



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO.

---

---

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN  
IZCALLI.

ESTUDIO INMUNO ENZIMÁTICO PARA DETECTAR  
ANTICUERPOS CONTRA *Listeria monocytogenes* EN  
POBLACIONES CAPRINAS.

TESIS:

PARA OBTENER EL TÍTULO DE:  
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO.

PRESENTA:

VICTOR LUNA ESCALONA.

ASESOR:

Dra. CLARA INÉS ÁLVAREZ MANRIQUE.

CUAUTITLÁN IZCALLI ESTADO DE MÉXICO 2011.



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**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.

## ÍNDICE.

Tema.	Pág.
1. Introducción.-----	8
2. Antecedentes.-----	10
2.1. Historia.-----	10
2.2. Listeriosis en animales.-----	11
2.3. Características del género <i>Listeria</i> .-----	13
2.3.1. Morfología.-----	13
2.3.2. Características de crecimiento.-----	13
2.3.3. Aislamiento.-----	14
2.3.4. Identificación.-----	15
2.3.5. Epidemiología.-----	17
2.3.6. Patogénesis.-----	18
2.3.7. Diagnóstico.-----	27
2.4. ELISA.-----	31
2.5. Cuantificación de proteínas.-----	33
2.5.1. Método de Bradford.-----	34
2.6. Electroforesis.-----	35
3. Justificación del problema.-----	39
4. Objetivos.-----	40
5. Materiales y métodos.-----	41
6. Resultados Y Discusión.-----	46
7. Conclusiones.-----	56
8. Anexos.-----	57
8.1. ANEXO 1: Elaboración de curva estándar para cuantificación de proteínas.---	57
8.2. ANEXO 2: Preparación de soluciones empleadas en electroforesis.-----	58
8.3. ANEXO 3: Preparación de soluciones empleadas en la técnica de ELISA.-----	61
9. Referencias.-----	62

## ÍNDICE DE TABLAS.

	Pág.
<b>Tabla 1.</b> Diferenciación de especies de <i>Listeria</i> .-----	15
<b>Tabla 2.</b> Actividad Bioquímica de <i>L. monocytogenes</i> .-----	17
<b>Tabla 3:</b> Algunos sistemas comerciales para la detección y la confirmación de <i>Listeria</i> -----	30
<b>Tabla 4:</b> Principales métodos para la cuantificación de proteínas y sus rangos de sensibilidad.-----	33
<b>Tabla 5:</b> Cálculo de la concentración de proteínas en la muestras problemas.-----	43
<b>Tabla 6:</b> Resultados concentración de proteína p60.-----	47
<b>Tabla 7:</b> Lecturas de densidad óptica obtenidas de los 20 sueros procedentes de la granja de referencia a listeriosis.-----	51
<b>Tabla 8:</b> Rangos para determinar sueros positivos, sospechosos y negativos.-----	52
<b>Tabla 9:</b> Elaboración de curva estándar.-----	57
<b>Tabla 10:</b> Resultados de regresión lineal.-----	57
<b>Tabla 11:</b> Elaboración del gel tapón.-----	58
<b>Tabla 12:</b> Elaboración del gel separador SDS PAGE 12 %.-----	58
<b>Tabla 13:</b> Elaboración del gel concentrador 4 %.-----	59
<b>Tabla 14:</b> Elaboración de solución amortiguadora pH 8.8.-----	59
<b>Tabla 15:</b> Elaboración de solución amortiguadora pH 6.8 0.5 M-----	59
<b>Tabla 16:</b> Elaboración de monómeros proporción 30 g: 0.8 g / 100 ml.-----	60
<b>Tabla 17:</b> Elaboración de solución de corrida pH 8.3 trisma 0.025 M-----	60
<b>Tabla 18:</b> Elaboración de solución digestora-----	60
<b>Tabla 19:</b> Elaboración de solución teñidora de gel-----	60
<b>Tabla 20:</b> Elaboración de solución desteñidora I.-----	61
<b>Tabla 21:</b> Elaboración de solución buffer de muestra -----	61
<b>Tabla 22:</b> Elaboración de PBS pH 7.2.-----	61

## ÍNDICE DE FIGURAS Y GRAFICAS.

	Pág.
<b>Figura 1.</b> Rol de E-Caderina en las uniones intercelulares e interacción con la Internalina A bacteriana.-----	23
<b>Figura 2.</b> Representación esquemática del ciclo de infección celular por <i>Listeria monocytogenes</i> .-----	24
<b>Figura 3:</b> Representación esquemática de la técnica de ELISA indirecta.-----	32
<b>Figura 4:</b> Reacción de la proteína con el colorante azul de Coomassie.-----	34
<b>Figura 5:</b> Representación esquemática de la técnica de Electroforesis.-----	38
<b>Figura 6:</b> Crecimiento después de 24 hrs de cepas de <i>Listeria</i> en agar BHI.-----	46
<b>Figura 7:</b> Representación de los resultados electroforéticos.-----	48
<b>Figura 8:</b> Porcentaje de positividad a <i>Listeria monocytogenes</i> en sueros de cabras del Estado de Puebla mediante la prueba de ELISA indirecta utilizando su p60 como Ag.-----	53
<b>Gráfica 1:</b> Respuesta serológica a la proteína p60 de cada especie de <i>Listeria</i> mediante la técnica de ELISA indirecta.-----	50
<b>Gráfica 2:</b> Respuesta serológica del antígeno p60 de <i>L. ivanovii</i> a los sueros de Puebla positivos a <i>L. monocytogenes</i> en una dilución de 1:200 por medio de la técnica de ELISA indirecta.-----	55

## ABREVIATURAS.

ABS. Absorbancia.	mA. Milíamperes.
Ac. Anticuerpo.	mg. Milígramos.
Ag. Antígeno.	MHC. Complejo mayor de histocompatibilidad.
ATCC. American Type Culture Collection.	mL. Mililitros.
BHI. Infusión de cerebro corazón.	mm. Milímetros.
CAMP. Prueba Christie–Atkins–Munch–Peterson	nm. Nanómetros.
CD4 <sup>+</sup> . Cumulo de diferenciación 4.	°C. Grados centígrados.
CD8 <sup>+</sup> . Cumulo de diferenciación 8.	P60. Proteína 60 kDa.
CSF. Factor estimulante de colonias.	PAGE. Electroforesis en gel de poliacrilamida.
D.O. Densidad óptica	PBS. Buffer Fosfato Salino.
ELISA. Enzyme-linked-immuno-sorbent-assay.	PI.PLC. Fosfolipasa C fosfatidilinositol-específica.
g. Gramos	rpm. Revoluciones por minuto.
hrs. Horas	SDS PAGE. Electroforesis en gel de poliacrilamida, condiciones desnaturalizantes.
IFN- $\gamma$ . Interferón gamma.	SDS. Dodecil sulfato de sodio.
IL. Interleucina.	SNC. Sistema nervioso central.
Inl. Internalina.	TEMED. N, N, N, N'-tetrametilen-diamina.
kb. Kilo bases.	TNF- $\alpha$ . Factor de necrosis tumoral alfa.
kDa. Kilo Dalton.	u.f.c. Unidades formadoras de colonias.
LIP1-1. Isla de patogenicidad 1 de <i>Listeria</i> .	UV. Ultra violeta.
LLO. Listeriolisina O.	
M. Molar.	

## **AGRADECIMIENTOS.**

*Hay tanto que agradecer y a tantas personas, que no encuentro las palabras que reflejen fielmente todo lo que quisiera poder expresar y solo puedo decir:*

*Gracias a Dios por haberme permitido llegar hasta aquí.*

*A mis padres por todo su apoyo incondicional... Gracias.*

*A mi esposa y a mi hija por no dejar de creer en mí... Gracias.*

*A la familia Reyes Lemus que sin su comprensión quizá hubiese sido un poco más difícil llegar hasta aquí... Gracias.*

*A mis compañeros y amigos por compartir conmigo buenos y malos momentos durante todo este tiempo... Gracias.*

*A mi asesora por todo... Gracias.*

*Al proyecto N 48599, SAGARPA-CONACYT Responsable Dr. Efrén Días Aparicio... Gracias.*

*A la Cátedra: Infección e Inmunidad Clave GC-21, y a la Dra. Gabriela Bárcenas Morales... Gracias.*

*A la Dra. Susana Mendoza Elvira... Gracias.*

*Y a quienes no creyeron en mí, que Dios les de salud y bienestar para que de pie puedan ver mi éxito.*

***El éxito debe medirse no por la posición a que una persona ha llegado, sino por su esfuerzo por triunfar. Booker T. Washington***

*Cuando alguien evoluciona, también evoluciona todo a su alrededor...  
Cuando tratamos de ser mejores de lo que somos, todo a nuestro alrededor también se vuelve  
mejor.*

*Eres libre para elegir... para tomar decisiones, aunque solo tú las entiendas.  
Toma tus decisiones con coraje, desprendimiento, y a veces, con una cierta dosis de locura.  
Solo entenderemos la vida y el Universo cuando no buscamos explicaciones.  
Entonces todo queda claro.*

*Aprender algo significa entrar en contacto con un mundo desconocido, en donde las cosas  
más simples son las más extraordinarias.*

*Atrévete a cambiar.*

*Desafíate.*

*No temas a los retos.*

*Insiste una, y otra, y otra vez.*

*Recuerda que sin fe, se puede perder una batalla que ya parecía ganada.*

*No te des por vencido.*

*Acuérdate de saber siempre lo que quieres. Y empieza de nuevo.*

*El secreto está en no tener miedo de equivocarnos.*

*Y de saber que es necesario ser humilde para aprender.*

*Ten paciencia para encontrar el momento exacto y congratúlate con tus logros.*

*Y si esto no fuera suficiente... analiza las causas... e inténtalo con más fuerza.*

*El mundo está en manos de aquellos que tienen el coraje de soñar y de correr el riesgo de  
vivir sus sueños.*

**PAULO COELHO**



## 1. INTRODUCCIÓN.

A nivel mundial, la cría de la especie caprina históricamente ha estado asociada a sectores marginales y a los países más pobres, donde la producción de leche y carne se destina principalmente al autoconsumo. Sin embargo, las diferentes patologías que afectan a esta especie tienen sin duda una repercusión económica.<sup>(20)</sup>

Low y Donachie, demuestran gran importancia de la listeriosis en veterinaria, particularmente en rumiantes por el consumo de forraje conservado en silos de mala calidad. Además de que puede ser transmitida al humano por medio de leche, carne o subproductos contaminados.<sup>(20)</sup>

*Listeria monocytogenes* es el único patógeno humano importante de las siete especies admitidas en el género *Listeria*, aunque *L. seeligeri*, *L. welshimeri* y *L. ivanovii* han sido relacionadas accidentalmente con la enfermedad humana, siendo la *L. ivanovii* patógena para ovejas y cabras principalmente.<sup>(76)</sup>

A nivel veterinario, causa encefalitis en rumiantes adultos, tales como oveja y ganado vacuno, y una forma visceral más común en los monogástricos y en los rumiantes jóvenes ataca otros órganos que no son el cerebro, causando nacimientos prematuros, aborto y septicemia.<sup>(3)</sup>

En la actualidad existen varios métodos convencionales y rápidos disponibles para la detección e identificación de *L. monocytogenes* en muestras de alimentos y en muestras de origen animal. Los métodos bacteriológicos convencionales nos permiten obtener al microorganismo en cultivo puro. Estos métodos siguen siendo el “patrón de oro”. Normalmente estos métodos bacteriológicos son muy sensibles y no requieren equipamiento sofisticado o caro. Algunas desventajas de este grupo de métodos incluyen el periodo de tiempo relativamente largo que se necesita para finalizar los protocolos, la experiencia práctica que se precisa en varias manipulaciones, la necesidad de productos químicos, reactivos y medios muy diferentes, la posibilidad de que algunos microorganismos contaminantes enmascaren la presencia de las bacterias de interés, incluyendo una posible falta de detección de variantes atípicas del microorganismo en estudio y la subjetividad relativa que supone la

interpretación del crecimiento bacteriano en placas de agar con un medio selectivo y diferencial. <sup>(3)</sup>

*Listeria monocytogenes* es un parásito intracelular facultativo que penetra en el hospedador a través del sistema digestivo, tanto del hombre como de los animales. En los últimos años se han identificado un gran número de factores de virulencia involucrados en los pasos clave del ciclo de vida intracelular de *L. monocytogenes*. <sup>(31)</sup>

Las proteínas más comunes asociadas al proceso infeccioso de *L. monocytogenes*, son internalinas (InIA, InIC2, InID to InIF), listeriolisina O, fosfolipasa C, ActA y la p60. <sup>(31)</sup>

La p60 es la proteína excretada con mayor abundancia por *L. monocytogenes*. En contraste a otros factores de virulencia, p60 es también una enzima metabólica esencial de *L. monocytogenes* puesto que posee la actividad de la murreina hidrolasa la cual parece estar involucrada en el último paso de la división celular. Se ha mostrado recientemente que la p60 es un antígeno importante en la respuesta inmune contra *L. monocytogenes*. <sup>(98)</sup>

## 2. ANTECEDENTES.

### 2.1. Historia.

En 1926, Murray y sus colaboradores, describe por primera vez a *Bacillus monocytogenes* como el agente causal de un brote que afectó a los cobayos y conejos de su laboratorio en la Universidad de Cambridge. El proceso se caracterizaba por la presencia de lesiones necróticas en hígado, acompañadas de leucocitosis mononuclear (monocitosis).<sup>(91)</sup>

Coincidiendo en el tiempo, Pirie aislaba en 1927 durante sus estudios sobre la enfermedad de río Tiger en África del Sur, una bacteria a partir de focos necróticos del gerbo que denominó *Listerella hepatolytica*. No fue hasta 1940 que el propio Pirie designó a este agente con su nombre actual, *Listeria monocytogenes*; Esta fue por mucho tiempo (1926-1974) la única especie reconocida dentro del género *Listeria*.<sup>(91)</sup>

La octava edición del Manual de Bergey, amplió oficialmente el género a cuatro especies, añadiendo tres no patógenas: *L. denitrificans*, *L. grayi* y *L. murrayi* (descritas en 1963, 1966 y 1971, respectivamente). Sin embargo, la especie *L. monocytogenes* seguía definida como *sensu lato* e incluía cepas hemolíticas patógenas y no hemolíticas apatógenas, lo que implicaba la imposibilidad de diferenciar taxonómicamente cepas de origen epidémico de las apatógenas aisladas del medio ambiente.<sup>(92)</sup>

*L. monocytogenes sensu lato* fue dividida en 1982 como consecuencia de un análisis fenotípico y epidemiológico detallado, y el desarrollo de técnicas de hibridación ADN-ADN, en 5 especies: *L. monocytogenes sensu stricto*, débilmente hemolítica y patógena, *L. seeligeri*, débilmente hemolítica y apatógena; *L. innocua* y *L. welshimeri*, no hemolíticas y apatógenas; y un grupo que incluía las cepas de *L. monocytogenes* serovar 5, fuertemente hemolíticas y patógenas.<sup>(91)</sup>

En 1962, el búlgaro Iván Ivanov había aislado a partir de infecciones perinatales y abortos ovinos, una bacteria que bautizó con el nombre de *Listeria bulgarica*. En 1975 Ivanov sugirió que estas bacterias debían formar oficialmente una nueva especie dentro del género *Listeria*. Sin embargo, en 1982 pasaron a constituir la serovar 5 de *L. monocytogenes*. El reconocimiento oficial de una nueva especie denominada *L. ivanovii* para estas cepas del serovar 5 se realizó en 1984 bajo propuesta de Seeliger. <sup>(92)</sup>

Actualmente el género *Listeria* está compuesto por dos especies potencialmente patógenas, *L. monocytogenes* y *L. ivanovii*, y cuatro apatógenas, *L. seeligeri*, *L. innocua*, *L. welshimeri* y *L. grayi*. <sup>(92)</sup>

Los primeros casos de listeriosis en rumiantes se describieron por Gill en 1933 y 1937, aislando un microorganismo a partir del encéfalo de ganado ovino al que denominó *Listerella ovis*. Los animales cursaban con una sintomatología nerviosa caracterizada por incoordinación y torneo, lo que le llevó a denominar a la enfermedad "circling disease", que es la presentación más característica de la listeriosis en rumiantes. <sup>(96)</sup>

*L. monocytogenes* fue reconocido como patógeno humano por primera vez en 1929 y desde 1983 es considerado como un microorganismo oportunista que causa infecciones alimentarias, principalmente por la ingestión de alimentos crudos contaminados. <sup>(96)</sup>

## **2.2. Listeriosis en animales.**

Al igual que en el hombre, la listeriosis en los animales está vinculada por los alimentos elaborados. Cualquier mamífero, además de las aves, puede estar afectado cuando consume alimento contaminado con *Listeria*. El alimento más implicado en la listeriosis de animales es el ensilado. Su preparación defectuosa hace que alcance un pH próximo al neutro, en lugar del pH ácido necesario para su conservación, permitiendo la rápida proliferación de *Listeria*. Consecuentemente, los animales que más consumen este tipo de alimento son aquellos que más sufren listeriosis, los rumiantes, en nuestro país principalmente el ganado ovino, seguido del bovino y caprino. <sup>(96)</sup>

A diferencia de lo que ocurre en el hombre, son dos las bacterias del género *Listeria* que pueden producir listeriosis en animales: *L. monocytogenes* y *L. ivanovii*. Los animales afectados han consumido siempre, en las semanas anteriores a la aparición de los síntomas característicos, alimento altamente contaminado con *Listeria*. Por lo tanto, un análisis del ensilado, en el caso de los rumiantes, y la destrucción del mismo en el caso de que sea positivo, controlarán el proceso en la población afectada. Es muy recomendable realizar el análisis del ensilado, debido que la carga bacteriana del mismo, en el caso de tratarse de *Listeria*, es muy elevada (hasta  $10^9$  u.f.c./gramo), por lo que su detección en el laboratorio no es complicada. Cabe recordar que *L. ivanovii* no es capaz de atravesar la barrera hematoencefálica, y que afecta exclusivamente a rumiantes, por lo que los síntomas en brotes provocados por este microorganismo nunca serán de tipo meningoencefalítico, y sus brotes se caracterizarán, casi siempre, por la aparición repentina de abortos. <sup>(96)</sup>

