



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES

Identificación de *Listeria* spp. en fauna urbana (*Didelphis virginiana* y *Otospermophilus variegatus*).

Tesis individual

Como parte de los requisitos para obtener el grado de:

Licenciado en Microbiología

Presenta:
Carlos Alberto Molina Vera

Dirigido por
Dra. Andrea Margarita Olvera Ramírez

Santiago de Querétaro, Querétaro

Noviembre del 2018



Dirección General de Bibliotecas y Servicios Digitales
de Información



Identificación de *Listeria* spp. en fauna urbana
(*Didelphis virginiana* y *Otospermophilus variegatus*).

por

Carlos Alberto Molina Vera

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-231445



Universidad Autónoma de Querétaro
Facultad de Ciencias Naturales

Identificación de *Listeria* spp. en fauna urbana (*Didelphis virginiana* y *Otospermophilus variegatus*).

Tesis

Que como parte de los requisitos para obtener el Grado de
Licenciado en Microbiología

Presenta:

Carlos Alberto Molina Vera

Dirigido por:

Dra. Andrea Margarita Olvera Ramírez

Dra. Andrea Margarita Olvera Ramírez

Director

Dr. Carlos Alberto López González

Sinodal

Dra. Angelina Rodríguez Torres

Sinodal

Centro Universitario
Querétaro, Qro.
Septiembre-2018
México

Resumen

Listeria spp. es el agente causal de la Listeriosis, enfermedad transmitida por alimentos que es poco frecuente y con una alta mortalidad. La bacteria es capaz de diseminarse a través de alimentos contaminados y por reservorios como roedores, aves, animales de abasto y de compañía. Hasta la fecha, no se sabe si los ardillones (*Otospermophilus variegatus*) y los tlacuaches (*Didelphis virginiana*) son reservorios de esta bacteria, por lo que en el presente trabajo tuvo como objetivo identificar y estimar la prevalencia de *Listeria* spp. en ambos especímenes. Para este estudio se utilizaron muestras rectales las cuales fueron tomadas en dos zonas para los tlacuaches: área urbana (Centro Universitario) y área periurbana (Zibatá). Mientras que las muestras de ardillones solo se tomaron en un área urbana (parque Alameda Hidalgo). La identificación de *Listeria* spp. se llevó a cabo mediante la amplificación del gen *prfA* y el gen *Prs* por PCR. Adicionalmente se llevó a cabo el aislamiento selectivo para *Listeria* spp. de los preenriquecimientos congelados en glicerol, los cuales fueron cultivados en agar PALCAM suplementados con Ceftazidima pentahidratada (15 µg/ml), las colonias obtenidas fueron identificadas mediante la secuenciación de la región ribosomal 16S. De un total de 100 muestras rectales de ardillones, 43 % resultaron ser positivos a *Listeria* spp. con los oligonucleótidos Lip1 y Lip2 (gen *prfA*) así como el 11 % con los oligonucleótidos Prs (gen *Prs*). Por otra parte 36 muestras rectales de tlacuaches fueron analizadas (Centro Universitario UAQ n=20; Zibatá n=16); 10.5 % resultaron ser positivos a *Listeria* spp. con Lip1 y Lip2 mientras que con Prs solamente 5.56 %. Los aislamientos obtenidos no fueron identificados como *Listeria* spp., por lo que la obtención de la bacteria no fue posible. En conclusión ambas especies pueden ser reservorios de *Listeria* spp. pero la mayor prevalencia se encuentra en ardillones, dichos hallazgos permiten ampliar el panorama de *Listeria* en ambientes naturales y antropizados.

Palabras clave: *Listeria*, ardillones, tlacuaches.

Summary

Listeria spp. is the causal agent of Listeriosis, a rare high mortality foodborne disease. This bacterium has been reported to be disseminated by contaminated food and reservoirs like rodents, birds, livestock and pets. To the date it is unknown if rock squirrel (*Otospermophilus variegatus*) and opossum (*Didelphis virginiana*) are reservoirs of this bacterium. The aims of this study were to identify and estimate the prevalence of *Listeria* spp. for both specimens. For this study, rectal samples from two areas were collected from opossums: urban area (University town) and periurban area (Zibatá), while rock squirrel's samples were collected only in urban area (Alameda Hidalgo park). *Listeria* spp. were identified by amplification of the *prfA* gene and the *prs* gene by PCR. Additionally, selective isolation of *Listeria* spp. from frozen pre-enrichments in glycerol were carried out on PALCAM agar supplemented with Ceftazidime pentahydrate (15 µg /ml), the isolated colonies were identified by 16S ribosomal region sequencing. Of the total 100 rectal samples from rock squirrels 43 % were found positive for *Listeria* spp. with the Lip1 and Lip2 primers (*prfA* gene) as well as 11 % with the Prs primers (*prs* gene). On the other hand, 36 rectal samples from opossums were analyzed (University town UAQ n=20; Zibatá n=16); 10.5 % were found positive for *Listeria* spp. with Lip1 and Lip2 while only 5.56 % were positive with Prs. The isolates were not identified as *Listeria* spp., then this bacterium couldn't be obtained. In conclusion, both specimens can be reservoirs of *Listeria* spp., but the prevalence of *Listeria* in rock squirrels is bigger; these findings enlarge the outlook of *Listeria* in natural and anthropized environments.

Key words: *Listeria*, rock squirrels, opossums.

Dedicatoria

A mis padres Araceli Vera Ibarra e Ismael Molina Andrade, a mi hermano Luis Alejandro Molina Vera y mi abuela María de Jesús Andrade.

A la Rosa del cielo... donde quiera que esté.

Agradecimientos

Primeramente, quisiera agradecer a mi familia; mis padres, mi hermano y mis abuelas quienes fueron el punto más fuerte de apoyo durante el desarrollo de este trabajo y durante toda mi vida. A mi mamá quien siempre estuvo apoyándome e impulsándome con el ejemplo. A mi papá que siempre estuvo a pie del cañón y me sacó adelante a cualquier costo. Gracias Negro por hacerme reír, acompañarme y soportarme con la luz encendida aún a las 3 am. Mil gracias.

Quiero agradecer a mi tía Verónica Andrade quien fue la principal impulsora de mi carrera.

Agradezco de todo corazón a la Dra. Margarita Teresa de Jesús García Gasca por creer en mí y darme esta oportunidad, sin usted yo no estaría aquí.

A mi directora de tesis, la Dra. Andrea Margarita Olvera Ramírez y al Dr. Carlos Alberto López González por brindarme la oportunidad de trabajar en su proyecto de fauna urbana, por financiar parte de mi proyecto y por sus consejos. Quiero agradecer a todos los gigantes que sembraron la semilla de la ciencia a lo largo de mi carrera; el Dr. Juan Campos Guillén, por darme un lugar en su laboratorio, a la M. en C. Xóchitl Pastrana por sus enseñanzas y las risas que acompañaban el día a día en el laboratorio, al M. en C. Julio Alfonzo Cruz por sus enseñanzas y tips. Al Dr. Sergio Romero por todas sus enseñanzas y consejos, al Dr. Carlos Saldaña por mostrarme el maravilloso mundo de la biofísica y los canales iónicos. Especialmente quisiera agradecer a la Dra. Angelina Rodríguez Torres, quien además de ser mi sinodal fue mi tutora académica, me dio invaluable consejos. Muchas gracias a todos.

A mis amigos (Por orden de aparición) Andrés Córdoba, Jorge Cortes, Ángelo Luna, Luz Salas, Karina Juárez, Citlalli Limpens, Roxanna Layseca, Iván Corona por ser incondicionales, por su cariño, su apoyo y su bullying. A Goku de quien seguí un modelo de vida de nunca rendirse, aun cuando parezca imposible y ser más fuerte cada vez, que con cada derrota se puede regresar más fuerte que nunca.

A mis compañeros de laboratorio, Gaby Arteaga por su invaluable ayuda en las capturas, y a Xiao, Elsa, Luisa, Neri quienes hicieron mi tiempo en el laboratorio muy agradable. Además quiero agradecer a la MC. Susana Sosa por su apoyo técnico en el laboratorio.

Al Municipio de Querétaro, institución que financió el proyecto “Abundancia de ardillones (*Otospermophuillus variegatus*) y su potencial de riesgo en la salud pública en la “Alameda Hidalgo”, del cual deriva esta tesis.

Por último quiero agradecer a la Universidad Autónoma de Querétaro, mi alma mater; la Facultad de Ciencias Naturales y a la Licenciatura en Microbiología por sustentar mis estudios.

Índice	
Resumen	3
Summary	4
Dedicatoria	5
Agradecimientos	6
Lista de abreviaturas	12
1. Introducción	16
2. Revisión bibliográfica	18
2.1 Enfermedades transmitidas por alimentos.....	18
2.1.2 Generalidades.....	18
2.1.3 Agentes causales de las ETAs.	21
2.1.4 Epidemiología descriptiva.	22
2.2 Listeriosis.....	22
2.2.1 Generalidades.....	22
2.2.2 Epidemiología.	23
2.2.3 Diagnóstico.	23
2.3 <i>Listeria</i> spp.....	25
2.3.1 Generalidades.....	25
2.3.2 Taxonomía.....	26
2.3.3 Genoma.	27
2.3.4 Factores de virulencia.....	29
2.3.5 Genes clave en la patogenia de <i>Listeria</i>	30
2.3.6 Mecanismo molecular de infección.....	32
2.3.7 Reservorios.....	35
2.4 Tlacuaches.....	36
2.4.1 Generalidades.....	36
2.4.2 Clasificación Taxonómica.	36

2.4.3 Hábitat.	37
2.4.4 Alimentación y tracto gastrointestinal.....	37
2.5 Ardillones.	38
2.5.1 Generalidades.....	38
2.5.2 Clasificación taxonómica	38
2.5.3 Hábitat.	39
2.5.4 Alimentación y tracto gastrointestinal.....	39
3. Justificación	41
4. Hipótesis	42
5. Objetivos	42
6. Metodología	43
6.1 Muestreo.	43
6.1.1 Consideraciones bioéticas.	43
6.1.2 Medidas de seguridad e higiene.	43
6.1.3 Manejo y captura.	43
6.1.4 Toma de muestras rectales.	44
6.2 Procesamiento de las muestras de ardillones y tlacuaches.....	44
6.2.1 Pre-enriquecimiento.....	44
6.2.2 Extracción de ácidos nucleicos.....	45
6.2.3 Detección molecular de <i>Listeria</i> spp. por PCR.	45
6.2.4 Visualización de productos de PCR en geles de Agarosa.	47
6.2.5 Secuenciación de ácidos nucleicos y análisis.....	48
6.2.5 Aislamiento selectivo de <i>Listeria</i> spp.	48
6.2.6 Identificación molecular de aislamientos de <i>Listeria</i> spp.	49
6.3 Análisis estadístico.	49
7. Resultados	50
7.1 Estandarización de PCR.	50

7.2 Prevalencia de <i>Listeria</i> spp.	52
7.2.1 Ardillones.	54
7.2.2 Tlacuaches	55
7.3 Aislamiento microbiológico.....	57
7.4 Factores de riesgo	57
7.5 Validación de las pruebas	60
8. Discusión	61
9. Conclusiones	67
Referencias	68
Apéndice	86
Apéndice 1. Carta de aceptación del comité de Bioética de la FCN, UAQ.	86
Apéndice 2. Estandarización de las reacciones de PCR.	87
Apéndice 3. Visualización de productos de PCR en geles de agarosa correspondientes a Tlacuaches (<i>Didelphis virginiana</i>).	92
Apéndice 4. Visualización de productos de PCR en geles de agarosa correspondientes a Ardillones (<i>Otospermophilus variegatus</i>)	95
Apéndice 5. Resultados de secuenciación.	105

Índice de cuadros

Cuadro 1. Normas Oficiales Mexicanas relacionadas a la inocuidad alimentaria.....	20
Cuadro 2. Características genéticas de las especies del género <i>Listeria</i>	28
Cuadro 3. Factores de virulencia involucrados en la patogenia de <i>Listeria</i>	31
Cuadro 4. Oligonucleótidos utilizados en este trabajo para la detección de <i>Listeria</i> spp.	46
Cuadro 5 Comparación estadística entre oligonucleótidos utilizados.....	54
Cuadro 6. Factores de riesgo asociados a la prevalencia de <i>Listeria</i> spp.....	59

Índice de Figuras

Figura 1. Agares selectivos para el aislamiento de <i>Listeria</i> spp.	25
Figura 2. Mapa filogenético de las especies <i>sensu stricto</i> y <i>sensu lato</i> de <i>Listeria</i>	27
Figura 3. Adquisición de la isla de patogenicidad 1 de <i>Listeria</i> (LIPI-1)	30
Figura 4. Ciclo infeccioso de <i>Listeria monocytogenes</i>	34
Figura 5. Representación del tracto gastrointestinal de ardilla y tlacuache	40
Figura 6. Parámetros de corrida para la PCR.....	47
Figura 7. Estandarización de PCR	51
Figura 8. Prueba de sensibilidad	52
Figura 9. Estandarización de PCR.	53
Figura 10. Resultados de PCR por cuadrantes.	55
Figura 11. Resultados de PCR con Lip1 y Lip2 para <i>Listeria</i> spp.....	56
Figura 12. Resultados de PCR con Prs para <i>Listeria</i> spp.	56
Figura 13. Aislamiento selectivo para <i>Listeria</i> spp.....	57
Figura 14. Gráficos de validación.	60

Lista de abreviaturas

Abreviatura	Significado
ETAs	Enfermedades transmitidas por alimentos.
OMS	Organización Mundial de la Salud.
spp.	Término referido a todas las especies de un mismo género.
UAQ	Universidad Autónoma de Querétaro.
FDA	Administración de Alimentos y Drogas
SAGARPA	Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación.
COFEPRIS	Comisión Federal para la Protección contra Riesgos Sanitarios.
SALUD	Secretaria de Salud.
CDC	Centro de Control y Prevención de Enfermedades.
µg	Microgramo.
Kg	Kilogramo.
µl	Microlitro.
SINAVE	Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica.
Fe(III)	Ion férrico.
ADN	Ácido desoxirribonucleico.
ARN	Ácido ribonucleico.

PCR	Reacción en cadena de la Polimerasa.
ELISA	Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas.
mPCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa Múltiple.
Mpb	Mega pares de bases.
ARNt	Ácido ribonucleico de transferencia.
%GC	Porcentaje de Guanina y Citosina.
Serovar	Serovariedad.
Subsp.	Sub especie.
pH	Potencial de hidrógeno.
LIPI-1	Isla de patogenicidad 1 de <i>Listeria</i> .
LIPI-2	Isla de patogenicidad 2 de <i>Listeria</i> .
ARNt ^{arg}	Ácido ribonucleico de transferencia de arginina.
SD	Secuencia Shine-Dalgarno.
Gen <i>prfA</i>	PrfA (Factor regulador positivo A).
Gen <i>actA</i>	ActA (Proteína inductora de ensamblaje de actina).
Gen <i>hly</i>	LLO (Listeriolisina O).
Gen <i>inIA</i>	InIA (Internalina A).
Gen <i>inIB</i>	InIB (Internalina B).
Gen <i>inIC</i>	InIC (Internalina C).
Gen <i>plcA</i>	PlcA (Fosfatidilinositol fosfolipasa C).
Gen <i>mpl</i>	Mpl (Precursor zinc Metaloproteasa).
Gen <i>bsh</i>	Hidrolasa biliar.
Gen <i>OpuC</i>	Transportador de osmolitos.
Gen <i>InIA</i>	Internalina A.

Gen <i>InIB</i>	Internalina B.
Gen <i>InIC</i>	Internalina C.
<i>Crp-Fnr</i>	Factor de transcripción con dominios Crp (Proteína receptora de AMP cíclico) y Fnr (proteína reguladora de la fumarato y nitrato reductasa).
Gen <i>plcB</i>	PlcB (Fosfatidilcolina fosfolipasa C).
Gen <i>htp</i>	Htp (Proteína transportadora de hexosa fosfato).
GAD	Glutamato descarboxilasa.
GABA	Ácido gamma-aminobutírico.
H+	Ion hidronio.
CO ₂	Dióxido de carbono.
OppA	Proteína A de unión a oligopéptidos.
BiIE	Proteína de exclusión biliar.
GAGs	Glicosaminoglicanos.
Met	Receptor del factor de crecimiento de hepatocito.
M	Metro.
Mg	Miligramo.
AP	Agua Peptonada.
LB	Luria Bertani.
Rpm	Revoluciones por minuto.
TS	Tripticasa de soya.
Tm	Temperatura de alineamiento o de fusión.
GI	Gados de libertad.
Sig.	Significancia estadística.
C.	Cuadrante.
CD.	Cuadrante desconocido.
OR	Odds Ratio (Razón de momios).
NA	No aplica.
Pb	Pares de bases.

Kpb	Kilopares de bases.
Cbp.	Cuanto baste para.
Vf.	Volumen final.
pPCR	PCR cuantitativa.
ΔG	Energía libre de Gibbs
LAMP	Loop-mediated isothermal amplification
pg	Picogramos

1. Introducción

Las enfermedades transmitidas por alimentos (ETAs) son una de las más grandes preocupaciones de la Organización Mundial de la Salud. Un reporte por la OMS estima que cada año 600 millones de personas alrededor del mundo se enferman por la ingesta de algún alimento contaminado, de las cuales 420 mil mueren como consecuencia (OMS, 2017). Estos datos son alarmantes ya que un tercio de las muertes registradas por ETAs corresponden a infantes menores de 5 años de edad (WHO, 2015).

En México se han reportado alrededor de 25,000 casos de intoxicación alimentaria bacteriana en el 2016 de los cuales se desconoce cuáles están directamente relacionados con *Listeria* (Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica, 2017), mientras que en otros países como Estados Unidos, tan solo en dos años (del 2014 al 2016) se tienen reportes de 68 casos confirmados de listeriosis en diferentes estados relacionados con el consumo de vegetales y manzanas con caramelo (Angelo *et al.*, 2017; Burall *et al.*, 2017).

Estudios recientes han demostrado que *Listeria* spp. puede ser aislada de agua, suelo, (Ahlstrom *et al.*, 2018) incluso pueden ser transmitidas por vectores como hormigas (Máximo *et al.*, 2014), así mismo se ha encontrado que en heces existe una gran carga bacteriana del género *Listeria*, por lo que la listeriosis puede ser transmitida por zoonosis (Mohammed *et al.*, 2009; Whitfield *et al.*, 2017). Este punto es de gran importancia debido a que la gran mayoría de animales que conviven con el humano (perros, gatos, anfibios y reptiles) han demostrado ser hospederos de *Listeria* spp. y por lo tanto un potencial riesgo para la salud de humanos y animales de compañía (Dhama *et al.*, 2015). Sin embargo hay otros animales que también conviven con el humano y que hasta la fecha, no se sabe si estos hospedan al género *Listeria*, tales animales son los tlacuaches (*Didelphis virginiana*) y los ardillones (*Otospermophilus variegatus*). Estas dos especies se han tenido que adaptar a las adversidades de la antropización y destrucción de su hábitat natural. En la capital del estado de Querétaro se encuentra un parque llamado Alameda Hidalgo que es famoso por la gran cantidad de ardillones que alberga pese a la limitación de espacio, estos animales han sobrevivido gracias a los desperdicios y alimentos de consumo humano que se tiran dentro y en los alrededores del parque. A su vez, los tlacuaches se han desplazado a las zonas marginales de la capital del estado, por lo que las zonas residenciales como Zibatá, El cimatarío, Juriquilla, entre otros más han visualizado una gran cantidad de tlacuaches. Estos animales también pueden consumir restos alimenticios. Hasta la fecha

no hay reportes de la presencia de bacterias del género *Listeria* en ninguno de los dos especímenes. Por esta razón es importante averiguar si alguno de estos animales que conviven tan cerca del humano porta las especies patógenas de *Listeria* (*L. monocytogenes* y *L. ivanovi*).

2. Revisión bibliográfica

2.1 Enfermedades transmitidas por alimentos.

2.1.2 Generalidades.

Enfermedad transmitida por alimentos (ETAs) se define como todo aquél padecimiento directamente relacionado con el consumo de alimentos contaminados con microorganismos patógenos o algún químico tóxico. La Organización Mundial de la Salud (OMS o WHO por sus siglas en inglés) ha catalogado a las ETAs como una de las causas más importantes de mortalidad a nivel mundial, puesto que la contaminación de productos alimenticios puede ocurrir en cualquiera de las fases de producción, desde la elaboración o recolección, hasta el almacenaje (refrigeración, anaquel o congelación) del producto. Así mismo, se menciona que la mayoría de las contaminaciones en los alimentos se deben a la manipulación del alimento antes del consumo, es decir durante la preparación del alimento, ya sea en el hogar o en algún establecimiento (WHO, 2016).

Aproximadamente cerca de 250 agentes son los causales de estas enfermedades, de los cuales los más relevantes abarcan los géneros bacterianos como *Salmonella* (Jackson *et al.*, 2013), *Escherichia* (T. F. Jones y Yackley, 2018) y *Campylobacter* (Gu *et al.*, 2018), los hongos productores de Aflatoxinas, los Norovirus y los parásitos del género *Taenia*. Así mismo, otros microorganismos menos prevalentes pero de gran importancia son *Listeria monocytogenes*, *Vibrio cholerae*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Shigella*, *Staphylococcus aureus*, *Clostridium botulinum* y *Clostridium perfringens*, *Bacillus cereus*, *Cryptosporidium* y Virus de la Hepatitis A (FDA, 2018).

La organización mundial de la salud (WHO por sus siglas en inglés) sostiene que dichas enfermedades constituyen uno de los más importantes temas de salud pública global, destacando que los grupos de riesgo para estas enfermedades está conformado por recién nacidos, niños menores de 12 años, mujeres embarazadas y adultos mayores. Los casos de enfermedades diarreicas en estos grupos de riesgo ascienden a cientos de miles anualmente. En México las organizaciones que se encargan de monitorear y atender las ETAs (desde su prevención hasta su tratamiento) son la Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA), la Comisión Federal para la Protección contra Riesgos Sanitarios (COFEPRIS) y la Secretaría de Salud (SALUD); en conjunto se encargan de regular la calidad de los alimentos importados y exportados.

La inocuidad de alimentos en México está regulada por una serie de Normas que determinan la calidad y las medidas preventivas para su manejo y preparación (**Cuadro 1**), dichas normas están publicadas en el Diario Oficial de la Federación.

Las ETAs en general presentan cuadros clínicos similares, el desarrollo de la enfermedad puede tomar distintos niveles de gravedad o simplemente pasar desapercibida. En su mayoría los microorganismos causales de ETAs desencadenan síntomas como diarrea, dolor estomacal, vómito e incluso fiebre. Dependiendo de la causa de intoxicación, el cuadro clínico puede cambiar a diarreas con sangre, fiebre de más de 38 °C, visión borrosa, escalofríos y en algunos casos la muerte (CDC, 2017).

Cuadro 1. Normas Oficiales Mexicanas relacionadas a la inocuidad alimentaria.

Norma	Nombre	Status
NOM-251-SSA1-2009	Prácticas de higiene para el proceso de alimentos, bebidas o suplementos alimenticios.	Vigente
NOM-247-SSA1-2008	Productos y servicios. Cereales y sus productos. Cereales, harinas de cereales, sémolas o semolinas. Alimentos a base de: cereales, semillas comestibles, de harinas, sémolas o semolinas o sus mezclas. Productos de panificación. Disposiciones y especificaciones sanitarias y nutrimentales. Métodos de prueba	Vigente
NOM-243-SSA1-2010	Productos y servicios. Leche, fórmula láctea, producto lácteo combinado y derivados lácteos. Disposiciones y especificaciones sanitarias. Métodos de prueba.	Vigente
NOM-242-SSA1-2009	Productos y servicios. Productos de la pesca frescos, refrigerados, congelados y procesados. Especificaciones sanitarias y métodos de prueba.	Vigente
NOM-213-SSA1-2002	Productos y servicios. Productos cárnicos procesados. Especificaciones sanitarias. Métodos de prueba.	Vigente
NOM-187-SSA1/SCFI-2002	Productos y servicios. Masa, tortillas, tostadas y harinas preparadas para su elaboración y establecimientos donde se procesan. Especificaciones sanitarias. Información comercial. Métodos de prueba.	Vigente
NOM-186-SSA1/SCFI-2013	Cacao, chocolate y productos similares, y derivados del cacao. Especificaciones sanitarias. Denominación comercial. Métodos de prueba.	Vigente
NOM-159-SSA1-1996	Bienes y Servicios. Huevo, sus productos y derivados. Disposiciones y especificaciones sanitarias.	Vigente
NOM-092-SSA1-1994	Método para la cuenta de bacterias aerobias en placa.	Vigente
NOM-110-SSA1-1994	Bienes y servicios. Preparación y dilución de muestras de alimentos para su análisis microbiológico.	Vigente
NOM-112-SSA1-1994	Bienes y servicios. Determinación de bacterias coliformes. Técnica del número más probable.	Vigente
NOM-113-SSA1-1994	Bienes y servicios. Método para la cuenta de microorganismos coliformes totales en placa.	Vigente
NOM-114-SSA1-1994	Bienes y servicios. Método para la determinación de Salmonella en alimentos.	Vigente
NOM-115-SSA1-1994	Bienes y servicios. Método para la determinación de Staphylococcus aureus en alimentos.	Vigente
NOM-143-SSA1-1995	Bienes y servicios. Método de prueba microbiológico para alimentos. Determinación de <i>Listeria monocytogenes</i> .	Vigente
NOM-111-SSA1-1994	Bienes y servicios. Método para la cuenta de mohos y levaduras en alimentos.	Vigente

Tomado sin modificación de: <http://www.cofepris.gob.mx/MJ/Paginas/NormasPorTema/Alimentos.aspx>

2.1.3 Agentes causales de las ETAs.

La incidencia de las ETAs se ha mantenido en un nivel constante a lo largo de los últimos años, es decir el número de casos nuevos anuales de estas enfermedades se mantiene año con año. Dentro de los microorganismos más comunes que provocan estas enfermedades están las bacterias; debido a su alta tasa de reproducción y metabolismo permiten que los alimentos entren en estado de putrefacción en cuestión de días e incluso horas, por lo cual el consumo de un alimento contaminado puede fácilmente desarrollar síntomas.

La salmonelosis es una de las ETAs más importantes a nivel mundial cuyos dos principales exponentes son *Salmonella enterica* subespecie *enterica* serovariedad *typhimurium*, causante de 153 millones de casos anuales (Parisi *et al.*, 2018) y *Salmonella enterica* serovariedad typhi es una de las bacterias causantes de la fiebre tifoidea llegando a registrar 21.6 millones de casos anualmente (Hiyoshi *et al.*, 2018). Las disposiciones generales para su control en México están bien definidas por la NOM-114-SSA1-1994 y la NOM-210-SSA1-2014 (**Cuadro 1**). Las serovariedades de *Salmonella enterica* se agrupan en dos: tifoideas (Typhi, Paratyphi A/B/C) y no tifoideas; tanto las serovariedades tifoideas como no tifoideas pueden ser transmitidas por alimentos contaminados con materia fecal o agua contaminada. Aquellas personas infectadas con las serovariedades tifoideas suelen presentar fiebre tifoidea así como síntomas inespecíficos como dolores musculares, náusea, diarrea (algunas veces con sangre), bacteriemia y en ocasiones salpullido. Así mismo, las serovariedades no tifoideas se caracterizan por causar cuadros clínicos leves en adultos mientras que en niños y adultos mayores suele ser más grave. El cuadro clínico abarca fiebres repentinas, problemas respiratorios, dolores musculares, diarreas y gastroenteritis (Crump *et al.*, 2015).

Las micotoxinas (toxinas producidas por hongos) son uno de los más grandes conflictos en la industria alimentaria, tal es el caso de la Aflatoxina B1, la cual es el mayor hepatocarcinógeno conocido (Kew, 2013), esta potente toxina producida por los hongos *Aspergillus flavus*, *Aspergillus nomius* y *Aspergillus parasiticus*. Estos hongos microscópicos son capaces de infectar semillas de trigo, centeno, maíz, cacahuate y algodón así como leche y carne a cualquier nivel de las fases de producción (Magnussen y Parsi, 2013). Debido a su amplia distribución y su fácil diseminación, se han implementado

medias de control para esta toxina en particular: Estados Unidos de América, África y América Latina establece un límite máximo de 20 µg/kg de Aflatoxina B1, mientras que países de la Unión Europea marcan el límite permitido en 4 µg/kg. En el caso de México, el mayor consumidor de maíz, no tiene grandes medidas de prevención ni regulación para esta toxina salvo a los límites establecidos en las importaciones de Estados Unidos. Así mismo no hay reportes que vinculen a esta toxina y el carcinoma hepatocelular en México (Guzmán-de-Peña y Peña-Cabriales, 2005).

2.1.4 Epidemiología descriptiva.

La OMS en el 2015 publicó la carga mundial de las enfermedades transmitidas por alimentos; los datos recopilados por la OMS mencionan que en la región de las Américas anualmente cerca de 77 millones de personas son víctimas de estas enfermedades, causando más de 11,000 fallecimientos como consecuencia. Dentro de los grupos de riesgo más afectados por estas enfermedades están los niños menores de 5 años, los cuales conforman el 43 % del total de enfermos llegando a registrar anualmente cerca de 2,000 fallecimientos a causa de las enfermedades transmitidas por alimentos (WHO, 2016).

Las ETAs constituyen uno de los mayores retos de salud pública a nivel mundial, en México el reto es aún mayor debido a la alta oferta y demanda de alimentos típicos preparados y vendidos a pie de calle en los llamados “Tianguis” (Mercado sobre ruedas) o en puestos establecidos cuyas medidas de higiene están muy por debajo o apenas cumplen con las normativas de higiene y salubridad. Además los reportes de listeriosis son muy escasos, no solo en México sino a nivel mundial debido a la sintomatología tan similar a otras ETAs.

2.2 Listeriosis.

2.2.1 Generalidades.

La listeriosis es una enfermedad poco frecuente con una alta mortalidad, su agente causal es la bacteria *Listeria monocytogenes* y en raros casos *L. innocua* y *Listeria ivanovii*. La *Listeria* es un microorganismo extensamente distribuido (aguas residuales, suelos, plantas, animales, etc.) y comúnmente asociado a productos alimenticios derivados de la

industria quesera y cárnica (Tovar Pérez *et al.*, 2005). Esta enfermedad suele presentarse en grupos de riesgo tales como en mujeres embarazadas, adultos mayores, recién nacidos y personas inmunodeprimidas. Las formas clínicas que presenta la listeriosis abarca diversas patologías dependiendo de la localización de la bacteria en el organismo; dichos síntomas se agrupan en dos tipos, Invasiva y no invasiva. Aquellas patologías referentes a la forma invasiva abarcan bacteriemias, meningitis (Pagliano *et al.*, 2017), endocarditis (Kumaraswamy *et al.*, 2018), peritonitis (Espinoza Gómez *et al.*, 2006), secuelas post-parto en recién nacidos e incluso muerte fetal (Fouks *et al.*, 2017). Por otro lado, la forma no invasiva es la más común llegando a presentar diarrea febril (Sánchez Artola y Palencia Herrejón, 2010). Estas características hacen a la listeriosis un problema de salud pública cuyos controles para su prevención están rigurosamente establecidos en México bajo la norma oficial mexicana NOM-143-SSA1-1995 y la NOM-210-SSA1-2014 e internacionalmente por la ISO 11290-1:2017.

2.2.2 Epidemiología.

Al día 29 de junio del año 2018, se han reportado varios brotes de Listeriosis asociada al consumo de alimentos contaminados alrededor del mundo siendo Sudáfrica el país con mayor incidencia (647 casos con 183 fallecimientos) seguido de la Unión Europea (79 casos con 15 fallecimientos) y Estados Unidos (8 casos con 2 fallecimientos) (ECDC, 2018; ProMED-mail, comunicación personal, 1 de Enero – 6 de Abril del 2018).

En México, los datos referentes a la Listeriosis son escasos debido a la desinformación y al mal diagnóstico de la enfermedad. De acuerdo con los datos proporcionados en el boletín epidemiológico del Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica (SINAVE), hasta la semana epidemiológica 12 del 2018 se han reportado 6,002 casos de intoxicaciones alimentarias bacterianas y 964,237 casos de infecciones intestinales por Otros organismos y mal definidas (Secretaría de Salud, 2018).

2.2.3 Diagnóstico.

La listeriosis es comúnmente causada por la especie *L. monocytogenes*, el diagnóstico de esta enfermedad se basa únicamente en el aislamiento del agente causal a partir de una muestra sanguínea, líquido cefalorraquídeo o líquido amniótico. (Matanock *et*

al., 2015). El agar selectivo PALCAM y Oxford (**Figura 1**) son dos de los más utilizados para la identificación de *Listeria*, en ambos medios las colonias de *Listeria* adquieren una coloración gris a verde rodeada de un halo negro producto de la degradación de la Esculina a Esculetina y Glucosa en presencia de Fe(III) (Van Netten *et al.*, 1989).

Las pruebas moleculares para la detección de *L. monocytogenes*, *L. innocua* y *L. ivanovii* se basan en la detección de ácidos nucleicos como ADN o ARN, así como en la detección de antígenos de superficie, lo cual permite no solo identificar a nivel de especie al agente causal sino también la serovariedad. Las principales técnicas moleculares empleadas en la detección son la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), Ensayo por inmunoadsorción ligado a enzimas (ELISA) y biosensores.

Una de las pruebas de detección más desarrolladas es la PCR; una de sus variantes es la PCR múltiple (mPCR) la cual permite utilizar 2 o más pares de oligonucleótidos para detectar diversos blancos moleculares los cuales pueden ser regiones conservadas del genoma bacteriano, regiones híper variables, factores de virulencia, linajes moleculares, e inclusive distinguir entre organismos de diferente especie o subespecie (Edwards y Gibbs, 1994). Con el paso de los años y el avance de la tecnología se desarrollaron nuevas metodologías basadas en la PCR las cuales no solo incrementaban las ventajas y disminuían costos, sino que se adecuaron a las necesidades de los laboratorios e inclusive al trabajo de campo.

