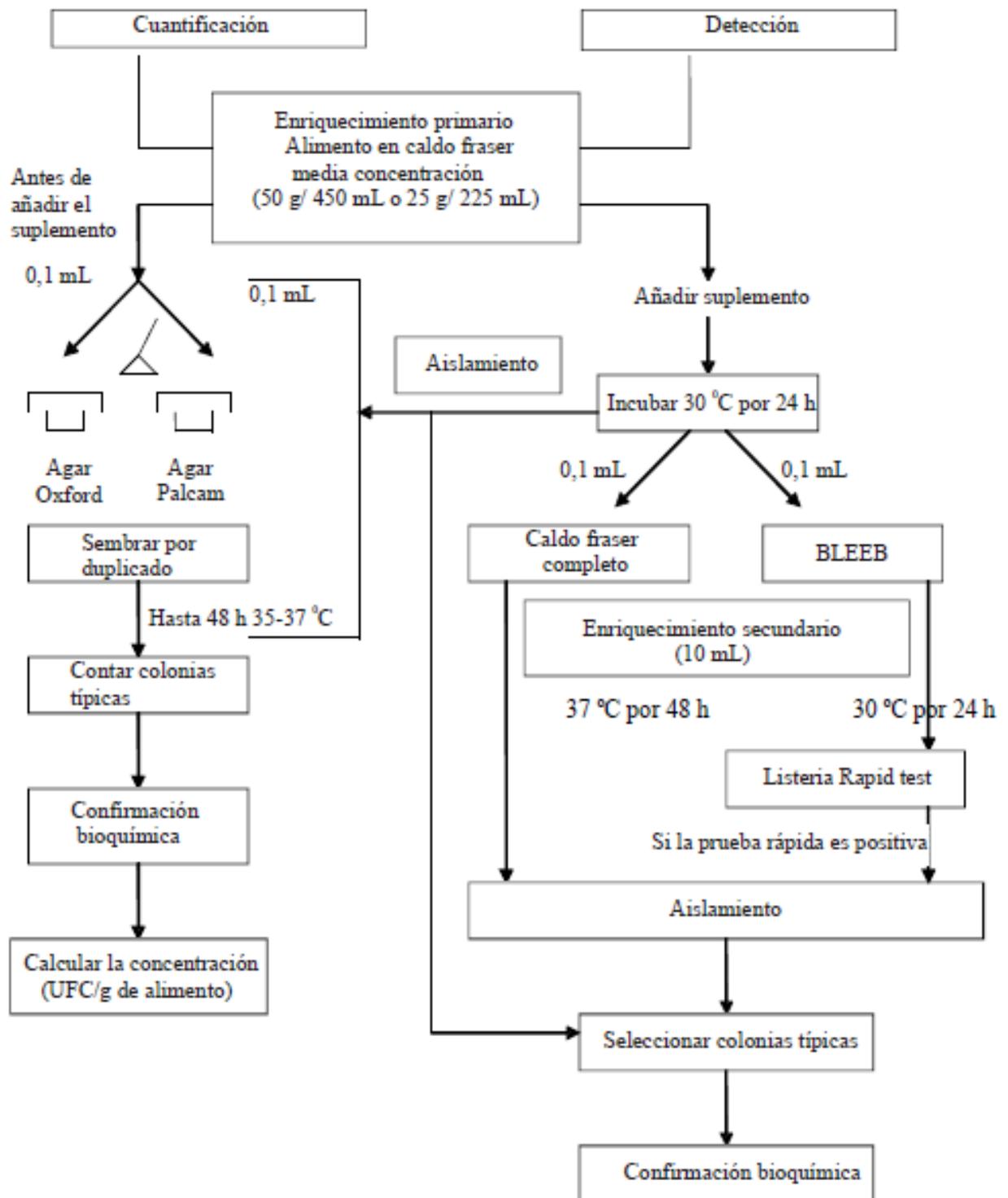


Figura 10. Procedimiento para la detección cuantitativa y cualitativa de la *Listeria spp.* Obtenido de (Cristina, 2005).

1.8.2. Métodos de identificación

Los métodos de enriquecimiento, que generalmente toman alrededor de 30-48 h, son seguidos por la identificación de los microorganismos enriquecidos (Garrido-Maestu et al., 2018; Gasanov et al., 2005). Es importante tomar en cuenta que la confirmación de la identidad de especies de *Listeria* tiene relevancia clínica, es decir, la ausencia de *L. monocytogenes* en muestras clínicas puede hacer que la terapia con antibióticos sea innecesaria (Liu, 2006).

En la actualidad existen múltiples métodos de identificación temprana de *L. monocytogenes*, en un inicio estos métodos se centraron en marcadores bioquímicos y fenotípicos, y aún en la actualidad se usan ampliamente para la identificación, por ejemplo, para mejorar la evaluación de la hemólisis y garantizar una diferenciación más confiable entre las especies hemolíticas *L. monocytogenes*, *L. ivanovii* y *Listeria seeligeri*, varios autores recomiendan el uso de la prueba CAMP (Christie, Atkins y Munch-Petersen) la cual detecta la actividad sinérgica de la hemolisina de *Listeria spp.*, con la toxina beta de *Staphylococcus aureus* y el exofactor de *Rhodococcus equi*, en una placa de agar sangre de oveja. *L. monocytogenes* tiene una reacción positiva con *S. aureus*, pero una negativa con *R. equi*. (Camargo et al., 2016; Gasanov et al., 2005). Pero dado que estas propiedades pueden variar debido a múltiples factores como lo son las condiciones externas cambiantes, la fase de crecimiento y las mutaciones genéticas espontáneas, el uso de pruebas fenotípicas a veces puede conducir a resultados equívocos. Tras los recientes avances en las técnicas de genética molecular, los métodos dirigidos a genes únicos en *Listeria* se han diseñado para la diferenciación específica de *L. monocytogenes* de otras especies de *Listeria*; estos métodos son intrínsecamente más precisos y menos afectados por la variación natural que los métodos fenotípicos (Gasanov et al., 2005; Liu, 2006).

La identificación de especies bioquímicas es posible por la reacción de catalasa, el perfil de fermentación de carbohidratos, la actividad hemolítica y otras pruebas complementarias, como la tinción de Gram y la prueba de motilidad a 25 ° C. Existe algunas alternativas para la rápida identificación de *Listeria* entre las que destaca las pruebas API *Listeria* (bio-Merieux, Marcy-Etoile, Francia) y Micro-ID™ (Remel, EE. UU.), utilizada para la fácil diferenciación bioquímica en un formato de microtubo, que apunta a la presencia o ausencia de arilamidasa, hidrólisis de esculina, presencia de α -manosidasa y producción de ácido de d-arabitol, d-xilosa, l-ramnosa, α -metil-d-glucósido, d-ribosa, glucosa-1-fosfato y d-tagatosa; las cuales se han validado ampliamente y ahora se incorporan a la metodología estándar.

L. monocytogenes puede identificarse mediante técnicas basadas en inmunidad, como el Ensayo Inmunoabsorbente Ligado a Enzimas (ELISA) cuyo fundamento radica en el uso de un anticuerpo inmovilizado en un pocillo de microtitulación para captura de antígeno en combinación con un anticuerpo secundario acoplado a una enzima (u otra etiqueta) para detectar el antígeno capturado, el cual es uno de los métodos más ampliamente aplicados porque combinan la facilidad de uso con la generación de resultados de pruebas rápidas. Además de que la metodología ELISA tiene la ventaja de que se puede utilizar con matrices de muestras difíciles, lo que hace que estas pruebas sean particularmente adecuadas para pruebas de alimentos, así como la separación inmunomagnética, pero cabe destacar que, aunque son métodos muy buenos y eficientes, estos métodos tienen un límite mínimo de detección de 10⁵ células / ml para la detección bacteriana de muestras ambientales por reacción antígeno-anticuerpo (Gasánov et al., 2005; Liu, 2006; Mazza et al., 2015).

La electroforesis en gel de campo pulsado (PFGE) se utiliza ampliamente para la caracterización genética de microorganismos, y el método estandarizado para *L. monocytogenes* utiliza una combinación de dos enzimas de restricción: Apal y Ascl. Este método se basa en RFLP de ADN bacteriano, que da como resultado fragmentos de *L. monocytogenes* que varían de 30 a 600 kb, que aparecen en 6 a 25 bandas en la electroforesis en gel de agarosa, actualmente el PFGE se usa ampliamente y se considera como el estándar de oro para rastrear *L. monocytogenes* de instalaciones de procesamiento de alimentos, alimentos y muestras clínicas, es por esto que organizaciones como lo es el CDC y la Asociación de Laboratorios de Salud Pública han creado una red para el seguimiento de *L. monocytogenes* en estudios epidemiológicos y brotes de transmisión alimentaria usando PFGE como método estandarizado para subtipar este patógeno. (Camargo et al., 2016; Gasánov et al., 2005; Liu, 2006).

En los últimos años, se han descrito varias especies nuevas de *Listeria*, siendo una alternativa rápida y eficiente, la utilización de métodos de base molecular, métodos de detección basados en análisis de ADN que incluyen la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), hibridación de ADN y el microarreglo de ADN, los cuales reducen el costo y el tiempo de reacción (Gasánov et al., 2005; Liu, 2006)

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) ha sido ampliamente utilizada para la identificación de *Listeria* y ha demostrado ser un método rápido y sensible para el análisis de rutina de diferentes tipos de alimentos por lo que se han diseñado múltiples cebadores para la diferenciación de *Listeria spp.*, Diversos estudios han utilizado genes de virulencia para la identificación de *L. monocytogenes*, entre los que se incluyen *actA*, *plcA*, *plcB*, *inlA*, *inlB*, *inlC* e *inlJ* (Camargo et al., 2016).

Prueba	Sensibilidad	Nivel de identificación	Costo/Prueba	Labor	Tiempo de enriquecimiento	Tiempo	Disponible comercialmente	Automatización disponible	Aprobaciones regulatorias
Metodos de cultivo (e.g., FDA-BAM)	$\leq 10^4$ cells/mL	Genero <i>Listeria</i> , diferenciación bioquímica de especies	\leq \$1	Alto	~48	3-4 días, Arriba de 7 días para especies	Medios deshidratados o preparados	No	Si, metodos estandar
Medios cromogenicos	$\leq 10^4$ cells/mL	<i>L. monocytogenes</i> , no diferenciación de otras especies.	\$1-\$2	Medio	24-30	1-2 días	Si	No	Algunas recientemente aprobadas
Metodos de inmunoensayo, e.g., ELISA, EFLA	$\geq 10^5$ cells/mL	Genero <i>Listeria</i> . Poca diferenciación de <i>L. monocytogenes</i> de <i>Listeria sp.</i>	\$6	Bajo a medio	40-48 28 ^e	1-2 h	Si	Si	Si, muchos métodos aprobados.
Immuno-captura/ELISA ^c	$\geq 10^5$ cells/mL	Genero <i>Listeria</i> . Poca diferenciación de <i>L. monocytogenes</i> de <i>Listeria spp.</i>	\$10	Medio	24-30	1-2 h	Si	Si ^f	No
Immuno-captura/PCR ^d	$\geq 10^5$ cells/mL	Diferenciación especifica de todas las especies, sub-especies	\geq \$10	Medio	24-30	\geq 2 h	Si	No	No
PCR ^d	$\geq 10^5$ cells/mL	Diferenciación especifica de todas las especies, sub-especies.	\$10	Bajo	24-30	\geq 2 h	Si	Si	Si algunos aprobados
Hibridación de ADN	$\geq 10^7$ cells/mL	Diferenciación especifica de todas las especies, sub-especies.	\$10	Bajo	40-48	2-4 h	Si	Si	Si algunos aprobados

Cuadro 6. Comparación de métodos para pruebas alimentarias, ambientales y clínicas para la identificación de *Listeria spp.* Obtenida de (Gasnov et al., 2005).

^a Sensibilidad de la prueba por ml de muestra enriquecida. Todas las pruebas aprobadas son necesarias para detectar 1 célula por cada 25 g de muestra de alimentos; Por lo tanto, todas las pruebas requieren enriquecimiento de la cultura.

^b Tiempo aproximado que se tarda en realizar la prueba excluyendo los tiempos de enriquecimiento.

^c *Listeria* Uniquae (TECRA International, Frenchs Forest, Australia).

^d La sensibilidad es de 65 cfu en cultivo puro, no se aplica a las pruebas de alimentos.

^e VIDAS *Listeria* Express (bioMérieux, Marcy-Etoile, Francia)

1.9. Caracterización molecular de *L. monocytogenes*

La capacidad de determinar con precisión y rapidez el potencial patogénico de los aislados de *L. monocytogenes* es esencial para limitar la propagación de la Listeriosis y reducir los retiros innecesarios de productos alimenticios (Ferreira et al., 2014; Liu, 2006).

Las técnicas moleculares como la PCR y la hibridación de ADN se han convertido en una alternativa viable al cultivo y a las técnicas serológicas cuya principal ventaja sobre los métodos convencionales es que estas se basan en diferencias dentro del genoma y no dependen de la expresión de ciertos factores antigénicos o enzimas para facilitar la identificación y son extremadamente precisos, por lo mismo que en la actualidad se ha incrementado una gama de métodos moleculares disponibles para la identificación y caracterización de *Listeria* (Gasnov et al., 2005).

Las técnicas convencionales por sí mismas no pueden detectar la fuente de los brotes de listeriosis; sin embargo, los métodos de caracterización molecular son una herramienta útil en esta determinación. Aunque la Listeriosis puede ser causada por cualquiera de los serotipos de *L. monocytogenes*, se sabe que los serotipos 1 / 2a, 1 / 2b y 4b son los responsables de casi el 90% de los casos de brotes epidémicos y esporádicos en todo el mundo (Monteiro et al., 2013).