*L. monocytogenes* causa abortos y sintomatología nerviosa, caracterizada por torneo, incoordinación, tortícolis, postración con pedaleo y finalmente muerte. En el caso de que exista sintomatología nerviosa, el diagnóstico de laboratorio debe realizarse a partir de las lesiones petequiales características que se pueden detectar en la base del romboencéfalo. Por ello, el envío del animal completo o de la cabeza es recomendable para un rápido y certero diagnóstico. <sup>(96)</sup>

*L. monocytogenes* puede ser liberada en la materia fecal de animales clínicamente afectados; sin embargo, los animales sanos también pueden tener latente a *L. monocytogenes*. Múltiples estudios han mostrado que hasta el 50 % de muestras fecales tomadas de animales sin síntomas clínicos de listeriosis (incluyendo ganado vacuno, ovejas, cabras, cerdos y carne de ave) podrían tener *L. monocytogenes*. <sup>(70, 78)</sup>

## 2.3. Características del género *Listeria*.

### 2.3.1. Morfología.

El género *Listeria* está constituido por seis especies *L. innocua*, *L. weishimeri*, *L. seeligeri*, *L. ivanovii*, *L. grayi*, *L. monocytogenes*. Únicamente dos especies de este género son patogénicas: *L. monocytogenes* asociada con infección en humanos y animales y *L. ivanovii* asociada únicamente con infección en animales. <sup>(90)</sup>

El género *Listeria* son bacilos Gram positivos cortos, regulares, no esporulados, suelen observarse en disposición individual o formando cadenas cortas, en cultivos viejos pueden aparecer formando filamentos de 6-20 mm de longitud. Presentan de 1 a 5 flagelos peritricos que les confieren movilidad a 28 °C. <sup>(2)</sup>

Las colonias son pequeñas (de 1 a 2 mm tras uno o dos días de incubación) y lisas. Al observarse a la lupa con epiiluminación, con un ángulo de la luz de 45 °- 60 °, se observan reflejos de color azul-verdoso sobre una superficie finamente granular. <sup>(2)</sup>

### 2.3.2. Características de crecimiento.

Los microorganismos del género *Listeria* son anaerobios facultativos que crecen mejor en una atmósfera con tensión de oxígeno y tensión de CO<sub>2</sub> aumentada. Se desarrolla en un medio de cultivo que requiere de ciertas condiciones tales como temperatura, pH, agentes químicos y factores nutricionales. <sup>(53)</sup>

**Temperatura.** La temperatura óptima para el desarrollo del microorganismo se sitúa entre los 30 y 37 °C, a temperatura ordinaria el crecimiento es en ocasiones retardado, pero a los 3 ó 4 días el cultivo es satisfactorio. El límite superior de crecimiento está entre 42 y 44 °C, además, los microorganismos mueren a los 56 °C, en una hora. <sup>(41)</sup>

**pH.** *L. monocytogenes* para su crecimiento, requiere de un pH neutro o ligeramente alcalino, siendo el pH ideal de 7.5. Por debajo de 5.6 no se cultiva y además las resiembras a menudo son imposibles. Con el pH alcalino e incluso hasta 9.6 este microorganismo todavía se puede cultivar. <sup>(26)</sup>

**Agentes químicos.** *L. monocytogenes* se cultiva en presencia de altas concentraciones de NaCl, de bilis y de telurito de potasio. <sup>(20)</sup>

**Factores nutricionales.** Estos factores favorecen el crecimiento de los microorganismos, la presencia de glucosa, vitaminas del grupo B, aminoácidos tales como valina, cisteína, glutamina, leucina e isoleucina. La influencia de estos factores, son necesarios para el buen desarrollo de las cepas de *L. monocytogenes*, sin embargo los medios de cultivo empleados para el aislamiento y crecimiento del microorganismo difieren dependiendo del tipo de muestra clínica que se vaya a trabajar. <sup>(61, 79)</sup>

### 2.3.3. Aislamiento.

*L. monocytogenes* se aísla fácilmente de muestras orgánicas habitualmente estériles como sangre, líquidos cefalorraquídeo y amniótico, placenta y tejido fetal. Estas muestras deben ser remitidas al laboratorio y procesadas tan pronto como sea posible o en su defecto conservarse a 4 °C durante un máximo de 48 hrs. Las muestras clínicas habitualmente estériles pueden ser inoculadas directamente en medios habituales como el agar sangre. Las muestras de sangre pueden inocularse en cualquier sistema convencional de hemocultivos. <sup>(2)</sup>

Sin embargo, el aislamiento de *L. monocytogenes* en muestras poli microbianas es un tanto difícil ya que se requiere un tratamiento previo de la muestra y del empleo de un medio altamente selectivo para *L. monocytogenes*. <sup>(2)</sup>

Las muestras no estériles pueden conservarse a 4 °C durante 24-48 hrs como máximo. Si se va a producir una mayor demora en su procesamiento deben ser congeladas a -20 °C para evitar el

sobre crecimiento bacteriano. Este tipo de muestras, así como las alimentarias, deben ser enriquecidas con un medio selectivo para *Listeria spp*, antes de sembrarse en placas. Tradicionalmente se ha usado un método de enriquecimiento en frío, utilizando un caldo de crecimiento no selectivo mantenido a 4 °C durante dos o más meses para su posterior subcultivo en placas. <sup>(2)</sup>

De igual modo, los medios sólidos selectivos han contado con una combinación de agentes selectivos tales como el cloruro de litio, el feniletanol, y el anhídrido de glicina y los antibióticos. <sup>(2)</sup>

#### 2.3.4. Identificación.

Las colonias típicas de *Listeria spp*, una vez crecidas en el medio selectivo/diferencial, se seleccionan para su identificación a nivel de especie, utilizando una batería de pruebas. Estas pruebas comprenden la reacción a la tinción de Gram, la catalasa, los ensayos de movilidad (en una muestra en fresco observada por microscopía de contraste de fases y después de su inoculación en un medio de prueba de movilidad), prueba de hemólisis y de utilización de carbohidratos. La prueba Christie–Atkins–Munch–Peterson (CAMP) es una herramienta muy útil que facilita la identificación de las especies de *Listeria spp* a partir de los aislamientos. <sup>(64)</sup>

**Tabla 1.** Diferenciación de especies de *Listeria*. <sup>(64)</sup>

Especie	Hemólisis	Producción de ácido		Prueba CAMP	
		Ramnosa	Xilosa	<i>S. aureus</i>	<i>R. equi</i>
<i>L. monocytogenes</i>	+	+	–	+	–
<i>L. innocua</i>	–	V	–	–	–
<i>L. ivanovii</i>	+	–	+	–	+
<i>L. seeligeri</i>	(+)	–	+	(+)	–
<i>L. welshimeri</i>	–	V	+	–	–
<i>L. grayi</i> subsp. <i>Grayi</i>	–	–	–	–	–
<i>L. grayi</i> subsp. <i>Murrayi</i>	–	V	–	–	–

V: variable; (+): reacción débil; +: >90% reacciones positivas; –: sin reacción.



La identificación de colonias presuntivas de *Listeria* se basa en el examen microscópico de las placas iluminadas desde la parte inferior con un ángulo de incidencia de 45 °C, (iluminación de Henry); cuando se examinan con esta técnica las colonias presentan un color que va desde azul-gris a azul-verde. Algunos medios evitan el uso de esta técnica incorporando esculina y citrato férrico-amónico de modo que las colonias de *Listeria* aparecen de un color pardo oscuro o negro como consecuencia de la hidrólisis de la esculina. <sup>(2)</sup>

En agar sangre se observan pequeñas colonias rodeadas de una estrecha zona de beta hemólisis. En caldo se produce un ligero enturbiamiento y un sedimento granular bastante denso. <sup>(72)</sup>

En medio semisólido produce una forma de sombrilla típica pino invertido, creciendo cerca de un centímetro y medio de la superficie porque es un organismo naturalmente microaerofílico. <sup>(52)</sup>

La confirmación de *L. monocytogenes* requiere la realización de pruebas bioquímicas adicionales que incluyen pruebas de fermentación de azúcares para diferenciarla de otras especies de *Listeria* y en especial la prueba de CAMP para diferenciar *L. monocytogenes* de *L. innocua*. <sup>(2)</sup>

**Tabla 2.** Actividad Bioquímica de *L. monocytogenes*.<sup>(87)</sup>

<b>PRUEBA</b>	<b>RESULTADO</b>
<b>Requerimientos de oxígeno</b>	Facultativa y microaeroflica
<b>β – hemólisis</b>	Positiva
<b>Crecimiento a 35°C</b>	Positiva
<b>Catalasa</b>	Positiva
<b>Oxidasa</b>	Negativa
<b>RMVP</b>	Positivo
<b>Citrato</b>	No utiliza
<b>Indol</b>	No produce
<b>H<sub>2</sub>S</b>	Negativa
<b>Nitratos</b>	No reduce
<b>Hidrólisis de urea</b>	Negativa
<b>Hidrólisis de caseína</b>	Negativa
<b>Hidrólisis de gelatina</b>	Negativa
<b>Hidrólisis de celulosa</b>	Negativa
<b>Hidrólisis de esculina</b>	Positiva
<b>Hidrólisis de hipurato sódico</b>	Positiva
<b>Fermentación de glucosa</b>	Positiva
<b>Fenilalanina desaminasa, ornitasa, Lisina, arginina descarboxilasa</b>	No produce
<b>Movilidad</b>	Positiva de 20-25 °C Negativa a 37 °C
<b>CAMP –<i>S aureus</i></b>	Positiva
<b>Fosfatasa</b>	Positiva

### **Epidemiología.**

La distribución de *L. monocytogenes* es mundial y se ha logrado aislar a partir de muestras de tierra, polvo, materia vegetal en descomposición, comida para consumo humano, tanto fresca como procesada, destacando las carnes y vegetales, alimentos para animales, aguas residuales, desechos de los mataderos, productos lácteos y numerosos animales o humanos asintomáticos. Respecto a los animales en los cuales el microorganismo se ha detectado, incluyen a 42 especies domésticas, mamíferos silvestres, aves, peces, moscas y crustáceos.<sup>(1, 44)</sup>

*L. monocytogenes* es habitante natural de la tierra y la materia vegetal en descomposición, elementos que fungen como sus principales reservorios; el humano y los animales pueden contactarla a partir de diversas fuentes, destacando la materia fecal y los alimentos. Aún cuando existe la lógica transmisión directa a veterinarios y granjeros, la mayor parte de las infecciones ocurren en personas ciudadinas que ingieren alimentos contaminados, incluidos la ensalada de col, quesos suaves, carne de aves, salchicha de pavo, champiñones, leche y lengua de cerdo en jalea. <sup>(1, 44,73)</sup>

Adicionalmente la patofisiología de la infección de listeria en humanos y animales todavía es pobremente entendida. La mayoría de la información disponible se deriva de la interpretación epidemiológica, clínica y de observaciones histopatológicas realizadas en infecciones experimentales en animales. <sup>(24)</sup>

Como la comida es la principal fuente de infección en brotes epidémicos y casos esporádicos, el tracto gastrointestinal es el sitio primario de entrada de los organismos patogénicos de *Listeria* dentro del huésped. El curso clínico de la infección usualmente comienza cerca de 20 horas después de la ingestión de alimentos altamente contaminados en casos de gastroenteritis, considerando que el periodo de incubación para la invasión es generalmente de más tiempo, alrededor de 20 a 30 días; periodos similares de incubación han sido reportados en animales para la presentación gastroentérica e invasiva. <sup>(33, 98)</sup>

### **2.3.5. Patogénesis.**

La mayoría de los conocimientos actuales sobre la patogénesis de la infección por *Listeria* están basados en el modelo murino de listeriosis experimental, ya que constituye un sistema altamente reproducible para caracterizar la virulencia de las especies patógenas del género *Listeria*, mimetizando ciertos aspectos de la infección natural en el hombre y los animales. No obstante, sobre la base de acercamientos moleculares, actualmente se está cuestionando la capacidad del modelo murino para reproducir importantes aspectos de la listeriosis humana y se ha propuesto el cobayo como modelo de elección para futuros estudios *in vivo*. <sup>(55, 62)</sup>

El primer paso importante para el conocimiento de la patofisiología de la listeriosis se dio gracias a los trabajos pioneros de Mackaness quien, en 1962, estableció que el sistema mononuclear fagocítico atrapaba a las *Listerias* en el hígado y el bazo de los animales infectados, aportando evidencias convincentes de que estas bacterias eran capaces no sólo de sobrevivir sino de multiplicarse activamente en los macrófagos. El modelo de listeriosis experimental en el ratón contribuyó definitivamente a considerar a *L. monocytogenes* como paradigma en el estudio del parasitismo intracelular facultativo y permitir así el desarrollo de conceptos básicos en enfermedades infecciosas e inmunología relacionados con el parasitismo intracelular, tales como la inmunidad adquirida de base celular mediada por células T y macrófagos activados. <sup>(29, 68, 94)</sup>

La infección por *Listeria* ocurre normalmente tras la ingestión de alimentos contaminados, por lo tanto, la entrada de las bacterias en el organismo se produce fundamentalmente a través de la barrera intestinal tras haber superado el primer filtro de la acidez del estómago. Sin embargo, se ha postulado que la invasión del SNC podría producirse directamente a partir de lesiones en la mucosa bucal desde donde *Listeria* accedería a las terminaciones de los nervios trigémino o facial, ascendiendo centripetamente hasta alcanzar el tronco del encéfalo. Otras posibles vías de invasión, aunque muy infrecuentes, serían la conjuntiva o la mucosa respiratoria. <sup>(4, 5, 63, 80, 81)</sup>

Una vez que las bacterias se encuentran en el intestino deben atravesar la mucosa intestinal, ya que no se trata de un patógeno primario del intestino sino sistémico. La puerta de entrada hacia órganos profundos ha sido un tema muy debatido. Tradicionalmente han coexistido dos hipótesis: por un lado, en 1970 Racz y su equipo, describieron en cobayos infectados por vía oral, la entrada de *Listeria* a través de los enterocitos y en 1977 Karunasagar y su equipo, mostraron la invasión de células de carcinoma de colon humano (Caco-2) por la superficie apical de las mismas. Por otro lado, Mac Donald y colaboradores 1980 y Marco y colaboradores en 1997, utilizando el modelo murino, demostraron que las bacterias se localizaban fundamentalmente en las placas de Peyer del íleon, por lo que la invasión del epitelio intestinal podría tener lugar, principalmente, atravesando las células M que tapizan la superficie de los folículos linfoides de la pared intestinal (placas de Peyer). Desde esta

localización los microorganismos podrían acceder a los enterocitos por su cara basolateral, como es el caso de *Shigella flexineri*.<sup>(56, 67, 86, 93)</sup>

Recientemente se han presentado evidencias apoyando ambas hipótesis. Jensen y su equipo en 1998, considera a las células M como la puerta de entrada de *Listeria*, mientras que en 1997 Marco y su equipo y en 1998 Pron y colaboradores, indican que no existe un lugar preferencial de entrada (enterocitos o células M). No obstante, todos los autores consideran esta primera fase de entrada como un proceso inespecífico e ineficaz que depende únicamente de la cantidad de bacterias que haya en el intestino y que no requiere ningún factor de virulencia específico. Sin embargo, se ha demostrado que las células fagocíticas subyacentes a las placas de Peyer constituyen un lugar para la multiplicación primaria de *Listeria*. A partir de estos focos primarios de multiplicación de las bacterias, vía linfática y posteriormente por la circulación sanguínea, llegan al hígado y al bazo constituyendo éstos los órganos diana primarios de la infección.<sup>(54, 68, 71, 85.)</sup>

En los sinusoides hepáticos son atrapadas por los macrófagos residentes (células de Küpffer), donde la mayoría de las bacterias son destruidas en las primeras 6 horas debido a la fusión fagolisosómica y a la explosión oxidativa. Un porcentaje variable dependiendo de la dosis infectiva es capaz de escapar de los fagolisosomas de las células de Küpffer y proliferar en su citosol; la fase hepática es crucial para el posterior desarrollo de la listeriosis.<sup>(22, 69, 91)</sup>

Una de las piedras angulares de la virulencia de *Listeria* es la capacidad para moverse en el interior de las células eucariotas y de pasar directamente de una célula a otra sin entrar en contacto con el medio extracelular, quedando por tanto al abrigo de los efectores humorales del sistema inmune. Gracias a esta habilidad, *Listeria*, pasa desde las células de Küpffer a los hepatocitos donde se multiplica activamente. En contra de lo que se venía creyendo, los hepatocitos y no los macrófagos, son el principal lugar de multiplicación de *Listeria* en el organismo durante las fases tempranas de la infección. La multiplicación masiva de *Listeria* en los hepatocitos acaba destruyéndolos por necrosis o apoptosis, dando lugar a la concomitante liberación de citocinas que reclutan neutrófilos en el foco infeccioso. Los neutrófilos tienen un papel fundamental en los mecanismos de defensa temprana y resolución del foco infeccioso: al

fagocitar y destruir los hepatocitos apoptóticos, dejan libres y vulnerables a las bacterias que también serán destruidas por ellos. Otra posible vía de entrada a los hepatocitos puede producirse a partir de las listerias que quedan libres en el espacio extracelular después de haber sido destruidas las células de Kúpffer donde se encontraban, mediante fagocitosis inducida. <sup>(15, 21, 25, 59, 88, 89, 99)</sup>

Las bacterias que logran sobrevivir crecen logarítmicamente durante 2-3 días, los neutrófilos son sustituidos por monocitos y macrófagos que llegan al foco de infección inducidos por factores quimiotácticos y citocinas tales como, factor de necrosis tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ), interferón gamma (IFN- $\gamma$ ), factor estimulante de colonias (CSF), e interleucinas (IL-) como IL-1, IL-4, IL-6 e IL-12 (para cuya inducción es necesaria la hemolisina de *L. monocytogenes*). <sup>(8, 42)</sup>