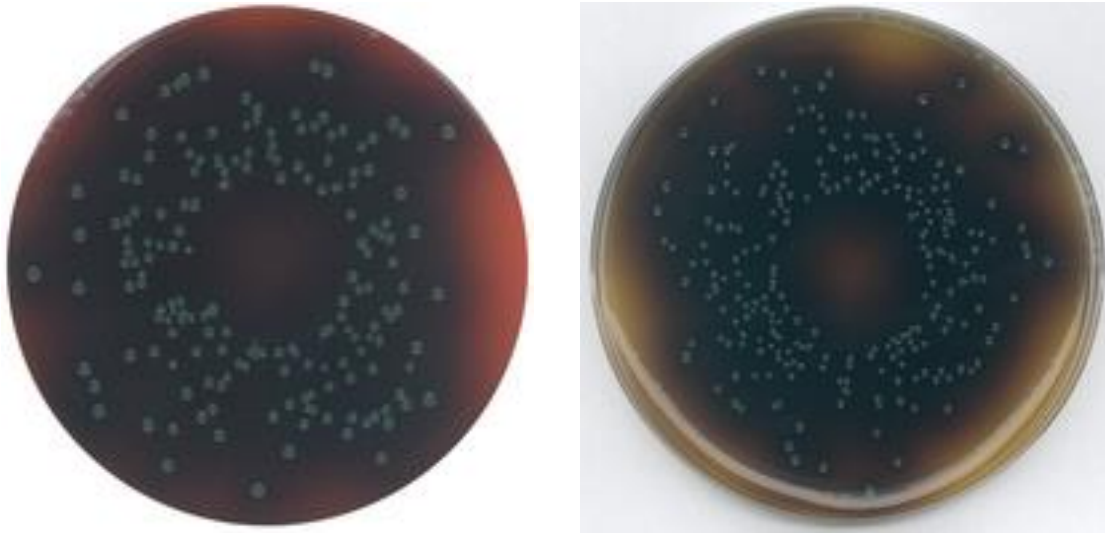


Figura 1 Agares selectivos para el aislamiento de *Listeria spp.*

Nótese la coloración verdosa con halo negro característico de las colonias de *Listeria*. Izquierda Agar PALCAM; derecha Agar Oxford. Tomado de: https://www.merckmillipore.com/MX/es/product/PALCAM-Listeria-Selective-agar-Base,MDA_CHEM-111755 http://www.merckmillipore.com/MX/es/product/Oxford-Listeria-Selective-Agar-Base,MDA_CHEM-107004

2.3 *Listeria* spp.

2.3.1 Generalidades.

El primer registro referente a *Listeria* data del año 1926 cuando E. G. D. Murray, Webb, y Swann aíslan por primera vez una bacilo muy corto Gram positivo causante de varias muertes en conejos de laboratorio, esta bacteria no tenía similitud con ningún género bacteriano conocido hasta la fecha, por lo cual catalogó a este patógeno como *Bacterium monocytogenes*. No fue hasta que J. H. H. Pirie en 1940 le diera el nombre al género *Listeria* (En honor al célebre cirujano Joseph Lister) a las bacterias con forma de bacilos Gram positivos, catalasa positivos.

Durante los casi 100 años desde su descubrimiento, *Listeria monocytogenes* ha causado miles de muertes alrededor del mundo, debido a su fácil diseminación y ubicuidad alrededor del mundo; *Listeria* spp. pasó a convertirse en un problema de salud pública siendo los alimentos el principal foco de infección.

Listeria es una bacteria Gram positiva, anaerobia facultativa, no formadora de endosporas. Debido a su gran capacidad de resistencia es capaz de desarrollarse en temperaturas desde 4 °C hasta 40 °C además de resistir la salinidad y la acidez (Madigan *et al.*, 2009). Morfológicamente las colonias de *Listeria* suelen ser pequeñas (1-2 mm de diámetro) y es capaz de sobrevivir durante largos periodos en superficies inertes como suelo o rocas, sin embargo se ha aislado mayoritariamente en heces de rumiantes (Griffiths, 2003).

2.3.2 Taxonomía (ITIS, 2018).

Phylum: Firmicutes

Clase: Bacilli

Orden: Bacillales

Familia: *Listeriaceae*

Género: *Listeria*

En la actualidad se conocen 18 especies de *Listeria*. *L. monocytogenes*, *L. innocua*, *L. ivanovii*, *L. seeligeri*, *L. welshimeri* y *L. marthii* son consideradas como especies *sensu stricto* dentro del género *Listeria* (Volokhov, *et al.*, 2002); por otra parte *L. aquatica*, *L. booriae*, *L. cornellensis*, *L. costaricensis*, *L. grayi*, *L. fleischmannii*, *L. floridensis*, *L. grandensis*, *L. newyorkensis*, *L. rocourtiae*, *L. riparia* y *L. weihenstephanensis* son catalogadas como especies *sensu lato* (Núñez-Montero *et al.*, 2018a; Orsi y Wiedmann, 2016; Volokhov *et al.*, 2002). Dicha agrupación se basa en la semejanza genética y bioquímica de estas especies respecto a *L. monocytogenes* (**Figura 2**); por lo tanto las especies *sensu stricto* son capaces de crecer a temperaturas bajas, tienen motilidad dependiente de temperatura, además de ser catalasa positivos e incapaces de reducir el nitrito en nitrato, mientras que las especies *sensu lato* no muestran alguna(s) de estas características (Henk C. den Bakker *et al.*, 2014).

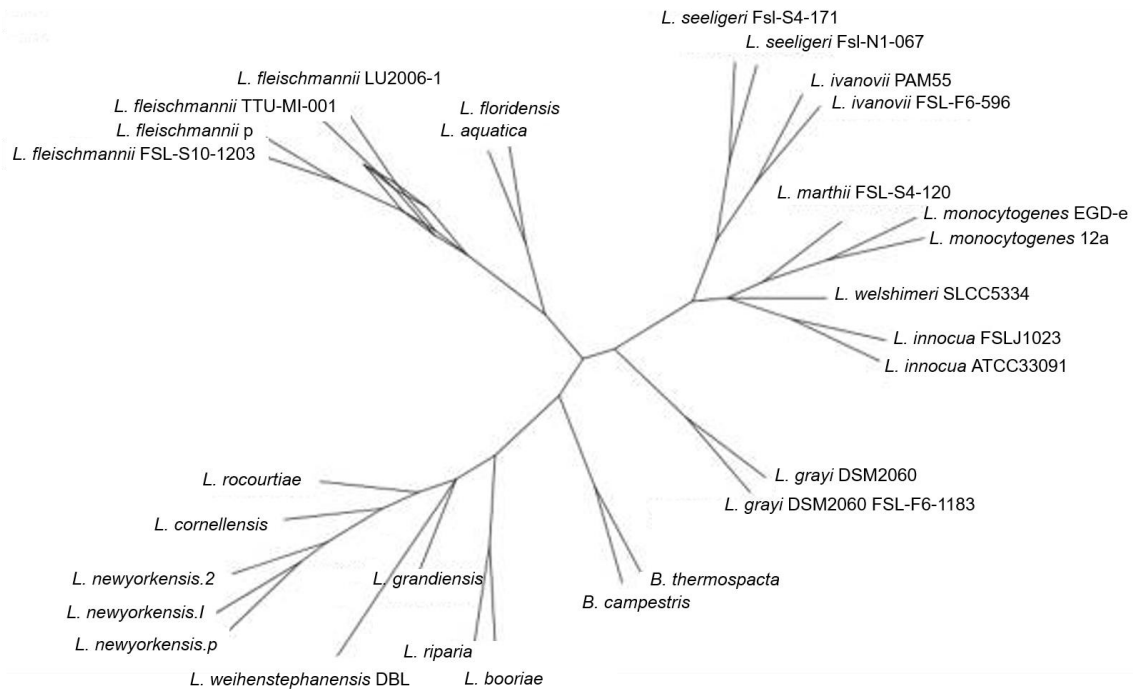


Figura 2 Mapa filogenético de las especies *sensu stricto* y *sensu lato* de *Listeria*. Tomado de Chiara *et al.* (2015)

2.3.3 Genoma.

Listeria monocytogenes es la especie más estudiada del género, esta especie alberga un genoma relativamente corto de 3 Mpb, el cual se encuentra altamente conservado entre las distintas especies (**Cuadro 2**), así mismo su genoma cuenta con aproximadamente 2,800 genes codificantes y 53 genes de ARNt (Casey *et al.*, 2015). Las diferencias entre cada una de las especies que comprende el género *Listeria* puede llegar a ser mínima, dentro de las cuales se pudieran encontrar desde genes de multiresistencia a drogas hasta plásmidos. Un punto a recalcar es que el genoma mantiene diversos mecanismos de evolución genética, siendo los elementos móviles (Transposones) y loci hipervariables los principales precursores de variabilidad genética (Kuenne *et al.*, 2013), mientras que el mantenimiento de la longitud del genoma está dirigido por múltiples eventos de pérdida de genes, lo cual ha derivado en cepas menos virulentas. Estos eventos, en consecuencia han permitido la adaptación de las cepas a un estilo de vida saprofito, además la longitud del genoma se conserva entre 2.7 y 3.2 Mpb limitando la adquisición de nuevos genes (Henk C den Bakker, Cummings, *et al.*, 2010).

Cuadro 2. Características genéticas de las especies del género *Listeria*.

Nombre	Genoma en pb	% GC	Genes codificantes	Genes de ARN	Referencia/RefSeq
<i>Sensu stricto</i>					
<i>Listeria monocytogenes</i> EGD-e (serovar 1/2a)	2,944,528	39	2853	67	(Glaser <i>et al.</i> , 2001)
<i>Listeria innocua</i> CLIP 11262 (serovar 6a)	3,011,209	37	2973	66	(Glaser <i>et al.</i> , 2001)
<i>Listeria ivanovii</i> subsp. <i>ivanovii</i> PAM 55	2,928,879	36.9	2650	85	(Buchrieser <i>et al.</i> , 2011)
<i>Listeria seeligeri</i> serovar 1/2b SLCC3954	2,797,636	37.3	2710	85	(Steinweg <i>et al.</i> , 2010)
<i>Listeria welshimeri</i> serovar 6b SLCC5334	2,814,130	36.4	2774	84	(Hain <i>et al.</i> , 2006)
<i>Listeria marthii</i> FSL S4-120	2,884,550	36.8	2,963	ND	(den Bakker <i>et al.</i> , 2010)
<i>Sensu lato</i>					
<i>Listeria aquatica</i> FSL S10-1188	2,601,150	39.5	1976	60	NZ_AOCG00000000.1
<i>Listeria booriae</i> strain FSL A5-0281	3,436,960	42.1	3162	57	NZ_JNFA00000000.1
<i>Listeria cornellensis</i> FSL F6-0969 c18	3,347,830	41.9	2828	60	NZ_AODE00000000.1
<i>Listeria costaricensis</i>	ND	ND	ND	ND	(Núñez-Montero <i>et al.</i> , 2018b)
<i>Listeria grayi</i> DSM 20601	2,658,710	41.5	2453	52	NZ_ACCR00000000.2
<i>Listeria fleischmannii</i> subsp. <i>coloradonensis</i> subsp. nov	2,817,512	38.6	2923	50	(den Bakker <i>et al.</i> , 2013)
<i>L. floridensis</i> FSL S10-1187	2,794,390	41	2302	59	NZ_AODF00000000.1
<i>Listeria grandensis</i> FSL F6-0971 c2	3,181,730	42	2759	63	NZ_AODD00000000.1
<i>L. newyorkensis</i>	3.50696	43	3238	ND	(Weller <i>et al.</i> , 2015)
<i>Listeria rocourtiae</i> FSL F6-920 c6	3,216,750	40	2735	62	NZ_AODK00000000.1
<i>L. riparia</i> FSL S10-1204	3,291,040	41	2837	59	NZ_AODL00000000.1
<i>Listeria weihenstephanensis</i> FSL R9-0317	3,374,440	41	3,226	70	NZ_AODJ00000000.1

2.3.4 Factores de virulencia.

Listeria monocytogenes y *Listeria ivanovii* son los agentes etiológicos de la listeriosis en humanos y bovinos respectivamente. Los mecanismos de patogenicidad están regulados por diversos factores de virulencia, los cuales dependen de diversos estímulos para ser activados ya sea por temperatura, pH, entre otros.

Los factores de virulencia están codificados en el cromosoma bacteriano, específicamente se encuentran localizados en la Isla de patogenicidad 1 de *Listeria* (LIPI-1 por sus siglas en inglés), esta isla contiene a los genes *prfA*, *plcA*, *hly*, *mpl*, *actA* y *plcB*. Este conjunto de genes es conocido como Cluster genético *prfA* el cual codifica para funciones de movilidad intra e inter-celular, supervivencia en el interior de la célula huésped, β hemólisis, entre otras (den Bakker *et al.*, 2010). El cluster *prfA* se encuentra conservado en varias especies del género *Listeria*, entre las cuales se encuentran *L. monocytogenes*, *L. ivanovii*, *L. seeligeri* (Volokhov *et al.*, 2006). Las evidencias mostradas en los análisis genéticos sugieren que el ancestro común de *Listeria* adquirió en su cromosoma la isla de patogenicidad LIPI-1, que con el paso de los años fue divergiendo hasta llegar a especies que conservan la isla y otras más que no la poseen (**Figura 3**), una evidencia de esta teoría es la existencia de cepas de *L. innocua* que contienen la isla LIPI-1 capaces de reproducirse en el interior de células de mamífero in-vitro (Johnson *et al.*, 2004; Volokhov *et al.*, 2007).

L. ivanovii además de contener la isla LIPI-1, tiene una isla de patogenicidad extra llamada LIPI-2 la cual es especie-específica. Esta isla de patogenicidad contiene diez genes de la familia de las internalinas (i-inl E/F/G/H/I/J/B/K/L/B2) y un gen *smcL* (transcripcionalmente independiente de *prfA*), estos genes se encuentran flanqueados por un gen de ARN^t^{arg} al extremo 5' y un gen *ydel* al extremo 3'. La presencia de estos genes le confiere a *L. ivanovii* colonizar células con membranas ricas en Esfingomielina además de inducir apoptosis, mecanismo por el cual se hipotetiza la carencia de *L. ivanovii* para producir meningoencefalitis (Domínguez-Bernal *et al.*, 2006).

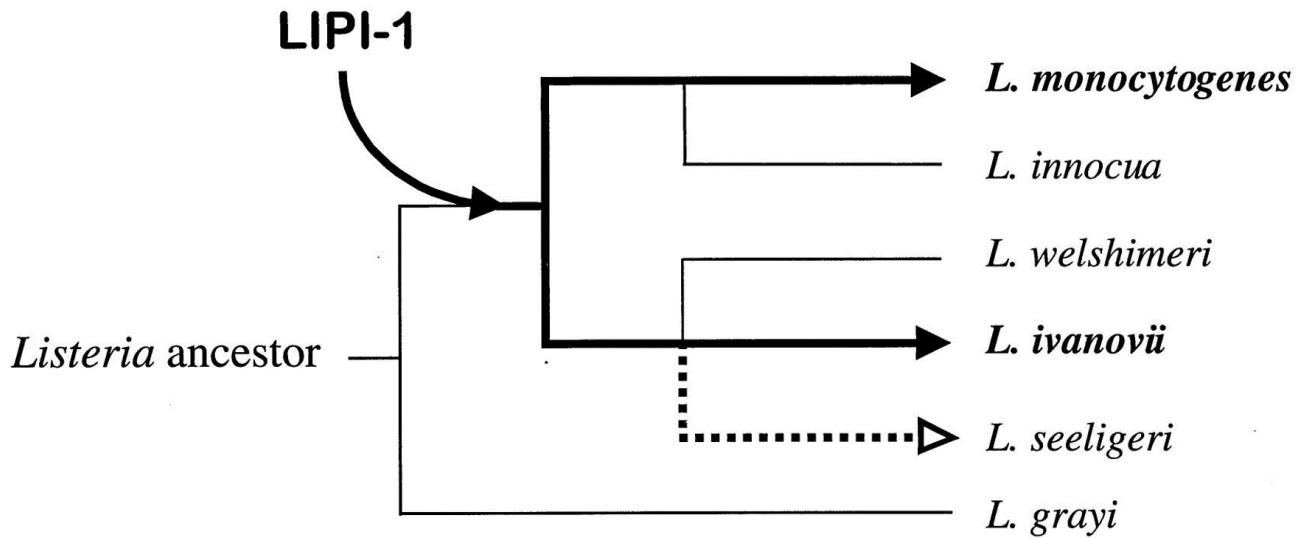


Figura 3 Adquisición de la isla de patogenicidad 1 de *Listeria* (LIPI-1). Tomado de Vázquez-Boland *et al.* (2001).

2.3.5 Genes clave en la patogenicidad de *Listeria*.

El cluster *prfA* contiene una batería de genes necesarios para la invasión, adherencia, replicación y diseminación de la bacteria en el huésped (**Cuadro 3**). Estos genes se encuentran regulados por el gen *prfA* el cual codifica para la proteína PrfA, un factor de transcripción de la familia Crp-Fnr (Portman *et al.*, 2017). Esta proteína activa 3 sets de genes dependiendo de la etapa de infección en la que se encuentre la bacteria; (i) InIA,B (Internalinas A y B) encargadas de la adhesión y reconocimiento de la célula huésped, (ii) LIPI-1 encargado de la diseminación y supervivencia en el fagosoma, (iii) InIC necesaria para la invasión de células vecinas (de las Heras *et al.*, 2011). La activación de la transcripción de estos genes está determinado por la temperatura, estudios recientes han descubierto que a bajas temperaturas (≤ 30 °C) la secuencia SD (Shine-Dalgarno) se ve obstruida por una estructura secundaria que impide su traducción, sin embargo, cuando la temperatura asciende a 37 °C, la estructura secundaria se desestabiliza y permite el reconocimiento de la secuencia SD a los ribosomas (Hamon *et al.*, 2006). PrfA es la proteína más importante en el proceso infeccioso de *Listeria*, si esta proteína se encuentra mutada (Mutación sin sentido, pérdida de sentido o con cambio de marco de lectura) la invasión no es posible y por lo tanto se traduce a una cepa no virulenta (Maury *et al.*, 2017).

La supervivencia de la bacteria en el estómago y el tracto gastrointestinal está directamente relacionada con el factor Sigma B (*sigB*), este es capaz de reconocer secuencias promotoras de diversos genes relacionados con la resistencia al pH, osmolaridad, temperatura, etanol, oxígeno e inclusive con el factor *prfA* (White *et al.*, 2015). El factor *sigB* regula directamente los genes *bsh* (Hidrolasa biliar) (Zhang *et al.*, 2011), *OpuC* (transportador de osmolitos) (Angelidis *et al.*, 2002; Sleator *et al.*, 2001), *inIA* e *InIB* (Kazmierczak *et al.*, 2003); además se ha descubierto que *sigB* es capaz de contribuir en la formación de biofilm (van der Veen y Abee, 2010).

Cuadro 3. Factores de virulencia involucrados en la patogenia de *Listeria*.

Gen	Proteína	Función
<i>prfA</i>	PrfA (Factor regulador positivo A)	Activador transcripcional
<i>actA</i>	ActA (Proteína inductora de ensamblaje de actina)	Motilidad intra-intercelular dependiente de actina, evasión de autofagia
<i>hly</i>	LLO (Listeriolisina O)	Formación de poro para escapar de la vacuola fagocítica
<i>inIA</i>	InIA (Internalina A)	Reconocimiento de E-cadherina
<i>inIB</i>	InIB (Internalina B)	Reconocimiento de HGF (Hepatocyte Growth Factor)
<i>inIC</i>	InIC (Internalina C)	Permite la invasión a células adyacentes
<i>plcA</i>	PlcA (Fosfatidilinositol fosfolipasa C)	Lisis del fagosoma
<i>mpl</i>	Mpl (Precursor zinc Metaloproteasa)	Procesa al precursor de la PlcB
<i>plcB</i>	PlcB (Fosfatidilcolina fosfolipasa C)	Lisis del fagosoma
<i>htp</i>	Htp (Proteína transportadora de hexosa fosfato)	Crecimiento en el interior de la célula huésped

Modificado de (Hadjilouka *et al.*, 2018; Mostowy y Cossart, 2012; Rajabian *et al.*, 2009; Vera *et al.*, 2013)

2.3.6 Mecanismo molecular de infección.

Una vez que *Listeria* ha sido ingerida mediante un alimento contaminado, el primer paso para la supervivencia de la bacteria es resistir el pH del estómago; el sistema GAD es el encargado de contrarrestar dichas condiciones mediante la descarboxilación de Glutamato a GABA, el cual es transportado fuera de la bacteria mediante un sistema de antiporters. Este proceso necesita iones H⁺ para el intercambio Glutamato:GABA, además de generar amonio y CO₂ (Cheng *et al.*, 2013; Cormac G. M. Gahan y Hill, 2014) (**Figura 4a**). Subsecuentemente al paso por el estómago, en el intestino delgado los niveles de pH cambian, así como las concentraciones de osmolitos tales como las sales biliares; estas moléculas son contrarrestadas mediante una serie de proteínas que permiten internalizar péptidos (OppA), sacar sales biliares (BilE) e hidrolizar bilis (Bsh) (**Figura 4b**) (Van der Veen y Abee, 2011).

El paso de *Listeria* por el tracto gastrointestinal le permite infectar células no fagocíticas. La bacteria es capaz de replicarse exitosamente en enterocitos, células M, hepatocitos, fibroblastos y neuronas. El proceso de invasión en células enterocíticas da comienzo mediante el reconocimiento de InIA e InIB con sus respectivos blancos moleculares en la membrana celular. En el caso de InIA, se une con una alta afinidad a la E-cadherina, mientras que la InIB se ancla al receptor Met (Receptor del factor de crecimiento de hepatocito) y a GAG (Glicosaminoglicanos) (Pizarro-Cerdá *et al.*, 2012). La interacción de las internalinas con sus respectivos receptores activa una serie de cascadas de señalización que repercuten en la endocitosis mediada por clatrina (Cossart y Toledo-Arana, 2008). Si bien ambas internalinas son utilizadas para la internalización de la bacteria, entre ellas existen diferencias que les permiten actuar en diferentes circunstancias; la especificidad de InIA por unirse a la E-cadherina permite que *Listeria* sea capaz de atravesar la membrana de la placenta, siendo los sincitiotrofoblastos y los citotrofoblastos las células blanco (Seveau *et al.*, 2007). Por otra parte, se ha observado que InIB es necesaria para la invasión de diversos tipos celulares, además de que esta proteína puede existir de manera no anclada a la pared celular de la bacteria. InIB soluble es capaz de interactuar con el receptor Met y con componentes de la matriz extra celular como GAGs,

la interacción de InIB con sus dos tipos de receptores propicia un efecto sinérgico el cual eficientiza la invasión de *Listeria* en las células (Jonquières *et al.*, 2001).

El escape del endosoma es un proceso regulado por *prfA*, durante el proceso de endocitosis, la temperatura y el pH del microambiente en el que se encuentra la bacteria propicia la activación de los genes *hly*, *plcA* y *plcB*. El gen *hly* codifica para la listeriolisina O (LLO); los monómeros de esta proteína se anclan a la membrana del endosoma formando un poro que permite la liberación de la bacteria al citosol de la célula. Así mismo, *PlcB* y en menor medida *PlcA* son sintetizadas para lisar la membrana del endosoma y permitir la liberación de la bacteria al citosol (Kayal y Charbit, 2006). Cuando la bacteria es liberada del endosoma, prolifera en el interior celular dividiéndose y activando el gen *atcA*, este gen codifica para la proteína inductora de ensamblaje de actina (*ActA*); esta proteína se encuentra en el exterior de la pared celular y permite utilizar los filamentos de actina del citoesqueleto y utilizarlos como propela, polimerizando actina para llegar hasta la membrana celular del huésped. Cuando la bacteria interactúa con la membrana, la bacteria invade las células adyacentes llevándose parte de la membrana de la célula inicial; este paso deja a la bacteria dentro de un endosoma de doble membrana del cual escapará utilizando la batería de proteínas LLO, *PlcA* y *PlcB*; reiniciando el ciclo infeccioso y propagándose a torrente sanguíneo y célula-célula (**Figura 4c**) (Pizarro-Cerdá *et al.*, 2012)

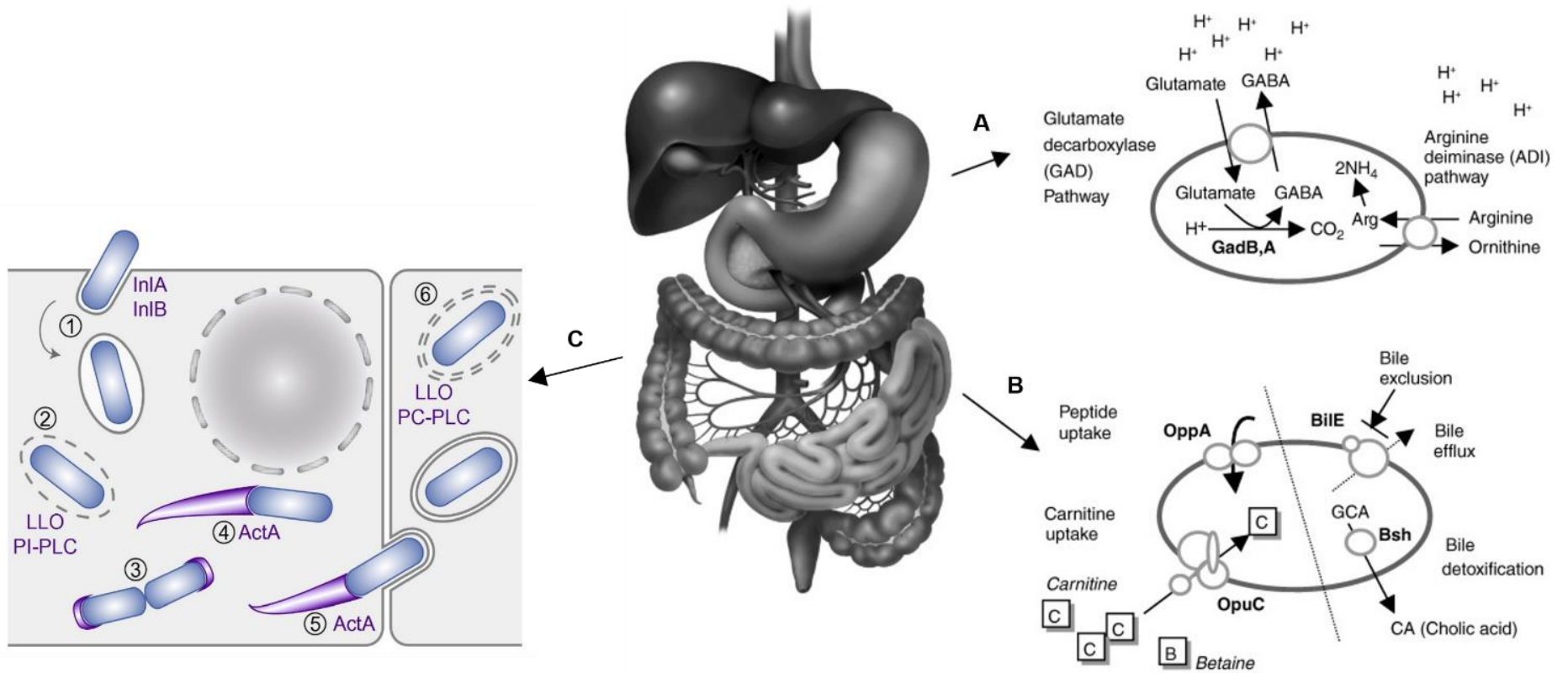


Figura 4 Ciclo infeccioso de *Listeria monocytogenes*.

A. Mecanismo de resistencia al ácido en la cavidad estomacal. Tomado de Gahan y Hill, 2005.

B. Mecanismo de resistencia biliar en el intestino delgado. Tomado de Gahan y Hill, 2005.

C. Ciclo de replicación intracelular y diseminación de *Listeria monocytogenes*. Modificado de Cossart y Lebreton, 2014.

2.3.7 Reservorios

Listeria spp. es una bacteria cosmopolita, su fácil transmisión y gran capacidad de adaptación le ha permitido colonizar diversos tipos de ambientes y superficies. Estudios realizados por diversos grupos de investigación han encontrado que *Listeria* puede ser aislada en agua, vegetación y suelo; siendo el agua contaminada y el forraje contaminado u otros alimentos, los principales factores que contribuyen a la transmisión de esta bacteria en diferentes poblaciones humanas y silvestres (Ivanek *et al.*, 2006). La capacidad de *Listeria* para adaptarse a diversas condiciones ambientales y nutricias le ha permitido colonizar diversos tipos de superficies; se ha encontrado una baja prevalencia de esta bacteria en pieles de bovino y cadáveres (Camargo *et al.*, 2014), lo cual puede ser un indicio de un estilo de vida saprofita; sin embargo la capacidad para sobrevivir en superficies inertes como mesas de trabajo, pelajes y otros es quizá la característica más peligrosa en la transmisión de *Listeria*. Uno de los puntos menos estudiados es la posibilidad de transmisión zoonótica; *Listeria* es capaz de sobrevivir en el cuerpo de una gran diversidad de animales sin llegar a presentar signos ni síntomas relacionados a la listeriosis; Weindl y colaboradores en 2016 lograron identificar a *L. monocytogenes* en contenido ruminal de ciervo rojo sano. Así mismo, se ha logrado identificar *L. monocytogenes* en las amígdalas, carne y heces de jabalís sanos (Hayashidani *et al.*, 2002; Wacheck *et al.*, 2010) es decir estos animales son reservorios de *Listeria*. Si bien la presencia de la bacteria no tiene ningún riesgo inminente a la salud de estos animales, la transmisión de la bacteria si puede ocurrir. Diversos estudios respecto a la ocurrencia de *Listeria* en poblaciones de fauna silvestre han encontrado que un gran número de aves, mamíferos, reptiles y anfibios son reservorios de *Listeria*, siendo los cuervos y los monos los principales reservorios de esta bacteria (Yoshida *et al.*, 2000). En poblaciones de animales domésticos, se ha encontrado una alta prevalencia de *Listeria* en heces; siendo las ovejas, cabras, perros, gatos y ratas los principales exponentes de esta categoría, así mismo se ha encontrado la presencia de *L. monocytogenes* en heces de humanos aparentemente sanos (Schoder y Wagner, 2012).

2.4 Tlacuaches.

2.4.1 Generalidades.

Los tlacuaches son mamíferos de gran importancia ecológica. En México se conocen 8 especies de marsupiales pertenecientes al orden Didelphimorphia: *Marmosa mexicana*, *Tlacuatzin canescens*, *Caluromys derbianus*, *Chironectes minimus*, *Metachirus nudicaudatus*, *Philander opossum*, *Didelphis marsupialis* y *Didelphis virginiana* (Medina-Romero *et al.*, 2012).

El tlacuache norteamericano (*Didelphis virginiana*) es el marsupial con mayor distribución del orden, abarcando desde el sureste canadiense hasta Costa Rica. El tamaño del tlacuache es relativamente grande llegando a pesar hasta 3 Kg y medir hasta 1 m de cola a nariz. En México se han encontrado dos subespecies: *Didelphis virginiana californica* y *Didelphis virginiana yucatanensis*. Estas difieren una de la otra respecto a la coloración del pelaje, siendo más pálido en la subespecie *californica*, mientras que la subespecie *yucatanensis* tiene el pelaje más oscuro. (Zarza y Medellín, 2005).

2.4.2 Clasificación Taxonómica (ITIS, 2018).

Reino: Animalia

Phylum: Chordata

Clase: Mammalia

Orden: Didelphimorphia

Familia: Didelphidae

Género: *Didelphis*

Especie: *Didelphis virginiana*

2.4.3 Hábitat.

Los tlacuaches de la especie *D. virginiana* suelen encontrarse ampliamente distribuidos en norte américa. Su capacidad de adaptación les permite habitar en muchos tipos de hábitat; se han avistado tlacuaches de esta especie en tierras bajas, zonas boscosas, pantanos, marismas e inclusive se han logrado adaptar a los ambientes urbanos (Zarza y Medellín, 2005).

D. virginiana suele establecerse en madrigueras (ocupadas generalmente una hembra con sus crías) como troncos caídos, huecos grandes entre las rocas e inclusive pueden utilizar madrigueras abandonadas de otros animales (Zarza y Medellín, 2005). Su nicho ecológico le permite regular poblaciones de insectos, además de ser presas recurrentes de zorros, perros ferales, serpientes, búhos y coyotes, sin embargo se ha reportado que *D. virginiana* es resistente al veneno de algunas serpientes (Werner y Vick, 1977).

2.4.4 Alimentación y tracto gastrointestinal.

La alimentación de los tlacuaches es sumamente adaptable y variada. Dependiendo del hábitat donde se encuentren; se ha observado que en zonas no antropizadas, estos especímenes suelen alimentarse de insectos, pequeños invertebrados, frutos, semillas y carroña, mientras que en ambientes donde se encuentren con un alto contacto con el humano, los tlacuaches se pueden alimentar de insectos, aves pequeñas, roedores pequeños, basura, desechos alimenticios y alimento para mascotas (McRuer y Jones, 2009).

El tracto gastrointestinal del tlacuache (**Figura 5b**) se caracteriza por tener un intestino grueso corto, aunque cuenta con un ciego bien desarrollado que le permite digerir alimentos ricos en celulosa, además cuenta con un intestino delgado largo que conecta con un estomago monocavitario. En contraste con los roedores, los tlacuaches tienen una glándula biliar bien desarrollada (Tardieu, 2017). La diversidad microbiana del tracto gastrointestinal de *D. virginiana* ha sido poco estudiada. Diversos estudios han encontrado que el tracto gastrointestinal de los tlacuaches nortños se encuentra parasitada por una gran cantidad de cestodos, nematodos y trematodos (Jiménez *et al.*, 2011; Monet-Mendoza *et al.*, 2005), así mismo la carga bacteriana se compone en su mayoría por proteobacterias

de las cuales, *E. coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Citrobacter freundii*, *Lactobacillus* y *Salmonella* spp. (Rodríguez *et al.*, 1992).