En 2013 Ryu et al. desarrollaron una PCR múltiple para la detección rápida y simultánea de seis especies de *Listeria* (*L. grayi*, *L. innocua*, *L. ivanovii*, *L. monocytogenes*, *L. seeligeri* y *L. welshimeri*) a partir de alimentos procesados con carne (**Figura 11**). En el cual los autores sugirieron que este método puede ser útil para la detección de *Listeria spp.* En alimentos contaminados y muestras clínicas.

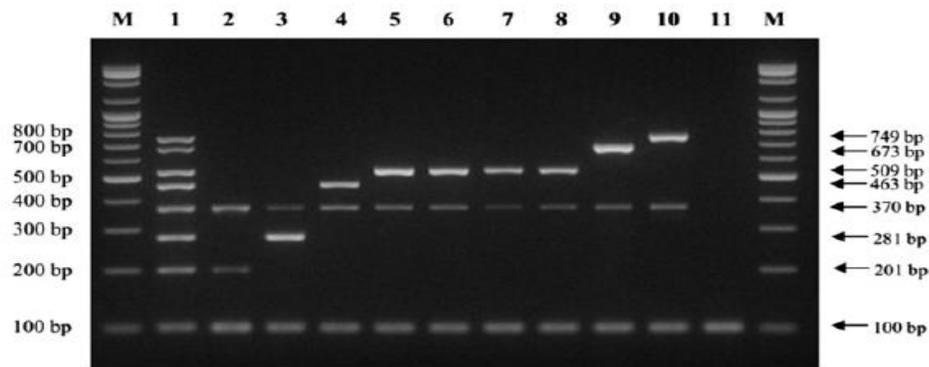


Figura 11. Resultados de la PCR múltiple llevada a cabo por Ryu et al., 2013 para la detección de seis tipos de *Listeria* (*L. grayi*, *L. innocua*, *L. ivanovii*, *L. monocytogenes*, *L. seeligeri* y *L. welshimeri*). M: 100-pb DNA ladder, línea 1: *L. grayi* ATCC 19120, *L. welshimeri* ATCC 35897, *L. ivanovii* ATCC 19119, *L. monocytogenes* ATCC 19115, *L. seeligeri* ATCC 35967, y *L. innocua* ATCC 33090, línea 2: *L. grayi* ATCC 19120, línea 3: *L. welshimeri* ATCC 35897, línea 4: *L. ivanovii* ATCC 19119, línea 5: *L. monocytogenes* ATCC 19111, línea 6: *L. monocytogenes* ATCC 19113, línea 7: *L. monocytogenes* ATCC 19115, línea 8: *L. monocytogenes* ATCC 15313, línea 9: *L. seeligeri* ATCC 35967, línea 10: *L. innocua* ATCC 33090, línea 11: control negativo

Posteriormente en 2015 Mazza et al. desarrollaron un protocolo de PCR múltiplex con el objetivo de identificar igualmente seis especies de *Listeria* (*L. monocytogenes*, *L. innocua*, *L. ivanovii*, *L. grayi*, *L. seeligeri* y *L. welshimeri*) y *Listeria spp.*, mediante el uso de los oligonucleótidos descritos en el **figura 13** y la modificación del protocolo descrito por Ryu et al., 2013 con el fin de obtener las siete bandas diferenciales para cada especie de *Listeria* en una sola reacción (**Figura 12**).



Figura 12. Resultados de la PCR múltiplex llevada a cabo por Mazza et al., 2015 para la detección de seis tipos de *Listeria* (*L. grayi*, *L. innocua*, *L. ivanovii*, *L. monocytogenes*, *L. seeligeri* y *L. welshimeri*). Marcador: 100 pb DNA ladder. CN, control negativo; 1: *L. grayi*; 2: *L. welshimeri*; 3: *L. ivanovii*; 4: *L. monocytogenes*; 5: *L. seeligeri*; 6: *L. innocua*.

ESPECIES	GEN	OLIGONUCLEÓTIDOS	SECUENCIAS (5'-3')	PRODUCTO (pb)	CONCENTRACIÓN DE OLIGONUCLEÓTIDOS
<i>Listeria spp.</i>	<i>prs</i>	PrsF PrsR	GCTGAAGAGATTGCGAAAGAAG CAAAGAAACCTTGGATTTGCGG	370	0.4
<i>L. grayi</i>	<i>Oxidoreductasi</i>	JOgrayiF JOgrayiR	GCGGATAAAGGTGTCGGGTCAA ATTTGCTATCGTCCGAGGCTAGG	201	0.24
<i>L. innocua</i>	<i>Lin0464</i>	Lin0464F Lin0464R	CGCATTATCGCCAAAACCTC TCGTGACATAGACGCGATTG	749	2.5
<i>L. ivanovii</i>	<i>namA</i>	Liv22228F Liv22228R	CGAATTCCTTATCACTTGAGC GGTGCTGCGAACTTAACTCA	463	0.52
<i>L. monocytogenes</i>	<i>Lmo1030</i>	Lmo1030F Lmo1030R	GCTTGATTCACTTGGAATTTGTCTGG ACCATCCGCATATCTCAGCCAACT	509	0.56
<i>L. seeligeri</i>	<i>Lmo0333</i>	IseelinF IseelinR	GTACCTGCTGGGAGTACATA CTGTCTCCATATCCGTACAG	673	1.36
<i>L. welshimeri</i>	<i>scrA</i>	Lwe1801F Lwe1801R	CGTGCCACAATAGCAATCTG GACATGCCTGCTGAACTAGA	281	2.5

Figura 13. Oligonucleótidos utilizados por Mazza et al., 2015 para la identificación de las especies de *Listeria*.

En 2007 Rawool et al. desarrollaron un PCR múltiplex para detectar los cuatro genes asociados a la virulencia de *Listeria*: *plcA*, *hlyA*, *actA* e *iap*, en muestras de leche. De igual forma en 2007 Liu et al. estandarizaron una PCR múltiplex para detectar los genes *inlA*, *inlC* e *inlJ* los cuales también proporcionan identificación con respecto al potencial de virulencia de *Listeria*.

Se han desarrollado métodos basados en la PCR en tiempo real (qPCR) para la rápida identificación y cuantificación de *Listeria spp.* de una variedad de fuentes, en 2002 Hough et al. desarrollaron un método de qPCR para la detección de *L. monocytogenes*. Recientemente Garrido-Maestu et al., 2018 diseñaron un nuevo sistema de detección de qPCR múltiplex, en diferentes matrices alimentarias, que incluye un control de amplificación interno, en donde ambos objetivos se detectan con sondas de hidrólisis. El método podía detectar confiablemente el patógeno *L. monocytogenes*, alcanzando un límite de detección de 9.5 ufc / 25 g.

En 2015, Tao et al., llevaron a cabo un estudio el cual tuvo como objetivo la obtención de nuevos genes diana para el diseño de oligonucleótidos especie específicos, en la detección molecular de *L. monocytogenes*, en donde utilizaron un enfoque genómico comparativo de 30 genomas completos de *L. monocytogenes* con la finalidad de obtener secuencias conservadas de especies de *L. monocytogenes*, para el diseño de 26 pares de oligonucleótidos (**Figura 14**), de los cuales evaluaron su especificidad y sensibilidad ante la detención de *L. monocytogenes* comparándolos con oligonucleótidos reportados en otros estudios (*hly*, *prfA* y *lmo1030*) utilizados para la detección específica de *L. monocytogenes*, los cuales usaron como control. Para determinar la especificidad de los oligonucleótidos diseñados llevaron a cabo ensayos de PCR utilizando como template 10 muestras de ADN de *L. monocytogenes* y 26 muestras de ADN de diferentes especies de bacterias y serotipos de *Listeria* (**Figura 15**), para lo cual el conjunto de oligonucleótidos Lm8, Lm13 y Lm20 mostraron una especificidad completa por *L. monocytogenes*, mientras que los oligonucleótidos *hlyA*, *prfA* y *lmo1030* que usaron como grupos de control, mostraron poca especificidad en las pruebas (**Figura 15**). Para determinar la sensibilidad de los oligonucleótidos realizaron 10 diluciones serias del ADN extraído de *L. monocytogenes* tomando 2 μ L de cada dilución para usarlos como template en ensayos de PCR y determinar el límite de detección de ADN genómico de *L. monocytogenes* de los oligonucleótidos diseñados, cuyos resultados indicaron que igualmente el set de oligonucleótidos Lm8, Lm13 y Lm20 mostraron alta sensibilidad en la detección de *L. monocytogenes* (**Figura 16**). Mostrando que los tres genes diana especie específicos para *L. monocytogenes* (LMOF2365_0970, LMOF2365_2721 y *mpl*) fueron seleccionados con éxito y que los correspondientes oligonucleótidos iniciadores de la PCR (Lm8, Lm13 y Lm20) fueron diseñados con alta especificidad y sensibilidad para la detección eficiente de *L. monocytogenes*.

OLIGONUCLEÓTIDO	SECUENCIAS (5'-3')	GEN	PROTEÍNA QUE CODIFICA	Tm/°C	ESPECIFICO PARA <i>L. MONOCYTOGENES</i>	TAMAÑO DEL PRODUCTO (pb)
Lm1	AACTTGCTTATGACCGAGAA CCCCACCAGTAAACCCTA	<i>ispF</i>	2-C-metil-D-eritritol 2,4-ciclo difosfato sintasa	60	—	396
Lm2	CTCTGACAAAGGCAGCAAAT TCGTCGCTTCATCCCACTC	LMOF2365_0481	Proteína hipotética	60	—	429
Lm3	AAACTTTATTGCTGGCTTCC TTTCTTAGACTCCTCGGTGC	LMOF2365_0493	Proteína hipotética	60	—	434
Lm4	AGCAATGGGTATGGTGT TTGTCTCCTTGAGGGTTT	LMOF2365_0497	Proteína hipotética	60	—	400
Lm5	AGTGACAGATTTGGCAGACGG GCAAGGAACCATTAGGAACCC	<i>tetA</i>	Tetraciclina, proteina de resistencia	60	—	496
Lm6	CAATCCACCGCTTCTACG GTACGACCGCATCCAGTT	LMOF2365_0866	Amidasa	60	—	447
Lm7	ACCTGATAAAGAGGCGAAAAG CCGTGACACCGATGAAAT	<i>sigB</i>	RNA polimerasa sigma factor SigB	55	—	419
Lm8	GCTCAGCGCAAATCAAAC GGCACTCGCAACAGAAAACG	LMOF2365_0970*	Proteína hipotética	60	+	386
Lm9	CGTAGCAGGAGCAGATGAT CCGCACTAAGTAACGCAAT	LMOF2365_1386	Fosfato acetil/ butiriltransferasa	55	—	458
Lm10	TACAGTTCCCTTACCAGC AACCAGAAAAGTCCAGCAT	LMOF2365_2418	Proteína hipotética	55	—	443
Lm11	GCAAGTGCCTGTGTGATG CAGTGGTAGCCTGGTGGAT	<i>plcB</i>	Fosfolipasa C	55	—	509
Lm12	GCCTCTACGGTATTCTCGC CATCGTTTGTGCCACTTCCA	<i>gark-1</i>	Glicerato kinasa	60	—	199
Lm13	GTTCGTCGGTCCGTGGTA TTGGCAAGCAAGCAGTTCA	LMOF2365_2721*	Glicosil hidrolasa	60	+	583
Lm14	GTAGGATTGGCGAGTGGG ACGCTTCTGGCTTTGTTG	LMOF2365_0852	Proteína de la familia de anclaje de la superficie de la pared celular	55	—	936
Lm15	TGGGAAGAAGCAGAGGAT TCACGACAATACCGAAGC	LMOF2365_2176	Familia GntR, regulador transcripcional	55	—	310
Lm16	ATGCCTATTTGAGGTTGTGG AACTCCTGTGTCAGTGTA	LMOF2365_2059	Familia TetR, regulador transcripcional	55	—	326
Lm17	ACGCCGTGCTCATAAAGT TTGTCGTGCTCCGTCATC	LMOF2365_0101	Aldo/keto reductasa, oxidoreductasa	55	—	424
Lm18	GACGCTTCAGGCGGATAG CACCGTGTGGAAATGGATA	<i>inIA</i>	Internalina A	55	—	1066
Lm19	CTGGAACCACCTCCCTAAC TCAAGATACCACCCGTC	LMOF2365_0494	Proteína hipotética	55	—	316
Lm20	TGATGAAATAAAGGTCCACG CAAGCCATAATGAACAAACG	<i>mpl*</i>	Metalopeptidasa de Zinc	60	+	679
Lm21	GATTGGCTATTTGAAGTGGTT ATGATTCTACTGAAAAGGGTGT	LMOF2365_1252	Proteína hipotética	60	—	139
Lm22	CAACGGTTCCTTTCAGTG TCATTTGGATTGGGCTA	<i>inIC2</i>	Internalina C2	55	—	484
Lm23	CCAGCACAAGTAGTAAAGG TCACATACCCATCCACATC	LMOF2365_0328	Proteína hipotética	55	—	152
Lm24	AAAGCACAACCAAGAAGGA GGAGTAACAAGCGACCCATC	<i>inIB</i>	Internalina B	60	—	798
Lm25	AGTGAAAGTAAACGCGAGAAAG ACCAGCCTGTGAAAGTGAT	<i>inID</i>	Internalina D	55	—	976
Lm26	AAATGACCTACACGACGCAAAT TCAACACTTCGGGAGACACG	LMOF2365_2057	Proteína hipotética	60	—	618
-	Resultado negativo de PCR					
+	Resultado positivo de PCR					
*	El gen fue seleccionado como una secuencia blanco especie específica.					

