



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

---

---

**FACULTAD DE QUÍMICA**

**DETECCIÓN DE *Listeria monocytogenes* EN QUESO FRESCO POR  
PCR MÚLTIPLEX**

**TESIS**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE  
QUÍMICA DE ALIMENTOS**

**PRESENTA**

**MARÍA ALEJANDRA MEJÍA CABALLERO**



**MÉXICO, D.F.**

**2014**



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

**JURADO ASIGNADO:**

**PRESIDENTE:** Q.F.B. OLGA DEL CARMEN VELÁZQUEZ MADRAZO

**VOCAL:** Q.F.B. AURORA IRMA ORTEGÓN ÁVILA

**SECRETARIO:** M. en B. MARTHA GILES GÓMEZ

**1er. SUPLENTE:** DRA. GLORIA DÍAZ RUÍZ

**2° SUPLENTE:** M. en C. NORMA ANGÉLICA CAMACHO DE LA ROSA

**SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:**

**CEPARIO, DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA, FACULTAD DE QUÍMICA, UNAM**

**ESTE PROYECTO FUE FINANCIADO POR LOS PROGRAMAS DGAPA-PAPIME-UNAM  
PE205606 Y PE203410**

**ASESOR DEL TEMA:**

M. en B. MARTHA GILES GOMEZ

**SUSTENTANTE:**

MARÍA ALEJANDRA MEJÍA CABALLERO

# ÍNDICE

## PÁGINA

1. Índice de Tablas -----	7
2. Índice de Figuras -----	11
3. Resumen -----	13
4. Introducción -----	15
5. Marco teórico	
5.1. Taxonomía del género <i>Listeria</i> -----	18
5.2. Factores físicos y químicos de desarrollo -----	19
5.3. Alimentos donde se desarrolla <i>Listeria</i> spp. -----	21
5.4. Brotes reportados a nivel mundial -----	25
5.5. Brotes reportados en México -----	28
5.6. Queso fresco -----	28
5.7. Factores y mecanismos de patogenicidad -----	32
5.8. Factores de virulencia	
5.8.1. Familia de Internalinas -----	33
5.9. Métodos de detección -----	36
5.9.1. Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) -----	41
5.9.2. PCR Múltiplex -----	44
6. Hipótesis -----	46
7. Objetivos	
7.1. Objetivo general -----	46
7.2. Objetivos particulares -----	46

<b>8. Metodología</b> .....	48
8.1. Microorganismos utilizados .....	50
8.2. Conservación .....	50
8.3. Corroboración de la identidad de las cepas	
8.3.1. Identificación fenotípica	
8.3.1.1. Características morfológicas y microscópicas .....	51
8.3.1.1.1. Prueba de CAMP.....	51
8.3.1.2. Pruebas bioquímicas convencionales en tubo .....	51
8.3.1.3. Pruebas bioquímicas por el sistema miniaturizado API LISTERIA (BioMérieux) .....	52
8.3.1.4. Identificación por el sistema automatizado VITEK (BioMérieux) .....	52
8.3.2. Identificación genotípica	
8.3.2.1. Extracción de DNA cromosomal .....	52
8.3.2.2. Electroforesis en gel de agarosa .....	53
8.3.2.3. Amplificación del gen ribosomal 16S por PCR .....	54
8.3.2.4. Purificación del producto de PCR .....	55
8.3.2.5. Secuenciación del producto de PCR del gen ribosomal 16S .....	56
8.3.2.6. Construcción del árbol filogenético para el gen ribosomal 16S .....	56
8.4. PCR Múltiple en cepa pura	
8.4.1. Diseño de primers de los genes <i>inIA</i> e <i>inIC</i> .....	57
8.4.2. Optimización de la amplificación de los genes <i>inIA</i> e <i>inIC</i> .....	57
8.4.3. Secuenciación de los genes <i>inIA</i> e <i>inIC</i> .....	59
8.4.4. Construcción del dendograma para los genes <i>inIA</i> e <i>inIC</i> .....	60
8.4.5. PCR Múltiple para las muestras de cepa pura .....	60
8.5. Identificación por PCR Múltiple de <i>Listeria monocytogenes</i> en queso fresco .....	61
8.5.1. Identificación de <i>Listeria monocytogenes</i> queso fresco .....	62
8.5.2. Identificación de <i>Listeria monocytogenes</i> inoculada en queso fresco	
8.5.2.1. Preparación del inóculo .....	63
8.5.2.2. Inoculación en las muestras de queso fresco .....	63
8.5.2.3. Cuantificación del desarrollo de <i>Listeria monocytogenes</i> en las muestras. ....	64

8.5.3. Extracción de DNA cromosomal a partir de cultivos y de queso fresco inoculado y sin inocular	65
8.5.4. PCR Múltiplex para las muestras de <i>L. monocytogenes</i> I y queso fresco inoculado, enriquecidas con la metodología descrita en el BAM	65

## 9. Resultados y discusión

9.1. Conservación y reactivación de las cepas	66
9.2. Comprobación de la identidad de las cepas	
9.2.1. Identificación fenotípica	
9.2.1.1. Características morfológicas y microscópicas	66
9.2.1.1.1. Prueba de CAMP	68
9.2.1.2. Pruebas bioquímicas convencionales	69
9.2.1.3. Pruebas bioquímicas por el sistema miniaturizado API LISTERIA (BioMérieux)	71
9.2.1.4. Identificación por el sistema automatizado VITEK	75
9.2.2. Identificación genotípica	
9.2.2.1. Extracción de DNA cromosomal	77
9.2.2.2. Amplificación por PCR del gen ribosomal 16S	78
9.2.2.3. Purificación del producto de PCR para el gen ribosomal 16S	79
9.2.2.4. Secuenciación del producto de PCR para el gen ribosomal 16S	80
9.2.2.5. Construcción del árbol filogenético para el gen ribosomal 16S	81
9.3. PCR Múltiplex en cepa pura	
9.3.1. Diseño de primers para los genes <i>inIA</i> e <i>inIC</i>	85
9.3.2. Optimización de la amplificación de los genes <i>inIA</i> e <i>inIC</i>	88
9.3.3. Secuenciación de los genes <i>inIA</i> e <i>inIC</i>	92
9.3.4. Construcción del dendograma para los genes <i>inIA</i> e <i>inIC</i>	94
9.4. Identificación de <i>Listeria monocytogenes</i> en queso fresco por PCR Múltiplex	
9.4.1. PCR Múltiplex en la cepa pura para los genes <i>inIA</i> e <i>inIC</i>	98
9.4.2. PCR Múltiplex para los genes <i>inIA</i> e <i>inIC</i> en queso fresco	
9.4.2.1. Queso fresco sin inocular	99

9.4.2.2. Queso fresco inoculado con <i>L. monocytogenes</i> I -----	100
9.4.2.2.1. Cuantificación del desarrollo de <i>L. monocytogenes</i> I utilizada como inóculo -----	100
9.4.2.2.2. Queso inoculado con una concentración de $1 \times 10^7$ UFC/g de <i>L. monocytogenes</i> I. -----	101
9.4.2.2.3. Queso inoculado con una concentración de 1 UFC/ 10 g de <i>L. monocytogenes</i> I. -----	104
<b>10. Conclusiones</b> -----	<b>108</b>
<b>11. Perspectivas</b> -----	<b>109</b>
<b>12. Bibliografía</b> -----	<b>110</b>
<b>13. Anexos</b> -----	<b>115</b>

## 1. Índice de tablas

	PÁGINA
<b>Tabla 1.</b> Límites de crecimiento y sobrevivencia de <i>L. monocytogenes</i> -----	20
<b>Tabla 2.</b> Susceptibilidad y resistencia de <i>Listeria</i> a agentes antimicrobianos -----	20
<b>Tabla 3.</b> Productos marinos y su riesgo potencial para encontrar <i>Listeria</i> -----	22
<b>Tabla 4.</b> Porcentaje de muestras de carne de res positivas para patógenos por región -----	23
<b>Tabla 5.</b> Incidencia de <i>L. monocytogenes</i> en personas clínicamente sanas, en diferentes ciudades -----	27
<b>Tabla 6.</b> Reportes de listeriosis casos/100.000 habitantes -----	27
<b>Tabla 7.</b> Aislamientos de <i>L. monocytogenes</i> en quesos tipos panela y Chihuahua procedentes de mercados sobre ruedas en la Ciudad de México -----	28
<b>Tabla 8.</b> Principales brotes de listeriosis en el mundo asociados al consumo de queso (1995-2009) -----	30
<b>Tabla 9.</b> Prevalencia de <i>L. monocytogenes</i> en quesos en el contexto internacional -----	31
<b>Tabla 10.</b> Factores de virulencia encontrados en <i>Listeria</i> -----	33
<b>Tabla 11.</b> Resultados de pruebas bioquímicas para las seis especies de <i>Listeria</i> -----	39
<b>Tabla 12.</b> Genes utilizados para la identificación de <i>Listeria</i> por PCR -----	42
<b>Tabla 13.</b> Genes utilizados para la identificación de la especie de <i>Listeria</i> por PCR -----	43
<b>Tabla 14.</b> Genes utilizados para la identificación de los serotipos asociados a la patogenicidad de <i>Listeria monocytogenes</i> por PCR ---	44
<b>Tabla 15.</b> Características de los primers utilizados para la amplificación del gen ribosomal 16S -----	55



<b>Tabla 16.</b> Mezcla de reacción y condiciones utilizadas para la amplificación del gen ribosomal <i>16S</i> -----	55
<b>Tabla 17.</b> Gradiente para la optimización de la temperatura de alineamiento de los genes <i>inIA</i> e <i>inIC</i> -----	58
<b>Tabla 18.</b> Mezcla de reacción y condiciones utilizadas para la amplificación del gen <i>inIA</i> -----	58
<b>Tabla 19.</b> Mezcla de reacción y condiciones utilizadas para la amplificación del gen <i>inIC</i> -----	59
<b>Tabla 20.</b> Mezcla de reacción y condiciones utilizadas para la amplificación de los genes <i>inIA</i> e <i>inIC</i> -----	61
<b>Tabla 21.</b> Condiciones de crecimiento e identificación de <i>Listeria monocytogenes</i> en muestras de queso fresco. -----	63
<b>Tabla 22.</b> Resultados de morfología presente en los dos medios de cultivo utilizados de las cepas probadas, (caldo BHI 48 h/ 28 °C y agar BHI 24 hrs/37 °C) -----	67
<b>Tabla 23.</b> Características microscópicas de las colonias aisladas en agar BHI, a las 24 h -----	68
<b>Tabla 24.</b> Resultados de pruebas bioquímicas convencionales para las cepas utilizadas de <i>Listeria</i> -----	71
<b>Tabla 25.</b> Resultados de pruebas bioquímicas del sistema API LISTERIA (Biomerièux) -----	72
<b>Tabla 26.</b> Resultados de la identificación utilizando el sistema API LISTERIA (Biomerièux) -----	74
<b>Tabla 27.</b> Comparación de resultados obtenidos para la fermentación de los carbohidratos ramnosa y xilosa, en tubo y por el sistema API LISTERIA -----	75
<b>Tabla 28.</b> Resultados de pruebas bioquímicas por el sistema VITEK <sup>®</sup> (Biomerièux) para la cepa <i>Listeria monocytogenes</i> I -----	76
<b>Tabla 29.</b> Resultados de la identificación utilizando el sistema VITEK <sup>®</sup> (Biomerièux) -----	76
<b>Tabla 30.</b> Resultados obtenidos por el análisis de NanoDrop del gen ribosomal <i>16S</i> , para las cepas probadas -----	81

<b>Tabla 31.</b> Secuencias utilizadas para la elaboración del árbol filogenético del gen ribosomal 16S. -----	82
<b>Tabla 32.</b> Comparativos de resultados obtenidos con los tres sistemas de identificación utilizados -----	84
<b>Tabla 33.</b> Diseño de primers utilizando el programa Primer BLAST -----	88
<b>Tabla 34.</b> Primers sintetizados para los genes <i>inIA</i> e <i>inIC</i> -----	89
<b>Tabla 35.</b> Resultados obtenidos por el análisis de NanoDrop del gen <i>inIA</i> , para las cepas <i>L. monocytogenes</i> I, <i>L. monocytogenes</i> II y <i>L. monocytogenes</i> III -----	93
<b>Tabla 36.</b> Resultados obtenidos por el análisis de NanoDrop del gen <i>inIC</i> , para las cepas <i>L. monocytogenes</i> I, <i>L. monocytogenes</i> II y <i>L. monocytogenes</i> III -----	93
<b>Tabla 37.</b> Secuencias utilizadas para la elaboración del dendograma del gen <i>inIA</i> -----	94
<b>Tabla 38.</b> Secuencias utilizadas para la elaboración del dendograma del gen <i>inIC</i> -----	95
<b>Tabla 39.</b> Cuantificación del desarrollo de <i>Listeria monocytogenes</i> I, partiendo de una concentración de 10 <sup>7</sup> UFC/ mL, incubado a 37 °C por 0, 4, 24 y 48 h -----	101
<b>Tabla 40.</b> Cuantificación del desarrollo de <i>Listeria monocytogenes</i> I, partiendo de una concentración de 1 UFC/ 10 g, incubado a 37 °C por 0, 4, 24 y 48 h -----	105
<b>Tabla 41.</b> Guía de interpretación de la galería API LISTERIA (BioMérieux). -----	117
<b>Tabla 42.</b> Sustratos utilizados en la identificación de microorganismos Gram-positivos en el sistema VITEK -----	126
<b>Tabla 43.</b> Resultados de pruebas bioquímicas por el sistema VITEK (Biomerièux) para la cepa <i>Listeria monocytogenes</i> II -----	128
<b>Tabla 44.</b> Resultados de pruebas bioquímicas por el sistema VITEK (Biomerièux) para la cepa <i>Listeria monocytogenes</i> III -----	128
<b>Tabla 45.</b> Resultados de pruebas bioquímicas por el sistema VITEK (Biomerièux) para la cepa <i>Listeria innocua</i> I -----	128
<b>Tabla 46.</b> Resultados de pruebas bioquímicas por el sistema VITEK	

(Biomerièux) para la cepa <i>Listeria innocua</i> II -----	129
<b>Tabla 47.</b> Resultados de pruebas bioquímicas por el sistema VITEK	
(Biomerièux) para la cepa <i>Listeria seeligeri</i> -----	129
<b>Tabla 48.</b> Resultados de pruebas bioquímicas por el sistema VITEK	
(Biomerièux) para la cepa <i>Listeria welshimeri</i> -----	129

## 2. Índice de figuras

	PÁGINA
<b>Figura 1.</b> Fisiopatología de la infección por <i>Listeria monocytogenes</i> .-----	34
<b>Figura 2.</b> Rol de E-Caderina en las uniones intercelulares e interacción con la Internalina A bacteriana. -----	35
<b>Figura 3.</b> Metodología de la conservación e identificación de <i>Listeria</i> sp. -----	48
<b>Figura 4.</b> Metodología de la identificación de los genes <i>inIA</i> e <i>inIC</i> en queso fresco -----	49
<b>Figura 5.</b> Marcador de peso molecular de 1 Kbp de la marca Fermentas®. -----	53
<b>Figura 6.</b> Prueba de CAMP para <i>L. monocytogenes</i> I y II contra <i>S. aureus</i> β-hemolítico en agar sangre 37°C/24 h. A: Factor CAMP para <i>L. monocytogenes</i> I. B: Factor CAMP para <i>L. monocytogenes</i> II -----	69
<b>Figura 7.</b> Fermentación de carbohidratos para la cepa de <i>L. monocytogenes</i> I -----	70
<b>Figura 8.</b> Tiras API LISTERIA realizadas para la cepa <i>Listeria monocytogenes</i> I -----	72
<b>Figura 9.</b> Identificación obtenida con el programa APIweb de BioMérieux, para la cepa, <i>L. monocytogenes</i> I. -----	73
<b>Figura 10.</b> Electroforesis para el DNA cromosomal extraído de las cepas de <i>Listeria</i> . -----	78
<b>Figura 11.</b> Electroforesis para el producto de PCR purificado del gen ribosomal 16S de las cepas <i>Listeria</i> . -----	80
<b>Figura 12.</b> Árbol filogenético no enraizado del gen ribosomal 16S de las cepas de <i>Listeria</i> . -----	83
<b>Figura 13.</b> Alineamiento realizado por Clustal W con las secuencias de <i>inIA</i> para obtener la secuencia consenso. -----	85

<b>Figura 14.</b> Alineamiento realizado por Clustal W con las secuencias de <i>inlC</i> para obtener la secuencia consenso. -----	86
<b>Figura 15(a).</b> Secuencia consenso del gen <i>inlC</i> . -----	86
<b>Figura 15(b).</b> Secuencia consenso del gen <i>inlA</i> . -----	87
<b>Figura 16.</b> Electroforesis para el gen <i>inlA</i> para las cepas <i>L. monocytogenes</i> I, <i>L. monocytogenes</i> II y <i>L. monocytogenes</i> III. -----	90
<b>Figura 17.</b> Electroforesis para el gradiente de temperatura para el gen <i>inlC</i> para las cepas <i>L. monocytogenes</i> I, <i>L. monocytogenes</i> II y <i>L. monocytogenes</i> III.-----	91
<b>Figura 18.</b> Dendograma de las secuencias del gen <i>inlA</i> para las cepas de <i>Listeria</i> -----	96
<b>Figura 19.</b> Dendograma de las secuencias del gen <i>inlC</i> para las cepas de <i>Listeria</i> -----	97
<b>Figura 20.</b> Electroforesis para el producto de mPCR de los genes <i>inlA</i> e <i>inlC</i> de las cepas <i>Listeria</i> .-----	99
<b>Figura 21.</b> Electroforesis para el DNA cromosomal total extraído de las muestras de queso y cepa pura, inoculadas con la cepa de <i>L. monocytogenes</i> I a la concentración de $10^7$ UFC/g. -----	103
<b>Figura 22.</b> Electroforesis para el PCR Múltiplex de las muestras de queso y cepa pura, inoculadas con la cepa de <i>L. monocytogenes</i> I a la concentración de $10^7$ UFC/g. -----	103
<b>Figura 23.</b> Electroforesis para el DNA cromosomal total extraído de las muestras de queso y cepa pura, inoculadas con la cepa de <i>L. monocytogenes</i> I a la concentración de 1 UFC/ 10. -----	105
<b>Figura 24.</b> Electroforesis para el PCR Múltiplex de las muestras de queso y cepa pura, inoculadas con la cepa de <i>L. monocytogenes</i> I a la concentración de 1 UFC/10 g.-----	106
<b>Figura 25.</b> Hoja de resultados para la determinación del perfil numérico en la identificación de <i>Listeria</i> por el sistema miniaturizado API <i>Listeria</i> . -----	118

### 3. Resumen

*Listeria monocytogenes* es un bacilo Gram-positivo, patógeno para todos los humanos, aunque tiene la tendencia de causar una enfermedad más seria en mujeres embarazadas, neonatos, ancianos y personas inmunocomprometidas. Actualmente se determina en alimentos por medio del aislamiento y la diferenciación de especies de *Listeria* spp., principalmente por la fermentación de carbohidratos y la actividad hemolítica de los miembros de éste género, aun que tienen el inconveniente del tiempo de detección, además que no son tan específicos para determinar la especie involucrada.

Por tal razón se ha buscado optimizar el tiempo de identificación empleando técnicas de caracterización molecular, en este trabajo se utilizó la técnica de PCR Múltiple (mPCR), con la cual se pueden amplificar más de un gen en una sola reacción con mayor sensibilidad y rapidez.

Se emplearon tres cepas de *Listeria monocytogenes*, dos de *Listeria innocua*, una de *Listeria seeligeri* y una de *Listeria welshimeri*, fueron identificadas fenotípicamente siguiendo el protocolo del Bacteriological Analytical Manual. De igual forma se realizó la identificación molecular por medio de la amplificación del gen ribosomal 16S con primers universales, los amplicones se secuenciaron y se construyeron los árboles filogenéticos. Se logró la identificación de todas las cepas, a excepción de *L. seeligeri*, por medio de la comparación de las secuencias con el programa BLAST-nt.

Se realizó la amplificación de los genes *inIA* e *inIC* por mPCR, estos genes se encuentran involucrados en la patogenicidad de *L. monocytogenes*, los amplicones obtenidos fueron de alrededor de 800 y 500 bp respectivamente. Finalmente se trabajó con una muestra de queso fresco sin inocular y una inoculada con cultivos de  $10^7$  UFC/mL y 1 UFC/10 g siguiendo el protocolo de enriquecimiento indicado en el BAM-FDA, se tomaron muestras a las 0, 4, 24 y 48 h de incubación para la extracción

del DNA cromosomal total. Se realizó el mPCR para la identificación de los genes antes mencionados.

Con los programas bioinformáticos y la herramienta BLAST de la base de datos del National Center for Biotechnology Information, se realizó la comparación de las secuencias obtenidas del gen ribosomal 16S, *inIA* e *inIC*, obteniendo un buen porcentaje de identificación de las cepas. En el caso del queso fresco, se logró la amplificación de los genes *inIA* e *inIC* por mPCR en las muestras de queso inoculadas con *Listeria monocytogenes* y en el queso fresco sin inocular no se detectó.

Para la concentración de  $10^7$  UFC/mL se logró la amplificación de ambos genes a partir del caldo de enriquecimiento a las 4 h, en cambio para la concentración de 1 UFC/10 g la amplificación se obtuvo hasta las 24 h.

## 4. Introducción

El género *Listeria* es un grupo de bacilos cortos Gram-positivos, clasificados taxonómicamente en seis especies (*L. monocytogenes*, *L. ivanovii*, *L. innocua*, *L. seeligeri*, *L. welshimeri* y *L. grayi*). Las infecciones causadas por esta bacteria fueron insignificantes hasta 1980, cuando se registraron muchos casos de listeriosis humana, debido al aumento del consumo de “alimentos listos para su consumo” (“ready-to-eat”) (Gasánov *et al.*, 2005; Wagner y McLauchlin, 2008).

La contaminación del queso con *L. monocytogenes* puede abarcar todas las etapas de la cadena agroalimentaria, por factores como la presencia de mastitis subclínica, el deterioro de la infraestructura, la contaminación de pisos y/o equipos, deficientes procedimientos de limpieza y desinfección, presencia de biopelículas, temperaturas de almacenamiento inadecuada, contaminación cruzada, entre otros. Entre 1995 y 2009 se identificaron en el mundo 11 brotes de listeriosis asociados al consumo de quesos, con 545 personas afectadas con tasas de mortalidad estimadas entre el 14% y 30% y de hospitalización hasta del 100 % (Instituto Nacional de Salud, 2011).

*Listeria monocytogenes* es patógena para todos los humanos, pero tiene la tendencia de causar una enfermedad más seria en mujeres embarazadas, neonatos, ancianos y personas inmunocomprometidas. Las manifestaciones de la enfermedad en el hombre comprenden septicemia, meningitis y encefalitis, habitualmente precedidas de síntomas parecidos a los de la gripe, incluida la fiebre; en mujeres gestantes, las infecciones intrauterinas o cervicales pueden provocar abortos espontáneos o muerte del feto (Almeida, 2000; Wagner y McLauchlin, 2008).

En los últimos años se ha buscado la optimización del tiempo de identificación de este patógeno al emplear nuevas técnicas involucradas en la identificación molecular, la más utilizada dentro de estas técnicas es la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) (Gasánov *et al.*, 2005).



El RNA ribosomal (RNAr) 16S es la macromolécula más utilizada en estudios de filogenia y taxonomía bacteriana debido a ser una molécula muy antigua presente en todas las bacterias, su estructura y función han permanecido constantes durante un tiempo muy prolongado. Sin embargo, debido a esta universalidad del gen 16S para la identificación de especies patógenas, como es el caso de *L. monocytogenes*, resulta ser poco específica (Díaz y Wachter, 2003).

En el Cepario de la Facultad de Química, donde se desarrolló este trabajo, se ha realizado la identificación de distintos grupos de bacterias mediante la amplificación del gen 16S. Escalante *et al.*, (2001), realizó la identificación de bacterias lácticas presentes en el pozol, así mismo Escalante *et al.*, (2008), analizaron la diversidad bacteriana en el pulque. Conca (2008), realizó la identificación de bacterias lácticas productoras de exopolisacárido presentes en el pulque; Cervantes (2010) y Cabanétos (2013), realizaron la identificación de la colección de bacterias lácticas, de Enterobacterias y otras bacterias Gram-negativas del Cepario, respectivamente. En cuanto a la identificación de microorganismos patógenos, Iriarte (en revisión) realizó la identificación de *E. coli* enteropatogénica en muestras de carne congelada para hamburguesas mediante PCR Múltiple de los genes *eae* y *bfp*.

La identificación del género *Listeria* se realiza de acuerdo a la metodología tradicional antes descrita, estas pruebas son útiles para una identificación presuntiva, sin embargo no son tan específicas ni sensibles como son las técnicas moleculares; por lo anterior se realizó la identificación de todas las cepas de *Listeria* mediante la secuenciación del gen ribosomal 16S.

La PCR Múltiple (mPCR) es una variante de la técnica de PCR, en la cual se puede amplificar más de un gen en una sola reacción. Esta técnica nos da una mayor sensibilidad y rapidez en la detección del patógeno, además de presentar la ventaja de que su determinación puede realizarse directamente del DNA extraído de la muestra de alimento sin tener que realizar un aislamiento previo, con lo cual se logrará reducir el riesgo de infección por *L. monocytogenes* transmitida por alimentos

al tener el resultado del análisis en menor tiempo y con mayor sensibilidad, (NOM-143-SSA1-1995; Almeida, 2000).

Por lo anterior los objetivos de este trabajo son implementar el procedimiento para la identificación fenotípica y molecular de *Listeria* spp, determinar a *L. monocytogenes* utilizando la técnica de mPCR para los genes patógenos *inIA* e *inIC*, así mismo mediante la amplificación de ambos genes empleando la técnica de PCR Múltiplex, es posible la identificación de *L. monocytogenes* en quesos frescos incrementando la sensibilidad, especificidad y reduciendo así el tiempo de identificación.

## 5. Marco teórico

### 5.1. Taxonomía del género *Listeria*.

El género *Listeria* son bacilos cortos Gram-positivos, no esporulados, anaerobios facultativos, clasificado taxonómicamente en seis especies; dos de estas especies son patógenas (*L. monocytogenes* y *L. ivanovii*) y cuatro no patógenas (*L. innocua*, *L. seeligeri*, *L. welshimeri* y *L. grayi*) (Liu, 2008).

Todas las especies de *Listeria* son móviles con flagelos peritricos cuando se encuentran a una temperatura de 20 a 25 °C, pero pierden el flagelo cuando se encuentran a 37 °C; crecen en un intervalo de pH de 5.2 a 9, y en un intervalo de temperatura de -4 °C a 50 °C, aunque su crecimiento óptimo se encuentra entre 30-37 °C. Las secuencias del gen ribosomal 16S ayudan a dividir estas especies en dos grupos, uno formado por *L. monocytogenes*, *L. ivanovii*, *L. innocua*, *L. welshimeri* y *L. seeligeri*, y el otro grupo formado únicamente por *L. grayi*. (Wagner y McLauchlin, 2008).

*L. monocytogenes* es catalasa-positivo y oxidasa-negativo, expresa una  $\beta$ -hemolisina la cual produce una zona de hemólisis en agar sangre, esta hemolisina actúa sinérgicamente con la  $\beta$ -hemolisina de *Staphylococcus aureus* en eritrocitos bovinos, por lo cual se considera que posee un factor de CAMP positivo (Wagner y McLauchlin, 2008).

Todas las especies de *Listeria* presentan una morfología similar en medios de cultivo artificiales, las colonias después de 24-48 horas de incubación presentan un diámetro de 0.5-1.5 mm, redondas, traslúcidas, convexas, suaves y de bordes enteros. Se puede distinguir a *Listeria* spp. de bacterias similares por medio de reacciones bioquímicas, como son actividad lipolítica y hemolítica, fermentación de azúcares y prueba de CAMP; aunque se han encontrado cepas (ATCC 15313 o NCTC 10357) que no presentan actividad hemolítica, son negativas a la prueba de CAMP y no

presentan movilidad. Las proteínas responsables de la hemólisis de *Listeria* en agar sangre han sido identificadas en *L. monocytogenes* (listeriolisina o LLO), *L. ivanovii* (ivanolisina o ILO) y *L. seeligeri* (seeligeriolisina o SLO) (Wagner y McLauchlin, 2008).

*L. monocytogenes* comprende 12 serovariedades: 1/2a, 1/2b, 1/2c, 3a, 3b, 3c, 4a, 4b, 4c, 4d, 4e y 7, las serovariedades 4b, 1/2a, 1/2b y 1/2c forman el 98% de los casos registrados de listeriosis humana, y la serovariedad 4b ha sido asociada con los más recientes casos de listeriosis (Wagner y McLauchlin, 2008).

## 5.2. Factores físicos y químicos de desarrollo

Las especies de *Listeria* presentan buen crecimiento en medios de cultivo no selectivos, como son caldo soya-tripticaseína o infusión cerebro corazón (BHI), y bajo condiciones aeróbicas y anaeróbicas. *Listeria* puede sobrevivir en presencia de NaCl 10% y con 200 ppm de NaNO<sub>2</sub>; el intervalo de pH es de 5.2 a 9.0. La movilidad tipo “tumbling” se presenta en cultivos incubados a una temperatura de 20-25 °C. (Wagner y McLauchlin, 2008).

*Listeria* es capaz de sobrevivir bajo diferentes condiciones ambientales, como es el intervalo de temperatura -0.1 a 45 °C, pH 3.0 a 9.5 y concentraciones altas de sal (cerca del 10%). Esta resistencia depende de los mecanismos de respuesta contra el estrés; se conocen genes que regulan esta respuesta como son *betL*, *gbuABC*, *opuC*, *opuB*, *Imo1421* y *bsh*. La habilidad de *Listeria monocytogenes* de sobrevivir bajo estas condiciones la convierte en una preocupación para la industria alimenticia (Wagner y McLauchlin, 2008). En la tabla 1 se resumen las características generales de crecimiento de *Listeria monocytogenes*.

**Tabla 1.** Límites de crecimiento y sobrevivencia de *L. monocytogenes*.

Parámetro	Mínimo	Máximo	Sobrevivencia
Temperatura	-1.5 a 3 °C	45 °C	-18 °C
pH	4,0	9,4 – 9,6	3,3 – 4,0
Actividad de agua ( $a_w$ )	0,90 a 0,93	>0,99	<0,89
Sal (% NaCl)	< 0,5	12-16	>20

(Wagner y McLauchlin, 2008)

De igual forma se han identificado antibióticos a los cuales *Listeria* spp. presenta susceptibilidad y resistencia, los cuales se muestran en la tabla 2.

**Tabla 2.** Susceptibilidad y resistencia de *Listeria* a agentes antimicrobianos.

Sensibilidad natural o intermedia	Resistencia natural o intermedia
Tetraciclinas	Cefalosporinas (cefetamet, cefixime, ceftibuten, ceftazidima, cefdinir, cefpodoxima, cefotaxima, ceftriaxona y cefuroxima)
Aminoglicósidos	Aztreonam
Penicilinas (excepto oxacilina)	Ácido pipemídico
Cefalosporinas (loracarbef, cefazolina, cefaclor)	Dalfopristina
Cefixina	
Cefoperazona	
Carbapenemas	
Macrólidos	
Lincosamidas	
Glicopéptidos	
Cloranfenicol	
Rifampicina	

(Wagner y McLauchlin, 2008)

### 5.3. Alimentos donde se desarrolla *Listeria* spp.

*Listeria monocytogenes* es un microorganismo ubicuo del ambiente, por lo cual se puede encontrar en gran variedad de alimentos, de ahí que sea de suma importancia para la industria alimenticia el determinar las condiciones a las cuales el alimento no pierde sus propiedades, y se mantiene la contaminación microbiana a niveles bajos o nulos (Cocolin, 2002; Wagner y McLauchlin, 2008).

*Listeria* puede crecer en un amplio rango de alimentos que presentan valores de actividad de agua altos ( $a_w > 0.92$ ), y en un amplio intervalo de temperatura (-0.15 a 45 °C). El crecimiento a temperaturas de refrigeración es muy lento, con un tiempo de duplicación máximo de 1 a 2 días en productos lácteos. En cambio, *L. monocytogenes* no es muy resistente a las altas temperaturas, por lo que no resiste las temperaturas de esterilización en leche (Wagner y McLauchlin, 2008).