2.5 Ardillones.

2.5.1 Generalidades.

Los ardillones de la especie *Otospermophilus variegatus* (anteriormente llamados *Spermophilus variegatus*) son considerados por la gente como ardillas debido a su apariencia similar, sin embargo difieren de las ardillas en muchos aspectos. Los ardillones se encuentran distribuidos en gran parte del territorio nacional y el centro de Estados Unidos. Su tamaño es relativamente grande comparado con el de una ardilla, logrando medir 50 cm de los cuales aproximadamente el 40 % corresponde a la longitud de la cola; además pueden llegar a pesar hasta 900 g, los ojos son grandes y su pelaje suele ser oscuro de tonos griseos con moteados blancos en el dorso, mientras que en la parte ventral suele ser de tonos claros a grises e incluso cafés; sin embargo en el norte del país suelen ser completamente negros (Valdéz Alarcón y Ceballos, 2005).

2.5.2 Clasificación taxonómica (ITIS, 2018).

Reino: Animalia

Phylum: Chodata

Clase: Mammalia

Orden: Rodentia

Familia: Sciuridae

Género: *Otospermophilus* (antes *Spermophilus*)

Especie: *Otospermophilus variegatus*

2.5.3 Hábitat.

Los ardillones de roca son muy adaptables a las condiciones ambientales; se han avistado estos especímenes en ambientes que van desde climas templados como bosques de pinos, encinos, hasta zonas semiáridas, zonas de cultivos y semiurbanas. Suelen albergarse en madrigueras a nivel del suelo hechas por ellos mismos o entre las rocas. La actividad de estos especímenes es típicamente diurna, llegando a observarse un pico de actividad a medio día (Valdéz Alarcón y Ceballos, 2005).

2.5.4 Alimentación y tracto gastrointestinal.

La alimentación del ardillón es omnívora, siendo su principal fuente de alimento los insectos, las semillas y frutos, dependiendo del hábitat también pueden comer carroña, basura e incluso serpientes (BISON-M, 2017). Se ha observado que dependiendo de la estación del año, tienden a preferir el consumo de ciertos alimentos, por ejemplo en primavera suelen consumir mayormente las flores del agave y otras cactáceas, durante el otoño se incrementa la alimentación a base de semillas y bayas; sin embargo durante todo el año se ha visto que los ardillones depredan los nidos de las aves robando sus huevos, además de consumir insectos y pequeñas lagartijas (Armstrong *et al.*, 2011).

La estructura gastrointestinal del ardillón corresponde al de un omnívoro, al igual que los tlacuaches cuenta con un estómago monocavitario, intestino delgado largo además de un ciego bien desarrollado que le permite la digestión de materia vegetal y un colon corto, sin embargo morfológicamente es más parecido al tracto gastrointestinal de las ardillas (**Figura 5a**). La diversidad microbiana del tracto gastrointestinal de *O. variegatus* ha sido estudiada con anterioridad, estudios parasitológicos han encontrado una gran cantidad y diversidad de parásitos asociados al tracto gastrointestinal; en la subespecie *O. variegatus grammurus* se han encontrado parásitos del género *Eimeria* (Thomas y Stanton, 1994), *Trichinella*, *Taenia*, *Trichuris*, *Ostertagia* (Jenkins y Grundmann, 1973). *O. variegatus* es reservorio de una gran diversidad de bacterias de importancia médica como *Yersinia pestis* (Poland y Dennis, 1969), *Borrelia* spp., *Anaplasma* (Fleer *et al.*, 2011), *Morganella*, *proteus* y *Pseudomonas* (Cloud-Hansen *et al.*, 2007).

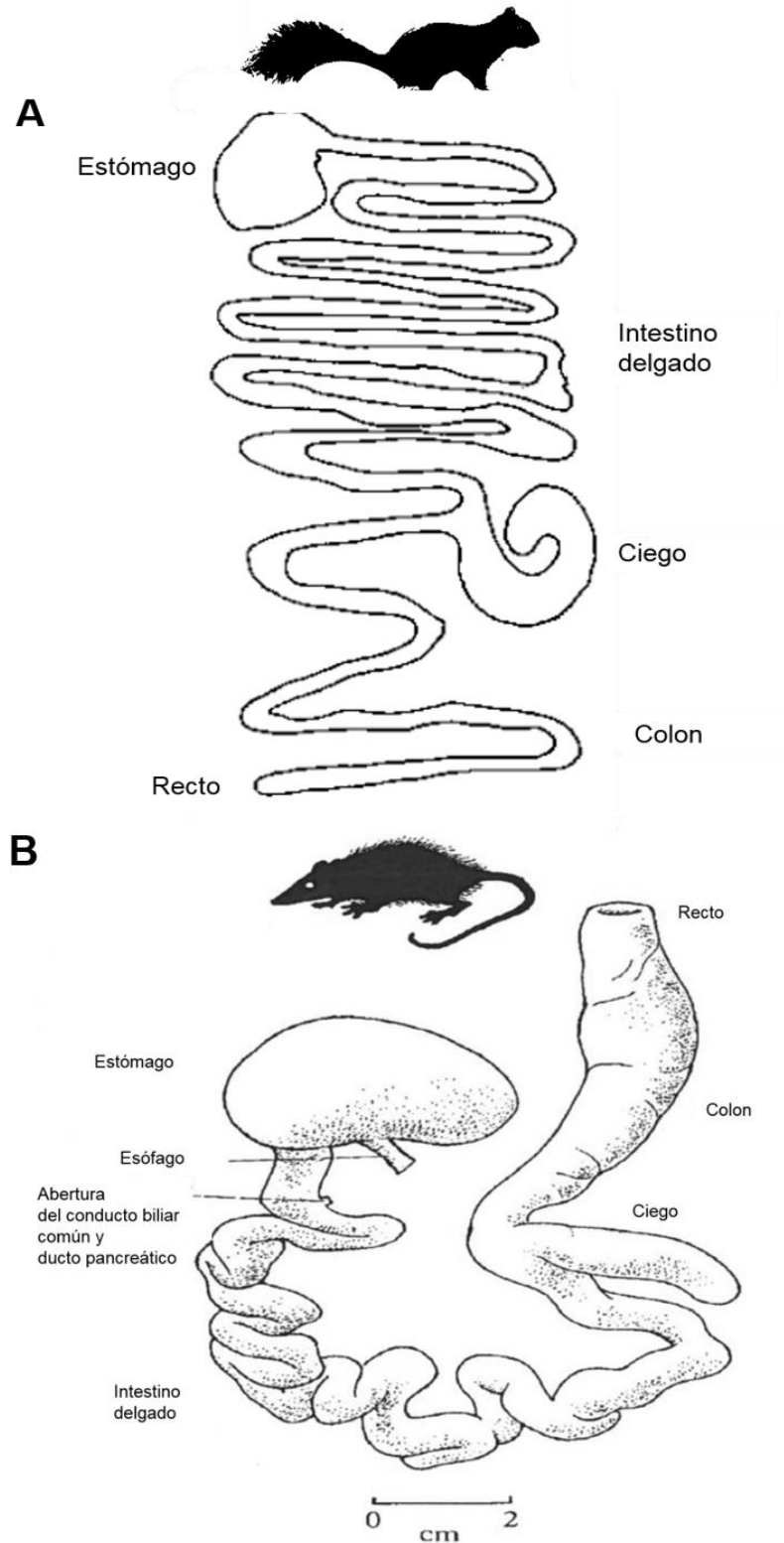


Figura 5 Representación del tracto gastrointestinal de ardilla y tlacuache.

A. Tracto gastrointestinal de *Sciurus aberti*. Modificado de Murphy y Linhart, 1999

B. Tracto gastrointestinal de *Didelphis virginiana*. Modificado de Tardieu, Adogwa y Garcia, 2017.

3. Justificación

La listeriosis es una de las enfermedades transmitidas por alimentos con mayor mortalidad. Las medidas tomadas para evitar su propagación están rigurosamente establecidas en México y el mundo, sin embargo los agentes causales de esta enfermedad (*Listeria monocytogenes* y *Listeria ivanovii*) se encuentran ubicuamente (suelo, agua, heces, etc.). El potencial zoonótico de la listeriosis es un tema a consideración no solo por la letalidad de la enfermedad sino por la gran capacidad de adaptación de la bacteria.

El estado de Querétaro ha mostrado en los últimos años una gran expansión demográfica, la constante demanda de viviendas ha provocado que la fauna local se desplace a las zonas marginales de la ciudad o inclusive se haya forzado a convivir con el humano. El tlacuache norteño o zarigüeya (*Didelphis virginiana*) y los ardillones (*Otospermophilus variegatus*) son dos mamíferos cuyos hábitats han sido completamente invadidos por el humano. Ambas especies han sobrevivido gracias a su capacidad de adaptación al medio antrópico, teniendo que alimentarse de la basura como resultado de la disminución de sus fuentes de alimento naturales. Hasta la fecha no existen reportes que prueben si estas dos especies son reservorios de *Listeria* spp, ni las consecuencias de la interacción Fauna urbana-humano, por lo cual es importante determinar la prevalencia de este género bacteriano.

4. Hipótesis

Didelphis virginiana y *Otospermophilus variegatus* son reservorios de *Listeria* spp.

5. Objetivos

Objetivo general.

- Determinar la existencia de bacterias del género *Listeria* en dos especímenes de fauna urbana: *Didelphis virginiana* y *Otospermophilus variegatus*.

Objetivos específicos.

- Estandarizar una prueba molecular para la detección de *Listeria* spp.
- Determinar la existencia de *Listeria* spp. en el tlacuache *D. virginiana*.
- Determinar la existencia de *Listeria* spp. en el ardillón *O. variegatus*.
- Estimar la prevalencia de *Listeria* spp. en los especímenes de fauna urbana.

6. Metodología

6.1 Muestreo.

6.1.1 Consideraciones bioéticas.

El protocolo de procesamiento de muestras fue sometido y aprobado por el comité de bioética de la facultad de ciencias naturales de la universidad autónoma de Querétaro (**Apéndice 1**).

6.1.2 Medidas de seguridad e higiene.

La sustracción de los especímenes de las trampas se llevó a cabo con guantes protectores de carnaza o piel, mientras que para el manejo, mediciones y toma de muestras se utilizaron guantes de nitrilo. Después de haber tomado la muestra rectal, se lavaron los guantes con etanol al 70 %. De acuerdo con la NOM-087-ECOL-SSA1-2007 los residuos potencialmente patógenos como hisopos con sangre, o heces, agujas, guantes y sanitas fueron dispuestos en bolsas o envases de polipropileno de color Rojo.

6.1.3 Manejo y captura.

La captura de especímenes tanto de ardillones como de tlacuaches se llevó a cabo por la M. en C. Gabriela Arteaga, quien determinó los sitios de captura, manejo de trampas y especímenes, toma de constantes fisiológicas, anestesia, toma de sangre y liberación (Arteaga Salazar, 2017; Olvera-Ramírez *et al.*, 2017) Para la captura de tlacuaches se utilizaron trampas tomahawk de una sola puerta, mientras que para los ardillones se usaron trampas Sherman (Gallina y López-González, 2011) usando como carnadas sardinas con vainilla para tlacuaches y una mezcla de avena con cacahuates naturales para ardillones. Una vez capturados, se cubrieron con una manta para reducir el estrés de los especímenes.

Se establecieron dos sitios de captura para tlacuaches (zona residencial Zibatá y Centro universitario), mientras que para los ardillones se estableció una división por cuadrantes dentro del sitio de captura (Alameda Hidalgo).

Se administró Tiletamina Zolazepam (Zoletil® 100) a una dosis de 15 mg/Kg. Para la inyección intramuscular del anestésico se utilizó una prensa casera suave que permitió

empujar al Ardillón o tlacuache hasta el fondo de la trampa para inmovilizarlo y aplicar el fármaco. Se dejó actuar el anestésico y se extrajo al espécimen de la trampa para la toma de muestras y constantes fisiológicas siendo las muestras de hisopados rectales las necesarias para el presente trabajo.

6.1.4 Toma de muestras rectales.

Tanto para Tlacuaches como ardillones se tomó una muestra rectal usando un hisopo estéril con medio de transporte AMIES. Dicha muestra se tomó introduciendo la totalidad del algodón en el recto del espécimen girando 180° de izquierda a derecha y viceversa, posteriormente se introdujo el hisopo en el medio de transporte AMIES; se rotuló el tubo de transporte con el número de identificación como se muestra a continuación:

Especimen: A/T (Ardillón o Tlacuache)

Sitio de captura (En tlacuaches): Cu/Zi (Centro Universitario o Zibatá)

Número de espécimen: 1-100 Ardillones/ 1-36 por sitio con Tlacuaches

Los hisopados fueron refrigerados a 4° hasta su procesamiento en el laboratorio de Microbiología Veterinaria de la Facultad de Ciencias Naturales de la Universidad Autónoma de Querétaro.

6.2 Procesamiento de las muestras de ardillones y tlacuaches.

6.2.1 Pre-enriquecimiento.

Para el aislamiento de *Listeria* sp. se llevó a cabo la metodología establecida en la NOM-143-SSA1-1995 con las siguientes modificaciones:

Como primer paso, se modificó la cantidad de caldo nutritivo estandarizando a 10ml de Agua Peptonada (AP) para cada uno de los hisopados en tubos cónicos de 15 ml. Cada hisopo fue cortado a una longitud máxima de 5 cm con unas tijeras de acero las cuales se flamearon con alcohol 96° entre cada muestra. Cada uno de los hisopados en AP se incubaron a 37 °C durante 24 horas. Una vez transcurrido el periodo de incubación, se tomaron 4 alícuotas; dos para extracción de ADN (1ml c/u) y dos para crio-preservación en

glicerol al 50 % v:v (700 µl glicerol 100%: 700 µl de cultivo), dichas alícuotas se congelaron a 0 °C hasta su uso.

6.2.2 Extracción de ácidos nucleicos.

Se realizó la extracción de ADN por lisis térmica propuesta por (Dashti *et al.*, 2009) modificado; para la lisis se tomaron 200 µl del cultivo inicial congelado en AP, posteriormente se centrifugó a 14,000 rpm 2 minutos para obtener un precipitado bacteriano, se descartó el sobrenadante y se realizaron 3 lavados con 300 µl de agua destilada estéril centrifugando a 14,000 rpm por 2 minutos entre cada lavado. Tras el último paso de lavado se resuspendió el precipitado bacteriano en 50 µl de agua destilada estéril y se incubaron a 100 °C por 10 minutos mezclando generosamente cada 5 minutos, por último se centrifugó a 14,000 rpm por 2 minutos tomando 40 µl del sobrenadante. El producto obtenido se utilizó para las reacciones de PCR.

6.2.3 Detección molecular de *Listeria* spp. por PCR.

Para identificar cuántos individuos tienen presencia de *Listeria* spp se realizó un ensayo de filtración en el cual se usó la técnica de PCR con los oligonucleótidos utilizados por Garrido *et al.*, 2013 (**Cuadro 4**) los cuales son según los autores, específicos para *L. monocytogenes*, sin embargo tras analizar estos oligonucleótidos con herramientas bioinformáticas y ensayos de laboratorio, se descubrió que también son útiles para la identificación de *Listeria innocua*.

Las reacciones de PCR se realizaron por duplicado con las cantidades mostradas en el **Cuadro 5**. Los parámetros de corrida para el termociclador se estandarizaron para cada par de oligonucleótidos los cuales se encuentran representados en la **Figura 6**.

Cuadro 4. Oligonucleótidos utilizados en este trabajo para la detección de *Listeria* spp.

Gen blanco	Nombre	Secuencia 5'-3'	Amplicón	Referencia
<i>Prs</i> Posible fosforibosil fosfato sintetasa	Prs-F	GCTGAAGAGATTGCGAAAGAAG	370 pb	(Ryu <i>et al.</i> , 2013)
	Prs-R	CAAAGAAACCTTGGATTTGCGG		
<i>prfA</i> regulador transcripcional de listeriolisina	LIP1-F	GATACAGAAACATCGGTTGGC	251 pb	(Garrido <i>et al.</i> , 2013)
	LIP2-R	GTGTAATCTTGATGCCATCAG G		
<i>actA</i> proteína inductora de ensamblaje de actina	ActA-F	AAGTGGCGAAAGAGTCAGTTGC	121 pb	(Milohanic <i>et al.</i> , 2003)
	ActA-R	ACTTTAGGGAAAAATGGTTGTTG GT		
<i>lap</i> Probable endopeptidasa p60	Ino2 F	ACTAGCACTCCAGTTGTTAAAC	870 pb	(Bubert <i>et al.</i> , 1999)
	Lis1BR	TTATACGCGACCGAAGCCAAC		
	PLis1-F	ATGAATATGAAAAAAGCAAC	450 pb	(Rattanachaikunsopon y Phumkhachorn, 2012)
	PrIn-R	GTTTAACAACCTGGAGTGCTAGT		
<i>namA</i> N-acetil muramidasa	liv-22F	CGAATTCCTTATTCACCTTGAGC	463 pb	(Liu <i>et al.</i> , 2004; Huang <i>et al.</i> , 2007; Mazza <i>et al.</i> , 2015)
	liv-22R	GGTGCTGCGAACTTAACTCA		
16S Gen del ARN ribosomal 16S	8F	AGAGTTTGATCCTGGCTCAG	1.6 kb	(Hogg y Lehane, 1999; Takahashi <i>et al.</i> , 2014; Zoetendal <i>et al.</i> , 1998)
	1510R	GGTTACCTTGTTACGACTT		

Cuadro 5. Componentes de reacción para PCR

Componente	Cantidad
Hot Start Master mix (Thermo) 2X	6 μ l
Oligonucleótido Sentido (10 μ M)	0.4 μ l
Oligonucleótido Antisentido (10 μ M)	0.4 μ l
Albúmina Sérica Bovina (BSA) (Thermo) (2 μ g/ μ l)	1.6 μ l
ADN (~50 ng/ μ l)	1 μ l
Agua libre de nucleasas	cbp. 12 μ l

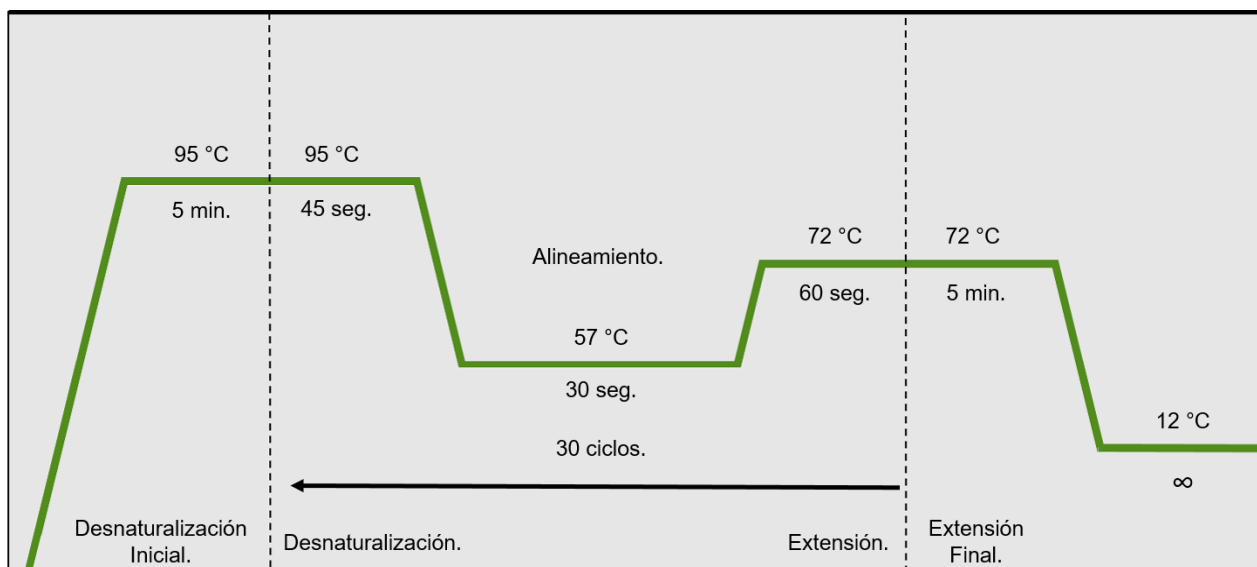


Figura 6. Parámetros de corrida para la PCR.

6.2.4 Visualización de productos de PCR en geles de Agarosa.

Los productos de PCR se visualizaron mediante electroforesis en gel, para lo cual se prepararon geles de agarosa al 1.5 % en Buffer TAE (Tris, Ácido Acético, EDTA). Se

utilizó 1 µl de Buffer de carga Orange Green Dye Buffer 6x de Thermo y se mezcló con 5 µl de producto de PCR mientras que el marcador de peso molecular se preparó 1:1 (vf: 2µl por pozo). La electroforesis se corrió a 70 V por 45 minutos con TAE frío.

Aquellas muestras que mostraron amplificación con los oligonucleótidos Lip1 y Lip2 en el tamaño esperado se catalogaron como presuntas positivas a *Listeria* spp. (Lip+).

6.2.5 Secuenciación de ácidos nucleicos y análisis.

Para corroborar la identidad del Amplicón obtenido en las muestras, tanto el control positivo como una muestra al azar Lip+ fueron secuenciadas en la unidad de Proteogenómica del Instituto de Neurobiología de la UNAM. La muestra y el control fueron preparadas de acuerdo con las especificaciones recomendadas por la unidad de Proteogenómica. Así mismo, los aislamientos microbiológicos fueron identificados mediante la secuenciación de la región ribosomal 16S.

Para el análisis de los electroferogramas de secuenciación se utilizó el programa BioEdit Sequence Alignment Editor (Hall, 2005), las secuencias fueron analizadas a mano y guardadas en formato FASTA. Tanto la secuencia control como la muestra fueron alineadas en el programa ApE (Davis, 2017) mediante alineamiento local, por último se utilizó el programa BLAST® (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) para verificar que la identidad de las secuencias obtenidas correspondieran a una especie del género *Listeria*.

6.2.5 Aislamiento selectivo de *Listeria* spp.

Las muestras presuntas positivas a *Listeria* fueron procesadas modificando la metodología de aislamiento propuesta por Martínez-González *et al.* (2014, 2016) para el crecimiento selectivo de *Listeria* en agar PALCAM según Van Netten *et al.* (1989). Para este propósito se utilizaron las muestras en crio-preservación de tlacuaches y ardiliones las cuales fueron inoculadas en caldo Luria Bertani (LB) (50 µl en 2ml) y puestas a incubar a 37 °C por 24 horas, pasado el tiempo de incubación se centrifugaron los tubos a 14,000 rpm por 2 minutos y se descartó 1950 µl. Los 50 µl restantes de cada muestra se inocularon en placas de Agar PALCAM según Van Netten *et al.* (1989) suplementadas con Ceftazidima pentahidratada a una concentración de 15 µg/ml, las placas se incubaron a 37 °C por 48

horas. Pasado el tiempo de incubación se sembraron las colonias aisladas que presentasen coloración gris a negro sin halo amarillo en Agar PALCAM con 15 µg/ml de Ceftazidima. Este procedimiento se repitió hasta obtener colonias aisladas y cultivos puros.

6.2.6 Identificación molecular de aislamientos de *Listeria* spp.

Las cepas aisladas que tuvieron las características pertinentes a *Listeria* fueron sometidas a una serie de pruebas que constaron de Tinción de Gram y PCR. Para la reacción de PCR se utilizaron oligonucleótidos específicos para *Listeria monocytogenes*, *Listeria innocua*, *Listeria ivanovii* y el género *Listeria* (**Cuadro 4**).

Para la tinción de Gram, se realizó un cultivo en agar TS (Trypticase de soya) incubado a 37 °C por 24 horas. Se colocó una gota de 2 µl de agua destilada estéril en un portaobjetos nuevo rotulado, acto seguido se tomó una colonia bacteriana con un asa microbiológica de platino y se procedió a la fijación y tinción con los siguientes tiempos: 1 minuto cristal violeta, 1 minuto Lugol, 15 segundos Alcohol:Acetona, 1 min Safranina; se realizó un lavado con agua destilada entre cristal violeta y lugol y un último lavado al final. Las tinciones se observaron en un microscopio de luz (UNICO G380) usando la técnica de iluminación Köhler.

6.3 Análisis estadístico.

Para el análisis de los datos se utilizó el paquete estadístico SPSS versión 20 (IBM). Se utilizó la prueba de χ^2 para determinar la significancia de las prevalencias Lip1 y Lip2+ y la prueba de exacto de Fisher para Prs+ (Abu Aboud *et al.*, 2016) tanto para ardillones como para tlacuaches.

Los datos obtenidos también se analizaron con el fin de obtener aquellos factores que puedan asociarse a la presencia de *Listeria* spp. Se calculó la razón de momios (Odds Ratio OR) utilizando cada uno de los oligonucleótidos (Lip1 y Lip2 y Prs) como prueba de diagnóstico y tomando en cuenta los siguientes aspectos como factores de exposición / riesgo: Edad, sexo y sitio de captura (cuadrantes 1-4 para ardillones y zona urbana y zona periurbana para tlacuaches).

Para la validación de las pruebas de PCR de Lip 1/2 y Prs se realizó un modelo de regresión lineal para determinar si los resultados obtenidos con ambas técnicas son significativas. Para esto se normalizaron los datos tanto de ardillones como de tlacuaches, tomando el valor máximo como 100% = 1.

7. Resultados

7.1 Estandarización de PCR.

Las temperaturas de alineamiento de cada par de oligonucleótidos fue determinada in silico y experimentalmente mediante pruebas de gradiente de temperatura (**Figura 7a**), se utilizó como control positivo de todos los oligonucleótidos una cepa de *L. monocytogenes*. La TM determinada para todos los oligonucleótidos fue de 57°C.

La especificidad de cada par de oligonucleótidos se probó con la biblioteca de ADN del laboratorio; siendo *Citrobacter*, *Enterobacter*, *E. coli* O157, *E. coli* XL1-Blue, *S. enterica*, *L. innocua* y *L. monocytogenes* los ADN utilizados para las pruebas (**Apéndice 2**). Del total de oligonucleótidos, solamente los Lip1 y Lip2 fueron completamente específicos a 57 °C (**Figura 7c**), mientras que Prs solamente mostró reactividad cruzada con *E. coli* XL1-Blue (**Figura 7b**), por lo que se decidió utilizar estos dos pares de oligonucleótidos como primer filtro para la detección de *Listeria* spp. EL control positivo y una muestra de ardillones Lip1 y Lip2+ fueron secuenciados, tras analizar las secuencias obtenidas se identificó ambos amplicones como *L. monocytogenes*.

La sensibilidad de los oligonucleótidos se determinó utilizando ADN de *L. monocytogenes* en una reacción de PCR utilizando concentraciones seriadas 1:10 desde 47 ng/μl hasta 4.7 pg/μl. Los oligonucleótidos Lip1 y Lip2 demostraron ser más sensibles, logrando detectar hasta 47 pg de ADN, mientras que los oligonucleótidos Prs solamente fueron capaces de detectar hasta 470 pg (**Figura 8**).

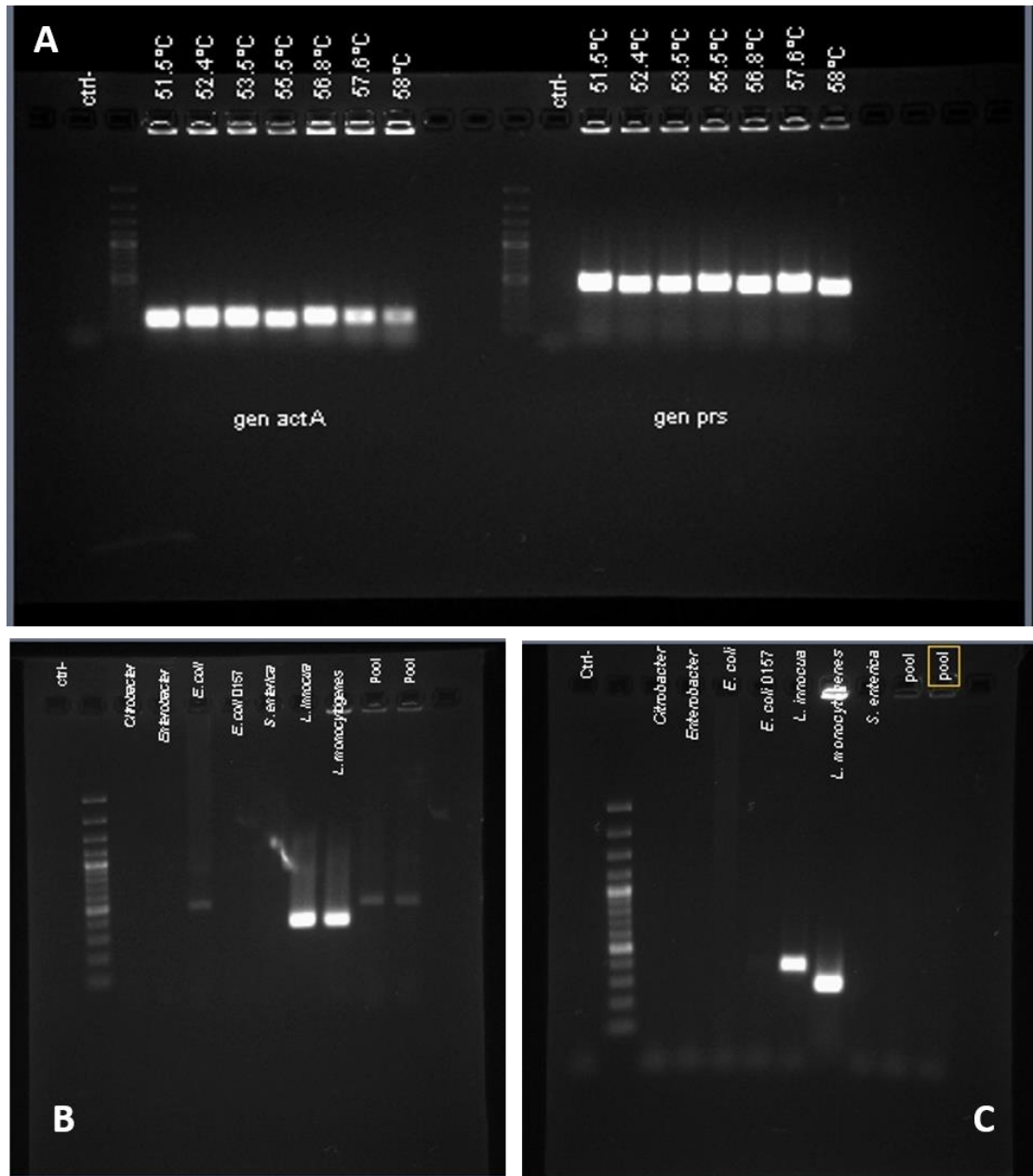


Figura 7. Estandarización de PCR.

A. Las pruebas de gradiente de TM se realizaron para todos los oligonucleótidos utilizados (Imagen representativa).

B. Prueba de especificidad para los Oligonucleótidos Prs, nótese la amplificación inespecífica con *E. coli* (TM=57 °C).

C. Prueba de especificidad para los oligonucleótidos Lip1 y Lip2 (TM=57 °C).

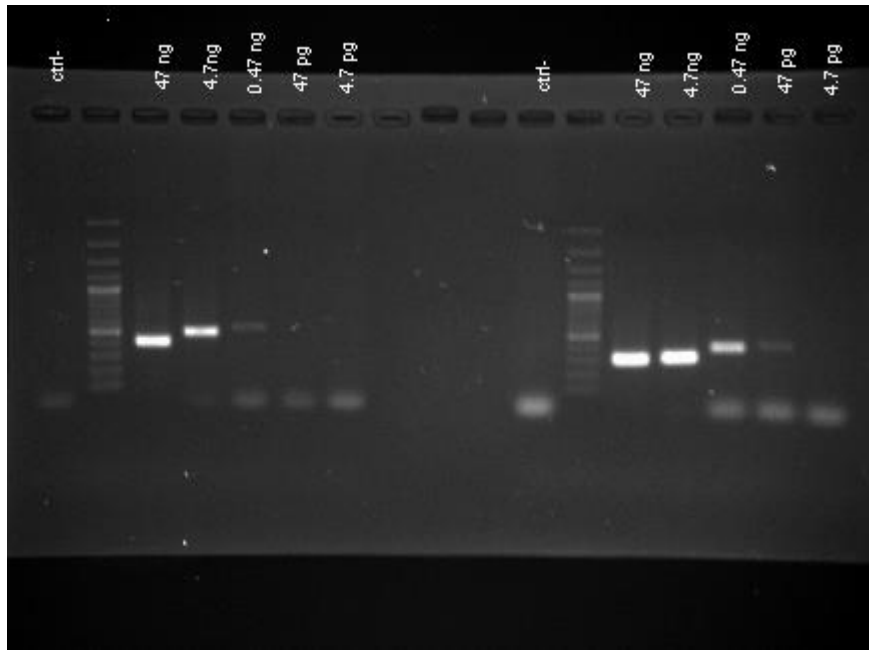


Figura 8. Prueba de sensibilidad.

Carril 1 y 11, controles negativos; carril 2 y 12, marcador de peso molecular; carril 3 al 7, reacciones para los oligonucleótidos Prs; carril 13 al 17, reacciones para los oligonucleótidos Lip1 y Lip2.