Figura 14. Secuencias y especificidad de los conjuntos de oligonucleótidos utilizados para la detección de *L. monocytogenes* en el estudio llevado a cabo por Tao et al., 2015, obtenida de (Tao et al., 2015).

ESPECIES BASTERIANAS	NÚMERO DE CEPA	RESULTADOS DE PCR					
		hlyA	prfA	lmo1030	Lm8	Lm13	Lm20
<i>L. monocytogenes</i>	CICC 21662	+	+	+	+	+	+
<i>L. monocytogenes</i>	CICC 21633	+	+	+	+	+	+
<i>L. monocytogenes</i>	CICC 21634	+	+	+	+	+	+
<i>L. monocytogenes</i>	CICC 21635	+	+	+	+	+	+
<i>L. monocytogenes</i>	CICC 21533	+	+	+	+	+	+
<i>L. monocytogenes</i>	CICC 21583	+	+	+	+	+	+
<i>L. monocytogenes</i>	CICC 21632	+	+	+	+	+	+
<i>L. monocytogenes</i>	CICC 21637	+	+	+	+	+	+
<i>L. monocytogenes</i>	CICC 21638	+	+	+	+	+	+
<i>L. monocytogenes</i>	CICC 21639	+	+	+	+	+	+
<i>L. innocua</i>	CICC 10417	-	+	+	-	-	-
<i>L. innocua</i>	CICC 10416	-	-	-	-	-	-
<i>L. ivanovii</i>	CICC 21663	+	-	-	-	-	-
<i>L. grayi</i>	CICC 21670	+	-	-	-	-	-
<i>L. seeligeri</i>	CICC 21671	+	+	-	-	-	-
<i>L. welshimeri</i>	CICC 21672	+	-	-	-	-	-
<i>S. choleraesuis</i>	CICC 21493	-	-	-	-	-	-
<i>S. dublin</i>	CICC 21497	-	-	-	-	-	-
<i>S. paratyphi-C</i>	CICC 21512	-	-	-	-	-	-
<i>S. typhimurium</i>	CMCC 51005	-	-	-	-	-	-
<i>S. enteritidis</i>	CMCC 50041	-	-	-	-	-	-
<i>S. enterica subsp. enterica</i>	CICC 21527	-	+	-	-	-	-
<i>C. sakazakii</i>	CICC 21560	+	-	+	-	-	-
<i>C. sakazakii</i>	CICC 21563	-	-	+	-	-	-
<i>C. malonaticus</i>	DSM 18702	+	-	-	-	-	-
<i>C. turicensis</i>	DSM 18703	+	-	-	-	-	-
<i>C. dublinensis subsp. Dublinensis</i>	DSM 18705	+	-	-	-	-	-
<i>C. universalis</i>	NCTC 9529	+	-	-	-	-	-
<i>E. coli O157:H7</i>	CICC 21530	+	-	+	-	-	-
<i>Y. enterocolitica</i>	CMCC 52225	-	-	+	-	-	-
<i>S. flexneri</i>	CMCC 51571	-	-	-	-	-	-
<i>S. aureus</i>	ATCC 27217	+	-	-	-	-	-
<i>B. cereus</i>	CMCC 63301	-	-	-	-	-	-
<i>P. mirabilis</i>	CMCC 49005	-	-	-	-	-	-
<i>P. fluorescens</i>	CICC 21620	-	-	-	-	-	-
<i>V. parahaemolyticus</i>	ATCC 33847	+	-	-	-	-	-

Figura 15. Resultados de PCR que determinan la especificidad de los oligonucleótidos hly, prfA, lmo1030, Lm8, Lm13 y Lm20 en la identificación específica de *L. monocytogenes* llevado a cabo por Tao et al., 2015, obtenido de (Tao et al., 2015).

OLIGONUCLEÓTIDO	SENSIBILIDAD DE DETECCIÓN		GEN	REFERENCIAS
	ADN GENÓMICO fg/ μ L)	CULTIVO PURO (cfu/mL)		
Lm8	430	5x10 ³	LMOF2365_0970	Este estudio
Lm13	43	50	LMOF2365_2721	Este estudio
Lm20	4.3	5	<i>mpl</i>	Este estudio
<i>prfA</i>	4.3x10 ³	5x10 ⁴	<i>prfA</i>	SN/T 1869–2007
<i>hlyA</i>	430	5x10 ³	<i>hlyA</i>	Aurora et al. (2008)
<i>lmo 1030</i>	430	5x10 ³	<i>lmo1030</i>	Ryu et al. (2013)
<i>lmo0733</i>	4.3x10 ³	5x10 ⁴	<i>lmo0733</i>	Liu et al. (2004)

Figura 16. Tabla comparativa de la sensibilidad de oligonucleótidos específicos para la detección de *L. monocytogenes*, mostrada en el estudio llevado a cabo por Tao et al., 2015, obtenida de (Tao et al., 2015).

1.10. Relevancia del desarrollo de nuevas técnicas para la identificación de *L. monocytogenes* en alimentos.

En la actualidad se ha optado por un desarrollo continuo de métodos de mayor poder discriminatorio, para diferenciar entre cepas e identificar subtipos de serotipos de *L. monocytogenes*.

La estandarización de métodos es un tema clave para la aplicación de rutina y se puede lograr mediante la automatización de pruebas como la ribotipificación automática, la PCR y también la PCR en tiempo real. Dada la alta precisión y velocidad con que se pueden llevar a cabo las pruebas moleculares, no hay duda de que la mayoría de estos métodos, si no se han aplicado ya, serán adoptados por las autoridades reguladoras y los laboratorios de pruebas alimentarias en el futuro (Gasnov et al., 2005).

2. JUSTIFICACIÓN

La Listeriosis generalmente es causada por la infección de *L. monocytogenes*, cuya principal fuente de transmisión es por alimentos contaminados. Según datos reportados por la Organización Mundial de la Salud (OMS), los principales alimentos implicados en los brotes de Listeriosis son los productos cárnicos listos para consumo (ej. salchichas, patés, salmón ahumado), así como productos lácteos (quesos frescos, leche y helados no pasteurizados), ensaladas preparadas (ensaladas con repollo y germinados) y frutas y hortalizas frescas (Mazza et al., 2015; OMS, 2018) , la Listeriosis humana se caracteriza por una baja prevalencia, un cuadro sintomatológico grave y una alta tasa de mortalidad (20 y 30%) (Castañeda-Ruelas and León-Félix, 2014; OMS, 2018; Paziak-Domańska et al., 1999). Esta infección afecta principalmente a niños, ancianos, mujeres embarazadas y personas con sistemas inmunes comprometidos (Mazza et al., 2015). Los métodos convencionales para detectar *L. monocytogenes* en los alimentos se basan principalmente en el cultivo bacteriano e identificación bioquímica; proceso que requiere más de 5 días para confirmar la presencia del patógeno (Gasnov et al., 2005). Estos tiempos de detección son muy largos para la industria alimentaria que requiere tiempos de reacción cortos para evitar que los alimentos contaminados lleguen a los consumidores; por lo tanto, se necesita el desarrollo de metodologías microbiológicas para la rápida y oportuna detección de *L. monocytogenes* en alimentos (Gasnov et al., 2005; Liu, 2006; Tao et al., 2015).

Se han generado numerosos métodos moleculares para la detección de *L. monocytogenes* en matrices alimentarias, muestras clínicas o ambientales; sin embargo, un reto importante para la detección molecular del patógeno es la interferencia del microbioma o la presencia de sustancias inhibitoras de la PCR (ej. proteína, grasa y ácidos orgánicos) presentes en los alimentos (Camargo et al., 2016; Gasnov et al., 2005; Mazza et al., 2015).

El presente trabajo se realizó estudios de microbiología molecular para desarrollar y estandarizar un método de detección rápida y oportuna, capaz de detectar bajos niveles de *L. monocytogenes* en matrices alimentarias que poseen un complejo microbioma y ricas en sustancias inhibitoras.

3. HIPÓTESIS

La estandarización de ensayos moleculares para la detección rápida de *L. monocytogenes* en alimentos, mediante el uso de los iniciadores de la PCR Lm20, que amplifican el gen *mpl*, permitirá la identificación sensible y específica de este patógeno.

4. OBJETIVO GENERAL

Desarrollar, estandarizar y validar un ensayo molecular para la detección rápida y oportuna de *L. monocytogenes* en alimentos.

4.1. Objetivos específicos

1. Desarrollar y estandarizar un protocolo de extracción de ADN genómico para muestras inoculadas con *L. monocytogenes*.
2. Estandarizar y validar un ensayo de PCR para la detección de *L. monocytogenes* en matrices alimentarias.
3. Establecer los niveles mínimos de detección de *L. monocytogenes* en una matriz alimentaria.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1. Materiales

5.1.1. Equipo

- ❖ Autoclave eléctrica de mesa, 121 °C (Market-Forge, Sterilimatic)
- ❖ Balanza analítica digital, 120g x 0.0001g (Sartorius)
- ❖ Balanza granataria, sensibilidad 0.1 g, Modelo No. CT200-S (OHAUS)
- ❖ Bolsas de poli-papel en rollo sin marca comercial diferentes tamaños
- ❖ Campana de flujo laminar (Alder y Veco)
- ❖ Centrifuga de mesa (HermLe)
- ❖ Homogenizador (Stomacher, Seward 400)
- ❖ Horno para esterilización (Shel-lab)
- ❖ Incubadora de 37° (Pecision Scientific, Seward 400)
- ❖ Potenciómetro óptico (Jenway), modelo 3510
- ❖ Vortex, modelo G650 Scientific Industries Inc (Daiger Vortex Genie 2)
- ❖ Micropipetas 2-1000 µl (Labsystems)
- ❖ Termociclador modelo c1000 touch cycler de 96 pozos (Bio-rad)
- ❖ Mini sistema de electroforesis horizontal (Bio-rad)
- ❖ Fotodocumentador (MiniBis Pro)
- ❖ NanoDrop 2000 (ThermoScientific)

5.1.2. Medios de cultivo

- ❖ Agar soya tripticasa (AST), (BD Bioxon)
- ❖ Caldo soya tripticasa (CST), (BD Bioxon)
- ❖ Caldo Base Fraser (suplementado con citrato de amonio férrico), (Neogen)

5.1.3. Soluciones

- ❖ Solución salina isotónica (SSI) 0.85% (cloruro de sodio, Productos Químicos Monterrey)
- ❖ Diluyente de peptona 0.1% (DP) (Peptona de caseína, BD Bioxon)

5.1.4. Reactivos

- ❖ Citrato de amonio férrico (C₆H₁₁FeNO₇)
- ❖ Reactivos para PCR:
 - MgCl₂ (25 mM)
 - dNTP's (10M)
 - Enzimas comerciales Taq ADN polimerasa:

Polimerasa	Fabricante	Código
Dream Taq DNA Polymerase	Thermo Scientific	#EP0702
Maxima Hot Sart Taq DNA Polymerase	Thermo Scientific	#EP0602
Phire Hot Start II Taq DNA Polymerase	Thermo Scientific	#F-1225

Cuadro 7. AND Polimerasas utilizadas en los ensayos de PCR llevados a cabo en este estudio.

5.1.5. Material biológico

Bacteria	Fuente	Código de referencia
<i>Listeria monocytogenes</i>	Cepario de la Universidad Autónoma de Querétaro	L3
<i>Salmonella Typhimurium</i>	Cepario de la Universidad Autónoma de Querétaro	ATCC 14028.

Cuadro 8. Material biológico bacteriano usado en este estudio.

5.2. Métodos.

5.2.1. Estandarización de extracción de ADN.

El proceso de estandarización de la extracción de ADN genómico de *L. monocytogenes* consistió en lo siguiente:

1. Cultivo microbiano

Activación de la cepa de *L. monocytogenes* para la obtención de células viables: se realizó un pase de 40 µL del aislamiento de *L. monocytogenes* en stock o almacenamiento en glicerol a un tubo de ensayo (con tapa) con 5mL de Caldo Soya Trypticasa (CST), y se incubó a 37°C por 24 horas.

2. Extracción de material genético

Para la extracción del material genético se utilizó el kit comercial Quick-gDNA™ del fabricante ZYMO RESEARCH un procedimiento simple para el aislamiento rápido de ADN total optimizado para la recuperación máxima de ADN ultra puro sin contaminación de ARN, basado en la adsorción del ADN a una membrana de sílica y cuyo procesamiento de muestra es llevado a cabo únicamente agregando un tampón de lisis genómica especialmente formulado a la muestra, agitar en vórtex y transferir la mezcla a la columna Zymo-Spin™ suministrada, no existiendo la necesidad de desnaturalizantes orgánicos o digestión con proteinasa K debido al sistema de tampón de lisis, eliminado efectivamente los inhibidores de la PCR durante el proceso de purificación.

Implementación al protocolo el uso de perlas de vidrio, con la finalidad de facilitar el rompimiento de la pared celular (lisado celular) para obtener una mayor concentración de ADN.

2.1. Selección de perlas:

Se utilizaron diferentes grupos de perlas, tres diferentes tamaños de perlas cuya mezcla dio como resultado 6 grupos diferentes. Para facilitar su identificación se nombraron los diferentes tamaños de perlas de la siguiente forma:

- Pequeñas (PEQ): con un tamaño de diámetro de 0.1 mm
- Medianas (MED): con un tamaño de diámetro de 1.0 mm
- Chaquira (CH): con un tamaño de diámetro de 1.3 mm

Obtención de perlas	Nombre comercial	Numero de catálogo	Tamaño (diámetro)
BioSpec Products Inc.	Glass Beads	11079101	0.1 mm
		11079110	1.0 mm
	Chaquira	N/A	1.3 mm

Cuadro 9. Perlas utilizadas en el proceso de estandarización de la extracción del ADN genómico de *L. monocytogenes*.