La reacción inflamatoria se inicia, dando lugar a la formación de granulomas que constituyen la lesión característica de la listeriosis y que forman una auténtica barrera física que frena la progresión del foco infeccioso. Uno de los mecanismos por los que *Listeria* puede entrar en los macrófagos es dependiente del complemento. Los macrófagos infectados producen TNF- $\alpha$ , que va a estimular a las células naturales asesinas (NK, del inglés *natural killer*), que a su vez producirán grandes cantidades de IFN- $\gamma$ , el cual va a activar los mecanismos listericidas de los macrófagos. También se ha sugerido que los propios hepatocitos podrían destruir a las listerias tras su estimulación con IFN- $\gamma$ . <sup>(7, 19, 30, 37)</sup>

La resolución de una listeriosis depende de la activación y potenciación de la actividad bactericida de los macrófagos mediada por células T (CD4<sup>+</sup>), específicamente dirigidas contra antígenos de *Listeria* tales como, la hemolisina y la proteína de superficie p60. La presentación de los correspondientes epitopos de *Listeria* por moléculas del complejo principal de histocompatibilidad (MHC) de clase I da lugar a la activación de dichas células T citotóxicas (CD8<sup>+</sup>), esenciales para la destrucción de las células infectadas. La estimulación de las células T CD4<sup>+</sup> por el MHC de clase II también contribuye a la adquisición de una respuesta inmune contra la bacteria. Ambas células producen a su vez IFN- $\gamma$ , contribuyendo a incrementar la cascada de activación de los macrófagos. La interacción del sistema inmune

con células hepáticas infectadas es crucial para el control de la infección. Si esta respuesta inmune no es suficientemente eficaz (como puede ocurrir en el caso de individuos inmunocomprometidos), las listerias se multiplicarán en el hígado sin restricción. La consecuente destrucción de los hepatocitos origina la liberación de una gran carga bacteriana al torrente circulatorio y una diseminación hematógena a los órganos diana secundaria, fundamentalmente el SNC o la placenta, o la invasión generalizada del organismo, dando lugar a los cuadros clínicos característicos de la listeriosis. <sup>(11, 36, 45, 57, 69, 77, 84, 92, 97)</sup>

### **Ciclo intracelular de *Listeria*.**

*L. monocytogenes* son patógenos intracelulares facultativos capaces no sólo de sobrevivir y multiplicarse en macrófagos de diferentes orígenes sino de invadir activamente distintos tipos celulares no fagocíticos. Esta habilidad de las especies patógenas de *Listeria* de invadir las células no fagocíticas constituye una piedra angular para el éxito de su estilo de vida como parásito intracelular. <sup>(18)</sup>

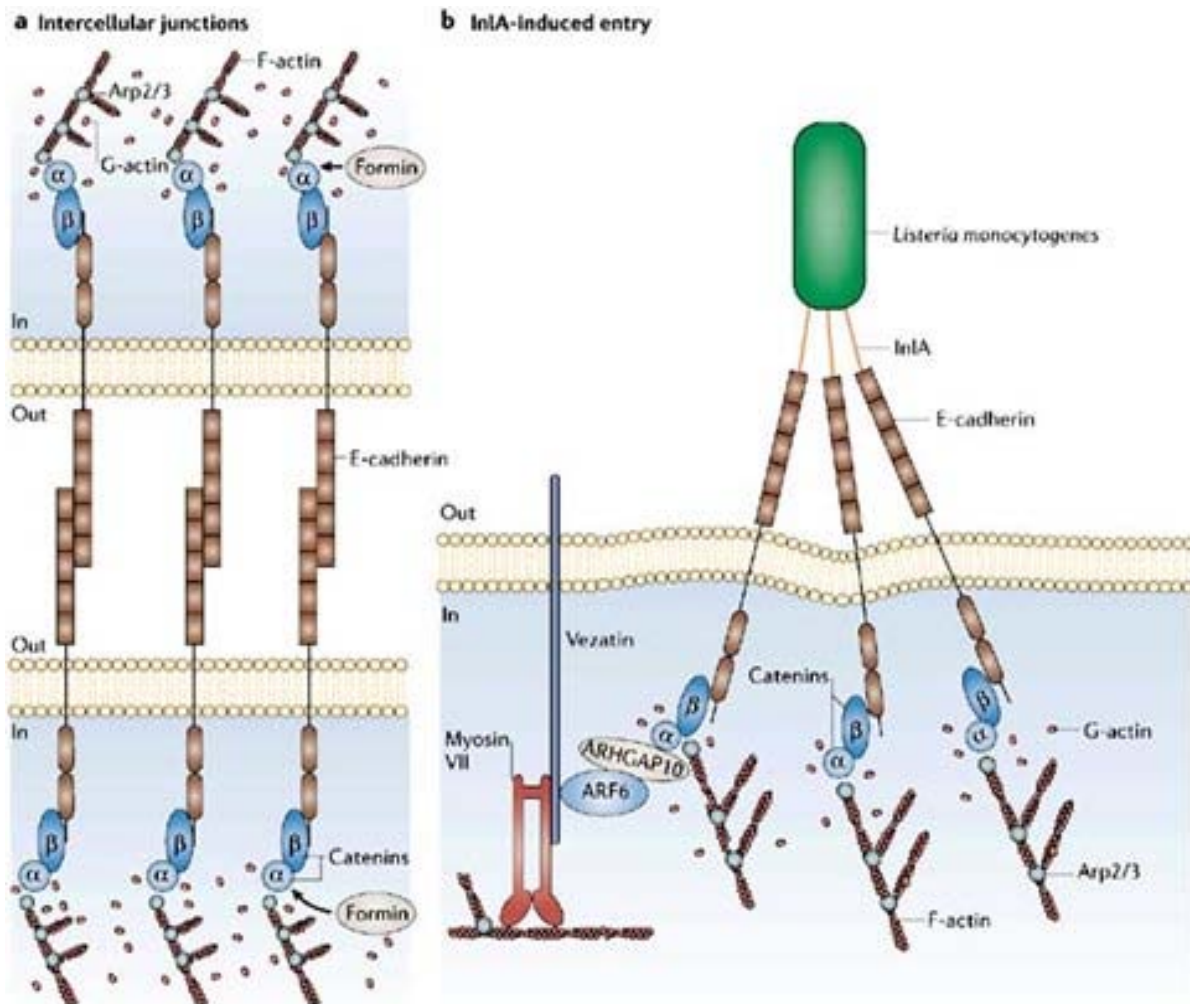
*L. monocytogenes* produce una serie de factores de virulencia para facilitar el proceso invasivo. Seis de los factores de virulencia responsables del parasitismo intracelular de *L. monocytogenes* (*prfA*, *plcA*, *hly*, *mpl*, *actA* y *plcB*) están organizados en una isla cromosomal de 9 kb conocida como grupo de genes de virulencia *PrfA* dependiente; isla denominada como isla 1 de patogenicidad de *Listeria* (LIPI-1). <sup>(13)</sup>

El ciclo de vida intracelular se inicia con la adhesión y posterior invasión de las células hospedadoras. Este proceso implica muy probablemente interacciones específicas ligando-receptor que inducen la estimulación de vías de transducción de señales en la célula eucariota, desencadenando la reorganización del citoesqueleto de actina y la fagocitosis. <sup>(16,35)</sup>

Para ingresar al medio intracelular *Listeria* utiliza proteínas de superficie conocidas como *invasinas* o Internalinas A y B, que interactúan con receptores celulares de transmembrana como E-Caderina, en el caso de Internalina A y Tirosin-kinasa Met-c, en el de Internalina B; estas interacciones favorecen la entrada de la bacteria mediante fagocitosis. <sup>(49, 82)</sup>

La proteína E-Caderina tiene un rol fundamental en las uniones intercelulares. Se sabe que cuando se producen fenómenos de remodelación en la vellosidad intestinal esta proteína queda expuesta en la superficie del lumen, donde se encuentra *Listeria*; en ese momento se produce la interacción entre Internalina A y E-Caderina, que culmina en la fagocitosis de la bacteria. La expresión abundante de E-Caderina por parte del sinciciotrofoblasto explicaría el tropismo placentario de este patógeno. El otro receptor celular involucrado en su fagocitosis, la proteína tirosin-kinasa Met-c, tendría un rol en el paso de *Listeria* a través de la barrera hematoencefálica. <sup>(40)</sup>

**Figura 1.** Rol de E-Caderina en las uniones intercelulares e interacción con la Internalina A bacteriana. (Tomada de [http://www.seimc.org/control/revi\\_Bacte/listeria.htm](http://www.seimc.org/control/revi_Bacte/listeria.htm))

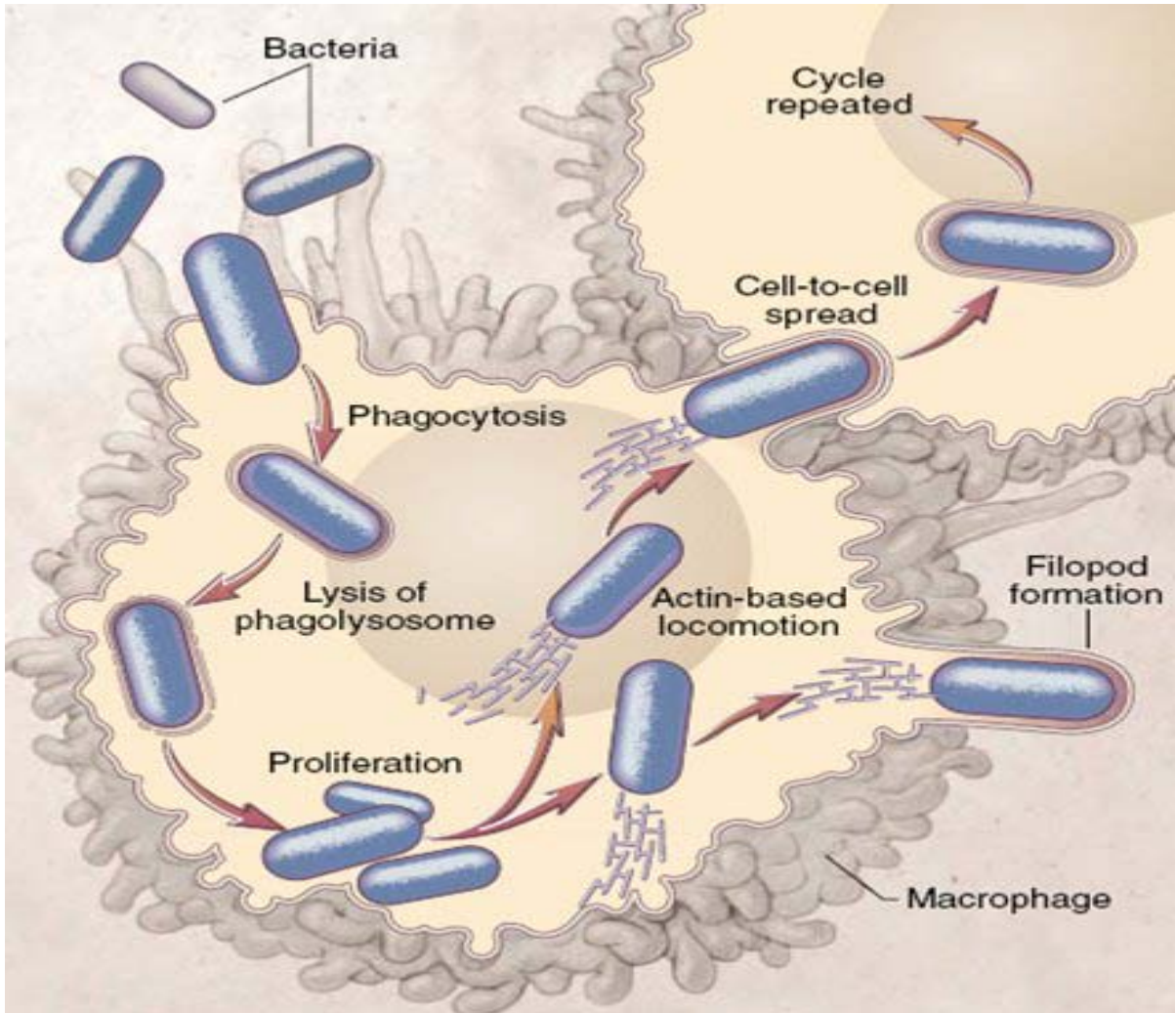




Tras su internalización, las listerias quedan confinadas en un fagosoma. Algunos de estos fagosomas se fusionan con lisosomas y las bacterias son destruidas. Sin embargo, un porcentaje significativo de listerias escapa del compartimento vacuolar mediante la disrupción de la membrana fagosómica. Una vez libre en el citoplasma, las bacterias se multiplican activamente. Al mismo tiempo, inician un proceso de motilidad intracelular subvirtiendo nuevamente la funcionalidad del citoesqueleto de actina de la célula hospedadora. La polimerización de actina en uno de los polos de la bacteria es utilizada como fuerza de propulsión, generando un movimiento bacteriano aleatorio en el citoplasma. Este movimiento permite que algunas alcancen la periferia de la célula infectada. Allí, las listerias entran en contacto con la cara interna de la membrana celular, haciendo protrusión hacia la célula colindante en evaginaciones citoplásmicas que contienen en su extremo apical una bacteria. Estas estructuras son fagocitadas por las células vecinas y las bacterias quedan englobadas en fagosomas secundarios de doble membrana ver figura 2. Las *Listerias* son nuevamente capaces de lisar este compartimento vacuolar y escapar al citoplasma, iniciando así un nuevo ciclo de multiplicación y propagación. <sup>(16, 27, 32, 38, 39, 50)</sup>

Mediante este elegante mecanismo las listerias patógenas pueden diseminarse entre diferentes células y tejidos del hospedador infectado sin verse expuestas a los efectores humorales del sistema inmune del medio extracelular. <sup>(51)</sup>

**Figura 2.** Representación esquemática del ciclo de infección celular por *Listeria monocytogenes*. (Tomada de [http://www.seimc.org/control/revi\\_Bacte/listeria.htm](http://www.seimc.org/control/revi_Bacte/listeria.htm))



Existen diferentes tipos de proteínas que actúan en el proceso infeccioso por *L. monocytogenes*, algunas de ellas son las siguientes:

- **Las internalinas A y B y otros miembros de la familia Inl.** La entrada de *L. monocytogenes* a las células epiteliales se ha estudiado ampliamente, lo que ha permitido identificar a la internalina A (InlA), proteína de 80 kDa que media la entrada bacilar a las células del epitelio intestinal humano y algunas otras células epiteliales. La InlA está codificada por el gen *InlA* que, a su vez, forma parte de una familia de

multigenes llamada *Inl*, a la cual también pertenece el gen de la InlB, molécula proteica de 67 kDa que promueve el ingreso de listeria a los hepatocitos. <sup>(47, 48, 60)</sup>

- **Proteína p60.** La p60 es una proteína extracelular de 60 kDa, codificada por el gen *iap* (gen para la proteína asociada a la invasión). La expresión del gen *iap* es independiente de PrfA, y es controlado a nivel post transcripcional. <sup>(12, 58)</sup>

La proteína p60 que está asociada con la pared celular bacteriana es la responsable de la invasión intestinal y la supervivencia “*in vivo*” de *L. monocytogenes*. Esta proteína tiene una actividad mureína hidrolasa requerida para la formación del septo y esencial para la viabilidad celular, lo cual hace difícil determinar la función precisa de la p60 en la virulencia debido a que las mutaciones *iap* son letales; adicionalmente p60, es la proteína de mayor antigenicidad en la respuesta inmune contra *L. monocytogenes*. <sup>(33, 43, 100)</sup>

Cuando el gen que codifica para la p60 es afectado, las mutantes con bajos niveles de la proteína son filamentosas y manifiestan una pequeña o nula capacidad para invadir a las células hospederas. <sup>(47)</sup>

Se ha mostrado recientemente que la p60 es un antígeno importante en la respuesta inmune contra *L.monocytogenes*. <sup>(98)</sup>

- **ClpC ATPasa.** Ésta pertenece a la familia de proteínas Clp 100 kDa de choque térmico, implicadas en la tolerancia al estrés de varios microorganismos procarióticos y eucarióticos. Su papel en la invasión es el de promover el escape bacteriano del compartimiento fagosómico de los macrófagos pero, además, favorece la invasión *in vivo* de los hepatocitos, junto con la InlA, InlB y ActA. <sup>(75)</sup>
- **Listeriolisina O (LLO).** La LLO es una citolisina sulfhidrilo activada de 58 kDa, codificada por el gen *hly*, oxígeno lábil, perteneciente a una gran familia de citolisinas formadoras de poros activadas por grupos sulfhidrilo, cuyo prototipo es la estreptolisina O de *Streptococcus pyogenes*. La LLO se enlaza al colesterol de la

membrana celular e inserta y oligomeriza 20 a 80 monómeros que inducen la aparición de poros. <sup>(23)</sup>

Por último, la LLO induce la apoptosis, estimula a diversas cinasas y promueve la expresión de moléculas de adhesión y la generación de mediadores lipídicos en las células endoteliales infectadas. <sup>(17, 28)</sup>

- **Acta.** Esta proteína superficial de *L. monocytogenes* está formada por 610 aminoácidos, está codificada por el gen *ActA* y consta de tres dominios. <sup>(17, 14)</sup>
- **Lecitinasa.** También conocida como fosfolipasa C. La lecitinasa es secretada como un precursor inactivo (proPC-PLC) de 33 kDa, a partir del cual una escisión proteolítica en su región N-terminal genera la forma activa. Dicha activación puede ocurrir por alguno de dos mecanismos: el primero depende precisamente de la Mpl, dependiente de zinc, en tanto que, el segundo, es mediado por una proteasa de cisteína. <sup>(66)</sup>
- **Fosfolipasa C fosfatidilinositol-específica (PI-PLC).** A diferencia del mecanismo lítico utilizado por la LLO, esta enzima 33 kDa afecta a la membrana celular de las células hospederas hidrolizando al lípido de membrana PI (fosfatidilinositol). Además, está codificada por el gen *plcA*, desempeña un papel importante en el escape bacilar de las vacuolas de doble-membrana y su actividad catalítica es necesaria en otras numerosas funciones intracelulares de *L. monocytogenes*. <sup>(6)</sup>