7.2 Prevalencia de *Listeria* spp.

En total, 35 % de ambos especímenes resultaron ser positivos a *Listeria* spp. con los oligonucleótidos Lip1 y Lip2 (47 especímenes: 43 ardillones y 4 tlacuaches) mientras que solo el 9.6 % (13 especímenes: 11 ardillones y 2 tlacuaches) resultaron positivos con Prs (**Figura 9a-c**).

La prevalencia obtenida con los oligonucleótidos Lip1 y Lip2 es significativamente independiente ($p < 0.01$) a la de los resultados obtenidos con Prs (**Cuadro 6**).

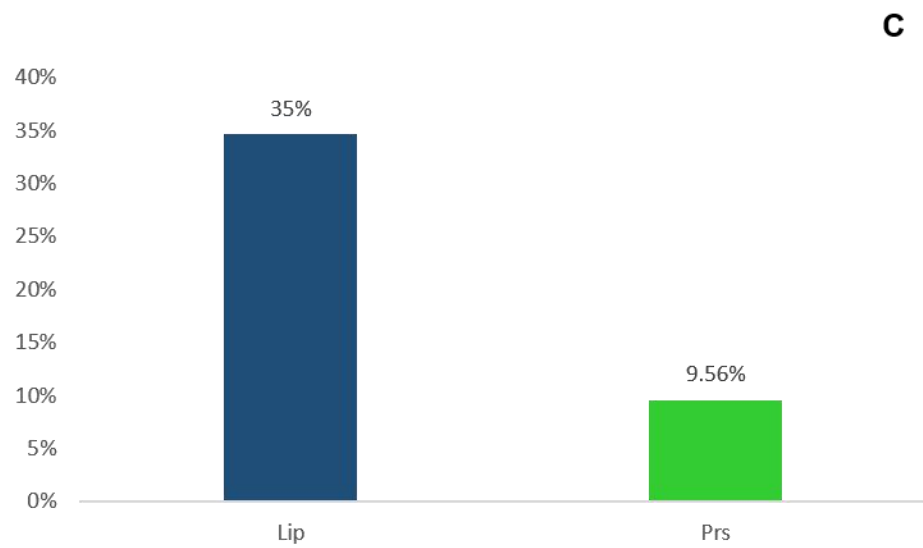
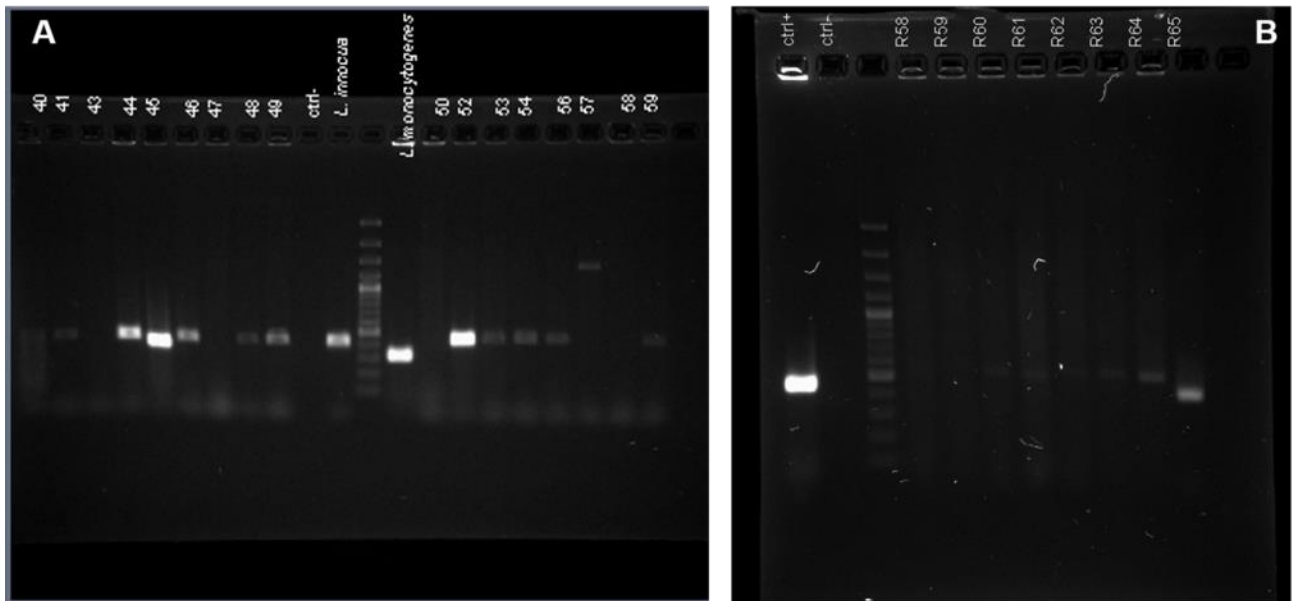


Figura 9. Estandarización de PCR.

A. Resultados de PCR con los oligonucleótidos Lip1 y Lip2.

B. Resultados de PCR con los oligonucleótidos Prs.

C. Resultados agrupados por oligonucleótidos. Lip1 y Lip2 (47); Prs (13); n=136.

Cuadro 5 Comparación estadística entre oligonucleótidos utilizados.

	Valor	gl	Sig. asintótica (bilateral)	Sig. exacta (bilateral)
Chi-cuadrado de Pearson	24.719	1	.000	
Estadístico exacto de Fisher				.000
N de casos válidos	272			

7.2.1 Ardillones.

En total se lograron capturar 100 especímenes de ardillones; 81 de ellos fueron adultos y 19 juveniles; la proporción de sexos fue de 42 hembras y 58 machos. Los resultados de PCR fueron los siguientes: 43 muestras fueron positivas (43 %) a la amplificación con los oligonucleótidos Lip1 y Lip2 (**Figura 11**), mientras que para Prs solamente 13 resultaron positivos (11 %) (**Figura 12, Apéndice 4**). La prevalencia de *Listeria* spp. detectada con Lip1 y Lip2 en cada uno de los cuadrantes de captura para ardillones fue la siguiente: 45.5 % C1, 47.4 % C2, 41.2 % C3 y 43.33 % C4. En el caso de Prs la prevalencia de *Listeria* por cada cuadrante fue: 0 % C1, 18 % C2, 12 % C3 Y 7 % C4 (**Figura 10**)

Al comparar las proporciones obtenidas tanto de Lip1 y Lip2 y de Prs con respecto del sitio de captura de los ardillones mediante la prueba de χ^2 , se demostró que no hay relación entre estas. Por lo que la presencia de *Listeria* no está relacionada con el sitio de captura de los animales.

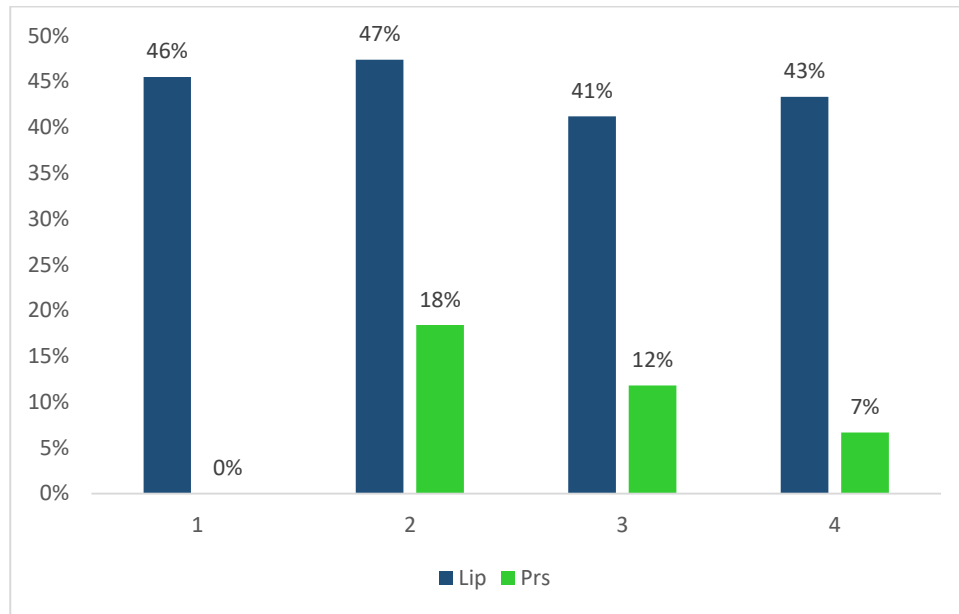


Figura 10. Resultados de PCR por cuadrantes.

7.2.2 Tlacuaches

En el caso de los tlacuaches, se capturaron un total de 36 especímenes; 20 en Centro Universitario y 16 en Zibatá. Del total de tlacuaches 16 de ellos fueron juveniles y 20 adultos. La proporción de sexos fue de 19 hembras y 17 machos. La prevalencia de *Listeria* spp. fue muy baja; del total de los especímenes muestreados, solamente 4 (10.5 %) resultaron ser positivos a *Listeria* spp. utilizando los oligonucleótidos Lip1 y Lip2 (**Figura 11**) mientras que para los oligonucleótidos Prs solo 2 tlacuaches (5.56 %) resultaron ser positivos (**Figura 12, Apéndice 3**).

Al igual que con los ardillones, se analizó la prevalencia de *Listeria* spp. en ambos sitios de muestreo (Zibatá y Centro Universitario) para identificar si hay alguna asociación con la presencia de la bacteria. Para esto se realizó una prueba de exacto de Fisher (debido a que la frecuencia esperada fue menor a 5). Los resultados de la prueba mostraron que no hay una asociación directa entre la presencia de *Listeria* y ambos sitios de muestreo.

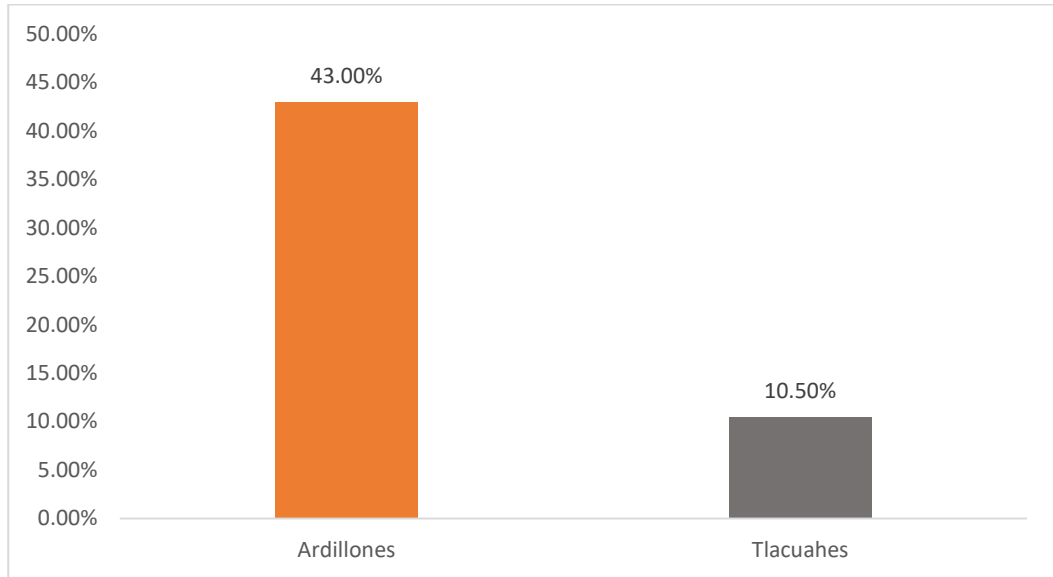


Figura 11 . Resultados de PCR con Lip1 y Lip2 para *Listeria* spp.

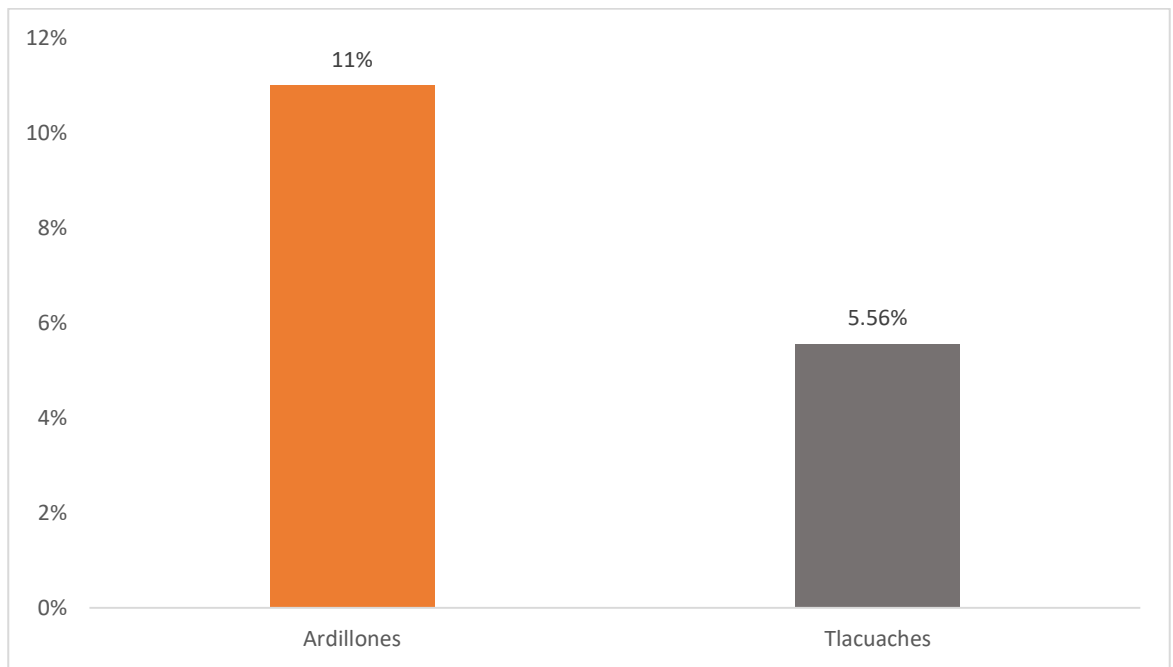


Figura 12 Resultados de PCR con Prs para *Listeria* spp.

7.3 Aislamiento microbiológico.

Para el aislamiento microbiológico, se realizaron las muestras presuntivas de *Listeria* (Lip1 y Lip2+ y Prs+). En total se cultivaron 47 muestras en agar PALCAM, de estas, solamente 19 mostraron tolerancia al antibiótico, de las cuales 17 mostraron características fenotípicas de *Listeria* (**Figura 13a**): colonias pequeñas de 1mm a 2mm de diámetro, color negro a negro verdoso, halo negro o nulo, Gram + (**Figura 13b**).

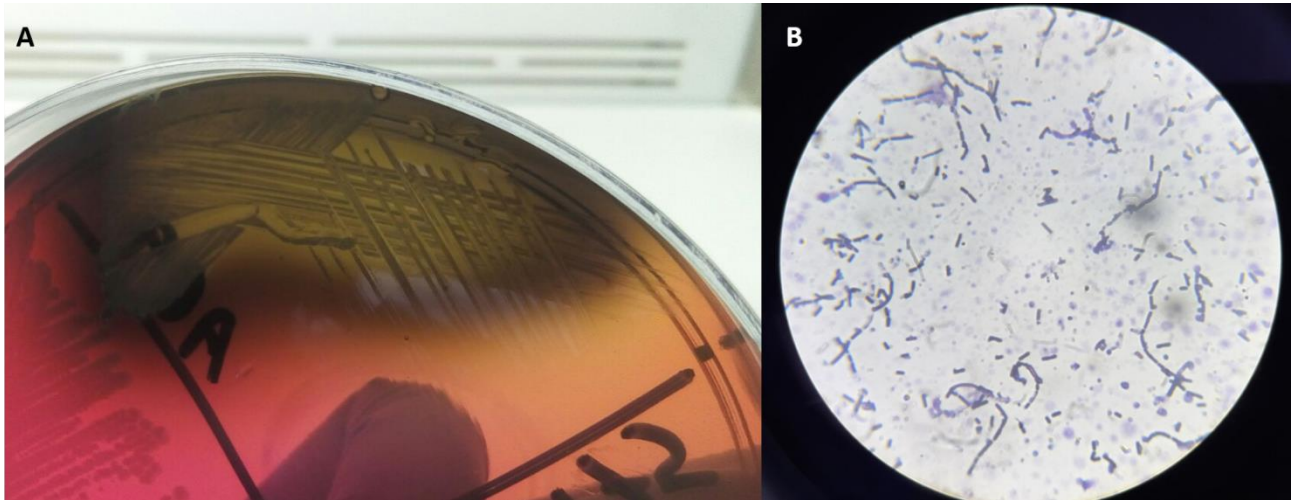


Figura 13. Aislamiento selectivo para *Listeria* spp.

A. Morfología colonial de los crecimientos en agar PALCAM (Foto representativa).

B. Tinción de Gram. Nótese la morfología de la bacteria: bacilo muy corto Gram+.

Posteriormente al aislamiento, las cepas fueron sometidas a la identificación molecular con los genes Lip1 y Lip2, Prs, Ino2 y Lis1, sin embargo, ninguno de estos amplificó. Posteriormente se utilizaron los oligonucleótidos 8F y 1510R para la identificación de estos aislados, los cuales fueron identificados como *E. coli*, *Enterococcus* spp., *Staphylococcus sciuri* y *Lysinibacillus* spp (**Apéndice 5**).

7.4 Factores de riesgo

Los resultados obtenidos con la prueba Lip1 y Lip2 para ardillones mostraron que los factores de riesgo juvenil, hembra, C1, C2 y C4 tienen una mayor probabilidad de riesgo de presentar *Listeria* spp. En contraste, los grupos adulto, macho y C3 muestran ser factores

de protección. Los resultados para tlacuaches con la misma prueba muestran que los factores de riesgo juvenil, macho y Zona urbana tienen mayor probabilidad de riesgo de presentar *Listeria* spp. mientras que con los grupos adulto, hembra y zona periurbana muestran ser factores de protección.

Los resultados obtenidos con la prueba Prs para ardillones mostraron que los factores de riesgo adulto, hembra, C2 y C1 tienen una mayor probabilidad de riesgo, mientras que juveniles, macho, C1, C3 y C4 muestran ser factores de protección. Para el caso de tlacuaches solamente el factor de riesgo Macho tiene una mayor probabilidad de riesgo ya que los demás factores se invalidan en el cálculo de OR debido a que uno (o más) valores son 0. Cada uno de los resultados fueron analizados mediante la comparación de proporciones mediante la prueba de χ^2 o Exacto de Fisher según fuese el caso (**Cuadro 7**).

La agrupación de factores de riesgo para ardillones mostró una tendencia de infección con *Listeria* spp. para los especímenes adultos (18 Machos y 16 Hembras), en comparación con los especímenes juveniles los cuales mostraron baja prevalencia de la bacteria (9 individuos). Sin embargo, los resultados de los tlacuaches no pudieron ser comparados con este método.

Cuadro 6. Factores de riesgo asociados a la prevalencia de *Listeria* spp.

Espécimen	Factor de Riesgo	Lip 1/2 positivo	Lip 1/2 negativo	χ^2 / Exacto de Fisher	OR	Prs positivo	Prs negativo	χ^2 / Exacto de Fisher	OR
Ardillones	Juvenil	9	10	0.669 ^a	1.24	1	18	0.685 ^b	0.39
	Adulto	34	47		0.8	10	71		2.54
	Macho	24	34	0.7 ^a	0.85	5	53	0.519 ^b	0.57
	Hembra	19	23		1.17	6	36		1.77
	C1	5	6	1 ^b	1.12	0	11	0.605 ^b	0*
	C2	18	20	0.49 ^a	1.33	7	31	0.098 ^b	3.27
	C3	7	10	0.868 ^a	0.91	2	15	1 ^b	1.1
	C4	13	17	0.965 ^a	1.02	2	28	0.497 ^b	0.48
	CD	0	4	0.132 ^b	0*	0	4	1 ^b	0*
Tlacuaches	Juvenil	2	14	1 ^b	1.29	0	16	0.492 ^b	0*
	Adulto	2	18		0.78	2	18		0*
	Macho	2	15	1 ^b	1.13	1	16	1 ^b	1.13
	Hembra	2	17		0.88	1	18		0.89
	Zona Urbana	3	17	0.613 ^b	2.65	0	20	0.19 ^b	NA
	Zona Periurbana	1	15		0.38	2	14		NA

a. Resultados analizados con la prueba de χ^2 .

b. Resultados analizados con la prueba de Exacto de Fisher.

*. El valor de OR igual a "0" es debido a que en el cálculo de OR uno de los valores es 0.

C1, Cuadrante 1; C2, Cuadrante 2; C3, Cuadrante 3; C4, Cuadrante 4; CD, Cuadrante desconocido.

7.5 Validación de las pruebas

Los resultados obtenidos para arpillones muestran que la prueba Lip1 y Lip2 es confiable, puesto que los valores de R^2 son cercanos a 1, así mismo los valores de la prueba Prs son de 0.79. En el caso de los tlacuaches, el valor de R^2 de las pruebas tanto para Lip1 y Lip2 como para Prs son menores a 0.2 (**Figura 14**).

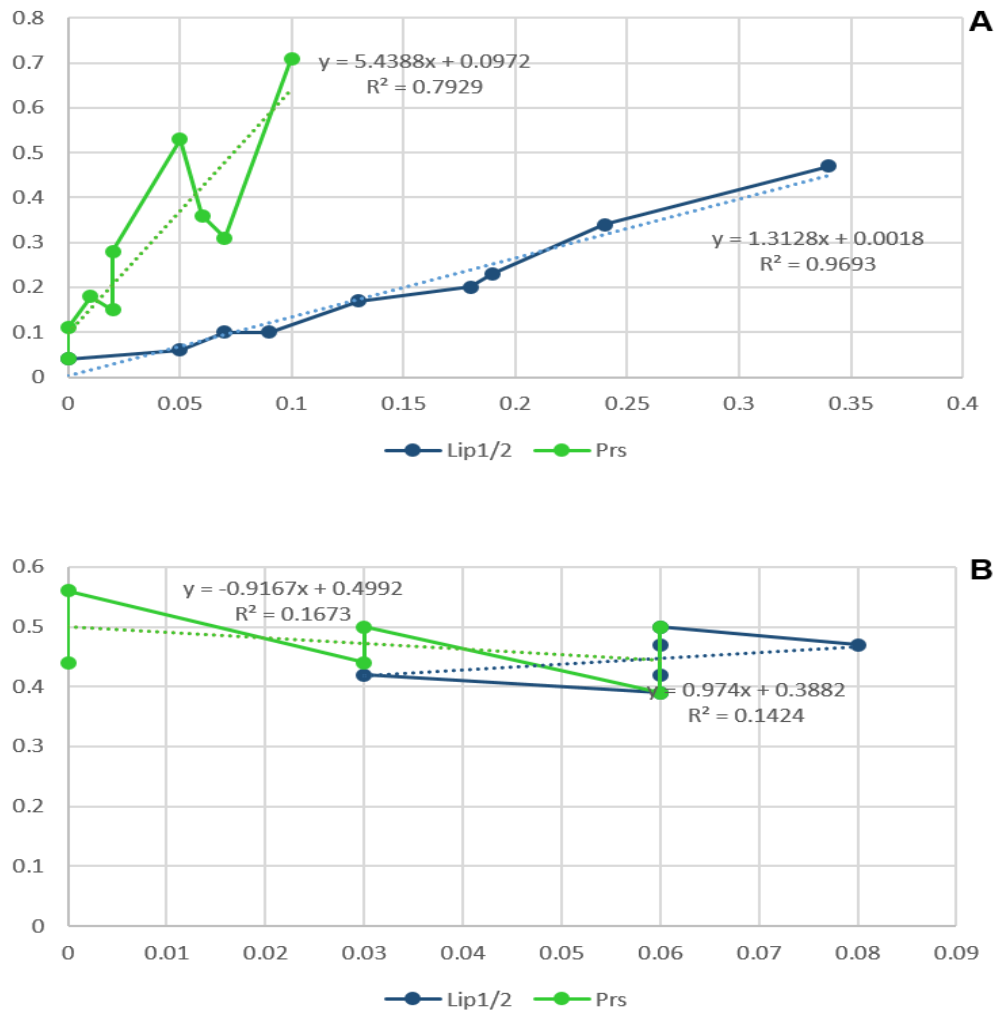


Figura 14. Gráficos de validación.

A. Gráfico de validación para arpillones, $R^2_{Lip1 \text{ y } Lip2}$: 0.9693; R^2_{Prs} : 0.7929.

B. Gráfico de validación para tlacuaches, $R^2_{Lip1 \text{ y } Lip2}$: 0.1424; R^2_{Prs} : 0.1673.

8. Discusión

Los productos de PCR tanto para Lip1 y Lip2 y Prs fueron del tamaño esperado: 264 pb para Lip1 y Lip2 y 370 pb para Prs. La especificidad de Lip1 y Lip2 fue la indicada ya que del total de las muestras, no se obtuvo bandas inespecíficas en ninguno de los casos; en contraparte los oligonucleótidos Prs sí mostraron bandas inespecíficas pero de tamaño distinto al esperado; en comparación con las bandas control, las inespecificidades fueron más grandes (aproximadamente 100 pb) lo cual permitió notar diferencias entre los productos de PCR verdaderamente positivos de los falsos positivos.

Las pruebas de sensibilidad de los oligonucleótidos determinaron que Lip1 y Lip2 son los más sensibles, logrando detectar hasta 47 pg de ADN, en contraparte los oligonucleótidos Prs fueron menos sensibles. Sin embargo se notó que para ambos oligonucleótidos mientras más baja fuese la concentración de ADN, se propiciaba la formación de heterodímeros (**Figura 8**). El análisis *in silico* de los oligonucleótidos mostró que ambos oligonucleótidos tienen probabilidad de formar heterodímeros, lo cual se refleja en la energía libre; el ΔG para la formación de heterodímeros calculado con el programa Oligo Analyzer (<https://www.idtdna.com/calc/analyzer>) fue de -8.16 kcal/mol para Lip1 y Lip2, mientras que para Prs fue de -3.9 kcal/mol. El valor de la energía libre óptimo para cada par de oligonucleótidos debe ser cercano a 0 ya que a partir de -9 kcal/mol se considera como secuencias problemáticas (Arif y Ochoa-Corona, 2013); si bien el valor de ΔG de ambos oligonucleótidos estaban dentro del rango permitido, la energía libre de los oligonucleótidos fue suficiente para provocar la formación de heterodímeros en la reacción. Los productos de PCR a 30 ciclos se muestran muy cercanos al doble de longitud del producto esperado (500 pb aproximadamente), interesantemente, a menor concentración es más evidente este fenómeno, lo cual se puede deber a la probabilidad de unión de los oligonucleótidos al ADN blanco; es decir mientras menos ADN bacteriano hay en la muestra, es más probable que los oligonucleótidos se unan a los amplicones generados en la reacción.

Las reacciones de PCR con los oligonucleótidos Lip1 y Lip2 y Prs como primer escrutinio fueron los indicados; tanto las especies más comunes del género *Listeria* como las escasas cuentan con la isla de patogenicidad LIPI-1, si bien algunas especies carecen de elementos dentro de esta isla de patogenicidad, todos comparten las regiones Prs y prfA. Los resultados presentados en este trabajo nos dan un panorama de la situación en el

ámbito de la presencia de *Listeria* en las poblaciones de fauna urbana. Las reacciones de PCR con los oligonucleótidos Lip1 y Lip2 tuvieron una alta tasa de identificación, en contraste con los oligonucleótidos Prs.

Diversos autores recomiendan la preservación de muestras a -20 °C y de ser posible, embebidos en alcohol etílico al 70-95 % (Abdelsalam *et al.*, 2017; Papaiakovou *et al.*, 2018), así mismo las muestras fecales (hisopados rectales) deben ser mantenidas en criopreservación desde el traslado hasta el procesamiento en el laboratorio. Además se recomienda evitar la congelación y descongelación de las muestras, preferentemente se deben alícuotar y preservar congeladas en un rango de temperatura de -20 °C o de ser posible a -70 °C (Wei Kai *et al.*, 2018). Sin embargo, los hisopos fecales de este estudio fueron mantenidas a 4 °C desde el momento que se tomaron, durante el transporte y posteriormente se preenriquecieron en el laboratorio, donde se dividió en dos alícuotas, una para extracción de DNA y otra para crecimiento microbiano a la cual se le adicionó glicerol (50 % volumen final), manteniendo ambas alícuotas a 0°C. Por lo que la baja prevalencia de *Listeria* con los oligonucleótidos Prs no se considera que sea un problema de la calidad de las muestras. No obstante, es posible que la diferencia de prevalencia entre oligonucleótidos, tenga que ver con la sensibilidad ya que las pruebas nos indican que los oligonucleótidos Lip1 y Lip2 son más sensible que los Prs.

Por otro lado los resultados de la validación de ambas pruebas nos dan una clara idea del poder estadístico para ambos especímenes, por una parte los ardillones muestran valores de R^2 por encima de 0.96 en el caso de la prueba Lip1 y Lip2 mientras que el valor de 0.79 para Prs es de tomar en cuenta. Estos resultados nos indican que la prueba Lip1 y Lip2 es capaz de dar un resultado correcto en el 96 % de los casos, mientras que la prueba Prs solo es capaz de dar un resultado correcto en el 79 % de los casos. Interesantemente, los tlacuaches han dado resultados muy distintos a los ardillones; los datos de la validación de la prueba nos arrojan valores de R^2 muy por debajo del 0.5, lo cual indica que es necesario contar con mayor robustez estadística incrementando la n. Es decir, si se incrementa el número de muestras, se podría tener un mayor número de puntos para la construcción del gráfico y en consecuencia el valor de R^2 puede aumentar. Por lo tanto, la prevalencia de *Listeria* spp. en este estudio se obtuvo mediante el gen *prfA* (Lip1 y Lip2) y no mediante el gen *Prs*.

La prevalencia de *Listeria* spp. para los tlacuaches fue menor que para ardillones (10.6 vs 43 %), observándose en tlacuaches una tendencia que relaciona la presencia de *Listeria* spp. con la zona urbana (OR= 2.65), sin embargo la comparación de prevalencias de la zona urbana con la periurbana no es estadísticamente significativa ($P>0.05$), esto puede ser por el tamaño de muestra. Ya que en total se obtuvieron 36 tlacuaches, en comparación con los ardillones (Un total de 100). Este problema se ve reflejado en la agrupación de los factores de riesgo, pues se obtuvo en total 4 especímenes positivos a *Listeria*, de los cuales 1 es un macho adulto, 1 es un macho juvenil, 1 es una hembra adulta y 1 es una hembra juvenil. No obstante, estos resultados nos dan un indicio del panorama respecto a la prevalencia de *Listeria* en los tlacuaches, si bien el tamaño de muestra es un punto en contra, los resultados mostrados pueden dar una idea del contexto como evidencia de una prueba piloto y seguir con las investigaciones para estos especímenes. En cambio la alta prevalencia de esta bacteria en la población de ardillones puede deberse a múltiples factores, los cuales pueden ser identificables debido a la restricción espacial de la colonia de ardillones. Uno de los principales puntos de referencia es la calidad del agua; *Listeria* ha sido identificada en múltiples superficies y ambientes, de los cuales el agua tratada es una de las principales fuentes de contaminación (Enweani, 2015; Frances *et al.*, 1991); los ardillones del parque la Alameda solamente tienen disponible agua tratada para riego, por lo cual se puede asociar la presencia de *Listeria* en estos especímenes. Si bien la identificación de la bacteria en agua es posible, en este estudio no se llevó a cabo dicho análisis. Otra de las posibles fuentes de infección para estos especímenes es el contacto con el humano. Sin embargo la prevalencia de los ardillones no pudieron ser comparados por zonas ya que solo se contó con el apoyo para el muestreo de la Alameda, quedando pendiente el muestreo de ardillones en zonas periurbanas. No obstante, los datos recabados mostraron un valor mayor de OR para el cuadrante 1 y 2, los cuales se caracterizaban por tener contacto con el comercio informal, (hasta el desalojo de los puestos en 2016), siendo los puestos de comida (tacos, gorditas, chicharrones) las potenciales fuentes de contaminación; además se sabe que la comida callejera mexicana se basa en el consumo de carne de cerdo, carne de res, y sus derivados los cuales han sido reportados como importantes fuentes de brotes de *Listeria* a nivel mundial (Gamboa-Marín *et al.*, 2012; Thévenot *et al.*, 2006); así mismo la basura generada por este tipo de comercio y la generada al interior del parque, pudieron ser una de las principales fuentes de alimentación

de los ardillones; inclusive hoy en día se puede avistar ardillones que hurgan en los botes de basura.

Listeria spp. se encuentra distribuida ampliamente, esta bacteria ha sido identificada en múltiples superficies y ambientes, así como en una gran variedad de animales sin presentarles daño aparente (Yoshida *et al.*, 2000). Si bien hasta la fecha no se tienen reportes de la presencia de *Listeria* en ardillones de la especie *O. Variegatus*, ni en tlacuaches de la especie *D. virginiana*; si se ha identificado la presencia de *L. monocytogenes* en distintas especies de roedores (Wang *et al.*, 2017), aves y animales de compañía (Dhama *et al.*, 2015), por lo que la presencia de *Listeria* en ardillones y tlacuaches pudo haberse originado por la transmisión por contacto con alguno de estos reservorios.