Los alimentos donde se ha aislado a *L. monocytogenes* con mayor frecuencia son quesos frescos, leche, paté, embutidos, carnes rojas, pollo, pescado, vegetales procesados y algunas frutas en trozos (Churchill, *et al.*, 2005). Así mismo, se ha aislado en un 45% de leche cruda, 19.5% de la carne de cerdo, 60% de aves de corral, 79% de carne molida de res, 30% de hortalizas como papa y rábanos, 0.57% de leche en polvo y alimentos elaborados con este producto como helado (3.79%), leche fría (3.03%), chocolate (1.20%) y en helado casero (8.55%) (Tovar *et al.*, 2005).

- Productos de la pesca

Aunque no es común encontrar a *L. monocytogenes* en pescados o mariscos, puede llegar a aislarse de pescados crudos que se encuentran cerca de asentamientos humanos, como criaderos. Por ejemplo, en Finlandia se ha encontrado a *L. monocytogenes* en 0-75 % de pescados criados en granjas. Rodas-Suarez *et al.* examinaron 66 pescados y 144 muestras de agua del estuario, recolectadas en

Veracruz, México. Se detectó a *Listeria* en 22.7 % de los pescados y en 30.5% de las muestras de agua (Liu, 2008).

De igual forma se ha detectado a *L. monocytogenes* en filetes procesados, lo cual indica malas prácticas de higiene durante la fabricación, o bien que la contaminación provenía del ambiente natural del pescado. En la tabla 3 se muestran los productos donde es posible encontrar a *Listeria* (Gambarin, 2012).

**Tabla 3.** Productos marinos y su riesgo para encontrar *Listeria*.

Alto riesgo	Bajo riesgo
Moluscos crudos	Pescados semi-conservados (caviar)
Pescado crudo	Pescados procesados con calor (esterilizados)
Pescados parcialmente procesados (salados, marinados, fermentados y ahumados)	Pescados secos, salados y ahumados
Pescados procesados con calor (Pasteurizados, cocinados)	Pescados y crustáceos congelados

(Liu, 2008)

- Productos cárnicos

Se ha detectado a *L. monocytogenes* en muestras de heces de cerdos en porcentajes de 0 a 47%, y en la piel de cerdos sanos, aunque se ha detectado con mayor frecuencia en lenguas de cerdos (más del 14%) y vísceras, lo cual puede ser resultado de la contaminación cruzada entre la lengua y otras vísceras durante el procesamiento de las mismas (Liu, 2008).

Los serotipos de *L. monocytogenes* que más han sido identificados en productos procesados de cerdo son: 1/2a, 1/2b y 1/2c. Se puede encontrar a *L. monocytogenes* en productos cárnicos, penetrando en la carne al ser manipulada o al entrar en

contacto con maquinaria, herramienta o superficies de trabajo contaminadas (Liu, 2008). En la tabla 4 se muestran los resultados de un análisis realizado en muestras de carne, en distintos lugares del país.

**Tabla 4.** Porcentaje de muestras de carne de res positivas para patógenos por región.

Microorganismo	Monterrey, NL (n=30)		Cd. de México (n=40)		Tabasco (n=20)		Porcentaje total
	Importada	Mexicana	Importada	Mexicana	Importada	Mexicana	
<i>L. monocytogenes</i>	0	26.7 (8)	17.5 (7)	10 (4)	5 (1)	25 (5)	27.7 (25)
<i>Salmonella</i>	0	3.3 (1)	0	2.5 (1)	0	30 (6)	8.8 (8)
<i>Yersinia</i>	0	6.7 (2)	12.5 (5)	27.5 (11)	30 (6)	10 (2)	28.8 (26)

( )= número de muestras

(Rubio *et al.*, 2013)

La carne importada fue la menos contaminada en comparación con la de origen mexicano, indicando que el uso obligatorio de HACCP como requisito de United States Department of Agriculture-Food Safety and Inspection Service (USDA-FSIS), es efectivo para la disminución de la contaminación por patógenos en la canal bovina. En México, en contraste con Estados Unidos de América, el uso de programas pre-requeridos e implementación del sistema HACCP para reducir cargas patógenas en la canal bovina, no es obligatorio y solamente es usado por algunos rastros como iniciativa propia (Rubio *et al.*, 2013).

En México, se ha informado con anterioridad de la presencia de bacterias como: *Listeria*, *Salmonella*, *Yersinia* y *Staphylococcus*, entre otros agentes causantes de enfermedades transmitidas por alimentos, en donde la carne y sus derivados actúan como vehículos potenciales para la transmisión de estos patógenos (Rubio *et al.*, 2013).



- Frutas y vegetales.

Los vegetales y frutas en trozos representan un medio rico de nutrientes para el desarrollo de *Listeria*; el primer brote de listeriosis documentado (23 pacientes) ocurrió en 1979 en el hospital de Boston, donde los vegetales preparados en el hospital fueron contaminados con *L. monocytogenes* serotipo 4b (Liu, 2008).

- Alimentos listos para su consumo (LPC; ready-to-eat).

Según la definición del Codex (CAC, 1999b), los alimentos listos para consumo (LPC) comprenden cualquier alimento (incluidas las bebidas) que se consume normalmente en crudo, cualquier alimento manipulado, elaborado, mezclado, cocinado o transformado de otro modo sin proceso adicional (Tovar *et. al.*, 2005; Liu, 2008).

Estos alimentos LPC son una categoría amplia y diversa de productos, elaborados y almacenados de modos diferentes y en condiciones diferentes, algunos de los cuales sustentan la proliferación de *L. monocytogenes*, mientras que en otros casos dicho microorganismo no prolifera en las condiciones específicas de almacenamiento y vida útil (Liu, 2008).

- Productos lácteos.

*Listeria monocytogenes* puede desarrollarse en toda clase de alimentos; siendo la leche y los productos lácteos (tales como el queso fresco) los que presentan mayor riesgo de ser contaminados por esta bacteria. En los países donde estos alimentos son producidos tradicionalmente, es decir, sin ningún tratamiento térmico, la contaminación por *Listeria monocytogenes* tiene que controlarse a partir de materia prima (Meyer-Broseta *et al.*, 2003).

Se ha demostrado que varios brotes de listeriosis están asociados con el consumo de leche, lo cual ha causado gran preocupación en la industria láctea, debido al número de casos y al porcentaje tan alto de mortalidad asociado a estos brotes. La presencia de *Listeria* spp y *L. monocytogenes* en tanques de leche bronca y muestras de productos lácteos, es relativamente baja. En una planta se encontró que el agua utilizada para el lavado del queso dio la mayor proporción de muestras positivas (9.5%), seguida de las superficies en donde se almacenaban los quesos (5.0%) (Carminati, 2004; Amagliani, 2004).

También se ha reportado en 2.6-7.9% de muestras de mantequilla al inicio de su procesamiento. Se ha aislado de quesos, los cuales son frescos en su mayoría y de fabricación casera en donde se aisló principalmente al serotipo 4b, según lo reportado por un estudio realizado en México. Los quesos frescos elaborados con leche cruda (es decir, sin pasteurizar) han sido implicados en infecciones causadas por varios patógenos entéricos, incluyendo un brote de listeriosis en el condado de Los Ángeles, California (Meyer-Broseta *et al.*, 2003; Cagri-Mehmetoglu, 2011).

#### **5.4. Brotes reportados a nivel mundial**

A pesar de que desde hace aproximadamente 50 años se reconoce a *Listeria* como causante de afecciones en animales y humanos, pero fué hasta la década de los 80's que se reconoció como un problema de salud pública, con brotes en algunas provincias de Canadá, E.U.A. y Europa, debido principalmente al consumo de alimentos contaminados (Schuchat *et al.*, 1991).

Muchos factores influyen en el crecimiento de *L. monocytogenes* en los alimentos, como son su naturaleza, concentración de nutrientes, pH, temperatura, actividad de agua y presencia de inhibidores. Es capaz de sobrevivir en el suelo, del mismo modo que muchos microorganismos Gram-positivos, de aquí que el empleo del estiércol tenga gran importancia cuando se aplica a una tierra de cultivo, sobre todo cuando la

cosecha que se obtiene de los cultivos son frutas u hortalizas que posiblemente no se sometan a un tratamiento térmico (Lovett *et al.*, 1990).

Este microorganismo es ubicuo en la naturaleza, se asocia con una gran variedad de alimentos crudos, contaminados de origen o durante su obtención y/o procesamiento. *Listeria monocytogenes* normalmente coexiste con otras especies del mismo género, tales como *L. ivanovii*, *L. seeligeri* y *Listeria innocua*, la cual no es patogénica y se utiliza como indicador de la posible presencia de *L. monocytogenes* (Rodríguez-Lázaro *et al.*, 2004).

La listeriosis es considerada como una enfermedad rara, su incidencia en humanos es entre 0.1 y 11.3 casos/millón, con un porcentaje muy alto de mortalidad (arriba del 30 %). Debido a que el periodo de incubación puede variar entre 3 y 60 días, es difícil identificar el alimento responsable de la infección. El primer brote reportado ocasionado por alimentos fue en 1981 con 41 casos de listeriosis y se confirmó mediante la identificación de *L. monocytogenes* en una ensalada fresca de col, en Halifax, Nueva Escocia, Canadá (Tovar *et al.*, 2005; Gambarin *et al.*, 2012). En la tabla 5 se muestra la incidencia de *Listeria monocytogenes* en personas clínicamente sanas, en diferentes ciudades.

La probabilidad de enfermar por el consumo de un número específico de bacterias de *L. monocytogenes* puede representarse de forma conveniente mediante el triángulo epidemiológico, compuesto por los siguientes factores: la matriz alimenticia, la virulencia de la cepa y la vulnerabilidad del consumidor. Las cifras notificadas de incidencia anual de listeriosis oscilan entre: 0,1 a 11,3 casos por millón de personas, 0,3 a 7,5 casos por millón de personas en Europa, 4,4 casos por millón de personas en los Estados Unidos de América y 3 casos por millón de personas en Australia; sin embargo, la exactitud de estos valores depende del empeño que cada país pone en la ejecución de los programas nacionales de vigilancia de la listeriosis (Mead *et al.*, 1999; FAO/OMS, 2004).

**Tabla 5.** Incidencia de *L. monocytogenes* en personas clínicamente sanas, en diferentes ciudades.

Ciudad	Número de muestras		Serotipo <sup>a</sup> de <i>Listeria monocytogenes</i>		
	Totales	Positivas (%)	1	4b	5
Berlín	24	4 (17)	2	2	-
Copenhage	26	3 (12)	2	1	-
Londres	25	1 (4)	1	-	-
St. Gallen	25	4 (16)	4	-	-
Estocolmo	20	3 (15)	-	3	-
Utrecht	25	2 (8)	1	-	1
Viena	26	5 (19)	5	-	-

<sup>a</sup> Además, en todas partes se aisló un número de cepas de *L. monocytogenes* no tipificables aproximadamente similar. (Robinson, 2000)

Dada la gravedad de la listeriosis los afectados solicitan con frecuencia atención médica, según cálculos de los Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades (CDC) de los Estados Unidos de América, el 90% de los enfermos de listeriosis es hospitalizado y aproximadamente la mitad de los casos se notifica a los CDC, frente a la tasa de identificación del 3% de la mayoría de los demás patógenos transmitidos por alimentos (Mead *et al.*, 1999). En la tabla 6 se muestran los datos de incidencia de Listeriosis por cada 100,000 habitantes en varios países.

**Tabla 6.** Reportes de listeriosis casos/100,000 habitantes

País	No. de casos/100 000 habitantes	Año
Estados Unidos	12 en neonatos	1997
España	1,8 general	2000
Estados Unidos	123 inmunocomprometidos	2000
Francia	0,35 general	2001-2003
Estados Unidos	0,3 población general	2005
Dinamarca	1,8 general	2009
Alemania	0,62 general	2009

(Instituto Nacional de Salud, 2011)

## 5.5. Brotes reportados en México

No se dispone de datos actualizados de la incidencia de este microorganismo en México, ya que los procesos gastroentéricos por *L. monocytogenes* no se declaran, o bien son incluidos en otros procesos diarreicos por no seguirse su análisis en forma rutinaria. Sin embargo se ha reportado en distintos estudios el aislamiento de *Listeria monocytogenes* en distintos alimentos, en la tabla 7 se muestran estos resultados (Alcázar y Rubio, 2006).

**Tabla 7.** Aislamientos de *L. monocytogenes* en quesos tipos panela y Chihuahua procedentes de mercados sobre ruedas en la Ciudad de México.

Mercado	Número de muestras	Número de muestras presuntivas en agar PALCAM
Queso Panela		
A	30	16
B	30	16
Queso Chihuahua		
C	30	0
D	30	1

(Alcázar y Rubio, 2006).

## 5.6. Queso fresco

Los quesos frescos son elaborados de manera industrial y artesanal, existiendo mayor riesgo de contaminación con *L. monocytogenes* en la producción artesanal debido principalmente a la falta de implementación de Buenas Prácticas de Manufactura (BPM). Entre 1995 y 2009 se identificaron en el mundo 11 brotes de listeriosis asociados al consumo de quesos con 545 personas afectadas, con tasas de mortalidad estimadas entre el 14% y 30% y de hospitalización hasta del 100% (Instituto Nacional de Salud, 2011).

La contaminación del queso con *L. monocytogenes* puede abarcar todas las etapas de la cadena agroalimentaria por factores tales como la presencia de mastitis subclínica, el deterioro de la infraestructura, la contaminación de pisos y/o equipos, deficientes procedimientos de limpieza y desinfección, presencia de biopelículas, temperaturas de almacenamiento inadecuada, contaminación cruzada, entre otros.

En el ámbito mundial, en las últimas dos décadas el queso ha sido el principal alimento involucrado en brotes de listeriosis, destacándose los siguientes brotes: el primero, en Estados Unidos asociado al consumo de queso “tipo-mexicano”, con una tasa de mortalidad del 34%, el segundo en Suiza asociado al consumo de queso “*Vacherin Mont d’Or-type*” con una tasa de mortalidad del 27%, y los dos últimos ocurridos en Francia asociados al consumo de queso *Brie de Meaux* (Instituto Nacional de Salud, 2011).

Los principales brotes de listeriosis reportados en el mundo asociados al consumo de queso, se presentan en la tabla 8. De los casos incluidos únicamente dos indican que fueron producidos con leche cruda, y se destaca en este resumen la variedad de quesos (incluidos quesos frescos y madurados).

En la Unión Europea (UE), entre 2004 y 2008, se estimaron 0.3 casos por cada 100,000 habitantes. Para el año 2007, el mayor número de casos se presentó en personas mayores de 65 años (53,1%) estimándose una tasa de 1 caso/100,000 y en niños menores de 5 años con 0,51 casos/100,000 habitantes (Instituto Nacional de Salud, 2011).

En la tabla 9 se presentan estudios realizados en el ámbito internacional sobre la presencia de *L. monocytogenes* en quesos. La prevalencia varía entre 0% y 50%, sin embargo, esta variabilidad puede estar relacionada con el número de muestras procesadas en cada estudio, así como por las condiciones de elaboración de los mismos (uso de leche cruda o pasteurizada y tipo de queso).

**Tabla 8.** Principales brotes de listeriosis en el mundo asociados al consumo de queso (1995-2009)

Año	Tipo de queso	No. de afectados	Reporte	Tipo de Listeriosis	Serotipo involucrado	País
1995	Queso fresco	37	11 muertos (29.7%)	I	4b	Francia
1997	Queso fresco elaborado con leche cruda	14	0	NI	4b	Francia
2000	Queso frsco tipo mexicano elaborado con leche cruda	13	5 abortos (38.5%)	I	ND	Estados Unidos de América
2001	Queso	48	1 hospitalizado (2.1%)	NI	ND	Suecia
	Queso	38	0	NI	1/2b	Japón
2002	Queso elaborado con leche cruda	17	3 abortos (17.6%), 10 bacteremia (58.8%), 11 encefalitis (64.7%), 2 partos prematuros (11.7%)	I	ND	Canadá
2005	Queso tomme	10	ND	ND	1/2a	Noruega
2006	Queso suave	75	13 muertos (17.3%)	ND	1/2b	República Checa
	Queso duro	189	145 hospitalizados (81%)	I	4b y 1/2b	Alemania
2007	Queso suave	21	5 muertos (23.8%), 21 hospitalizados (100%)	I	1/2a	Suiza
2008	Queso Brie	69	ND	I	Clon 4b	Chile
2009	Queso duro	14	4 muertos (28.6%)	I	1/2b, 4b, 1/2 a	Austria y Alemania

ND: no hay dato; I: Listeriosis invasiva; NI: Listeriosis no invasiva.

(Instituto Nacional de Salud, 2011)

**Tabla 9.** Prevalencia de *L. monocytogenes* en quesos en el contexto internacional.

Tipo de queso	Año	No. de muestras		País
		analizadas	Prevalencia (%)	
Queso fresco artesanal	NR	17	41.2	Brasil
Queso fresco industrial		33	3.0	
Queso madurado		53	5.7	
Queso fresco	2007	110	24.5	Costa Rica
Queso fresco	NR	101	22.8	México
Queso fresco	NR	10	10.0	Costa Rica
Quesos de pasta blanda (tipo panela hecho con leche pasteurizada) y queso semimadurado (Chihuahua)	2005	60	0	México
Queso fresco	NR	60	3.3	Venezuela
Queso fresco	NR	25	0	Chile
Queso fresco artesanal	2003	74	4.1	Perú
Queso suave	NR	99	1.0	España
Queso fresco elaborado con leche pasteurizada	2000-2001	371	1.6	Portugal
Queso de pasta blanda	2002-2003	132	0	Argentina
Quesos semiduros	NR	54	1.9	Cuba
Quesos semisuaves, incluidos 36 quesos frescos	2001-2002	90	6.7	Brasil
Queso telita	NR	100	0	Venezuela
Queso minas	NR	40	0	Brasil
Queso tipo colonial		62	0	
Queso Ricotta	2004-2005	6	50.0	Brasil
Queso panela	NR	40	15.0	México

NR: no reporta

(Instituto Nacional de Salud, 2011)



## 5.7. Factores y mecanismos de patogenicidad

La patogenicidad es la capacidad de un agente infeccioso de producir enfermedad en un huésped susceptible. La virulencia es un término cuantitativo que define el grado en que un patógeno puede causar enfermedad, esto a menudo está relacionado con el número de microorganismos que se requieren para causar la infección o la frecuencia de infección en una población dada y los determinantes de virulencia de la cepa (Madigan *et al.*, 2004).

La listeriosis invasiva se refiere a los casos en que una infección inicial del tejido intestinal por *L. monocytogenes* deriva en la invasión de partes del organismo que habitualmente son estériles, como el útero grávido, el sistema nervioso central o la sangre, o combinaciones de éstos. La listeriosis invasiva se caracteriza por una tasa de letalidad alta, de 20 a 30% y las infecciones pueden producir secuelas, aunque la incidencia de éstas pocas veces se determina. Los casos de listeriosis no invasiva (conocida como gastroenteritis febril por listerias) se han observado en algunos brotes en los que la mayoría de los casos presentaron síntomas de gastroenteritis, como diarrea, fiebre, cefalea y mialgia, tras un período de incubación corto. Estos brotes se han producido generalmente tras la ingestión de dosis altas de *L. monocytogenes* vía alimentaria por personas previamente sanas (Rocourt, 1996; Mead *et al.*, 1999).

La virulencia de *Listeria* es mediada por un gran número de factores, algunos de ellos son exclusivos de *Listeria monocytogenes*, y otros se pueden encontrar en otras especies como *L. ivanovii* y *L. welshimeri*, en la tabla 10 se presentan algunos de estos factores de virulencia.

*L. monocytogenes* induce su propia internalización sin necesidad de realizar un reacomodo significativo en la membrana de la célula hospedera. La entrada ocurre por fagocitosis (tipo zipper) caracterizada por la emisión de pequeños pseudópodos que la adhieren firmemente a la membrana de la célula hospedera. Después de esto, la bacteria aparece en una vacuola unida a la membrana, la cual es lisada por la combinación de hemolisina, listeriolisina (LLO) y dos fosfolipasas (Liu, 2008).

**Tabla 10.** Factores de virulencia encontrados en *Listeria*.

Proteína	Genes	Comentarios
<b>PrfA</b>	<i>prfA</i>	Proteína reguladora del operón
<b>PI-PLC</b>	<i>plcA</i>	Fosfolipasa
<b>LLO</b>	<i>hlyA</i>	Hemolisina
<b>ActA</b>	<i>actA</i>	Polimerización de actina
<b>InlA</b>	<i>InlA</i>	Internalina necesaria para la entrada a la célula hospedera

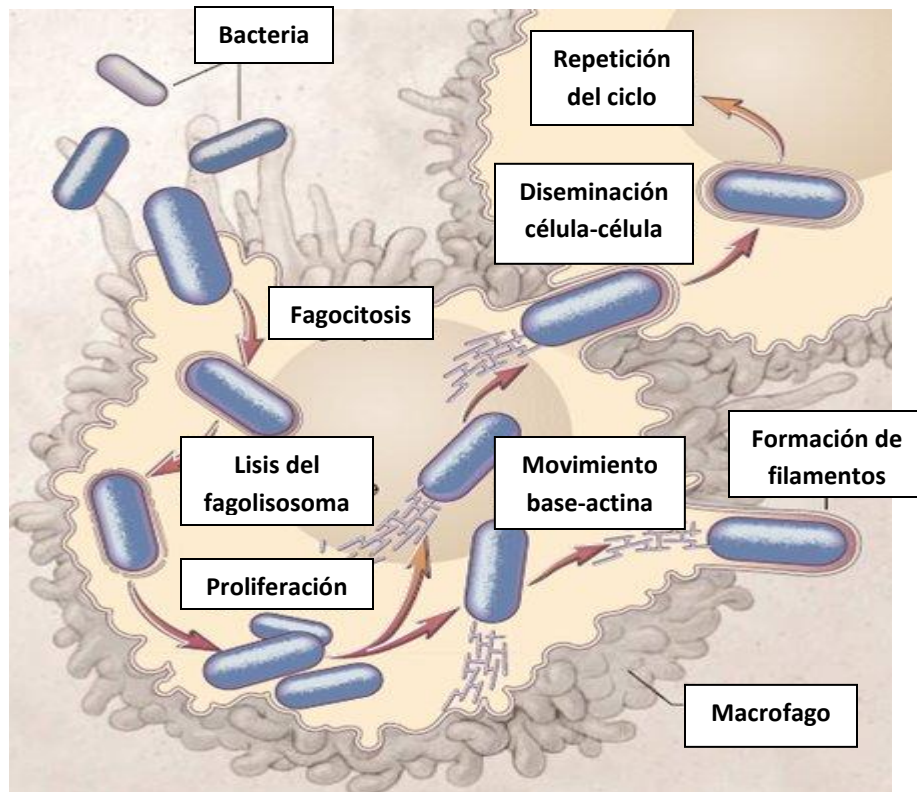
(Liu, 2008)

Las bacterias que se encuentran en el citoplasma comienzan a replicarse mientras utilizan transportadores específicos para obtener carbohidratos de la célula hospedera. Posteriormente, *L. monocytogenes* induce la expresión de la proteína de membrana ActA, la cual en conjunto con la activación del complejo Arp2/3, inducen la degradación de los filamentos de actina de la célula hospedera. La formación de una “cola” y la constante polimerización de la F-actina, produce una fuerza de propulsión la cual mueve a la bacteria a través del citoplasma. Por este mecanismo, la bacteria logra avanzar a las células cercanas a la célula hospedera, repitiendo el mismo mecanismo de internalización e invasión (Liu, 2008). En la figura 1 se muestra la fisiopatología de la infección por *L. monocytogenes*.

## 5.8. Factores de virulencia

### 5.8.1. Familia de internalinas

Las internalinas pertenecen a la familia de las proteínas LLR (repeticiones ricas en leucina; Leucine-rich repeat), caracterizadas por un dominio N-terminal y un péptido señal, lo que permite el transporte de las proteínas a la superficie de la célula (Bierne, *et al.*, 2007).



**Figura 1.** Fisiopatología de la infección por *Listeria monocytogenes*.

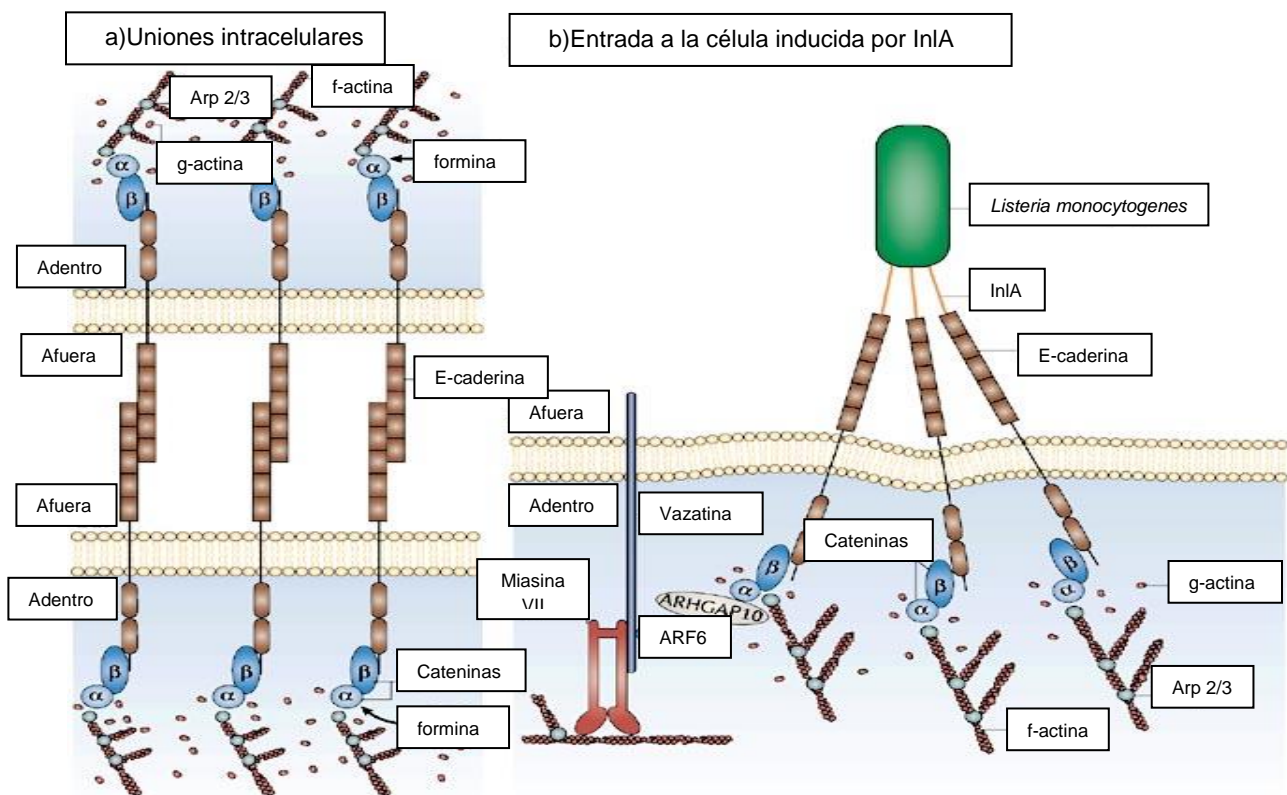
(Modificado de Olivares, 2009)

Las internalinas pueden dividirse en 3 clases, la primera representada por la InIA; comprende internalinas de tamaño relativamente grande. La segunda, con un solo miembro en *L. monocytogenes* cepa EGD-e (InIB), y finalmente la tercera clase, de nuevo con un solo miembro en *L. monocytogenes* (InIC), la cual corresponde a una proteína LRR relativamente pequeña, que no se encuentra en la superficie de la célula, sino en el citoplasma.

La InIA es una proteína ácida de 800 aminoácidos, la cual posee dos dominios largos repetidos. El gen *inIA* el cual codifica a la proteína, forma parte de un operón junto con el gen *inIB* (gen que codifica la InIB) aunque los dos genes pueden transcribirse individualmente, la transcripción del gen *inIA* puede ocurrir por medio de cuatro promotores. En la figura 2 se muestra el rol de la E-caderina en las uniones intercelulares y su interacción con la Internalina A; a) se muestran las uniones

intracelulares entre las células hospederas, las células adyacentes se encuentran unidas gracias a la proteína transmembranal E-caderina. El dominio intracelular de esta proteína se adhiere a  $\alpha$ -catenina y  $\beta$ -catenina; la  $\alpha$ -catenina forma uniones con el citoesqueleto de actina y con las forminas, las cuales también son esenciales para la formación de la unión por puentes de actina entre célula-célula.

En la figura b se observa que el receptor para la proteína InIA es la E-caderina, muchas de estas proteínas transmembranales son reclutadas al sitio de unión con la InIA, con lo cual se produce un reordenamiento del citoesqueleto, el cual es necesario para la invasión de la célula hospederas.



**Figura 2.** Rol de E-caderina en las uniones intercelulares e interacción con la Internalina A bacteriana.

(Modificado de Olivares, 2009)

Por otra parte, la InIB es una proteína de 630 aminoácidos, que también cuenta con una secuencia N-terminal de transporte y está ubicada hacia la superficie de la célula por medio de enlaces no covalentes.

Las InIA e InIB están involucradas con la internalización de *L. monocytogenes* en varias células de mamíferos; la InIA regula la entrada a la célula hospedera principalmente en enterocitos humanos y hepatocitos; mientras que InIB promueve la invasión a un mayor número de células, incluyendo las células epiteliales, endoteliales, hepatocitos y fibroblastos.

El papel de la InIC no es muy claro, aunque se ha observado que la eliminación del gen *inIC* reduce la patogenicidad en ratones, lo cual sugiere una participación de la InIC con la InIA para la internalización de la célula, pero el detalle de esta función y el modo de acción aun es desconocido (Kuhn, 2008; Gründler *et al.*, 2012).

## **5.9. Métodos de detección**

La identificación de *Listeria* empleando métodos de cultivo e inmunoensayos se sigue realizando tradicionalmente debido a que son sencillos y baratos. La prueba de inmunoensayo se basa en una interacción de antígenos y anticuerpos que pueden ser visualizados por aglutinación o formación de grumos, desarrollo de colores a partir de sustratos cromogénicos y por la formación de una inmunobanda o fluorescencia. Ejemplos de estas técnicas son la prueba de ELISA o el inmuno conteo magnético. Sin embargo, particularmente en la industria alimenticia, existe una búsqueda constante de nuevos métodos de identificación que sean más rápidos y sensibles, donde la presión por parte de los organismos de regulación es constante (Gasnov *et al.*, 2005).

La industria de alimentos se inclina hacia la identificación molecular de *Listeria*, sin embargo existen ciertas desventajas comparando estos métodos con los de cultivo

tradicional; tales como el costo de los equipos y reactivos, así como la necesidad de contar con personal altamente capacitado en estas técnicas. La mayor ventaja que ofrecen las técnicas moleculares es que están basadas en las diferencias de los genomas y no dependen de la expresión de ciertos factores antigénicos o de enzimas, son extremadamente precisas, confiables y algunas de ellas se pueden llevar a cabo en el mismo tiempo que los métodos inmunológicos (Gasánov *et al.*, 2005).

Los métodos establecidos por las agencias de regulación deben de ser capaces de detectar una célula de *Listeria* en 25 g de alimento. Generalmente esta sensibilidad solo se puede alcanzar usando métodos de enriquecimiento donde el microorganismo es capaz de crecer alrededor de  $10^4 - 10^5$  UFC/mL. Las células de *Listeria* presentan un crecimiento lento y pueden ser superadas por competidores, por lo que es necesario utilizar agentes bacteriostáticos, como la acriflavina y el ácido nalidíxico, para suprimir el crecimiento de la microbiota acompañante. Estos dos agentes han sido incluidos en todos los métodos utilizados para el aislamiento de *Listeria* de muestras ambientales y de alimentos (Gasánov *et al.*, 2005).

- Métodos de enriquecimiento y aislamiento del BAM de FDA e ISO 11290:

En el método establecido por la Bacteriological Analytical Manual (BAM-FDA) se realiza un enriquecimiento de 48 h incubando a 30 °C en caldo de enriquecimiento para *Listeria*, el cual contiene agentes selectivos (acriflavina, ácido nalidíxico y el fungicida cicloheximida). Después del enriquecimiento se realiza el aislamiento en agar selectivo (Oxford, PALCAM, MOX o LPM) (Gasánov *et al.*, 2005).

En el método ISO 11290 se establece un proceso de enriquecimiento de dos pasos: la muestra de alimento es enriquecida en caldo Fraser por 24 h, después se transfiere una alícuota al caldo completo Fraser, para un segundo enriquecimiento. El medio Fraser también contiene los agentes selectivos acriflavina y ácido nalidíxico, así como esculina. Ambos enriquecimientos se siembran en agar Oxford y PALCAM (Gasánov *et al.*, 2005).