### 2.3.6. Diagnóstico.

La presencia de *L. monocytogenes* ha sido ampliamente estudiada en ensilados destinados al consumo animal, en el ambiente, en muestras clínicas así como alimentos para el consumo humano. Las técnicas de detección de *Listeria* no constituyen sólo herramientas valiosas para identificar brotes epidémicos, sino también para prevenirlos. <sup>(46)</sup>

El diagnóstico se confirma únicamente tras el aislamiento del agente infeccioso a partir de la materia fecal, líquido cefalorraquídeo, sangre, líquido amniótico, placenta, material de lavado gástrico u otros sitios infectados. <sup>(46)</sup>

Los métodos microbiológicos tradicionales aún son el “Patrón de oro” para la identificación y detección rutinaria de *Listeria*. Estos métodos son importantes por varias razones: su empleo permite obtener el microorganismo en cultivo puro, normalmente estos métodos son muy sensibles y no requieren equipamiento sofisticado o caro. <sup>(46)</sup>

La detección de *Listeria* se ha ido desarrollando en los últimos años y podemos encontrar varios métodos basados en el uso de anticuerpos específicos frente a *Listeria* disponible en kits comerciales. Sin embargo, sólo unos pocos están disponibles para la detección específica de *L. monocytogenes*. El inmunoensayo enzimático (ELISA) es el más común de este tipo de ensayos inmunológicos. Es de fácil aplicación y es rápido, pero debe utilizarse para reconocer *L. monocytogenes* específicamente. Hay una prueba que utiliza anticuerpos monoclonales que reconocen la proteína p60 para la identificación de *L. monocytogenes*. <sup>(46)</sup>

Además, el serotipado y los métodos moleculares empleados para estudiar los subtipos de esta especie han mejorado notablemente la caracterización de *L. monocytogenes*, permitiendo diferenciar cepas y clones. Los métodos moleculares basados en análisis de ácidos nucleicos más utilizados en la caracterización de *L. monocytogenes* son la secuenciación de ADN, hibridación de ADN, PCR, amplificación al azar de polimorfismos del ADN (*random amplification of polymorphic DNA*, RAPD), el estudio de polimorfismos en los genes de RNAs ribosómicos (*ribotyping*), y la electroforesis en gel en campo pulsante (*pulsed field gel electrophoresis*, PFGE). <sup>(46)</sup>

Un método alternativo a los métodos convencionales muy empleado es la técnica de PCR ó PCR a tiempo real, ya que permite la identificación y la cuantificación de *Listeria* a través de las secuencias de sus ácidos nucleicos. Los métodos que utilizan la técnica de PCR tienen una sensibilidad superior si los comparamos con los inmunoensayos. Sin embargo, la compleja y

minuciosa preparación de la muestra y el uso de geles de agarosa obstaculizan la adaptación de este método de investigación para el uso rutinario en los laboratorios de microbiología. <sup>(46)</sup>

La electroforesis en gel en campo pulsante es una técnica muy utilizada en estudios epidemiológicos por su alta capacidad discriminatoria, ya que puede diferenciar cepas que se hallen muy próximas genéticamente, y también porque posee una buena reproducibilidad. Sin embargo, se trata de una técnica manual, delicada y lenta. <sup>(46)</sup>

Existen otra serie de técnicas prometedoras y más modernas, como el uso de bolas inmunomagnéticas recubiertas con anticuerpos anti-*Listeria* para la captura de *Listerias* de matrices de alimentos o de cultivos de enriquecimiento, el Test targeting RNA, basado en la amplificación de ARN, tecnología de *microarrays* o *biochips*, en los que muchas sondas se sitúan discretamente en un sustrato sólido o los biosensores, unas moléculas de origen biológico adjuntas a una señal de reconocimiento de *Listeria*. <sup>(46)</sup>

Por lo tanto, los avances tecnológicos y el desarrollo de la genómica bacteriana permitirán en los próximos años llevar a cabo la detección y el estudio de los subtipos moleculares de *L. monocytogenes* de forma mucho más fiable, identificando diferentes genes que podrán ser utilizados en técnicas diversas como la comparación de secuencias de múltiples genes (*multilocus sequence typing*, MLST), o de un único gen (*single locus sequence typing*, SLST) y mediante el uso de *microarrays*. <sup>(46)</sup>

**Tabla 3:** Algunos sistemas comerciales para la detección y la confirmación de *Listeria*.<sup>(64)</sup>

Prueba	Nivel ID	Principio	Tiempo aproximado de la prueba <sup>2</sup>	Compañía	Utilización principal
Gene Trak <i>Listeria</i> Assay	<i>Listeria</i> spp.	Hibridación de ácidos nucleicos con sondas	50 horas	Gene Trak	Detección
Gene Trak test for <i>L. monocytogenes</i>	<i>L. monocytogenes</i>	Hibridación de ácidos nucleicos con sondas	50 horas	Gene Trak	Detección
REVEAL for <i>Listeria</i>	<i>Listeria</i> spp.	Inmuno-cromatografía	43 horas	Neogen	Detección
Clearview <i>Listeria</i> (Oxoid <i>Listeria</i> Rapid Test)	<i>Listeria</i> spp.	Inmuno-cromatografía	43 horas	Oxoid	Detección
BAX for screening <i>L. monocytogenes</i>	<i>L. monocytogenes</i>	PCR	48 horas	Qualicon	Detección
BAX for screening <i>Listeria</i> Genus	<i>Listeria</i> spp.	PCR	48 horas	Qualicon	Detección
PROBELIA	<i>L. monocytogenes</i>	PCR	48 horas	Sanofi Diagnostics Pasteur	Detección
<i>Listeria</i> UniQue	<i>Listeria</i> spp.	ELISA	32 horas	TECRA	Detección
Listeritest	<i>Listeria</i> spp.	Separación Inmagnetomagnética	24-48 horas	Vicam	Detección
SwabCheck System	<i>Listeria</i> spp.	ELISA	24 horas	Biopath	Detección
MICRO-ID <i>Listeria</i>	<i>L. monocytogenes</i> /innocua complejo	Reacción enzimática	24 horas	Organon Teknika	Confirmación
Vitek System	<i>L. monocytogenes</i> /innocua complejo	Pruebas bioquímicas	24 horas	bioMérieux	Confirmación
API <i>Listeria</i>	<i>L. monocytogenes</i>	Pruebas bioquímicas	24 horas	bioMérieux	Confirmación
MicroLog System	<i>L. monocytogenes</i>	Uso de sustratos como fuente de carbono	4 o 24 horas	Biolog	Confirmación
MICROBACT 12L	<i>L. monocytogenes</i>	Utilización de carbohidratos y prueba de microhemólisis	4-6 o 24 horas	Microgen	Confirmación
Sherlock Microbial Identification System (MIS)	<i>L. monocytogenes</i> /innocua complejo	Patrones de ácidos grasos	90 minutos	Microbial ID	Confirmación
Gen-Probe (AccuProbe)	<i>L. monocytogenes</i>	Hibridación de ácidos nucleicos con sondas	30 minutos	Gen Probe	Confirmación
Microscreen	<i>Listeria</i> spp.	Agglutinación con latex	1 minuto	Microgen BioProducts	Confirmación
<i>Listeria</i> Tek	<i>Listeria</i> spp.	ELISA	50 horas	Organon Teknika	Detección
TECRA <i>Listeria</i> Visual Immunoassay (TLVIA)	<i>Listeria</i> spp.	ELISA	50 horas	TECRA	Detección
Assurance <i>Listeria</i> EIA	<i>Listeria</i> spp.	ELISA	50 horas	BioControl Systems	Detección
VIP <i>Listeria</i>	<i>Listeria</i> spp.	Inmuno-cromatografía	2 minutos (después del enriquecimiento)	BioControl Systems	Detección
VIDAS <i>Listeria</i> (LIS)	<i>Listeria</i> spp.	ELISA	50 horas	bioMérieux	Detección
VIDAS <i>Listeria</i> monocytogenes (LMO)	<i>L. monocytogenes</i>	ELISA	50 horas	bioMérieux	Detección
Foodproof <i>Listeria</i> monocytogenes	<i>L. monocytogenes</i>	PCR	48 horas	Biotecon Diagnostics	Detección
Transia Plate <i>Listeria</i>	<i>Listeria</i> spp.	ELISA	50 horas	Diffchamb	Detección
Transia Plate <i>Listeria</i> monocytogenes	<i>L. monocytogenes</i>	ELISA	50 horas	Diffchamb	Detección
Dynabeads anti- <i>Listeria</i>	<i>Listeria</i> spp.	Separación Inmagnetomagnética	48-72 horas	Dynal	Detección
EIAFOSS <i>Listeria</i>	<i>Listeria</i> spp.	ELISA automatizado	48 horas	Foss Electric	Detección

## 2.4. ELISA.

Los términos que describen los procedimientos de inmuno análisis ligados a enzimas son inmuno análisis enzimáticos (EIA), análisis inmuno absorbente ligado a enzimas (ELISA) o inmuno ensayo enzimático, es una técnica en la cual uno de los reactantes, el anticuerpo o el antígeno se fija en un soporte sólido antes de su interacción con el reactante complementario, con un anticuerpo conjugado y un substrato-cromógeno que indica y detecta la presencia del reactante a analizar virando a un color. <sup>(9)</sup>

Pruebas inmuno enzimáticas (ELISA o EIA), (enzyme-linked-immuno-sorbent-assay), descritos hace 25 años, se basan en dos fenómenos biológicos importantes:

- La elevada especificidad de los Ac.
- La alta actividad de algunas enzimas usadas en este tipo de ensayos, lo que permite la amplificación de la señal generada por la muestra. <sup>(9)</sup>

Independientemente de los esquemas experimentales empleados, los ELISA comprenden dos etapas generales: donde una de ellas consiste en la reacción de un inmunorreactante con un Ag o Ac, además de la detección de ese inmunorreactante mediante la utilización de un conjugado enzimático. <sup>(9)</sup>

La sencillez de ELISA, sumada a la potencialidad de los Ac monoclonales (AcMo) hace que día a día se vayan imponiendo sobre métodos tales como aquellos basados en la utilización de un trazador radiactivo (radioinmunoanálisis) RIA, un trazador emisor de luz (quimioluminiscencia) o un trazador fluorescente (fluorografía). La gran ventaja de ELISA sobre otros métodos reside en que no requiere un equipamiento demasiado sofisticado para su implementación en el laboratorio. <sup>(9)</sup>

El ELISA se basa en el uso de antígenos o anticuerpos marcados con una enzima, de forma que los conjugados resultantes tengan actividad tanto inmunológica como enzimática. Al estar uno de los componentes (antígeno o anticuerpo) marcado con una enzima e insolubilizado



sobre un soporte (inmuno adsorbente) la reacción antígeno-anticuerpo quedará inmobilizada y, por tanto, será fácilmente revelada mediante la adición de un substrato específico que al actuar la enzima producirá un color observable a simple vista o cuantificable mediante el uso de un espectrofotómetro o un colorímetro. <sup>(9)</sup>

Una de las grandes ventajas de la técnica ELISA es la posible automatización de la lectura y, por lo tanto, su objetividad. Dicha automatización se puede conseguir con un simple colorímetro o espectrofotómetro de cubeta o con sofisticados equipos de lectura automática de micro placas. <sup>(9)</sup>

Los resultados finales de la lectura colorimétrica se reflejan numéricamente mediante valores de absorbancia o densidad óptica que se obtendrán a la longitud de onda más adecuada para la coloración final alcanzada. <sup>(9)</sup>

**Figura 3:** Representación esquemática de la técnica de ELISA indirecta. (Tomada de <http://www.sanidadanimal.info/cursos/inmuno2/ca051.htm>)



## 2.5. Cuantificación de proteínas.

Para extraer proteínas solubles celulares, se debe desarrollar un método eficaz de ruptura celular el cual libere a la proteína de su compartimento intracelular como por ejemplo con acción mecánica adicionando su respectivo amortiguador de lisis, en una forma soluble en una solución de composición bien definida.<sup>(10)</sup>

Existen diferentes métodos para la cuantificación de proteínas. Muchos de estos métodos se basan en:

- La propiedad intrínseca de las proteínas para absorber luz en el UV.
- La formación de derivados químicos.
- La capacidad que tienen las proteínas de unir ciertos colorantes. En la Tabla 4 se recogen los métodos más usados así como sus respectivas sensibilidades.<sup>(10)</sup>

**Tabla 4:** Principales métodos para la cuantificación de proteínas y sus rangos de sensibilidad.<sup>(10)</sup>

Método	Rango de sensibilidad (µg)	Coefficiente de extinción o Cálculo de la concentración
<b>Métodos de Absorción</b>		
A <sub>280</sub>	100-3000	$\epsilon_{280} = 1 \text{ mL/mg cm}$
A <sub>205</sub>	3-100	$\epsilon_{205} = 31 \text{ mL/mg cm}$
A <sub>280</sub> - A <sub>260</sub>	100-3000	Proteína (mg/mL) = $(1.55A_{280} - 0.76A_{260})$
A <sub>235</sub> - A <sub>280</sub>	25-700	Proteína (mg/mL) = $(A_{235} - A_{280})/2.51$
A <sub>224</sub> - A <sub>235</sub>	5-180	Proteína (mg/mL) = $(A_{224} - A_{235})/0.6$
A <sub>215</sub> - A <sub>225</sub>	2-45	Proteína (µg/mL) = $144(A_{215} - A_{225})$
<b>Métodos Derivados Colorimétricos</b>		
Biuret	1000-10000	$\epsilon_{545} = 0.06 \text{ mL/mg cm}$
Lowry	25-100 a 500 nm 2-30 a 660 nm 1-2 a 750 nm	Usar curva estándar
Bradford	1-15	$\epsilon_{595} = 81 \text{ mL/mg cm}$
BCA	0.5- 10	Usar curva estándar
<b>Métodos Derivados Fluorimétricos</b>		
o-ftalaldehido	1-5 $\lambda_{excitación}$ a 340 nm $\lambda_{emisión}$ a 475 nm	Usar curva estándar

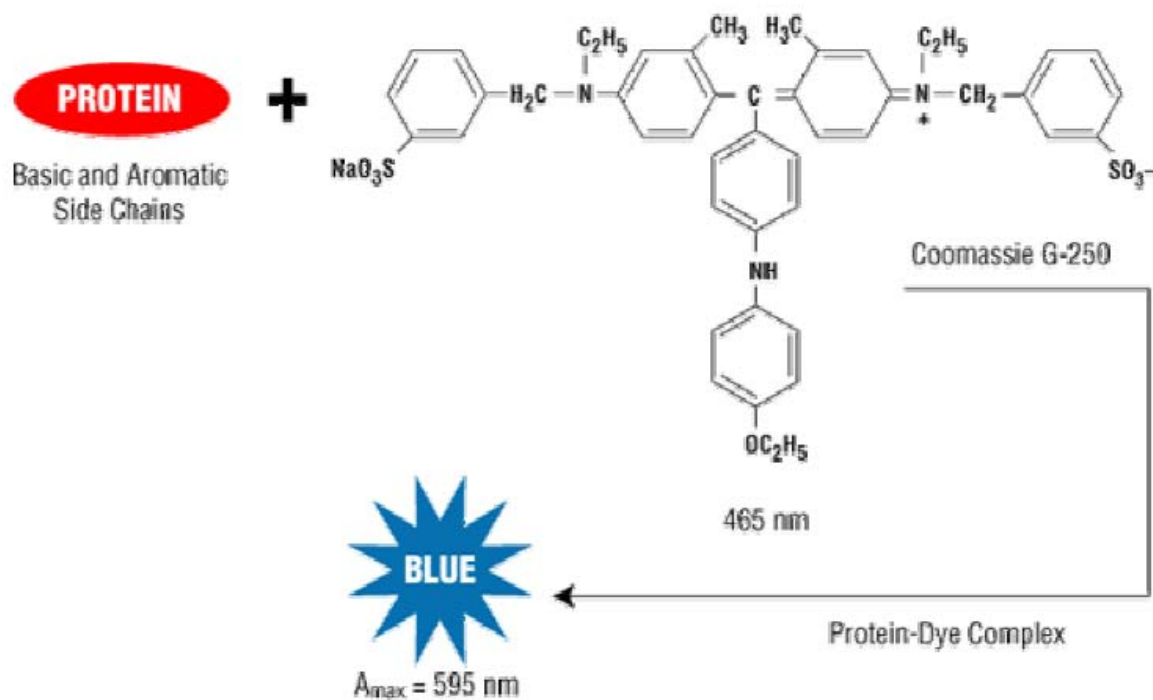
### 2.5.1. Método de Bradford.

El método de Bradford, es un procedimiento simple para la determinación de las concentraciones de proteínas en soluciones, que dependen del cambio en la absorbancia por las uniones entre el azul de Coomassie G-250 con la proteína. Existe una relación directa entre el desarrollo de color y la concentración de proteínas. Contrario a otras técnicas, incluyendo el método de Lowry, el ensayo de Bradford no es susceptible a interferencias ocasionadas por una gran variedad de químicos en las muestras. <sup>(10)</sup>

#### Principio.

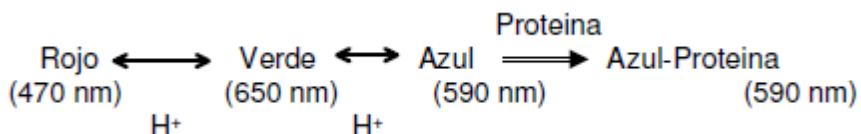
Algunas moléculas presentan afinidad por las proteínas y pueden fijarse a ésta de manera no covalente al colorante azul de Coomassie que cambia de rojo a azul. <sup>(10)</sup>

**Figura 4:** Reacción de la proteína con el colorante azul de Coomassie.



## Características del método

El colorante presenta diferencias en color en función de la carga.



Forma aniónica interacción con las proteínas (grupos básicos y aromáticos).

Sensibilidad 0.001 a 0.1 mg/ml.