Los signos relacionados con la Listeriosis animal han sido observados en rumiantes cuyos síntomas abarcan diarrea, desorientación, depresión, fiebre y abortos (Nightingale *et al.*, 2004), sin embargo estos eventos no tienen un patrón temporal, ya que pueden aparecer desde el día 1 de la infección, o inclusive hasta que la enfermedad se encuentra muy avanzada (Roberts y Wiedmann, 2003). por lo que el transcurso desde la infección hasta la aparición de estos síntomas permanece asintomático (Bandelj *et al.*, 2018). Además no se ha registrado que ardillones y tlacuaches desarrollan la misma sintomatología que los rumiantes, por lo que no podemos asegurar que los especímenes muestreados padezcan la enfermedad o no. Sin embargo se pudo notar que ninguno de los especímenes padecía diarrea (con o sin sangre), no mostraban desorientación producto de meningitis (Vueltas alrededor de sí mismo) ni salivación excesiva; por lo que al momento del muestreo no había síntomas aparentes de Listeriosis. La temperatura cloacal promedio de los tlacuaches se ha reportado entre los 32 y 35 °C (Johnson-Delaney, 2014); los tlacuaches muestreados en este estudio tuvieron una temperatura promedio de 34 °C, lo cual está dentro del rango reportado. Así mismo, los ardillones varían sus temperaturas corporales a lo largo del día, la zona geográfica y de las estaciones del año, llegando a variar en un rango de los 30.2 °C hasta los 40.8 °C (Buck y Barnes, 1999). Los ardillones muestreados tuvieron una temperatura promedio de 38 °C, temperatura que se encuentra dentro del rango reportado. Estos datos nos permiten asegurar que los especímenes no estaban pasando por un cuadro febril, además junto con las observaciones realizadas se pudo sugerir que los especímenes no presentaban Listeriosis al momento del muestreo.

Los aislamientos obtenidos fueron identificados como *E. coli*, *Enterococcus* spp., *Staphylococcus sciuri* y *Lysinibacillus* spp. Dichas bacterias, en especial los cocos han sido fácilmente confundidos en cultivo PALCAM con las colonias de *Listeria* (Martínez-González *et al.*, 2014), por lo cual se recomienda el uso de pruebas bioquímicas y/o moleculares para reforzar la identificación. En este trabajo no se realizaron pruebas bioquímicas, por lo que solamente se realizó la técnica molecular para corroborar los aislamientos, sin embargo ninguno de estos fue identificado como *Listeria*.

La prueba microbiológica no fue suficientemente sensible ni específica para la identificación y aislamiento selectivo de *Listeria* spp. Dentro de las posibles causas de estos resultados está la recuperación microbiológica de las muestras. El manejo realizado en este trabajo utilizó como medio de transporte el medio AIMES; sin embargo diversos estudios recomiendan el uso de caldo infusión cerebro corazón más glicerol (vf. 15 %) y caldo Fraser como medio de transporte y/o medio de cultivo primario (Alonzo *et al.*, 2011; Capita *et al.*, 2000; Jones y D'Orazio, 2014) debido a que los componentes de estos caldos permiten que *Listeria* pueda desarrollarse mejor en competencia con otros géneros bacterianos, además el caldo Fraser es selectivo para *Listeria*, lo cual lo hace ideal para el aislamiento exclusivo de *Listeria*.

Las normas oficiales mexicanas para la detección de enteropatógenos, *Listeria* y otros agentes microbianos se basan únicamente en el aislamiento microbiológico y pruebas bioquímicas. En el presente estudio se evaluó la eficacia para la detección de *Listeria* spp. en muestras rectales tanto con métodos microbiológicos como con métodos moleculares. Los resultados mostrados anteriormente muestran la eficacia de la prueba molecular contra la prueba microbiológica, lo cual es un buen punto de argumentación para la reforma a las normas oficiales mexicanas. Las pruebas moleculares, en conjunto con las microbiológicas deben ser utilizadas en los métodos cotidianos de detección de agentes biológicos contaminantes en alimentos; no solo por lo rápido de la prueba sino por la sensibilidad y especificidad que brinda la combinación de ambas pruebas. No obstante, es importante mencionar que las muestras preenriquecidas fueron congeladas para ser aisladas posteriormente. (Saraka *et al.* (2015) reportaron que el almacenamiento bacteriano prolongado a temperaturas por arriba de los -80 °C conlleva a un decaimiento en la viabilidad de las bacterias. Así mismo, se ha observado que el uso de glicerol previene este efecto, sin embargo, la pérdida de viabilidad continua con el paso del tiempo (Oskouei *et al.*, 2010).

Por lo que dichos factores pudieran ser los causantes de que no se pudiese aislar *Listeria* spp. en este trabajo.

Por último, para mejorar los resultados obtenidos es necesario que se incrementen los tamaños de muestra para tlacuaches, de tal manera que podamos estimar con mayor exactitud la prevalencia e incidencia de *Listeria* spp. en las poblaciones urbanas y periurbanas, así mismo es necesario muestrear arpillones en zonas periurbanas con el fin de comparar las prevalencias de la bacteria como se realizó con los tlacuaches. Además, es importante obtener muestras de agua, suelo y pelaje a fin de evaluar las dinámicas que utiliza esta bacteria en su ambiente para sobrevivir y diseminarse.

Adicionalmente, los métodos de detección pueden ser mejorados al incluir pruebas más sensibles para la detección específica de *Listeria* spp. como la qPCR, la cual nos permitiría estimar la carga bacteriana de la muestra (Chen *et al.*, 2017). Así mismo se podría estandarizar pruebas de LAMP (Loop-mediated isothermal amplification), la cual permite realizar detecciones del patógeno con una alta sensibilidad (ficogramas de ADN purificado), además de que puede ser adaptada a campo (Pisamayarom *et al.*, 2017; Wachiralurpan *et al.*, 2018) haciéndola ideal para la detección de *Listeria* en los especímenes de zonas periurbanas o silvestres.

La diversidad microbiana del tracto gastrointestinal de ambos especímenes no se ha reportado hasta la fecha, por lo que un análisis metagenómico podría aportar mucha información respecto a la dinámica de poblaciones bacterianas en estos especímenes, así como su papel en el tracto gastrointestinal.

La implementación de estas pruebas permitiría dar una mejor explicación de la dinámica de infección de *Listeria*, su impacto en salud pública, así como la determinación de factores clave en la interacción *Listeria*-reservorio reservorio-humano. De esta manera podremos argumentar sobre la implementación de medidas para la prevención de la Listeriosis humana y animal.

9. Conclusiones

El presente trabajo es el primero que logra identificar *Listeria* spp. en *Otospermophilus variegatus* y en *Didelphis virginiana*. La prevalencia de este patógeno se encuentra altamente distribuida en las poblaciones de ardillones pero no en tlacuaches; sin embargo, la prevalencia de la bacteria en los tlacuaches es mayor en la zona urbana que en la zona periurbana.

La edad, sexo y sitio de captura no está relacionado con la presencia o ausencia de *Listeria* spp. en ardillones y tlacuaches.

Ninguno de los especímenes de ardillones y tlacuaches mostró signos relacionados con la Listeriosis, por lo que podemos argumentar que ambos especímenes son reservorios de *Listeria*.

Referencias

- Abdelsalam, I. M., Sarhan, R. M., y Hanafy, M. A. (2017). The Impact of Different Copro-preservation Conditions on Molecular Detection of *Cryptosporidium* Species. *Iran J Parasitol*, 12(2), 274–283. Retrieved from <http://ijpa.tums.ac.ir>
- Abu Aboud, O. A., Adaska, J. M., Williams, D. R., Rossitto, P. V., Champagne, J. D., Lehenbauer, T. W., Atwill, R., Li, X., Aly, S. S. (2016). Epidemiology of *Salmonella* sp. in California cull dairy cattle: prevalence of fecal shedding and diagnostic accuracy of pooled enriched broth culture of fecal samples. *PeerJ*, 4, e2386. <http://doi.org/10.7717/peerj.2386>
- Ahlstrom, C. A., Manuel, C. S., Den Bakker, H., Wiedmann, M., y Nightingale, K. K. (2018). Molecular Ecology of *Listeria* spp., *Salmonella*, *Escherichia coli* O157:H7, and non-O157 Shiga Toxin Producing *Escherichia coli* in Pristine Natural Environments in Northern Colorado. *Journal of Applied Microbiology*, 12(10), 3218–3221. <http://doi.org/10.1111/ijlh.12426>
- Alonzo, F., Bobo, L. D., Skiest, D. J., y Freitag, N. E. (2011). Evidence for subpopulations of *Listeria monocytogenes* with enhanced invasion of cardiac cells. *Journal of Medical Microbiology*, 60(4), 423–434. <http://doi.org/10.1099/jmm.0.027185-0>
- Angelidis, A. S., Smith, L. T., Hoffman, L. M., y Smith, G. M. (2002). Identification of *opuC* as a chill-activated and osmotically activated carnitine transporter in *Listeria monocytogenes*. *Applied and Environmental Microbiology*, 68(6), 2644–50. <http://doi.org/10.1128/AEM.68.6.2644-2650.2002>
- Angelo, K. M., Conrad, A. R., Saupe, A., Dragoo, H., West, N., Sorenson, A., Barnes, A., Doyle, M., Beal, J., Jackson, K. A., Stroika, S., Tarr, C., Kucerova, Z., Lance, S., Gould, L. H., Wise, M., Jackson, B. R. (2017). Multistate outbreak of *Listeria monocytogenes* infections linked to whole apples used in commercially produced, prepackaged caramel apples: United States, 2014-2015. *Epidemiology and Infection*, 145(5), 848–856. <http://doi.org/10.1017/S0950268816003083>
- Arif, M., y Ochoa-Corona, F. M. (2013). Comparative assessment of 5' A/T-rich overhang sequences with optimal and sub-optimal primers to increase PCR yields and sensitivity. *Molecular Biotechnology*, 55(1), 17–26. <http://doi.org/10.1007/s12033-012-9617-5>

- Armstrong, D. M., Fitzgerald, J. P., Meaney, C. A., y Fitzgerald, J. P. (2011). *Mammals of Colorado*. University Press of Colorado.
- Arteaga-Salazar, G. (2017). Prevalencia de *Salmonella* spp. en tlacuaches (*Didelphis virginiana*) en zonas urbanas y periurbanas de la ciudad de Santiago de Querétaro. Universidad Autónoma de Querétaro.
- Bandelj, P., Jamnikar-Ciglenecki, U., Ocepek, M., Blagus, R., y Vengust, M. (2018). Risk factors associated with fecal shedding of *Listeria monocytogenes* by dairy cows and calves. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, (April), 1773–1779. <http://doi.org/10.1111/jvim.15234>
- Bison-M. (2017). Rock Squirrel - *Otospermophilus variegatus grammurus*. Retrieved July 29, 2018, from <http://www.bison-m.org/booklet.aspx?id=050815>
- Bubert, A., Hein, I., Rauch, M., Lehner, A., Yoon, B., Goebel, W., y Wagner, M. (1999). Detection and Differentiation of *Listeria* spp. by a Single Reaction Based on Multiplex, *65*(10), 4688–4692.
- Buchrieser, C., Rusniok, C., Garrido, P., Hain, T., Scotti, M., Lampidis, R., Kärst, U., Chakraborty, T., Cossart, P., Kreft, J., Vazquez-Boland, J. A., Goebel, W., Glaser, P. (2011). Complete genome sequence of the animal pathogen *Listeria ivanovii*, which provides insights into host specificities and evolution of the genus *Listeria*. *Journal of Bacteriology*, *193*(23), 6787–8. <http://doi.org/10.1128/JB.06120-11>
- Buck, C. L., y Barnes, B. M. (1999). Free-Living Arctic Ground Squirrels. *Journal of Mammalogy*, *80*(2), 430–442. <http://doi.org/10.1016/j.jbankfin.2011.02.009>
- Burall, L. S., Grim, C. J., y Datta, A. R. (2017). A clade of *Listeria monocytogenes* serotype 4b variant strains linked to recent listeriosis outbreaks associated with produce from a defined geographic region in the US. *PLoS ONE*, *12*(5), 1–17. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0176912>
- Camargo, A. C., Lafisca, A., Cossi, M. V. C., Lanna, F. G. P. A., Dias, M. R., de Arruda Pinto, P. S., y Nero, L. A. (2014). Low Occurrence of *Listeria monocytogenes* on Bovine Hides and Carcasses in Minas Gerais State, Brazil: Molecular Characterization and Antimicrobial Resistance. *Journal of Food Protection*, *77*(7), 1148–1152. <http://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-13-434>

- Capita, R., Alonso-Calleja, C., García-Arias, M. T., Moreno, B., y García-Fernández, M. C. (2000). Evaluation of Fraser Broth to Isolate *Listeria* from Poultry. *LWT - Food Science and Technology*, 33(8), 560–563. <http://doi.org/10.1006/fstl.2000.0712>
- Casey, A., McAuliffe, O., Coffey, A., Hunt, K., Fanning, S., Fox, E., y Jordan, K. (2015). Complete Genome Sequence of *Listeria monocytogenes* Strain DPC6895, a Serotype 1/2b Isolate from Bovine Raw Milk. *Genome Announcements*, 3(3). <http://doi.org/10.1128/genomeA.00629-15>
- CDC. (2017). Symptoms and Sources of Food Poisoning. Retrieved April 12, 2018, from <https://www.cdc.gov/foodsafety/symptoms.html>
- Chen, J.-Q., Healey, S., Regan, P., Laksanalamai, P., y Hu, Z. (2017). PCR-based methodologies for detection and characterization of *Listeria monocytogenes* and *Listeria ivanovii* in foods and environmental sources. *Food Science and Human Wellness*, 6(2), 39–59. <http://doi.org/10.1016/j.fshw.2017.03.001>
- Cheng, C., Chen, J., Shan, Y., Fang, C., Liu, Y., Xia, Y., Song, H., Fang, W. (2013). *Listeria monocytogenes* ArcA contributes to acid tolerance. *Journal of Medical Microbiology*, 62(PART6), 813–821. <http://doi.org/10.1099/jmm.0.055145-0>
- Chiara, M., Caruso, M., D'Erchia, A. M., Manzari, C., Fracalvieri, R., Goffredo, E., Latorre, L., Miccolupo, A., Padalino, I., Santagada, G., Chiocco, D., Pesole, G., Horner, D. S., Parisi, A. (2015). Comparative Genomics of *Listeria Sensu Lato*: Genus-Wide Differences in Evolutionary Dynamics and the Progressive Gain of Complex, Potentially Pathogenicity-Related Traits through Lateral Gene Transfer. *Genome Biology and Evolution*, 7(8), 2154–72. <http://doi.org/10.1093/gbe/evv131>
- Cloud-Hansen, K. A., Villiard, K. M., Handelsman, J., y Carey, H. V. (2007). Thirteen-lined ground squirrels (*Spermophilus tridecemlineatus*) harbor multiantibiotic-resistant bacteria. *Journal of the American Association for Laboratory Animal Science*, 46(3), 17–20. Retrieved from <Go to ISI>://000246535200003
- Cossart, P., y Lebreton, A. (2014). A trip in the “new Microbiology” with the bacterial pathogen *Listeria monocytogenes*. *FEBS Letters*, 588(15), 2437–2445. <http://doi.org/10.1016/j.febslet.2014.05.051>
- Cossart, P., y Toledo-Arana, A. (2008). *Listeria monocytogenes*, a unique model in infection

- biology: an overview. *Microbes and Infection*, 10(9), 1041–1050.
<http://doi.org/10.1016/j.micinf.2008.07.043>
- Crump, J. A., Sjölund-Karlsson, M., Gordon, M. A., y Parry, C. M. (2015). Epidemiology, clinical presentation, laboratory diagnosis, antimicrobial resistance, and antimicrobial management of invasive *Salmonella* infections. *Clinical Microbiology Reviews*, 28(4), 901–937. <http://doi.org/10.1128/CMR.00002-15>
- Dashti, A. A., Jadaon, M. M., Abdulsamad, A. M., y Dashti, H. M. (2009). Heat Treatment of Bacteria: A Simple Method of DNA Extraction for Molecular Techniques. *Kuwait Medical Journal*, 41(2), 117–122. Retrieved from <Go to ISI>://WOS:000266228900006
- Davis, W. M. (2017). ApE- A plasmid Editor. Retrieved from <http://biologylabs.utah.edu/jorgensen/wayned/ape/>
- de las Heras, A., Cain, R. J., Bielecka, M. K., y Vázquez-Boland, J. A. (2011). Regulation of *Listeria* virulence: PrfA master and commander. *Current Opinion in Microbiology*, 14(2), 118–127. <http://doi.org/10.1016/j.mib.2011.01.005>
- den Bakker, H. C., Bundrant, B. N., Fortes, E. D., Orsi, R. H., y Wiedmann, M. (2010). A population genetics-based and phylogenetic approach to understanding the evolution of virulence in the genus *Listeria*. *Applied and Environmental Microbiology*, 76(18), 6085–100. <http://doi.org/10.1128/AEM.00447-10>
- den Bakker, H. C., Cummings, C. A., Ferreira, V., Vatta, P., Orsi, R. H., Degoricija, L., Barker, M., Petrauskene, O., Furtado, M. R., Wiedmann, M. (2010). Comparative genomics of the bacterial genus *Listeria*: Genome evolution is characterized by limited gene acquisition and limited gene loss. *BMC Genomics*, 11, 688. <http://doi.org/10.1186/1471-2164-11-688>
- den Bakker, H. C., Manuel, C. S., Fortes, E. D., Wiedmann, M., y Nightingale, K. K. (2013). Genome sequencing identifies *Listeria fleischmannii* subsp. *coloradonensis* subsp. nov., isolated from a ranch. *INTERNATIONAL JOURNAL OF SYSTEMATIC AND EVOLUTIONARY MICROBIOLOGY*, 63(Pt 9), 3257–3268. <http://doi.org/10.1099/ijs.0.048587-0>
- den Bakker, H. C., Warchocki, S., Wright, E. M., Allred, A. F., Ahlstrom, C., Manuel, C. S., Stasiewicz, M. J., Burrell, A., Roof, S., Strawn, L. K., Fortes, E., Nightingale, K. K.,

- Kephart, D., Wiedmann, M. (2014). *Listeria floridensis* sp. nov., *Listeria aquatica* sp. nov., *Listeria cornellensis* sp. nov., *Listeria riparia* sp. nov. and *Listeria grandensis* sp. nov., from agricultural and natural environments. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 64(PART 6), 1882–1889. <http://doi.org/10.1099/ijs.0.052720-0>
- Dhama, K., Karthik, K., Tiwari, R., Shabbir, M. Z., Barbuddhe, S., Malik, S. V. S., y Singh, R. K. (2015). Listeriosis in animals, its public health significance (food-borne zoonosis) and advances in diagnosis and control: a comprehensive review. *Veterinary Quarterly*, 35(4), 211–235. <http://doi.org/10.1080/01652176.2015.1063023>
- Domínguez-Bernal, G., Müller-Altrock, S., González-Zorn, B., Scotti, M., Herrmann, P., Monzó, H. J., Lacharme, L., Kreft, J., Vázquez-Boland, J. A. (2006). A spontaneous genomic deletion in *Listeria ivanovii* identifies LIPI-2, a species-specific pathogenicity island encoding sphingomyelinase and numerous internalins. *Molecular Microbiology*, 59(2), 415–432. <http://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2005.04955.x>
- ECDC. (2018). *Listeria monocytogenes* outbreak: 47 cases including 9 deaths. Retrieved from <https://ecdc.europa.eu/en/news-events/listeria-monocytogenes-outbreak-47-cases-including-9-deaths>
- Edwards, M. C., y Gibbs, R. A. (1994). Multiplex PCR : Advantages , Development , and Applications. Retrieved from <https://genome.cshlp.org/content/3/4/S65.long>
- Enweani, I. B. (2015). Isolation of *Listeria* species from water bodies , sewage and soil samples, (August 2003).
- Espinoza Gómez, F., Newton Sánchez, O., Melnikov, V., y Pinzón S., L. (2006). Peritonitis bacteriana espontánea por *Listeria monocytogenes*, en un paciente con cirrosis hepática. Caso clínico. *Revista Espanola de Enfermedades Digestivas*, 101(9), 653. <http://doi.org/10.4321/S1130-01082009000900010>
- FDA. (2018). Foodborne Illnesses: What You Need to Know. Retrieved April 12, 2018, from <https://www.fda.gov/Food/FoodbornellnessContaminants/FoodbornellnessesNeedToKnow/default.htm>
- Fleer, K. A., Foley, P., Calder, L., y Foley, J. E. (2011). Arthropod Vectors and Vector-Borne Bacterial Pathogens in Yosemite National Park. *Journal of Medical Entomology*, 48(1),

101–110. <http://doi.org/10.1603/ME10040>

- Fouks, Y., Amit, S., Many, A., Haham, A., Mandel, D., y Shinar, S. (2017). Listeriosis in pregnancy: under-diagnosis despite over-treatment. *Nature Publishing Group*, 38(10), 26–30. <http://doi.org/10.1038/jp.2017.145>
- Frances, N., Hornby, H., y Hunter, P. R. (1991). The isolation of *Listeria* species from fresh-water sites in Cheshire and North Wales. *Epidemiology and Infection*, 107(1), 235–238. <http://doi.org/10.1017/S0950268800048858>
- Gahan, C. G. M., y Hill, C. (2005). Gastrointestinal phase of *Listeria monocytogenes* infection. *Journal of Applied Microbiology*, 98(6), 1345–1353. <http://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2005.02559.x>
- Gahan, C. G. M., y Hill, C. (2014). *Listeria monocytogenes*: survival and adaptation in the gastrointestinal tract. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 4(February), 1–7. <http://doi.org/10.3389/fcimb.2014.00009>
- Gallina, S., y López-González, C. (2011). Manual de técnicas para el estudio de la fauna. Manual de Técnicas para el estudio de la Fauna (Volumen 1). Querétaro, México: Universidad Autónoma de Querétaro-Instituto de Ecología A. C. Retrieved from http://www.uaq.mx/FCN/Investigacion/MANUAL_DE_TECNICAS_PARA_EL_ESTUDIO_DE_LA_FAUNA.pdf
- Gamboa-Marín, A., Buitrago, S. M., Pérez-Pérez, K., Mercado, M. R., Poutou-Piñales, R., y Carrascal-Camacho, A. (2012). Prevalence of *Listeria monocytogenes* in pork-meat and other processed products from the Colombian swine industry, 17(1), 2827–2833. Retrieved from <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=69323749004>
- Garrido, A., Chapela, M. J., Román, B., Fajardo, P., Vieites, J. M., y Cabado, A. G. (2013). In-house validation of a multiplex real-time PCR method for simultaneous detection of *Salmonella* spp., *Escherichia coli* O157 and *Listeria monocytogenes*. *International Journal of Food Microbiology*, 164(1), 92–98. <http://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2013.03.024>
- Glaser, P., Frangeul, L., Buchrieser, C., Rusniok, C., Amend, A., Baquero, F., Berche, P., Bloecker, H., Brandt, P., Chakraborty, T., Charbit, A., Chetouani, F., Couvé, E., De Daruvar, A., Dehoux, P., Domann, E., Domínguez-Bernal, G., Duchaud, E., Durant, L.,

- Dussurget, O., Entian, K. D., Fsihi, H., Garcia-Del Portillo, F., Garrido, P., Gautier, L., Goebel, W., Gómez-López, N., Hain, T., Hauf, J., Jackson, D., Jones, L. M., Kaerst, U., Kreft, J., Kuhn, M., Kunst, F., Kurapkat, G., Madueño, E., Maitournam, A., Mata Vicente, J., Ng, E., Nedjari, H., Nordsiek, G., Novella, S., De Pablos, B., Pérez-Díaz, J. C., Purcell, R., Remmel, B., Rose, M., Schlueter, T., Simoes, N., Tierrez, A., Vázquez-Boland, J. A., Voss, H., Wehland, J., Cossart, P. (2001). Comparative genomics of *Listeria* species. *Science*, 294(5543), 849–852. <http://doi.org/10.1126/science.1063447>
- Griffiths, M. W. (2003). *Listeria*. Properties and Occurrence. *American Journal of Clinical Nutrition*, (1996), 779–786.
- Gu, W., Dutta, V., Patrick, M., Bruce, B. B., Geissler, A., Huang, J., Fitzgerald, C., Henao, O. (2018). Statistical adjustment of culture-independent diagnostic tests for trend analysis in the Foodborne Diseases Active Surveillance Network (FoodNet), USA. *International Journal of Epidemiology*, (March), 1–10. <http://doi.org/10.1093/ije/dyy041>
- Guzmán-de-Peña, D., y Peña-Cabriales, J. J. (2005). Regulatory considerations of aflatoxin contamination of food in Mexico. *Revista Latinoamericana de Microbiología*, 47(3-4), 160–4. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17061539>
- Hadjilouka, A., Paramithiotis, S., y Drosinos, E. H. (2018). Genetic Analysis of the *Listeria* Pathogenicity Island 1 of *Listeria monocytogenes* 1/2a and 4b Isolates. *Current Microbiology*, 75(7), 857–865. <http://doi.org/10.1007/s00284-018-1458-4>
- Hain, T., Steinweg, C., Kuenne, C. T., Billion, A., Ghai, R., Chatterjee, S. S., Domann, E., Karst, U., Goesmann, A., Bekel, T., Bartels, D., Kaiser, O., Meyer, F., Pühler, A., Weisshaar, B., Wehland, J., Liang, C., Dandekar, T., Lampidis, R., Kreft, J., Goebel, W., Chakraborty, T. (2006). Whole-genome sequence of *Listeria welshimeri* reveals common steps in genome reduction with *Listeria innocua* as compared to *Listeria monocytogenes*. *Journal of Bacteriology*, 188(21), 7405–7415. <http://doi.org/10.1128/JB.00758-06>
- Hall, T. (2005). BioEdit Sequence Alignment Editor. Retrieved from <http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html>
- Hamon, M., Bierne, H., y Cossart, P. (2006). *Listeria monocytogenes*: A multifaceted model. *Nature Reviews Microbiology*, 4(6), 423–434. <http://doi.org/10.1038/nrmicro1413>

- Hayashidani, H., Kanzaki, N., Kaneko, Y., Okatani, A. T., Taniguchi, T., Kaneko, K., y Ogawa, M. (2002). Occurrence of Yersiniosis and Listeriosis in wild boars in Japan. *Journal of Wildlife Diseases*, 38(1), 202–205. <http://doi.org/10.7589/0090-3558-38.1.202>
- Hiyoshi, H., Wangdi, T., Lock, G., Saechao, C., Raffatellu, M., Cobb, B. A., y Bäumler, A. J. (2018). Mechanisms to Evade the Phagocyte Respiratory Burst Arose by Convergent Evolution in Typhoidal *Salmonella* Serovars, 70(12), 773–779. <http://doi.org/10.1016/j.celrep.2018.01.016>.
- Hogg, J. C., y Lehane, M. J. (1999). Identification of bacterial species associated with the sheep scab mite (*Psoroptes ovis*) by using amplified genes coding for 16S rRNA. *Applied and Environmental Microbiology*, 65(9), 4227–4229.
- Huang, B., Eglezos, S., Heron, B. A., Smith, H., Graham, T., Bates, J., y Savill, J. (2007). Comparison of multiplex PCR with conventional biochemical methods for the identification of *Listeria* spp. isolates from food and clinical samples in Queensland, Australia. *Journal of Food Protection*, 70(8), 1874–1880. <http://doi.org/10.4315/0362-028X-70.8.1874>
- ITIS. (2018). Standard Report Page: *Didelphis virginiana*. Retrieved July 28, 2018, from https://www.itis.gov/servlet/SingleRpt/SingleRpt?search_topic=TSNysearch_value=179921#null
- ITIS. (2018). Standard Report Page: *Listeria monocytogenes*. Retrieved June 8, 2018, from https://www.itis.gov/servlet/SingleRpt/SingleRpt?search_topic=TSNysearch_value=963001#null
- ITIS. (2018). Standard Report Page: *Otospermophilus variegatus*. Retrieved July 28, 2018, from https://www.itis.gov/servlet/SingleRpt/SingleRpt?search_topic=TSNysearch_value=930302#null
- Ivanek, R., Gröhn, Y. T., y Wiedmann, M. (2006). *Listeria monocytogenes* in Multiple Habitats and Host Populations: Review of Available Data for Mathematical Modeling, 3(4). <http://doi.org/10.1093/oxfordhb/9780199934874.013.0021>
- Jackson, B. R., Griffin, P. M., Cole, D., Walsh, K. A., y Chai, S. J. (2013). *Salmonella enterica*

Serotypes and Food Commodities ,. *Emerging Infectious Diseases*, 19(8), 1239–1244.
<http://doi.org/10.3201/eid1908.121511>

Jenkins, E., y Grundmann, A. W. (1973). The Parasitology of the Ground Squirrels of Western Utah. *Proc. Helm. Soc. Wash.*, 40(1), 76–86. Retrieved from <http://bionames.org/archive/issn/0018-0130/40/76.pdf>

Jiménez, F. A., Catzeflis, F., y Gardner, S. L. (2011). Structure of Parasite Component Communities of Didelphid Marsupials: Insights From a Comparative Study. *Journal of Parasitology*, 97(5), 779–787. <http://doi.org/10.1645/GE-2711.1>

Johnson, J., Jinneman, K., Stelma, G., Smith, B. G., Lye, D., Messer, J., Ulaszek, J., Ulaszek, J., Evsen, L., Gendel, S., Bennett, R W., Swaminathan, B., Pruckler, J., Steigerwalt, A., Kathariou, S., Yildirim, S., Volokhov, D., Rasooly, A., Chizhikov, V., Wiedmann, M., Fortes, E., Duvall, R. E., Hitchins, A. D. (2004). Natural atypical *Listeria innocua* strains with *Listeria monocytogenes* pathogenicity island 1 genes. *Applied and Environmental Microbiology*, 70(7), 4256–66. <http://doi.org/10.1128/AEM.70.7.4256-4266.2004>

Johnson-Delaney, C. (2014). Pet Virginia Opossums and Skunks. *Journal of Exotic Pet Medicine*, 23(4), 317–326. <http://doi.org/10.1053/j.jepm.2014.07.011>

Jones, G. S., y D’Orazio, S. E. F. (2014). *Listeria monocytogenes*: Cultivation and Laboratory Maintenance. *Nano*, 6(9), 2166–2171. <http://doi.org/10.1021/nl061786n.Core-Shell>

Jones, T. F., y Yackley, J. (2018). Foodborne Disease Outbreaks in the United States: A Historical Overview. *Foodborne Pathogens and Disease*, 15(1), 11–15. <http://doi.org/10.1089/fpd.2017.2388>

Jonquière, R., Pizarro-Cerda, J., y Cossart, P. (2001). Synergy between the N- and C-terminal domains of InlB for efficient invasion of non-phagocytic cells by *Listeria monocytogenes*. *Molecular Microbiology*, 42(4), 955–965. <http://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2001.02704.x>

Kayal, S., y Charbit, A. (2006). Listeriolysin O: A key protein of *Listeria monocytogenes* with multiple functions. *FEMS Microbiology Reviews*, 30(4), 514–529. <http://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2006.00021.x>

Kazmierczak, M. J., Mithoe, S. C., Boor, K. J., y Wiedmann, M. (2003). *Listeria*

- monocytogenes* sigma B regulates stress response and virulence functions. *Journal of Bacteriology*, 185(19), 5722–34. <http://doi.org/10.1128/JB.185.19.5722-5734.2003>
- Kew, M. C. (2013). Aflatoxins as a cause of hepatocellular carcinoma. *Journal of Gastrointestinal and Liver Diseases*, 22(3), 305–310.
- Kuenne, C., Billion, A., Mraheil, M. A., Strittmatter, A., Daniel, R., Goesmann, A., Barbuddhe, S., Hain, T., Chakraborty, T. (2013). Reassessment of the *Listeria monocytogenes* pan-genome reveals dynamic integration hotspots and mobile genetic elements as major components of the accessory genome. *BMC Genomics*, 14, 47. <http://doi.org/10.1186/1471-2164-14-47>
- Kumaraswamy, M., Do, C., Sakoulas, G., Nonejuie, P., Tseng, G. W., King, H., Fierer, J., Pogliano, J., Nizet, V. (2018). *Listeria monocytogenes* endocarditis: case report, review of the literature, and laboratory evaluation of potential novel antibiotic synergies. *International Journal of Antimicrobial Agents*, (2018). <http://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2017.12.032>
- Liu, D., Ainsworth, A. J., Austin, F. W., y Lawrence, M. L. (2004). PCR detection of a putative N-acetylmuramidase gene from *Listeria ivanovii* facilitates its rapid identification. *Veterinary Microbiology*, 101(2), 83–89. <http://doi.org/10.1016/j.vetmic.2004.03.015>
- Madigan, M. T., Martinko, J. M., Dunlap, P. V., y Clark, D. P. (2009). Listeriosis. In *Brock. Biología de los microorganismos* (12th ed., p. 1178). PEARSON EDUCACIÓN, S.A.
- Magnussen, A., y Parsi, M. A. (2013). Aflatoxins, hepatocellular carcinoma and public health. *World Journal of Gastroenterology*, 19(10), 1508–1512. <http://doi.org/10.3748/wjg.v19.i10.1508>
- Martínez-González, N. E., Martínez-Chávez, L., Cabrera-Díaz, E., Martínez-Cárdenas, C., Gutiérrez-González, P., y Castillo, A. (2016). Use of a novel medium, the Polymyxin Ceftazidime Oxford Medium, for isolation of *Listeria monocytogenes* from raw or non-pasteurized foods. *Food Microbiology*, 55, 105–111. <http://doi.org/10.1016/j.fm.2015.10.015>
- Martínez-González, N. E., Martínez-Chávez, L., Martínez-Cárdenas, C., Cabrera-Díaz, E., y Castillo, A. (2014). The Polymyxin Ceftazidime Oxford Medium as an alternative selective and differential medium for isolation of *Listeria monocytogenes* from raw or

unpasteurized food. *Food Microbiology*, 38, 44–51.
<http://doi.org/10.1016/j.fm.2013.07.010>

Matanock, A., Katz, L. S., Jackson, K. A., Kucerova, Z., Conrad, A. R., Glover, W. A., Jackson, B. R. (2015). Two *Listeria monocytogenes* Pseudo-outbreaks Caused by Contaminated Laboratory Culture Media. *Journal of Clinical Microbiology*, 54(3), 768–770. <http://doi.org/10.1128/JCM.02035-15>. Editor