Aunque los agentes selectivos son necesarios para inhibir la microbiota acompañante durante el enriquecimiento, existen varios reportes de que estos agentes pueden tener efectos negativos sobre las células dañadas de *Listeria*. Para solucionar este problema en el método del BAM-FDA se agregan los agentes selectivos después de 4 h de incubación, permitiendo con esto que las células dañadas se recuperen. Por otro lado, el método ISO 11290 establece un primer enriquecimiento con la mitad de la concentración de los agentes selectivos (Gasánov *et al.*, 2005).

La mayoría de los medios sólidos selectivos utilizados para la identificación de *Listeria* (Oxford, PALCAM, MOX), se basan en la reacción de la esculinasa para diferenciar a *Listeria* de otras bacterias. Las colonias típicas de *Listeria* en estos medios son negras con un halo negro alrededor de la colonia. Estos medios también contienen agentes selectivos que inhiben el crecimiento de otros microorganismos, sin embargo, existen otras bacterias, como *Enterococcus* y *Bacillus* spp. que también utilizan la esculina y pueden tener una apariencia similar; por lo que es necesario realizar otro tipo de pruebas para la confirmación (Gasánov *et al.*, 2005).

Tradicionalmente las colonias que se sospecha puedan ser de *Listeria*, se siembran en agar soya tripticaseína y las colonias son examinadas con ayuda de luz oblicua, donde las colonias de *Listeria* aparecen con un color azul-verde característico. Posteriormente se realiza tinción de Gram, catalasa, oxidasa y fermentación de carbohidratos. En la tabla 11 se muestran los resultados de las pruebas bioquímicas para las seis especies de *Listeria* (Gasánov *et al.*, 2005).

La prueba de CAMP se utiliza para diferenciar las especies  $\beta$ -hemolíticas de *Listeria* (*L. monocytogenes*, *L. ivanovii* y *L. seeligeri*). Esta prueba se realiza sembrando en agar sangre una cepa de *Staphylococcus*  $\beta$ -hemolítico paralelo a *Rhodococcus equi*. Las cepas hemolíticas de *L. monocytogenes* presentan el factor CAMP contra *S. aureus* pero no contra *R. equi*, por lo que las colonias sospechosas son estriadas entre estos dos microorganismos horizontalmente. Aunque se ha encontrado que no todas las cepas de *L. monocytogenes* y *L. ivanovii* lo contienen (Gorski, 2008)..

**Tabla 11.** Resultados de pruebas bioquímicas para las seis especies de *Listeria*.

	<i>L. monocytogenes</i>	<i>L. innocua</i>	<i>L. ivanovii</i>	<i>L. seeligeri</i>	<i>L. welshimeri</i>	<i>L. grayi</i>
Hemolisina	+	-	+	+	-	-
Catalasa	+	+	+	+	+	+
Oxidasa	-	-	-	-	-	-
Fermentación	L-Ramnosa	+	+/-	-	-	+/-
	D-Manitol	-	-	-	-	+
	D-Xilosa	-	-	+	+	-
	α-Metil manosido	+	+	-	-	+

(Gasánov *et al.*, 2005)

- Métodos de identificación usados en epidemiología.

*Tipificación serológica:* está basada en la reacción específica entre anticuerpos y los antígenos somáticos (O) ó flagelares (H) de las especies de *Listeria*, y permite la agrupación en serotipos de acuerdo a sus antígenos O ó H. Por esta técnica no es posible diferenciar las diferentes especies del género de *Listeria*. La confirmación serológica no es necesaria para la identificación de *L. monocytogenes*, esta bacteria comprende 12 serotipos: 1/2a, 1/2b, 1/2c, 3a, 3b, 3c, 4a, 4b, 4c, 4d, 4e y 7, sin embargo se ha demostrado que los brotes de listeriosis más frecuentes a partir del consumo de alimentos están asociados a los serotipos 4b, 1/2a, 1/2b y 1/2c, por lo que en estos casos es recomendable la serotipificación (Gasánov *et al.*, 2005; Wagner y McLauchin, 2008).

*Fago-tipificación:* este método se basa en la interacción específica de un bacteriofago particular de *Listeria*, dando como resultado la lisis de la célula hospedera. La mayor desventaja de esta técnica es que no todas las cepas de *L. monocytogenes* son tipificables; en particular *L. monocytogenes* serotipo 1/2a, ya que este serotipo es el principal asociado a la listeriosis. Este método resulta inconveniente para su identificación (Gasánov *et al.*, 2005).



- Pruebas moleculares

La industria de alimentos se inclina hacia la identificación molecular de *Listeria*, sin embargo existen ciertas desventajas comparando este método con el cultivo tradicional, como lo es el costo de los equipos y reactivos, así como la necesidad de contar con personal altamente capacitado en estas técnicas. La mayor ventaja que ofrecen las técnicas moleculares es que están basadas en las diferencias de los genomas y no dependen de la expresión de ciertos factores antigénicos o de enzimas. Son extremadamente precisos, confiables y algunos de ellos se pueden llevar a cabo en el mismo tiempo que el que se requiere en los métodos inmunológicos (Gasánov *et al.*, 2005).

*Hibridación de DNA:* es el método molecular más sencillo utilizado para la identificación de *Listeria monocytogenes* en alimentos. La presencia de una secuencia se detecta usando una sonda de oligonucleótido, la cual se une por complementariedad de bases a una secuencia específica del DNA. La incorporación de isótopos radioactivos a la secuencia de oligonucleótidos se usa como una forma de detectar estas secuencias.

Recientemente se utilizan sondas biotiniladas o marcadores fluorescentes con la misma sensibilidad para la detección que las sondas con isótopos radioactivos, sin los peligros asociados a la radioactividad. El principal objetivo de la hibridación del DNA es la diferenciación de *L. monocytogenes* de las otras especies de *Listeria*, utilizando sondas específicas para los genes de factores de virulencia (Gasánov *et al.*, 2005).

Los métodos moleculares, tales como la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), pueden detectar e identificar rápidamente patógenos transmitidos por alimentos; sin embargo, el uso de PCR puede estar limitado por el costo o el volumen de la muestra.

*Técnicas moleculares de tipificación:* estas técnicas están basadas en la hibridación del DNA, PCR, análisis por enzimas de restricción o la secuenciación directa del

DNA. Con el objetivo de interpretar los resultados de estas técnicas con mayor exactitud, se han desarrollado técnicas electroforéticas para obtener mejor resolución de los fragmentos de DNA; como son la electroforesis de campo pulsado (PFGE), electroforesis de gradiente desnaturizante (DGGE) o electroforesis capilar (CE). Los métodos moleculares más importantes que se utilizan en la detección de *L. monocytogenes* por ejemplo, son ribotipificación, digestión de macrorestricción, PFGE, RFLP o RAPD (Gasarov *et al.*, 2005; Churchill, 2006).

#### 5.9.1. Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

La Reacción en cadena de la Polimerasa (PCR) es un proceso repetitivo de la síntesis bidireccional de DNA por medio de primers que delimitan una región específica de ácidos nucleicos. El descubrimiento de la DNA polimerasa de la bacteria termófila *Thermus aquaticus* (Taq polimerasa) permitió el perfeccionamiento de la técnica. Esta enzima puede resistir a temperaturas de 95 °C, temperatura que es necesaria para la separación de las dos hebras de DNA, y permite manejar temperaturas de alineamiento y amplificación que dejan margen para manejar la astringencia de la reacción y así acceder únicamente a las secuencias de DNA específicas para el primer utilizado (Madigan, *et al.*, 2004).

La PCR es una técnica muy importante para la diferenciación de *L. monocytogenes* de otras especies de *Listeria*, utilizando primers específicos para los genes que codifiquen los factores de virulencia o genes de subunidades de RNAr. Para la detección de *Listeria* por PCR, se debe realizar previamente un enriquecimiento selectivo de 24-48 h, ya que se ha encontrado que el análisis directo de las muestras sin un pre-enriquecimiento arroja resultados poco confiables.

Uno de los principales problemas de utilizar la PCR para la detección de *Listeria* en muestras de alimentos o ambientales directamente, sin un pre-enriquecimiento, es que contienen inhibidores de la PCR, lo que ocasiona que se obtengan falsos

negativos (Liu, 2008). En la tabla 12 se muestran algunos genes utilizados para la identificación de *Listeria* por PCR.

**Tabla 12.** Genes utilizados para la identificación de *Listeria* por PCR.

<b>Especificidad</b>	<b>Gen Blanco</b>	<b>Proteína</b>
<i>Listeria</i> (género y especie)	16S rRNA	-
<i>Listeria</i> (género y especie)	23S rRNA	Peptidiltransferasa
<i>Listeria</i> (género y especie)	16S / 23S rRNA (regiones intergénicas)	-
<i>Listeria</i> (género)	<i>groESL</i>	Proteína de choque térmico
<i>Listeria</i> (género)	<i>rpoB</i>	Gen "Housekeeping"
<i>Listeria</i> (género)	<i>recA</i>	Gen "Housekeeping"
<i>Listeria</i> (género)	<i>gyrB</i>	Gen "Housekeeping"
<i>Listeria</i> (género)	<i>prs</i>	Fosforibosil pirofosfato sintasa
<i>Listeria</i> (género y especie)	<i>lap (p60)</i>	Proteína asociada a la invasión
<i>Listeria</i> (género y especie)	<i>flaA</i>	Flagelina A
<i>Listeria monocytogenes</i> y <i>Listeria innocua</i>	<i>fbp</i>	Proteína de unión a Fibronectina

(Liu, 2008)

En muestras donde se encuentran varias especies de *Listeria* se complica la identificación de *L. monocytogenes*, por lo cual es de mucha ayuda realizar la PCR con genes específicos para cada especie. En la tabla 13 se muestran los genes utilizados para la identificación por PCR, específicos para cada especie. Por otro lado, también resulta de interés la identificación de las cepas patógenas de *L. monocytogenes*, utilizando genes específicos asociados a los serotipos implicados en patogenicidad de *L. monocytogenes* (Liu, 2008). Estos genes se muestran en la tabla 14.

**Tabla 13.** Genes utilizados para la identificación de las especies de *Listeria* por PCR.

<b>Especificidad</b>	<b>Gen Blanco</b>	<b>Proteína</b>
<i>Listeria monocytogenes</i>	<i>hly</i>	Listeriolisina (LLO)
	<i>plcA</i>	Fosfatidilinositol-fosfolipasa C (PI-PLC)
	<i>plcB</i>	Fosfatidilcolina-fosfolipasa C (PC-PLC)
	<i>actA</i>	ActA
	<i>impl</i>	Metaloproteasa
	<i>prfA</i>	Regulador transcripcional PrfA
	<i>inIA</i>	Internalina A
	<i>inIB</i>	Internalina B
	<i>clpE</i>	Clp ATPasa
	<i>lmaA / dth18</i>	Proteína de hipersensibilidad tipo antígeno LmaA retardada
	<i>lmo0733</i>	Regulador transcripcional putativo
	<i>lmo2234</i>	Proteína desconocida
	<i>pepC</i>	Aminopeptidasa C
<i>Listeria ivanovii</i>	<i>liv22-228</i>	N-acetilmuramidasa putativa
<i>Listeria seeligeri</i>	<i>lse24-315</i>	Internalina putativa
<i>Listeria innocua</i>	<i>lin0464</i>	Regulador transcripcional putativo
	<i>lin2483</i>	Transportador putativo
<i>Listeria welshimeri</i>	<i>lwe7-571</i>	Sistema enzimático IIBC fosfotransferasa putativa
<i>Listeria grayi</i>	<i>lgr20-246</i>	Oxidoreductasa putativa

(Liu, 2008)

**Tabla 14.** Genes utilizados para la identificación de los serotipos asociados a la patogenicidad de *Listeria monocytogenes* por PCR.

Especificidad	Gen Blanco	Proteína
Todos los serotipos de <i>L. monocytogenes</i> , excepto 4a	<i>Imo2821</i>	Internalina J
Todos los serotipos de <i>L. monocytogenes</i> , excepto 4a y algunos 4c	<i>Imo2470</i>	Internalina putativa
Todos los serotipos de <i>L. monocytogenes</i> , excepto 4a y algunos 4c	<i>inIC</i>	Internalina C
Todos los serotipos de <i>L. monocytogenes</i> , excepto 4a y algunos 4c	<i>Imo2672</i>	Regulador transcripcional putativo
Todos los serotipos de <i>L. monocytogenes</i> , excepto 4a y algunos 4c	<i>Imo1134</i>	Regulador transcripcional putative
Serotipos de <i>L. monocytogenes</i> 1/2b, 3b, 4b, 4d, 4e y 7	<i>ORF2819</i>	Regulador transcripcional putative
Serotipos de <i>L. monocytogenes</i> 4b, 4d y 4e	<i>ORF2110</i>	Proteína de secreción putativa
Serotipos de <i>L. monocytogenes</i> 4b, 4d y 4e	<i>ORF2372</i>	Proteína similar precursora de ácidos teicoicos
Serotipos de <i>L. monocytogenes</i> 1/2a, 1/2c, 3a y 3c	<i>Imo0737</i>	Desconocida
Serotipos de <i>L. monocytogenes</i> 1/2a, 1/2c, 3a y 3c	<i>Imo0171</i>	Proteína de superficie
Serotipos de <i>L. monocytogenes</i> 1/2c y 3c	<i>Imo1118</i>	Desconocida
Serotipos de <i>L. monocytogenes</i> 1/2b y 3b	Región flanqueada por los genes <i>gltA-gltB</i>	Desconocida
Serotipos de <i>L. monocytogenes</i> 1/2a y 3a	<i>flaA</i>	Flagelina A

(Liu, 2008)

### 5.9.2. PCR Múltiplex

La PCR Múltiplex es una variante de la PCR en la cual dos o más secuencias pueden ser amplificadas, incluyendo más de un par de primers en la misma reacción. Desde su inicio (1988) este método ha sido exitosamente aplicado en numerosas áreas,

como son mutaciones y análisis de polimorfismos, análisis cuantitativos y transcripción reversa (RT)-PCR (Liu *et al.*, 2007).

Es necesario prestar especial atención en el diseño de los primers, como lo es el tamaño, contenido de GC y concentración (18-28 bp y 45-60 % GC), así como ajustar la concentración de los primers para evitar la formación de dímeros de primer. Todos los primers utilizados deben tener similares eficiencias en la amplificación. Para llevar a cabo esta reacción previamente es necesario realizar una optimización, la cual comprende los siguientes pasos: concentración de primers, concentración de dNTPs y  $MgCl_2$ , concentración del buffer, cantidad de templado y de la Taq DNA polimerasa (Löffert *et al.*, 1999).

## 6. Hipótesis

Es posible la detección específica de *L. monocytogenes* en menor tiempo a partir de la amplificación de los genes *inIA* e *inIC* por medio de PCR Múltiplex obtenida con DNA cromosomal bacteriano total de quesos frescos.

## 7. Objetivos

### 7.1. Objetivo general

Realizar la determinación de *Listeria monocytogenes* en queso fresco por PCR Múltiplex de los genes *inIA* e *inIC*.

### 7.2. Objetivos particulares

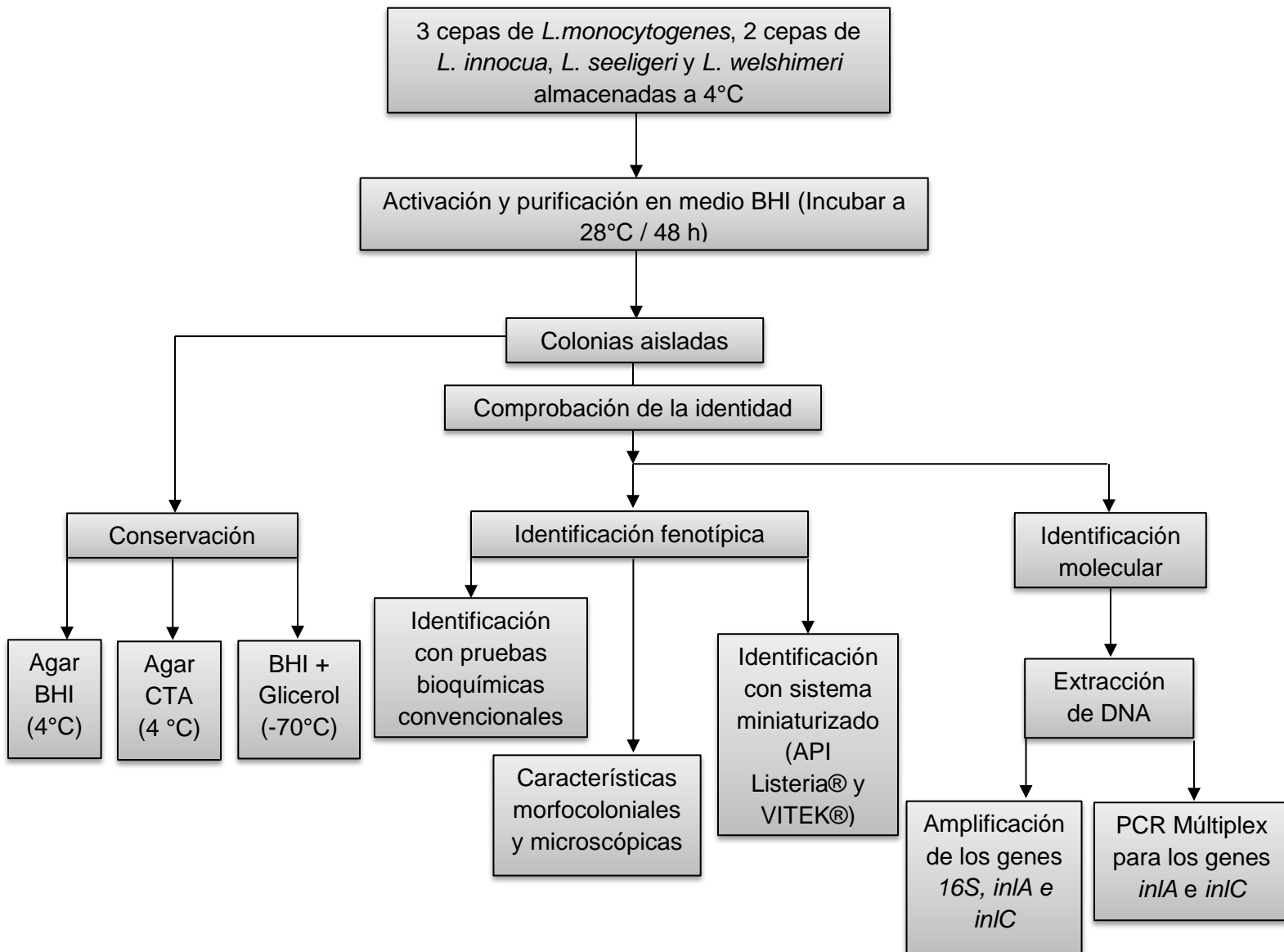
- Conservar las cepas del género *Listeria* por subcultivo y ultracongelación.
  
- Identificar fenotípicamente cepas de *Listeria*.
  - Determinar las características morfológicas y microscópicas.
  - Realizar la identificación bioquímica tradicional.
  - Realizar la identificación bioquímica por los sistemas miniaturizados y automatizados.
  
- Identificar el gen ribosomal *16S* por análisis de secuencias:
  - Extraer el DNA cromosomal a partir de cepas puras.
  - Amplificar, secuenciar e identificar *in silico* el gen ribosomal.

- Implementar la técnica de PCR Múltiplex para la identificación específica de *L. monocytogenes*.
  - Diseñar *in silico* los primers para los genes *inIA* e *inIC*.
  - Realizar gradiente de temperatura de amplificación.
  - Amplificar, secuenciar e identificar *in silico* los genes *inIA* e *inIC* .
  
- Determinar la presencia de *Listeria monocytogenes* en queso fresco comercial por PCR Múltiplex.
  - Cuantificar el desarrollo de *L. monocytogenes* durante el enriquecimiento selectivo
  - Extraer el DNA cromosomal bacteriano total de muestras de queso.
  - Amplificar los genes *inIA* e *inIC* por PCR Múltiplex .



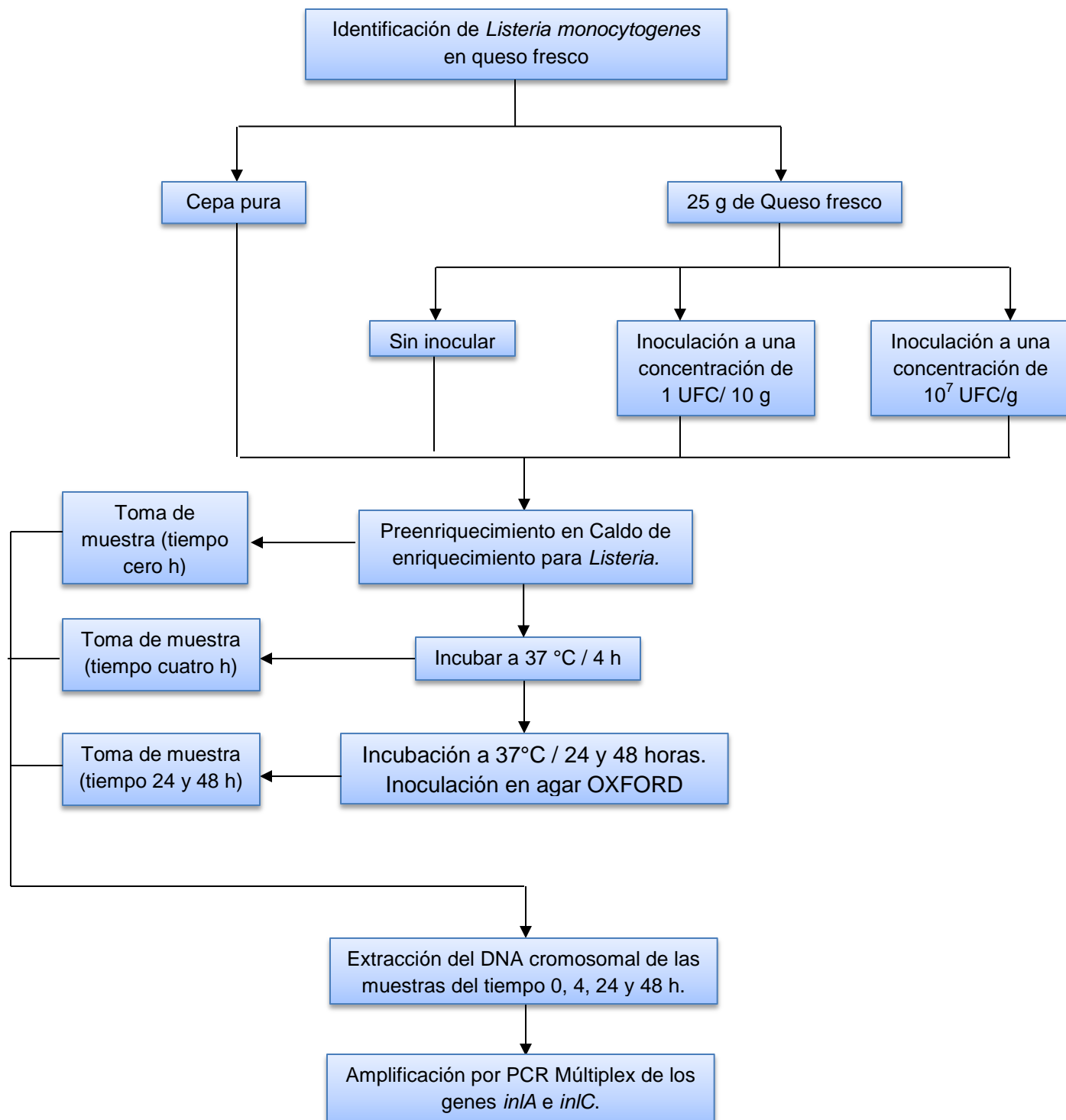
## 8. METODOLOGÍA

En la figura 3 se muestra el diagrama de la metodología de la conservación y comprobación de la identidad de *Listeria monocytogenes* y *Listeria* sp. por métodos fenotípicos y moleculares.



**Figura 3.** Metodología de la conservación e identificación de *Listeria* sp.

En la figura 4 se muestra la metodología de la identificación de los genes *inIA* e *inIC* en queso fresco.



**Figura 4.** Metodología de la identificación de los genes *inIA* e *inIC* en queso fresco.

## 8.1. Microorganismos utilizados

Se emplearon 7 cepas del género *Listeria* las cuales se enlistan a continuación:

- *Listeria monocytogenes* I
- *Listeria monocytogenes* II
- *Listeria monocytogenes* III
- *Listeria innocua* I
- *Listeria innocua* II
- *Listeria seeligeri*
- *Listeria welshimeri*

A excepción de la cepa *Listeria monocytogenes* I, la cual pertenece a la colección de cepas del Cepario de la Facultad de Química; el resto de ellas fueron donadas por la profesora Aurora Ortigón, de la Facultad de Química, UNAM. Estas cepas fueron aisladas e identificadas a partir del análisis de superficies inertes y de alimentos tales como croissant a la mexicana, coctel de fruta y carne.

## 8.2. Conservación

Se realizó la conservación a corto, mediano y largo plazo de las siete cepas.

- **Conservación a corto plazo:** se inoculó por cuadrante radial en agar BHI y se incubó a 37 °C por 24 h; después de este tiempo de incubación se almacenó a 4 °C. Se comprobó la viabilidad de las cepas cada tres semanas.
- **Conservación a mediano plazo:** se utilizó el medio semisólido Agar Cistina Trypticaseína (CTA), se inoculó por picadura y se incubó a 37 °C por 24 h. Después de este tiempo de incubación se almacenó a 4 °C. Se comprobó la viabilidad de las cepas cada tres meses.

- **Conservación a largo plazo:** se inoculó en agar BHI por cuadrante radial, se incubó a 37 °C por 24 h; de este cultivo se inoculó a saturación en 0.8 mL de BHI y se agregaron 0.8 mL de glicerol al 50%, se homogenizó y almacenó en ultracongelación (-70 °C). La viabilidad de las cepas conservadas por esta técnica se estima de un año.

### 8.3. Corroboración de la identidad de las cepas

#### 8.3.1. Identificación fenotípica

##### 8.3.1.1. Características morfológicas y microscópicas

Se inoculó en agar BHI por cuadrante radial, se incubó a 37 °C por 24 horas. Para comprobar las características microscópicas, se realizó una tinción de Gram, a partir de una colonia aislada.

##### 8.3.1.1.1. Prueba de CAMP

Se desarrolló un cultivo de cada una de las cepas de *Listeria monocytogenes* I y II, y de *Staphylococcus aureus*  $\beta$ -hemolítico (Ceparío, Facultad de Química) en caldo BHI durante 24 h. Se realizó una estría recta vertical del cultivo de *S. aureus* en agar sangre, y a partir de ~ 2mm de distancia una estría recta perpendicular a ésta de las cepas de *L. monocytogenes*. La caja se incubó a 37°C por 24 h y se observó el desarrollo.

##### 8.3.1.2. Pruebas bioquímicas convencionales

A partir de las cepas conservadas se inoculó en BHI, se incubó a 28 °C por 48 h y aisló en el mismo medio para mantener y comprobar la pureza, a partir de ellas se realizó la identificación por pruebas bioquímicas convencionales.

Para la identificación del género *Listeria*, según la metodología del Bacteriological Analytical Manual, se realizaron las siguientes pruebas bioquímicas: reducción de nitratos, movilidad, fermentación de carbohidratos (dextrosa, maltosa, ramnosa, manitol y xilosa), hidrólisis de esculina, catalasa y hemólisis. Como prueba complementaria se realizó una resiembra en medio OXFORD, el cual contiene además de esculina, antibióticos a los que es resistente *Listeria* (acriflavina, colistina, ciclohexamida, cefocetan y fosfomicina).

#### 8.3.1.3. Pruebas bioquímicas por el sistema miniaturizado API LISTERIA® (Biomèrieux).

Se realizó suspensión en solución salina isotónica del proveedor, de cada una de las cepas a probar a partir de una colonia aislada en agar BHI e incubada a 37 °C por 24 h. Se realizó la identificación por este sistema, siguiendo las instrucciones proporcionadas por el proveedor (Anexo 1).

#### 8.3.1.4. Identificación por el sistema automatizado VITEK® (Biomèrieux).

Se realizó suspensión en solución salina isotónica estéril al 0.45% de cada una de las cepas, a partir de una colonia aislada en agar BHI incubada a 37 °C por 24 h. Se ajustó la concentración de la suspensión a 0.5 en la escala de MacFarland. Se realizó la identificación por este sistema, siguiendo las instrucciones proporcionadas por el proveedor.

### 8.3.2. Identificación genotípica

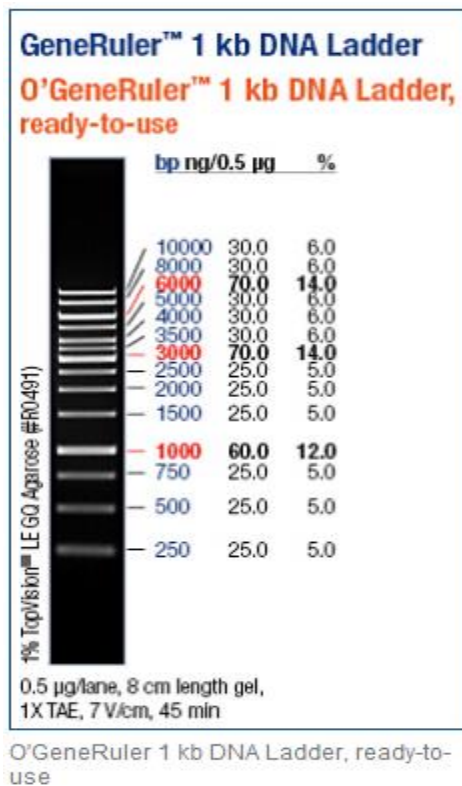
#### 8.3.2.1. Extracción de DNA cromosomal

Se realizó la extracción de DNA cromosomal de cada una de las cepas, utilizando un cultivo puro de 24 horas de desarrollo, utilizando un sistema comercial de extracción

cromosomal (Ultra Clean™ Microbial DNA Isolation Kit, MoBio®), siguiendo la metodología proporcionada por el proveedor (Anexo 2).

### 8.3.2.2. Electroforesis en gel de agarosa

Se comprobó la extracción correcta del DNA cromosomal por medio de una electroforesis en gel de agarosa (1%). Se utilizó bromuro de etidio (0.04 %) como revelador, y amortiguador de corrida Tris-boratos EDTA pH 8.0, con una concentración de 89 mM Tris base, 89 mM ácido bórico y 2 mM EDTA. En cada carril se colocaron 5 µL de muestra más 3 µL de colorante de carga. Se utilizó el marcador de peso molecular de 1 kb (O'GeneRuler 1 kb DNA Ladder, ready to use), de la marca Fermentas® (<http://www.thermoscientificbio.com>), de una concentración de 0.1 µg/µL. En la figura 5 se muestra la imagen de este marcador. El tamaño del DNA cromosomal es aproximadamente de 12 Kbp.



**Figura 5.** Marcador de peso molecular de 1 Kbp de la marca Fermentas®.

Se aplicó un voltaje de corrida de 100 V, y se utilizó el colorante de corrida con una concentración de 5 unidades/mL (6X Orange DNA Loading Dye) de la marca Fermentas®. Se utilizó un transiluminador para la visualización de las bandas del gel de agarosa, y el equipo Molecular Imager Gel Doc XR System 170-8170 para tomar las fotografías de los geles, en el Instituto de Biotecnología, UNAM.

Esta misma estrategia se aplicó para visualizar la amplificación del gen ribosomal 16S por PCR (inciso 8.3.2.3), purificación del producto de PCR (inciso 8.3.2.4), optimización de mPCR para los genes *inIA* e *inIC* (inciso 8.4.2), extracción del DNA cromosomal total bacteriano del alimento (inciso 8.5.3) y mPCR a partir de la cepa pura y de las entidades de prueba de queso fresco (inciso 8.5.4).

#### 8.3.2.3. Amplificación del gen ribosomal 16S por PCR.

Para la amplificación del gen ribosomal 16S se utilizó la enzima Taq polimerasa (Fermentas®) y los primers universales para eubacterias denominados como fD1 (5'-AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG-3') y rD1 (5'-AAG GAG GTG ATC CAG CC-3'). Estos primers fueron utilizados por Weisburg *et al.*, 1991, para la amplificación de genes ribosomales a partir de muestras de DNA de diferentes especies de bacterias. Se utilizaron estos primers debido a su carácter inespecífico que permitió la amplificación de segmentos de DNA de 1000 bp, que comprenden la posición 530 hasta la 1449 de los DNAr 16S de cada uno de los templados obtenidos (Weisburg *et al.*, 1991). En la tabla 15 se muestran las características de los primers empleados.