Presenta inestabilidad del color en función del pH. <sup>(10)</sup>

## 2.6. ELECTROFORESIS.

La electroforesis es un método analítico semi preparativo, en el que se separan biomoléculas, en dependencia entre otros factores de su carga y bajo la acción de un campo eléctrico, fue empleado por primera vez por *Tiselius* en el año 1937. *Raymond y Weintraub* en 1959 emplearon como soporte para la electroforesis un gel de poliacrilamida (PAGE), posteriormente el método fue perfeccionado por varios investigadores como *Davis y Ornstein*. La popularidad de este creció rápidamente y se logró un aumento de la resolución. El dodecil sulfato de sodio (SDS) se introduce en esta técnica en 1970, y ya en 1972 se emplean agentes reductores y SDS en la determinación del peso molecular de proteínas en lo que se denominó electroforesis en geles de poliacrilamida con SDS (SDS-PAGE). <sup>(65)</sup>

Es de destacar que a escala analítica, los métodos electroforéticos son de alta sensibilidad, poder de resolución y versatilidad, y sirven como método de separación de mezclas complejas de ácidos nucleicos, proteínas y otras biomoléculas, donde aportan un potente criterio de pureza. Se pueden conocer también mediante estas técnicas, las características ácido-básicas de las proteínas presentes en un extracto crudo, lo que da la información necesaria si se pretende realizar una separación cromatográfica basada en diferencias de carga. Es útil además para determinar otros parámetros como peso molecular, punto isoeléctrico y número de cadenas polipeptídicas de las proteínas. <sup>(65)</sup>

## Fundamentos de la electroforesis.

La electroforesis es la migración de solutos iónicos bajo la influencia de un campo eléctrico; Estas partículas migran hacia el cátodo o ánodo (electrodos - y +), en dependencia de una combinación de su carga, peso molecular y estructura tridimensional. <sup>(65)</sup>

La velocidad de migración (v) de la partícula es directamente proporcional al producto de su carga efectiva (q) y el gradiente de potencial eléctrico (E) e inversamente proporcional al coeficiente de fricción (f) relativo al tamaño y forma de la molécula, o sea, a la resistencia que le ofrece el medio. <sup>(65)</sup>

$$V = q E / f$$

La movilidad electroforética (Me) es un caso particular de la velocidad de migración de un ión, cuando se aplica un campo eléctrico de 1 V/cm. Su signo es igual al de la carga de la partícula. <sup>(65)</sup>

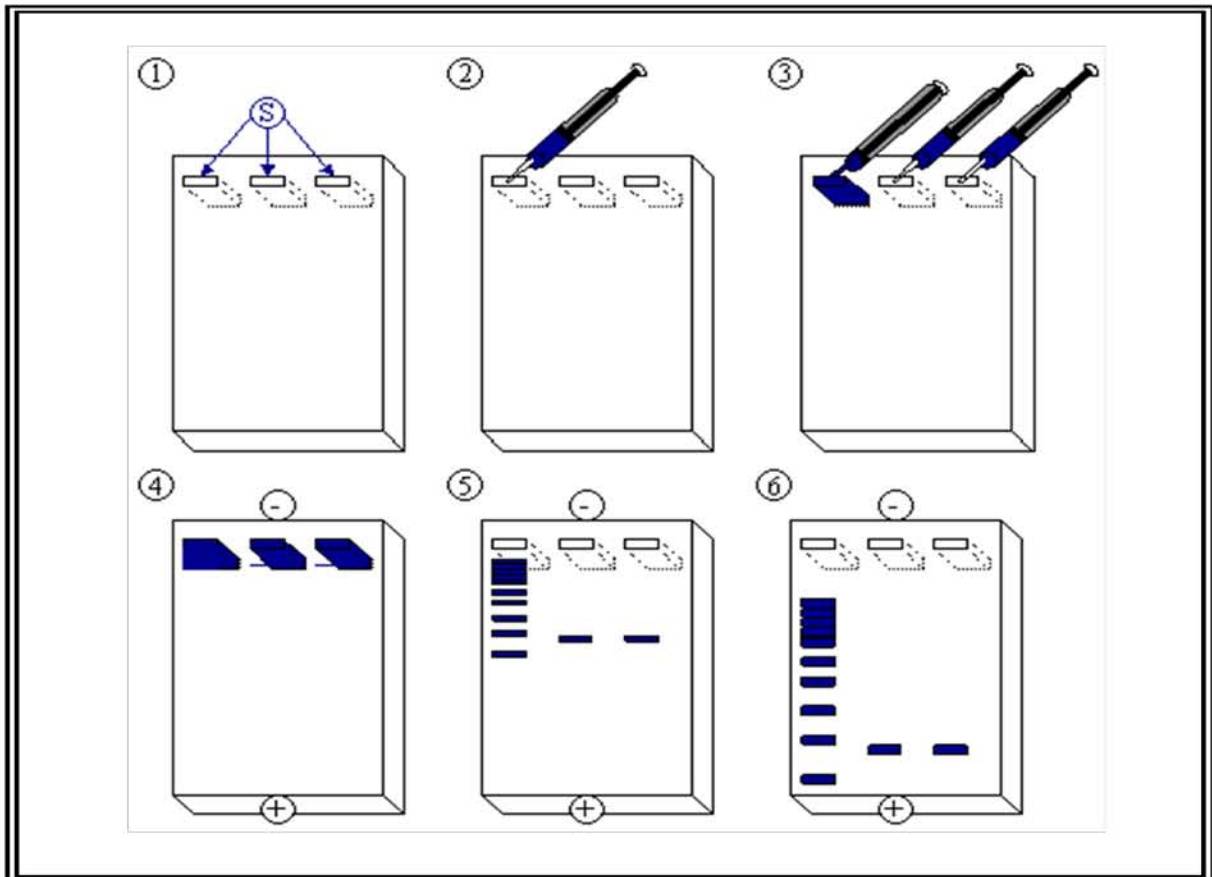
La velocidad de migración electroforética depende de la densidad de carga de la molécula (relación carga / peso), del voltaje aplicado y de la porosidad del gel de electroforesis. El voltaje no se puede incrementar indiscriminadamente porque se genera un excesivo calor. En contraste, al aplicar bajo voltaje puede ocurrir una pobre separación, por causa de la difusión por tiempo muy prolongado de la corrida electroforética. <sup>(65)</sup>

La mayoría de las biomacromoléculas (proteínas, ácidos nucleicos y polisacáridos) poseen determinada carga eléctrica con grupos aniónicos y catiónicos capaces de disociarse. La carga neta de la partícula está dada por el pH del medio y puede ser modificada por la interacción con pequeñas moléculas de iones u otras macromoléculas. De lo anterior se deduce que el pH influye sobre la velocidad de migración de las moléculas. En el punto isoelectrico de la biomolécula, pH al cual su carga neta es 0, esta no migra. Por debajo del punto isoelectrico tiene carga neta positiva y migra hacia el cátodo, y por encima del punto isoelectrico tienen carga neta negativa y migra hacia el ánodo. <sup>(65)</sup>

## **Formación del gel de poliacrilamida.**

Los geles de poliacrilamida se forman por la polimerización vinílica del monómero acrilamida  $\text{CH}_2=\text{CH}-\text{CO}-\text{NH}_2$  y del monómero entrecruzador N, N'-metilen-bis-acrilamida  $\text{CH}_2 = \text{CH}-\text{CO} - \text{NH} - \text{CH}_2 - \text{NH} - \text{CO} - \text{CH} = \text{CH}_2$ . La polimerización se inicia con la formación de radicales libres del monómero, que se producen por radicales libres de oxígeno, por causa de la acción de iones persulfato. Las aminas terciarias como el N, N, N, N'-tetrametilen-diamina (TEMED) se emplean como catalizadores de esta reacción, porque causan la formación de radicales libres del persulfato. Esta reacción es fuertemente inhibida por altos niveles de oxígeno, por lo que la solución debe ser desgasificada para lograr una formación de gel reproducible. Hay muchos factores que desempeñan una función importante en la separación electroforética, como son pH, fuerza iónica, gradiente de potencial, tiempo de corrida, concentraciones de acrilamida y bis acrilamida, etc. Las condiciones óptimas de una buena separación, en la práctica se determinan experimentalmente, con el análisis de cómo influyen los diferentes factores en la electroforesis en cuestión. La naturaleza de la muestra sirve de guía para alcanzar las condiciones en la que se deben obtener los mejores resultados. <sup>(65)</sup>

**Figura 5:** Representación esquemática de la técnica de Electroforesis: 1, preparación del gel; 2, colocar patrón de pesos moleculares; 3, colocar muestras; 4, conectar a la fuente; 5, avance de corrida; 6, fin de la corrida. (Tomada de <http://www.sanidadanimal.info/cursos/inmuno2/ca051.htm>)



### 3. JUSTIFICACIÓN DEL PROBLEMA.

*L. monocytogenes* es un microorganismo ubicuo y es muy común la exposición habitual de los animales y del hombre a este microorganismo. Muchos individuos sanos son portadores intestinales (2–6 %) y se ha descrito la prevalencia de anticuerpos séricos anti-*L. monocytogenes* en un nivel tan alto como del 53 %. El nivel de portadores en los animales es similar al de humanos, con algunas diferencias dependiendo de la especie y una tasa algo mayor durante la estación de estabulación en comparación con la de pastoreo de los animales.

En las pruebas serológicas de diagnóstico para *L. monocytogenes* se ha observado que pueden presentar reacciones cruzadas entre las diferentes especies del género *Listeria*, por lo tanto, es evidente la necesidad de contar con una prueba serológica como es la técnica de ELISA indirecta, para llevar a cabo la detección oportuna de animales portadores de este microorganismo, empleando la proteína p60 de las diferentes especies del género *Listeria*, como antígeno.



#### 4. OBJETIVOS.

##### Objetivo general.

- Conocer el comportamiento de la proteína p60 de las diferentes especies del género *Listeria* (*L. ivanovii*, *L. welshimeri*, *L. seeligeri*, *L. innocua*, *L. grayi*, *L. monocytogenes*), empleada como antígeno en la técnica de ELISA indirecta para el diagnóstico de *Listeria monocytogenes* en sueros de cabras.

##### Objetivos particulares.

- Aislar y purificar la proteína p60 de las diferentes especies del género *Listeria* (*L. ivanovii*, *L. welshimeri*, *L. seeligeri*, *L. innocua*, *L. grayi*, *L. monocytogenes*), por medio de una precipitación con ácido tricloroacético.
- Evidenciar su presencia mediante electroforesis en gel de poliacrilamida.
- Conocer el grado de reacción cruzada que existe entre las diferentes especies de *Listeria* empleando la técnica de ELISA indirecta, utilizando como Ag la proteína p60 de cada especie frente a 20 sueros procedentes de una granja caprina con aislamientos previos de *Listeria monocytogenes*.
- Detectar anticuerpos contra *Listeria monocytogenes* en sueros de cabras del Estado de Puebla, utilizando la técnica de ELISA indirecta previamente estandarizada.
- Valorar el grado de reacción cruzada entre las dos cepas consideradas como patógenas para las cabras (*L. ivanovii* y *L. monocytogenes*), los sueros positivos a *Listeria monocytogenes* obtenidos en la prueba de ELISA indirecta, procedentes del Estado de Puebla.

## 5. MATERIALES Y METODOS.

### Muestras biológicas.

Se emplearon 6 cepas ATCC de *Listeria*, donadas del cepario del Instituto politécnico Nacional.

- *Listeria ivanovii* (1786).
- *Listeria welshimeri* (35897).
- *Listeria seeligeri* (35967).
- *Listeria innocua* (3304).
- *Listeria grayi* (19120).
- *Listeria monocytogenes* (244).

Se analizaron 847 sueros procedentes de diferentes poblaciones caprinas del Estado de Puebla, de los cuales:

- 754 sueros eran de animales estabulados.
- 93 sueros eran de animales no estabulados.

### 5.1 Activación de cepas empleadas.

Se activaron las 6 cepas ATCC de *Listeria*, de la siguiente manera:

1. Se prepararon tubos con 3 ml de caldo BHI cada uno.
2. Se realizaron prueba de esterilidad y se incubó por 24 hrs a 37 °C.
3. Se inocularon los tubos de caldo BHI con 300 µl de cepa.
4. Se incubaron por 24 hrs a 37 °C.
5. Se sembraron las diferentes cepas en agar BHI y se incubaron por 24 hrs a 37 °C.
6. Se realizaron pruebas bioquímicas primarias para confirmar el género.

## 5.2. Obtención de la proteína p60.

Una vez que se comprobó que las cepas estaban puras se procedió a la obtención de la proteína p60, siguiendo la metodología empleada por Ramírez G. y colaboradores en 2006.

1. Se tomó una colonia de *Listeria spp*, de 24 hrs de incubación se pasaron a 30 ml de caldo BHI y se incubaron por 24 hrs a 37 °C.
2. Una vez transcurridas las 24 hrs de incubación se pasaron los 30 ml de caldo BHI a 300 ml de caldo BHI.
3. Se incubaron por 10 hrs a 37 °C en agitación 100 rpm.
4. Transcurrido este tiempo se centrifugaron a 5000 rpm por 25 min.
5. El sobrenadante se guardó 24 hrs a refrigeración.
6. Se agregó 70 g de ácido tricloroacético por litro de caldo BHI, se adicionó lentamente y con agitación, para precipitar la proteína p60.
7. Se guardó el precipitado en congelación por una hora.
8. Pasado este tiempo se pasó a 4 °C por 2 hrs.
9. Se centrifugó a 7000 rpm por 30 min.
10. Se lavó con acetona.
11. Se centrifugó a 7000 rpm por 30 min.
12. Se resuspendió la pastilla en PBS pH 7.2.
13. Se agregó un anti proteolítico, para evitar la degradación de la proteína.
14. Se congeló a -20 °C.

### 5.3. Cálculo de la concentración de la proteína p60, por el método de Bradford.

**Tabla 5:** Cálculo de la concentración de proteínas en la muestras problemas.

	<b>VOL. DE MUESTRA (ml)</b>	<b>VOL DE AGUA DESTILADA (ml)</b>	<b>VOL. R. BRADFORD (ml)</b>
<i>L. ivanovii</i>	1	0	5
<i>L.welshimeri</i>	1	0	5
<i>L. seeligeri</i>	1	0	5
<i>L. innocua</i>	1	0	5
<i>L. grayi</i>	1	0	5
<i>L. monocytogenes</i>	1	0	5
<b>BLANCO</b>	0	1	5

1. Se agitó en el vortex.
2. Se leyó a 595 nm.
3. Se diluyó la muestra 1:20 para favorecer la lectura.

NOTA: *Todo el material debe de estar completamente libre de proteínas; se lava con metanol se agita y se enjuaga con agua destilada, la celda también se lava con metanol.*

#### **5.4. Técnica de electroforesis para evidenciar la presencia de la proteína p60.**

Armada de cámara:

1. El vidrio grande va adelante y el de la muestra va atrás, separados por una pestaña plástica y prensados por medio de tornillos los cuales vienen con el equipo.
2. Sellar con masking-tape la base (solo sobre los vidrios para que al final se desprenda fácil) y así evitar que se salga el gel, en caso de fugas por los costados apretar un poco más.
3. Colocar el gel tapón rápido porque gelifica casi instantáneamente.
4. Colocar el gel separador.
5. Agregar isopropanol para nivelar.
6. Dejar solidificar 15 min aproximadamente.
7. Retirar el alcohol y se coloca el peine.
8. Agregar el gel concentrador.
9. Dejar gelificar 30 min aproximadamente, (quitar el masking-tape).
10. Colocar patrones de pesos moleculares y muestras (previamente digeridas).  
(NOTA: Los pozos se llenan con el volumen equivalente de tampón de muestra para mantener uniforme la resistencia electrostática en el fondo del gel).
11. Llenar con amortiguador de corrida abajo y entre los vidrios hasta que quede un poco más arriba de las muestras para un corrimiento uniforme.
12. Tapar la cámara y colocar los electrodos.
13. Dejar correr a 100 V, 15 mA hasta que la marca del colorante llegue al gel tapón.
14. El gel se dejó toda la noche aproximadamente 15 hrs en solución teñidora azul de Coomassie.
15. Se decoloro con solución desteñidora I por 5 hrs en agitación. Se realizaron 3 cambios de solución desteñidora en este tiempo.

### 5.5. Estandarización de la técnica de ELISA indirecta.

Se utilizaron como antígenos la p60 de cada especie frente a 20 sueros procedentes de una granja con aislamientos previos de *L. monocytogenes* en animales y en ensilados.

1. Se diluyó el antígeno 1:10 en PBS carbonatos pH 9.6.
2. Se agregaron 100  $\mu$ L/pozo en microplacas (Costar 9018 EIA/RIA plate 96 pozos fondo plano de poliestireno).
3. Se incubó 12 hrs. a 4 °C. Se lavó 5 veces con PBS Tween 0.05 % por 3 min. Cada uno en agitación, invirtiendo y golpeando sobre un papel absorbente.
4. Se bloqueó con 150  $\mu$ L/pozo de leche descremada (Svelty) al 5 % en PBS. Se incubó 2 hrs a 37 °C. Se lavó 5 veces con PBS Tween 0.05 % por 3 min. Cada uno en agitación, invirtiendo y golpeando sobre un papel absorbente.
5. Se agregaron 100  $\mu$ L/pozo de muestra sérica en diluciones dobles desde 1:200 hasta 1:1600, se incubó 1 hr a 37 °C. Se lavó 5 veces con PBS Tween 0.05 % por 3 min. Cada uno en agitación, invirtiendo y golpeando sobre un papel absorbente.
6. Se adicionaron 100  $\mu$ L/pozo de conjugado (Immuno Research 305-035-045). Se incubó 30 min a 37 °C. Se lavó 5 veces con PBS Tween 0.05 % por 3 min. Cada uno en agitación, invirtiendo y golpeando sobre un papel absorbente.
7. Se adicionaron 100  $\mu$ L/pozo de sustrato (O-fenilendiamina, 0.4 mg/mL, agregar 40  $\mu$ L de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 30 %). Incubar 5 min a 37 °C.
8. Se paró la reacción con H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 3 M, se dejó 5 min a temperatura ambiente.
9. Se leyó en un lector de ELISA (Marca OPSYS MR DINEX TECHNOLOGIES REVELATION 4.225), a 450 nm.