Maury, M. M., Chenal-Francisque, V., Bracq-Dieye, H., Han, L., Leclercq, A., Vales, G., Moura, A., Gouin, E., Scotti, M., Disson, O., Vázquez-Boland, J. A., Lecuit, M. (2017). Spontaneous Loss of Virulence in Natural Populations of *Listeria monocytogenes*. *Infection and Immunity*, 85(11). <http://doi.org/10.1128/IAI.00541-17>

Máximo, H. J., Felizatti, H. L., Ceccato, M., Cintra-Socolowski, P., y Beretta, A. L. R. Z. (2014). Ants as vectors of pathogenic microorganisms in a hospital in São Paulo county, Brazil. *BMC Research Notes*, 7(1), 1–5. <http://doi.org/10.1186/1756-0500-7-554>

Mazza, R., Piras, F., Ladu, D., Putzolu, M., Consolati, S. G., y Mazzette, R. (2015). Identification of *Listeria* spp. strains isolated from meat products and meat production plants by multiplex polymerase chain reaction. *Italian Journal of Food Safety*, 4(4), 4–7. <http://doi.org/10.4081/ijfs.2015.5498>

McRuer, D. L., y Jones, K. D. (2009). Behavioral and Nutritional Aspects of the Virginian Opossum (*Didelphis virginiana*). *Veterinary Clinics of North America - Exotic Animal Practice*, 12(2), 217–236. <http://doi.org/10.1016/j.cvex.2009.01.007>

Medina-Romero, M., Goyenechea, I., y Castillo-Cerón, J. (2012). Phylogenetic measures applied to the conservation of Mexican marsupials. *Revista Mexicana de Biodiversidad*, 83(4), 1215–1226. <http://doi.org/10.7550/rmb.30966>

Milohanic, E., Glaser, P., Coppée, J. Y., Frangeul, L., Vega, Y., Vázquez-Boland, J. A., Kunst, F., Cossart, P., Buchrieser, C. (2003). Transcriptome analysis of *Listeria monocytogenes* identifies three groups of genes differently regulated by PrfA. *Molecular Microbiology*, 47(6), 1613–1625. <http://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2003.03413.x>

Mohammed, H. O., Stipetic, K., McDonough, P. L., Gonzalez, R. N., Nydam, D. V., y Atwill, E. R. (2009). Identification of potential on-farm sources of *Listeria monocytogenes* in herds of dairy cattle. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 234(3),

673–673. <http://doi.org/10.2460/javma.234.5.673>

- Monet-Mendoza, A., Osorio-Sarabia, D., y García-Prieto, L. (2005). Helminths of the Virginia opossum *Didelphis virginiana* (Mammalia: Didelphidae) in Mexico. *The Journal of Parasitology*, 91(1), 213–219. <http://doi.org/10.1645/GE-273R>
- Mostowy, S., y Cossart, P. (2012). Virulence factors that modulate the cell biology of *Listeria* infection and the host response. *Advances in Immunology* (1st ed., Vol. 113). Elsevier Inc. <http://doi.org/10.1016/B978-0-12-394590-7.00007-5>
- Murphy, S. M., y Linhart, Y. B. (1999). Comparative morphology of the gastrointestinal tract in the feeding specialist *Sciurus aberti* and several generalist congeners. *Journal of Mammalogy*, 80(4), 1325–1330. <http://doi.org/10.2307/1383182>
- Murray, E. G. D., Webb, R. A., y Swann, M. B. R. (1926). A disease of rabbits characterised by a large mononuclear leucocytosis, caused by a hitherto undescribed bacillus *Bacterium monocytogenes*. *The Journal of Pathology and Bacteriology*, 29(4), 407–439. <http://doi.org/10.1002/path.1700290409>
- Nightingale, K. K., Schukken, Y. H., Nightingale, C. R., Fortes, E. D., Ho, A. J., Her, Z., Grohn, Y. T., Wiedmann, M. (2004). Ecology and Transmission of *Listeria monocytogenes* Infecting Ruminants and in the Farm Environment. *APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY*, 70(8), 4458–4467. <http://doi.org/10.1128/AEM.70.8.4458>
- Núñez-Montero, K., Leclercq, A., Moura, A., Vales, G., Peraza, J., Pizarro-Cerdá, J., y Lecuit, M. (2018a). *Listeria costaricensis* sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 68(3), 844–850. <http://doi.org/10.1099/ijsem.0.002596>
- Núñez-Montero, K., Leclercq, A., Moura, A., Vales, G., Peraza, J., Pizarro-Cerdá, J., y Lecuit, M. (2018b). *Listeria costaricensis* sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 68(3), 844–850. <http://doi.org/10.1099/ijsem.0.002596>
- Olvera-Ramírez, A., López-González, C. A., Arteaga Salazar, G., Salas-Rosas, L. M., y Molina-Vera, C. (2017). Abundancia de ardillones (*Otospermophilus variegatus*) y su potencial de riesgo en salud pública en alameda hidalgo, Querétaro.
- Orsi, R. H., y Wiedmann, M. (2016). Characteristics and distribution of *Listeria* spp., including *Listeria* species newly described since 2009. *Applied Microbiology and Biotechnology*,

100(12), 5273–5287. <http://doi.org/10.1007/s00253-016-7552-2>

- Oskoueï, D. D., Bekmen, N., Ellidokuz, H., y Yilmaz, Ö. (2010). Evaluation of different cryoprotective agents in maintenance of viability of *Helicobacter pylori* in stock culture media. *Brazilian Journal of Microbiology*, 41(4), 1038–1046. <http://doi.org/10.1590/S1517-838220100004000023>
- Pagliano, P., Arslan, F., y Ascione, T. (2017). Epidemiology and treatment of the commonest form of listeriosis: Meningitis and bacteraemia. *Infezioni in Medicina*, 25(3), 210–216.
- Papaiakovou, M., Pilotte, N., Baumer, B., Grant, J., Asbjornsdottir, K., Schaer, F., Gray, D. J., Williams, S. A. (2018). A comparative analysis of preservation techniques for the optimal molecular detection of hookworm DNA in a human fecal specimen. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 12(1), 1–17. <http://doi.org/10.1371/journal.pntd.0006130>
- Parisi, A., Crump, J. A., Glass, K., Howden, B. P., Furuya-Kanamori, L., Vilkins, S., Gray, D. J., Kirk, M. D. (2018). Health Outcomes from Multidrug-Resistant *Salmonella* Infections in High-Income Countries: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Foodborne Pathogens and Disease*, 15(7), fpd.2017.2403. <http://doi.org/10.1089/fpd.2017.2403>
- Pirie, J. H. H. (1940). *Listeria*: Change of Name for a Genus Bacteria. *Nature*, 145(3668), 264–264. <http://doi.org/10.1038/145264a0>
- Pisamayaron, K., Suriyasomboon, A., y Chaumpluk, P. (2017). Simple screening of *Listeria monocytogenes* based on a fluorescence assay via a laminated lab-on-paper chip. *Biosensors*, 7(4). <http://doi.org/10.3390/bios7040056>
- Pizarro-Cerdá, J., Kühbacher, A., y Cossart, P. (2012). Entry of *Listeria monocytogenes* in mammalian epithelial cells: an updated view. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 2(11), a010009. <http://doi.org/10.1101/cshperspect.a010009>
- Poland, J. D., y Dennis, D. T. (1969). Treatment of Plague. *Plague Manual - Epidemiology Distribution, Surveillance and Control*, 9, 209–17. <http://doi.org/10.1017/S1026881200147841>
- Portman, J. L., Dubensky, S. B., Peterson, B. N., Whiteley, A. T., y Portnoy, D. A. (2017). Activation of the *Listeria monocytogenes* Virulence Program by a Reducing Environment. *mBio*, 8(5), e01595–17. <http://doi.org/10.1128/mBio.01595-17>

- Rajabian, T., Gavicherla, B., Heisig, M., Müller-Altrock, S., Goebel, W., Gray-Owen, S. D., y Ireton, K. (2009). The bacterial virulence factor InlC perturbs apical cell junctions and promotes cell-to-cell spread of *Listeria*. *Nature Cell Biology*, 11(10), 1212–8. <http://doi.org/10.1038/ncb1964>
- Rattanachaikunsopon, P., y Phumkhachorn, P. (2012). Identification of Viable *Listeria* Species Based on Reverse Transcription-Multiplex PCR (RT-MPCR) and Restriction Digestion. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 76(6), 1189–1194. <http://doi.org/10.1271/bbb.120066>
- Roberts, A. J., y Wiedmann, M. (2003). Pathogen, host and environmental factors contributing to the pathogenesis of listeriosis. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 60(5), 904–918. <http://doi.org/10.1007/s00018-003-2225-6>
- Rodriguez, L., Calabuig, R., LaRocco, M., Mood, F. G., y Miller, T. A. (1992). Bacterial flora of the gastrointestinal tract of opossums. *Veterinary Microbiology*, 30(2-3), 289–295. [http://doi.org/10.1016/0378-1135\(92\)90122-A](http://doi.org/10.1016/0378-1135(92)90122-A)
- Ryu, J., Park, S. H., Yeom, Y. S., Shrivastav, A., Lee, S. H., Kim, Y. R., y Kim, H. Y. (2013). Simultaneous detection of *Listeria* species isolated from meat processed foods using multiplex PCR. *Food Control*, 32(2), 659–664. <http://doi.org/10.1016/j.foodcont.2013.01.048>
- Sánchez Artola, B., y Palencia Herrejón, E. (2010). Infecciones por *Listeria*, 7(3), 1–4. Retrieved from http://www.facmed.unam.mx/deptos/microbiologia/pdf/Listerias_Medicine2010.pdf
- Saraka, N. D., Money, M., Doumbia, S., Cisse, S., Odi, N., Faye, K. H., y Dosso, M. (2015). The effects of storage conditions on the viability of enteropathogenic bacteria in biobanking of human stools: Cases of *Yersinia enterocolitica*, *Salmonella enterica Typhimurium* and *Vibrio cholerae* O: 1. *African Journal of Biotechnology*, 14(1), 38–41. <http://doi.org/10.5897/AJB2014.13668>
- Schoder, D., y Wagner, M. (2012). Growing awareness of asymptomatic carriage of *Listeria monocytogenes*. *Wiener Tierärztliche Monatsschrift*, 99(11-12), 322–329.
- Secretaría de Salud. (2018). Boletín Epidemiológico Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica Sistema Único de Información, 17–21. Retrieved from

https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/312847/BSEMANAL_12.pdf

- Seveau, S., Pizarro-Cerda, J., y Cossart, P. (2007). Molecular mechanisms exploited by *Listeria monocytogenes* during host cell invasion. *Microbes and Infection*, 9(10), 1167–1175. <http://doi.org/10.1016/j.micinf.2007.05.004>
- Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica, S. (2017). *Boletín Epidemiológico, semana 52 2017*.
- Sleator, R. D., Wouters, J., Gahan, C. G., Abee, T., y Hill, C. (2001). Analysis of the role of OpuC, an osmolyte transport system, in salt tolerance and virulence potential of *Listeria monocytogenes*. *Applied and Environmental Microbiology*, 67(6), 2692–8. <http://doi.org/10.1128/AEM.67.6.2692-2698.2001>
- Steinweg, C., Kuenne, C. T., Billion, A., Mraheil, M. A., Domann, E., Ghai, R., Hain, T. (2010). Complete genome sequence of *Listeria seeligeri*, a nonpathogenic member of the genus *Listeria*. *Journal of Bacteriology*, 192(5), 1473–4. <http://doi.org/10.1128/JB.01415-09>
- Takahashi, S., Tomita, J., Nishioka, K., Hisada, T., y Nishijima, M. (2014). Development of a prokaryotic universal primer for simultaneous analysis of Bacteria and Archaea using next-generation sequencing. *PLoS ONE*, 9(8). <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0105592>
- Tardieu, L., Adogwa, A. O., y Garcia, G. W. (2017). *Didelphis* species , neo-tropical animals with the potential for intensive production : Part 1 Review of taxonomy, natural history, general biology, animal behaviour, and nutrition, 94(April), 157–174.
- Thévenot, D., Dernburg, A., y Vernozy-Rozand, C. (2006). An updated review of *Listeria monocytogenes* in the pork meat industry and its products. *Journal of Applied Microbiology*, 101(1), 7–17. <http://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2006.02962.x>
- Thomas, D. M., y Stanton, N. L. (1994). Eimerian Species (*Apicomplexa, Eimeriina*) in Gunnisons Prairie Dogs (*Cynomys-Gunnisoni Zuniensis*) and Rock Squirrels (*Spermophilus-Variegatus Grammurus*) From Southeastern Utah. *Journal of the Helminthological Society of Washington*, 61(1), 17–21. Retrieved from <Go to ISI>://WOS:A1994MW49500003
- Tovar Pérez, G. I., Castillo Ramírez, I., Quiñónez Ramírez, E. I., y Rodas Suárez, O. R. (2005). *Listeria*. una aproximación práctica al microorganismo. *Revista Digital*

- Valdéz Alarcón, M., y Ceballos, G. (2005). Ardillón. In *Los mamíferos silvestres de México* (p. 453).
- van der Veen, S., y Abee, T. (2010). Importance of SigB for *Listeria monocytogenes* static and continuous-flow biofilm formation and disinfectant resistance. *Applied and Environmental Microbiology*, 76(23), 7854–60. <http://doi.org/10.1128/AEM.01519-10>
- van der Veen, S., y Abee, T. (2011). Contribution of *Listeria monocytogenes* RecA to acid and bile survival and invasion of human intestinal Caco-2 cells. *International Journal of Medical Microbiology*, 301(4), 334–340. <http://doi.org/10.1016/J.IJMM.2010.11.006>
- van Netten, P., Perales, I., van de Moosdijk, A., Curtis, G. D. W., y Mossel, D. A. A. (1989). Liquid and solid selective differential media for the detection and enumeration of *L. monocytogenes* and other *Listeria* spp. *International Journal of Food Microbiology*, 8(4), 299–316. [http://doi.org/10.1016/0168-1605\(89\)90001-9](http://doi.org/10.1016/0168-1605(89)90001-9)
- Vázquez-Boland, J. A., Domínguez-Bernal, G., González-Zorn, B., Kreft, J., y Goebel, W. (2001). Pathogenicity islands and virulence evolution in *Listeria*. *Microbes and Infection*, 3(7), 571–584. [http://doi.org/10.1016/S1286-4579\(01\)01413-7](http://doi.org/10.1016/S1286-4579(01)01413-7)
- Vera, A., González, G., Domínguez, M., y Bello, H. (2013). Principales factores de virulencia de *Listeria monocytogenes* y su regulación Main virulence factors of *Listeria monocytogenes* and its regulation. *Revista Chilena Infectol*, 30(4), 407–416. <http://doi.org/10.4067/S0716-10182013000400010>
- Volokhov, D. V, Duperrier, S., Neverov, A. A., George, J., Buchrieser, C., y Hitchins, A. D. (2007). The presence of the internalin gene in natural atypically hemolytic *Listeria innocua* strains suggests descent from *L. monocytogenes*. *Applied and Environmental Microbiology*, 73(6), 1928–39. <http://doi.org/10.1128/AEM.01796-06>
- Volokhov, D., George, J., Anderson, C., Duvall, R. E., y Hitchins, A. D. (2006). Discovery of natural atypical nonhemolytic *Listeria seeligeri* isolates. *Applied and Environmental Microbiology*, 72(4), 2439–48. <http://doi.org/10.1128/AEM.72.4.2439-2448.2006>
- Volokhov, D., Rasooly, A., Chumakov, K., y Chizhikov, V. (2002). Identification of *Listeria* species by microarray-based assay. *Journal of Clinical Microbiology*, 40(12), 4720–8.

<http://doi.org/10.1128/JCM.40.12.4720-4728.2002>

- Wacheck, S., Fredriksson-Ahomaa, M., Konig, M., Stolle, A., y Stephan, R. (2010). Wild Boars as an Importat Reservoir for Foodborn Pathogens. *Foodborne Pathog. Dis.*, 7(3), 307–312.
- Wachiralurpan, S., Sriyapai, T., Areekit, S., Sriyapai, P., Augkarawaritsawong, S., Santiwatanakul, S., y Chansiri, K. (2018). Rapid Colorimetric Assay for Detection of *Listeria monocytogenes* in Food Samples Using LAMP Formation of DNA Concatemers and Gold Nanoparticle-DNA Probe Complex. *Frontiers in Chemistry*, 6(April), 1–9. <http://doi.org/10.3389/fchem.2018.00090>
- Wang, Y., Lu, L., Lan, R., Salazar, J. K., Liu, J., Xu, J., y Ye, C. (2017). Isolation and characterization of *Listeria* species from rodents in natural environments in China. *Emerging Microbes and Infections*, 6(6). <http://doi.org/10.1038/emi.2017.28>
- Wei Kai, W., Chieh Chang, C., Suraphan, P., Rou An, C., Ming Shiang, W., Lee Yan, S., y Shan Chwen, C. (2018). Optimization of fecal sample processing for microbiome study - The journey from bathroom to bench. *Journal of the Formosan Medical Association*. <http://doi.org/10.1016/j.jfma.2018.02.005>
- Weindl, L., Frank, E., Ullrich, U., Heurich, M., Kleta, S., Ellerbroek, L., y Gareis, M. (2016). *Listeria monocytogenes* in Different Specimens from Healthy Red Deer and Wild Boars. *Foodborne Pathogens and Disease*, 13(7), 391–397. <http://doi.org/10.1089/fpd.2015.2061>
- Weller, D., Andrus, A., Wiedmann, M., y den Bakker, H. C. (2015). *Listeria booriae* sp. nov. and *Listeria newyorkensis* sp. nov., from food processing environments in the USA. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 65(1), 286–292. <http://doi.org/10.1099/ijs.0.070839-0>
- Werner, R. M., y Vick, J. A. (1977). Resistance of the opossum (*Didelphis virginiana*) to envenomation by snakes of the family crotolidae. *Toxicon*, 29(2 SUPPL), 55. [http://doi.org/10.1016/0041-0101\(77\)90066-6](http://doi.org/10.1016/0041-0101(77)90066-6)
- White, S. J., McClung, D. M., Wilson, J. G., Roberts, B. N., y Donaldson, J. R. (2015). Influence of pH on bile sensitivity amongst various strains of *Listeria monocytogenes* under aerobic and anaerobic conditions. *Journal of Medical Microbiology*, 64(11), 1287–

1296. <http://doi.org/10.1099/jmm.0.000160>

Whitfield, Y., Johnson, K., Hobbs, L., Middleton, D., Dhar, B., y Vrbova, L. (2017). Descriptive study of enteric zoonoses in Ontario, Canada, from 2010 - 2012. *BMC Public Health*, 17(1), 1–7. <http://doi.org/10.1186/s12889-017-4135-9>

WHO. (2015). WHO estimates of the global burden of foodborne diseases. *Who*.

WHO. (2016). Enfermedades de transmisión alimentaria. Retrieved April 11, 2018, from http://www.who.int/topics/foodborne_diseases/es/

WHO. (2017). Datos y cifras sobre las enfermedades de transmisión alimentaria. Retrieved April 11, 2018, from http://www.who.int/foodsafety/areas_work/foodborne-diseases/ferg_infographics/es/

Yoshida, T., Sugimoto, T., Sato, M., y Hirai, K. (2000). Incidence of *Listeria monocytogenes* in wild animals in Japan. *Journal of Veterinary Medical Science*, 62, 673–675. <http://doi.org/10.1292/jvms.62.673>

Zarza, H., y Medellín, R. A. (2005). Tlacuache. In *Los mamíferos silvestres de México* (pp. 108–109).

Zhang, Q., Feng, Y., Deng, L., Feng, F., Wang, L., Zhou, Q., y Luo, Q. (2011). SigB plays a major role in *Listeria monocytogenes* tolerance to bile stress. *International Journal of Food Microbiology*, 145(1), 238–243. <http://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2010.12.028>

Zoetendal, E. G., Akkermans, A. D., y Vos, W. M. (1998). Temperature gradient gel electrophoresis analysis of 16S rRNA from human fecal samples reveals stable and host-specific communities of active bacteria. *Appl Environ Microbiol*, 64(10), 3854–3859.

Apéndice

Apéndice 1. Carta de aceptación del comité de Bioética de la FCN, UAQ.



Universidad Autónoma de Querétaro

Facultad de Ciencias Naturales



Comité de Bioética

Querétaro, Qro. 12 de Marzo de 2018.

**CARLOS ALBERTO MOLINA VERA
LICENCIATURA EN MICROBIOLOGÍA
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES**

Estimado: Carlos Alberto Molina Vera,

Nos permitimos hacer de su conocimiento que el Comité de Bioética de la Facultad de Ciencias Naturales dio la siguiente resolución del proyecto de Investigación del cual usted es responsable:

Título	Resolución
"Identificación de <i>Listeria</i> spp. en fauna urbana (<i>Didelphis marsupialis</i> y <i>Otospermophilus variegatus</i>)". (15FCN2018)	Aprobado

Sin más por el momento, quedamos a sus órdenes para cualquier aclaración o duda.

Atentamente,

Dra. Diana Beatriz Rangel Peniche
Secretaria del Comité de Bioética
Facultad de Ciencias Naturales

Apéndice 2. Estandarización de las reacciones de PCR.

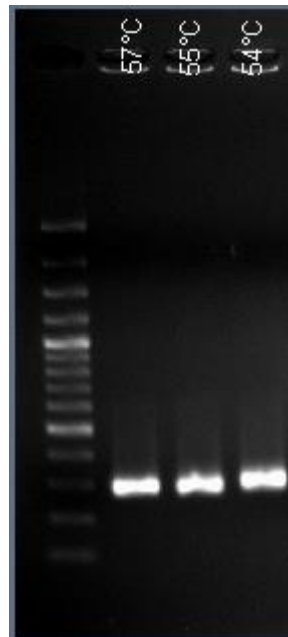


Figura SA.1 Prueba de estandarización de TM para oligonucleótidos Lip1 y Lip2.



Figura SA.2 Prueba de especificidad para oligonucleótidos Lip1 y Lip2.

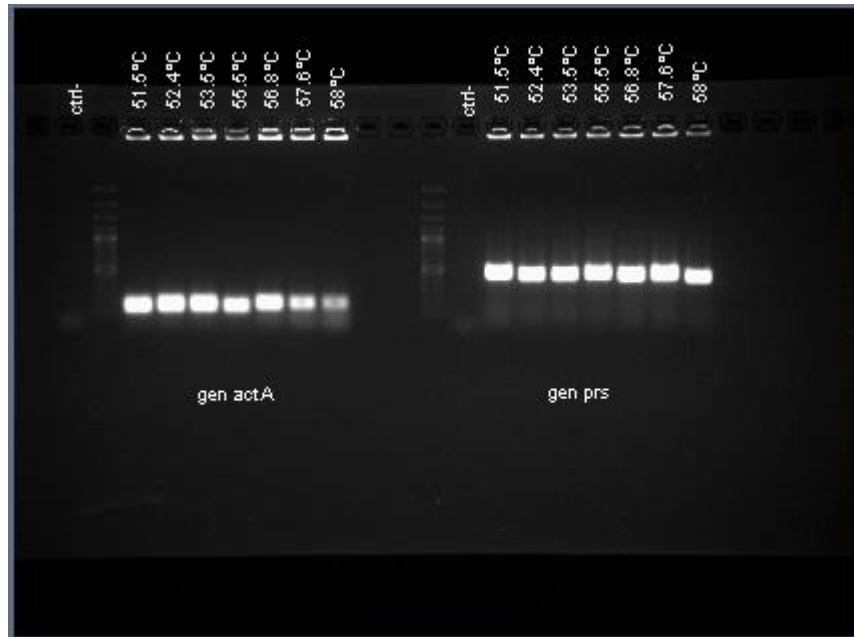


Figura SA.3 Prueba de estandarización de TM para oligonucleótidos ActA y Prs.

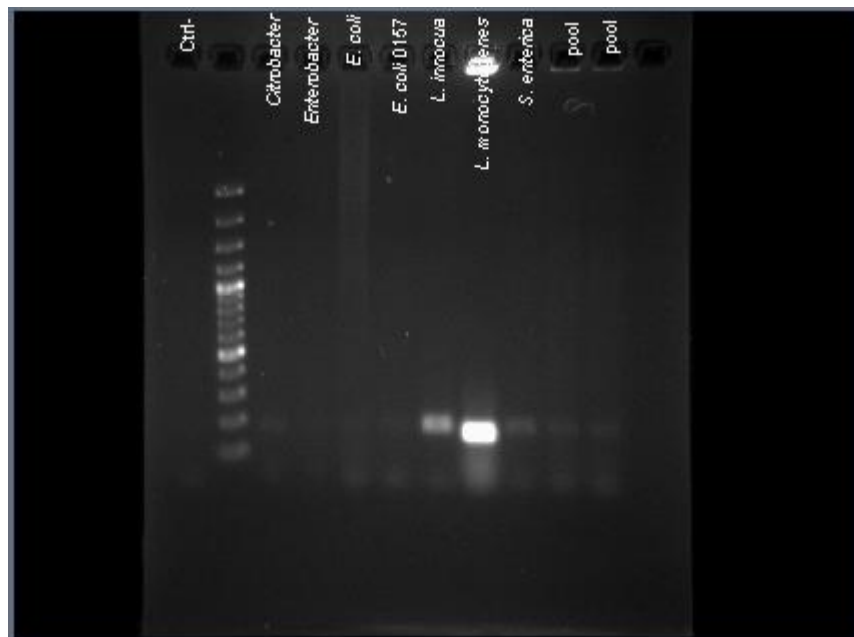


Figura SA.4 Prueba de especificidad para oligonucleótidos ActA.

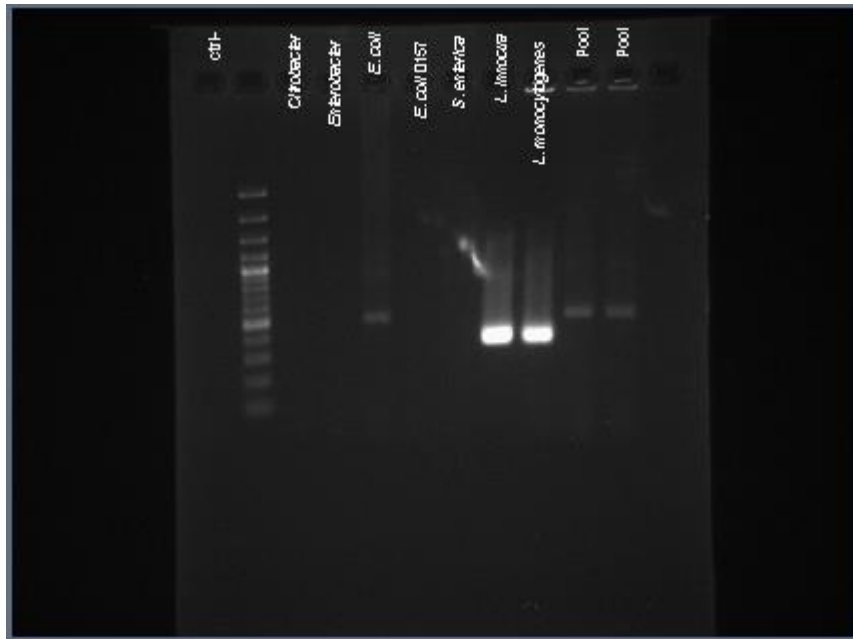


Figura SA.5 Prueba de especificidad para oligonucleótidos Prs.

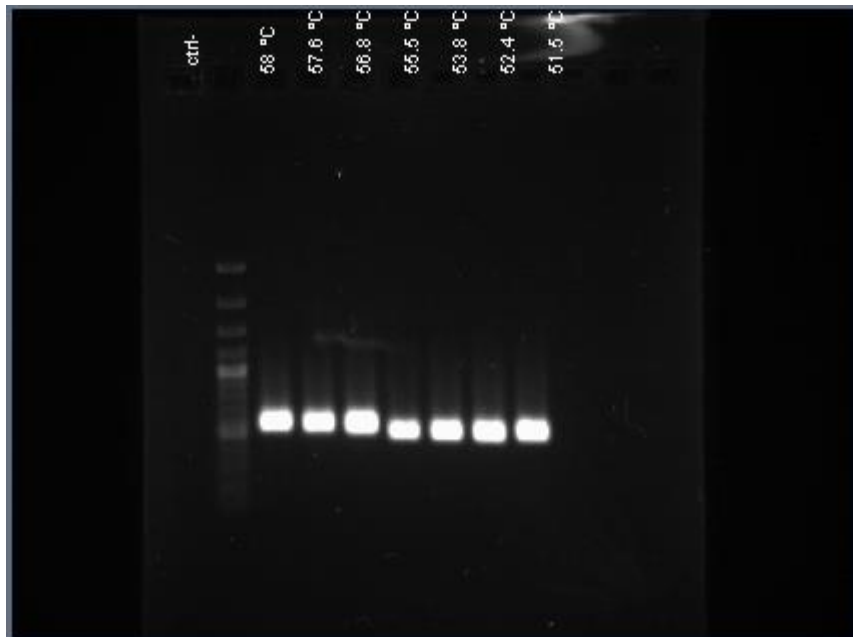


Figura SA.6 Prueba de TM para oligonucleótidos Prln/Lis1.

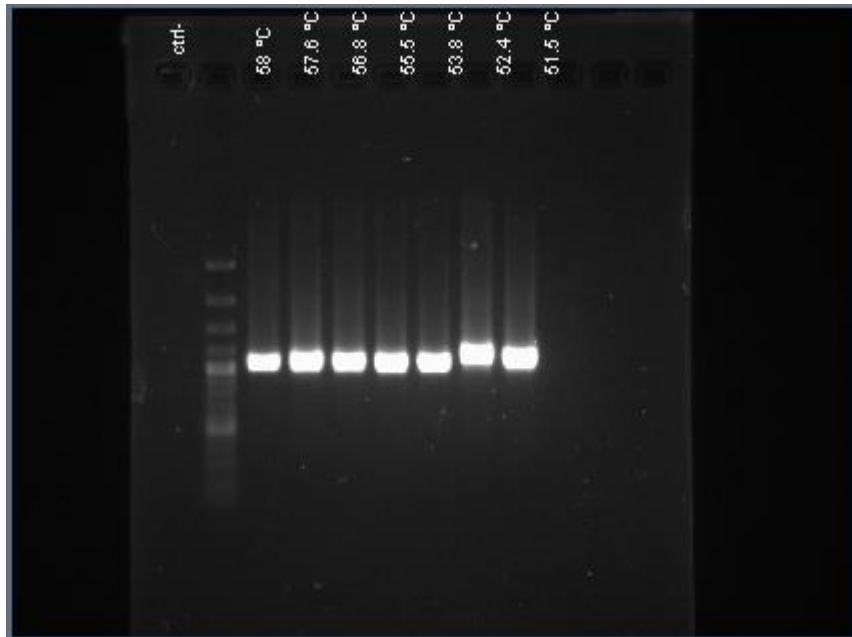


Figura SA.7 Prueba de TM para oligonucleótidos Ino2/Lis1B.

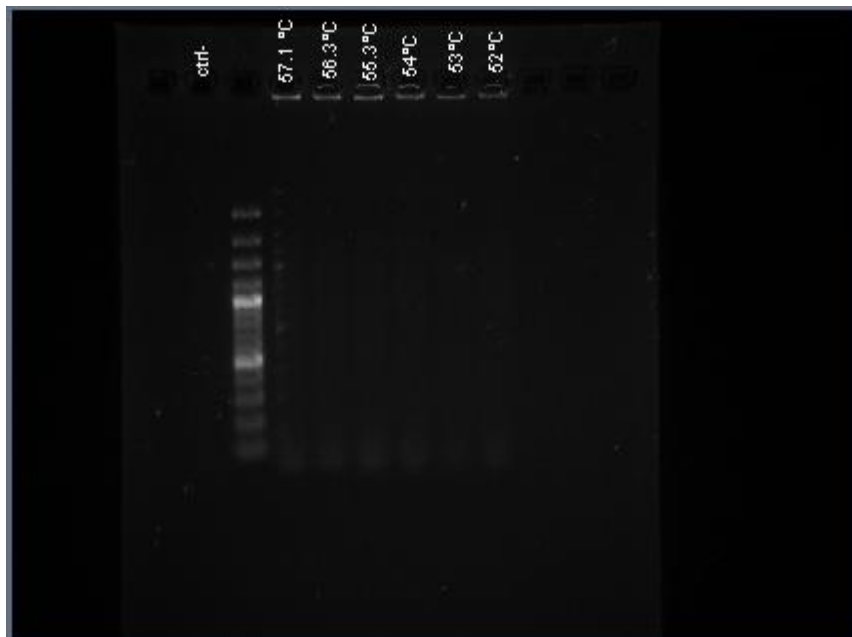


Figura SA.8 Prueba de TM para oligonucleótidos Liv22.

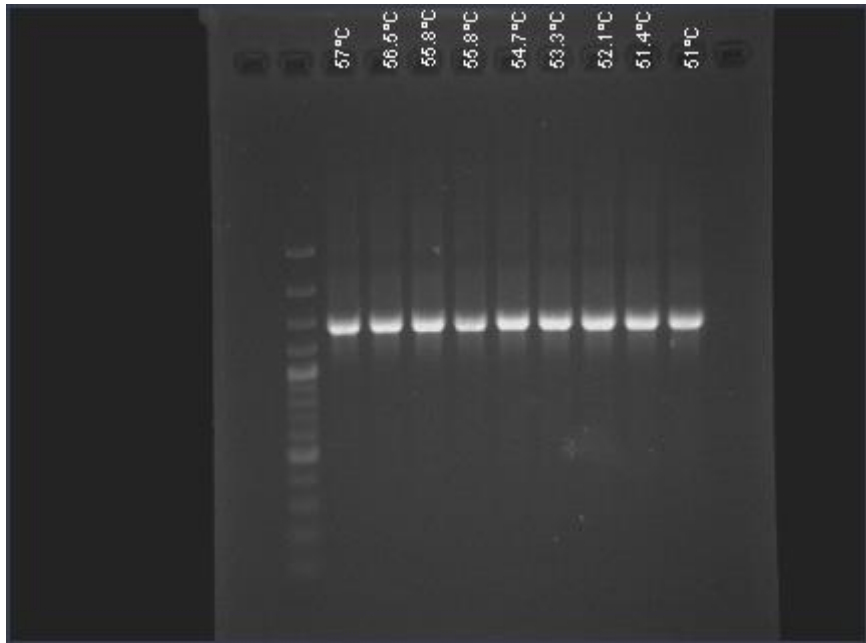


Figura SA.9 Prueba de TM para oligonucleótidos 8F/1510R

Apéndice 3. Visualización de productos de PCR en geles de agarosa correspondientes a Tlacuaches (*Didelphis virginiana*).