La mezcla de reacción se presenta en la tabla 16. Para corroborar el tamaño de los amplicones obtenidos se realizó una electroforesis en gel de agarosa con la metodología ya descrita (inciso 8.3.2.2). Para todas las cepas trabajadas el tamaño esperado fue de 1.5 Kbp.

**Tabla 15.** Características de los primers utilizados para la amplificación del gen ribosomal 16S.

Primers	fD1	rD1
Longitud	20 bp	17 bp
Absorbancia	0.598	0.434
% G+C	50.00	58.82
Peso molecular	6471.00	5516.40

**Tabla 16.** Mezcla de reacción y condiciones utilizadas para la amplificación del gen ribosomal 16S.

Mezcla de reacción		Condiciones de reacción		
		Temperatura (°C)	Tiempo (min)	No. Ciclos / etapa
Taq Buffer (10X)	5 µL	95	5	1 / desnaturalización inicial
dNTP Mix (2mM)	5 µL		1	
Primer universal fD1 (1µM)	0.6 µL	49	1	30 / amplificación
Primer universal rD1 (1µM)	0.6 µL	72	1.5	
MgCl <sub>2</sub> (2.5 mM)	5 µL	72	5	1 / extensión final
Templado (~0.1-1.0 µg)	1 µL			
Enzima polimerasa Taq (1 U/ µL)	1.25 µL			
Agua	c.b.p 50 µL			

#### 8.3.2.4. Purificación del producto de PCR

Para eliminar residuos de la reacción de amplificación, se empleó el sistema de purificación Invitrogen®. Se siguió la metodología proporcionada por el proveedor (Anexo 3). Se corroboró la correcta purificación del producto de PCR al observar una banda de 1.5 kbp, por medio de una electroforesis en gel de agarosa con la metodología ya descrita (inciso 8.3.2.2).



#### 8.3.2.5. Secuenciación del producto de PCR del gen ribosomal 16S.

El producto de PCR purificado, se envió a secuenciar (método basado en la técnica de Sanger) a la Unidad de Secuenciación y Síntesis de Oligonucleótidos del Instituto de Biotecnología de la UNAM (IBt); se utilizó el equipo Perkin Elmer/Applied Biosystems Modelo 3730 con capacidad de procesar 96 muestras en 4 h; siguiendo el método Taq FS Dye Terminator Cycle Sequencing Fluorescence-Based Sequencing. La concentración de DNA requerido fue de 10 ng de templado por cada 100 pares de bases de producto de PCR; se colocaron 100 ng/ $\mu$ L de templado y 10 pmol de cada uno de los primers (fD1 y rD1) aforando a 50  $\mu$ L con agua grado biología molecular, la mezcla se preparó con cada primer por separado. La mezcla DNA/primer se entregó en un volumen final de 16  $\mu$ L de acuerdo a las especificaciones del proveedor.

#### 8.3.2.6. Construcción del Árbol filogenético para el gen ribosomal 16S

Las secuencias obtenidas de la secuenciación fueron visualizadas y editadas por medio del programa BioEdit, Biological Sequence Alignment Editor (<http://www.mbio.ncsu.edu/bioedit/bioedit.html>). Se analizaron en el programa BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) del NCBI, National Center for Biotechnology Information (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>), con el se logró encontrar las regiones de similitud de las secuencias biológicas contenidas en la base de datos de esta página, donde se observó el porcentaje de identificación, el valor de expectancia y el porcentaje de cobertura.

Se eligieron y compararon las 9 secuencias que presentaron los mejores parámetros ya descritos. Estas secuencias, junto con la secuencia obtenida se alinearon en el programa ClustalW y con ayuda del programa MEGA, Molecular Evolutionary Genetics Analysis (<http://www.megasoftware.net/>) se realizó un árbol filogenético por medio del método Neighbor-Joining utilizando el algoritmo Jukes Cantor.

## 8.4. PCR Múltiplex en cepa pura

### 8.4.1. Diseño de primers de los genes *inlA* e *inlC*

Se realizó una búsqueda bibliográfica de los genes de patogenicidad adecuados para la identificación de *Listeria monocytogenes* (Roche *et al*, 2008). Se escogieron los genes *inlA* e *inlC* y se seleccionaron por cada gen, 10 secuencias reportadas en el GenBank del NCBI. Las secuencias seleccionadas para cada gen se alinearon en el programa Clustal W y a partir de este alineamiento se seleccionó la secuencia consenso de cada gen.

En la sección de primer BLAST de la página del NCBI se diseñaron los primers para estos genes. La selección se basó tomando en cuenta el criterio de valor de temperatura de fusión de cada primer ( $T_m$ ), la cual debe ser muy cercana a la de cada par de primer y el criterio del porcentaje de contenido de G-C, el cual debe de ser lo más cercano al 50 %. Además de considerar estos criterios, de las 10 secuencias seleccionadas para cada primer así como de los primers obtenidos del primer BLAST, se realizó un alineamiento en el programa BioEdit para verificar que el alineamiento de los primers fuera en los nucleótidos esperados.

Con los primers seleccionados, se mandaron a sintetizar a la Unidad de Síntesis y Secuenciación de DNA, del IBT, UNAM. En la unidad de síntesis, se utiliza el método del Fosfito-Triéster en fase sólida, en el que la cadena creciente de DNA se mantiene “anclada” a un soporte sólido (CPG) depositado en una columna delimitada por dos filtros e insoluble en los reactivos que fluyen a través de la misma.

### 8.4.2. Optimización de la amplificación de los genes *inl A* e *inl C*.

Para la optimización de la amplificación se trabajó con el DNA cromosomal de la cepas de *Listeria monocytogenes* I, *Listeria monocytogenes* II y *Listeria monocytogenes* III; y como controles negativos para la amplificación de los dos genes,

el DNA cromosomal de las cepas *Listeria innocua* I, *Listeria innocua* II y *Listeria welshimeri*. Para establecer la temperatura de alineamiento para los genes *inIA* e *inIC*, se realizó la PCR con un gradiente en la temperatura, para lo cual se consideró la T<sub>m</sub> teórica reportada por el servicio de síntesis de oligonucleótidos del IBT.

La temperatura de alineamiento teórica se calculó restando 5 °C a la T<sub>m</sub> teórica reportada por el servicio de síntesis. Se tomó como criterio inicial que el rango del gradiente incluyera la temperatura de alineamiento teórico, se realizó en el rango entre 55 °C y 65 °C. En la tabla 17 se muestran las temperaturas utilizadas en el gradiente de PCR.

**Tabla 17.** Gradiente para la optimización de la temperatura de alineamiento de los genes *inIA* e *inIC*.

Carril del termociclador	A	B	C	D	E	F	G	H
Temperatura (°C)	65.0	64.2	63.0	61.1	58.7	56.9	55.7	55.0

**Tabla 18.** Mezcla de reacción y condiciones utilizadas para la amplificación del gen *inIA*.

Mezcla de reacción		Condiciones de reacción		
		Temperatura (°C)	Tiempo (min)	No. ciclos / etapa
Taq Buffer (10X)	5 µL	95	5	1 / desnaturalización inicial
dNTP Mix (2mM)	5 µL	95	1	30 / amplificación
Primer Fw <i>inIA</i> (1µM)	2.9 µL	58.7	1	
Primer Rv <i>inIA</i> (1µM)	2.4 µL	72	1.5	
MgCl <sub>2</sub> (2.5 mM)	5 µL	72	5	1 / extensión final
Templado (~0.1-1.0 µg)	1 µL			
Enzima polimerasa Taq (1 U/ µL)	1.25 µL			
Agua	c.b.p. 50 µL			

**Tabla 19.** Mezcla de reacción y condiciones utilizadas para la amplificación del gen *inIC*.

Mezcla de reacción		Condiciones de reacción		
		Temperatura (°C)	Tiempo (min)	No. ciclos / etapa
Taq Buffer (10X)	5 µL	95	5	1 /desnaturalización inicial
dNTP Mix (2mM)	5 µL	95	1	30 / amplificación
Primer Fw <i>inIC</i> (1µM)	2.8 µL	58.7	1	
Primer Rv <i>inIC</i> (1µM)	2.8 µL	72	1.5	
MgCl <sub>2</sub> (2.5 mM)	5µL	72	5	1 / extensión final
Templado (~0.1-1.0 µg)	1 µL			
Enzima polimerasa Taq (1 U/ µL)	1.25 µL			
Agua	c.b.p. 50 µL			

La mezcla de reacción se presenta en las tablas 18 y 19, se utilizó la enzima Taq polimerasa (Fermentas<sup>®</sup>). Para comprobar el tamaño de los amplicones obtenidos se realizó una electroforesis en gel de agarosa con la metodología ya descrita (inciso 8.3.2.2). De acuerdo a los resultados obtenidos en el primer.BLAST (inciso 9.3.1), el tamaño esperado para el gen *inIA* es de ~800 bp y de ~500 bp para el gen *inIC*.

#### 8.4.3. Secuenciación de los genes *inIA* e *inIC*.

El producto de PCR se envió a secuenciar (método basado en la técnica de Sanger, Taq FS Dye Terminator Cycle Sequencing Fluorescence-Based Sequencing) a la Unidad de Secuenciación y Síntesis de Oligonucleótidos del Instituto de Biotecnología de la UNAM (IBT). La mezcla de reacción utilizada para la secuenciación, se preparó de la misma manera a lo descrito para la secuenciación del gen ribosomal 16S (inciso 8.3.2.5). La secuenciación se llevó a cabo en el equipo Perkin Elmer, Applied Biosystems, modelo 3739.

#### 8.4.4. Construcción del dendograma para los genes *inIA* e *inIC*.

Las secuencias obtenidas de la secuenciación de los genes *inIA* e *inIC* se visualizaron y editaron utilizando el programa BioEdit, (<http://www.mbio.ncsu.edu/bioedit/bioedit.html>). Se analizaron en el programa BLAST-nt, de la página web del NCBI, (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>), con el cual se encontraron las regiones de similitud con las secuencias biológicas de la base de datos de esta página, donde se calculó el porcentaje de identificación, el valor de expectancia y el porcentaje de cobertura.

Se eligieron 26 y 30 secuencias para los genes *inIA* e *inIC*, respectivamente, las cuales mostraron mayor porcentaje de identificación, porcentaje de cobertura y mayor valor de expectancia (E). Estas secuencias además de las obtenidas para las cepas de *L. monocytogenes* analizadas, se alinearon en el programa Clustal W, y se realizó el dendograma por medio del método Neighbor-Joining utilizando el algoritmo Jukes Cantor, con ayuda del programa MEGA, Molecular Evolutionary Genetics Analysis (<http://www.megasoftware.net/>).

#### 8.4.5. PCR Múltiplex para las muestras de cepa pura.

Para la amplificación se trabajó con el DNA cromosomal extraído de la cepas de *Listeria monocytogenes* I, *Listeria monocytogenes* II y *Listeria monocytogenes* III; y como controles negativos para la amplificación de los dos genes, el DNA cromosomal de las cepas *Listeria innocua* I, *Listeria innocua* II y *Listeria welshimeri*.

Se utilizó la enzima Taq polimerasa (Fermentas<sup>®</sup>), así como las condiciones de amplificación y las concentraciones de la mezcla de reacción empleadas en la PCR para cada uno de los genes *inIA* e *inIC* por separado (inciso 8.4.2). Dichas condiciones y mezcla de reacción se presentan en la tabla 20. Para comprobar el tamaño de los amplicones obtenidos, se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 1% (inciso 8.3.2.2). Se analizó la presencia de bandas correspondientes a un

tamaño equivalente a ~800 bp para *inlA* y ~500 bp para *inlC* en el mismo carril, como indicativo de una amplificación múltiple adecuada.

**Tabla 20.** Mezcla de reacción y condiciones utilizadas para la amplificación de los genes *inlA* e *inlC*.

Mezcla de reacción		Condiciones de reacción		
		Temperatura (°C)	Tiempo (min)	No. ciclos / etapa
Taq Buffer (10X)	5 µL	95	5	1/desnaturalización inicial
dNTP Mix (2mM)	5 µL	95	1	30/amplificación
Primer inl A Fw (1µM)	2.9 µL	58.7	1	
Primer inl A Rv (1µM)	2.4 µL	72	1.5	
Primer inl C Fw (1µM)	2.8 µL	72	5	1/extensión final
Primer inl C Rv (1µM)	2.8 µL			
MgCl <sub>2</sub> (2.5 mM)	5µL			
Templado (~0.1-1.0 µg)	1 µL			
Enzima polimerasa Taq (1 U/ µL)	1.25 µL			
Agua	c.b.p. 50 µL			

### 8.5. Identificación por PCR Múltiplex de *Listeria monocytogenes* en queso fresco

Se trabajó con muestras de queso fresco sin inocular e inoculadas con *L. monocytogenes* I ya que ésta cepa presentó el mejor porcentaje de identificación en los criterios fenotípicos y moleculares, a dos distintas concentraciones:

- A) Una concentración saturada con aproximadamente  $1 \times 10^7$  UFC/mL para comprobar que la amplificación de los genes se podía llevar a cabo y no presenta interferencias del alimento para la amplificación a partir de la metodología desarrollada para la cepa pura (inciso 8.4.5).
- B) Una concentración con 1 UFC/ 10 g para evaluar la sensibilidad del método.

### 8.5.1. Identificación de *Listeria monocytogenes* en queso fresco.

Se adquirió queso fresco en el Mercado Ajusco Monserrat colonia Ajusco, Coyoacán, el cuál se mantenía a temperatura ambiente. La presentación del queso fué de aproximadamente 500 g y al momento de adquirirlo el vendedor lo empacó en una bolsa de polipropileno. Después de la adquisición, se almacenó en refrigeración hasta el momento del análisis durante 72 h.

Para el enriquecimiento del queso fresco se siguió la metodología descrita en el BAM de FDA, en la sección “Detección y enumeración de *Listeria monocytogenes*” (Detection and Enumeration of *Listeria monocytogenes*, <http://www.fda.gov/Food/FoodScienceResearch/LaboratoryMethods/ucm2006949.htm>).

Se trabajó con 5 diferentes condiciones: Para el matraz 1 y 2, se colocaron 225 mL de caldo de enriquecimiento para *Listeria* (Difco®), y se colocó 1 mL de la cepa *Listeria monocytogenes* en concentración 1UFC/10 mL (matraz 1) y 10<sup>7</sup> UFC/mL (matraz 2) (inciso 8.5.2.2), se incubó a 37 °C durante 48 h. Para los matraces 3 (sin inocular), 4 (inoculado con 1 UFC/10 g) y 5 (inoculado con 10<sup>7</sup> UFC/mL), se pesaron 25 g de queso fresco en una bolsa hermética marca Ziploc® (18 x 20 cm), y se agregaron 225 mL de caldo de enriquecimiento para *Listeria*. Se homogenizó en stomacher durante 30 s y transfirió a un matraz Erlenmeyer de 500 mL e incubó a 37 °C durante 48 h.

A los tiempos 0, 4, 24 y 48 h de incubación se tomaron 1.8 mL de cada uno de los matraces, para depositar en microtubos de centrifuga de 2 mL estériles y se conservaron en congelación a -20 °C para la posterior extracción del DNA cromosomal bacteriano total del alimento. Así mismo, para la confirmación del crecimiento de *Listeria monocytogenes* se sembró por cuadrante radial en agar OXFORD (Dalynn Biologicals®) a los mismos tiempos. Se incubó a 37 °C durante 24 h, y se observaron las características de las colonias desarrolladas.

## 8.5.2. Identificación de *Listeria monocytogenes* inoculada en queso fresco

### 8.5.2.1. Preparación del inóculo

A partir de un cultivo de 24 h de *L. monocytogenes* I en agar BHI incubado a 37 °C, se tomó una colonia y se inoculó en un tubo de BHI, se incubó a 37 °C por 24 h. De este cultivo se tomó 0.1 mL y se inoculó en BHI, se incubó a las mismas condiciones.

Posteriormente se determinó la concentración a la cual desarrolló la cepa, para lo cual se realizaron diluciones decimales seriadas utilizando agua peptonada al 0.1% como diluyente. Se inoculó 0.1 mL por extensión superficial de cada dilución en agar BHI e incubó a 37 °C durante 24 h; se contabilizaron las colonias desarrolladas en la caja que contenía entre 30 y 300 UFC/mL como el intervalo representativo para estimar el desarrollo y calcular las UFC/mL del cultivo. La determinación se realizó por duplicado.

### 8.5.2.2. Inoculación en las muestras de queso fresco

A partir del cultivo obtenido en el inciso 8.5.2.1, se realizaron diluciones decimales seriadas utilizando el mismo diluyente, hasta llegar a las concentraciones seleccionadas y con estas inocular las muestras de queso, las cuales se muestran en la tabla 21.

**Tabla 21.** Condiciones de crecimiento e identificación de *Listeria monocytogenes* en muestras de queso fresco.

Matraz	Concentración de <i>Listeria monocytogenes</i> inoculada	Peso de Queso fresco (g)
4	1 UFC / 10 g queso	25
5	10 <sup>7</sup> UFC/ g queso	25



Para la inoculación del matraz 4 se realizaron diluciones decimales seriadas para obtener una concentración final de 1 UFC/ g a partir del desarrollo obtenido, y se inocularon 10 mL en el caldo de enriquecimiento para *Listeria* más 25 g de la muestra de queso fresco (de acuerdo a la metodología descrita en el inciso 8.5.1), con lo cual la concentración final obtenida fue de 1 UFC/ 10 g de queso fresco al tiempo 0 h. Para cada tiempo de muestreo se realizó resiembra en agar OXFORD. Se transfirieron cultivos a microtubos de centrífuga de 2.0 mL, a las 0, 4, 24 y 48 h y se almacenaron en congelación hasta el momento de la extracción.

A partir del desarrollo obtenido en el inciso 8.5.2.1, para la inoculación del matraz 5, se inoculó 1 mL en caldo de enriquecimiento para *Listeria* más 25 g de la muestra de queso (inciso 8.5.1), con lo cual la concentración obtenida fue de  $10^7$  UFC/ 10 g de queso fresco al tiempo 0 h. Para cada tiempo de muestreo se realizó la inoculación en agar OXFORD. Se tomaron subcultivos a las 0, 4, 24 y 48 h para colocarlos en microtubos de centrífuga de 2.0 mL y se almacenaron en congelación hasta el momento de la extracción.

Se realizó el mismo procedimiento de enriquecimiento descrito para la cepa pura sin muestra de alimento, con el fin de monitorear el desarrollo de la cepa inoculada eliminando la interferencia de la microbiota natural de la muestra de queso fresco.

### 8.5.2.3. Cuantificación del desarrollo de *Listeria monocytogenes* en las muestras.

Para realizar la cuantificación del desarrollo se tomaron muestras a las 0, 4, 24 y 48 h del caldo de enriquecimiento de *Listeria* inoculado sólo con la cepa de *L. monocytogenes* I. Para cada tiempo se tomó 1 mL del caldo de *Listeria* enriquecido, se colocó en 9 mL de diluyente estéril y se realizaron diluciones decimales consecutivas. A partir de éstas, se inoculó 0.1 mL por extensión superficial en agar BHI y se incubó a 37 °C durante 24 h. Se contabilizaron las cajas que presentaron entre 30 y 300 colonias y se calcularon las UFC/g obtenidas para cada tiempo de muestreo.

### 8.5.3. Extracción de DNA cromosomal a partir de cultivos y de queso fresco sin inocular e inoculado.

Cada una de las muestras congeladas trabajadas para los 4 tiempos de muestreo se descongelaron a temperatura de refrigeración para proceder a la extracción de DNA total cromosomal bacteriano de. Se utilizó un sistema comercial de extracción cromosomal (PowerFood Microbial DNA Isolation kit, MoBio®), siguiendo la metodología proporcionada por el proveedor (Anexo 4). Se corroboró la correcta extracción del DNA cromosomal por medio de una electroforesis en gel de agarosa (1%), siguiendo la metodología indicada en el inciso 8.3.2.2.

### 8.5.4. PCR Múltiplex para las muestras enriquecidas de *L. monocytogenes* I y queso fresco inoculado, con la metodología descrita en el BAM.

Se realizó la mPCR al DNA cromosomal total extraído de las muestras tomadas a los cuatro tiempos y para las distintas concentraciones trabajadas. Se realizó esta amplificación siguiendo la metodología indicada en el inciso 8.4.5. Se corroboró la correcta amplificación por medio de una electroforesis en gel de agarosa (1%), siguiendo la metodología descrita en el inciso 8.3.2.2.

## **9. RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

### **9.1. Conservación y reactivación de las cepas**

Para verificar la viabilidad de cada una de las cepas conservadas en agar BHI y agar CTA (ambas conservadas a 4 °C), y/o en crioviales con BHI y Glicerol 50% (conservadas a -18 °C), se reinoculó en caldo BHI e incubó a 37 °C por 24 h. Después del periodo de incubación, se observó turbidez en los tubos, lo cual fue un indicativo de la reactivación del desarrollo de las cepas.

Con los microorganismos reactivados se reinoculó por agotamiento en agar BHI por cuadrante radial. Después de la incubación, se obtuvieron las características morfológicas y microscópicas esperadas para estas cepas que se describen en los incisos 9.2.1 y 9.2.2.

### **9.2. Comprobación de la identidad de las cepas**

#### 9.2.1. Identificación fenotípica

##### 9.2.1.1. Características morfológicas y microscópicas

En la tabla 22 se describe la morfología observada tanto en el agar BHI, como en el medio selectivo OXFORD. Las colonias de *Listeria* en medios no selectivos (agar BHI), después de 24-48 h de incubación son: redondas, translúcidas, convexas, 0.5-1.5 mm de diámetro y de consistencia suave (Wagner y McLaughlin, 2008). Estas características morfológicas para todas las cepas coincidieron con las colonias observadas en el agar BHI.

**Tabla 22.** Resultados de morfología presente en los dos medios de cultivo utilizados de las cepas probadas, (caldo BHI 48 hrs/ 28 °C y agar BHI 24 hrs/37 °C).

Cepa	Medio de cultivo	
	Agar BHI	Medio OXFORD
<b><i>L. monocytogenes I</i></b>	Colonias pequeñas , redondas, color crema, convexas	Colonias negras, pequeñas, circulares, ligeramente convexas con borde liso.
<b><i>L. monocytogenes II</i></b>	Colonias pequeñas , redondas, color crema, convexas	Colonias negras, pequeñas, circulares, ligeramente convexas con borde liso.
<b><i>L. monocytogenes III</i></b>	Colonias pequeñas , redondas, color crema, convexas	Colonias negras, pequeñas, circulares, ligeramente convexas con borde liso.
<b><i>L. innocua I</i></b>	Colonias pequeñas , redondas, color crema, convexas	Colonias negras, pequeñas, circulares, ligeramente convexas con borde liso.
<b><i>L. innocua II</i></b>	Colonias pequeñas , redondas, color crema, convexas	Colonias negras, pequeñas, circulares, ligeramente convexas con borde liso.
<b><i>L. seeligeri</i></b>	Colonias pequeñas , redondas, color crema, convexas	Colonias negras, pequeñas, circulares, ligeramente convexas con borde liso.
<b><i>L. welshimeri</i></b>	Colonias pequeñas , redondas, color crema, convexas	Colonias negras, pequeñas, circulares, ligeramente convexas con borde liso.

El crecimiento de *Listeria* en el medio OXFORD es el siguiente; colonias rodeadas de color negro; el medio de cultivo, además de los antibióticos específicos a los que resiste *Listeria*, contiene esculina, que al ser degradada a esculetina y reaccionar con una sal de hierro III, forma un complejo fenólico de color castaño oscuro o negro. Esta prueba ayuda a diferenciar a *Listeria* de otros bacilos Gram-positivos anaerobios facultativos que pueden desarrollar en este medio de cultivo (MacFaddin, 2000). Al

observar el desarrollo morfocolonial de las cepas empleadas presentaron un crecimiento como se describe en la bibliografía para el género.

*Listeria* spp. son bacilos cortos Gram-positivos, no esporulados (Wagner y McLauchin, 2008), al realizar tinción de Gram a las cepas, los resultados de la observación microscópica comprobaron las características reportadas en la literatura para el género de *Listeria* spp. En la tabla 23 se describen las características observadas.

Se realizó una preparación en fresco a partir de un cultivo desarrollado en caldo BHI de cada una de las cepas y se incubaron a 25 °C por 24 h para determinar la movilidad tipo “tumbling” (taza loca), característica del género *Listeria* (Wagner y McLauchin, 2008). Todas las cepas al ser observadas en el microscopio presentaron este tipo de movilidad, con excepción de *Listeria seeligeri*.

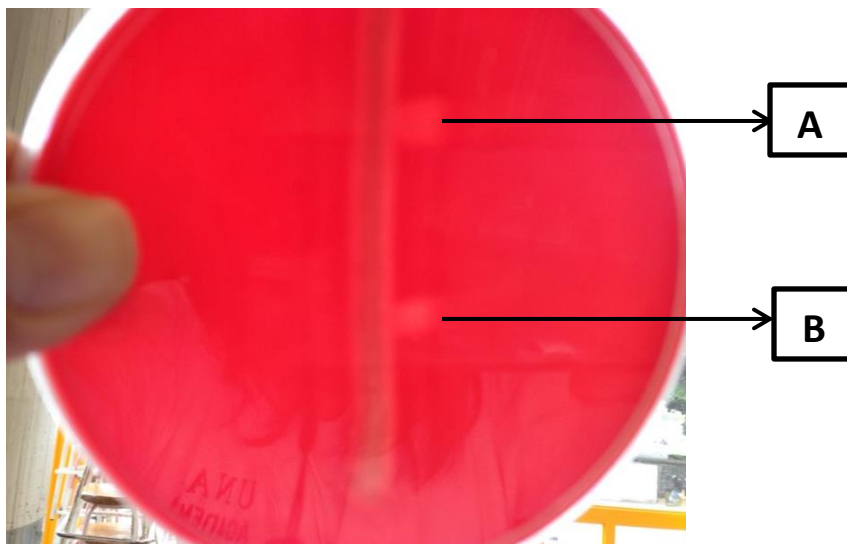
**Tabla 23.** Características microscópicas de las colonias aisladas en agar BHI, a las 24 h.

<i>Listeria monocytogenes</i> I	<i>Listeria monocytogenes</i> II	<i>Listeria monocytogenes</i> III	<i>Listeria innocua</i> I	<i>Listeria innocua</i> II	<i>Listeria seeligeri</i>	<i>Listeria welshimeri</i>
Gram (+)	Gram (+)	Gram (+)	Gram (+)	Gram (+)	Gram (+)	Gram (+)
Bacilos cortos, no esporulados.	Bacilos cortos, no esporulados.	Bacilos cortos, no esporulados.	Bacilos cortos, no esporulados.	Bacilos cortos, no esporulados.	Bacilos cortos, no esporulados.	Bacilos cortos, no esporulados.
Movilidad tipo tumbling	Movilidad tipo tumbling	Movilidad tipo tumbling	Movilidad tipo tumbling	Movilidad tipo tumbling	Movilidad tipo tumbling	Movilidad tipo tumbling

#### 9.2.1.1.1. Prueba de CAMP

En la figura 6 se muestra el resultado de la prueba de CAMP para las cepas *Listeria monocytogenes* I y II contra *Staphylococcus aureus* β-hemolítico. Se observó la presencia de una halo en translúcido resultado de la hemólisis completa de la sangre.

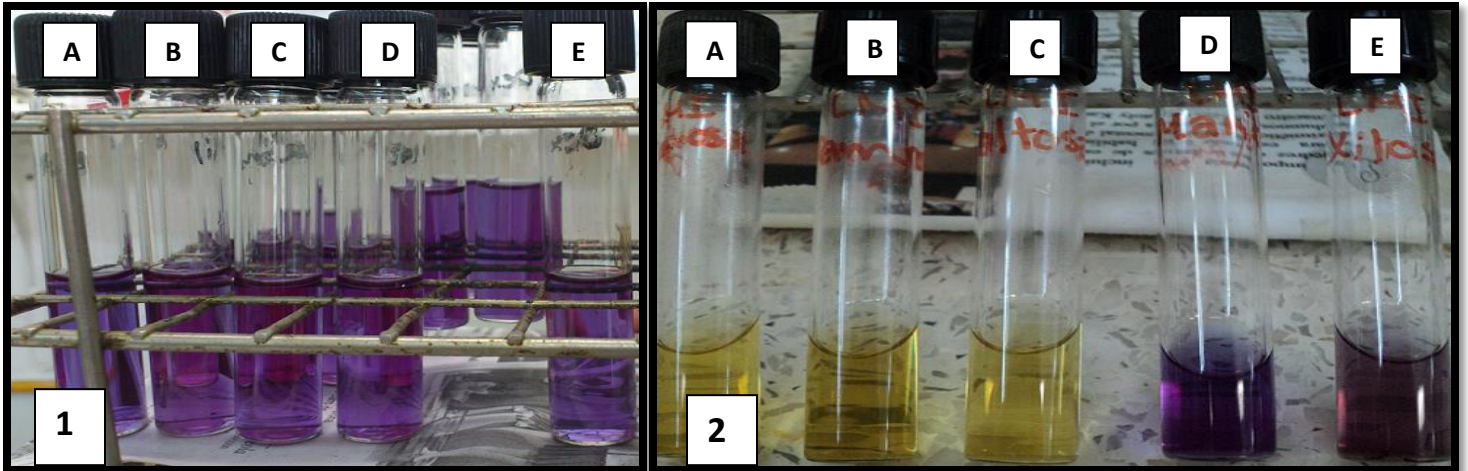
Al observar la zona cercana entre el estafilococo y las cepas de *Listeria* evaluadas se presentó mayor halo de hidrólisis, esto indicó la presencia del factor de CAMP para ambas cepas.



**Figura 6.** Prueba de CAMP para *L. monocytogenes* I y II contra *S. aureus*  $\beta$ -hemolítico en agar sangre 37°C/24 h. A: Factor CAMP para *L. monocytogenes* I. B: Factor CAMP para *L. monocytogenes* II.

#### 9.2.1.2. Pruebas bioquímicas convencionales.

A partir de una colonia purificada en agar BHI, se realizaron las pruebas bioquímicas convencionales con la finalidad de identificar la especie descrita inicialmente para cada cepa probada. Después de 5 días de incubación a 37 °C se obtuvieron los resultados de la fermentación de carbohidratos; para la prueba de movilidad en medio SIM se incubó a 28 °C por 7 días. En la figura 7 se muestra un ejemplo de algunas de las pruebas bioquímicas de fermentación de carbohidratos realizadas para la cepa *Listeria monocytogenes* I.



**Figura 7.** Fermentación de carbohidratos para la cepa de *L. monocytogenes* I, incubados a 37 °C / 7 días. 1) Tubos sin inocular y 2) Tubos después de la incubación. De izquierda a derecha: A) Dextrosa, B) Ramnosa, C) Maltosa, D) Manitol y E) Xilosa.

En la tabla 24 se presentan los resultados de las pruebas bioquímicas realizadas; de igual forma se presentan los resultados reportados de cada una de las especies del género *Listeria* (Wagner y McLauchin, 2008). En todas las cepas coinciden los resultados reportados con los obtenidos, a excepción de *L. seeligeri* y *L. welshimeri*.

En el caso de *L. seeligeri* las pruebas en contra son: la fermentación de ramnosa y xilosa, ya que los resultados reportados en la literatura son ramnosa negativo y xilosa positivo. Y para *L. welshimeri* se tiene como prueba en contra la fermentación de xilosa, ya que la reportada en la literatura para *L. welshimeri* es xilosa positivo. Por lo que se complementaron estos resultados con el sistema miniaturizado API LISTERIA<sup>®</sup> y el sistema VITEK<sup>®</sup>.

**Tabla 24.** Resultados de pruebas bioquímicas convencionales para las cepas utilizadas de *Listeria*.

Cepa	Nitratos	Movilidad	Manitol	Ramposa	Xilosa	Maltosa	Dextrosa	Esculina	Hemólisis	Catalasa
<i>L. monocytogenes</i> I	-	+	-	+	-	+	+	+	+	+
<i>L. monocytogenes</i> II	-	+	-	+	-	+	+	+	+	+
<i>L. monocytogenes</i> III	-	+	-	+	-	+	+	+	+	+
<i>L. monocytogenes</i> *	-	+	-	+	-	+	+	+	+	+
<i>L. innocua</i> I	-	+	-	+	-	+	+	+	-	+
<i>L. innocua</i> II	-	+	-	+	-	+	+	+	-	+
<i>L. innocua</i> *	-	+	-	V	-	+	+	+	-	+
<i>L. seeligeri</i>	-	+	-	+	-	+	+	+	+	+
<i>L. seeligeri</i> *	-	+	-	-	+	+	+	+	+	+
<i>L. welshimeri</i>	-	+	-	+	-	+	+	+	-	+
<i>L. welshimeri</i> *	-	+	-	V	+	+	+	+	-	+

V: Resultado variable.