## 6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

Activación de las cepas. Todas las cepas presentaron colonias típicas del género *Listeria*, se observaron colonias puntiformes, translúcidas, color blanco, ver figura 6.

**Figura 6:** Crecimiento después de 24 hrs de cepas de *Listeria* en agar BHI.



Para la obtención de la proteína p60 de cada una de las especies estudiadas, esta se obtuvo al final de la fase de crecimiento logarítmica de la bacteria esto para evitar reacciones cruzadas con otros microorganismos ya que al entrar en la fase estacionaria puede fraccionarse y dar reacciones cruzadas con otras proteínas como resultado se obtuvo un precipitado blanquecino para las seis especies de *Listeria*, el cual se cuantificó por el método de Bradford obteniéndose concentraciones muy similares ver tabla 6, esto se puede atribuir a que la proteína p60 es una proteína la cual se desprende de la pared y queda en el sobrenadante como una exotoxina, codificada por el gen *iap*, y presente en todas las especies del genero *Listeria*.<sup>(80)</sup>

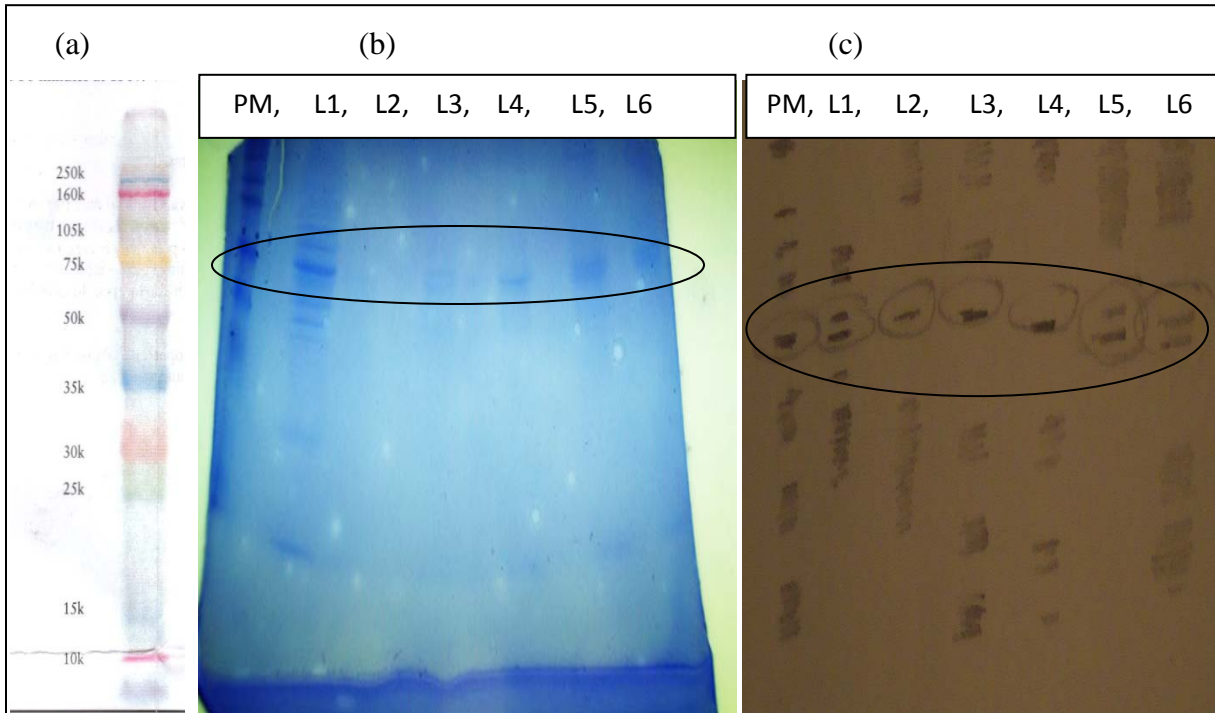
**Tabla 6:** Resultados concentración de proteína p60.

	<b>ABS. 595 nm.</b>	<b>CONCENTRACIÓN P60 (µg/mL)</b>
<i>L. ivanovii</i>	0.270	2784.55
<i>L. welshimeri</i>	0.272	2815.44
<i>L. seeligeri</i>	0.269	2769.11
<i>L. innocua</i>	0.272	2815.44
<i>L. grayi</i>	0.264	2691.89
<i>L. monocytogenes</i>	0.276	2877.22

Con la técnica de electroforesis, se logró obtener un gel el cual evidenció las bandas correspondientes al peso molecular de la p60 (60 kDa), Marly, afirma que los métodos electroforéticos son de alta sensibilidad, poder de resolución y versatilidad, y sirven como métodos de separación de mezclas compleja de ácidos nucleicos, proteínas y otras biomoléculas, los cuales aportan un potente criterio de pureza, por esta razón se realizó esta técnica la cual fue bastante útil puesto que permitió evidenciar las bandas pertenecientes a la proteína p60 de cada una de las especies de *Listeria*. En general se observan todas las p60 con un peso molecular de 60 kDa y otras pequeñas bandas las cuales se atribuyen a otras proteínas pertenecientes a este microorganismo, ver figura 7.



**Figura 7:** Representación de los resultados electroforéticos. (a) pesos moleculares, (b) gel de electroforesis, (c) dibujo representativo del gel de electroforesis. (PM Patrón de pesos moleculares; L1 *L. ivanovii*; L2 *L. welshimeri*; L3 *L. seeligeri*; L4 *L. innocua*; L5 *L. grayi*; L6 *L. monocytogenes*.



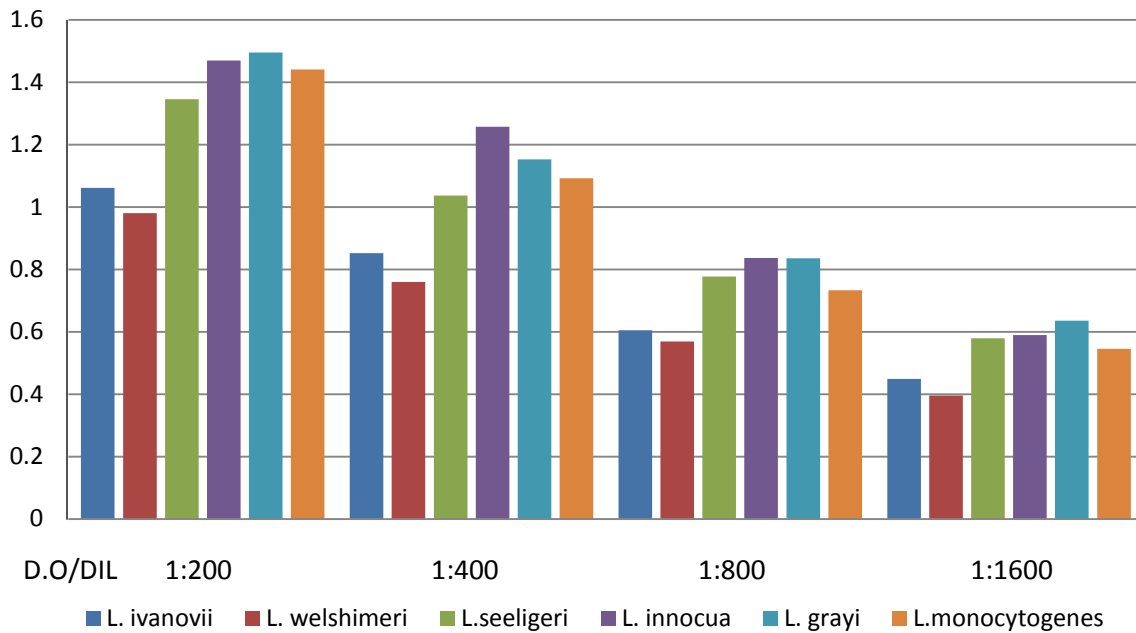
Para estandarizar la técnica de ELISA indirecta se emplearon 20 sueros procedentes de una granja con aislamientos previos de *L. monocytogenes*, en la cual se empleo como antígeno la proteína p60 de las diferentes especies del género *Listeria* (*L. ivanovii*, *L. welshimeri*, *L. seeligeri*, *L. innocua*, *L. grayi*, *L. monocytogenes*), a una concentración de 0.5 mg/mL y se realizaron diluciones dobles de las muestras séricas desde 1:200 hasta 1:1600 esto según lo reportado por Ramírez G. y colaboradores en 2006, que ha diluciones de 1:100 se obtiene un elevado porcentaje de sueros positivos lo cual nos hace pensar que a esta dilución los anticuerpos contra *L. monocytogenes* presentes en los animales reconocen a la proteína p60 de las otras especies estudiadas ver gráfica 1. Por lo cual se considero que lo más conveniente era trabajar con diluciones mayores a 1:200.<sup>(83)</sup>

Se puede observar en la gráfica 1 que *L. ivanovii*, que es la de mayor importancia después de la *L. monocytogenes* en afectar severamente a las cabras, presenta un menor grado de reacción cruzada en comparación con *L. seeligeri*, *L. innocua* y *L. grayi*; en la prueba con los sueros procedentes de la granja utilizada como referencia a listeriosis, y esto se confirma al evaluar los sueros positivos a la p60 de *L. monocytogenes* mediante la prueba de ELISA ahora utilizando como Ag la proteína p60 de *L. ivanovii*.

*L. ivanovii* desarrolla un ciclo de vida intracelular similar a *L. monocytogenes* ya que posee la isla de patogenicidad LIPI-1 de 9 kDa y es conocida como grupo de genes de virulencia *PrfA* dependiente donde se encuentran los factores de virulencia responsables de su parasitismo intracelular (*prfA*, *plcA*, *hly*, *mpl*, *actA* y *plcB*). Estas islas tienen una similitud genética entre el 73 y el 78 % lo que explicaría el comportamiento serológico diferente de la p60 de *L. ivanovii* al compararla con la de *L. monocytogenes*, ver gráfica 1. <sup>(13, 80, 98)</sup>

El LIPI-1 no está presente en el genoma de las especies saprofitas del género *Listeria*, a excepción de *L. seeligeri*; esto explica el porqué de las lecturas altas en la granja de referencia a listeriosis al menos para *L. seeligeri*. En cuanto a *L. grayi* y *L. innocua*; podemos suponer que los animales de esta granja han estado en contacto con las diferentes especies del género *Listeria* y sus lecturas están dadas por la presencia de anticuerpos contra *L. monocytogenes* o bien *L. seeligeri*. <sup>(13, 80, 98)</sup>

**Gráfica 1:** Respuesta serológica a la proteína p60 de cada especie de *Listeria* mediante la técnica de ELISA indirecta.



Para sacar el punto de corte se tomaron los valores obtenidos del análisis de los 20 sueros procedentes de una granja en la cual se han tenido reportes de listeriosis, a los cuales se les obtuvo la media de las lecturas de D.O obtenidas la cual fue de 1.453, además de la desviación estándar la cual fue 0.2586 la cual se empleo para sacar los limites superior e inferior para los rangos positivos y negativos, para esto, se tomo una desviación estándar hacia arriba y una hacia abajo del resultado de la media de las lecturas obtenidas de dicha granja. Finalmente se tomaron como positivas las lecturas de D.O mayor o igual a 1.195, como sospechosos las lecturas entre 0.937 y 1.195 y como negativas todas las lecturas que se encuentran por debajo de 0.937 ver tabla 8.

Ejemplo de determinación de los rangos para determinar sueros positivos, sospechosos y negativos:

**Tabla 7:** Lecturas de densidad óptica obtenidas de los 20 sueros procedentes de la granja de referencia a listeriosis.

<b>Suero</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>	<b>6</b>	<b>7</b>	<b>8</b>	<b>9</b>	<b>10</b>
<b>D.O</b>	1.139	1.33	1.02	1.77	1.5	1.48	1.21	1.35	1.54	1.57
<b>Suero</b>	<b>11</b>	<b>12</b>	<b>13</b>	<b>14</b>	<b>15</b>	<b>16</b>	<b>17</b>	<b>18</b>	<b>19</b>	<b>20</b>
<b>D.O</b>	1.17	1.11	1.29	1.391	1.625	2.02	1.41	1.83	1.558	1.753

Calculo de la media:

$$\bar{x} = \frac{\sum_{i=1}^n x_i n_i}{N}$$

$$\bar{X} = \frac{1.139+1.33+1.02+1.77+1.5+1.48+1.21+1.35+1.54+\dots+1.391+1.625+2.02+1.141+1.83+1.558+1.753}{20} = 1.453$$

Calculo de la varianza:

$$S^2 = \frac{\sum_{i=1}^n x_i^2 n_i}{N} - \bar{x}^2$$

$$S^2 = \frac{1.139^2+1.33^2+\dots+1.558^2+1.753^2}{20} - (1.453)^2 = 0.0668$$

Calculo de la desviación estándar:

$$S_x = \sqrt{S^2}$$

$$S_x = \sqrt{0.0668} = 0.2586$$

Y las lecturas de densidad óptica obtenidas con las especies saprófitas (*L. welshimeri*, *L. seeligeri*, *L. innocua*, *L. grayi*.), en el rango establecido para los negativos y sospechosos podría deberse a que si el microorganismo entra al intestino y atraviesa la mucosa intestinal por algún mecanismo desconocido puede llegar a una respuesta inmune a niveles bajos debido a que el estímulo antigénico sería muy corto antes de ser destruido por el organismo. <sup>(95)</sup>

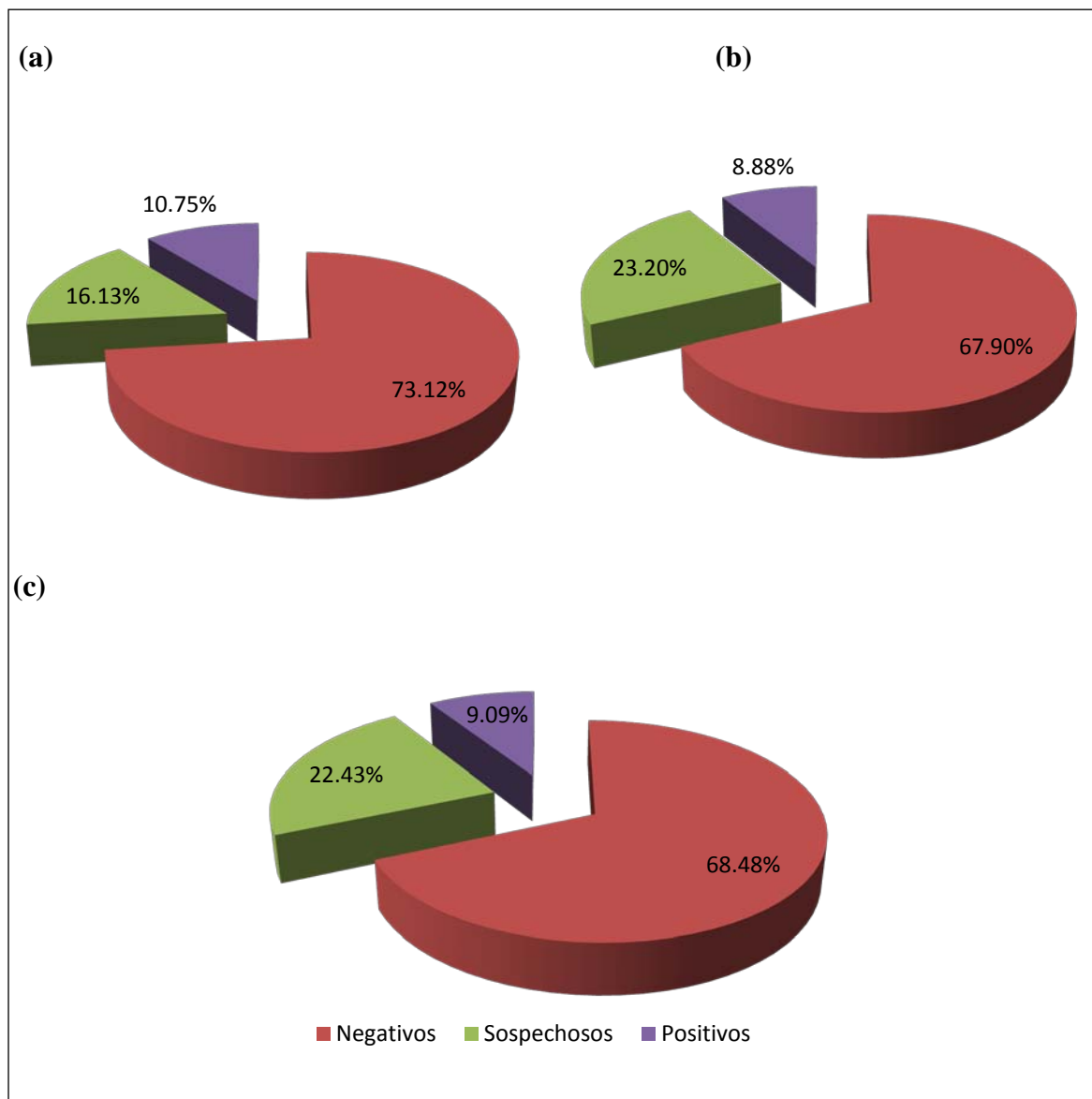
**Tabla 8:** Rangos para determinar sueros positivos, sospechosos y negativos.

		<i>L.ivanovii</i>	<i>L.welshimeri</i>	<i>L.seligeri</i>	<i>L.innocua</i>	<i>L.grayi</i>	<i>L.monocytogenes</i>
Media		1.062	0.981	1.346	1.47	1.495	1.453
Desv. Estand.		0.246	0.169	0.263	0.248	0.251	0.258
Positivos	L.S	1.3008	1.15	1.609	1.718	1.746	1.711
	L.I	0.816	0.812	1.083	1.222	1.244	1.195
Sospechosos	L.S	0.816	0.812	1.083	1.222	1.244	1.195
	L.I	0.57	0.643	0.82	0.974	0.993	0.937
Negativos		≤ 0.57	≤ 0.643	≤ 0.82	≤ 0.974	≤ 0.993	≤ 0.937

**L.S.- Límite superior.****L.I.- Límite inferior.**

En el análisis con la prueba de ELISA indirecta en los sueros del Estado de Puebla. (a) muestra sueros de animales no estabulados, el cual presenta un porcentaje de positividad a *L. monocytogenes* del 10.75 % de 93 sueros, (b) muestra sueros animales estabulados con un porcentaje de positividad a *L. monocytogenes* del 8.88 % de 754 sueros, (c) muestra el total de los sueros analizados con un porcentaje de positividad a *L. monocytogenes* es del 9.09 % de 847 sueros. Ver figura 8.

