



# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

---

## FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTILÁN

ESTABLECIMIENTO DE UNA PCR MULTIPLEX  
PARA LA SEROTIPIFICACIÓN DE AISLADOS DE  
*Listeria monocytogenes*

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE  
MÈDICA VETERINARIA ZOOTECNISTA

P R E S E N T A :

MARIBEL STRASSBURGER MADRIGAL

ASESOR: DR. VÍCTOR RUBÉN TENORIO GUTIÉRREZ  
COASESOR: DR. FRANCISCO AGUILAR ROMERO



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.

ESTE TRABAJO SE REALIZÓ EN:

EL LABORATORIO DE BACTERIOLOGÍA DEL CENID-MICROBIOLOGÍA,  
INIFAP.

EL LABORATORIO DE BACTERIOLOGÍA DE LA UNIDAD DE POSGRADO,  
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN, UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTÓNOMA DE MÉXICO

FUE FINANCIADO POR:

SAGARPA PROYECTO 46599

CONACYT PROYECTO SIN-2008/90945

BECA CONACYT no. 14233

## AGRADECIMIENTOS:

A la UNAM por abrirme sus puertas y darme la oportunidad de superarme.

A mis asesores: Doctor Víctor Rubén Tenorio Gutiérrez y Doctor Francisco Aguilar Romero, por todo su apoyo, compromiso, paciencia y comprensión para que se realizara este proyecto.

A la Dra. Guicela Ramírez Bernal por todo su apoyo incondicional.

A la MVZ Guadalupe Pastrana Retana y al Ingeniero Enrique Vera Gutiérrez por todo su apoyo y por creer en mí.

A mis amigos en especial Gerardo, Itzel y Norma.

A mis padres y hermanos en especial a Alejandro por todo su apoyo.

Dedico este trabajo a todos los animalitos ya que son mis inspiración y en especial a mi esposo Rodolfo y a mis hijos Isabella y Christopher, por todo su apoyo amor y comprensión.

# ÍNDICE

	<b>PAG</b>
Resumen	
1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. ANTECEDENTES.....	2
2.1 Epidemiología.....	2
2.2 Reservorio.....	6
2.3 Enfermedad.....	7
2.4 Factores predisponentes.....	9
2.5 Etiología.....	12
2.6 Tipificación.....	12
2.6.1 Serotipificación.....	15
2.6.2 Tipificación molecular.....	19
3. JUSTIFICACIÓN.....	20
4. OBJETIVOS.....	20
4.1 Objetivo general.....	20
4.2 Objetivos particulares.....	20
5. HIPÓTESIS.....	21
6. CUADRO METODOLÓGICO.....	22
7. MATERIALES Y MÉTODOS.....	22
7.1 Bacterias.....	23
7.2 Extracción de DNA.....	23
7.3 Serotipificación molecular mediante PCR multiplex.....	27
8. RESULTADOS.....	27
8.1 Serotipificación molecular PCR multiplex.....	28
8.2 Serotipificación con antisueros.....	36
9. DISCUSION.....	39
10. CONCLUSIONES.....	40
11. REFERENCIAS.....	40

## ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS

<b>TABLAS</b>	<b>PAG</b>
Tabla 1. Brotes de listeriosis causados por <i>Listeria monocytogenes</i> proveniente de alimentos.....	4
Tabla 2. Diferenciación fenotípica de <i>Listeria monocytogenes</i> .....	11
Tabla 3. Antígenos de los serotipos de <i>Listeria</i> .....	14
Tabla 4. Cepas evaluadas.....	22
Tabla 5. Iniciadores utilizados en la PCR multiplex para la determinación de serotipo reportados por Doumith y col.....	25
Tabla 6. PCR multiplex para la serotipificación molecular de las especies de <i>Listeria monocytogenes</i> reportado por Doumith y colaboradores.....	26
Tabla 7. Resultados de la serotipificación molecular de los aislamientos de <i>Listeria monocytogenes</i> mediante PCR multiplex.....	29
Tabla 8. Resultados de la serotipificación de <i>Listeria monocytogenes</i> mediante aglutinación en placa.....	31
Tabla 9. Comparación de las técnicas utilizadas para la serotipificación de aislamientos de <i>Listeria monocytogenes</i> .....	35
<b>FIGURAS</b>	
Figura 1. Amplificados de PCR multiplex.....	30
Figura 2. Amplificados de PCR multiplex.....	30
Figura 3. Resultados de la aglutinación en placa Poli, 1 y 4 (Difco).....	32
Figura 4. Resultados de la aglutinación en placa Poli, 1 y 4 (Difco).....	33
Figura 5. Resultados de la aglutinación en placa Poli, 1 y 4 (Difco).....	34