\*En la fila color verde se muestran los resultados de las pruebas bioquímicas reportadas en bibliografía (Wagner y McLauchlin, 2008).

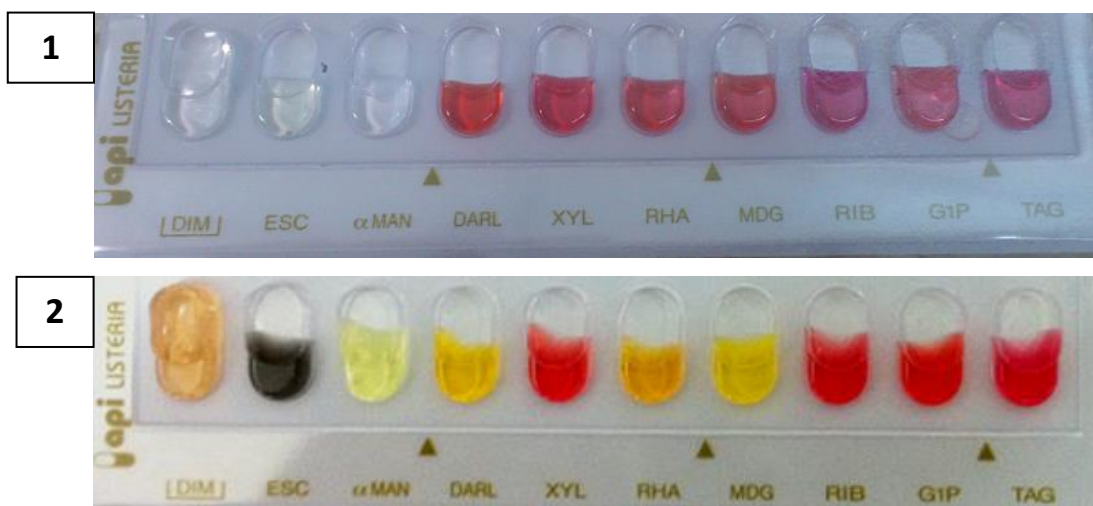
### 9.2.1.3. Pruebas bioquímicas por el sistema miniaturizado de API LISTERIA® (BioMérieux)

Para la complementación de la identificación fenotípica de las cepas probadas en este trabajo, se utilizó el sistema API LISTERIA®, la lectura de los resultados se llevó a cabo por comparación de los colores de cada pocillo, y revelando las pruebas que así lo requieran, con ayuda de la tabla de interpretación de resultados (Anexo 1).

De acuerdo con los resultados de las pruebas bioquímicas reportadas (tabla 25) se obtiene un código numérico, y con el programa APIweb (BioMérieux) se obtiene la



identidad. En las figuras 8 y 9 se muestra un ejemplo del resultado obtenido para la cepa probada *L. monocytogenes* I.



**Figura 8.** Tiras API Listeria<sup>®</sup>, realizadas para la cepa *L. monocytogenes* I. Incubadas a 37 °C / 24 h. 1) Recién inoculada y 2) Después del periodo de incubación 37 °C/ 24 hrs

**Tabla 25.** Resultados de pruebas bioquímicas del sistema API LISTERIA.

Cepa	DIM	ESC	αMAN	DARL	XYL	RHA	MDG	RIB	G1P	TAG	Codigo numérico
<i>Listeria monocytogenes</i> I	-	+	+	+	-	+	+	-	-	-	6510
<i>Listeria monocytogenes</i> II	-	+	+	+	-	+	+	-	-	-	6510
<i>Listeria monocytogenes</i> III	-	+	-	+	-	+	+	-	-	-	2510
<i>Listeria innocua</i> I	+	+	+	+	-	+	+	-	-	-	7510
<i>Listeria innocua</i> II	+	+	+	+	-	+	+	-	-	-	7510
<i>Listeria welshimeri</i>	+	+	+	+	+	-	+	-	-	+	7311
<i>Listeria seeligeri</i>	+	+	+	-	-	-	-	+	-	+	7021

De las tres cepas de *Listeria monocytogenes* utilizadas en este estudio, todas presentaron el perfil bioquímico reportado por el fabricante, a excepción de la cepa de *Listeria monocytogenes* III, la cuál no presento la actividad de la enzima  $\alpha$ -manosidasa. En el caso de las cepas de *Listeria innocua* las dos tuvieron una muy buena identificación presentando el perfil numérico reportado por el proveedor. Para la cepa de *Listeria seeligeri* la fermentación de xilosa fue contrario a lo reportado en la bibliografía (tabla 24) y el sistema la identificó como posible *Listeria grayi*.

BUENA IDENTIFICACION			
Galería	API LISTERIA V1.1		
Perfil	6 5 1 0		
Nota			

Taxón significativo	% ID	T	Pruebas en contra			
<i>Listeria monocytogenes</i>	98.6	1.0				

Taxón siguiente	% ID	T	Pruebas en contra			
<i>Listeria innocua</i>	1.3	0.58	DIM	99%		

**Figura 9.** Identificación obtenida con el programa APIweb de BioMérieux, para la cepa, *L. monocytogenes* I.

En la tabla 26 se muestra la calidad de identificación, la probabilidad y el organismo al comparar con la base de datos de BioMérieux. De acuerdo con los resultados, para las cepas empleadas se obtuvo una calidad de identificación muy buena o excelente con un porcentaje de identificación mayor al 98%, con excepción de la cepa *L. seeligeri*.

En la tabla 27 se muestra la comparación de los resultados obtenidos en la identificación con las pruebas bioquímicas convencionales de la fermentación de los carbohidratos ramnosa y xilosa para las cepas del estudio. Únicamente se compararon los resultados de estos dos carbohidratos, debido a que estas dos

pruebas son las que demostraron tener diferencia, tanto para la identificación convencional, como por el sistema API LISTERIA<sup>®</sup>. Se observó que en las pruebas de fermentación de ramnosa convencionales para la cepa de *Listeria seeligeri* se obtuvo un resultado positivo, el cual fue contrario a lo reportado para este microorganismo (tabla 24; Wagner, 2008).

**Tabla 26.** Resultados de la identificación utilizando el sistema API LISTERIA (Biomerièux).

Cepa	Identificación descrita en el APIWEB	% ID	Calidad
<b><i>L. monocytogenes</i> I</b>	<i>Listeria monocytogenes</i>	98.6	Buena identificación
<b><i>L. monocytogenes</i> II</b>	<i>Listeria monocytogenes</i>	98.6	Buena identificación
<b><i>L. monocytogenes</i> III</b>	<i>Listeria monocytogenes</i>	98.5	Buena identificación
<b><i>L. innocua</i> I</b>	<i>Listeria innocua</i>	99.6	Muy buena identificación
<b><i>L. innocua</i> II</b>	<i>Listeria innocua</i>	99.6	Muy buena identificación
<b><i>L. seeligeri</i></b>	Probable <i>Listeria grayi</i>	-	-
<b><i>L. welshimeri</i></b>	<i>Listeria welshimeri</i>	99.9	Excelente identificación

Debido a estas diferencias en las pruebas, fue necesario continuar con la identificación molecular para poder tener una identidad más cercana y de esta forma complementar cada una de las aproximaciones fenotípicas empleadas en este trabajo.

De forma preliminar, con el criterio fenotípico realizado, se aseguró la identidad fenotípica para la mayoría de las cepas probadas en el estudio. Se complementó la identificación con otro sistema automatizado (VITEK<sup>®</sup>) y por comparación de las secuencias del gen ribosomal 16S, se tuvo un criterio de identidad global.

**Tabla 27.** Comparación entre los resultados obtenidos para la fermentación de los carbohidratos ramnosa y xilosa, en tubo y por el sistema API Listeria.

Cepa	Prueba bioquímica en tubo		Resultado reportado en la bibliografía		Sistema de identificación API Listeria	
	Xilosa	Ramnosa	Xilosa	Ramnosa	Xilosa	Ramnosa
<i>L. monocytogenes</i> I	-	+	-	+	-	+
<i>L. monocytogenes</i> II	-	+	-	+	-	+
<i>L. monocytogenes</i> III	-	+	-	+	-	+
<i>L. innocua</i> I	-	+	-	+	-	+
<i>L. innocua</i> II	-	+	-	+	-	+
<i>L. seeligeri</i>	-	+	+	-	-	-
<i>L. welshimeri</i>	-	+	+	+	+	-

#### 9.2.1.4. Identificación por el sistema automatizado VITEK® (BioMérieux)

Para la identificación por el sistema automatizado VITEK®, a partir de una colonia desarrollada en agar BHI incubada a 37 °C durante 24 h, se realizó una suspensión al 0.5 de la escala de MacFarland en solución salina proporcionada por el proveedor. Como ejemplo, en la tabla 28 se muestran los resultados obtenidos para la cepa de *L. monocytogenes* I, en el anexo 5 se presentan los resultados obtenidos para el resto de las cepas. De acuerdo con los resultados de las pruebas bioquímicas reportadas, se obtiene un nivel de confianza, la probabilidad y el organismo que se identificó por comparación con la base de datos que contiene el equipo (tabla 29).

Para las tres cepas de *Listeria monocytogenes* se obtuvo un buen porcentaje de identificación y calidad, aunque para *Listeria monocytogenes* III en la prueba de fermentación de sacarosa (SAC) se obtuvieron resultados contrarios, ya que según la base de datos del sistema VITEK debió ser negativa (anexo 5; tabla 44). Así mismo no presentó la enzima  $\alpha$ -manosidasa (AMAN), prueba que según la base de datos debió dar resultado positivo; sin embargo, a pesar de estas pruebas contrarias a lo

esperado, se obtuvo un porcentaje de identificación de 94.07%, con una calidad muy buena (tabla 29).

**Tabla 28.** Resultados de las pruebas bioquímicas por el sistema VITEK<sup>®</sup> (Biomerièux) para la cepa *Listeria monocytogenes* I.

AMY	+	PIPLC	-	dXYL	-	ADH1	-	BGAL	-	AGLU	+
APPA	-	CDEX	+	AspA	-	BGAR	-	AMAN	+	PHOS	-
LeuA	-	ProA	-	BGURr	-	AGAL	-	PyrA	-	BGUR	-
AlaA	-	TyrA	+	dSOR	¿?	URE	-	POLYB	+	dGAL	-
dRIB	-	1LATk	+	LAC	-	NAG	+	dMAL	+	BACI	+
NOVO	+	NC6.5	+	dMAN	+	dMNE	+	MBdG	+	PUL	-
dRAF	-	O129R	+	SAL	+	SAC	+	dTRE	+	ADH2s	-
OPTO	+										

NOTA: En el anexo 5 se presentan las iniciales de cada prueba que comprende el sistema.

**Tabla 29.** Resultados de la identificación utilizando el sistema VITEK<sup>®</sup> (Biomerièux).

Cepa	Organismo identificado	% ID	Nivel de confianza
<i>L. monocytogenes</i> I	<i>Listeria monocytogenes</i>	95.00	Muy buena identificación
<i>L. monocytogenes</i> II	<i>Listeria monocytogenes</i>	95.00	Muy buena identificación
<i>L. monocytogenes</i> III	<i>Listeria monocytogenes</i>	94.07	Muy buena identificación
<i>L. innocua</i> I	<i>Listeria innocua</i>	90.98	Buena identificación
<i>L. innocua</i> II	<i>Listeria innocua</i>	95.00	Muy buena identificación
<i>L. seeligeri</i>	<i>Staphylococcus vitulinus</i>	87.59	Identificación aceptable
<i>L. welshimeri</i>	<i>Listeria welshimeri</i>	90.40	Buena Identificación

En la identificación de la cepa de *L. innocua* I se obtuvieron dos pruebas en contra, la alcalinización por L-lactato (1LATk) la cuál dio resultado positivo y la base de datos establece que esta prueba debe de ser negativa, y la segunda prueba en contra fue la de hidrólisis de sacarosa (SAC) en la cual se obtuvo un resultado positivo, cuando

debió ser negativo. Para *L. innocua* II se obtuvo solo una prueba en contra, la alcalinización por L-lactato (1LATk) que de igual forma que *L. innocua* II se obtuvo el resultado positivo cuando debió ser negativo; a pesar de estas pruebas se logró una buena y muy buena identificación, respectivamente.

La cepa *L. welshimeri* presentó una buena identificación con dos pruebas en contra, la fermentación de manitol (dMAN) y la hidrólisis de sacarosa, las dos dieron un resultado positivo, cuando la base de datos del sistema VITEK marca que deben de ser negativos. En el caso de la cepa *L. seeligeri* se identificó como *Staphylococcus vitulinus*, se había observado con el resultado de las pruebas bioquímicas convencionales y el sistema miniaturizado API Listeria<sup>®</sup> un taxón distinto a lo esperado (tabla 30), se decidió no continuar trabajando con esta cepa para el resto del presente trabajo.

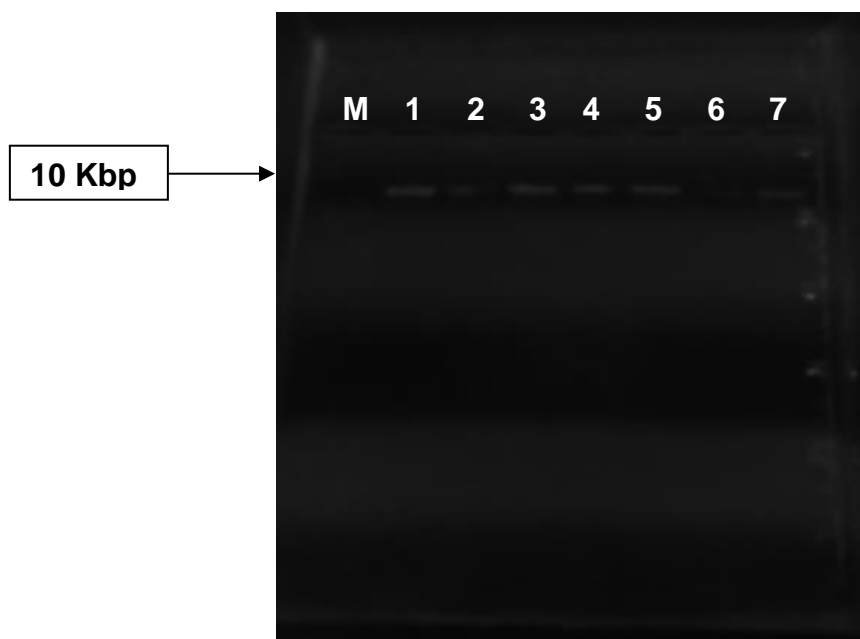
A pesar de que con la identificación fenotípica se obtuvieron buenos resultados (con excepción de la cepa mencionada *L. seeligeri*) para comprobar los taxones inicialmente descritos para las cepas trabajadas, se complementó la identificación de todas las cepas con el gen ribosomal 16S para obtener un panorama polifásico y tener la certeza de que las cepas que se utilizaron en la identificación por mPCR en queso fresco, están correctamente catalogadas como *Listeria* y la especie correspondiente.

## 9.2.2. Identificación genotípica

### 9.2.2.1. Extracción de DNA cromosomal

En la figura 10 se comprueba la correcta extracción del DNA cromosomal de las cepas, al haber utilizado el sistema comercial MOBIO<sup>®</sup>, ya que todas las bandas se encuentran por encima de 10 Kbp. Solo se observa una banda íntegra, lo que indica que el DNA cromosomal no se encuentra degradado y que presenta el tamaño reportado según la bibliografía (Madigan *et al.*, 2010). La banda del carril (6), la cual

corresponde a *L. seeligeri*, es más tenue que las otras bandas, lo cual pudo haber reflejado una baja eficiencia en la extracción. A partir del producto de la extracción, se procedió a realizar la amplificación del gen 16S por PCR.



**Figura 10.** Electroforesis para el DNA cromosomal extraído de las cepas de *Listeria*. Gel de agarosa 1% + 4  $\mu$ L de Bromuro de etidio 0.05%, 5 $\mu$ L + 3  $\mu$ L buffer de carga. 100 V. M) marcador de peso molecular (Fermentas 1 kb DNA), (1) *L. monocytogenes* I, (2) *L. monocytogenes* II, (3) *L. monocytogenes* III, (4) *L. innocua* I, (5) *L. innocua* II, (6) *L. seeligeri* y (7) *L. welshimeri*.

#### 9.2.2.2. Amplificación por PCR del gen ribosomal 16S

Se amplificó el gen ribosomal 16S utilizando los primers universales fD1 y rD1 (Weisburg, 1991; Escalante, 2000), Weisburg (1991), reportó la amplificación del gen ribosomal 16S de *Listeria* sp. y otras eubacterias Gram-positivas. Así mismo, Escalante (2000), empleó este par de primers para la identificación de bacterias lácticas en muestras de pozol.

Al observar las bandas obtenidas después de la electroforesis en gel de agarosa al 1%, realizada con el DNA cromosomal de cada una de las cepas se observó un tamaño aproximado de 1.5 Kbp (datos no mostrados), lo cuál indicó una correcta amplificación del gen ribosomal 16S.

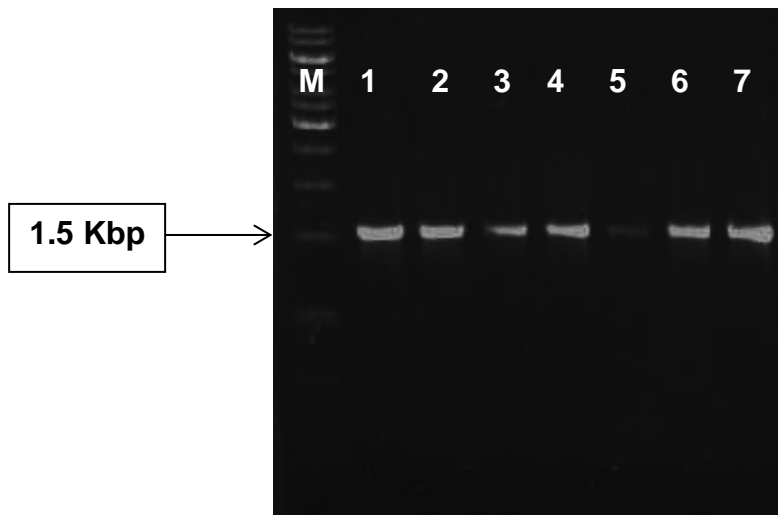
#### 9.2.2.3. Purificación del producto de PCR para el gen ribosomal 16S

Se realizó la purificación de este producto, lo cual tiene como objetivo eliminar las impurezas que pudieron quedar después de la reacción de PCR, como son restos de la enzima Taq polimerasa, de dNTP's, de MgCl<sub>2</sub> o restos de primers, los cuales pudieran interferir en la reacción de secuenciación.

La purificación se verificó con una electroforesis en gel de agarosa al 1 %. En la figura 11 se presenta la imagen obtenida de este gel. En todos los casos, se observó para todos los amplicones de cada una de las cepas, la presencia de una banda nítida e intensa del peso molecular esperado (1.5 Kbp) y la ausencia de otras bandas que indicarían la posible presencia de productos inespecíficos o primers.

Se observó que la intensidad de las bandas 1, 2, 3, 4, 6 y 7 es alta, lo cual indica una correcta amplificación y purificación, y por lo tanto una mayor concentración del gen 16S (Entis, 2001); al contrario de la banda 5 (obtenida para el amplicón de *L. innocua* II), que se observa más tenue, lo cual puede atribuirse a una deficiencia en la purificación del producto de PCR, lo que implica una disminución de la concentración del gen amplificado.





**Figura 11.** Electroforesis para el producto de PCR purificado del gen ribosomal 16S de las cepas *Listeria*. Gel de agarosa 1% + 4  $\mu$ L de Bromuro de etidio 0.05%, 5  $\mu$ L + 3  $\mu$ L de buffer de carga. 100 V. Carril (M) marcador de peso molecular, (1) *L. monocytogenes* I, (2) *L. monocytogenes* II, (3) *L. monocytogenes* III, (4) *L. innocua* I, (5) *L. innocua* II, (6) *L. welshimeri*, (7) *L. seeligeri*.

#### 9.2.2.4. Secuenciación del producto de PCR para el gen ribosomal 16S

Previo a la secuenciación se realizó un análisis utilizando el equipo NanoDrop 2000t Spectrophotometer, y de esta forma obtener la concentración del producto de amplificación y su pureza. En la tabla 30 se presentan los resultados de este análisis. En la primera columna se registra la concentración de DNA ( $\text{ng}/\mu\text{L}$ ), lo cual indica que la concentración de los amplicones fue adecuada, y esto concuerda con la intensidad de las bandas obtenidas en el gel de agarosa de los amplicones.

Los valores obtenidos de la absorbancia a 260 nm indicó la concentración de DNA y la absorbancia a 280 nm la concentración de proteínas presentes. La relación de 260/280 indicó la pureza del amplicón con relación a la proteína presente. Los valores obtenidos se encuentran entre 1.7 – 1.8, donde valores alrededor de 1.8 son aceptados para considerarlo con una pureza adecuada.

**Tabla 30.** Resultados obtenidos por el análisis de NanoDrop del gen ribosomal 16S, para las cepas probadas.

Cepa	[ DNA] (ng/μL)	Abs 260	Abs 280	260 / 280	260 / 230
<i>L. monocytogenes</i> I	24.1	0.482	0.261	1.85	1.07
<i>L. monocytogenes</i> II	30.6	0.538	0.304	1.77	0.73
<i>L. monocytogenes</i> III	26.4	0.529	0.296	1.78	0.72
<i>L. innocua</i> I	27.4	0.548	0.298	1.84	0.98
<i>L. welshimeri</i>	37.1	0.741	0.396	1.87	1.1

En cuanto a la relación 260/230 indica la pureza del DNA con respecto a otros compuestos, como son los compuestos fenólicos. Al igual que con la relación de 260/280, los valores aceptados están en el rango entre 1.8-2.0. En el caso de los valores obtenidos de esta relación para las cepas *L. monocytogenes* I, *L. monocytogenes* II y *L. innocua* I fue menor a este rango, lo cual que indica una mayor concentración de contaminantes no proteicos.

#### 9.2.2.5. Construcción del árbol filogenético para el gen ribosomal 16S

En la tabla 31 se enlista la identidad de las secuencias utilizadas para la elaboración del árbol filogenético del gen ribosomal 16S (número de GENBANK), su porcentaje de identificación y su valor de expectancia (valor E), este valor nos indicó la probabilidad de que el alineamiento haya sido realizado al azar, por lo cual este valor debió de ser muy cercano a cero, lo cual fue consistente con el resultado obtenido en el programa BLAST para todas las cepas.

En la figura 12 se presenta el árbol filogenético no enraizado elaborado por el método de Neighbor-Joining, empleando el algoritmo de comparación Jukes Cantor de las cepas de *Listeria*. De acuerdo a la posición de cada una de las ramas y su comparación, este árbol indicó que existe una mayor similitud entre las cepas *L.*

*monocytogenes* II y III debido a que se encuentran más cercanas, lo cual confirmó que en cuanto a especie son muy parecidas; además se agruparon en la misma ramal filogenética a las secuencias seleccionadas más parecidas en la base del NCBI, que asegura su identidad como se indica en la tabla 31 y que son muy similares a la especie indicada; mientras que la cepa de *L. monocytogenes* I se encuentra a una mayor distancia y por lo tanto no presenta tanta similitud con las otras dos cepas de *L. monocytogenes*.

**Tabla 31.** Secuencias utilizadas para la elaboración del árbol filogenético del gen ribosomal 16S.

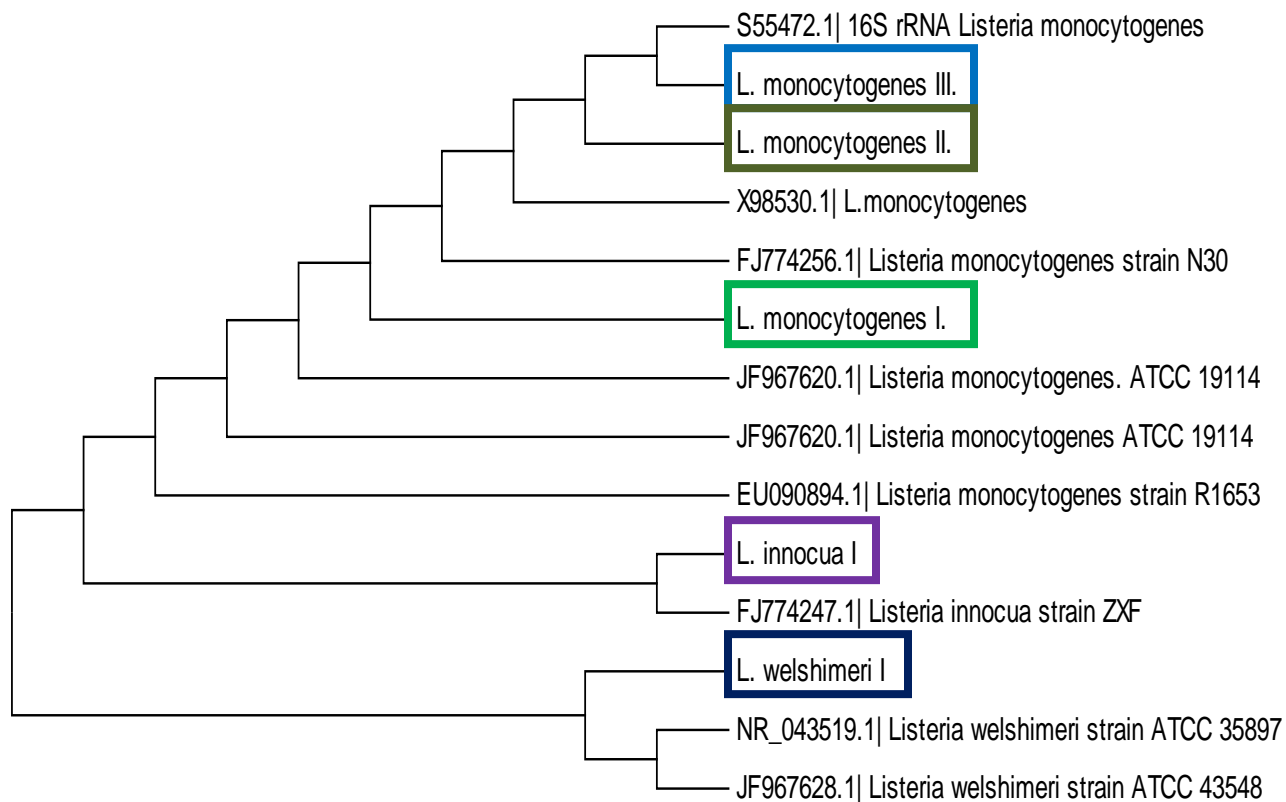
Especie	Número de GENBANK	% Id	Valor E	% Cobertura
<i>L. monocytogenes</i>	FJ774256.1	97	0.0	99
	JF967620.1	97	0.0	98
	EU090894.1	97	0.0	99
	S55472.1	96	0.0	99
	X98530.1	96	0.0	98
<i>L. innocua</i>	FJ774247.1	97	0.0	98
<i>L. welshimeri</i>	NR_043519.1	97	0.0	99
	JF967628.1	97	0.0	99

Para las cepas de la especie *Listeria innocua*, se observó que se agrupó en otra ramal filogenética junto con la secuencia FJ774247.1 elegida más similar obtenida por el programa BLAST del NCBI. Así mismo se encontró intermedia entre las ramas correspondientes a *Listeria monocytogenes* y *Listeria welshimeri*. Finalmente la cepa *L. welshimeri* la cual deriva de una raíz diferente a las otras cepas, se agrupó con las secuencias más similares obtenidas por el BLAST (NR\_043519.1 y JF967628.1)

Los resultados obtenidos mediante la aproximación fenotípica y por la comparación de las secuencias obtenidas del gen ribosomal 16S, aseguraron la correcta identidad de

las cepas para implementar la metodología del PCR Múltiplex con alguna de éstas, así como para la aplicación de la técnica en muestras de alimento.

Aunque utilizar el gen ribosomal 16S es una buena aproximación molecular para la identificación de las cepas, se debe tomar en cuenta que este gen es un gen universal, y no es tan específico ni brinda tanta información cuando se quiere identificar a cepas involucradas en infecciones, como lo es la listeriosis. Por lo anterior se realizó la identificación de *L. monocytogenes* utilizando al gen específico de esa especie (*inIA*) y al gen específico de todos los serotipos, excepto 4a y algunos 4c (*inIC*).



**Figura 12.** Árbol filogenético no enraizado del gen ribosomal 16S de las cepas de *Listeria* elaborado por el método de Neighbor-Joining, empleando el algoritmo de comparación Jukes Cantor que representa las 5 cepas secuenciadas, además de las secuencias elegidas con mayor similitud obtenidas por el BLAST del NCBI.

En la tabla 32 se muestra un comparativo de las pruebas realizadas para la identificación de las cepas, se puede observar que para el caso de los sistemas que utilizan pruebas bioquímicas para la identificación, el porcentaje de identificación es muy variable, pero en todos los casos es mayor al 90% (a excepción de *L. seeligeri*); por otro lado, en cuanto a la identificación por el gen 16S se obtuvo un menor porcentaje de identificación para todas del 97 %, lo cual brinda un panorama polifásico de la identificación de todas las cepas, para continuar con la identificación por PCR Múltiplex.

**Tabla 32.** Comparativo de resultados obtenidos con los tres sistemas de identificación utilizados.

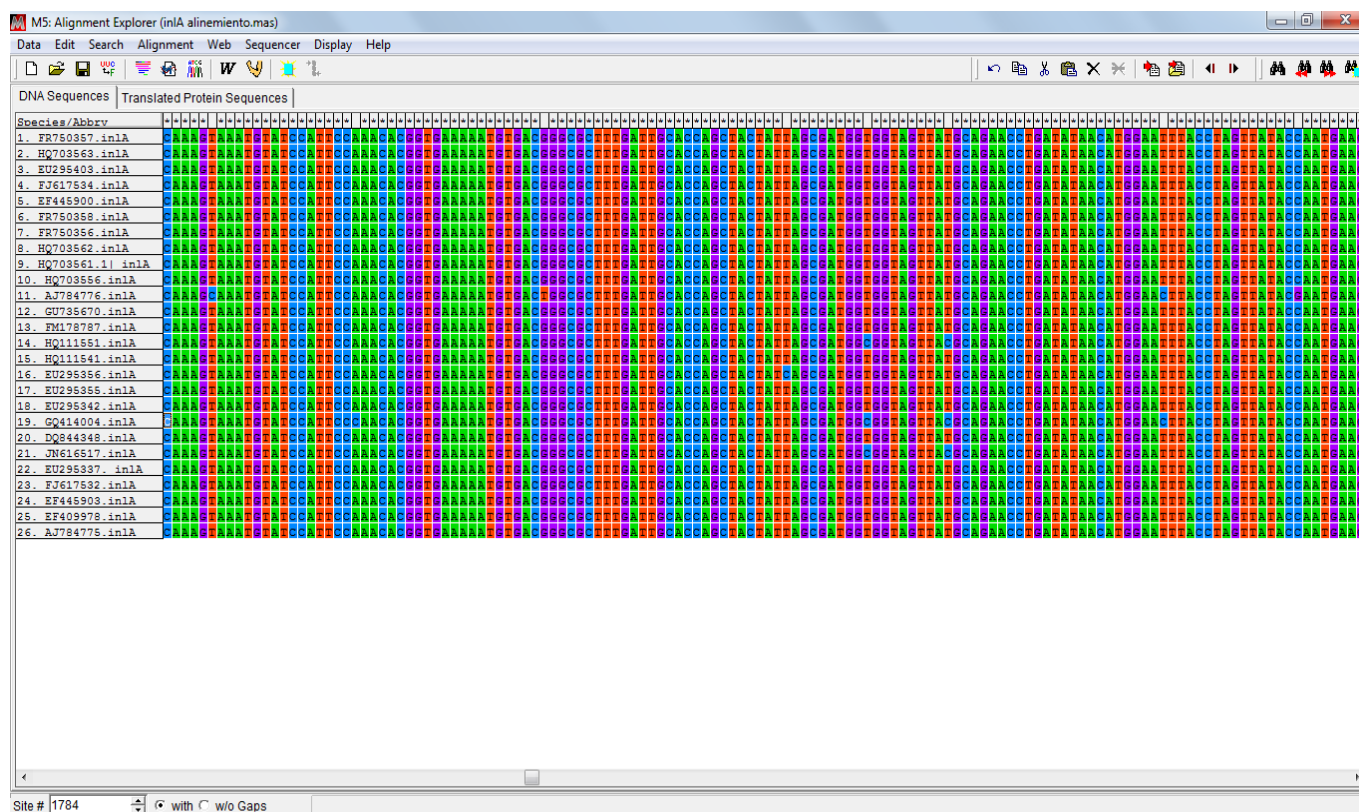
Cepa	API Listeria			VITEK			Gen ribosomal 16S	
	% Id	Calidad	Taxon	% Id	Calidad	Taxon	% Id	Taxon
<b>Listeria monocytogenes I</b>	98.6	Buena	<i>Listeria monocytogenes</i>	95	Muy buena	<i>Listeria monocytogenes</i>	97	<i>Listeria monocytogenes</i>
<b>Listeria monocytogenes II</b>	98.6	Buena	<i>Listeria monocytogenes</i>	95	Muy buena	<i>Listeria monocytogenes</i>	97	<i>Listeria monocytogenes</i>
<b>Listeria monocytogenes III</b>	98.5	Buena	<i>Listeria monocytogenes</i>	94.07	Muy buena	<i>Listeria monocytogenes</i>	97	<i>Listeria monocytogenes</i>
<b>Listeria innocua I</b>	99.6	Muy buena	<i>Listeria innocua</i>	90.98	Buena	<i>Listeria innocua</i>	97	<i>Listeria innocua</i>
<b>Listeria innocua II</b>	99.6	Muy buena	<i>Listeria innocua</i>	95	Muy buena	<i>Listeria innocua</i>	97	<i>Listeria innocua</i>
<b>Listeria welshimeri</b>	99.9	Excelente	<i>Listeria welshimeri</i>	90.4	Buena	<i>Listeria welshimeri</i>	97	<i>Listeria welshimeri</i>
<b>Listeria seeligeri</b>	-	-	<i>Listeria grayi</i>	87.59	Aceptable	<i>Staphylococcus vitulinus</i>	-	-

% Id: Porcentaje de identidad

### 9.3. PCR Múltiplex en cepa pura

#### 9.3.1. Diseño de primers para los genes *inIA* e *inIC*

Se eligieron 25 secuencias del gen *inIA* y 29 del gen *inIC* de la base de datos del GenBank contenida en el NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>). Con éstas, se empleó el programa para alineamiento de secuencias Clustal W, contenido en el programa MEGA (Phylogenetic and molecular evolutionary analyses were conducted using *MEGA* Version 5.0 (Tamura, Peterson, Stecher, Nei, y Kumar 2011). En las figuras 13 y 14 se muestran los alineamientos para los genes *inIA* e *inIC*, respectivamente, con cada una de las secuencias seleccionadas.