**Figura 8:** Porcentaje de positividad a *Listeria monocytogenes* en sueros de cabras del Estado de Puebla mediante la prueba de ELISA indirecta utilizando su p60 como Ag. (a) sueros no estabulados, (b) sueros estabulados, (c) sueros totales.



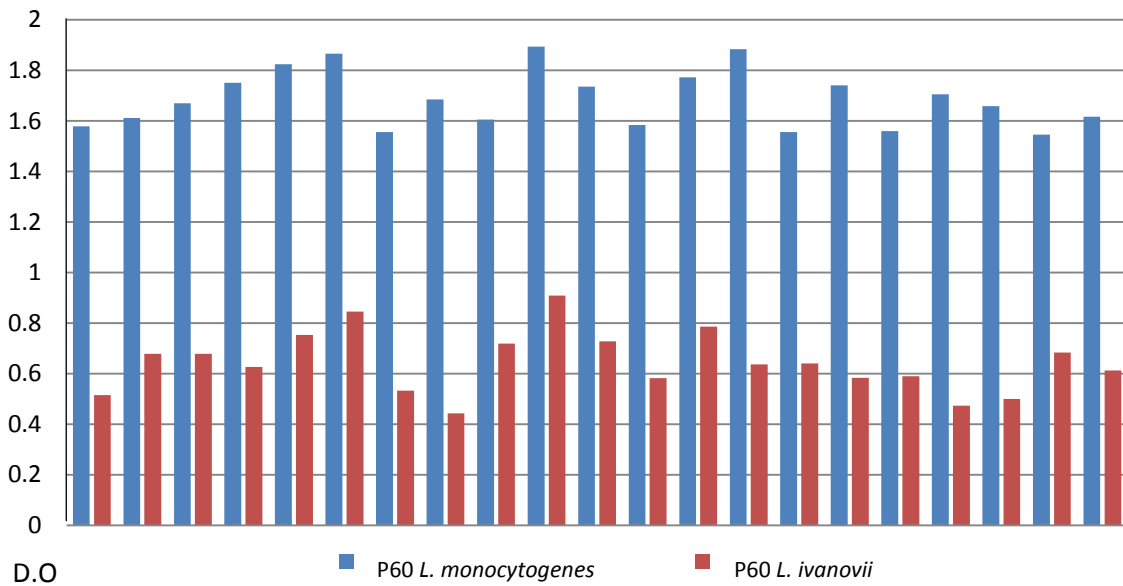
Los resultados positivos a *L.monocytogenes* obtenidos en el Estado de Puebla sugieren un posible contacto de los animales con este microorganismo y la necesidad de realizar un monitoreo de los animales en el caso de producir leche o sus productos derivados debido a la importancia zoonótica de la misma.

Mientras que para los animales con resultados sospechosos puede ser porque la enfermedad este en su inicio o por reacciones cruzadas con otras especies del género *Listeria*. También en este caso es necesario realizar el monitoreo a los animales que presenten lecturas sospechosas en el análisis con la técnica de ELISA. Ya que esta técnica serológica nos sirve para realizar un diagnóstico a nivel de hato, esto es que con un animal que de positivo, se debe realizar un monitoreo ya que se pueden tener más animales infectados. La prueba de ELISA puede detectar enfermedad a nivel subclínico que es más común que las enfermedades clínicas. <sup>(74)</sup>

Por los resultados sospechosos y negativos puede deberse a que el animal estuvo en contacto con estas especies sin llegar a causarles ningún daño, a la respuesta inmune del animal en los estados iniciales de la infección y para confirmarlo sería necesario hacer un seguimiento serológico a estos animales, o bien que el microorganismo no es expuesto al sistema inmune lo suficiente para desarrollar una respuesta de anticuerpos cuando ataca al sistema nervioso central, o puede ser como algunos autores afirman que en ocasiones los microorganismos estimulan la producción de anticuerpos pero al mismo tiempo se puede producir antígeno en gran cantidad y forman complejos inmunes que disminuyen la cantidad de anticuerpo libre disponible para la prueba. <sup>(74)</sup>

Al realizar la técnica de ELISA a los sueros positivos a *L. monocytogenes*, empleando como Ag la p60 de *L. ivanovii* se puede observar que no existe reacción cruzada de importancia diagnóstica significativa entre estas dos especies ver gráfica 2. Posiblemente a que su p60 es diferente en sus sitios de reconocimiento.

**Gráfica 2:** Respuesta serológica del antígeno p60 de *L. ivanovii* a los sueros de Puebla positivos a *L. monocytogenes* en una dilución de 1:200 por medio de la técnica de ELISA indirecta.





## 7. CONCLUSIONES.

En base a los resultados obtenidos se puede concluir que la p60 al ser una proteína la cual es secretada en abundancia por el género *Listeria* y su fácil obtención, se logro obtener en una buena concentración en cada una de las seis especies de *Listeria* estudiadas (*L. ivanovii*, *L. welshimeri*, *L. seeligeri*, *L. innocua*, *L. grayi*, *L. monocytogenes*). En base a esto podemos especular que se podría emplear la proteína p60 de alguna de las especies saprofitas (*L. welshimeri*, *L. seeligeri*, *L. innocua*, *L. grayi*) para el diagnóstico de *Listeria monocytogenes* y así evitar la manipulación de especies patógenas.

En la técnica de electroforesis se logro obtener un gel el cual no era muy visible pero a pesar de esto se pudo observar la presencia de varias bandas, y basándonos por el patrón de pesos moleculares colocado podemos decir que la proteína p60 se encuentra presente en las seis especies de *Listeria* estudiadas.

En cuanto al grado de reacción cruzada existente entre las especies saprofitas de *Listeria* (*L. welshimeri*, *L. seeligeri*, *L. innocua*, *L. grayi*) así como para *L. ivanovii* la segunda de importancia medica se puede especular que este no es significativo a nivel de diagnostico.

Nos podemos dar cuenta por los resultados obtenidos de los sueros provenientes del Estado de Puebla analizados con la técnica de ELISA indirecta, que esta prueba nos sirve principalmente para el diagnóstico de *Listeria monocytogenes* a nivel de hato.

Se recomienda seguir un monitoreo a los animales positivos para evitar la diseminación de la enfermedad, así mismo estudiar las proteínas p60 de las diferentes especies del género *Listeria*, con los sueros positivos y sospechosos obtenidos en este trabajo para confirmar el grado de reacción cruzada que manifiestan estas especies y en un futuro determinar si es posible utilizar alguna proteína p60 como Ag para diagnóstico de *Listeria monocytogenes* en cabras.

## 8. ANEXOS.

### 8.1. ANEXO 1: Elaboración de curva estándar para cuantificación de proteínas.

**Tabla 9:** Elaboración de curva estándar.

TUBO.	VOL. ALBUMINA $\mu$ l.	VOL. DE AGUA DESTILADA $\mu$ l.	CONCENTRACIÓN DE ALBUMINA $\mu$ g.	ABS 595nm.
1	200	800	20	0.103
2	400	600	40	0.148
3	600	400	60	0.178
4	800	200	80	0.203
5	1000	0	100	0.205

4. Se adicionó 5 ml de reactivo de Bradford a cada uno.
5. Blanco.- 1 ml de agua destilada más 5 ml de reactivo de Bradford.
6. Se agitó en el vortex.
7. Se leyó a 595 nm.
8. Se diluyó la muestra 1:20 para favorecer la lectura.

#### **Preparación del reactivo de Bradford:**

1. Disolver 100 mg de azul de Coomassie R250 en 50 ml de etanol absoluto al 95 %.
2. Agregar 10 ml de ácido fosfórico ( $H_3PO_4$ ) al 85 %.
3. Aforar a 100 ml con agua destilada.
4. Almacenar una semana en frasco ámbar antes de usar.

**Tabla 10:** Resultados de regresión lineal.

<b>r.- 0.957</b>
<b>m.- <math>1.295 \times 10^{-3}</math></b>
<b>b.- 0.0897</b>

## 8.2.ANEXO 2: Preparación de soluciones empleadas en electroforesis.

**Tabla 11:** Elaboración del gel tapón.

<b>Tampón pH 8.8</b>	<b>500 µl</b>
<b>Monómeros</b>	<b>1000 µl</b>
<b>Persulfato 10 %</b>	<b>16 µl</b>
<b>TEMED</b>	<b>7.5 µl</b>

Se coloca en un extremo de la cámara y se inclina para que corra rápido se pone a una altura  $\pm 5 \text{ mm} \pm 0.2 \text{ mm}$ .

Al mezclar el TEMED y persulfato se preparan las cantidades ya listas. Se mezcla muy rápido y colocarlo rápidamente pues se gelifica muy rápido.

**Tabla 12:** Elaboración del gel separador SDS PAGE 12 %.

<b>Monómeros</b>	<b>1.99 ml</b>
<b>Tampón 8.8</b>	<b>1.24 ml</b>
<b>SDS 10 %</b>	<b>49 µl</b>
<b>Agua</b>	<b>1.67 ml</b>
<b>Persulfato 10 %</b>	<b>25 µl</b>
<b>TEMED</b>	<b>2.5 µl</b>
<b>Volumen total</b>	<b>5 ml</b>

Se colocan 4 ml este gel no gelifica tan rápido.

Se coloca unas gotas de isopropanol sobre la superficie para nivelar el gel.

Se coloca por un extremo y se inclina la cámara para que salga parejo.

**Tabla 13:** Elaboración del gel concentrador 4 %.

<b>Monómeros</b>	<b>0.67 ml</b>
<b>Tampón</b>	<b>1.25 ml</b>
<b>SDS 10 %</b>	<b>50 µl</b>
<b>Agua</b>	<b>3.0 ml</b>
<b>Persulfato 10 %</b>	<b>50 µl</b>
<b>TEMED</b>	<b>10 µl</b>
<b>Volumen total</b>	<b>5.0 ml</b>

Se elimina el alcohol volteando la cámara.

Se coloca cuando ya solidificó el gel separador.

Se coloca el peine en la cámara.

Se agrega el gel concentrador hasta el límite del vidrio.

Se deja solidificar y se retira el peine con mucho cuidado.

Hay que estar revisando por que se va bajando el nivel.

*NOTA: Checar muy bien los volúmenes a poner en cada paso.*

**Tabla 14:** Elaboración de solución amortiguadora pH 8.8.

(Tris-HCL puede prepararse solo con trisma 1.5 M)

<b>Trisma base</b>	<b>181.65 g.</b>
<b>Agua desionizada</b>	<b>1 L.</b>

**Tabla 15:** Elaboración de solución amortiguadora pH 6.8 0.5 M.

<b>Trisma base</b>	<b>6.055 g.</b>
<b>Agua desionizada</b>	<b>100 ml.</b>

**(NOTA: Se puede ajustar pH con HCL 6 N)**

**Tabla 16:** Elaboración de monómeros proporción 30 g: 0.8 g / 100 ml.

<b>Acrilamida</b>	<b>9 g.</b>
<b>Bis acrilamida</b>	<b>0.24 g.</b>

Disolver en 30 ml de agua destilada o desionizada con agitación, filtrar con papel Watman #1.

*NOTA: Disolver con mosca (agitación) cubrir el matraz con papel aluminio, guardar en frasco ámbar.*

**Tabla 17:** Elaboración de solución de corrida pH 8.3 trisma 0.025 M.

<b>Concentración</b>		
<b>0.025 M</b>	<b>trisma base</b>	<b>3.027 g.</b>
<b>0.192 M</b>	<b>glicina</b>	<b>14-4 g.</b>
<b>0.1 %</b>	<b>SDS</b>	<b>1 g.</b>
	<b>Agua des ionizada</b>	<b>1 L.</b>

**Tabla 18:** Elaboración de solución digestora.

<b>Tris 0.5 M pH 6.8</b>	<b>4.375 ml.</b>
<b>SDS</b>	<b>1 g.</b>
<b>Glicerol</b>	<b>0.5 ml.</b>
<b>2 mercaptoetanol</b>	<b>0.25 ml.</b>
<b>Azul de bromo timol</b>	<b>0.05 g.</b>

**Tabla 19:** Elaboración de solución teñidora de gel.

<b>Azul de Coomasie R250</b>	<b>25 ml.</b>
<b>Metanol</b>	<b>100 ml.</b>
<b>Ácido acético</b>	<b>20 ml.</b>
<b>Agua destilada</b>	<b>65 ml.</b>

**Tabla 20:** Elaboración de solución desteñidora I.

<b>Metanol</b>	<b>250 ml.</b>
<b>Ácido acético</b>	<b>50 ml.</b>
<b>Agua destilada</b>	<b>200 ml.</b>

**Tabla 21:** Elaboración de solución buffer de muestra.

<b>Tris-HCL 0.5 M pH 6.8</b>	<b>5 ml.</b>
<b>SDS 10 %</b>	<b>8 ml.</b>
<b>Agua destilada</b>	<b>1 ml.</b>
<b>Glicerol</b>	<b>4 ml.</b>

### **8.3.ANEXO 3: Preparación de soluciones empleadas en la técnica de ELISA.**

**Tabla 22:** Elaboración de PBS pH 7.2.

<b>Fosfato de potasio di básico</b>	<b>1.21 g/1000 ml.</b>
<b>Fosfato de potasio monobásico</b>	<b>0.34 g/1000 ml.</b>
<b>Cloruro de sodio</b>	<b>8.0 g/1000 ml.</b>

## 9.- REFERENCIAS

1. Acheson D. *Foodborne Listeriosis*, Clin Infec Dis, 2000; 31: 770-775.
2. Adams M. R. y Moss M. O. 1997. *Microbiología de los Alimentos*. University of Surroy, Guildford, UK. Ed. Acribia S.A. Zaragoza España. 234-239.
3. Andrews W. 2002. *Current State of Conventional Microbiological Methodology for the Examination of Food*. En: Workshop 102–15. Microorganisms in Foods: Now What? American Society for Microbiology, Washington, DC, EE.UU.
4. Asaoka Y. Nakamura S. I. Yoshida K. and Nishizuka Y. 1992. *Protein kinase C, calcium and phospholipid degradation*. Trends Biochem. Sci. 17: 414-417.
5. Audurier A. 1989 *Listeriosis: epidemiology and phage-typing*. En: *Microbiología-89*. (Sociedad Española de Microbiología, ed.). Actas del XII Congreso Nacional de la Sociedad Española de Microbiología, Pamplona 24-27 Sept. 1:245-246.
6. Bannam T. and Goldfine H. *Mutagenesis of Active-Site Histidines of Listeria monocytogenes Phosphatidylinositol-Specific Phospholipase C: Effects on Enzyme Activity and Biological Function*. Infec Immun, 1999; 67: 182-186.
7. Batut J. Daveran-Mingot M.-L. Jacobs M.D.L. Garnerone A. and Kahn D. 1989. *fixK, a gene homologous with fnr and crp from Escherichia coli, regulates nitrogen fixation genes both positively and negatively in Rhizobium meliloti* EMBO J. 8: 1279-1286.
8. Berche P. Gaillard J.-L. Geoffroy C. and Alouf J. E. 1987. *T cell recognition of listeriolysin O is induced during infection with Listeria monocytogenes*. J. Immunol. 139: 3813-3821.
9. Boerlin P. Boerlin-Petzold F. y Jemmi T. *Use of listeriolysin O and internalin A in a sero epidemiological study of Listeriosis in Swiss dairy cows*. J. Clin. Microbiol. 2003; 41:1055-1061.
10. Bradford M. *A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding*. Anal Biochem. 1996; 72:248-254.
11. Braun L. Ghebrehiwet B. and Cossart P. 2000. *GC1q-R/p32, a C1q-binding protein, is a receptor for the InlB invasión protein of Listeria monocytogenes*. EMBO J. 19:1458-1466.

12. Bubert A. Sokolovic Z. Chun S. K. Papatheodorou L. Simm A. Goebel W. *Differential Expression of Listeria monocytogenes Virulence Genes In Mammalian Host Cells*. Mol Gen Genet 1999; 261:323-336.
13. Chakraborty T. Hain T. Domann E. *Genome Organization and the Evolution of the Virulence Gene Locus in Listeria Species*. International J Med Microbiol 2000; 290:167-174.
14. Cicchetti G. Maurer P. Wagener P. and Kocks C. *Actin and Phosphoinositide Binding by the ActA Protein of the Bacterial Patogen Listeria monocytogenes*. J Biol Chem, 1999; 274: 33616-33626.
15. Cooper J. Walker and D. R. 1998. *Listeriosis. Microbial Food Borne Pathogens*. 14(1):113-125.
16. Cossart P, Pizarro-Cerdá J. Lecuit M. *Invasion of Mammalian Cell by Listeria monocytogenes: Functional Mimicry to Subvert Cellular Functions*. TRENDS Cell Biolo 2003; 13(1): 23-31.
17. Cossart P. and Lecuit M. *Interactions of Listeria monocytogenes with mammalian cells during entry and actin-based movement: bacterial factors, cellular ligands and signaling*. EMBO, 1998; 17: 3797-3806.
18. Cossart P. Vicente M.F. Mengaud J. Baquero F. Pérez-Díaz J.C. and Berche P. 1989. *Listeriolysin O is essential for the virulence of Listeria monocytogenes: direct evidence obtained by gene complementation*. Infect. Immun. 57: 3629-3636.
19. Dabiri G.A. Sanger J.M. Portnoy D.A. and Southwick F.S. 1990. *Listeria monocytogenes moves rapidly through the host-cell cytoplasm by inducing directional actin assembly*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87: 6068-6072.
20. Daquet G. y Colaboradores. 1997. *Técnicas en bacteriología. Exámenes de laboratorio*. Editorial JMS. Barcelona, España. 452p.
21. De Chastellier C. and Berche P. 1994. *Fate of Listeria monocytogenes in murine macrophages: evidence for simultaneous killing and survival of intracellular bacteria*. Infect. Immun. 62: 543-553.
22. De Vries F. P. van Der Ende A. van Putten J.P. Danker J. 1996. *Invasion of primary nasopharyngeal epithelial cells by Neisseria meningitidis is controlled by phase variation of multiple surface antigens*. Infect. Immun. 64: 2998-3006.