## RESUMEN

La serotipificación de *Listeria monocytogenes* es una herramienta comúnmente usada en la vigilancia epidemiológica como la primera caracterización de la bacteria proveniente de alimentos y aislados clínicos. En este trabajo se establecieron las condiciones de una PCR múltiplex como método de identificación del serotipo de *Listeria monocytogenes*, comparándola contra la técnica convencional de aglutinación con suero. Se obtuvieron 12 cepas de *L. monocytogenes* provenientes de leche, queso, alfalfa, materia fecal de cabra y se utilizaron dos de referencia como control positivo. Se emplearon 5 pares de iniciadores diseñados con base en regiones variables del genoma de *L. monocytogenes*. Mediante la PCR multiplex se determinó que todas las cepas evaluadas pertenecen al serotipo 4b, obteniéndose fragmentos amplificados del tamaño esperado (entre 370 y 906 pares de bases). Asimismo las cepas fueron evaluadas por el método convencional de aglutinación en placa, con la cual no fue posible definir el serotipo de dos de las cepas evaluadas. Los resultados obtenidos mediante la PCR multiplex coincidieron con los obtenidos por el método convencional de aglutinación en placa para 10 de los 12 aislamientos (83.33%) así como para las cepas control. Los resultados de este estudio indican que la PCR multiplex podría considerarse como un método alternativo rápido y útil para una primera caracterización de los serotipos más frecuentemente encontrados de *L. monocytogenes*. Por lo cual, la serotipificación de *Listeria monocytogenes* mediante PCR representa una alternativa a la técnica de aglutinación en placa como sistema de clasificación.

## 1. INTRODUCCIÓN

*Listeria monocytogenes* es un patógeno bacteriano causante de listeriosis la cual produce una letalidad alta en humanos y en animales domésticos (1).

Las personas y los animales inmunosuprimidos, las mujeres embarazadas o animales preñados, los recién nacidos y ancianos representan mayor riesgo de contraer la infección. La ingestión de alimentos contaminados es considerada la principal fuente de infección en brotes y casos esporádicos de listeriosis (2).

Puesto que esta bacteria tiene la habilidad de sobrevivir y crecer bajo condiciones adversas y en refrigeración, puede transmitirse a través del consumo de una amplia variedad de alimentos (3,4,5).

Las enfermedades causadas debido al consumo de alimentos contaminados tienen un gran impacto económico y en salud pública a nivel mundial (6,7,8). En la industria pecuaria la listeriosis provoca pérdidas por el incremento de costos de producción de los animales, debido a las enfermedades y al incremento de la infertilidad y a los abortos (9).

Debido a la importancia en cuanto a la caracterización de las cepas para las investigaciones epidemiológicas, han sido descritos diversos métodos de tipificación para este microorganismo. La serotipificación es un método de tipificación ampliamente usado en la vigilancia epidemiológica, siendo una de las primeras técnicas de diagnóstico desarrolladas para este patógeno (10,11,12).