PCR Lip 1/2 de Tlacuaches.

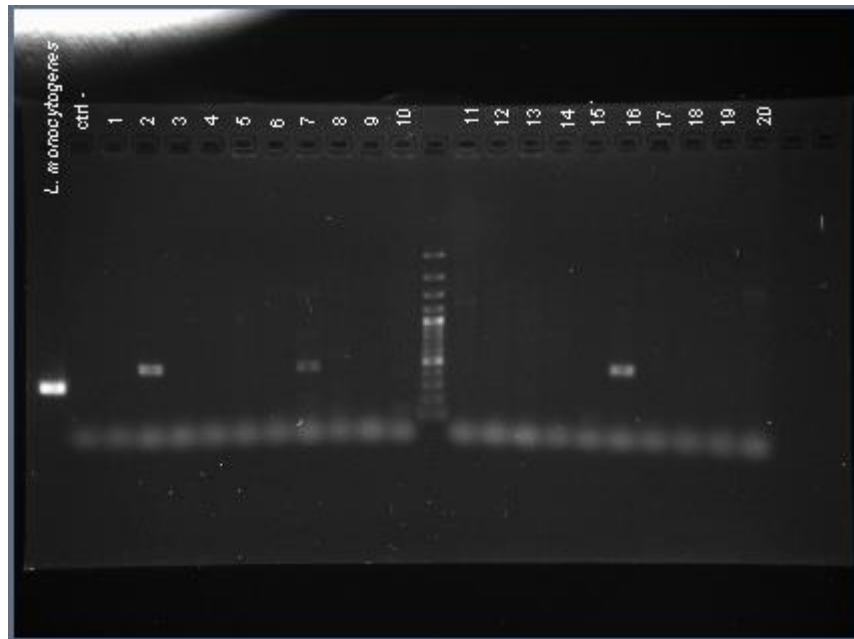


Figura SB.1 PCR Lip1 y Lip2. Muestras de Centro Universitario. Muestras 1 a la 20.

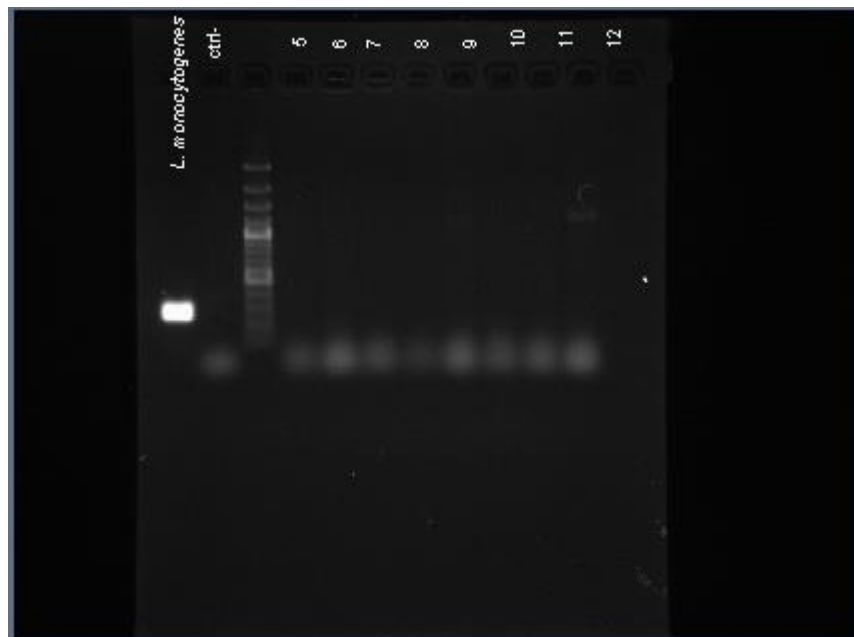


Figura SB.2 PCR Lip1 y Lip2. Muestras de Zibatá. Muestras 5 a la 12.

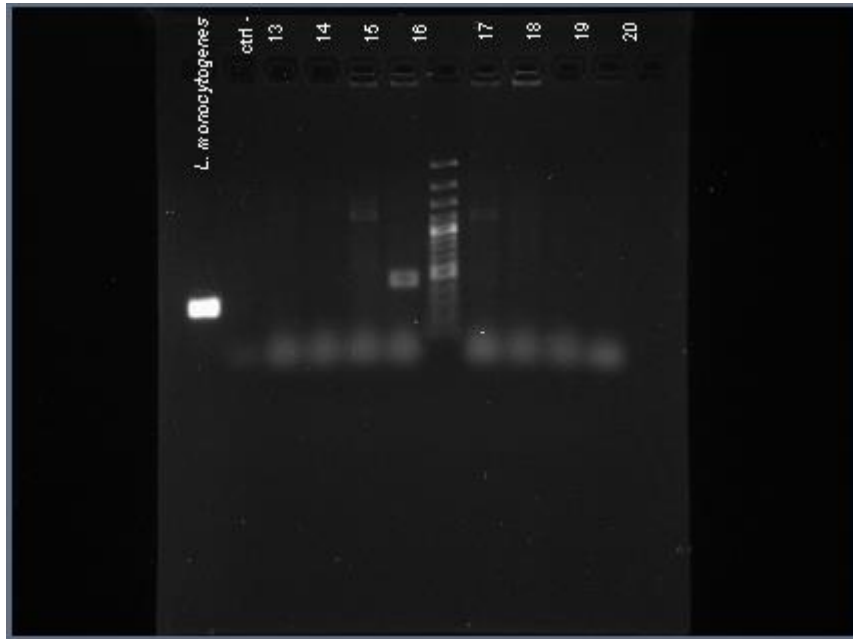


Figura SB.3 PCR Lip1 y Lip2. Muestras de Zibatá. Muestras 13 a la 20.

PCR Prs de Tlacuaches.

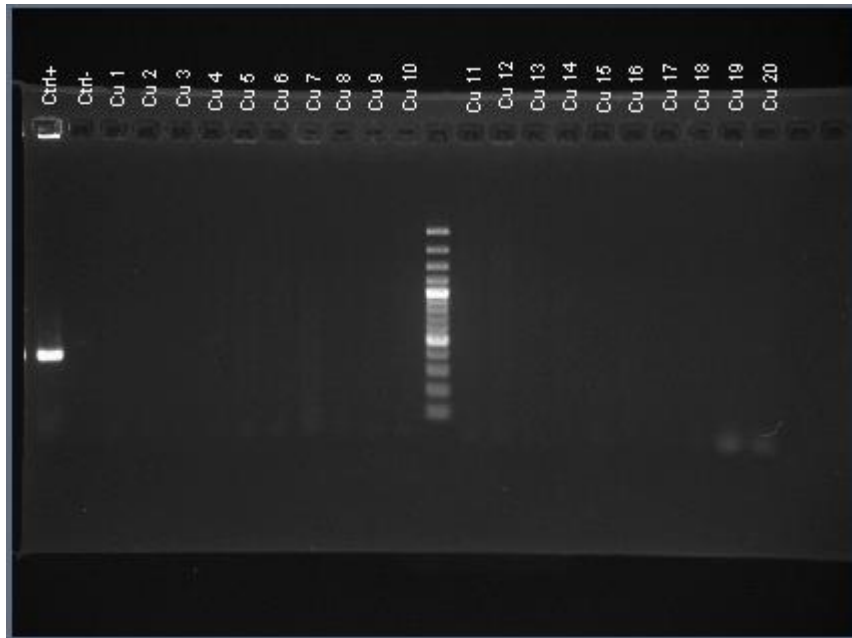


Figura SB.4 PCR Prs. Muestras de Centro universitario. Muestras 1 a 20.

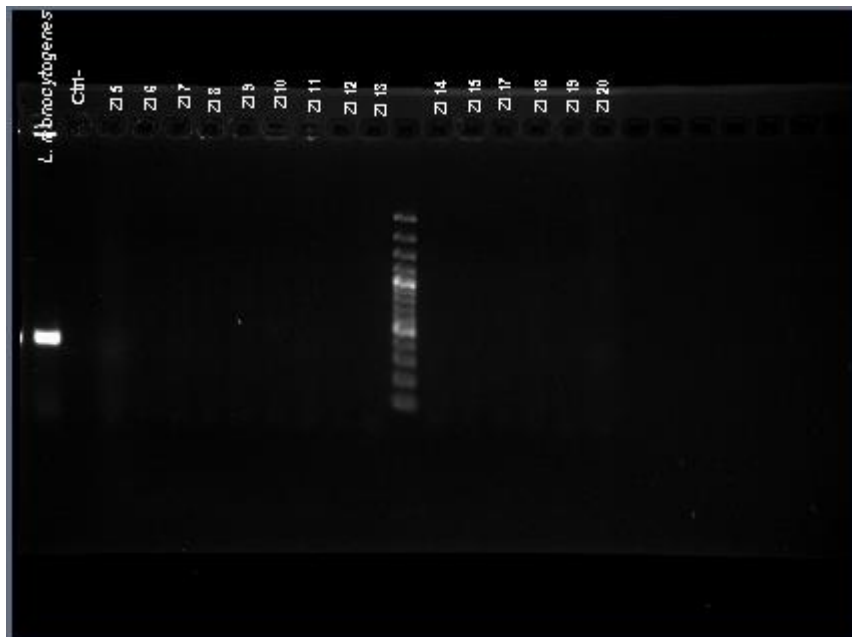


Figura SB.5 PCR Prs. Muestras de Zibatá. Muestras 5 a 20.

Apendice 4. Visualización de productos de PCR en geles de agarosa correspondientes a Ardillones (*Otospermophilus variegatus*)

PCR Lip1 y Lip2 de Ardillones

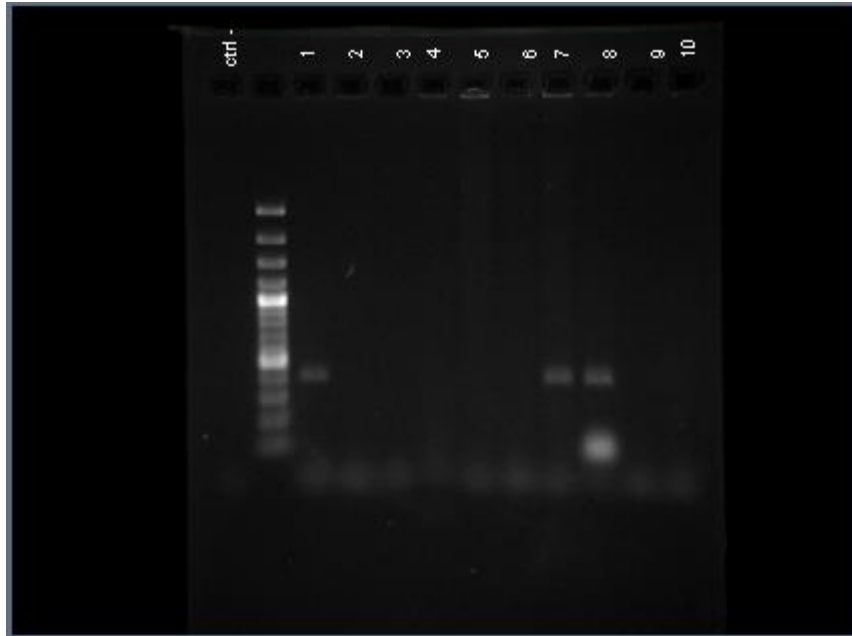


Figura SC.1 PCR Lip1 y Lip2. Muestras de ardillones. Muestras 1 a 10.

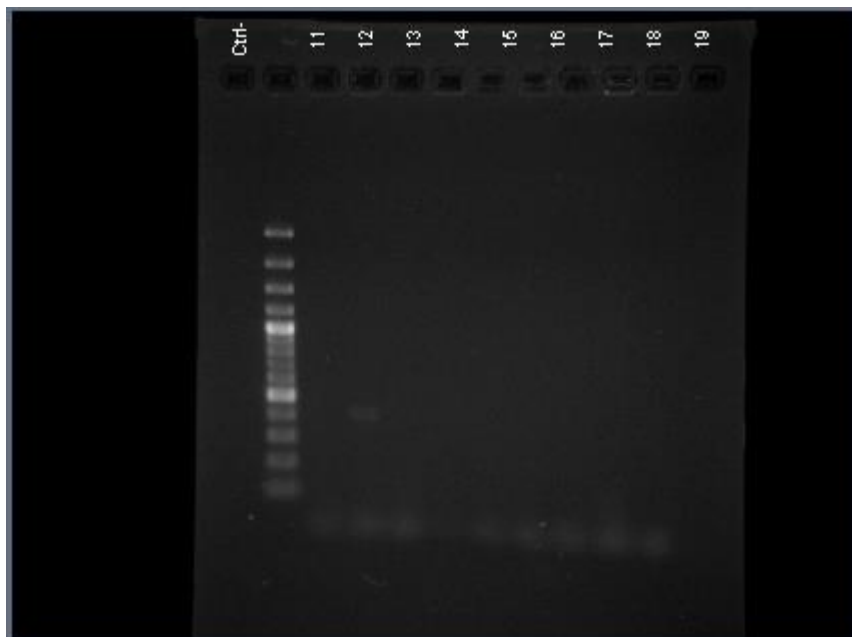


Figura SC.2 PCR Lip1 y Lip2. Muestras de ardillones. Muestras 11 a 19.

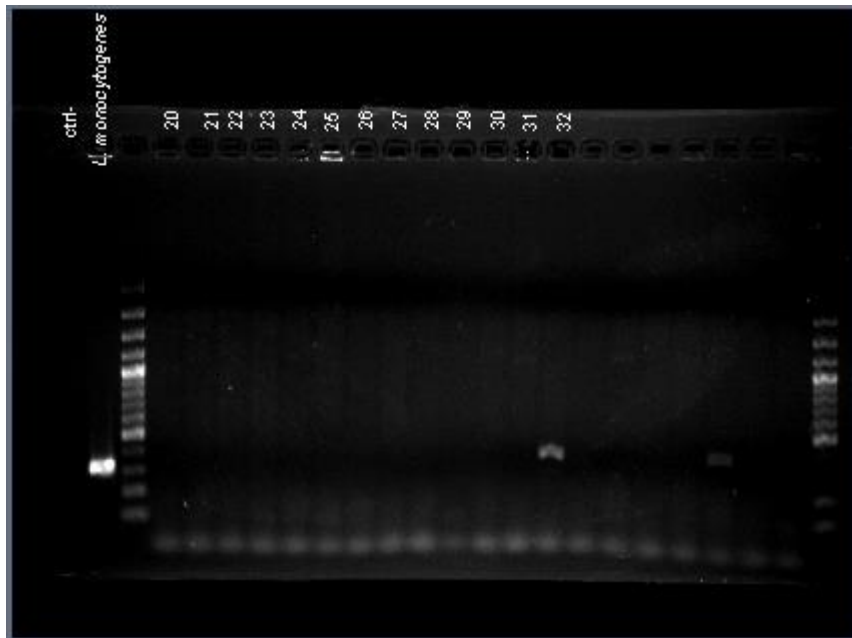


Figura SC.3 PCR Lip1 y Lip2. Muestras de ardillones. Muestras 20 a 32.

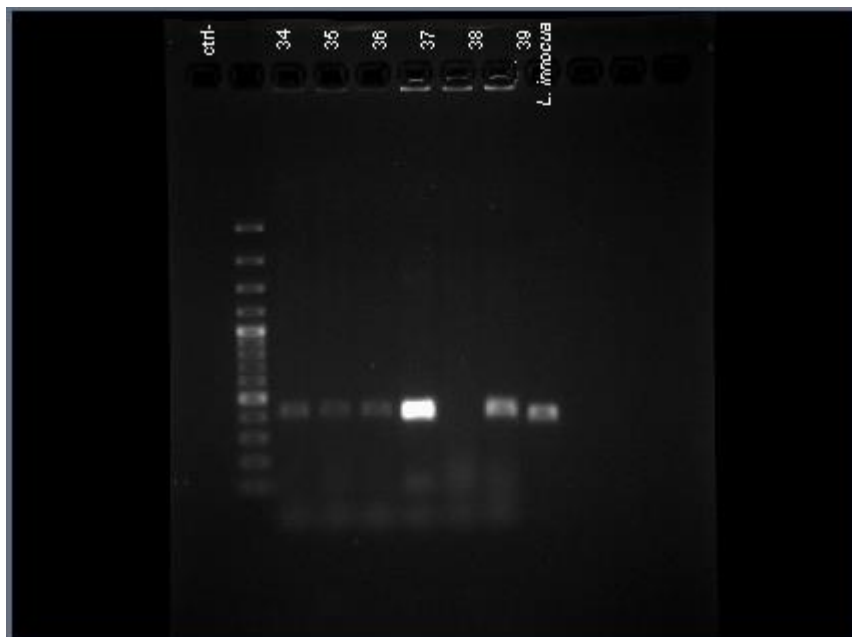


Figura SC.4 PCR Lip1 y Lip2. Muestras de ardillones. Muestras 34 a 39.

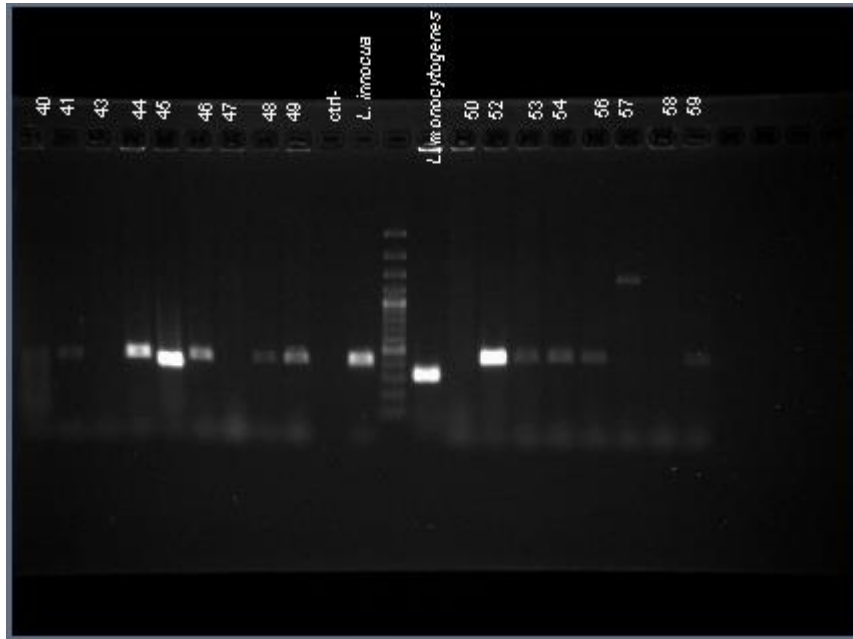


Figura SC.5 PCR Lip1 y Lip2. Muestras de ardillones. Muestras 40 a 59.

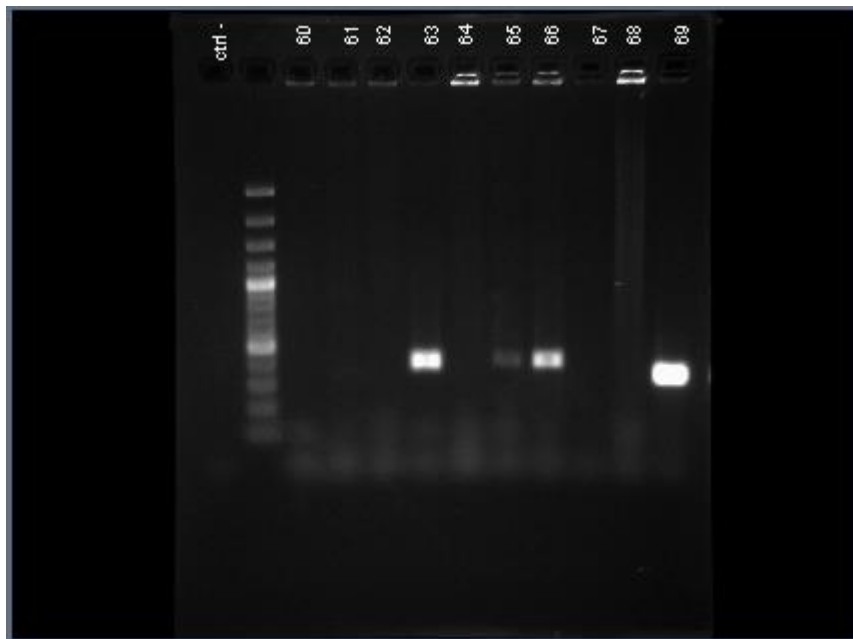


Figura SC.6 PCR Lip1 y Lip2. Muestras de ardillones. Muestras 60 a 69.

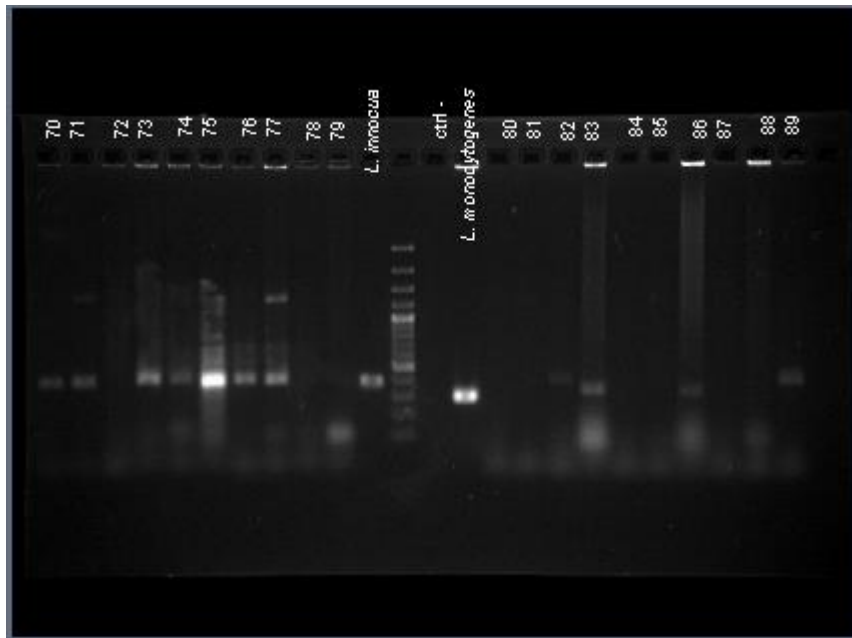


Figura SC.7 PCR Lip1 y Lip2. Muestras de ardillones. Muestras 70 a 89.

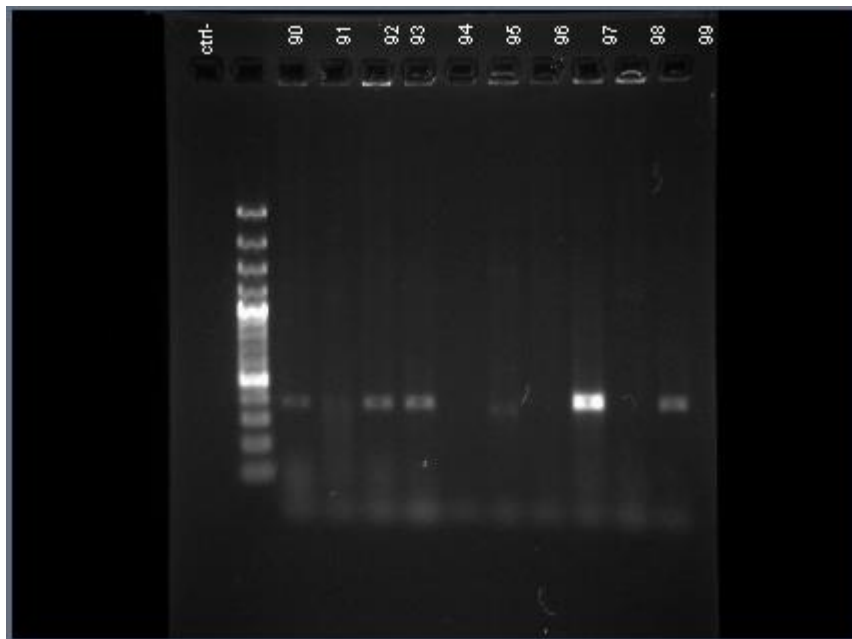


Figura SC.8 PCR Lip1 y Lip2. Muestras de ardillones. Muestras 90 a 99.

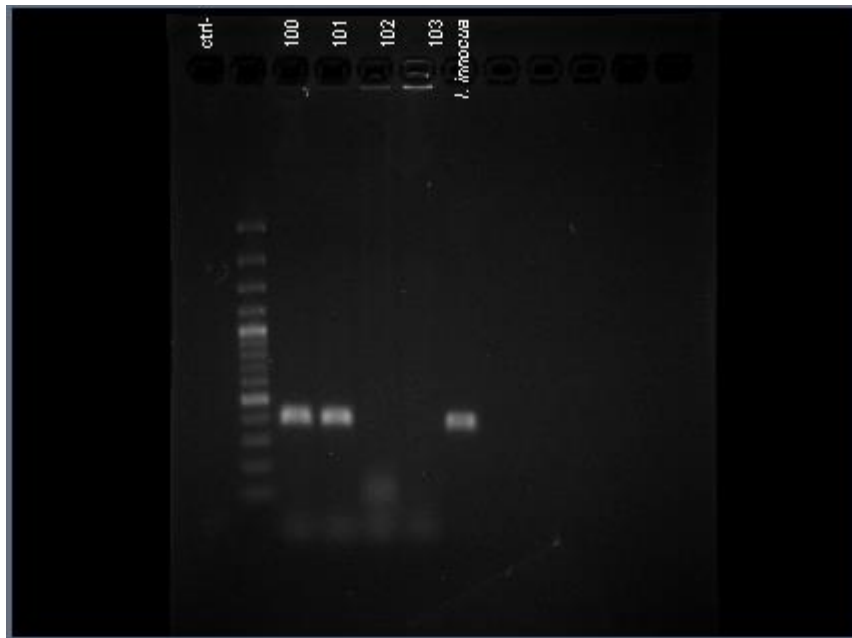


Figura SC.9 PCR Lip1 y Lip2. Muestras de ardillones. Muestras 100 a 103.

PCR Prs de Ardillones

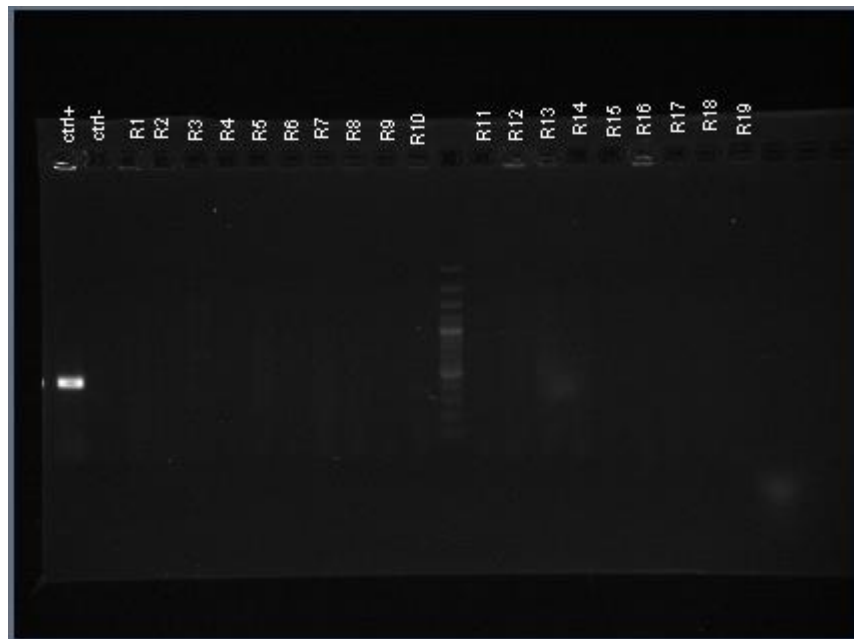


Figura SC.10 PCR Prs. Muestras de ardillones. Muestras 1 a 19.

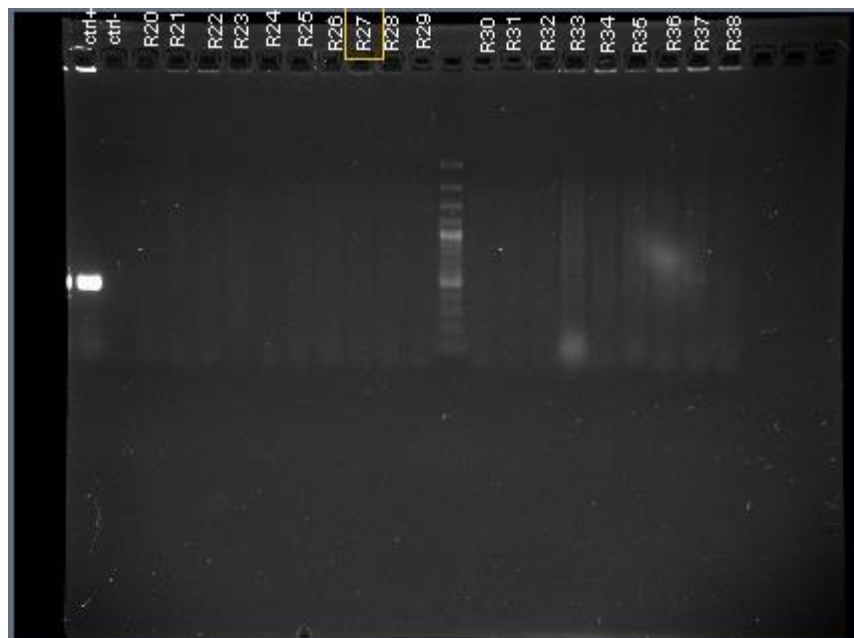


Figura SC.11 PCR Prs. Muestras de ardillones. Muestras 20 a 38.

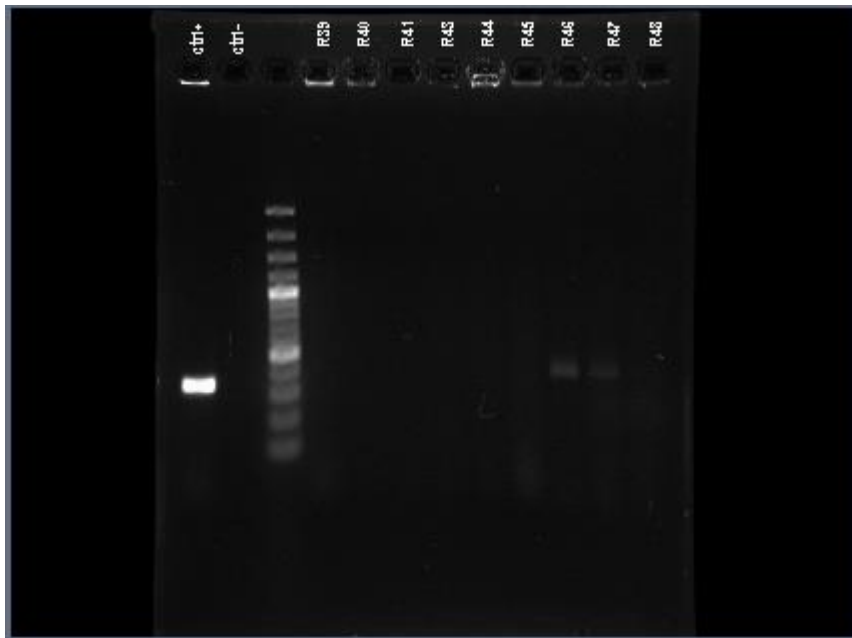


Figura SC.12 PCR Prs. Muestras de ardillones. Muestras 39 a 48.

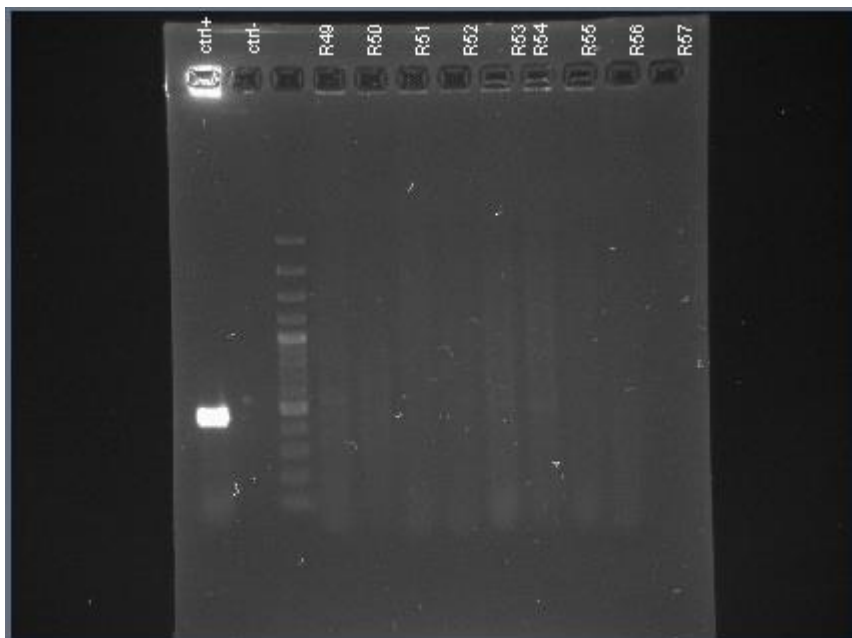


Figura SC.13 PCR Prs. Muestras de ardillones. Muestras 49 a 57.