**Figura 13.** Alineamiento realizado por Clustal W con las secuencias de *inIA* para obtener la secuencia consenso.



**Figura 14.** Alineamiento realizado por Clustal W con las secuencias de *inC* para obtener la secuencia consenso.

A partir de las regiones homólogas observadas entre las secuencias alineadas se obtuvo la secuencia consenso. En la figura 15(a) y 15(b) se presentan las secuencias consenso obtenidas para los genes *inC* e *inIA*, respectivamente.

```
TCACAAAGGAAGTATCTGGGGTACAAAATTTCAATGGAGATAATAGCAACATTAAATCTCTTGCCG
GAATGCAATTTTTCACTAATTTAAAAGAAGTTCATCTATCCCACAATCAAATAAGTGACCTTAGTCCT
TAAATGATCTAACTAAATTAGAAGAGCTATCTATGAATAGAAATAGACTGAAAAATTTAAACGGAAT
TCCAAGTGCTTGTTTATCTCGTTTGTGGTAGATAACAACGAAGTCCGAGATACTGACTCGCTTATT
CATTTGAAAAATCTAGAAATCTTATCTATTCGTAATAATAAGCTAAAAGTATTGTGATGCTTGGCTT
TTTATCTAACTAGAGGTATTAGATTTGCATGGTAATGAAATAACAAATACAGGTGGACTAACTAGAT
TGAAGAAAGTAACTGGATAGATTTAACTGGTCAGAAATGTGTGAATGAACCAGTAAGATACCAACC
AGAATTGTATATAACAAATACTGTCAAAGACCCAGATGGAAGATGGATATCTCCATATTACATCAGT
AATGGAGGGAATTATGTAGATGGTTGTGTCCTGTGGGAATTGCCTG
```

**Figura 15(a).** Secuencia consenso del gen *inC*. La secuencia consenso tiene un tamaño de 337 bp.

GTGAGAARAAAACGATATGTATGGTTGAAAAGTATACTAGTAGCAATATTAGTATTTGGCAGYGGAG  
TATGGATTAACACGAGYAACGGGACAAATGCTCAGGCAGCTACAATTACACAAGATACTCCTATTAA  
TCAGATTTTACAGAYRCAGCTCTAGCGGAAAAAATGAAGACGGTCTTAGGAAAAACGAATGTAACA  
GACACGGTCTCRCAAACAGATCTAGACCAAGTTACRACGCTTCAGGCGGATAGRTTAGGGATAAAA  
TCTATCGATGGAKTGGAATACTTGAACAATTTAACACAAATAAATTTTCAGCAATAATCAACTTACGGA  
YATAACKCCACTTAAARATTTAACTAAGTTAGTTGATATTTTGGATGAATAATAATCAAATAGCAGATAT  
AACTCCGCTAGCTAATTTGWCGAATCTAACTGGTTTACTTTGTTCAACAATCAGATAACRGATMTA  
GACCCGCTTAAAAATCTAACAAATTTAAATCGGCTAGAACTATCYAGTAACACGATTAGTGATATTA  
GTGCGCTTTCAGGTTTAACTARTCTACAGCAATTATCTTTTGGTAATCAAGTGACAGATTTAAAACCA  
TTAGCTAATTTAACRACACTAGAACGACTAGATATTTCAAGTAATAAGGTGTCRGATATTAGTGTTCT  
GGCTAAATTAACCAATTTAGAAAAGTCTTATCGCTACTAACCAAAATAAGTGATATAACTCCACTTG  
GGATTTTAAACAAATTTGGACGAATTATCCTTAAATGGTAACCAGTTAAAAGATATAGGCACATTGGC  
GAGTTTAAACAAACCTTWCAGATTTAGATTTAGCAAATAACCAATTAGTAATCTAGCACCCTGTCCG  
GGTCTAACAAAATACTGAGTTAAAACKGGAGCTAACCAATAAGTAACATCAGTCCCCTAGCAG  
GTYTAACCGCACTCACTAACTTAGAGCTWAATGAAAATCAGYTRGAAGATATTAGCCCAATTTCTAA  
CCTGAAAAATCTCACATATTTAACKTTGACTTTAATAATATAAGTGATATAAGCCCAGTTTCTAGTTT  
AACAAAGCTTCAAAGATTATTTTTCTATAATAACAAGGTAAGTGACGTAAGCTCACTTGCGAAYTTAA  
CMAATATTAATTGGCTTTCRGCTGGGCATAACCAAATTAGCGATCTTACACCATTGGCTAATTTAAC  
AAGAATYACCAAYTAGGRTTGAATGAYCAAGMATGGACAAATSCACCAGTRAACTACAAAGYAAAT  
GTATCCATTCCAAACACGGTGAAAAATGTGACKGGCGCTTTRATTGCACCWGCTACTATTAGCGAT  
GGYGGTAGTTAYRCAGARCKGATATAACATGGAAYTTACCTAGTTATACMAATGAAGTAAGYTATA  
CCTTTARCCAAYCTGTCACYATTGGAAAAGGAACGACAACATTTAGTGGAACYGTGACGCAGCCAC  
TTAAGGCAATTTTTAATGYTAAGTTTCATGTGGACGGCAAAGAAACAACCAAGAAGTGAAGCTG  
GGAATTTATTGACTGAACCAGCTAAGCCYGTAAAAGAAGGTYAYACATTTGTTGGKTGGTTTGATGC  
CCAAACMGGCGGAACTAAATGGRATTTTACGTACGGATAAAATGCCGACAAAYGACATCRATTTATA  
TGCRCATTTAGTATTAACAGCTACACAGCAACSTTTGAKAATGACGGTGTAAACAACATCTCAAACA  
GTAGATTATCAAGGCTTGYTACAAGAACCTACRSCACCAACAAAAGAAGGTTATACTTTTAAAGGCT  
GGTATGACGCAAAAATACTGGTGGTGACAAGTGGGATTTYGCAACTAGYAARATGCCTGCTAAAAACA  
TCACCTTATATGCYCAATATAGCGCCAATAGCTATACAGCAACSTTTGATRRTTGATGGAAAAWCAAC  
GACTCAARCAGTAGACTATCAAGGACTTCTAAAAGAACCAARRCRCCAACRAAAGCCGGATATAC  
TTTCAAAGGYTGGTATGACGAAAAACAGATGGKAAAAAATGGGATTTTGGCACRGATAAAATGCC  
AGCAAATGAYATTACGCTGTACGCTCAATTYACGAAAAATCCTGTGGCACCACCAACAACCTGGAGG  
GAACACWCCGCKACWACAAATAACGGMGGGAAYACTACACCACCTTCCGCAAATATACCTGGAA  
GCRACACATCTAACACATCAACTGGGAATTCAGCYAGCACAACAAGTACAATGAACGCTTATGACC  
CTTATAATTCAAAGAAGCTTCACTCCCTACAACCTGGYGATAGCGATAATGCGCTCTACCTKTTGW  
AGGRTTRTTAGCAGTAGGAACTGCARTGGCTCTTACTAAAAAAGCACGTGCTAGTAAATAG

**Figura 15(b).** Secuencia consenso del gen *inIA*. La secuencia consenso tiene un tamaño de 869 bp.



A partir de estas secuencias consenso, se diseñaron los primers más adecuados, utilizando el programa Primer BLAST del NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>). Los resultados indicados en el programa primer BLAST se muestran en la tabla 33 para ambos genes.

**Tabla 33.** Diseño de primers utilizando el programa Primer BLAST.

	<i>inIA fw</i>	<i>inIA rv</i>	<i>inIC fw</i>	<i>inIC rv</i>
<b>Secuencia (5´-3´)</b>	ACG GGA CAA ATG CTC AGG CAG C	TGC GGT TAA ACC TGC TAG GGG AC	ACG AAC TCC GAG ATA CTG ACT CGC	TCC CAC AGG ACA CAA CCA TCT ACA
<b>Longitud</b>	22	23	24	24
<b>Nucleótido inicial</b>	86	954	242	578
<b>Nucleótido final</b>	107	932	265	555
<b>Tm</b>	59.99	58.64	58.16	57.22
<b>C+G (%)</b>	59.09	56.52	54.17	50.00
<b>Auto</b>	3.00	3.00	5.00	3.00
<b>complementariedad (3´) Auto</b>	7.00	1.00	3.00	2.00
<b>complementariedad</b>				
<b>Tamaño del producto (nt)</b>	869		337	

Se solicitó la síntesis de los primers para los genes *inIA* e *inIC* a la Unidad de Síntesis de oligonucleótidos, del Instituto de Biotecnología de la UNAM. Los primers sintetizados poseen las características presentadas en la tabla 35. Con estos datos, se realizó la optimización de la PCR Múltiple.

### 9.3.2. Optimización de la amplificación de los genes *inIA* e *inIC*.

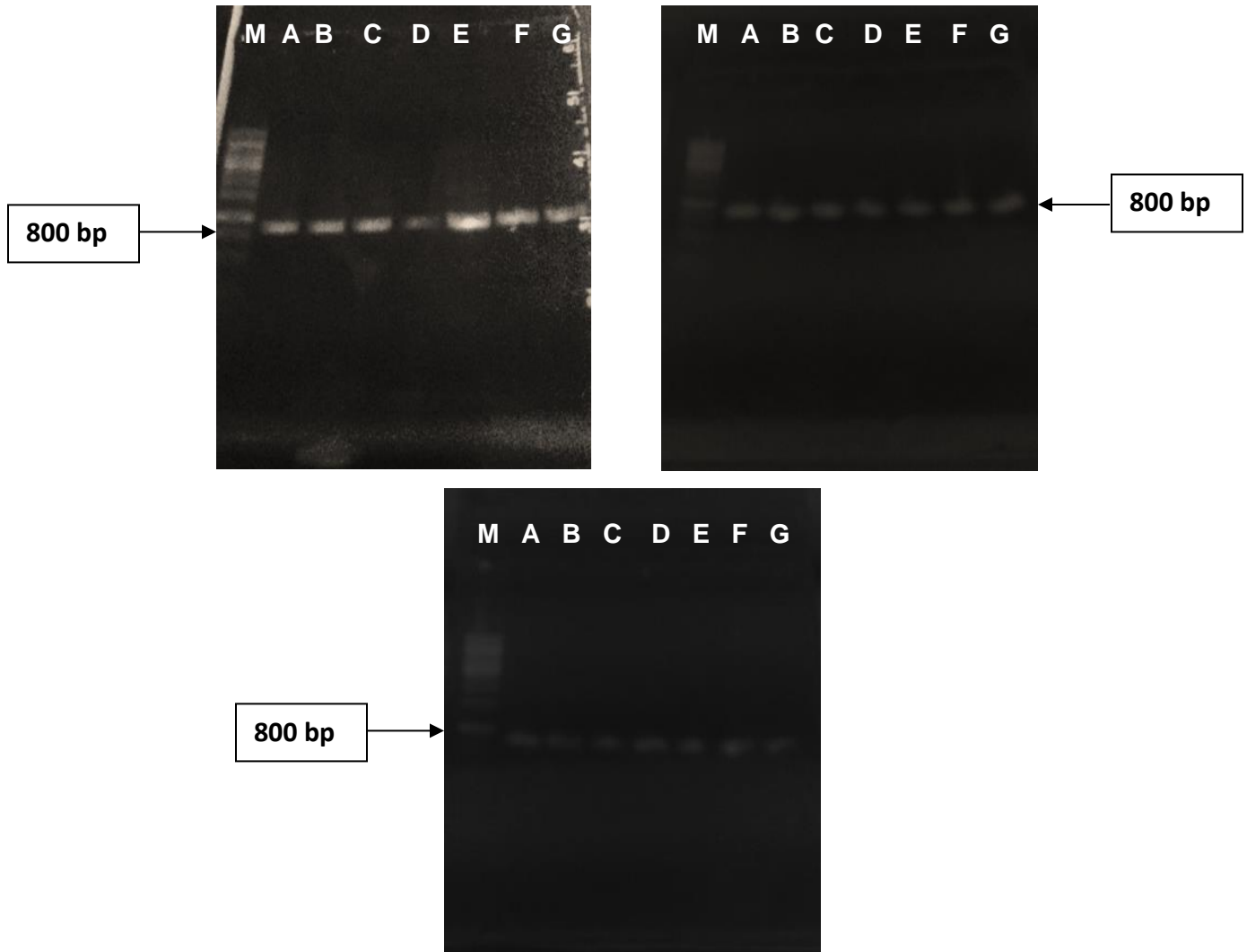
Con las temperaturas de fusión indicadas por el proveedor para cada uno de los primers sintetizados (Tm), se calcularon las temperaturas de alineamiento teóricas (5 °C por debajo de la Tm), las cuales se muestran en la tabla 34.

**Tabla 34.** Primers sintetizados para los genes *inIA* e *inIC*.

	<i>inIA</i> fw	<i>inIA</i> rv	<i>inIC</i> fw	<i>inIC</i> rv
<b>Secuencia (5'-3')</b>	ACG GGA CAA ATG CTC AGG CAG C	TGC GGT TAA ACC TGC TAG GGG AC	ACG AAC TCC GAG ATA CTG ACT CGC	TCC CAC AGG ACA CAA CCA TCT ACA
<b>Longitud</b>	22	23	24	24
<b>Coficiente Abs (260)</b>	252.7	254.4	262.5	263.2
<b>OD's totales</b>	52.38	69.54	59.389	58.683
<b>Concentración (µg/µL)</b>	19.07	23.71	20.98	20.73
<b>Concentración (pmol/µL)</b>	1.26	1.56	1.38	1.37
<b>C+G (%)</b>	176.37	209.21	179.84	179.73
<b>Tm (1)</b>	59.09	56.52	54.17	50.00
<b>Tm (2)</b>	69.64	69.54	69.46	68.04
<b>Tm teórica</b>	70	72	74	72
<b>PM</b>	64.64	64.54	64.46	63.04
<b>Volumen (µL)</b>	7135.40	7478.60	7697.80	7610.80
	500	500	500	500

Para elegir la mejor condición de alineamiento de los primers y con base en esta información, se realizó un PCR con gradiente de temperatura de alineamiento para las tres cepas de *L. monocytogenes* y cada uno de los genes utilizados por separado (*inIA* e *inIC*). La composición de la mezcla de amplificación para la PCR de cada gen se incluyó en las tablas 18 y 19 (inciso 8.4.2), así mismo las condiciones del gradiente se mencionaron en la tabla 17 (inciso 8.4.2).

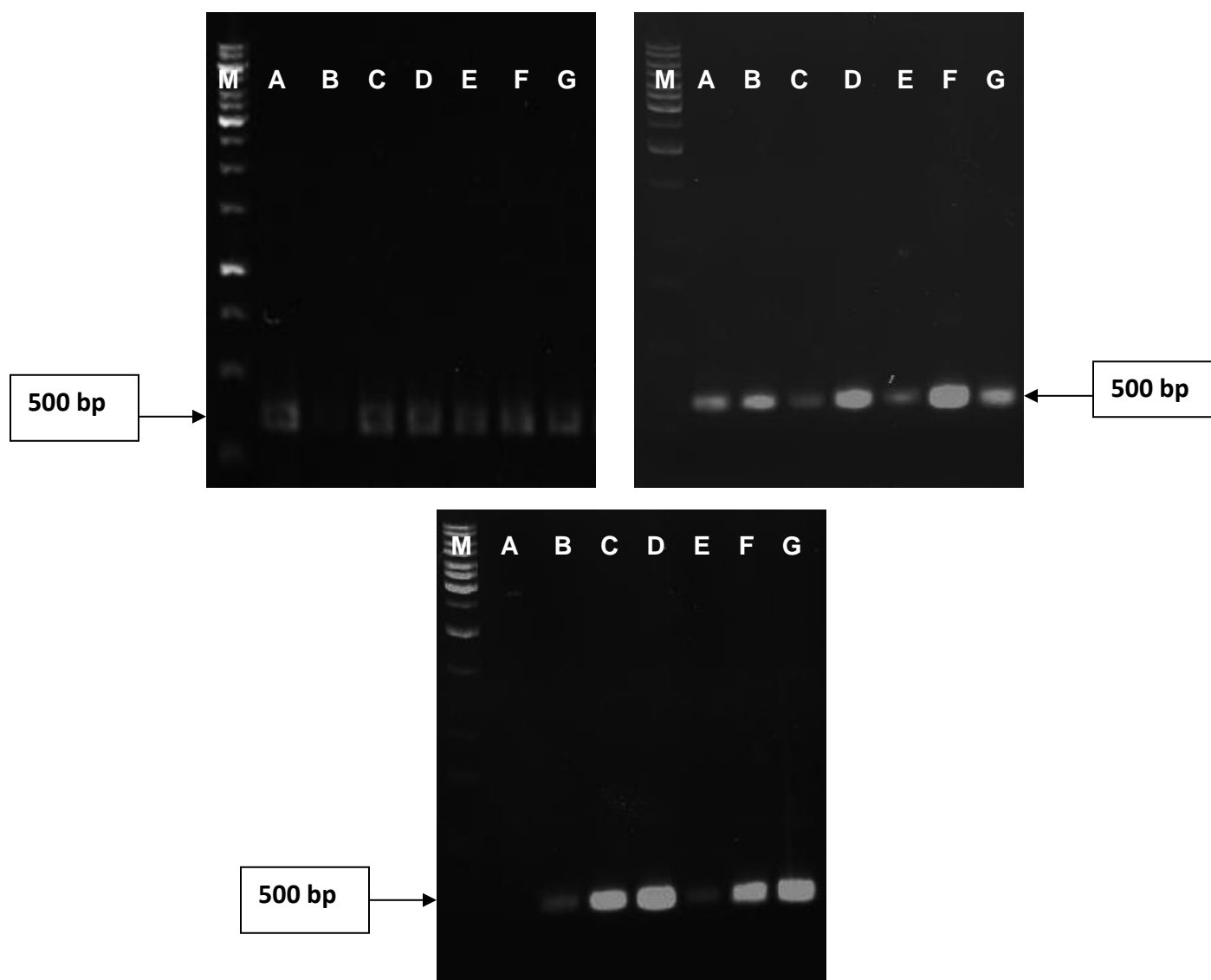
En la figura 16 se presenta la electroforesis en gel de agarosa al 1 %, para visualizar los amplicones de *inIA* e *inIC* obtenidos después de aplicar el gradiente de temperatura de alineamiento en la reacción de PCR, para el gen *inIA* de las tres cepas de *L. monocytogenes*. En la figura 17 se presentan los resultados de la amplificación del gen *inIC*. Para ambos genes se descartó la temperatura de 55 °C debido a la baja intensidad de banda que se obtuvo.



**Figura 16.** Electroforesis para el gradiente de temperatura para el gen *inIA* para las cepas *L. monocytogenes* I, *L. monocytogenes* II y *L. monocytogenes* III. Gel de agarosa 1% + 4  $\mu$ L de Bromuro de etidio 0.05%, 5 $\mu$ L + 3  $\mu$ L buffer de carga. 100 V. (M) Marcador de peso molecular (Fermentas 1 Kbp), (A) 65 °C, (B) 64.1 °C, (C) 63.0 °C, (D) 61.1 °C, (E) 58.7, (F) 56.9 °C y (G) 55.7 °C.

En la figura 16 se observó que la mejor temperatura de alineamiento para los primers del gen *inIA* es de 58.7 °C (carril E), debido a que esta banda es la que presenta mayor intensidad en el caso de la cepa de *L. monocytogenes* I; y para las otras dos cepas parece ser indistinto el cambio de temperatura de alineamiento, debido a que todas las bandas presentaron la misma intensidad. Por lo anterior se seleccionó como

la mejor condición de alineamiento en la PCR para este gen la temperatura de 58.7 °C.



**Figura 17.** Electroforesis para el gradiente de temperatura para el gen *inIC* para las cepas *L. monocytogenes* I, *L. monocytogenes* II y *L. monocytogenes* III. Gel de agarosa 1% + 4  $\mu$ L de Bromuro de etidio 0.05%, 5 $\mu$ L + 3  $\mu$ L buffer de carga. 100 V. (M) Marcador de peso molecular (Fermentas 1 Kbp), (A) 65 °C, (B) 64.1 °C, (C) 63.0 °C, (D) 61.1 °C, (E) 58.7, (F) 56.9 °C y (G) 55.7 °C.

La mejor temperatura de alineamiento para los primers del gen *inIC* es de 56.9 °C (figura 17; carril F) para la cepa de *L. monocytogenes* II, y de 61.1 °C (figura 17; carril

D) para la cepa de *L. monocytogenes* III, debido a que estas bandas son las que presentan mayor intensidad; en el caso de la cepa de *L. monocytogenes* I parece ser indistinto el cambio de temperatura de alineamiento, debido a que todas las bandas presentaron la misma intensidad.

Por lo anterior, se seleccionó como la mejor condición de alineamiento en la mPCR para ambos genes la temperatura de 58.7 °C, debido a que a pesar de que ésta no fue la mejor temperatura de alineamiento para el gen *inIC*, no hubo una temperatura común para las tres cepas, y sin embargo, presentó amplificación a la temperatura elegida para el gen *inIA*.

El gen *inIA* es específico para el género y especie de *L. monocytogenes* y el gen *inIC* incluye a todos los serotipos de esta especie a excepción del 4a y algunos del 4c (Liu, 2008). Se utilizaron como controles negativos las tres especies de *Listeria* distintas a la especie *monocytogenes*, (datos no mostrados), con las cuales no se observó amplificación para ninguno de los dos genes, esto indicó que los genes elegidos son específicos para *L. monocytogenes*. Así mismo ya que se obtuvo la mayor intensidad de banda al haber empleado la cepa *L. monocytogenes* I, se continuó trabajando para la implementación del PCR Múltiplex en el alimento con esta cepa.

### 9.3.3. Secuenciación de los genes *inIA* e *inIC*.

Al igual que con los productos de PCR del gen ribosomal 16S para las cepas utilizadas, previo a la secuenciación se realizó un análisis utilizando el equipo NanoDrop 2000t Spectrophotometer, para de esta forma obtener la concentración y calidad de los amplicones. En las tablas 35 y 36 se presentan los resultados de este análisis para los genes *inIA* e *inIC*, respectivamente.

**Tabla 35.** Resultados obtenidos por el análisis de NanoDrop del gen *inIA*, para las cepas *L. monocytogenes* I, *L. monocytogenes* II y *L. monocytogenes* III.

Cepa	[ DNA] (ng/μL)	Abs 260	Abs 280	260 / 280	260 / 230
<i>L. monocytogenes</i> I	53.1	1.063	0.584	1.82	1.20
<i>L. monocytogenes</i> II	49.0	0.980	0.534	1.84	1.04
<i>L. monocytogenes</i> III	46.7	0.934	0.503	1.86	1.20

**Tabla 36.** Resultados obtenidos por el análisis de NanoDrop del gen *inIC*, para las cepas *L. monocytogenes* I, *L. monocytogenes* II y *L. monocytogenes* III.

Cepa	[ DNA] (ng/μL)	Abs 260	Abs 280	260 / 280	260 / 230
<i>L. monocytogenes</i> I	27.9	0.557	0.311	1.80	0.86
<i>L. monocytogenes</i> II	29.8	0.596	0.319	1.87	0.94
<i>L. monocytogenes</i> III	33.8	0.676	0.368	1.84	0.87

En la primera columna se presenta la concentración de DNA (ng/μL) para los amplicones obtenidos de cada gen, esto aunado a la intensidad de las bandas obtenidas en el gel de agarosa, indicó ser una concentración adecuada para la secuenciación. Los valores obtenidos de la absorbancia a 260 nm indicó la concentración de DNA y la absorbancia a 280 nm la concentración de proteínas presentes, con lo cual, con la relación de 260/280 tendremos la pureza de nuestro gen. Los valores obtenidos se encontraron entre 1.7 – 1.8, donde valores alrededor de 1.8 son aceptados para considerar el DNA puro.

En cuanto a la relación 260/230 indicó la pureza del DNA con respecto a compuestos fenólicos. Al igual que con la relación de 260/280, los valores aceptados están en el rango entre 1.8-2.0, por lo cual el material genético obtenido tuvo una mayor concentración de contaminantes no proteicos.

### 9.3.4. Construcción del dendograma para los genes *inIA* e *inIC*

En las tablas 37 y 38 se enlista la identidad de las secuencias utilizadas para la elaboración de los dendogramas de los genes *inIA* e *inIC*, respectivamente; número de GENBANK, su porcentaje de identificación y su valor de expectancia (valor E). En las figuras 18 y 19 se presenta el dendograma para los genes *inIA* e *inIC*, respectivamente. La secuencia del gen *inIA* de *L. monocytogenes* I es muy similar a las secuencias mas parecidas obtenidas del sitio (NCBI) del mismo gen, debido a que el % de identidad fue del 96%, % de cobertura del 100% y el valor E reportado fue 0.0. Con respecto a la secuencia del gen *inIC* de *L. monocytogenes* I es muy similar a las secuencias mas parecidas reportadas en el sitio, debido a que el % de identidad fue del 99%, % de cobertura del 100% y el valor E reportado fue 0.0.

**Tabla 37.** Secuencias utilizadas para la elaboración del dendograma del gen *inIA*.

Número de GENBANK	% Id	Valor E	% Cobertura	Número de GENBANK	% Id	Valor E	% Cobertura
GU735670.1	96	0.0	100	JN616517.1	96	0.0	100
FM178787.1	96	0.0	100	HQ703563.1	96	0.0	100
FR750356.1	96	0.0	99	FR750358.1	96	0.0	99
EU295403.1	96	0.0	100	HQ703556.1	96	0.0	100
FJ617534.1	96	0.0	100	EU295355.1	96	0.0	100
HQ703562.1	96	0.0	100	EU295342.1	96	0.0	100
EF409978.1	96	0.0	100	DQ844348.1	96	0.0	100
FR750357.1	96	0.0	100	EU295337.1	96	0.0	100
EF445900.1	96	0.0	99	FJ617532.1	96	0.0	100
HQ703561.1	96	0.0	100	EF445903.1	96	0.0	99
HQ111541.1	96	0.0	100	AJ84775.1	96	0.0	100
GQ414004.1	96	0.0	100	EU295356.1	96	0.0	100
HQ111551.1	96	0.0	100	AJ84776.1	96	0.0	100

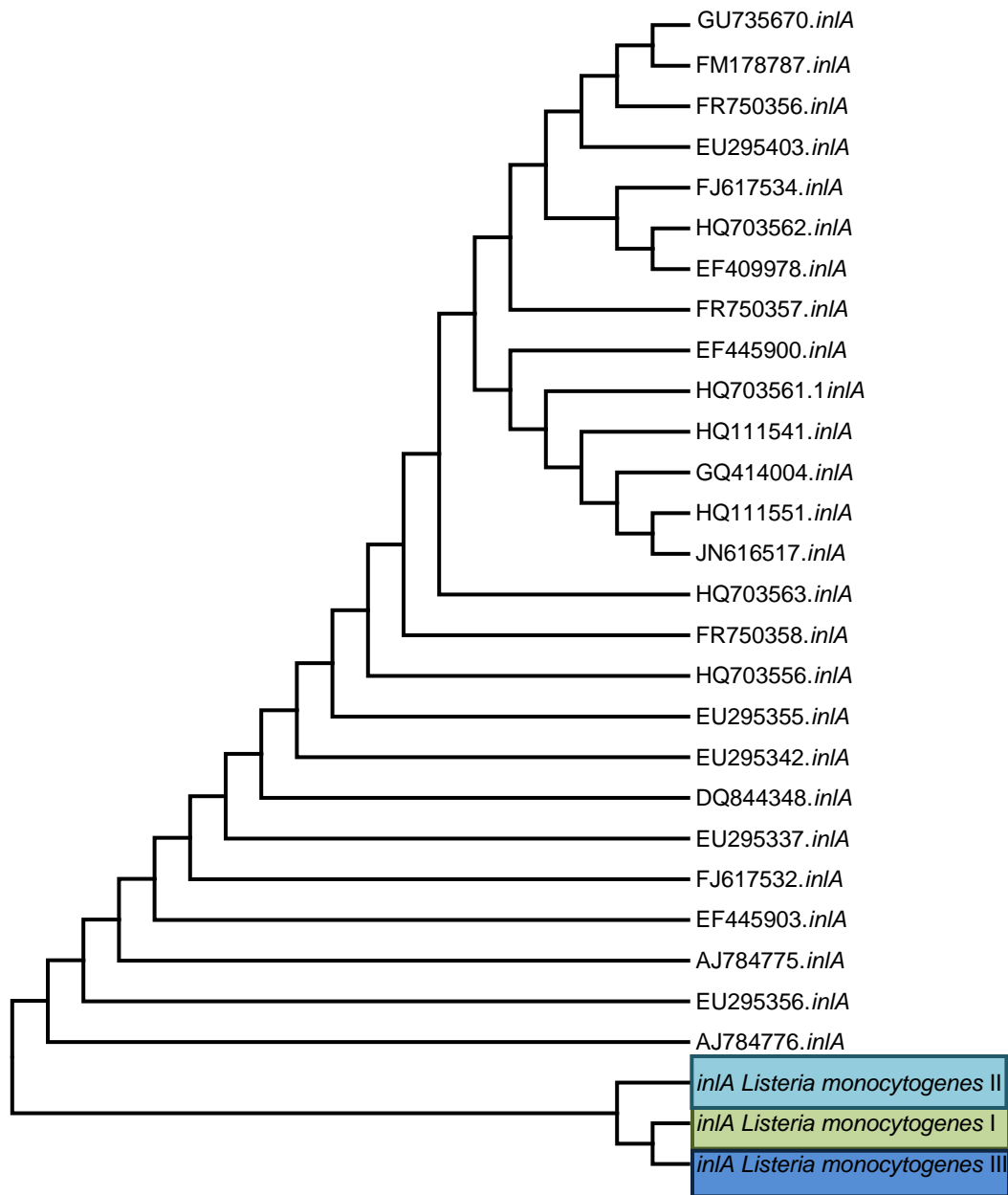
**Tabla 38.** Secuencias utilizadas para la elaboración del dendograma del gen *inIC*.