La serotipificación utiliza las reacciones serológicas de los antígenos somáticos (O) y flagelares (H) de esta bacteria con una serie de antisueros específicos en un formato de aglutinación en placa y separa las cepas de *L. monocytogenes* en diversos serotipos. Sin embargo se ha visto que por lo menos el 95% de las cepas aisladas de alimentos y casos clínicos (humanos y animales) pertenecen a los serotipos 1/2a, 1/2b, 1/2c, y 4b. Si bien el serotipo 1/2a es el más frecuentemente aislado de alimentos, los



principales brotes de la forma invasiva son debido a las cepas pertenecientes al serotipo 4b. Por ello, se ha considerado que la designación del serotipo está asociada con el potencial de virulencia. La serotipificación por medio de la aglutinación es una herramienta útil para identificar los diferentes aislamientos de *Listeria monocytogenes*, pero está sujeta a la disponibilidad de los sueros y los costos elevados (10,11,12).

## 2. ANTECEDENTES

### 2.1 Epidemiología

A diferencia de algunos agentes patógenos responsables de diversos brotes que han marcado la historia de los humanos por siglos, la historia de *Listeria monocytogenes* es reciente. *L. monocytogenes* fue aislada e identificada oficialmente como el agente etiológico de la listeriosis en 1924 (13,14). Sin embargo, fue reconocida como una causa de infección en humanos y se confirmó que era contraída por vía oral hasta después de la segunda guerra mundial (15).

Las primeras descripciones de *Listeria monocytogenes* fueron realizadas en 1926 por Murray y colaboradores cuando aislaron una bacteria corta Gram-positiva, de forma bacilar, que causaba enfermedad en los conejos y cobayas a la cual denominaron *Bacterium monocytogenes* porque infectaba a los monocitos de la sangre. En 1927, Pirie aisló un organismo parecido en el hígado de gerbos enfermos y lo denominaron *Listerella hepatolytica* en recuerdo al famoso cirujano Joseph Lister. Finalmente, en 1940 Pirie propuso el nombre de *Listeria* (15).

A partir de dichos hallazgos, han sido descritas infecciones debidas a esta bacteria en una gran variedad de animales, que incluyen al ganado bovino, caprino, ovino, aves, roedores, peces y también en los humanos (16). En 1979 tuvo lugar un brote que afectó a 20 personas adultas enfermas en ocho hospitales de Boston, de acuerdo con los resultados obtenidos no se implicó a alimento alguno, pero los estudios de control de los casos indicaron que el rasgo común era el consumo de hortalizas crudas tales como apio, tomates y lechuga (17). En la tabla 1, se muestran diversos brotes de listeriosis en distintos países.

Desde 1980, al menos cinco brotes importantes de listeriosis humana relacionados con los alimentos han sido descritos en Europa y en América del Norte. El primero tuvo lugar en las provincias marítimas de Canadá durante 1981 (18). Fueron descritos treinta y cuatro casos en niños de edad perinatal y siete casos en personas adultas, con una mortalidad superior al 28%; el alimento implicado fue la ensalada de col y se atribuyó a la granja en la que habían sido cultivadas las coles. Estas habían

sido abonadas con estiércol de oveja de un rebaño en que habían muerto animales como consecuencia de la listeriosis.

En 1983 hubo un brote en Massachusetts que supuso 42 casos en personas adultas y siete casos en niños de edad perinatal (19). Se produjeron 14 muertes y por los estudios del control de los casos, la infección se atribuyó a leche pasteurizada procedente a un rebaño con listeriosis. El brote que probablemente alertó al mundo con respecto al papel de los alimentos para difundir la listeriosis, tuvo lugar en California durante 1985 y afectó a 142 personas (93 niños de edad perinatal y 49 personas adultas) con 48 muertes. La cepa de *L. monocytogenes* fue aislada tanto en quesos estilo mexicano y en la planta donde fueron elaborados. El brote cesó después de que se hubiera retirado el queso del mercado (20).

En Europa, un brote se prolongó desde 1983 a 1987 y afectó a 122 personas, la mitad fueron niños de edad perinatal, con 31 muertes (21). El alimento responsable resulto ser un queso blando, de tipo vacherin, cuya retirada acabó con el brote.

En Francia, se informó que de marzo a diciembre de 1992 se presentaron 279 casos de listeriosis humana, produciéndose 63 muertes y 22 abortos. Se determinó que el alimento contaminado fue lengua de cerdo recubierta de una capa de gelatina (22).