GRUPO	TAMAÑO DE PERLAS USADAS	CANTIDAD DE PERLAS (g)	PESO TOTAL DE PERLAS (g)	PESO TOTAL DEL TUBO DE MICROCENTRIFUGA (g)
1	MED	0.2 g	0.2g	1.5 g
2	MED	0.4 g	0.4g	1.7 g
3	MED+PEQ	0.2 g+0.2 g	0.4g	1.7 g
4	CH	0.4 g	0.4g	1.7 g
5	CH+MED	0.2 g+0.2 g	0.4g	1.7 g
6	P+M+CH	0.2 g+0.2 g+0.2 g	0.6g	1.9 g

Cuadro 10. Grupos de perlas utilizados en la extracción de ADN de *L. monocytogenes*.

2.2. Protocolo para la extracción de ADN genómico de *L. monocytogenes* mediante el kit comercial Quick-gDNA™.

I. Se centrifugó el aislamiento a 13,000 Revoluciones Por Minuto (RPM) por tres minutos para la formación del pellet o sedimento celular. Se retiró el sobrenadante y se agregaron 500 µl de Buffer de lisis (Genomic Lysis Buffer) directamente al pellet o sedimento celular. Se resuspendió el pellet hasta quedar una solución homogénea (vortex por 10-15 segundos) y se dejó incubar a temperatura ambiente por 10 min.

II. **Muestras las cuales su extracción se llevó a cabo únicamente por medio del kit Quick-gDNA™:** Se transfirió la mezcla (500µl) a una Columna Zymo-Spin™ y se depositó en un nuevo tubo de colección. Se centrifugó a 11,000 RPM por un minuto y posteriormente se desechó el tubo de colección.

Muestras las cuales su extracción se llevó a cabo por medio del kit Quick-gDNA™ más la adición de perlas: Se transfirió la mezcla (500µl) a un tubo eppendorf de 1.5 mL con perlas y se centrifugó a 4,000 RPM por 45 segundos. Se transfirió la mezcla a una Columna Zymo-Spin™ y se depositó en un nuevo tubo de colección. Se centrifugó a 11,000 RPM por un minuto y posteriormente se desechó el tubo de colección.

Nota: La colisión efectuada con las perlas de vidrio aunado a la acción química del buffer de lisis, permite la salida del material genético de la célula. Los buffers altos en sales promueven la lisis celular y la unión del ADN a las membranas de sílica contenidas en las micro columnas.

III. Se transfirió la columna Zymo-Spin™ a un nuevo tubo de colección, se agregaron 200 µl de buffer de prelavado (DNA Pre-Wash Buffer) a la columna de centrifugación y se centrifugó a 11,000 RPM durante un minuto.

- IV. Se agregaron 500 µl del buffer de lavado (g-DNA Wash Buffer) a la columna de centrifugación y se centrifugó a 11,000 RPM durante un minuto.
- V. Se transfirió la columna de centrifugación a un tubo limpio de microcentrífuga (eppendorf) y se agregaron 50 µl del buffer de elución (DNA Elution Buffer) a la columna de centrifugación. Se incubó durante 5 minutos a temperatura ambiente y luego se centrifugó a 13,000 RPM por un minuto para eluir el ADN.

5.2.2. Estandarización de ensayos moleculares para la detección de *L. monocytogenes* en alimentos.

1. Especificidad de los iniciadores de PCR para la detección de *L. monocytogenes*.

Acorde a información consultada y publicada por diversos autores como (Garrido-Maestu et al., 2018; Momtaz and Yadollahi, 2013; Razei et al., 2017; Ryu et al., 2013; Tao et al., 2015; Zhang et al., 2018) en los cuales mencionan y evalúan diversos iniciadores específicos para la detección sensible y específica de *L. monocytogenes*, se evaluó optando por el par de iniciadores “Lm20” los cuales según lo descrito en el estudio publicado por (Tao et al., 2015), en comparación con otros iniciadores, mostraron buenos resultados en cuanto a la detección especie específica de *L. monocytogenes*.

Código Primer	Secuencia (5´ a 3´)	Gen	Proteína codificada	Tamaño pb
Lm20-F	TGATGAAATAAAGGTCCACG	mpl	Metalopeptidasa de zinc	679
Lm20-R	CAAGCCATAATGAACAAACG			

Cuadro 11. Par de oligonucleótidos iniciadores de la PCR utilizados para la amplificación del gen *mpl* utilizados en este estudio.

2. Condiciones de uso de los iniciadores Lm20 para la detección de *L. monocytogenes*.

Se llevaron a cabo modificaciones a las condiciones descritas por Tao et al., 2015 para el manejo de los iniciadores Lm20 en la detección específica de *L. monocytogenes* en estudios previos realizados por la M. en C. Yajaira Esquivel Hernández, entre los cuales se realizó un ensayo de gradiente de la temperatura de alineación, obteniendo las condiciones utilizadas en este estudio (**Cuadro 12.**).

Par de iniciadores Lm20	(Tao et al., 2015)	Modificaciones realizadas
	CONDICIONES	
Desnaturalización inicial	94°C por tres minutos.	95°C por un minuto.
Desnaturalización	94 °C por 30 segundos.	95 °C por 30 segundos.
Alineamiento	60°C por 30 segundos.	63.1°C por 30 segundos.
Extensión	72°C por 40 segundos.	72°C por 30 segundos.
Extensión final	72°C por 10 minutos.	72°C por 2 minutos.
Número de ciclos	35 ciclos.	32 ciclos.

Ciclos= Número de veces de la desnaturalización, alineamiento y elongación.

Cuadro 12. Condiciones en las que se manejaron los oligonucleótidos iniciadores de la PCR Lm20.

3. Especificidad de la PCR

Para evaluar la eficiencia de los iniciadores Lm20 en la detección específica de *L. monocytogenes*, se sometieron a proceso de extracción de ADN usando el kit comercial Quick-gDNA™ (protocolo de extracción descrito anteriormente (**numeral 5.2.1, inciso 2, sub-inciso 2.2**), sin el uso de perlas de vidrio), muestras de ADN de la cepa de *L. monocytogenes* activadas en CST utilizando el material genético obtenido en ensayos de PCR, haciendo uso de la enzima Taq ADN polimerasa “Phire Hot Start II Taq DNA Polymerase” así como ADN de la cepas *L. monocytogenes* como control positivo y *Salmonella Typhimurium* no blanco del iniciador como control negativo, analizando los productos en geles de agarosa a una concentración de 1.5%, visualizados mediante un fotodocumentador (MiniBis Pro).

4. Detección de *L. monocytogenes* en matrices alimentarias.

Matrices alimentarias utilizadas: Lechuga romana, carne molida de res y queso panela

Preparación e inoculación de las matrices alimentarias:

- I. Se prepararon seis muestras por cada matriz alimentaria (18 muestras totales de alimento), pesando 25g de cada alimento (en ambiente estéril) y fueron colocadas en bolsas estériles (perfectamente identificadas y etiquetadas con sus códigos correspondientes).
- II. Para el pre – enriquecimiento de las muestras se agregaron 225 mL de agua peptonada a cada muestra obteniendo una concentración 1:10, se homogeneizó durante un minuto por medio de un homogeneizador (Stomacher, Seward 400).
- III. Se tomaron 7 mL de cada una de las seis muestras hechas por cada matriz alimentaria (42 mL tomados por cada matriz alimentaria) y se colocaron en tubos de 50 mL (tres tubos de 50 mL, uno por cada matriz alimentaria), y se homogeneizó con vortex por 10-15 segundos.
- IV. Se tomaron 4.2 mL la cepa de *L. monocytogenes* y se inocularon a cada tubo de 50 mL (relación 1:10), se homogeneizó con vortex por 10-15 segundos y se incubó a 37°C por 24 horas.
- V. Se realizaron seis alícuotas de 1 mL de cada tubo de 50 mL.

Extracción de ADN genómico:

- VI. Cada alicuota realizada se sometió a proceso de extracción de ADN usando el kit comercial Quick-gDNA™ (protocolo de extracción descrito anteriormente (**numeral 5.2.1, inciso 2, subinciso 2.2**), tomando en cuenta tres variantes de extracción (**cuadro 13**). La calidad e integridad del material genético obtenido se verificó mediante la cuantificación en NanoDrop 2000 (ThermoScientific), verificando su integridad mediante una electroforesis en gel de agarosa al 1%.
- VII. El ADN obtenido de cada alicuota se llevó a una concentración de 2.5ng/μL, para ser utilizado en ensayos de PCR.

Ensayo de PCR:

- VIII. Para el ensayo de PCR se utilizó la enzima comercial Taq ADN polimerasa “Phire Hot Start II Taq DNA Polymerase”, el ADN obtenido de las 18 alicuotas de las tres matrices de alimentos, ADN de *L. monocytogenes* como control positivo y ADN de *Salmonella spp.* como control negativo, bajo las condiciones descritas en el cuadro 12. Los productos obtenidos se analizaron mediante electroforesis en gel de agarosa a una concentración de 1.5%, con 1μL de Bromuro de etidio, aplicando una corriente de 75 volts durante 35 minutos y fueron visualizados mediante un fotodocumentador (MiniBis Pro).

Kit Quick-gDNA™ Muestras	Variantes al de extracción de ADN		
	Grupo 3 de perlas (MED+PEQ)	Grupo 6 de perlas (MED+PEQ+CH)	Extracción normal, mediante el uso único del kit de extracción
	Cantidad de alicuotas por variante de extracción		
Carne molida de res (C).	2	2	2
Lechuga romana (L)	2	2	2
Queso panela (Q)	2	2	2

Cuadro 13. Variantes de extracción de ADN probadas y cantidad de alicuotas por matriz alimentaria.

5. Evaluación del límite de detección de los iniciadores de la PCR Lm20 y selección de la Taq ADN polimerasa comercial más eficiente en la detección de *L. monocytogenes* en matrices de alimentarias.

Una vez probado el funcionamiento y especificidad de los iniciadores Lm20 en la detección de *L. monocytogenes* en diferentes matrices alimentarias, se prosiguió con la estandarización del límite de detección de los iniciadores Lm20 (usando la cepa de *L. monocytogenes* como referencia) y la selección de la mejor Taq ADN polimerasa capaz de amplificar genes en muestras ricas en sustancias inhibitorias (se evaluaron tres enzimas comerciales **(Cuadro 7.)**).

- I. Se pesaron cinco muestras de brócoli (25g).
- II. Cada muestra fue pre- enriquecida con 225mL del medio "Half Fraser Broth Base", suplementado con citrato de amonio férrico (5 mL/L) por muestra para tener una concentración 1:10 según indica el método de la Organización Internacional de Estándares (ISO) 11290 y la NOM-143-SSA1-1995.
- III. Se inocularon las concentraciones de 1.8×10^7 y 1.8×10^5 UFC/mL de muestra de la cepa de *L. monocytogenes* en cuatro de cinco muestras de brócoli (1 muestra usada como control) y se sometieron a proceso de extracción de ADN usando el kit comercial Quick-gDNA™ **(descrito en numeral 5.2.2., inciso 5., sub-inciso IV.)** y ensayos de PCR **(descrito en numeral 5.2.2., inciso 5., sub-inciso V.)**.

Para establecer las concentraciones del patógeno que se inocularon directamente a las muestras de brócoli descritas anteriormente **(inciso II.)**, se llevó a cabo el siguiente protocolo:

- a) Se activó la cepa de *L. monocytogenes* realizando un pase de 40µL de la cepa almacenada en glicerol a tubos con 5 mL de CST y se incubó por 24 horas a 37 °C.
- b) Se homogeneizó la muestra mediante Vortex por 10-15 segundos.
- c) Se tomaron 40 µL de la cepa de *L. monocytogenes* activada y se colocaron en tres tubos de ensayo (40 µL del patógeno por tubo) que contenían 5 mL de CST y se incubaron por ocho horas a 37°C, alcanzando una concentración de 3.2×10^8 UFC/mL.
- d) Diluciones seriadas: se realizaron ocho diluciones seriadas tomando 1 mL por cada dilución del inoculo de *L. monocytogenes* de ocho horas y se colocaron en tubos con 9 mL de solución salina, cada dilución se realizó por triplicado.
- e) Conteo de confirmación de colonias: se tomaron 100 µL de las últimas cuatro diluciones (d-5, d-6, d-7 y d-8), y se realizó extensión en placa de cada dilución en cajas con Agar Soya Tripticasa (ATS) (cada caja por triplicado) y se dejaron incubar por 24 horas a 35°C: 1.8×10^8 UFC/mL de muestra.
- f) Se juntaron las diluciones d-3 y d-5 en tubos de 50 mL, uno con el triplicado de la dilución tres (d-3) 1.8×10^5 UFC/mL y otro con el triplicado de la dilución cinco (d-5) 1.8×10^7 UFC/mL,

(27 mL de cada dilución por tubo de 50mL) y se homogeneizó mediante vortex 10-15 segundos.