Número de GENBANK	% Id	Valor E	% Cobertura	Número de GENBANK	% Id	Valor E	% Cobertura
EU408887.1	99	0.0	100	DQ302537.1	99	0.0	100
EU408888.1	99	0.0	100	DQ302530.1	99	0.0	100
EU408896.1	99	0.0	100	EU408925.1	99	0.0	100
EU408911.1	99	0.0	100	EU408914.1	99	0.0	100
AY259761.1	99	0.0	100	EU408907.1	99	0.0	100
DQ302520.1	99	0.0	100	EU408950.1	97	0.0	100
DQ302522.1	99	0.0	100	EU408943.1	97	0.0	100
DQ302533.1	99	0.0	100	Y07640.1	97	0.0	100
DQ302536.1	99	0.0	100	X95822.1	97	0.0	100
DQ302538.1	99	0.0	100	DQ302555.1	97	0.0	100
DQ302552.1	99	0.0	100	DQ302554.1	97	0.0	100
EU408906.1	99	0.0	100	FJ024806.1	97	0.0	100
DQ302528.1	99	0.0	100	EU408903.1	97	0.0	100
DQ302540.1	99	0.0	100	EU408902.1	97	0.0	100
DQ302539.1	99	0.0	100	EU408897.1	97	0.0	100

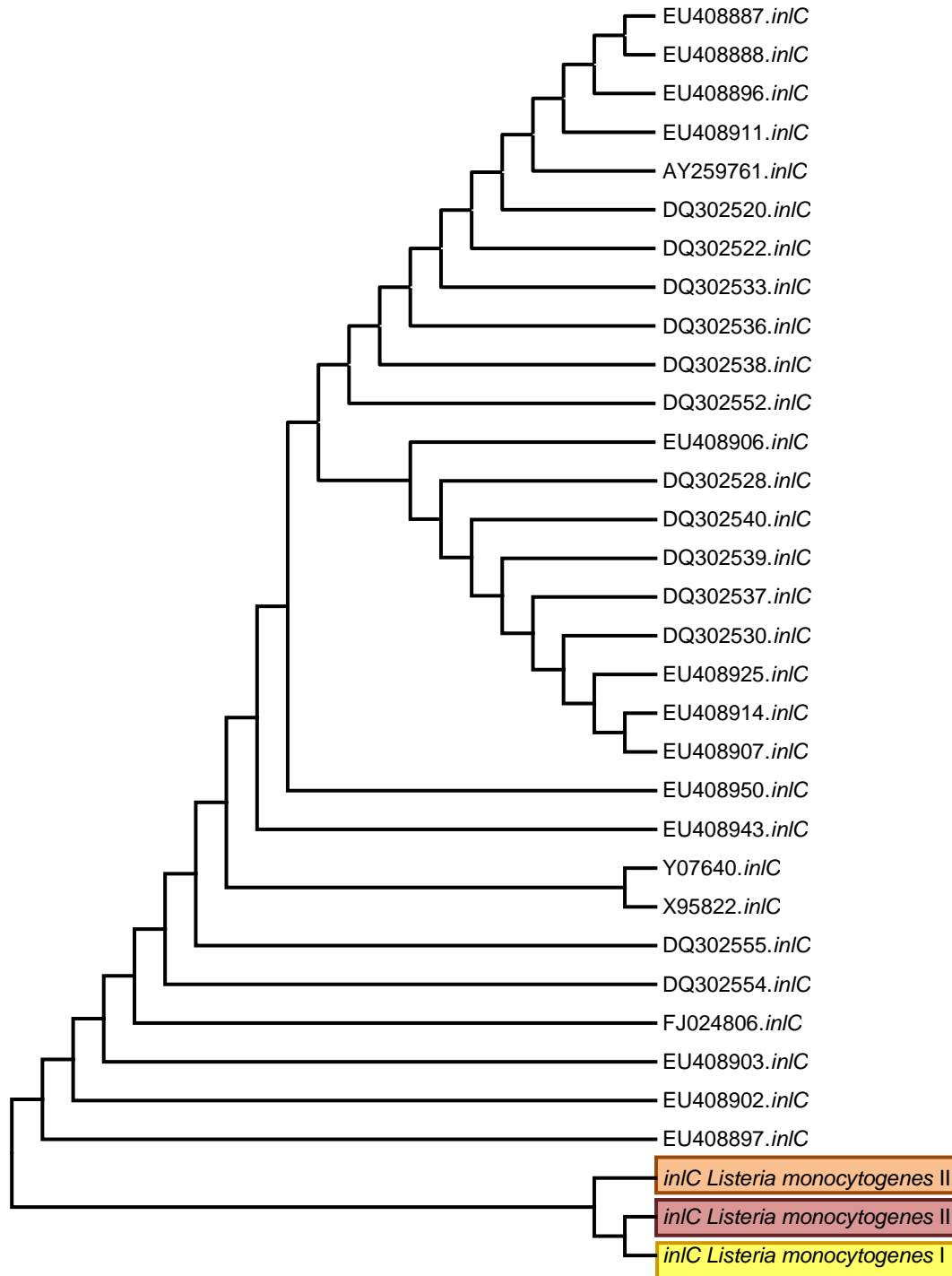
Para ambos genes los dendogramas nos indicaron que existió una mayor similitud entre las cepas *L. monocytogenes* I y III, debido a que se encuentran más cercanas, esto concuerda con lo observado con las relaciones filogenéticas obtenidas para estos microorganismos realizadas con las secuencias del gen *16S* (figura 12).

Aunque la rama del gen *inIA* para la cepa *L. monocytogenes* se ubica separada, se observó que parte del nodo más próximo, por lo que se consideró también muy parecida. Para ambos genes de las cepas de *Listeria monocytogenes* seleccionadas de la página del NCBI, se observó que se agruparon en el dendograma en otra posición, lo que indicó una mayor similitud entre todas ellas.





**Figura 18.** Dendrograma de las secuencias del gen *inIA* para las cepas de *Listeria* elaborado por el método de Neighbor-Joining, empleando el algoritmo de comparación Jukes Cantor, además de las secuencias elegidas con mayor similitud obtenidas por el BLAST del NCBI.



**Figura 19.** Dendrograma de las secuencias del gen *inC* para las cepas de *Listeria* elaborado por el método de Neighbor-Joining, empleando el algoritmo de comparación Jukes Cantor, además de las secuencias elegidas con mayor similitud obtenidas por el BLAST del NCBI.

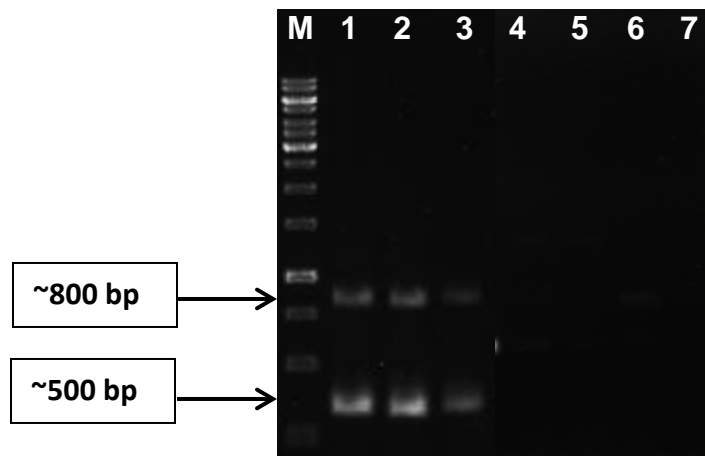
## 9.4. Identificación de *Listeria monocytogenes* en queso fresco por PCR Múltiplex

### 9.4.1. PCR Múltiplex en la cepa pura para los genes *inIA* e *inIC*

Para las tres cepas de *L. monocytogenes* utilizadas en el estudio se implementó el mPCR de ambos genes; como controles negativos se utilizó el DNA cromosomal de las cepas *Listeria innocua* I, *Listeria innocua* II y *Listeria welshimeri*. Se utilizó el DNA cromosomal extraído de cada cepa pura (inciso 9.2.2.1). La mezcla de reacción y condiciones para el mPCR se incluyeron en el inciso 8.4.5, considerando la temperatura de alineamiento de 57.8 °C la cual, de acuerdo a los resultados se consideró como la óptima para el alineamiento de los primers de ambos genes.

En la figura 21 se presenta la electroforesis en gel de agarosa después de realizar la amplificación simultánea de ambos genes para las tres cepas. Se observó que para los amplicones obtenidos con el DNA cromosomal de cada una de las cepas, la presencia de una banda de ~800 bp corresponde a la amplificación del gen *inIA* y una banda de ~500 bp corresponde al gen *inIC*.

La presencia de ambos amplicones para los dos genes en todo el material cromosomal obtenido de las cepas confirmó que corresponden al género y especie esperado. Además, se logró la característica amplificación simultánea de los dos genes durante la reacción de la mPCR. En el carril 1 se observó que las bandas más intensas corresponden a la cepa *L. monocytogenes* I, por esta razón se decidió trabajar con esta cepa en las muestras de queso.



**Figura 20.** Electroforesis para el producto de mPCR de los genes *inlA* e *inlC* de las cepas *Listeria*. Gel de agarosa 1% + 4  $\mu$ L de Bromuro de etidio 0.05%,. 5  $\mu$ L + 3  $\mu$ L de buffer de carga. 100 V. Carril (M) marcador de peso molecular, (1) *L. monocytogenes* I, (2) *L. monocytogenes* II, (3) *L. monocytogenes* III, (4) *L. innocua* I, (5) *L. innocua* II, (6) *L. seeligeri* y (7) *L. welshimeri*.

#### 9.4.2. PCR Múltiplex para los genes *inlA* e *inlC* en queso fresco.

##### 9.4.2.1. Queso fresco sin inocular

A partir de la muestra de queso fresco (inciso 8.5.1) se realizó el enriquecimiento selectivo indicado en el BAM de FDA (<http://www.fda.gov/Food/FoodScienceResearch/LaboratoryMethods/ucm114664.htm>) y se tomaron alícuotas del caldo de enriquecimiento a los tiempos 0, 4, 24 y 48 h. Con cada alícuota, se realizó una extracción de DNA cromosomal total bacteriano y un agotamiento en cuadrante radial en placa de agar OXFORD.

Después de incubar las placas de agar OXFORD a 37 °C por 24 h no se observó desarrollo de colonias típicas de *Listeria* (colonias negras con halo negro y con un diámetro de 0.5-1.5 mm, <http://www.fda.gov/Food/FoodScienceResearch/LaboratoryMethods/ucm071400.htm>),

lo cual fenotípicamente indica la ausencia de *L. monocytogenes* en la muestra de queso analizada.

A pesar de la ausencia de colonias sospechosas del género *Listeria*, se realizó con cada DNA extraído el mPCR la confirmación de la ausencia de *L. monocytogenes*, con la técnica desarrollada para la cepa pura (inciso 9.3). En la figura 25 carril 8 y 9 se presenta el mPCR para las muestras de queso sin inocular con 24 y 48 h de enriquecimiento respectivamente, no se observó amplificación de alguno de los genes. Con estos resultados se afirma la ausencia de *L. monocytogenes* en la muestra de queso fresco analizada y por lo tanto, de acuerdo a la Norma Oficial Mexicana NOM-243-SSA1-2010, esta muestra es apta para consumo humano respecto a este microorganismo patógeno.

#### 9.4.2.2. Queso fresco inoculado con *L. monocytogenes* I

La ausencia de *L. monocytogenes* en las muestras de queso sin inocular corroboraron su inocuidad, sin embargo para verificar que la técnica de mPCR para ambos genes fue funcional cuando la muestra pudiera contener al microorganismo, se trabajó con muestras de alimento inoculadas con una concentración alta de la cepa de *L. monocytogenes* I.

##### 9.4.2.2.1. Cuantificación de *L. monocytogenes* I utilizada como inóculo.

Para determinar el desarrollo de una colonia de *L. monocytogenes* I en BHI, incubando a 37 °C durante 24 h, se siguió la metodología descrita en el inciso 8.5.2.1, y se obtuvo  $22 \times 10^8$  UFC/g. Este crecimiento se consideró como el desarrollo estandarizado siguiendo la misma metodología con la cepa pura, con la cual se realizó en las muestras de queso fresco la mPCR para los dos genes.

9.4.2.2.2. Queso inoculado con una concentración de  $1 \times 10^7$  UFC/ g de *L. monocytogenes* I.

Para evaluar el desarrollo del microorganismo en el queso fresco a lo largo de la etapa de enriquecimiento (metodología indicada en el BAM, FDA), se realizó un plaqueo preliminar en agar OXFORD a partir de la muestra de queso inoculado con una concentración de  $1 \times 10^7$  UFC/ g de *L. monocytogenes* I.

Después de la incubación se observaron colonias de 0.5-1.5 mm de diámetro rodeadas de un halo negro, debido a la hidrólisis de esculina; sin embargo, éstas colonias no se lograron diferenciar del resto de la microbiota natural del alimento. Por esta razón, se decidió evaluar el desarrollo del microorganismo por extensión superficial en placa de agar BHI y realizar un ensayo simultáneo de enriquecimiento y posteriormente determinar por mPCR únicamente la cepa pura de *L. monocytogenes* I, siguiendo la metodología indicada en el inciso 8.4.5.

En la tabla 39 se muestran los resultados del desarrollo de la cepa pura inoculada en el caldo de enriquecimiento para *Listeria*. Se observó que a las 0 h la cepa tuvo una concentración de  $30 \times 10^6$  UFC/mL, a las 4 h desarrolló de  $87 \times 10^6$  UFC/mL, y a las 24 y 48 se cuantificó  $10 \times 10^8$  UFC/mL y  $14 \times 10^8$  UFC/mL, respectivamente.

**Tabla 39.** Cuantificación a las 0, 4, 24 y 48 h de *Listeria monocytogenes* I, inoculado a una concentración inicial de  $10^7$  UFC/g, en caldo de enriquecimiento para *Listeria*, incubado a 37 °C.

Tiempo	0	4	24	48
UFC / g	$30 \times 10^6$	$87 \times 10^6$	$10 \times 10^8$	$14 \times 10^8$

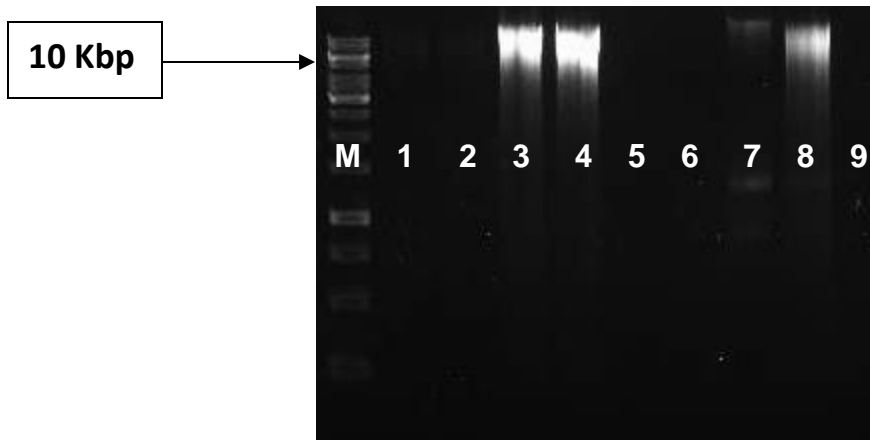
Para verificar el desarrollo de la muestra de queso fresco inoculada con *L. monocytogenes* I, se realizó inoculación por agotamiento por cuadrante radial en agar

OXFORD para cada uno de los tiempos de incubación. Para todos los tiempos plaqueados, se observó la presencia de colonias típicas de *Listeria* spp., lo cual indica la viabilidad del microorganismo durante las etapas de enriquecimiento analizadas (resultados no mostrados). Se observó que la concentración aumenta conforme pasa el tiempo de incubación, hasta llegar a las 48 h donde el orden de magnitud se mantiene igual en comparación con el de 24 h.

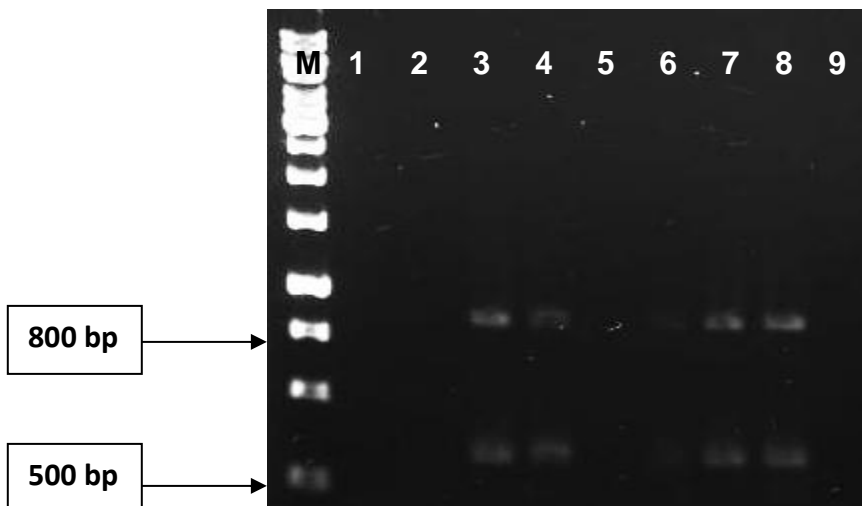
En la figura 21 se muestran los resultados de la extracción de DNA cromosomal bacteriano total de estos ensayos, al utilizar el sistema de extracción de DNA cromosomal total bacteriano a partir de alimento. En todos los casos se obtuvo una banda correspondiente al DNA cromosomal de bacterias de un tamaño equivalente ~15 kb; sin embargo la banda presenta una ligera degradación (no presenta una sola línea definida) lo cual es característico para el DNA extraído de matrices complejas como lo es el queso, debido a un proceso exhaustivo para eliminar interferencias inherentes al queso, como son las proteínas, lípidos, carbohidratos y demás componentes.

En general al transcurrir el tiempo de incubación se observó un incremento en la intensidad de la banda, lo cual se relaciona con el incremento de la concentración de DNA debido al desarrollo microbiano a los diferentes tiempos de incubación mostrados en la tabla 39.

Para las muestras inoculadas se presenta la máxima intensidad de banda a partir de las 24 h y se mantiene constante hasta las 48 h, comparándolo con el caso del DNA extraído de la cepa pura enriquecida se observó una tenue banda a las 24 h y resultó ser mas intensa a las 48 h. La diferencia en la intensidad de las bandas se debió probablemente a que la muestra de queso contenía microbiota natural. Con este material genético al realizar la amplificación por mPCR para los genes *inIA* e *inIC*, se determinó la presencia de *L. monocytogenes* I y se obtuvieron presencia de dos bandas correspondientes a los dos genes, a partir de las 24 h de incubación en el caldo de enriquecimiento. En la figura 22 se muestran los resultados de la mPCR para las muestras.



**Figura 21.** Electroforesis para el DNA cromosomal total extraído de las muestras de queso y cepa pura, inoculadas con *L. monocytogenes* I con la concentración de  $10^7$  UFC/mL. Gel de agarosa 1% + 4  $\mu$ L de Bromuro de etidio 0.05%, 5 $\mu$ L + 3  $\mu$ L buffer de carga.100 V. (M) Marcador de peso molecular (Fermentas 1 kb DNA), (1)Queso  $t^0$ , (2)Queso  $t^4$ , (3)Queso  $t^{24}$ , (4)Queso  $t^{48}$ , (5)Cepa  $t^0$ , (6)Cepa  $t^4$ , (7)Cepa  $t^{24}$ , (8)Cepa  $t^{48}$  y (9)Control de reactivos.



**Figura 22.** Electroforesis para el mPCR de las muestras de queso y cepa pura, inoculadas con *L. monocytogenes* I con una concentración de  $10^7$  UFC/mL. Gel de agarosa 1% + 4  $\mu$ L de Bromuro de etidio 0.05%, 5 $\mu$ L + 3  $\mu$ L buffer de carga.100 V. (M) Marcador de peso molecular (Fermentas 1 kb DNA), (1)Queso  $t^0$ , (2)Queso  $t^4$ , (3)Queso  $t^{24}$ , (4)Queso  $t^{48}$ , (5)Cepa  $t^0$ , (6)Cepa  $t^4$ , (7)Cepa  $t^{28}$ , (8)Cepa  $t^{48}$  y (9)Control de reactivos.



Al comparar el desarrollo del microorganismo con la amplificación de las bandas, se observó que a las 24 horas de incubación se cuantificó  $10 \times 10^8$  UFC/g de alimento. Por lo que se establece que se requiere enriquecer durante 24 h una concentración inicial de  $1 \times 10^7$  UFC/mL para que se pueda detectar a través de mPCR. Con los datos obtenidos, se logró la implementación de la técnica de mPCR para los genes *inlA* e *inlC* de *L. monocytogenes*, en la muestra de alimento.

#### 9.4.2.2.3. Queso inoculado con una concentración de 1 UFC/ 10 g de *L. monocytogenes* I.

De acuerdo a la NOM-243-SSA1, establece que las muestras de queso fresco deben estar libres de *L. monocytogenes* en 25 g de alimento; por lo que una concentración de  $10^7$  UFC/mL no es la adecuada para evaluar la presencia de una concentración mínima de la cepa; por lo que se decide disminuir la concentración inicial inoculada a 1 UFC/ 10 g de queso fresco, como un criterio preliminar para determinar la sensibilidad del método. Para evaluar el desarrollo del microorganismo, se realizó la misma metodología indicada en el inciso 8.4.2.2.2, inoculando el queso fresco con una concentración de  $1 \times 10^{-1}$  UFC/g de la cepa *L. monocytogenes* I.

Se realizó una inoculación por cuadrante radial en agar Oxford para verificar el desarrollo del microorganismo en la muestra de queso fresco inoculada con *L. monocytogenes* I con esta concentración. Después de la incubación en todas las muestras se observaron colonias de 0.5-1.5 mm de diámetro rodeadas de un halo color negro, debido a la hidrólisis de la esculina, es decir, colonias típicas del género *Listeria* en este medio. Esto indicó la viabilidad del microorganismo durante las etapas de enriquecimiento analizadas (resultados no mostrados).

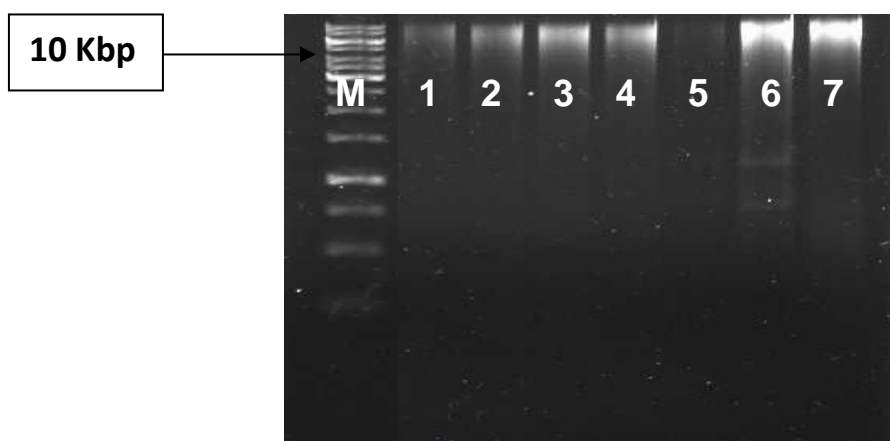
En la tabla 40 se muestran los resultados del desarrollo de la cepa pura enriquecida muestreada en paralelo al enriquecimiento que se realizó para la muestra de queso fresco inoculado con la concentración de 1 UFC/ 10 g de *L. monocytogenes* I. Se observó que a las 0 h la cepa tuvo una concentración de  $80 \times 10^1$  UFC/ g, a las 4 h de  $18 \times 10^2$  UFC/ g, y a las 24 y 48 se cuantificó  $13 \times 10^7$  UFC/ g y  $23 \times 10^7$  UFC/ g,

respectivamente. Se incrementó la concentración del microorganismo conforme pasa el tiempo de incubación, hasta llegar a las 48 h donde el orden de magnitud se mantiene comparándolo con el tiempo de 24 h.

**Tabla 40.** Cuantificación de *Listeria monocytogenes* I, partiendo de una concentración inicial de 1 UFC/ 10 g, incubado a 37 °C a las 0, 4, 24 y 48 h.

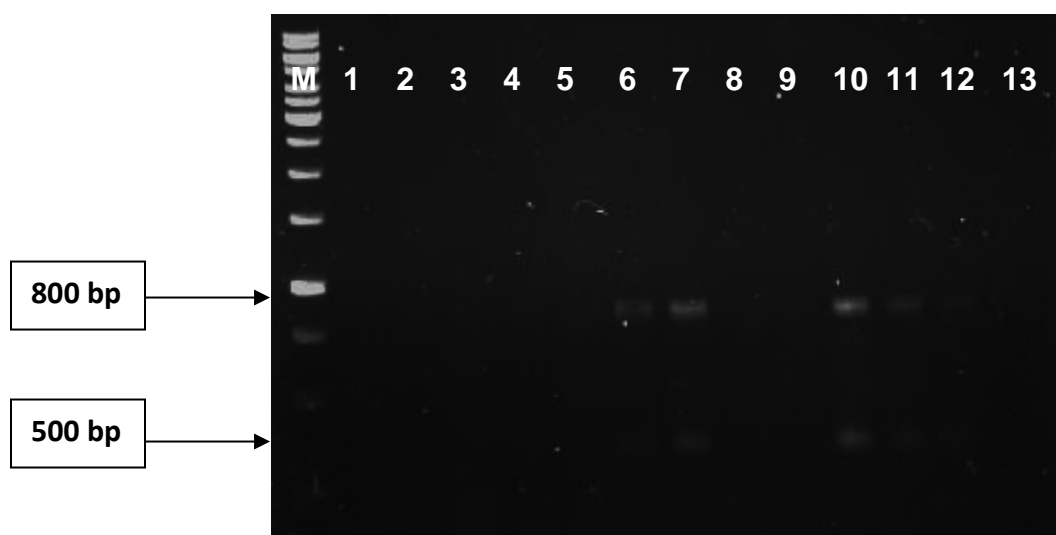
Tiempo	0	4	24	48
UFC / g	80	$18 \times 10^2$	$13 \times 10^7$	$23 \times 10^7$

En la figura 24 se muestran los resultados de la extracción de DNA cromosomal bacteriano total para estos ensayos. En todos los casos se obtuvo una banda correspondiente al DNA cromosomal de bacterias de un tamaño superior a 10 Kbp; sin embargo la banda presenta una ligera degradación, lo que es característico para el DNA extraído de matrices complejas como lo es el queso fresco. Se presentó un incremento en la intensidad de las bandas, lo que se relacionó con el incremento de la concentración del DNA originado por el desarrollo microbiano al transcurrir la incubación a los diferentes tiempos de incubación que se ven en la tabla 40.



**Figura 23.** Electroforesis de los ensayos de queso y cepa pura, inoculadas con *L. monocytogenes* I a la concentración de 1 UFC/10 g. Gel de agarosa 1% + 4  $\mu$ L de Bromuro de etidio 0.05%, 5 $\mu$ L + 3  $\mu$ L buffer de carga. 100 V. (M) Marcador de peso molecular (Fermentas 1 kb DNA), (1)Queso t<sup>0</sup>, (2)Queso t<sup>4</sup>, (3)Queso t<sup>24</sup>, (4)Queso t<sup>48</sup>, (5)Cepa t<sup>4</sup>, (6)Cepa t<sup>24</sup> y (7)Cepa t<sup>48</sup>.

Al realizar la amplificación por mPCR para los genes *inlA* e *inlC*, se determinó la presencia de *L. monocytogenes* I, las bandas correspondientes a ambos genes se presentaron a partir de las 24 h de incubación en el caldo de enriquecimiento. En la figura 24 se muestran los resultados de la mPCR para los ensayos. Al comparar el desarrollo del microorganismo con la amplificación de las bandas, se observó que a las 24 horas de incubación se cuantificaron  $13 \times 10^7$  UFC/g de alimento. Por lo que se requiere partir de una concentración inicial de 1 UFC/10 g y enriquecer durante 24 h para que pueda ser detectada por mPCR.



**Figura 24.** Electroforesis del mPCR de las muestras de queso y cepa pura, inoculadas con *L. monocytogenes* I a la concentración de 1 UFC/10 g. Gel de agarosa 1% + 4  $\mu$ L de Bromuro de etidio 0.05%, 5 $\mu$ L + 3  $\mu$ L buffer de carga. 100 V. (M) Marcador de peso molecular (Fermentas 1 kb DNA), (1)Queso  $t^0$ , (2)Queso  $t^4$ , (3)Queso  $t^{24}$ , (4)Queso  $t^{48}$ , (5)Cepa  $t^4$ , (6)Cepa  $t^{24}$ , (7)Cepa  $t^{48}$ , (8)Queso sin inocular  $t^{48}$  y (9)Queso sin inocular  $t^{24}$ .

Al identificarse a *Listeria monocytogenes* como un patógeno que presenta un alto porcentaje de mortalidad al ser comparado con otros patógenos transmitidos por alimentos, se ha buscado optimizar los métodos de identificación de *Listeria*, buscando que sean más rápidos y específicos para así poder asegurar la inocuidad

de los alimentos. Debido a este creciente interés se ha utilizado la técnica de PCR Múltiple para la identificación de varios patógenos en una misma reacción (Germini *et al.*, 2008; Mukhopadhyay y Mukhopadhyay, 2006; Chiang *et al.*, 2012) o para la identificación de las especies y serotipos patógenos de *Listeria* (Chen y Knabel, 2007; Kérouanton *et al.*, 2009).

Se han identificado diferentes genes que son específicos de especie (*hly*, *actA*, *inIA*, *inIB*, entre otros), y otros genes que son utilizados para identificar a los serotipos que se han detectado como patógenos (*inIJ*, *inIC*, *flaA*, entre otros). Liu *et al.*, (2007), realizaron la determinación de *Listeria monocytogenes* en diferentes muestras ambientales, sangre y alimentos por PCR Múltiple amplificando los genes *inIA*, *inIB*, *inIC* e *inIJ*, se utilizó a los genes *inIA* e *inIB* para la identificación especie-específica y los genes *inIC* e *inIJ* para la determinación de la patogenicidad de las cepas de *Listeria monocytogenes* utilizadas. Se utilizaron métodos de aislamiento tradicionales y fue a partir de colonias aisladas que se realizó la identificación de los genes anteriores.

En este trabajo se utilizaron los genes *inIA* e *inIC* utilizados por Liu *et al.*, (2007) probando identificarlos a partir de un alimento, como fue el queso fresco, obteniendo resultados positivos a partir de las 24 h de incubación en caldo de enriquecimiento para las dos concentraciones probadas.

## 10. Conclusiones

- Se logró la correcta conservación de las cepas a corto, mediano y largo plazo.
- Se identificaron las cepas utilizadas mediante pruebas bioquímicas tradicionales, y confirmando con el sistema API LISTERIA y sistema de identificación VITEK.
- Mediante la amplificación y secuenciación del gen *16S* se identificaron a las cepas probadas y se obtuvieron los árboles filogenéticos.
- Mediante la amplificación y secuenciación de los genes *inIA* e *inIC* se logró identificar las cepas, siendo el gen *inIA* específico de *Listeria monocytogenes* y el gen *inIC* específico de todos los serotipos de *Listeria monocytogenes*, excepto el 4a y algunos 4c.
- Se logró implementó la optimización del PCR Múltiplex para las tres cepas de *L. monocytogenes*, para los genes *inIA* e *inIC*.
- Se identificó a *Listeria monocytogenes* por mPCR en muestras de queso fresco inoculado. Fue posible la amplificación de ambos genes después de 24 h de enriquecimiento específico con una concentración inicial estimada del microorganismo de 1 UFC/ 10 g.
- Se demuestra la ausencia de *Listeria monocytogenes* en 25 g de queso fresco adquirido comercialmente, por el método de mPCR que detecto los genes *inIA* e *inIC*, por lo cual se consideró apta para consumo humano respecto a este microorganismo.

## 11. Perspectivas

El gen *inlA* es específico para la especie de *L. monocytogenes*, y el gen *inlC* no se encuentra presente en los serotipos 4a y 4c, por lo cual se sugiere llevar a cabo la identificación utilizando genes específicos para los serotipos patógenos asociados a las infecciones de listeriosis en humanos más comunes de *Listeria monocytogenes* (4b, 1/2a, 1/2b y 1/2c).

Realizar la serotipificación de *L. monocytogenes*, con el objetivo de identificar a los serotipos que se encuentran asociados a las infecciones de listeriosis en humanos.

Realizar la identificación de *L. monocytogenes* por mPCR, inoculando una concentración menor de la utilizada en este trabajo, para obtener un nivel de detección de 1 UFC/ 25 g de alimento.

Realizar el mPCR con genes relacionados al género *Listeria* con el objetivo de inferir posibles condiciones en el alimento que ocasionen la posible contaminación con *Listeria monocytogenes*.

Realizar el PCR Múltiplex con diferentes muestras de queso.