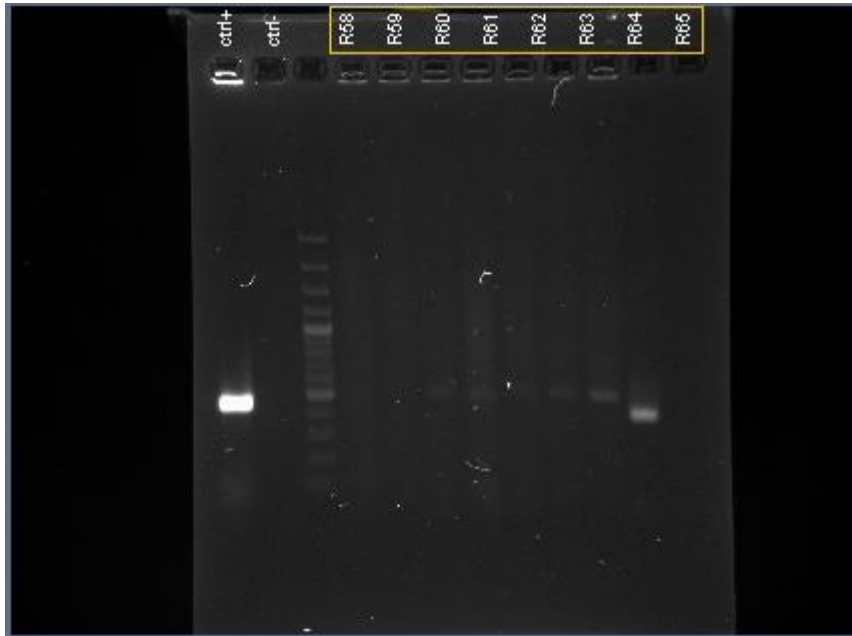


Figura SC.14 PCR Prs. Muestras de ardillones. Muestras 58 a 65.



Figura SC.15 PCR Prs. Muestras de ardillones. Muestras 66 a 74.

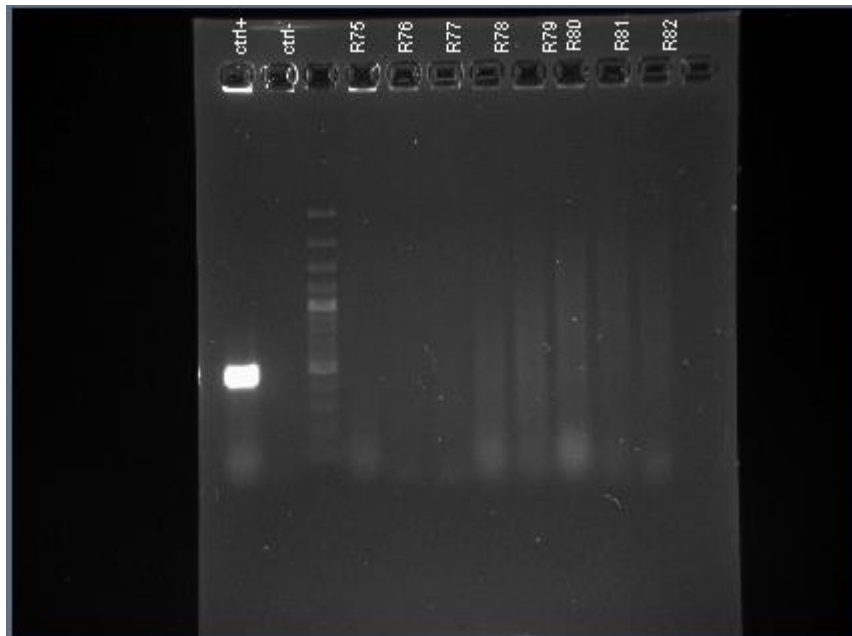


Figura SC.16 PCR Prs. Muestras de ardillones. Muestras 75 a 82.



Figura SC.17 PCR Prs. Muestras de ardillones. Muestras 83 a 91.

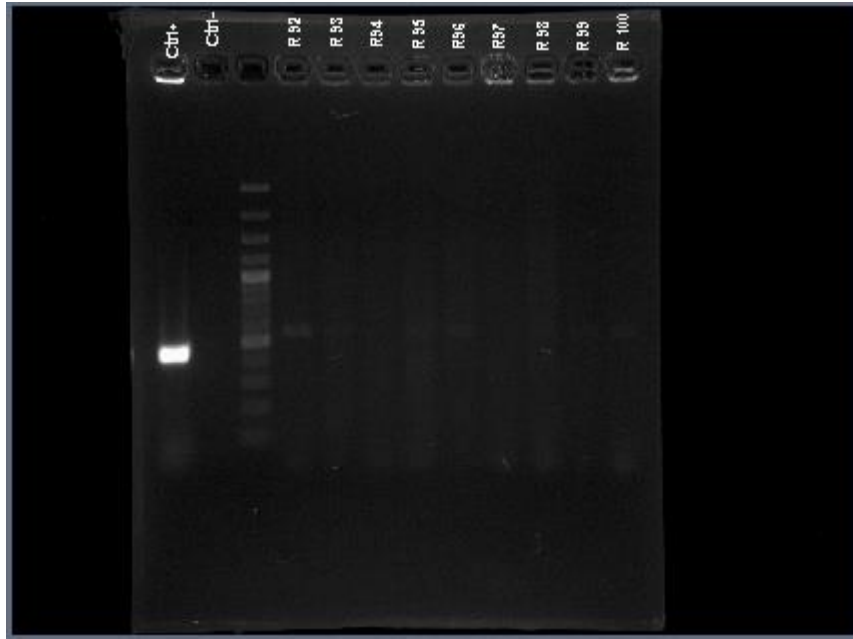


Figura SC.18 PCR Prs. Muestras de ardillones. Muestras 92 a 100.

Apéndice 5. Resultados de secuenciación.

Secuencia de la cepa control, *L. monocytogenes* (Lip 1 y Lip2).

```
>TTTTATTTAGAGTCTTAGCGAGCAGGCTACCGCATACGTTATCAAATAAACGAACTA
AAAGAACTACTGAGCAAAAATCTTACGCACTTTTTCTATGTTTTCCAAACCCTACAAA
ACAAGTTTCATACAGCCTAGCTAAATTTAATGATTTTTTCGATTAACGGGAAGCTTGGCT
CTATTTGCGGTCAACTTTTAATCCTGACCTATGTGTATGGTAAAGAACTCCTGATGGC
ATCCAAGGATTACACAA
```

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
<input type="checkbox"/> Listeria monocytogenes strain 2018TE5305-1-4 chromosome, complete genome	433	433	97%	1e-117	98%	CP029372.1
<input type="checkbox"/> Listeria monocytogenes strain 2015TE17781-5 chromosome	433	433	97%	1e-117	98%	CP028412.1
<input type="checkbox"/> Listeria monocytogenes strain 2015TE17781-3 chromosome	433	433	97%	1e-117	98%	CP028413.1
<input type="checkbox"/> Listeria monocytogenes strain 2015TE17781-6 chromosome	433	433	97%	1e-117	98%	CP028411.1
<input type="checkbox"/> Listeria monocytogenes strain 2015TE17781-7 chromosome	433	433	97%	1e-117	98%	CP028410.1
<input type="checkbox"/> Listeria monocytogenes strain 2015TE17781-9 chromosome	433	433	97%	1e-117	98%	CP028408.1
<input type="checkbox"/> Listeria monocytogenes strain 2015TE17781-8 chromosome	433	433	97%	1e-117	98%	CP028409.1
<input type="checkbox"/> Listeria monocytogenes strain 2015TE24980 chromosome	433	433	97%	1e-117	98%	CP028405.1
<input type="checkbox"/> Listeria monocytogenes strain 2015TE24968 chromosome	433	433	97%	1e-117	98%	CP028406.1
<input type="checkbox"/> Listeria monocytogenes strain 2015TE22590 chromosome	433	433	97%	1e-117	98%	CP028407.1
<input type="checkbox"/> Listeria monocytogenes strain 2015TE34286 chromosome	433	433	97%	1e-117	98%	CP028404.1
<input type="checkbox"/> Listeria monocytogenes strain 2016TE1580 chromosome	433	433	97%	1e-117	98%	CP028403.1
<input type="checkbox"/> Listeria monocytogenes strain 2016TE2143 chromosome	433	433	97%	1e-117	98%	CP028402.1
<input type="checkbox"/> Listeria monocytogenes strain 2016TE340 chromosome	433	433	97%	1e-117	98%	CP028400.1
<input type="checkbox"/> Listeria monocytogenes strain 2016TE337 chromosome	433	433	97%	1e-117	98%	CP028401.1
<input type="checkbox"/> Listeria monocytogenes strain 2016TE3773-1-1 chromosome	433	433	97%	1e-117	98%	CP028396.1
<input type="checkbox"/> Listeria monocytogenes strain 2016TE4965-1-1 chromosome	433	433	97%	1e-117	98%	CP028394.1
<input type="checkbox"/> Listeria monocytogenes strain 2016TE3770-1-1 chromosome	433	433	97%	1e-117	98%	CP028397.1
<input type="checkbox"/> Listeria monocytogenes strain 2016TE4526-1-1 chromosome	433	433	97%	1e-117	98%	CP028395.1
<input type="checkbox"/> Listeria monocytogenes strain 2016TE3785-1-1 chromosome	433	433	97%	1e-117	98%	CP028399.1
<input type="checkbox"/> Listeria monocytogenes strain 2016TE3767-1-1 chromosome	433	433	97%	1e-		

Questions.com

Secuencia de la muestra R32 (Lip1 y Lip2).

>TTTTATTTAGAGTCTTAGCGAGCAGGCTACCGCATAACGTTATCAAATAAACGAAC
 CAGAACTACTGAGCAAAAATCTTACGCACTTTTTCTATGTTTTCCAAACCCTACAAAA
 CAAGTTTCATACAGCCTAGCTAAATTTAATGATTTTTTCGATTAACGGGAAGCTTGGCTC
 TATTTGCGGTCAACTTTTAATCCTGACCTATGTGTATGGTAAAGAACTCCTGATGGCT
 CCAAGATTACACA

	Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
<input type="checkbox"/>	Listeria monocytogenes strain 2018TE5305-1-4 chromosome, complete genome	418	418	97%	4e-113	98%	CP029372.1
<input type="checkbox"/>	Listeria monocytogenes strain 2015TE17781-5 chromosome	418	418	97%	4e-113	98%	CP028412.1
<input type="checkbox"/>	Listeria monocytogenes strain 2015TE17781-3 chromosome	418	418	97%	4e-113	98%	CP028413.1
<input type="checkbox"/>	Listeria monocytogenes strain 2015TE17781-6 chromosome	418	418	97%	4e-113	98%	CP028411.1
<input type="checkbox"/>	Listeria monocytogenes strain 2015TE17781-7 chromosome	418	418	97%	4e-113	98%	CP028410.1
<input type="checkbox"/>	Listeria monocytogenes strain 2015TE17781-9 chromosome	418	418	97%	4e-113	98%	CP028408.1
<input type="checkbox"/>	Listeria monocytogenes strain 2015TE17781-8 chromosome	418	418	97%	4e-113	98%	CP028409.1
<input type="checkbox"/>	Listeria monocytogenes strain 2015TE24980 chromosome	418	418	97%	4e-113	98%	CP028405.1
<input type="checkbox"/>	Listeria monocytogenes strain 2015TE24968 chromosome	418	418	97%	4e-113	98%	CP028406.1
<input type="checkbox"/>	Listeria monocytogenes strain 2015TE22590 chromosome	418	418	97%	4e-113	98%	CP028407.1
<input type="checkbox"/>	Listeria monocytogenes strain 2015TE34286 chromosome	418	418	97%	4e-113	98%	CP028404.1
<input type="checkbox"/>	Listeria monocytogenes strain 2016TE1560 chromosome	418	418	97%	4e-113	98%	CP028403.1
<input type="checkbox"/>	Listeria monocytogenes strain 2016TE2143 chromosome	418	418	97%	4e-113	98%	CP028402.1
<input type="checkbox"/>	Listeria monocytogenes strain 2016TE340 chromosome	418	418	97%	4e-113	98%	CP028400.1
<input type="checkbox"/>	Listeria monocytogenes strain 2016TE337 chromosome	418	418	97%	4e-113	98%	CP028401.1
<input type="checkbox"/>	Listeria monocytogenes strain 2016TE3773-1-1 chromosome	418	418	97%	4e-113	98%	CP028396.1
<input type="checkbox"/>	Listeria monocytogenes strain 2016TE4965-1-1 chromosome	418	418	97%	4e-113	98%	CP028394.1
<input type="checkbox"/>	Listeria monocytogenes strain 2016TE3770-1-1 chromosome	418	418	97%	4e-113	98%	CP028397.1
<input type="checkbox"/>	Listeria monocytogenes strain 2016TE4526-1-1 chromosome	418	418	97%	4e-113	98%	CP028395.1
<input type="checkbox"/>	Listeria monocytogenes strain 2016TE3765-1-1 chromosome	418	418	97%	4e-113	98%	CP028399.1
<input type="checkbox"/>	Listeria monocytogenes strain 2016TE3767-1-1 chromosome	418	418	97%	4e-		

Questions/com

Secuencia de la muestra L53 identificada como E. coli sp. (8F y 1510R).

>ATGACCAGCCACACTGGAAGTGGAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGT
 GGGGAATATTGCACAATGGGCGCAAGCCTTGATGCAGCCATGCCGCGTGTATGAAGA
 AGGCCTTCGGGTTGTAAAGTACTTTTCAGCGGGGAGGAAGGGAGTAAAGTTAATACCT
 TTGCTCATTGATCGTTACCCGCAGAAGAAGCACCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCG
 CGGTAATACGGAGGGTGAAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCACGCAG
 GCGGTTTGTAAAGTCAGATGTGAAATCCCCGGGCTCAACCTGGGAACTGCATCTGATA
 CTGGCAAGCTTGAGTCTCGTAGAGGGGGGTAGAATTCCAGGTGTAGCGGTGAAATGC
 GTAGAGATCTGGAGGAATACCGGTGGCGAAGGCGGCCCCCTGGACGAAGACTGACG
 CTCAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCC
 GTAAACGATGTCGACTTGGAGGTTGTGCCCTTGAGGCGTGGCTTCCGGAGCTAACGC
 GTTAAGTCGACCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGGTTAAACTCAAATGAATTTGA
 CGGGGGCCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGATGCAACGCGAAGAAC
 CTTACCTGGTCTTGACATTCAGCGGAAGTTTTTCAGAGATGAGTAATGTGCCTTCGGGA
 ACCGTGAGACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGT

Alignments Download GenBank Graphics Distance tree of results						
Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
<input type="checkbox"/> Escherichia coli O25:H16 strain F5505-C1 chromosome, complete genome	1400	9695	100%	0.0	99%	CP024257.1
<input type="checkbox"/> Escherichia coli O25:NM strain 2014EL-1343-2 chromosome, complete genome	1400	9728	100%	0.0	99%	CP024228.1
<input type="checkbox"/> Uncultured bacterium clone SinRc_10BSL4aFC 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1400	1400	100%	0.0	99%	JQ207834.1
<input type="checkbox"/> Uncultured bacterium clone SinRc_06CSL4aFA 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1400	1400	100%	0.0	99%	JQ207755.1
<input type="checkbox"/> Uncultured bacterium clone SinRc_02ASL4aFA 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1400	1400	100%	0.0	99%	JQ207670.1
<input type="checkbox"/> Bacterium NLAE-zl-H213 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1400	1400	100%	0.0	99%	JX006436.1
<input type="checkbox"/> Uncultured bacterium partial 16S rRNA gene, clone 16saw48-1f07.p1k	1400	1400	100%	0.0	99%	HE582593.1
<input type="checkbox"/> Uncultured bacterium partial 16S rRNA gene, clone 16saw48-1c02.p1k	1400	1400	100%	0.0	99%	HE582585.1
<input type="checkbox"/> Uncultured organism clone ELU0067-T443-S-NIPCRAMgANa_000423 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence	1400	1400	100%	0.0	99%	HQ771091.1
<input type="checkbox"/> Uncultured organism clone ELU0066-T450-S-NIPCRAMgANa_000146 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence	1400	1400	100%	0.0	99%	HQ770237.1
<input type="checkbox"/> Uncultured bacterium clone 16saw29-1e07.p1k 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1400	1400	100%	0.0	99%	EF603470.1
<input type="checkbox"/> Uncultured bacterium clone 16saw29-1e08.p1k 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1400	1400	100%	0.0	99%	EF603468.1
<input type="checkbox"/> Uncultured bacterium clone aab26c06 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1400	1400	100%	0.0	99%	DQ819134.1
<input type="checkbox"/> Uncultured Enterobacteriaceae bacterium clone DVBSW_J32 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1397	1397	100%	0.0	99%	KF722036.1
<input type="checkbox"/> Uncultured bacterium clone SinGs_12HSL4aGA 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1397	1397	100%	0.0	99%	JQ206473.1
<input type="checkbox"/> Shigella flexneri partial 16S rRNA gene, strain JNTUH12	1397	1397	100%	0.0	99%	FR820477.2
<input type="checkbox"/> Escherichia coli M217 DNA, complete genome	1395	9728	100%	0.0	99%	AP019189.1
<input type="checkbox"/> Escherichia sp. strain Es_1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1395	1395	100%	0.0	99%	MK095771.1
<input type="checkbox"/> Escherichia coli strain ECCHD184 chromosome, complete genome	1395	9761	100%	0.0	99%	CP033250.1
<input type="checkbox"/> Escherichia coli SK1144, complete genome	1395	9756	100%	0.0	99%	CP033250.1
<input type="checkbox"/> Escherichia coli DSM 30083 = JCM 1649 = ATCC 11775 chromosome, complete genome	1395	9767	100%	0.0	99%	CP033250.1

Questions/comm

Secuencia de la muestra L69 identificada como *Enterococcus* spp. (8F y 1510R).

>GGAATCTTCGGCAATGGACGAAAGTCTGATCCGAGCAACGCCCGCGTGAGTGAAGA
 AGGTTTTTCGGATCCGTAAAACCTCTGTTGGTTAGAGAAGAACAAGGGTGAGAGTAACTG
 TTCACCCCTTGACGGTATCTAACCAGAAAGGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCC
 GCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGATTTATTTGGGCGTAAAGCGAGCGC
 AGGCGGTTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCCCGGCTCAACCGGGGGAGGGTCATT
 GGAAACTGGGAGACTTGAGTGCAGAAGAGGAGAGTGGAAATTCATGTGTAGCGGTGA
 AATGCGTAGATATATGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGGCTCTCTGGTCTGTA
 ACTGACGCTGAGGCTCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCAC
 GCCGTAAACGATGAGTGCTAAGTGTGGAGGGTTTCCGCCCTTCAGTGCTGCAGCTA
 ACGCATTAAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGACCGCAAGATTGAAACTCAAAGGAATT
 GACGGGGGGCCCGCACAAGCAGTGGGAGCAATGTGTGTCAATTCGAAGCATACGCGA
 AGAATCCTTGACAAGTCTTGACACTCGTTTTGATCCACCTCTAGAAGATAGAAGCATG
 CCCGTACAGGGGCCAAGTGACAGGTGGCTGCCATGAATGGACGGTCAGGCTTCAGT
 GATCCTGGAATGTT

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
Enterococcus mundtii strain SS1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1114	1114	95%	0.0	95%	MH938045.1
Bacterium strain Glim44 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1114	1114	95%	0.0	95%	MH569455.1
Enterococcus mundtii strain STw78 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1114	1114	95%	0.0	95%	MH727695.1
Enterococcus mundtii strain STw55 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1114	1114	95%	0.0	95%	MH727693.1
Enterococcus mundtii strain STw46 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1114	1114	95%	0.0	95%	MH727692.1
Enterococcus mundtii strain STw40 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1114	1114	95%	0.0	95%	MH727690.1
Enterococcus mundtii strain STw35 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1114	1114	95%	0.0	95%	MH727688.1
Enterococcus mundtii strain STw79 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1114	1114	95%	0.0	95%	MH588157.1
Enterococcus mundtii strain STw70 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1114	1114	95%	0.0	95%	MH588155.1
Enterococcus mundtii strain STw68 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1114	1114	95%	0.0	95%	MH588154.1
Enterococcus mundtii strain STw66 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1114	1114	95%	0.0	95%	MH588153.1
Enterococcus mundtii strain STw54 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1114	1114	95%	0.0	95%	MH588152.1
Enterococcus mundtii strain STw51 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1114	1114	95%	0.0	95%	MH588151.1
Enterococcus mundtii strain STw49 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1114	1114	95%	0.0	95%	MH588150.1
Enterococcus mundtii strain STw47 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1114	1114	95%	0.0	95%	MH588149.1
Enterococcus mundtii strain STw38 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1114	1114	95%	0.0	95%	MH588148.1
Enterococcus mundtii strain STw33 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1114	1114	95%	0.0	95%	MH588147.1
Enterococcus mundtii strain STw26 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1114	1114	95%	0.0	95%	MH588146.1
Enterococcus mundtii strain STw13 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1114	1114	95%	0.0	95%	MH588145.1
Enterococcus mundtii strain STw3 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1114	1114	95%	0.0	95%	MH588144.1
Enterococcus mundtii strain 1TP04-BL05 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1114	1114	95%	0.0	95%	MG031213.1
Enterococcus mundtii strain 3X31 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1114	1114	95%			



Secuencia de la muestra L71 identificada como *Staphylococcus sciuri* (8F y 1510R).

```
>CTTCCGCAATGGGCGAAAGCCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGTCTT
CGGATCGTAAACTCTGTTGTTAGGGAAGAACAATTTGTTAGTAACTGAACAAGTCTT
GACGGTACCTAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACG
TAGGTGGCAAGCGTTATCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGCGCGTAGGCCGGTTTCT
TAAGTCTGATGTGAAAGCCCACGGCTCAACCCGTGGAGGGTCATTGGAAACTGGGAA
ACTTGAGTGCAGAAGAGGAGAGTGGAATTTCCATGTGTAGCGGTGAAATGCGCAGAG
ATATGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCCGGCTCTCTGGTCTGTAAGTACTGACGCTGATGT
GCGAAAGCGTGGGGATCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGA
TGAGTGCTAAGTGTTAGGGGGTTTCCGCCCTTAGTGCTGCAGCTAACGCATTAAGC
ACTCCGCCTGGGGAGTACGACCGCAAGGTTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGACC
CGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAAGTTTACCCAA
TCTTGACATCCTTTGACCGCTCTAGAGATAGAGTCTTCCCCTTCGGGGGACAAAGTGA
CAGGTAGTGCATGGTGGTCGTCAGCTCGGGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCA
ACGAGCG
```

Alignments Download GenBank Graphics Distance tree of results						
Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
<input type="checkbox"/> Bacterium YY1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1339	1339	100%	0.0	99%	KT759041.1
<input type="checkbox"/> Bacterium F7-17 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1339	1339	100%	0.0	99%	KT759017.1
<input type="checkbox"/> Staphylococcus sciuri strain APBSMLB223 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1336	1336	100%	0.0	99%	MG706002.1
<input type="checkbox"/> Staphylococcus sciuri strain IADCAMB6 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1336	1336	100%	0.0	99%	MH619504.1
<input type="checkbox"/> Staphylococcus sciuri strain 2-6 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1336	1336	100%	0.0	99%	MH491952.1
<input type="checkbox"/> Staphylococcus sciuri subsp. sciuri strain NCTC12103 genome assembly, chromosome_1	1336	8006	100%	0.0	99%	LS483305.1
<input type="checkbox"/> Staphylococcus sp. strain 6112B 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1336	1336	100%	0.0	99%	KX302623.1
<input type="checkbox"/> Staphylococcus sp. strain 68U1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1336	1336	100%	0.0	99%	KX302622.1
<input type="checkbox"/> Staphylococcus sciuri strain CX-115 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1336	1336	100%	0.0	99%	MH368430.1
<input type="checkbox"/> Staphylococcus sciuri subsp. carnaticus strain IASST 61202 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1336	1336	100%	0.0	99%	MH368252.1
<input type="checkbox"/> Staphylococcus sciuri strain 89C3 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1336	1336	100%	0.0	99%	KX164440.1
<input type="checkbox"/> Staphylococcus sp. strain CMST6 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1336	1336	100%	0.0	99%	MF359891.1
<input type="checkbox"/> Staphylococcus sciuri strain S533-3 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1336	1336	100%	0.0	99%	MH231416.1
<input type="checkbox"/> Staphylococcus sciuri strain NXUBIHAL013 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1336	1336	100%	0.0	99%	MH201348.1
<input type="checkbox"/> Staphylococcus sciuri strain Cr6 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1336	1336	100%	0.0	99%	MH174653.1
<input type="checkbox"/> Staphylococcus sciuri subsp. sciuri partial 16S rRNA gene, isolate Vfr3	1336	1336	100%	0.0	99%	LT986221.1
<input type="checkbox"/> Staphylococcus sciuri subsp. sciuri partial 16S rRNA gene, isolate Vfr1	1336	1336	100%	0.0	99%	LT986220.1
<input type="checkbox"/> Staphylococcus sciuri subsp. sciuri partial 16S rRNA gene, isolate Vfr11	1336	1336	100%	0.0	99%	LT986196.1
<input type="checkbox"/> Staphylococcus sciuri subsp. sciuri partial 16S rRNA gene, isolate Vfr10	1336	1336	100%	0.0	99%	LT986195.1
<input type="checkbox"/> Staphylococcus sciuri subsp. sciuri partial 16S rRNA gene, isolate Vfr6	1336	1336	100%	0.0	99%	LT986193.1
<input type="checkbox"/> Staphylococcus lentus strain E3 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1336	1336	100%	0.0	99%

[Questions.com](#)

Secuencia de la muestra L99 identificada como *Lysinibacillus* sp. (8F y 1510R).

>TGATGGAGCGAACGCCGCGTGAGTGAAGAGAGGATTTTCGGTTCGTAAAACCTTCTGTT
 TGTAAGGGAAGAACAAGTACAGTAGTAACTGGCTGTACCTTGACGGGTAACCTTATTA
 GAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTTAGGTGGCAAGCGT
 TGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGCGCGCAGGTTGGTTTCTTAAGTCTGATTGTGA
 AAGCCCACGGCTCAACCGTGGAGGGTCAATTGGAAACTGGGAGACTTGAGTGCAGAA
 GAGGATAGTGGAATTCCAAGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATTTGGAGGAACACC
 AGTGGCGAAGGCGACTATCTGGTCTGTAAGTACTGACACTGAGGCGCGAAAGCGTGGGG
 AGCAAACAGGATTAGATAACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAGTGCTAAGTGTT
 AGGGGGTTTCCGCCCTTAGTGCTGCAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAG
 TACGGTCGCAAGACTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGGCCCCGCACAAGCGGTGG
 AAGCATGTGGTTTAATTGGAAGCAACGCGAAGAATCATTACCAGGTCTTGACATCCCG
 TTGACCACTGTAGAGATATGGGTTACCCCTTCAGGGGGCAACGGTTACA

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
<input type="checkbox"/> Lysinibacillus sp. strain BA2-75' 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1149	1149	100%	0.0	98%	KY621995.1
<input type="checkbox"/> Lysinibacillus sp. 38HT 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1149	1149	100%	0.0	98%	KX011062.1
<input type="checkbox"/> Lysinibacillus fusiformis strain YNSO1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1147	1147	100%	0.0	98%	KR738742.1
<input type="checkbox"/> Bacillus fusiformis site7S 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1147	1147	100%	0.0	98%	DQ420171.1
<input type="checkbox"/> Lysinibacillus fusiformis strain BT 159 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1144	1144	100%	0.0	97%	KJ848523.1
<input type="checkbox"/> Lysinibacillus fusiformis strain AZACCLR 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1142	1142	100%	0.0	97%	MK085101.1
<input type="checkbox"/> Lysinibacillus fusiformis strain IMB-12 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1142	1142	100%	0.0	97%	MG675634.1
<input type="checkbox"/> Lysinibacillus fusiformis strain 178 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1142	1142	100%	0.0	97%	MH910282.1
<input type="checkbox"/> Stenotrophomonas rhizophila strain 148 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1142	1142	100%	0.0	97%	MH910252.1
<input type="checkbox"/> Stenotrophomonas rhizophila strain 135 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1142	1142	100%	0.0	97%	MH910239.1
<input type="checkbox"/> Stenotrophomonas rhizophila strain 45 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1142	1142	100%	0.0	97%	MH910149.1
<input type="checkbox"/> Lysinibacillus fusiformis strain C4 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1142	1142	100%	0.0	97%	MH157243.1
<input type="checkbox"/> Lysinibacillus fusiformis partial 16S rRNA gene, strain Lysinibacillus sp JC555	1142	1142	100%	0.0	97%	LS974828.1
<input type="checkbox"/> Stenotrophomonas rhizophila strain GA1 plasmid unnamed1, complete sequence	1142	1142	100%	0.0	97%	CP031730.1
<input type="checkbox"/> Lysinibacillus sp. strain Firmi-74 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1142	1142	100%	0.0	97%	MH683163.1
<input type="checkbox"/> Lysinibacillus sp. strain Firmi-38 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1142	1142	100%	0.0	97%	MH683127.1
<input type="checkbox"/> Lysinibacillus fusiformis strain SC_0_1_A4 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1142	1142	100%	0.0	97%	MH595946.1
<input type="checkbox"/> Lysinibacillus fusiformis strain VITVB2 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1142	1142	100%	0.0	97%	MG755243.1
<input type="checkbox"/> Lysinibacillus sp. strain LJ110 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1142	1142	100%	0.0	97%	MG049782.1
<input type="checkbox"/> Lysinibacillus fusiformis strain NGS-STR-2 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1142	1142	100%	0.0	97%	MF083064.1
<input type="checkbox"/> Lysinibacillus fusiformis strain USW-STR-2 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1142	1142	100%	0.0	97%	MF083064.1



Secuencia de la muestra LCu16 identificada como *Staphylococcus* spp. (8F y 1510R).

>ACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCCGTTATCCGGAAATTA
 TTGGGCGTAAAGCGCGCGTAGGCGGTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCACGGCTC
 AACCGTGGAGGGTCATTGGAAACTGGGAACTTGAGTGCAGAAGAGGAAAGTGAAT
 TCCATGTGTAGCGGTGAAATGCGCAGAGATATGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCG
 ACTTTCTGGTCTGTAAGTACGCTGATGTGCGAAAGCGTGGGGATCAAACAGGATTA
 GATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAACGATGAGTGCTAAGTGGTAGGGGGTTTCCGC
 CCCTTAGTGCTGCAGCTAACGCATTAAGCACTCCGGCCTGGGGAGTACGGGCCGCAA
 GGTTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGACCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTA
 ATTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAAATCTTGACATCCTTTGACAGCTCTAGGAG
 AATAAAGCTTTCCCCTTCGGGGGACAAAGTGACAAGCTGTGCATGGTTGTCGTCAGC
 ATCGAGTCAGGGAAATGTTAGGTTAAGTCTCGCAAACGAGCCGCAACCCTTG

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
<input type="checkbox"/> Uncultured bacterium clone nby315f02c1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1014	1014	99%	0.0	96%	HM809339.1
<input type="checkbox"/> Uncultured bacterium clone nby467e08c1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1014	1014	99%	0.0	96%	HM823473.1
<input type="checkbox"/> Uncultured bacterium clone ncd429b04c1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1014	1014	99%	0.0	96%	HM324519.1
<input type="checkbox"/> Uncultured bacterium clone ncd101a08c1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1014	1014	99%	0.0	96%	HM257146.1
<input type="checkbox"/> Uncultured bacterium clone nbw279h04c1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1014	1014	99%	0.0	96%	GQ085749.1
<input type="checkbox"/> Uncultured bacterium clone nbw859h07c1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1014	1014	99%	0.0	96%	GQ029120.1
<input type="checkbox"/> Uncultured bacterium clone AKIW559 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1014	1014	99%	0.0	96%	DQ129417.1
<input type="checkbox"/> Staphylococcus cohnii strain HFUTY-08 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1009	1009	99%	0.0	96%	MG825047.1
<input type="checkbox"/> Staphylococcus sp. strain LSM15 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1009	1009	99%	0.0	96%	MG251638.1
<input type="checkbox"/> Staphylococcus gallinarum strain PCA-9 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1009	1009	99%	0.0	96%	MK063718.1
<input type="checkbox"/> Staphylococcus xylosum strain J6WTTM5 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1009	1009	99%	0.0	96%	MH985229.1
<input type="checkbox"/> Staphylococcus sp. strain G6-1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1009	1009	99%	0.0	96%	MG557680.1
<input type="checkbox"/> Staphylococcus cohnii strain PYG49 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1009	1009	99%	0.0	96%	MF773752.1
<input type="checkbox"/> Staphylococcus sp. strain MD3a 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1009	1009	99%	0.0	96%	MH271382.1
<input type="checkbox"/> Staphylococcus sp. strain MK2 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1009	1009	99%	0.0	96%	MH271380.1
<input type="checkbox"/> Bacillus sp. (in Bacteria) strain P13B 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1009	1009	99%	0.0	96%	MH078053.1
<input type="checkbox"/> Bacillus sp. (in Bacteria) strain P13A 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1009	1009	99%	0.0	96%	MH078052.1
<input type="checkbox"/> Staphylococcus cohnii subsp. urealyticus strain D118-4 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1009	1009	99%	0.0	96%	MH198145.1
<input type="checkbox"/> Staphylococcus haemolyticus strain APBSWPTB82 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1009	1009	99%	0.0	96%	MG733555.1
<input type="checkbox"/> Staphylococcus haemolyticus strain SWTPB55 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1009	1009	99%	0.0	96%	MG892842.1
<input type="checkbox"/> Staphylococcus haemolyticus strain APBSITMB11 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1009	1009	99%			

Questions.com