- g) Inoculación del brócoli: se inocularon directamente cuatro de las cinco muestras de brócoli con las diluciones d-3 y d-5 del patógeno *L. monocytogenes* con las cantidades que se muestran en el cuadro 16.
- h) Se homogeneizaron las muestras de brócoli inoculadas mediante el Homogeneizador (Stomacher, Seward 400) por un minuto como lo indica la NOM-210-SSA1-2014 y se incubaron por 24 horas a 37°C.
- i) Se realizaron seis alícuotas de 1mL en tubos de microcentrífuga de 1.5 mL por cada una de las cinco muestras de brócoli (cuatro muestras inoculadas con el patógeno y una sin inocular

N° de Muestra	Inoculación de muestra con dilución	Concentración de la dilución	Volumen (µL) agregado de cada dilución a las muestras de brócoli	UFC (valor estimado) contenido por muestra de alimento
1	Sin inocular (control)	N/A	N/A	
2	d-3	1.8 X 10 ⁵ UFC/mL de muestra	225 µL	180 UFC/225mL demuestra
3	d-3	1.8 X 10 ⁵ UFC/mL de muestra	2250 µL	18 UFC/225mL demuestra
4	d-5	1.8 X 10 ⁷ UFC/mL de muestra	225 µL	18000 UFC/225mL demuestra
5	d-5	1.8 X 10 ⁷ UFC/mL de muestra	2250 µL	1800 UFC/225mL demuestra

para su uso como control, dando un total de 30 alícuotas) homogeneizando cada tubo mediante vortex 10-15 segundos.

Cuadro 14. Volumen (µL) de inóculo agregado a cada muestra de brócoli.

IV. Extracción de ADN

Cada a alícuota realizada (**inciso i**) se sometió a proceso de extracción de ADN usando el kit comercial Quick-gDNA™ (protocolo de extracción descrito anteriormente (**numeral 5.2.1, inciso 2, sub-inciso 2.2**), tomando en cuenta dos variantes de extracción y asignando 15 alícuotas por cada variante:

1. Uso del grupo 3 de perlas (MED + PEQ) y el kit de extracción Quick-gDNA
2. Uso único del kit de extracción Quick-gDNA

La calidad e integridad del material genético obtenido se verifico mediante la cuantificación en NanoDrop 2000 (ThermoScientific), verificando su integridad mediante una electroforesis en gel de agarosa al 1%. El ADN obtenido de cada alícuota se llevó a una concentración de 2.5ng/µL, para ser utilizado en ensayos de PCR.

V. Ensayos de PCR

1. Evaluación de la presencia de producto de PCR amplificable.

Se corrió un ensayo de PCR evaluando el gen 16S universal con el par de oligonucleótidos 8F y 1510R y la ADN polimerasa “Maxima Hot Start Taq DNA Polymerase”, bajo las condiciones descritas en el cuadro 17.

Desnaturalización inicial	94°C por tres minutos.
Desnaturalización	94 °C por 45 segundos.
Alineamiento	53.3°C por 30 segundos.
Extensión	72°C por 30 segundos.
Extensión final	72°C por 5 minutos.
Número de ciclos	35 ciclos.

Cuadro 15. Condiciones en las que se manejaron los oligonucleótidos 8F Y 1510.

2. Selección de la Taq ADN polimerasa comercial más eficiente en la detección de *L. monocytogenes* y evaluación del límite de detección de los iniciadores de la PCR Lm20.

Se llevaron a cabo ensayos de PCR a las muestras de ADN genómico obtenido de las muestras de brócoli inoculadas con diferentes concentraciones del patógeno. Se utilizaron las 30 alícuotas de ADN genómico obtenido de las muestras de brócoli inoculado y sin inocular (control) con diferentes concentraciones de *L. monocytogenes* (**Cuadro 14**). Se evaluaron tres enzimas comerciales: Phire Hot Start II Taq DNA Polymerase”, “Maxima Hot Start Taq DNA Polymerase” y “Dream Taq DNA Polymerase”, siguiendo las condiciones y cantidades de reactivo indicadas por el fabricante ajustadas para la cantidad de muestras por reacción ya que las cantidades de reactivos utilizados en cada ensayo de PCR varían conforme la polimerasa utilizada (**Cuadro16**), así como los iniciadores de la PCR “Lm20” específicos para la detección de *L. monocytogenes* bajo las condiciones indicadas en el cuadro 12.

Se analizaron los productos obtenidos (**figuras 23, 24 y 25**) mediante electroforesis en gel de agarosa al 1.5% con 1µL de Bromuro de etidio, aplicando una corriente de 75 volts durante 35 minutos y finalmente visualizados mediante un fotodocumentador (MiniBis Pro).

A) Maxima Hot Start Taq DNA Polymerase		B) Dream Taq DNA Polymerase		C) Phire Hot Start II Taq DNA Polymerase	
	μL		μL		μL
10X Buffer	1,7	10X Buffer	1,7	5X Buffer	3,4
10mdNTP	0,34	10mdNTP	0,34	10mdNTP	0,34
Primer F	0,68	Primer F	0,68	Primer F	0,68
Primer R	0,68	Primer R	0,68	Primer R	0,68
Taq Maxima	0,085	Taq Maxima	0,085	Taq Maxima	0,34
25 mM MgCl ₂	1,36	DNA	2	DNA	2
DNA	2	H ₂ O	11,515	H ₂ O	9,56
H ₂ O	10,2	Total	17	Total	17
Total	17,045				

Cuadro 16. Cantidades de reactivo utilizado para la realización de ensayos de PCR correspondiente a una sola muestra acorde al uso de diferentes ADN polimerasas:

- A) Cantidades de reactivo correspondientes al uso de la Maxima Hot Start Taq DNA Polymerase.
- B) Cantidades de reactivo correspondientes al uso de la Dream Taq DNA Polymerase.
- C) Cantidades de reactivo correspondientes al uso de la Phire Hot Start II Taq DNA Polymerase.

6. RESULTADOS

6.1. Estandarización de extracción de ADN genómico

Establecimiento y selección de los grupos de perlas.

Para determinar si la implementación de perlas de vidrio a la metodología de extracción de ADN mediante el kit comercial de extracción Quick-gDNA™ en contraste con el uso único del kit de extracción favorecía la obtención de una mayor cantidad de ADN genómico, fueron probados seis grupos de perlas (**Cuadro 9**), sometiéndose a proceso de extracción muestras de ADN puro de *L. monocytogenes* probando los seis diferentes grupos de perlas, de los cuales tras realizarse la medición de las concentraciones del ADN obtenido mediante NanoDrop de los cuales se observó (**Figura 17**), que los grupos tres y seis de perlas obtuvieron mejores valores en cuanto a las concentraciones de ADN, en contraste con los demás grupos de perlas.

Grupos de perlas	Media	Error estándar
G1	9,633	1,713
G2	9,867	1,725
G3	23,233	2,674
G4	11,433	1,732
G5	12,367	4,153
G6	53,933	4,068

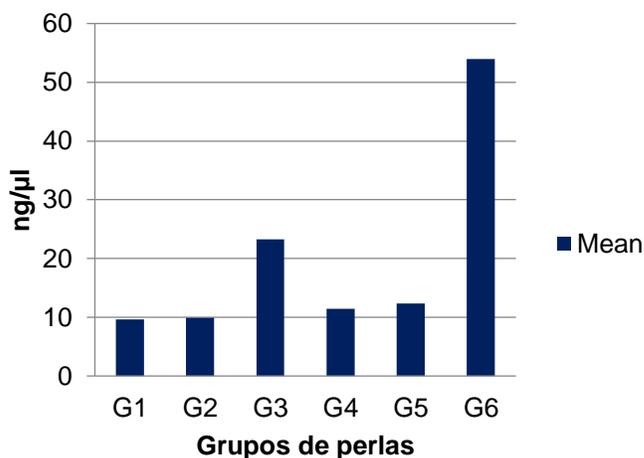
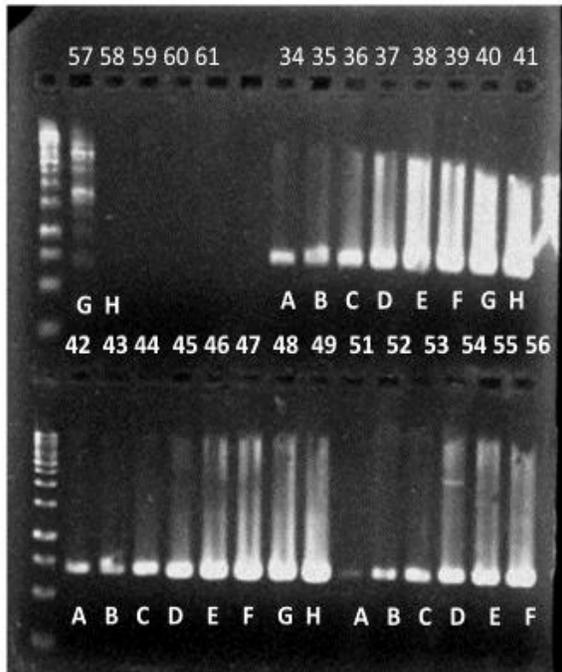


Figura 17. Concentraciones de ADN obtenido. Comparación de las concentraciones de ADN genómico obtenido tras extracción de ADN mediante el kit comercial Quick-gDNA™ y seis diferentes grupos de perlas a muestras de ADN puro de *L. monocytogenes*.

6.2. Condiciones de uso de los iniciadores Lm20 para la detección de *L. monocytogenes*. Para evitar la presencia de productos inespecíficos de la PCR, se realizó un ensayo de gradiente de la temperatura de alineación, siendo el rango de temperaturas utilizado en el ensayo de 55 a 58°C, observándose los amplicones más intensos a la temperatura de alineación de 63.1°C.



Par de iniciadores de la PCR "Lm20" de 679 pb para la identificación de *L. monocytogenes*.

Distribución de ADN en los diferentes posos del gel de agarosa

34-41 muestras de ADN puro

42-49 muestras de ADN puro

51-58 muestras de ADN puro+ ADN ambiental

59-61 controles negativos (muestras de ADN de *salmonella spp.*)

Figura 18. Gradiente de temperatura para la optimización de la PCR. Se utilizaron muestras de ADN genómico puro de *L. monocytogenes* y muestras de ADN puro más la adición de ADN ambiental de *L. monocytogenes*. Cada uno de los carriles representa una T (°C) específica a la que se realizó la alineación de la PCR. Carril **A**: 68°C, **B**: 67.1°C, **C**: 65.5°C, **D**: 63.1°C, **E**: 60.1°C, **F**: 58°C, **G**: 56.2 °C, **H**: 55°C, carriles **59** a **61** controles negativos (muestras de ADN de *Salmonella spp.*).

6.3. Detección de *L. monocytogenes* en matrices alimentarias.

Con la finalidad de comprobar la eficiencia de los ensayos moleculares (Extracción de ADN genómico y PCR) estandarizados, se inocularon tres matrices alimentarias: lechuga romana, carne molida de res y queso panela con el patógeno *L. monocytogenes* con lo que se determinó:

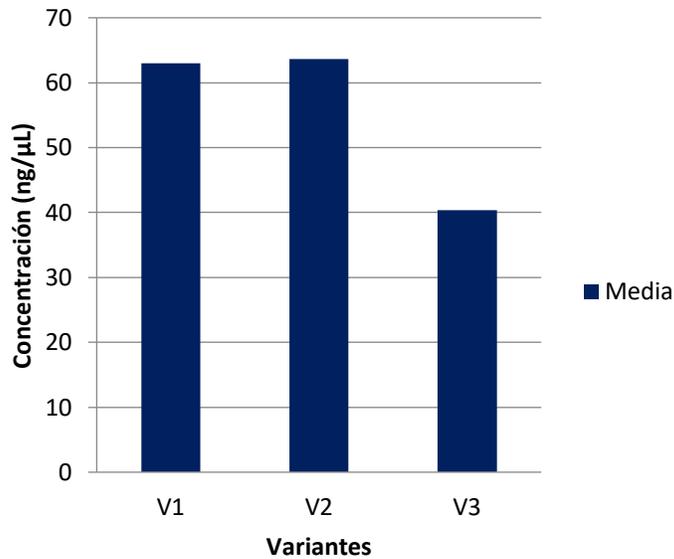
1. Si la implementación de los grupos de perlas en la extracción del ADN mostraba mejores resultados en contraste con el uso único del kit Quick-gDNA™ **(Figura 19)**.

2. La especificidad de los iniciadores de la PCR Lm20 en la identificación de *L. monocytogenes* ante la presencia de sustancias inhibitorias de la PCR **(Figura 20)**.

Acorde a los valores de las concentraciones de ADN genómico obtenido mediante las variantes de extracción de ADN V1, V2 y V3 utilizadas **(Cuadro 14)**, de V1= 63.003 ng/μL , V2= 63.6 ng/μL y V3=40.344 ng/μL **(Figura 19A)**, se descarta el uso de la variante de extracción V3 y así mismo se observa que acorde a la similitud de los valores obtenidos entre la V1 y V2 no hay una diferencia significativamente estadística entre una y otra variante.

El análisis de PCR **(Figura 21)** reveló que el par de iniciadores de la PCR Lm20 **(Cuadro 10)**, son específicos para detectar a *L. monocytogenes* en muestras de alimento.

A)



	Media	Error estándar
V1	63,006	8,06
V2	63,6	11,999
V3	40,344	8,427

B)

1. C1V1
2. C2V1
3. L3V1
4. L4V1
5. Q5V1
6. Q6V1

7. C7V2
8. C8 V2
9. L9V2
10. L10V2
11. Q11V2
12. Q12V2

13. C 13V3
14. C14V3
15. L15V3
16. L16V3
17. Q17V3
18. Q18V3

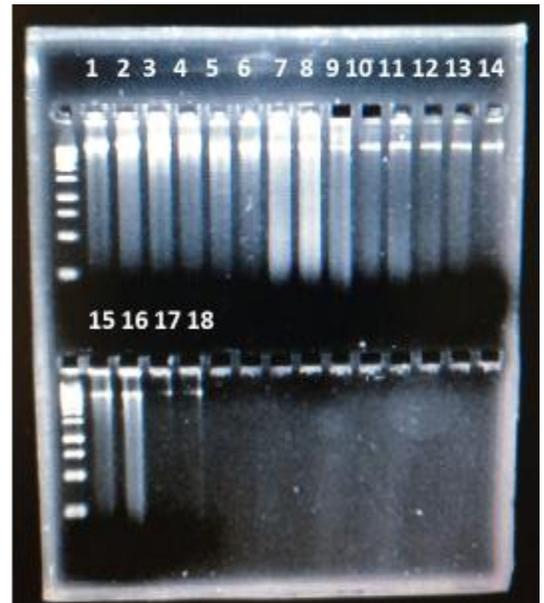


Figura 19. Evaluación de la calidad e integridad del material genético obtenido de la extracción de ADN genómico de lechuga romana (L), carne molida de res (C) y queso panela (Q), inoculados con *L. monocytogenes*. A) Tabulación de la media de las concentraciones obtenidas mediante la cuantificación en NanoDrop 2000 (ThermoScientific). B) Electroforesis en gel de agarosa al 1%. Carril 0- Marcador de peso molecular de 1kb (GeneRuler 1kb DNA Ladder, Thermo Scientific). Carriles 1-6: V1 de extracción de ADN, Carriles 7-12: V2 de extracción de ADN, Carriles 13-18: V3 de extracción de ADN.