## 12. Bibliografía

Alcázar, C., Rubio, M., 2006. Detection of *Salmonella* spp. and *Listeria monocytogenes* in fresh and semi-cured cheeses that are sold on the street markets in Mexico City. *Vet. Méx.*, 37, pp. 417-429.

Almeida, P.F., Almeida, R.C.C., 2000. A PCR protocol using *inl* gene as a target for specific detection of *Listeria monocytogenes*. *Food control*, 11, pp. 97-101.

Amagliani, G., Bandi, G., Omiccioli, E., Casiere, A., Bruce, I., Magnani, M., 2004. Direct detection of *Listeria monocytogenes* from milk by magnetic based DNA isolation and PCR. *Food Microbiology*, 21, pp. 597-603.

Biological Sequence Alignment Editor. BioEdit. <http://www.mbio.ncsu.edu/bioedit/html>.

Bierne, H., Sabet, C., Personnic, N., Cossart, P., 2007. Internalins: a complex family of leucine-rich repeat-containing proteins in *Listeria monocytogenes*. *Microbes and Infection*, 9, pp. 1156-1166.

Cabanéto, P., 2013. Identificación de microorganismos Gram-negativos mediante una aproximación polifásica. Tesis de Licenciatura. Facultad de Química, UNAM.

Cagri-Mehmetoglu, A., Yaldirak, G., Bodur, T., Simsek, M., Bozkir, H., Eren, N., 2011. Incidence of *Listeria monocytogenes* and *Escherichia coli* O157:H7 in two Kasar Cheese processing environments. *Food Control*, 22, pp. 762-766.

Carminati, D., Perone, A., Giraffa, G., Neviani, E., Mucchetti, G., 2004. Characterization of *Listeria monocytogenes* strains isolated from Gorgonzola cheese rinds. *Food Microbiology*, 21, pp. 801-807.

Cervantes, A., 2010. Identificación de cepas de bacterias lácticas por criterios fenotípicos y análisis de secuencias del gen ADN ribosomal 16S. Tesis de Licenciatura, Facultad de Química, UNAM.

Chiang, Y., Tsen, H., Chen, H., Chang, Y., Lin, C., Chen, C., Pai, W., 2012. Multiplex PCR and a chromogenic DNA microarray for the detection of *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*, *Enterobacter sakazakii*, *Escherichia coli* O157:H7, *Vibrio parahaemolyticus*, *Salmonella* spp. and *Pseudomonas fluorescens* in milk and meat samples, *Journal of Microbiological Methods*, 88, pp. 110-116.

Chen, Y. and Knabel, S., 2007. Multiplex PCR for the simultaneous detection of bacteria of the genus *Listeria*, *Listeria monocytogenes*, and major serotypes and epidemic clones of *Listeria monocytogenes*. Applied and Environmental Microbiology, Vol. 73, No. 19, pp. 6299-6304.

Churchill, R., Lee, H., Hall, C., 2005. Detection of *Listeria monocytogenes* and the toxin listeriolysin O in food. Journal of Microbiological Methods, 64, pp. 141-170.

Cocolin, L., Rantsiou, K., Iacumin, L., Cantoni, C., Comi, G., 2002. Direct identification in food samples of *Listeria* spp. and *Listeria monocytogenes* by molecular methods. Applied and Environmental Microbiology, Vol. 68, No. 12, pp. 6273-6282.

Conca, R., 2008. Aislamiento e identificación de cepas de bacterias lácticas productoras de nuevos polisacáridos extracelulares del pulque. Tesis de Licenciatura, Facultad de Química, UNAM.

Díaz, G., Wachter, C., 2003. Métodos para el estudio de comunidades microbianas en alimentos fermentados. Revista latinoamericana de microbiología, 45, pp. 1-2:30-40.

Entis, P., 2001. Rapid Methods for detection, Identification, and Enumeration. En: Downes, F.P. e Ito, K. Ed Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods, American Public Health Association, 4a edición.

Escalante, A., Giles-Gómez, M., Hernández, G., Córdova, M., López-Munguía, A., Gosset, G., Bolívar, F., 2008. Characterization of bacterial diversity in pulque, a traditional Mexican alcoholic fermented beverage, as determined by 16S rDNA analysis. FEMS Microbiology Reviews, 235, pp. 273-279.

Escalante, A., Wachter, C., Farrés, A., 2001. Determination of lactic acid bacteria diversity present in pozol, a Mexican traditional fermented dough determined by 16S rDNA sequence analysis. International Journal of Food Microbiology, 64, pp. 21-31.

Fermentas, <http://www.thermoscientificbio.com>

Food and Drug Administration. U.S. Department of Health and Human Services. 2012. Microbiological Methods and Bacteriological Analytical Manual (BAM).

Disponible en:

<http://www.fda.gov/Food/FoodScienceResearch/LaboratoryMethods/ucm2006949.htm>



Gambarin, P., Magrabosco, C., Losio, M., Pavoni, E., Gattuso, A., Acageli, G., Favretti, M., 2012. *Listeria monocytogenes* in Ready-to-Eat Seafood and potential hazards for the consumers. *International Journal of Microbiology*, 2012, pp. 1-10.

Gasanov, U., Hughes, D., Hansbro, P., 2005. Methods for the isolation and Identification of *Listeria* spp. and *Listeria monocytogenes*: a review. *FEMS Microbiology Reviews*, 29, pp. 851-875.

Germini, A., Mascla, A., Carnevali, P., Marchelli, R., 2008. Simultaneous detection of *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella* spp. and *Listeria monocytogenes* by multiplex PCR, *Food Control*, 20, pp. 733-738.

Gorski, L., 2008. Phenotypic Identification. En: D, Liu, D., (Ed.) *Handbook of Listeria monocytogenes*. USA: Taylor and Francis Group, LLC. pp 139-168.

Gründler, T., Quednau, N., Quednaw, N., Stump, C., Orian-Rousseau, V., Ishikawa, H., Wolburg, H., Schrotten, H., Tenenbaum, T., Schwek, C., 2012. The surface proteins InIA and InIB are interdependently required for polar basolateral invasion by *Listeria monocytogenes* in a human model of the blood-cerebrospinal fluid barrier, 15, pp. 291-301.

Instituto Nacional de Salud, 2011. Evaluación de riesgos de *Listeria monocytogenes* en queso fresco en Colombia, Bogotá, pp. 10,15.

Kérouanton, A., Marault, M., Petit, L., Grout, J., Dao, T., Brisabois, A., 2010. Evaluation of a multiplex PCR assay as an alternative method for *Listeria monocytogenes* serotyping. *Journal of Microbiology Methods*, 80, pp. 134-137.

Koichiro Tamura, Daniel Peterson, Nicholas Peterson, Glen Stecher, Masatoshi Nei, and Sudhir Kumar (2011) MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Method. *Molecular Biology and Evolution* 28: 2731-2739.

Kuhn, M., Scotti, M., Vázquez-Boland, J., 2008. Pathogenesis. En: Liu, D., (Ed.) *Handbook of Listeria monocytogenes*. USA: Taylor and Francis Group, LLC. Pp 97-138.

Liu, D., 2008. Epidemiology. En: Liu, D., (Ed.) *Handbook of Listeria monocytogenes*. USA: Taylor and Francis Group, LLC. pp. 27-60.

Liu, D., Lawrence, M., Ainsworth, A., Austin, F., 2007. A multiplex PCR for species- and virulence- specific determination of *Listeria monocytogenes*. Journal of Microbiological Methods, 71, pp. 133-140.

Liu, D., Lawrence, M., Ainsworth, A., Austin, F., 2008. Genotypic Identification. En: D, Liu (Ed.) Handbook of *Listeria monocytogenes*. USA: Taylor and Francis Group, LLC. pp. 169-202.

Löffert, D., Karger, S., Twieling, G., Ulber, V., Kang, J., 1999. Optimization of multiplex PCR. QIAGEN, Issue No. 2, pp. 5-8.

Lovett, J., Wesley, I., Vandermaaten, M., Bradshau, J., Francis, D., Crawford, R., Donnelly, C.W., Messor, J., 1990. High-Temperature Short-time pasteurization inactivates *Listeria monocytogenes*. Journal of Food protection, V. 53, No. 9, pp. 734-738.

MacFaddin, J.F., 2000. Biochemical Tests for Identification of Medical Bacteria, Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, USA.

Madigan, M., Martinko, J., Parker., 2004. Brock. Biología de los Microorganismos. Madrid, Pearson Educación, S.A., 10 edición, pp 303-619.

Mead, P.S., Slutsker, L., Dietz, V., McCraig, L.F., Bresee, J.S., Shapiro, C., P.M. y Tauxe, R.V., 1999. Food-related illness and death in the United States. *Emerging Infections Diseases*, 5, pp. 607-625.

Meyer-Broseta, S., Diot, A., Bastian, J., Rivieré, J., Cerf, O., 2003. Estimation of low bacterial concentration: *Listeria monocytogenes* in raw milk. International Journal of Food Microbiology, 80, pp. 1-15.

Mukhopadhyay, A. and Mukhopadhyay, U., 2006. Novel multiplex PCR approaches for the simultaneous detection of human pathogens: *Escherichia coli* O157:H7 and *Listeria monocytogenes*, Journal of Microbiological Methods, 68, pp. 193-200.

National Center of Biotechnology Information, NCBI

<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>

<http://ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>

<http://ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>

Norma Oficial Mexicana NOM-143-SSA1-1995, Bienes y servicios. Método de prueba microbiológico para alimentos. Determinación de *Listeria monocytogenes*.

Olivares, R., 2009. *Listeria monocytogenes*: and old bacteria, an ongoing challenge, Hospital Clínico Universidad de Chile. Santiago, Chile, Medware, 9, pp.6.

Organización de las Naciones para la Agricultura y la Alimentación, OMS/FAO, 2004. Serie de Evaluación de Riesgos Microbiológicos. Evaluación de riesgos de *Listeria monocytogenes* en alimentos listos para el consumo, Resumen interpretativo., Roma.

Rubio, M., Martínez, J., Hernández, R., Bonilla, C., Méndez, R., Núñez, J., Echeverry, A., Brashears, M., 2013. Detection of *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* and *Yersinia enterocolitica* in beef at points of sale in Mexico. Rev. Mex. Ciencias Pecuarias, 4, pp. 107-115.

Robinson, R., Batt, C., Patel, P. 2000. Encyclopedia of Food Microbiology. Academic California, Press. Vol 2, pp. 176.

Rocourt, J., 1996. Risk factors for listeriosis. Food Control, 7: 192–202.

Rodríguez-Lázaro, D., Hernández, M., Pla, M., 2004. Simultaneous quantitative detection of *Listeria* spp. and *Listeria monocytogenes*, using a duplex real-time PCR-based assay, Microbiology letters, 233, pp. 257-267.

Schuchat, A., Swaminathan, B., Broome, C., 1999. Epidemiology of human listeriosis. Clinic Microbiology Rev., Vol. 4, No. 2, pp. 169-183.

Sistema de Identificación de *Listeria*, API LISTERIA.

Tovar, G., Castillo, I., Quiñónez, E., Rodas, O., Vázquez, C., 2005., *Listeria*. Una aproximación práctica al microorganismo, Revista Digital universitaria, México, Vol. 6, No. 4, pp. 1067-6079.

Wagner, M. and McLauchin, J., 2008. Biology. En:Liu, D., (Ed.) Handbook of *Listeria monocytogenes*. USA: Taylor and Francis Group, LLC. pp. 3-26.

Weisburg, W., Barns, S., Pelletier, D., Lane, D., 1991. 16S Ribosomal DNA Amplification for phylogenetic study, Journal of Bacteriology, Vol. 173, No. 2, pp. 697-703.

## Anexo 1

### Sistema de identificación de *Listeria*: API Listeria

La galería API Listeria es un sistema estandarizado para la identificación de *Listeria* que utiliza ensayos miniaturizados, así como una base de datos específica. Esta galería consta de 10 microtubos que contienen substratos deshidratados, y permiten la realización de ensayos enzimáticos o de fermentación de azúcares.

Las reacciones que se producen durante la incubación se traducen en cambios de color, espontáneos o bien provocados mediante la adición de reactivos. La lectura de estas reacciones se realiza con la ayuda de la tabla de identificación (tabla 22), y la interpretación se realiza con la ayuda de un software de identificación.

### Procedimiento

#### 1. Selección de las colonias

- Verificar que la cepa a estudiar pertenece al género *Listeria* (bacilos cortos, Gram-positivos, polimorfos, móviles a 25 °C pero no a 37 °C, catalasa positivos y oxidasa negativos).

#### 2. Preparación de la galería

- Reunir fondo y tapa de una cámara de incubación y repartir aproximadamente 3 mL de agua destilada o desmineralizada (o cualquier agua sin aditivos ni derivados susceptibles a liberar gases) en los alvéolos del fondo para crear una atmósfera húmeda.
- Escribir la referencia de las muestras o cepas en la lengüeta lateral de la cámara.
- Sacar una galería de su envase individual.
- Colocar la galería en la cámara de incubación.
- Tirar la bolsita antihumedad.

### 3. Preparación del inóculo

- Abrir una ampolla de API Suspension Medium (2 mL).
- Con la ayuda de una pipeta, inocular colonias bien aisladas. Se recomienda utilizar cultivos jóvenes (18-24 h).
- Realizar una suspensión de turbidez igual a 1 de McFarland. Esta suspensión debe ser utilizada de inmediato.
- Observar el tipo de hemólisis y anotarlo en la hoja de resultados, ya que esta característica constituye un ensayo adicional.

### 4. Inoculación de la galería

- Repartir la suspensión bacteriana precedente en los tubos, evitando la formación de burbujas (para ello, inclinar la cámara de incubación hacia delante y colocar la pipeta en un lado de la cúpula):
  - Llenar el tubo y la cúpula del ensayo DIM (100 µL aprox.), cuidando que no se produzca un menisco convexo.
  - Llenar solamente la parte del tubo de los ensayos ESC a TAG (50 µL aprox.)

NOTA: la calidad del llenado es muy importante: los tubos excesiva o insuficientemente llenos originan resultados falsos positivos o negativos.

- Cerrar la cámara de incubación.
- Incubar de 18-24 h a 36 °C ±2 °C en atmósfera aerobia.

### 5. Lectura de la galería

- Agregar una gota de reactivo ZYM B al ensayo DIM.
- Pasados 3 minutos leer todas las reacciones haciendo referencia a la tabla de identificación (tabla 41).
- Anotar las reacciones de +/- en la hoja de resultados.

### 6. Interpretación

La identificación se obtiene a partir del perfil numérico:

- Determinación del perfil numérico: en la hoja de resultados (figura 27), los tests están separados en grupos de 3 y se asigna para cada uno un valor 1, 2 ó 4. Sumando en el inferior de cada grupo los números que corresponden a reacciones positivas, se obtienen 4 cifras que constituye el perfil numérico.

**Tabla 41.** Guía de interpretación de la galería API Listeria® (Biomèrieux).

Prueba	Componentes activos	Reacciones	Resultados	
			Negativo	Positivo
<b>DIM</b>	Sustrato enzimático	Diferenciación <i>L. innocua</i> / <i>L. monocytogenes</i>	ZYM B / < 3 min	
			Naranja pálido. Rosa beige. Gris beige	Naranja
<b>ESC</b>	Esculina citrato férrico	Hidrólisis (ESculina)	Amarillo pálido	Negro
<b>αMAN</b>	4-nitrofenil-αD-manopiranosida	α-MANosidasa	Incoloro	Amarillo
<b>DARL</b>	D-Arabinol	Acidificación (D-ARabitol)	Rojo / Rojo anaranjado	Amarillo / Amarillo anaranjado
<b>XYL</b>	D-Xilosa	Acidificación (XYLosa)		
<b>RHA</b>	L-Ramnosa	Acidificación (RHAmnosa)		
<b>MDG</b>	Metil-αD-glucopiranosido	Acidificación (Metil-αD-Glucopiranosido)		
<b>RIB</b>	D-Ribosa	Acidificación (RIBosa)		
<b>G1P</b>	Glucosa-1-Fosfato	Acidificación (Glucosa-1-Fosfato)		
<b>TAG</b>	D-Tagatosa	Acidificación (TAGatosa)		

Sistema de identificación de *Listeria*, api® Listeria.

**api® Listeria** CE 12131 A

REF : \_\_\_\_\_ / \_\_\_\_\_ / \_\_\_\_\_

Origine / Source / Herkunft /  
 Origen / Origen / Προέλευση /  
 Ursprung / Oprindelse / Pochodzenie :

**BIOMÉRIEUX**

1	2	4	1	2	4	1	2	4	1	
DIM	ESC	α MAN	DARL	XYL	RHA	MDG	RIB	G1P	TAG	β HEM

Autres tests / Other tests / Andere Tests /  
 Otras pruebas / Altri test / Outros testes /  
 Άλλες εξετάσεις / Andra tester /  
 Andre tests / Inne testy :

Ident. / Ταυτοποίηση :

Imprimé en France / Printed in France

**Figura 25.** Hoja de resultados para la determinación del perfil numérico en la identificación de *Listeria*.

## Anexo 2

### Obtención de DNA genómico por el método de *kit* comercial.

Se realizó la extracción del DNA cromosomal de cada una de las cepas, utilizando el sistema comercial de extracción cromosomal Ultra Clean™ Microbial DNA Isolation Kit, MoBio®. A continuación se describe la metodología proporcionada por el proveedor. Todos los materiales y reactivos están incluidos en el kit.

1. En un microtubo de centrifuga de 2 mL poner 1.8 mL del cultivo en estudio y centrifugar a 10 000 x g por 30 segundos, a temperatura ambiente y remover el sobrenadante con una punta de micropipeta.
2. Resuspender el pellet celular en 300 µL de la solución “MicroBead solution” y mezclar mediante vórtex ligero. Transferir las células resuspendidas a un microtubo de centrifuga.
3. Adicionar 50 µL de la solución “MD1” al microtubo de centrifuga. Esta solución contiene SDS y otras sustancias para la lisis.
4. Asegurar los tubos en una base de vórtex adecuada y mezclar a máxima velocidad por 10 min.
5. Centrifugar los tubos a 10 000 x g por 1 min a temperatura ambiente.
6. Transferir el sobrenadante a un microtubo de centrifugación de 2 mL.
7. Adicionar 100 µL de la solución MD2 al sobrenadante y dar vórtex por 5 segundos. Incubar a 4 °C por 5 minutos.
8. Centrifugar los microtubos a temperatura ambiente por 1 minuto a 10 000 x g.



9. Transferir el volumen completo del sobrenadante a un microtubo de centrifuga limpio, cuidando de no contaminar con el pellet.
10. Agregar 900  $\mu\text{L}$  de la solución MD3 al sobrenadante y mezclar en vórtex por 5 segundos.
11. Cargar aproximadamente 700  $\mu\text{L}$  en el filtro "Spin Filter" y centrifugar a 10 000 x g por 30 segundos a temperatura ambiente; descartar el sobrenadante.
12. Repetir la operación 2 ó 3 veces para cada muestra, descartando el sobrenadante.
13. Adicionar 300  $\mu\text{L}$  de la solución MD4 y centrifugar a 10 000 x g por 30 segundos, a temperatura ambiente. Se desecha el líquido.
14. Centrifugar 10 000 x g por 1 min, a temperatura ambiente.
15. Colocar el filtro en un nuevo microtubo de centrifuga.
16. Agregar 50  $\mu\text{L}$  de la solución MD5 al centro de la membrana del filtro, y centrifugar por 30 segundos a 10 000 x g, a temperatura ambiente.
17. Desechar el filtro. El DNA está listo para usarse. Se recomienda almacenar a -20 °C.

## Anexo 3

### Purificación del producto de PCR

Para eliminar residuos de la reacción de amplificación se empleó el kit de purificación (PureLink™ PCR Purification Kit, Invitrogen®). A continuación se describe la metodología proporcionada por el proveedor. Todos los materiales y reactivos están incluidos en el kit.

El procedimiento de purificación está diseñado para purificar más de 40 µg de DNA, en un tiempo total de 10-12 minutos, usando una microcentrífuga capaz de centrifugar > 10 000 x g.

1. Adicionar 4 volúmenes de la solución PureLink™ Binding Buffer con isopropanol, a 1 volumen del producto de PCR (50-100 µL). Mezclar bien.
2. Adicionar la mezcla anterior a un microtubo con el PureLink™ Spin Column.
3. Centrifugar a 10 000 x g durante 1 minuto. El DNA permanece unido a la columna. Descartar el sobrenadante.
4. Lavar la columna con 650 µL de la solución Wash Buffer con etanol.
5. Centrifugar a 10 000 x g durante 1 minuto. Descartar el sobrenadante.
6. Centrifugar a máxima velocidad durante 2-3 minutos, para remover cualquier residuo del buffer de lavado.
7. Colocar la columna de separación en un microtubo de 1.7 mL limpio.

8. Eluir el DNA con 50  $\mu$ L de la solución Elution Buffer (adicionar el buffer en el centro de la columna).
9. Incubar la columna a temperatura ambiente por 1 minuto.
10. Centrifugar a máxima velocidad por 2 minutos.
11. El sobrenadante contiene el producto de PCR purificado. Desechar la columna de separación. Almacenar a -20 °C.

## Anexo 4

### **Obtención de DNA genómico proveniente de microorganismos aislados de alimentos por el método de *kit* comercial.**

Se realizó la extracción del DNA cromosomal de cada una de las muestras de queso fresco a diferentes tiempos de incubación, utilizando el sistema comercial de extracción cromosomal PowerFood™ Microbial DNA Isolation Kit, MoBio®. A continuación se describe la metodología proporcionada por el proveedor. Todos los materiales y reactivos están incluidos en el kit.

NOTA: la solución PF1 se debe calentar a 55 °C durante 5-10 min antes de ser utilizada. Verificar que la solución PF3 no tengan ningún precipitado, y de ser necesario calentarla a 55 °C por 5-10 min.

1. Homogeneizar la muestra de alimento. Incubar siguiendo las instrucciones de la FDA (Bacteriological Analytical Manual, 8° Ed. revisión A- 1998).
2. Añadir 1.8 ml del cultivo del alimento a un microtubo de centrifuga de 2 mL y centrifugar a 13,000 x g durante 1 min a temperatura ambiente. Decantar el sobrenadante y centrifugar los tubos a 13,000 x g durante 1 min adicional. Eliminar completamente el sobrenadante restante con una punta de pipeta.
3. Resuspender el sedimento celular en 450 µL de la solución PF1.  
NOTA: la solución PF1 debe ser calentada para disolver precipitados antes del uso. La solución PF1 debe ser usada mientras este caliente.
4. Transferir las células resuspendidas al "MicroBead Tube".
5. Asegurar el MicroBead Tube horizontalmente a un vórtex.
6. Mezclar en vórtex a máxima velocidad por 10 mins.

7. Centrifugar los tubos a 13,000 x g 1 min a temperatura ambiente.
8. Transferir el sobrenadante a un microtubo de centrifuga de 2 mL limpio.  
NOTA: se esperan aproximadamente 400  $\mu$ L de sobrenadante.
9. Añadir 100  $\mu$ L de solución PF2 y mezclar brevemente en vórtex. Incubar a 4° C por 5 min.
10. Centrifugar los tubos a 13,000 x g por 1 min a temperatura ambiente.
11. Evitando tomar parte del pellet, transferir todo el volumen del sobrenadante a un microtubo de centrifuga de 2 mL limpio.  
NOTA: Se esperan aproximadamente 450  $\mu$ L de sobrenadante.
12. Añadir 900  $\mu$ L de la solución PF3 y agitar en vórtex.
13. Colocar 650  $\mu$ L del sobrenadante en un Spin Filter y centrifugar a 13,000 x g por 1 min. Desechar el sobrenadante y repetir hasta que todo el sobrenadante ha sido cargado en el Spin Filter.
14. Colocar el Spin Filter, sin el microtubo en un nuevo microtubo de centrifuga de 2 mL.
15. Agitar la solución PF4 antes de su uso. Añadir 650  $\mu$ L de esta solución y centrifugue a 13,000 x g durante 1 min a temperatura ambiente.
16. Desechar el sobrenadante y añadir 650  $\mu$ L de la solución PF5 y centrifugue a 13,000 x g por 1 min, a temperatura ambiente.
17. Desechar el sobrenadante y centrifugar de nuevo a 13,000 x g por 2 min para eliminar la solución de lavado residual.
18. Colocar el Spin Filter en un nuevo microtubo de centrifuga de 2 mL.

19. Añadir 100  $\mu$ L de la solución PF6 en el centro del Spin Filter.
20. Centrifugar a 13,000 x g por 1 min.
21. Desechar el Spin Filter. El DNA está listo para cualquier usarse. Almacenar a -20  $^{\circ}$ C.

## Anexo 5

### Identificación por sistema miniaturizado VITEK® (BioMérieux)

Para la identificación por el sistema miniaturizado VITEK®, a partir de una colonia en agar BHI incubada a 37 °C por 24 h, se realizó una suspensión al 0.5 de la escala de MacFarland en solución salina del proveedor.

**Tabla 42.** Sustratos utilizados en la identificación de microorganismos Gram-positivos en el sistema VITEK.

Prueba	Abreviatura	Cantidad (mg)
D-Amigdalina	AMY	0,1875
Fosfatidilinositol fosfolipasa C	PIPLC	0,0150
D-Xilosa	dXYL	0,3000
Arginina dihidrolasa 1	ADH1	0,1110
Beta-Galactosidasa	BGAL	0.0360
Alfa-Glucosidasa	AGLU	0,0360
Ala-Phe-Pro Arilamidasa	APPA	0,0384
Ciclodextrina	CDEX	0,3000
L-Aspartato Arilamidasa	AspA	0,0240
Beta-Galactopiranosidasa	BGAR	0,00204
Alfa-Manosidasa	AMAN	0,0360
Fosfatasa	PHOS	0,0504
Leucina Arilamidasa	LeuA	0,0234
L-Prolina Arilamidasa	ProA	0,0234
Beta- Glucuronidasa	BGURr	0,0018
Alfa-Galactosidasa	AGAL	0,0360
L-Prirrolidonil-Arilamidasa	PyrA	0,0180
Beta-Glucuronidasa	BGUR	0,0378

Prueba	Abreviatura	Cantidad (mg)
Alanina Arilamidasa	AlaA	0,0216
Tirosina Arilamidasa	TyrA	0,0276
D-Sorbitol	dSOR	0,1875
Ureasa	URE	0,1500
Resistencia a Polimixina B	POLYB	0,00093
D-Galactosa	dGAL	0,3000
D-Ribosa	dRIB	0,3000
L-Lactato (alcalinización)	ILATk	0,1500
Lactosa	LAC	0,9600
N-acetil-D-glucosamina	NAG	0,3000
D-maltosa	dMAL	0,3000
Resistencia a Bacitracina	BACI	0,0006
Resistencia a Novobiocina	NOVO	0,000075
NaCl 6.5 %	NC6.5	1,68
D-manitol	dMAN	0,1875
D-manosa	dMNE	0,3000
Metil-B-D-glucopiranosido	MBdG	0,3000
Pullulan	PUL	0,3000
D-rafinosa	dRAF	0,3000
Resistencia a O/129	O129R	0,0084
Salicina	SAL	0,3000
Sacarosa / Sucrosa	SAC	0,3000
D-Trealosa	dTRE	0,3000
Arginina dihidrolasa 2	ADH2s	0,2700
Resistencia a Optoquina	OPTO	0,000399

FUENTE: Microbial identification using the BioMérieux VITEK® 2 system.



**Tabla 43.** Resultados de pruebas bioquímicas por el sistema VITEK<sup>®</sup> (Biomerièux) para la cepa *Listeria monocytogenes* II.

AMY	+	PIPLC	+	dXYL	-	ASH1	-	BGAL	-	AGLU	+
APPA	-	CDEX	+	AspA	-	BGAR	-	AMAN	+	PHOS	-
LeuA	-	ProA	-	BGURr	-	AGAL	-	PyrA	-	BGUR	-
AlaA	?	TyrA	+	dSOR	-	URE	-	POLYB	+	dGAL	-
dRIB	-	1LATk	-	LAC	-	NAG	+	dMAL	+	BACI	+
NOVO	+	NC6.5	+	dMAN	?	dMNE	+	MBdG	+	PUL	-
dRAF	-	0129R	+	SAL	+	SAC	+	dTRE	+	ADH2 <sub>s</sub>	-
OPTO	+										

**Tabla 44.** Resultados de pruebas bioquímicas por el sistema VITEK<sup>®</sup> (Biomerièux) para la cepa *Listeria monocytogenes* III.

AMY	+	PIPLC	+	dXYL	-	ASH1	-	BGAL	-	AGLU	+
APPA	-	CDEX	+	AspA	-	BGAR	-	AMAN	-	PHOS	-
LeuA	-	ProA	-	BGURr	-	AGAL	-	PyrA	-	BGUR	-
AlaA	?	TyrA	+	dSOR	-	URE	-	POLYB	+	dGAL	-
dRIB	-	1LATk	-	LAC	-	NAG	+	dMAL	+	BACI	+
NOVO	+	NC6.5	+	dMAN	-	dMNE	+	MBdG	+	PUL	-
dRAF	-	0129R	+	SAL	+	SAC	+	dTRE	+	ADH2 <sub>s</sub>	-
OPTO	+										

**Tabla 45.** Resultados de pruebas bioquímicas por el sistema VITEK<sup>®</sup> (Biomerièux) para la cepa *Listeria innocua* I.

AMY	+	PIPLC	-	dXYL	-	ASH1	-	BGAL	-	AGLU	+
APPA	-	CDEX	+	AspA	-	BGAR	-	AMAN	+	PHOS	-
LeuA	-	ProA	-	BGURr	-	AGAL	-	PyrA	-	BGUR	-
AlaA	-	TyrA	+	dSOR	-	URE	-	POLYB	+	dGAL	-
dRIB	-	1LATk	+	LAC	-	NAG	+	dMAL	+	BACI	+
NOVO	+	NC6.5	+	dMAN	-	dMNE	+	MBdG	+	PUL	-
dRAF	-	0129R	+	SAL	+	SAC	+	dTRE	+	ADH2 <sub>s</sub>	-
OPTO	+										

**Tabla 46.** Resultados de pruebas bioquímicas por el sistema VITEK<sup>®</sup> (Biomerièux) para la cepa *Listeria innocua* II.

AMY	+	PIPLC	-	dXYL	-	ASH1	-	BGAL	-	AGLU	+
APPA	-	CDEX	+	AspA	-	BGAR	-	AMAN	+	PHOS	-
LeuA	-	ProA	-	BGURr	-	AGAL	-	PyrA	-	BGUR	-
AlaA	-	TyrA	+	dSOR	-	URE	-	POLYB	+	dGAL	-
dRIB	-	1LATk	+	LAC	-	NAG	+	dMAL	+	BACI	+
NOVO	+	NC6.5	+	dMAN	-	dMNE	+	MBdG	+	PUL	-
dRAF	-	0129R	+	SAL	+	SAC	?	dTRE	+	ADH2 <sub>s</sub>	-
OPTO	+										

**Tabla 47.** Resultados de pruebas bioquímicas por el sistema VITEK<sup>®</sup> (Biomerièux) para la cepa *Listeria seeligeri*.

AMY	?	PIPLC	-	dXYL	-	ASH1	+	BGAL	+	AGLU	-
APPA	-	CDEX	-	AspA	-	BGAR	-	AMAN	+	PHOS	?
LeuA	-	ProA	-	BGURr	-	AGAL	-	PyrA	-	BGUR	-
AlaA	-	TyrA	?	dSOR	-	URE	-	POLYB	-	dGAL	-
dRIB	+	1LATk	+	LAC	-	NAG	-	dMAL	-	BACI	+
NOVO	-	NC6.5	+	dMAN	+	dMNE	+	MBdG	+	PUL	-
dRAF	-	0129R	-	SAL	+	SAC	+	dTRE	+	ADH2 <sub>s</sub>	-
OPTO	+										

**Tabla 48.** Resultados de pruebas bioquímicas por el sistema VITEK<sup>®</sup> (Biomerièux) para la cepa *Listeria welshimeri*.

AMY	+	PIPLC	-	dXYL	?	ASH1	-	BGAL	-	AGLU	-
APPA	-	CDEX	+	AspA	-	BGAR	-	AMAN	+	PHOS	-
LeuA	-	ProA	-	BGURr	-	AGAL	-	PyrA	-	BGUR	-
AlaA	+	TyrA	+	dSOR	-	URE	-	POLYB	+	dGAL	-
dRIB	-	1LATk	-	LAC	-	NAG	+	dMAL	+	BACI	+
NOVO	+	NC6.5	+	dMAN	+	dMNE	+	MBdG	+	PUL	-
dRAF	-	0129R	+	SAL	+	SAC	+	dTRE	+	ADH2 <sub>s</sub>	-
OPTO	+										