23. Decatur A.L. and Portnoy D.A. A *PEST-like Sequence in Listeriolysin O Essential for Listeria monocytogenes Pathogenicity*, Science, 2000; 290: 992- 995.
24. Dijk R. G. *Listeriosis in animals: clinical signs, diagnosis and treatment*. In: Schönberg A. editor. *Listeriosis: Joint WHO/ROI consultation on prevention and control*. VetMed Hefte 5/1987. Berlin, Germany: Institut für Veterinärmedizin des Bundesgesundheitsamtes, 1987. pp.68-76.
25. Domínguez-Rodríguez L.; Vázquez-Boland J.A.; Fernández-Garayzábal J.F.; Echalecu-Tranchant P.; Gómez-Lucía E.; Rodríguez-Ferri E.F. and Suárez-Fernández G. 1986. *Microplate technique to determine hemolytic activity for routine typing of Listeria strain*. J. Clin. Microbiol. 24: 99-103.
26. Doyle M. P. *Effect of environmental and processing conditions on Listeria monocytogenes*. Food Tech.1988; 40:169-171.
27. Dramsi S. Kocks C. Forestier C. and Cossart P. 1993. *Internalin-mediated invasion of epithelial cells by Listeria monocytogenes is regulated by the bacterial growth state, temperature and the pleiotropic activator prfA*. Mol. Microbiol. 9: 931-941.
28. Dubail I. Berche P. *The European Listeria Genome Consortium and Charbit A.: Listeriolysin O as a Reporter to Identify Constitutive and In Vivo-Inducible Promoters in the Pathogen Listeria monocytogenes*, Infec Immun, 2000; 68: 3242-3250.
29. Fetherston J.D. and Perry R.D. 1994. *The pigmentation locus of Yersinia pestis KIM6+ is flanked by an insertion sequence and includes the structural genes for pesticin sensitivity and HMWP2*. Mol. Microbiol. 13: 697-708.
30. Franco A. A. Cheng R. K. Chung G.-T. Wu S. Oh H.-B. and Sears C. L. 1999. *Molecular Evolution of the Pathogenicity Island of Enterotoxigenic Bacteroides fragilis Strains*. J. Bacteriol. 181(21): 6623-6633.
31. Gaillard J. L. Berche C. Frehel E. Gouin. y Cossart P.1991. *Entry of L. monocytogenes into cells is Mediated by Internalin, a repeat Protein reminiscent of surface antigens from Gram-Positive cocci*. Cells. pág. 1127-1141.
32. Garges S. and Adhya S. 1985. *Sites of allosteric shift in the structure of the cyclic AMP receptor protein*. Cell 41: 745-751.

33. Geginat G. Nichterlein T. Kretschmar M. Schenk S. Hof H. Lalle M. Goebel W. Bubert A. *Enhancement of the Listeria monocytogenes p60 Specific CD4 and CD8 T Cell Memory by Nonpathogenic Listeria innocua*. J Immunol 1999; 162:478-4789.
34. Gitter M. A. *Changing pattern of ovine listeriosis in Gt. Britain*. In: Courtieu A. L. Espaze E. P. Reynaud A. E., editors *Listeria-listeriosis 1985-1986*. Nantes, France: University of Nantes; 1986. pp.294-299.
35. Goebel W. Kuhn M. *Bacterial Replication in the Host Cell Cytosol*. Curr Opin Microbiol 2000; 3. 49-53.
36. Gregory S.H. Sagnimeni A.J. and Wing E.J. 1996. *Expression of the inlAB operon by Listeria monocytogenes is not required for entry into hepatic cells in vivo*. Infect. Immun. 64: 3983-3986.
37. Groisman E. A. Ochman H. 1996. *Pathogenicity islands: bacterial evolution in quantum leaps*. Cell. 87: 791-794
38. Groves R.D. and Welshimer H.J. 1977. *Separation of pathogenic from apathogenic Listeria monocytogenes by three in vitro reactions*. J. Clin. Microbiol. 5: 559-563.
39. Grutzkau A. Hanski C. Hahn H. and Riecken E.O. 1990. *Involvement of M cells in the bacterial invasion of Peyer's patches: a common mechanism shared by Yersinia enterocolitica and other invasive bacteria*. Gut 31: 1011-1015.
40. Hamon M, Bierne H, Cossart P. *Listeria monocytogenes: a multifaceted model*. Nature Reviews Microbiology 2006; 4: 423-434.
41. Hao A. Beuchat L R. and Bracket R E. *Comparison of media and methods for detecting and enumeration Listeria monocytogenes in refrigerated cabbage*. Can J. Microbiol.1987; 31:955-957.
42. Harman J.G. McKenney K. and Peterkofsky A. 1986. *Structure-function analysis of three cAMP-independent forms of the cAMP receptor protein*. J. Biol. Chem. 261: 16332-16339.
43. Hess J. Dreher A. Gentschev I. Goebel W. Label C. Miko DKaufmann S. H. *Protein p60 Participates In Intestinal Host Invasion by Listeria monocytogenes*. Zentralbi Bakteriol. 1996; 284:263-272.
44. Hof H. Nichterlein T. and Kretschmar M. *Management of Listeriosis*, Clin Microbiol. Rev, 1997; 10: 345-357.

45. Hof H. and Hefner P. 1988. *Pathogenicity of Listeria monocytogenes in comparison to other Listeria species*. Infection 16 (Suppl 2): S141-S144.
46. Hudak A. P. Lee S. H. Issekutz A. C. and Bortolussi R. *Comparison of three serological methods; enzyme-linked immunosorbent assay, complement fixation, and microagglutination in the diagnosis of human perinatal L. monocytogenes infection*. Clin. Invest. Med. 1984; 7:349-354.
47. Ireton K. and Cossart P. *Host-Pathogen Interactions During Entry and Actin-Based movement of Listeria monocytogenes*; Annu Rev Genet, 1997; 31: 113-138.
48. Ireton K. Payrastra B. and Cossart P. *The Listeria monocytogenes Protein InlB is an Agonist of Mammalian Phosphoinositide 3-Kinase*. J Biol Chem, 1999; 274: 17025-17032.
49. Janikaraman V. *Listeriosis in Pregnancy: Diagnosis, Treatment, and Prevention*. Rev Obstet Gyneco 2008; 1: 179–185.
50. Jones D. 1992. *Current classification of the Genus Listeria*. Libro de resúmenes del XI International Symposium on the Problems of Listeriosis. p. 7-8. Copenague, Dinamarca.
51. Jones S. and Portnoy D.A. 1994. *Characterization of Listeria monocytogenes pathogenesis in a strain expressing perfringolysin O in place of listeriolysin O*. Infect. Immun. 62: 5608-5613.
52. Jorgensen F. Stephens P. J. and Knochel S. 1995. *The Effect of Osmotic Shock and Subsequent Adaptation on the Thermotolerance and Cell Morphology of Listeria monocytogenes*. J. Appl. Bacte. 38.
53. Juntilla J. R. Niemela S. I & Rin J. 1998. *Minimum Growth Temperatures of Listeria monocytogenes and Non-hemolytic listeria sp.* J. Appl. Bacte. 65:321-327.
54. Karunasagar I. Lampidis R. Goebel W. and Kreft J. 1997. *Complementation of Listeria seeligeri with the plcA-prfA genes from L. monocytogenes activates transcription of seeligerolysin and leads to bacterial escape from the phagosome of infected mammalian cells*. FEMS Microbiol. Lett. 146: 303-310.
55. Khan M.A. Seaman A. and Woodbine M. 1972. *Listeria monocytogenes-haemolysin: lecithinase*. Acta Microbiol. Acad. Sci. Hung. 19: 341-352.
56. Kim J. Adhya S. and Garges S. 1992. *Allosteric changes in the cAMP receptor protein of Escherichia coli: hinge reorientation*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89: 9700-9704.

57. Kocks C. Hellio R. Gounon P. Ohayon H. and Cossart P. 1993. *Polarized distribution of Listeria monocytogenes surface protein ActA at the site of directional actin assembly*. J. Cell Sci. 105: 699-710.
58. Kohler S. Bubert A. Vogel M. Goebel W. *Expression of the Iap Gene Coding for Protein p60 of Listeria monocytogenes is Controlled on the Posttranscriptional Level*. J Bacteriol 1991; 173:4668-4674.
59. Kreft J. Dumbsky M. and Theiss S. 1995. *The actin polymerization protein from Listeria ivanovii is a large repeat protein which shows only limited amino acid sequence to ActA from Listeria monocytogenes*. FEMS Microbiol. Lett. 126: 113-122.
60. Lecuit M. Ohayon H. Braun L. Mengaud J. and Cossart P.: *Internalin of Listeria monocytogenes with an Intact Leucine-Rich Repeat Region is Sufficient to Promote Internalization*. Infec Immun, 1997; 65: 5309-5319.
61. Leighton I. *Use of selective agent for the isolation of Listeria monocytogenes*. Med Lab Sci. 1979; 36:283-288.
62. Linnan M.J. Mascola L. Lou X.D. Goulet V. May S. Salminen C. Hird D.W. Yonekura L. Hayes P. Weaver R. Audurier A. Plikaytis B.D. Fannin S.L. Kleks A. and Broome C.V. 1988. *Epidemiologic listeriosis associated with Mexican-style cheese*. N. Engl. J. Med. 319: 823-828.
63. Low M.G. and Sltiel A.R. 1988. *Structural and functional roles of glycosyl-phosphatidylinositol in membranes*. Science 239: 268-275.
64. Manual de la OIE sobre animales terrestres, capitulo 2.10.14 *Listeria monocytogenes*, 2004.
65. Margini R. A. 1996. *Inmunología e Inmunología*. 5ª edición. Ed. Panamericana. Buenos Aires, Argentina. 976p.
66. Marquis H. Goldfine H. and Portnoy D.A.: *Proteolytic Pathways of Activation and Degradation of Bacterial Phospholipase C during Intracellular Infection by Listeria monocytogenes*, J Cell Biol, 1997; 137: 1381-1392.
67. Massillon D. Bollen M. De Wulf H. Overloop K. Vastapel F. Van Hecke P. and Stalmans W. 1995. *Demonstration of a glycogen/glucose-1-phosphate cycle in hepatocytes from fasted rats*. J. Biol. Chem. 270: 19351-19356.

68. Matic, I., Radman, M., Taddei, F., Picard, B., Doit, C., Bingen, E., Denamur, E., Elion, J. 1997. Highly Variable Mutation Rates in Commensal and Pathogenic *Escherichia coli*. *Science*. 277: 1833:1834.
69. Maurelli A. T. Fernández R. E. Bloch C. A. Rode C. K. and Fasano A. 1998. "Black holes" and bacterial pathogenicity: a large genomic deletion that enhances the virulence of *Shigella* spp. and enteroinvasive *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 95: 3943-3948.
70. Meng J. and M. P. Dolyle. 1997. *Emerging issues in microbiological food safety*. *Annu. Rev. Nutr.* 17:255-275.
71. Mengaud J. Chevenert J. Geoffroy C. Gaillard J.-L. and Cossart P. 1987. *Identification of the structural gene encoding the SH-activated hemolysin of Listeria monocytogenes: listeriolysin O is homologous to streptolysin O and pneumolysin*. *Infect. Immun.* 55: 3225-3227.
72. Merchant I & Packer R. 1975. *Bacteriología y Virología Veterinarias*. 3<sup>a</sup> Edición Española. Editorial Acribia. Zaragoza, España. 762p.
73. Miettinen M.K. Siitonen A. Heiskanen P. Haajanen H. Björkroth K.J. and Korkeala H.: *Molecular Epidemiology of an Outbreak of febrile Gastroenteritis Caused by Listeria monocytogenes in Cold-Smoked Rainbow Trout*. *J Clin Microbiol*, 1999; 37: 2358-2360.
74. Montaña H. J. A. *Temas selectos de Inmunología Veterinaria*. 2005. Ed. Manual moderno S.A de C.V. México.
75. Nair S. Milohanic E. and Berche P.: *ClpC ATPase is Required for Cell Adhesion and Invasion of Listeria monocytogenes*. *Infect Immun*, 2000; 68: 7061-7068.
76. Nightingale K. Schukken Y. Nightingale C. Fortes E. Ho A. Her Z. Grohn Y. McDonough P. & Wiedmann M. 2004. *Ecology and Transmission of Listeria monocytogenes infecting Ruminants and in the Farm environment*. *Applied Environmental Microbiology*. 8:4458-4467.
77. Pelech S.L. and Sanghera J.S. 1992. *Mitogen-activated protein kinases: versatile transducers for cell signaling*. *Trends Biochem. Sci.* 17: 233-238.
78. Pell A. N. 1997: *Manure and microbes: public and animal health problema*. *J. Dairy Sci.* 80:2673-2681.

79. Pine L. and Malcolm G B. *Physiological studies on the growth and utilization of sugar by Listeria species*. Can J Microbiol. 1989; 35:243-254.
80. Portnoy D A. Chakraborty T. Goebel W. Cossart P. *Molecular Determinants of Listeria monocytogenes Pathogenesis*. Infect Immun 1992; 60: 1263-1267.
81. Portnoy D.A. Jacks P.S. and Hinrichs D. 1988. *Role of hemolysin for the intracellular growth of L. monocytogenes*. J. Exp. Med. 167: 1459-1471.
82. Posfay-Barbe C. Listeriosis. *Semin Fetal Neonatal Med* 2009 Feb 19. *Epub ahead of print*.
83. Ramírez G. Álvarez C. I. Martínez H.A. Quintero L. Amaya M. G y Tenorio V. 2006. *Utilización de la proteína p60 en la detección de listeriosis en cabras*. Facultad de Estudios Superiores Cuautitlan. Posgrado UNAM. México.
84. Renzoni A. Karsfeld A. Dramsi S. and Cossart P. 1997. *Evidence that PrfA, the pleiotropic activator of virulence genes in Listeria monocytogenes, can be present but inactive*. Infect. Immun. 65, 1515-1518.
85. Rocourt J. 1988. *Taxonomy of the genus Listeria*. Infection. 16: 89-91
86. Rocourt J. and Seeliger H. P. R. 1985: *Distribution des espèces du genre Listeria*. Zbl. Bakt. Mikrobiol. Hyg. A259:317-330.
87. Santos I. R. Vergel C. V. 2002. *Determinación de los mecanismos genéticos de resistencia a desinfectantes en Listeria monocytogenes*. Pontificia Universidad Javeriana. Facultad ciencias Básicas. Carrera de Microbiología Industrial. Bogotá D.C, Colombia.
88. Schütze s. Machleidt T. and Krönke M. 1994. *The role of diacylglycerol and ceramide in tumor necrosis factor and interleukin-1 signal transduction*. J. Leukocyte Biol. 56: 533-541.
89. Schwan W.R. Demuht A. Kuhn M. and Goebel W. 1994. *Phosphatidylinositol -specific phospholipase C from Listeria monocytogenes contributes to intracellular survival and growth of Listeria innocua*. Infect. Immun. 62: 4795-4803.
90. Seeliger H.P.R. Jones D. *Genus Listeria Pirie.1986. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Sneath P H A, Mair N S, Sharpe M E, Holt J G. Baltimore, Williams and Wilkins. 2: 1235-1245.

91. Seeliger H.P.R. Schrettenbrunner A. Pongratz G. and Hof H. 1982. *Zur Sonderstellung stark hämolysierender Sämme der Gattung Listeria*. Zentralbl. Bakteriol. Parasitenkd. Infektionskr. Hyg. Abt. 1 Orig. Reihe A 252:176-190
92. Seeliger H.P.R. Rocourt J. Schrettenbrunner A. Grimont P.A.D and Jones D. 1984. *Listeria ivanovii* sp. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 34: 336-337.
93. Sibelius U. Rose F. Chakraborty T. Darji A. Wehland J. Weiss S. Seeger W. and Grimminger F. 1996. *Listeriolysin is a potent inducer of the phosphatidylinositol response and lipid mediator generation in human endothelial cells*. *Infect. Immun.* 64: 674-676.
94. Skalka B. Smola J. and Elischerova K. 1982. *Routine test for in vitro differentiation of pathogenic and apathogenic Listeria monocytogenes strains*. *J. Clin. Microbiol.* 15: 503-507.
95. Smith G.A. Marquis H. Jones S. Johnston N.C. Portnoy D.A. and Goldfine H. 1995. *The two distinct phospholipases C of Listeria monocytogenes have overlapping roles in escape from a vacuole and cell-to-cell spread*. *Infect. Immun.* 63: 4231-4237.
96. Suárez R. M. González Z. B. *Listeria Y Listeriosis*. Departamento de sanidad Animal. Facultad de Veterinaria Universidad Complutense de Madrid. Centro de Vigilancia sanitaria Animal.
97. Tilney L.G. De Rosier D.J. and Tilney M.S. 1992. *How Listeria exploits host cell actin to form its own cytoskeleton. I. Formation of a tail and how that tail might be involved in movement*. *J. Cell Biol.* 118: 71-81.
98. Vázquez-Boland J. A. Kuhn M. Berche P. Chakraborty T. Domínguez B. Goebel W. Gonzalez B. Wehland J. & Kreft J. *Listeria patogenesis and Molecular virulence Determinants*. *Clinical Microbiology Reviews.* 2001; 14:584-640.
99. Wawrzynow A. Banecki B. and Zylicz M. 1996. *The Clp ATPases define a novel class of molecular chaperones*. *Mol. Microbiol.* 21: 895-899.
100. Wuenscher M.D. Kohler S. Bubert A. Gerike U. y Goebel W. *The iap gene of Listeria monocytogenes is essential for cell viability, and its gene product, p60, has bacteriolytic activity*. *J. Bacter.* 1993; 175:3491-3501.