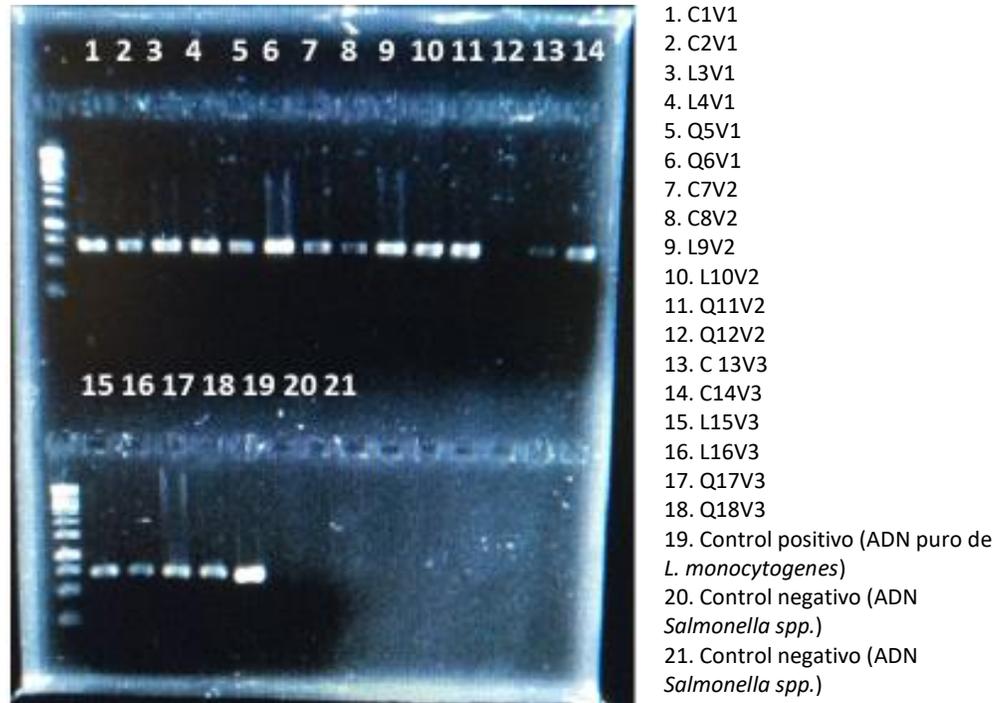


Figura 20. Verificación de la especificidad de los iniciadores Lm20 en la detección de *L. monocytogenes* mediante ensayo de PCR. Electroforesis en gel de agarosa al 1.5% de los productos de PCR de las matrices alimentarias carne molida de res (C), lechuga romana (L) y queso panela (Q), enzima utilizada ADN polimerasa “Phire Hot Start II Taq DNA Polymerase”. Carril 0- marcador de peso molecular de 1kb (GeneRuler 1kb DNA Ladder, Thermo Scientific). Carriles 1-6 productos de PCR de la V1, Carriles 7-12 productos de PCR de la V2, Carriles 13-18 productos de PCR de la V3, carril 19 control positivo (ADN puro de *L. monocytogenes*), carriles 20 y 21 controles negativos (ADN puro de *Salmonella typhimurium* cepa ATCC 14028).

6.4. Límite de detección de los iniciadores de la PCR Lm20 en la *identificación de L. monocytogenes* en muestras de brócoli.

Cuantificación mediante NanoDrop 2000 (ThermoScientific), de las concentraciones del ADN genómico obtenido tras el protocolo de extracción de ADN genómico de las 30 alícuotas realizadas de las muestras de brócoli inoculado con diferentes concentraciones de *L. monocytogenes* (**numeral 5.2.2. inciso 6, sub - inciso D**). Al realizar la tabulación de la media de las concentraciones obtenidas (**Figura 21**) se observa que los valores obtenidos de las muestras que fueron realizadas con la V1 son mejores en comparación con los valores obtenidos de las muestras realizadas mediante la V2.

	MEDIA	ERROR ESTANDAR		MEDIA	ERROR ESTANDAR
1, SI, N	30,22	6,892	16, SI, P	15,57	4,371
2SI, N			17, SI, P		
3, SI, N			18, SI, P		
4,18UFC, N	26,77	4,052	19,18UFC, P	33,42	9,639
5, 18UFC, N			20, 18UFC, P		
6, 18UFC, N			21, 18UFC, P		
7, 180UFC, N	31,91	6,522	22, 180UFC, P	13,98	3,535
8, 180UFC, N			23, 180UFC, P		
9, 180UFC, N			24, 180UFC, P		
10, 1800UFC, N	30,58	5,929	25, 1800UFC, P	17,65	6,246
11, 1800UFC, N			26, 1800UFC, P		
12, 1800UFC, N			27, 1800UFC, P		
13, 18000UFC, N	27,44	4,173	28, 18000UFC, P	9,95	2,930
14, 18000UFC, N			29, 18000UFC, P		
15, 18000UFC, N			30, 18000UFC, P		

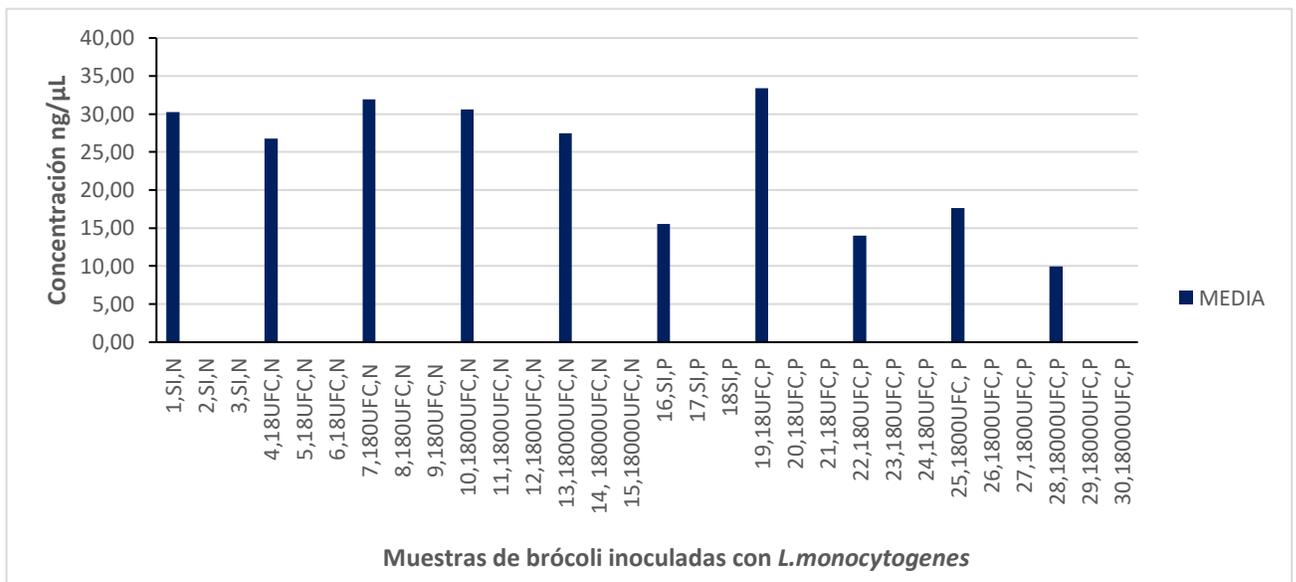


Figura 21. Media de las concentraciones de ADN genómico obtenido tras la extracción de ADN de 30 alícuotas de brócoli inoculado artificialmente con diferentes concentraciones de *L. monocytogenes*. Muestras 1-15: ADN genómico de extracciones de ADN mediante la V1, Muestras 16-30: ADN genómico de extracciones de ADN mediante la V2.

6.4.1. Ensayos de PCR

A. Evaluación de la presencia de producto de PCR amplificable.

La evaluación del gen 16S rRNA es una excelente herramienta genética en la identificación y caracterización de poblaciones bacterianas ya que es un gen altamente conservado a nivel de género y especie. El cual nos permitió visualizar **(Figura 22)**, la presencia de producto de PCR amplificable en el ensayo de PCR realizado **(numeral 5.2.2. inciso 6, sub – inciso E, punto 1.)**.

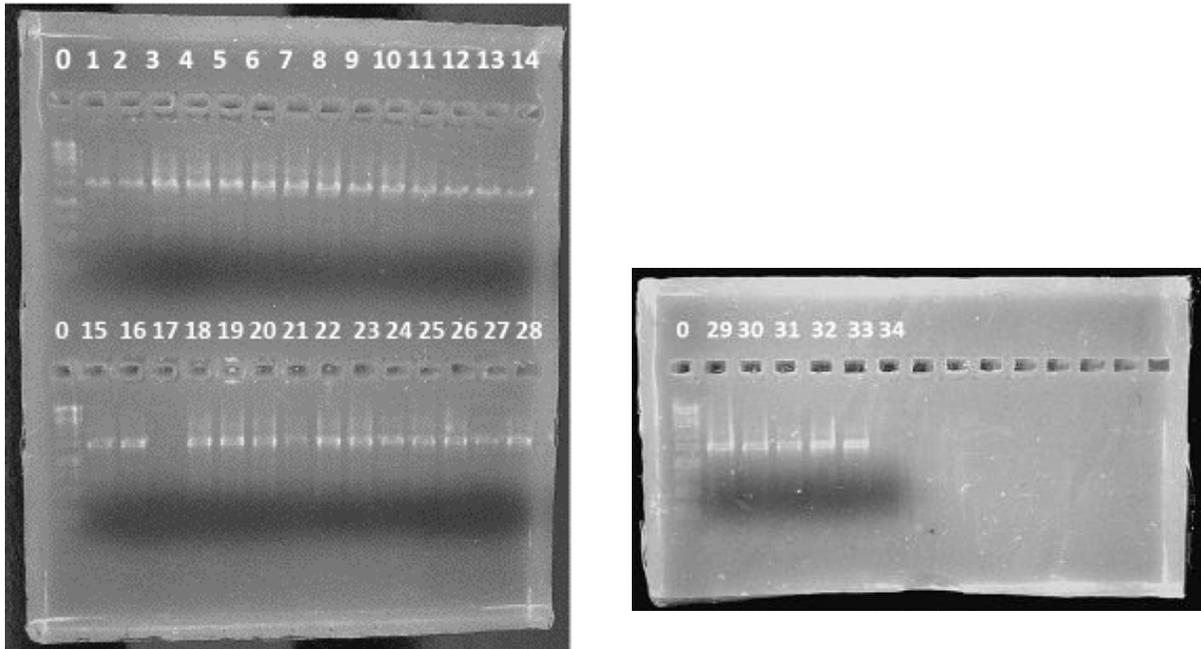


Figura 22. Visualización mediante electroforesis en gel de agarosa de la presencia de producto de PCR amplificable del ADN genómico obtenido de las 30 alícuotas de brócoli inoculado con *L. monocytogenes* (Cuadro 14). Gel de agarosa al 1.5%. Se utilizaron el par de iniciadores 8F Y 1510R (gen blanco, 16S rRNA), la enzima Taq ADN polimerasa “Maxima Hot Start Taq DNA Polymerase”. Carril 0- marcador de peso molecular de 1kb (GeneRuler 1kb DNA Ladder, Thermo Scientific). Carriles 1-15: productos de PCR de las muestras de ADN genómico obtenido de la extracción de ADN mediante la V1. Carril 16: ADN puro de *Salmonella spp.* (control positivo). Carril 17: 15 µL de producto de “Master Mix” (control negativo). Carriles 18-32: productos de PCR de las muestras de ADN genómico obtenido de la extracción de ADN mediante la V2. Carril 33: ADN puro de *Salmonella spp.* (control positivo). Carril 34: 15 µL de producto de “Master Mix” (control negativo).

B. Selección de la Taq ADN polimerasa comercial más eficiente en la detección de *L. monocytogenes* y evaluación del límite de detección de los iniciadores de la PCR Lm20.

Los ensayos de evaluación de la efectividad de las Taq-ADN polimerasas probadas reveló que el ensayo llevado a cabo con la ADN polimerasa “Phire Hot Start II Taq DNA Polymerase” (**Figura 25**), fue capaz de detectar la presencia de *L. monocytogenes* en las muestras de brócoli inoculadas con diferentes concentraciones del patógeno (Cuadro 16) en contraste con los ensayos llevados a cabo con las Taq ADN polimerasas “Maxima Hot Start Taq DNA Polymerase”, en el cual no se mostró la amplificación de los productos de PCR (**Figura 23**) y el ensayo llevado a cabo con la “Dream Taq DNA Polymerase” el cual mostró solo la amplificación de algunos productos de PCR (**Figura 24**). Así mismo estos resultados revelan que el límite de detección del ensayo de PCR en la identificación de *L. monocytogenes* en alimentos es de 1.8×10^5 UFC/mL de muestra.

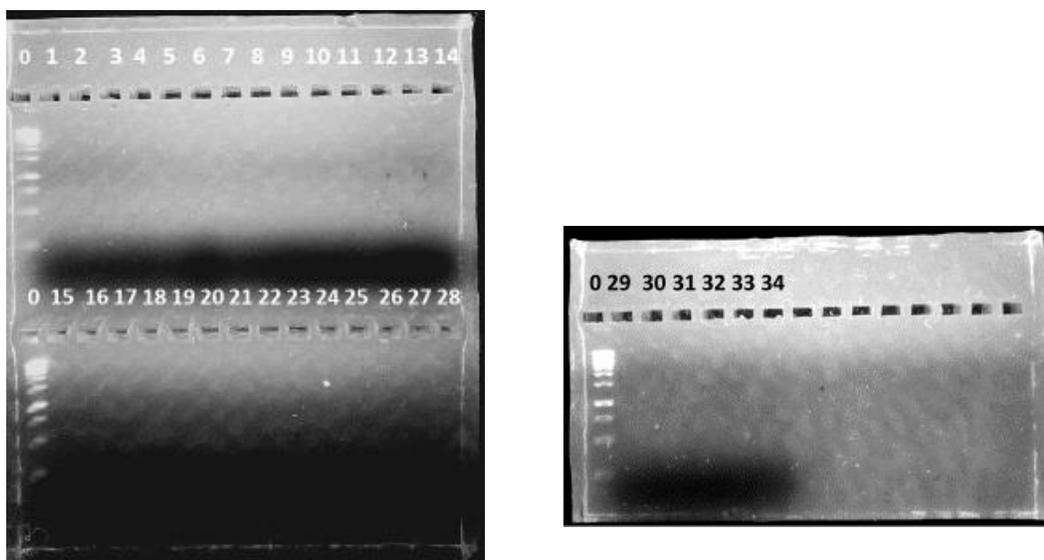


Figura 23. Visualización de producto de PCR amplificable mediante electroforesis en gel de agarosa evaluando la Taq ADN polimerasa “Maxima Hot Start Taq DNA Polymerase. Muestras de ADN genómico obtenido de las alícuotas de brócoli inoculado con *L. monocytogenes* (**Cuadro 14**). Gel de agarosa al 1.5%. Iniciadores de la PCR específicos Lm20 de 679 pb (**Cuadro 10**). Enzima Taq ADN polimerasa “Maxima Hot Start Taq DNA Polymerase (**Cuadro 16 inciso A.**). Carril 0: marcador de peso molecular de 1kb (GeneRuler 1kb DNA Ladder, Thermo Scientific). Carriles 1-15: productos de PCR de las muestras de ADN genómico obtenido de la extracción de ADN mediante la V1. Carril 16: ADN puro de *L. monocytogenes* (control positivo). Carril 17: ADN puro de *S. typhimurium* cepa ATCC 14028 (control negativo). Carriles 18-32: productos de PCR de las muestras de ADN genómico obtenido de la extracción de ADN mediante la V2. Carril 33: ADN puro de *L. monocytogenes* (control positivo). Carril 34: ADN puro de *S. typhimurium* cepa ATCC 14028 (control negativo). En ensayo de PCR se llevo a cabo bajo las condiciones descritas en el cuadro 12.

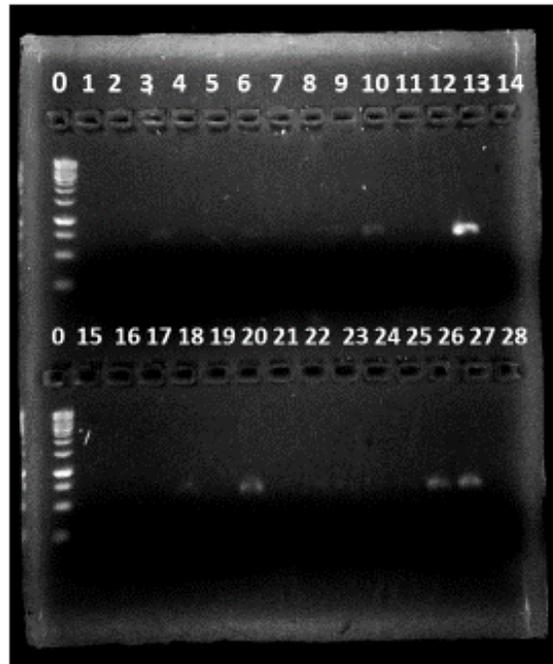


Figura 24. Visualización de producto de PCR amplificable mediante electroforesis en gel de agarosa evaluando la Taq ADN polimerasa “Dream Taq DNA Polymerase”. Muestras de ADN genómico obtenido de las alícuotas de brócoli inoculado con *L. monocytogenes* (**Cuadro 14**). Gel de agarosa al 1.5%. Iniciadores de la PCR específicos Lm20 de 679 pb (**Cuadro 10**). Enzima Taq ADN polimerasa “Dream Taq DNA Polymerase” (**Cuadro 16 inciso B.**). Carril 0- marcador de peso molecular de 1kb (GeneRuler 1kb DNA Ladder, Thermo Scientific). Carriles 1-12: productos de PCR de las muestras de ADN genómico obtenido de la extracción de ADN mediante la V1. Carril 13: ADN puro de *L. monocytogenes* (control positivo). Carril 14: ADN puro de *S. typhimurium* cepa ATCC 14028 (control negativo). Carriles 15-26: productos de PCR de las muestras de ADN genómico obtenido de la extracción de ADN mediante la V2. Carril 27: ADN puro de *L. monocytogenes* (control positivo). Carril 28: ADN puro de *S. typhimurium* cepa ATCC 14028 (control negativo). El ensayo de PCR se llevó a cabo bajo las condiciones descritas en el cuadro 12.

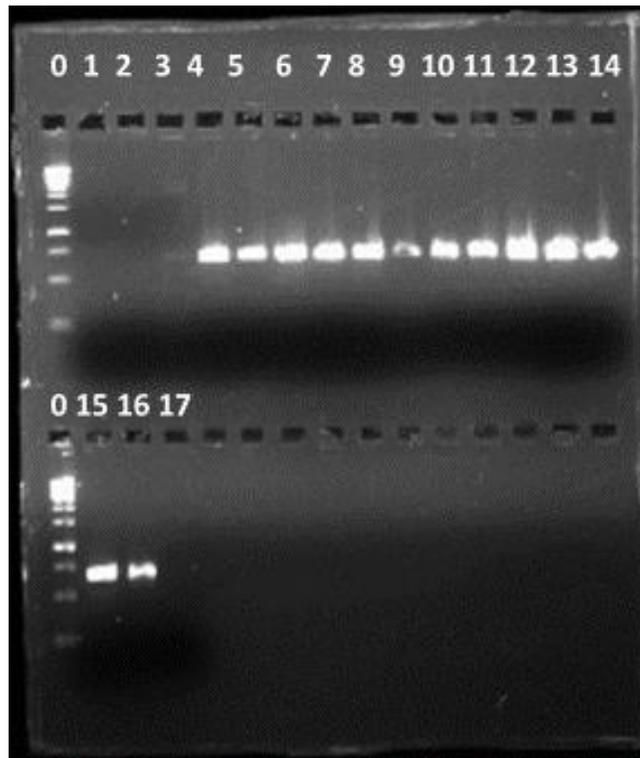


Figura 25. Visualización de producto de PCR amplificable mediante electroforesis en gel de agarosa evaluando la Taq ADN polimerasa “Phire Hot Start II Taq DNA Polymerase”. Muestras de ADN genómico obtenido de las alícuotas de brócoli inoculado con *L. monocytogenes* (**Cuadro 14**). Gel de agarosa al 1.5%. Iniciadores de la PCR específicos Lm20 de 679 pb (**Cuadro 10**). Enzima Taq ADN polimerasa “Phire Hot Start II Taq DNA Polymerase” (**Cuadro 16 inciso C.**). Carril 0- marcador de peso molecular de 1kb (GeneRuler 1kb DNA Ladder, Thermo Scientific). Carriles 1-15: productos de PCR de las muestras de ADN genómico obtenido de la extracción de ADN mediante la V1. Carril 16: ADN puro de *L. monocytogenes* (control positivo). Carril 17: ADN puro de *S. typhimurium* cepa ATCC 14028 (control negativo). El ensayo de PCR se llevó a cabo bajo las condiciones descritas en el cuadro 12.

7. DISCUSIÓN

Los estudios cultivo-dependientes para detectar *L. monocytogenes* en los alimentos se basan principalmente en el cultivo bacteriano e identificación bioquímica; proceso que requiere más de 5 días para confirmar la presencia del patógeno. Por esta razón, surge la necesidad de desarrollar metodologías rápidas para la oportuna identificación de este patógeno.

Recientemente, se han desarrollado métodos moleculares para la detección de *L. monocytogenes* basados en sus genes de virulencia como *hlyA*, *prfA*, *iap* y *plcA*, (Cho et al., 2014; Mazza et al., 2015; Momtaz and Yadollahi, 2013; Tao et al., 2015), sin embargo, la deficiencia y la mutación de algunos factores de virulencia en cepas de *L. monocytogenes* pueden dar lugar a resultados falsos representando una amenaza potencial de intoxicación (Liu, 2006). Por lo que, gracias al desarrollo de la tecnología de secuenciación y la bioinformática, que ha llevado a la publicación de numerosas secuencias del genoma microbiano muchos investigadores se han dedicado a explorar y seleccionar nuevos marcadores de objetivos específicos que podrían reemplazar algunos genes diana con una especificidad deficiente.

El objetivo del presente trabajo fue desarrollar un método molecular para la detección rápida y oportuna de *L. monocytogenes*. En el cual se evaluó la eficiencia de los iniciadores Lm20 (descritos en el estudio realizado por Tao et al., 2015) en la detección sensible y específica de *L. monocytogenes* en matrices alimentarias, esto a través de la estandarización de la metodología de extracción de ADN y ensayos de PCR.

A diferencia de resultados mostrados en estudios realizados por Yeates et al., 1998 en donde la metodología de batido de perlas para la extracción de ADN genómico se desempeñó mejor que los diferentes métodos probados (sonicación y lisis enzimática) y Ogram et al., 1987 donde la eficacia de la lisis llevada a cabo mediante la implementación de perlas de vidrio, verificada mediante recuentos directos de naranja de acridina mostró valores superiores al 90%. Los resultados obtenidos en este estudio tras la estandarización del protocolo de extracción de ADN genómico mediante el kit comercial “Quick-gDNA™” del fabricante Zymo Research, revelaron que la implementación de los diferentes grupos de perlas (**Cuadro 10**) a la metodología de extracción de ADN no representó una mejor aportación a los resultados en cuanto a la obtención de una mayor concentración de ADN en las pruebas realizadas en contraste con el uso único del kit comercial (**Figuras 19 y 20**).

La confiabilidad y aceptabilidad de la detección por PCR de *L. monocytogenes* se evaluó mediante la contaminación artificial de tres matrices de alimentos: carne molida de res, lechuga romana y queso panela. Los resultados revelaron que los componentes inhibidores de la PCR presentes en los alimentos, no tienen efecto de interferencia en la detección de *L. monocytogenes*. Determinado la alta especificidad de los iniciadores Lm20 en el ensayo de PCR realizado (**Figura 20**).

La sensibilidad y la especificidad del ensayo de PCR con el par iniciadores Lm20 estudiados, se determinaron mediante la contaminación artificial de muestras de brócoli a las cuales se les fueron inoculadas diferentes concentraciones del patógeno (**Cuadro 16**). *Listeria monocytogenes* en muestras de brócoli se pudo detectar a concentraciones de 18 UFC / 225 mL de muestra (**Figura 25**). Los resultados obtenidos son comparables con lo reportado por (Tao et al., 2015) en el cual *Listeria monocytogenes* en muestras de leche se pudo detectar por debajo del nivel de inóculo inicial de 380 UFC / 10 mL de muestra después del enriquecimiento en caldo BHI (90mL) durante 4–8 h. Los ensayos directos de PCR para detectar la presencia de *L. monocytogenes* en alimentos han demostrado ser altamente específicos y sensibles cuando se comparan con el método cultivo-dependiente (Gasnov et al., 2005; Momtaz and Yadollahi, 2013; Tao et al., 2015). Son requeridos estudios más extensos en los cuales se pueda determinar tanto la sensibilidad y especificidad del método desarrollado ante muestras ambientales y positivas de *L. monocytogenes*.

8. CONCLUSIÓN

En el presente estudio se desarrolló y validó un método molecular para la detección directa de *L. monocytogenes* en matrices alimentarias con un límite de detección de 18 UFC/225 mL de muestra con lo que se determinó que los iniciadores de la PCR Lm20 poseen una alta especificidad y sensibilidad para la detección de *L. monocytogenes*.

Debido a la gran importancia que *L. monocytogenes* representa para la salud pública, así como al incremento de brotes de Listeriosis humana mostrado durante los últimos 10 a 15 años, los cuales son atribuidos principalmente a la ingesta de alimentos contaminados, se pone en evidencia la necesidad de la aplicación de nuevas herramientas para la identificación rápida, sensible y específica de patógenos en alimentos, como lo son los métodos moleculares, los cuales dada la gran precisión y velocidad con que se pueden realizar no hay duda de que la mayoría de estos métodos, si no se han aplicado, serán adoptados por las autoridades reguladoras y en los laboratorios de pruebas de alimentos en el futuro.

Por lo que se considera que el ensayo molecular desarrollado en el presente estudio será de gran importancia para este fin.

9. ANEXOS

9.1. Preparación de tubos con perlas para extracción de ADN.

Pesaje de los diferentes tamaños de perlas, combinándolas acorde a lo descrito en el cuadro 9 en tubos eppendorf de 1.5 mL mediante el uso de balanza analítica digital, 120g x 0.0001g (Sartorius).

9.2. Preparación de medios de cultivo y soluciones

- ❖ Instrucciones del fabricante para la preparación de Caldo Base Fraser (suplementado con citrato férrico de amonio)

Un vial de 5 mL del producto 7984 (citrato férrico de amonio) para Caldo Base Fraser proporcionará 500 mL de Caldo Base Fraser

- Disolver 55 g del medio en un litro de agua purificada.
- Mezclar completamente.
- Autoclave a 121°C durante 15 minutos.
- Adicionar asépticamente 10 mL (2 viales de 5 mL) del Suplemento Base para Caldo Fraser (7984).
- Mezcle completamente

Nota: Para realizar el Caldo Base Half Fraser, disolver 500 mL de Caldo Base Fraser con 500 mL de agua purificada.

- ❖ Instrucciones del fabricante para la preparación del medio Agar Soya Tripticasa

Disolver 40 g del polvo en 1 litro de agua purificada, mezclar y dejar reposar 5 minutos. Calentar agitando suavemente y hervir durante 1-2 minutos hasta su disolución total. Ajustar pH final a 7.3 ± 0.2 . Distribuir en recipientes apropiados y esterilizar en autoclave a 121°C durante 15 minutos. Enfriar a 45-50°C, homogeneizar y distribuir en placas de Petri estériles.

- ❖ Instrucciones del fabricante para la preparación del medio Caldo Soya Tripticasa

Disolver 30 g del polvo en 1 litro de agua purificada, mezclar y dejar reposar 5 minutos. Calentar con agitación frecuente y llevar hasta ebullición hasta disolver completamente. Ajustar pH final a 7.3 ± 0.2 . Distribuir en recipientes apropiados y esterilizar en autoclave a 121°C durante 15 minutos.

- ❖ Solución salina 0.85%

Disolver 8.5 g de cloruro de sodio (NaCl) en 1 litro de agua purificada. Ajustar el pH a 7.0 ± 0.2 a 25°C. Esterilizar 15 min a 121°C

- ❖ Agua peptonada amortiguada

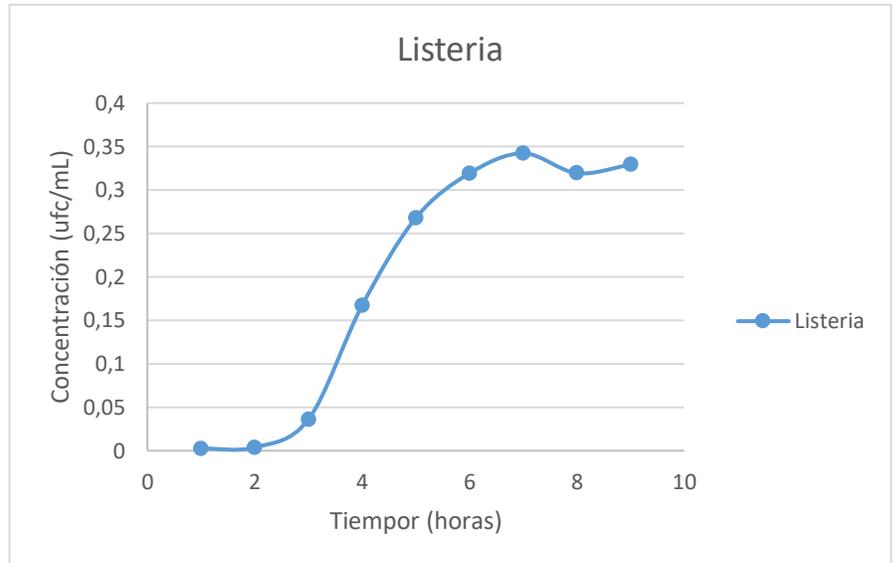
Fórmula.

Digerido enzimático de caseína	10 g
NaCl	5 g
Na ₂ HPO ₄ ·12H ₂ O	9 g
KH ₂ PO ₄	1.5 g
Agua	1000 mL

Preparación: Disolver los ingredientes en el agua, calentar si es necesario. Ajustar el pH a 7.0 ± 0.2 a 25°C. Esterilizar en autoclave 15 min a 121°C.

9.3. Cinética de crecimiento de *L. monocytogenes*.

Tiempo	Listeria
0 h	0,0026219
1 h	0,0038108
2 h	0,0360358
3 h	0,1672362
4 h	0,267837
5 h	0,319229
6 h	0,3422082
7 h	0,31940018
8 h	0,3290942



10. BIBLIOGRAFÍA

Allerberger, F., and Wagner, M. (2010). Listeriosis: a resurgent foodborne infection. *Clin. Microbiol. Infect.* 16, 16–23.

Alvarez, D.E., and Agaisse, H. (2016). The Metalloprotease Mpl Supports *Listeria monocytogenes* Dissemination through Resolution of Membrane Protrusions into Vacuoles. *Infect. Immun.* 84, 1806–1814.

Blanot, S., Joly, M.M., Vilde, F., Jaubert, F., Clement, O., Frija, G., and Berche, P. (1997). A gerbil model for rhombencephalitis due to *Listeria monocytogenes*. *Microb. Pathog.* 23, 39–48.

Bosshard, P.P., Zbinden, R., Abels, S., Boddington, B., Altwegg, M., and Bottger, E.C. (2006). 16S rRNA Gene Sequencing versus the API 20 NE System and the VITEK 2 ID-GNB Card for Identification of Nonfermenting Gram-Negative Bacteria in the Clinical Laboratory. *J. Clin. Microbiol.* 44, 1359–1366.

Camargo, A.C., Woodward, J.J., and Nero, L.A. (2016). The Continuous Challenge of Characterizing the Foodborne Pathogen *Listeria monocytogenes*. *Foodborne Pathog. Dis.* 13, 405–416.

Castañeda-Ruelas, G., and León-Félix, J. (2014). Listeriosis en México: importancia clínica y epidemiológica. *Salud Pública México* 56, 6.

Cho, A.-R., Dong, H.-J., Seo, K.-H., and Cho, S. (2014). Development of a loop-mediated isothermal amplification assay for detecting *Listeria monocytogenes* prfA in milk. *Food Sci. Biotechnol.* 23, 467–474.

Cristina, M. (2005). DETERMINACIÓN DE LISTERIA SPP. EN QUESOS Y EMBUTIDOS COMERCIALIZADOS EN CUBA. *Inst. Nutr. E Hig. Los Aliment. INHA* 6.

ECDC, and European Food Safety Authority (2018). Multi-country outbreak of *Listeria monocytogenes* serogroup IVb, multi-locus sequence type 6, infections probably linked to frozen corn.

Ferreira, V., Wiedmann, M., Teixeira, P., and Stasiewicz, M.J. (2014). *Listeria monocytogenes* Persistence in Food-Associated Environments: Epidemiology, Strain Characteristics, and Implications for Public Health. *J. Food Prot.* 77, 150–170.

Flores, T.G., and Herrera, R.A.R. (2005). Enfermedades transmitidas por alimentos y PCR: prevención y diagnóstico. *Salud Pública México* 47, 388–390.

Garrido-Maestu, A., Azinheiro, S., Carvalho, J., and Prado, M. (2018). Rapid and sensitive detection of viable *Listeria monocytogenes* in food products by a filtration-based protocol and qPCR. *Food Microbiol.* 73, 254–263.

Gasnov, U., Hughes, D., and Hansbro, P.M. (2005). Methods for the isolation and identification of *Listeria* spp. and *Listeria monocytogenes*: a review. *FEMS Microbiol. Rev.* 29, 851–875.

Groves, R.D., and Welshimer, H.J. (1997). Separation of Pathogenic from Apathogenic *Listeria monocytogenes* by Three In Vitro Reactions. *J CLIN MICROBIOL* 5, 5.

Hitchins, Jinneman, and Chen (2017). Laboratory Methods - BAM: Detection and Enumeration of *Listeria monocytogenes*.

- Hough, A.J., Harbison, S.-A., Savill, M.G., Melton, L.D., and Fletcher, G. (2002). Rapid enumeration of *Listeria monocytogenes* in artificially contaminated cabbage using real-time polymerase chain reaction. *J. Food Prot.* 65, 1329–1332.
- Kindt, Goldsby, and Osborne (2007). *Inmunología de Kuby* (McGRAW-HILL INTERAMERICANA EDITORES, S.A. de C.V.).
- Koneman, E.W., and Allen, S. (2008). *Koneman. Diagnostico Microbiologico/ Microbiological diagnosis: Texto Y Atlas En Color/ Text and Color Atlas* (Ed. Médica Panamericana).
- Liu, D. (2006). Identification, subtyping and virulence determination of *Listeria monocytogenes*, an important foodborne pathogen. *J. Med. Microbiol.* 55, 645–659.
- MacFaddin, J.F. (2003). *Pruebas bioquímicas para la identificación de bacterias de importancia clínica* (Ed. Médica Panamericana).
- Mazza, R., Piras, F., Ladu, D., Putzolu, M., Consolati, S.G., and Mazzette, R. (2015). Identification of *Listeria* spp. strains isolated from meat products and meat production plants by multiplex polymerase chain reaction. *Ital. J. Food Saf.* 4.
- Momtaz, H., and Yadollahi, S. (2013). Molecular characterization of *Listeria monocytogenes* isolated from fresh seafood samples in Iran. *Diagn. Pathol.* 8, 149.
- Monteiro, L.R.L. de, Mesquita, A.J. de, André, M.C.D.P.B., and Cardoso, J.L. (2013). Molecular characterization of *Listeria monocytogenes* isolated from animal products in a city of Northern Brazil. *Ciênc. Rural* 43, 1443–1448.
- Murray, P.R., Rosenthal, K.S., and Pfaller, M.A. (2009). *Microbiología médica*, 6a ed. (Elsevier España).
- Ogram, A., Saylor, G.S., and Barkay, T. (1987). The extraction and purification of microbial DNA from sediments. *J. Microbiol. Methods* 7, 57–66.
- OMS (2018). OMS | Listeriosis.
- OMS, W.H. (2015). WHO estimates of the global burden of foodborne diseases: executive summary (World Health Organization).
- Orsi, R.H., and Wiedmann, M. (2016). Characteristics and distribution of *Listeria* spp., including *Listeria* species newly described since 2009. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 100, 5273–5287.
- Orsi, R.H., Bakker, H.C. den, and Wiedmann, M. (2011). *Listeria monocytogenes* lineages: Genomics, evolution, ecology, and phenotypic characteristics. *Int. J. Med. Microbiol.* 301, 79–96.
- Oteo, and Alós *Listeria* Y LISTERIOSIS. *Control Calid. SEIMC* 4.
- Paziak-Domańska, B., Bogusawska, E., Wiśnickowska-Szakiel, M., Kotowski, R., Ralska, B., Chmiela, M., Kur, J., Dąbrowski, W., and Rudnicka, W. (1999). Evaluation of the API test, phosphatidylinositol-specific phospholipase C activity and PCR method in identification of *Listeria monocytogenes* in meat foods. *FEMS Microbiol. Lett.* 171, 209–214.
- Radoshevich, L., and Cossart, P. (2017). *Listeria monocytogenes*: towards a complete picture of its physiology and pathogenesis. *Nat. Rev. Microbiol.* 16, 32–46.

- Razei, A., Sorouri, R., Mousavi, S.L., Nazarian, S., Amani, J., and Aghamollaei, H. (2017). Presenting a rapid method for detection of *Bacillus cereus*, *Listeria monocytogenes* and *Campylobacter jejuni* in food samples. *Iran. J. Basic Med. Sci.* *20*, 1050.
- Rodríguez-López, P., Rodríguez-Herrera, J., Vázquez-Sánchez, D., and López Cabo, M. (2018). Current Knowledge on *Listeria monocytogenes* Biofilms in Food-Related Environments: Incidence, Resistance to Biocides, Ecology and Biocontrol. *Foods* *7*, 85.
- Ryu, J., Park, S.H., Yeom, Y.S., Shrivastav, A., Lee, S.-H., Kim, Y.-R., and Kim, H.-Y. (2013). Simultaneous detection of *Listeria* species isolated from meat processed foods using multiplex PCR. *Food Control* *32*, 659–664.
- Seveau, S. (2014). Multifaceted Activity of Listeriolysin O, the Cholesterol-Dependent Cytolysin of *Listeria monocytogenes*. *MACPF CDC Proteins - Agents Def. Attack Invasion* *80*, 32.
- SINAVE, D.C.R.M. (2013). ENFERMEDADES TRANSMITIDAS POR ALIMENTOS (SINAVE).
- Tao, T., Chen, Q., Bie, X., Lu, F., and Lu, Z. (2015). Mining of novel species-specific primers for PCR detection of *Listeria monocytogenes* based on genomic approach. *World J. Microbiol. Biotechnol.* *31*, 1955–1966.
- Yeates, C., Gillings, M.R., Davison, A.D., Altavilla, N., and Veal, D.A. (1998). Methods for microbial DNA extraction from soil for PCR amplification. *Biol. Proced. Online* *1*, 40–47.
- Zhang, M., Wang, X., Han, L., Niu, S., Shi, C., and Ma, C. (2018). Rapid detection of foodborne pathogen *Listeria monocytogenes* by strand exchange amplification. *Anal. Biochem.* *545*, 38–42.
- European Centre for Disease Prevention and Control. Listeriosis. In: ECDC. Annual epidemiological report for 2015. Stockholm: ECDC; 2018.