*Listeria monocytogenes* ha sido reportada en muestras de leche cruda de vaca, de cabra y de borrega. En algunos países como Canadá, Brasil, Costa Rica, Egipto, México, Nueva Zelanda e Italia, *Listeria innocua* ha sido aislada de leche cruda más frecuentemente que *L. monocytogenes* (23,24).

En México la bacteria ya ha sido aislada de leche de vaca, en un estudio realizado en el estado de Jalisco, de las 100 muestras analizadas de leche sin pasteurizar de vaca, fueron positivas 7 para *L. innocua* y 2 para *L. welshimeri* (25); en otro estudio llevado a cabo en los alrededores de la Ciudad de México, de las 1300 muestras de leche sin pasteurizar de vaca, fueron positivas para *Listeria monocytogenes* 6% (26). También ha sido reportada la presencia de *L. monocytogenes* en quesos panela elaborados con leche de vaca, con un 65% de muestras positivas a *Listeria spp*, *L. Murrayi* 20%, *L. innocua* 15%, *L. grayi* 15% y *L. monocytogenes* 15% (serotipos 1/2a, 1/2b, 4b) (27).

*L. monocytogenes* es responsable de la mayor parte de las infecciones por *Listeria* que afectan al hombre, aunque se han publicado algunos casos de infección debidos a *L. ivanovii* (anteriormente *L. monocytogenes* serotipo 5) y *L. seeligeri*. En animales, es responsable de la mayoría de las infecciones, pero en ovejas el 10–15% de los casos de septicemia listérica se deben a *L. ivanovii*. Los serotipos más comúnmente aislados son los tipos 1 y 4. Antes de los sesenta se creía que el tipo 1 existía en mayor proporción en Europa y África y el tipo 4 en América del Norte, pero posiblemente ha cambiado este patrón. Gray y Killinger (16) indicaron que los serotipos de *Listeria* están relacionados con el hospedero, el proceso patológico y el origen geográfico, esto se ha confirmado en general por los aislamientos realizados en alimentos, aunque las serotipos 1/2a y 1/2b presentan algunas diferencias geográficas. Los serotipos 1/2a, 1/2b y 4b, han sido aislados en más del 95% de los casos humanos y animales. Otros, como el 1/2c, han sido encontrados como contaminantes de alimentos (4,11,12,28,29,30,31).

En México existen pocos datos sobre la enfermedad y la epidemiología debido a que no se diagnostica adecuadamente, en cambio éste patógeno cobra cada vez mayor importancia en salud pública a nivel mundial.

Tabla 1. Brotes de listeriosis en distintos países causada por *Listeria monocytogenes* proveniente de alimentos.

País	Año	Casos	Muertes	Serotipo	Alimento
Halifax, Canadá	1981	41	18	4b	Coles
Massachusetts, USA	1983	49	14	4b	Leche
Vaud, Suiza	1983-87	122	34	4b	Queso
California, USA	1985	142	48	4b	Queso
Reino Unido	1989-90	300	0	4b	Paté
Francia	1992	279	88	4b	Lengua de cerdo
Francia	1993	39	0	4b	Paté de cerdo
Francia	1995	36	0	4b	Queso blando
USA	1998-99	40	4	4b	Carne fileteada
Finlandia	1998-99	25	6	3a	Manteca
Francia	1999	29	7	NI	Lengua de cerdo
USA	2000	29	4	4b	Pavo fileteado
USA	2000-01	12	0	4b	Queso
USA	2002	46	7	NI	Pollo y pavo
Canadá	2002	17	0	NI	Queso

(32). NI: serotipo no informado

Debido a que la listeriosis no es una enfermedad reportada en animales, se desconoce la incidencia exacta de infecciones por *Listeria monocytogenes* en el ganado. En Norteamérica, la mayoría de los casos sucede en ganado vacuno, con un menor porcentaje en ovejas, cabras. La variación estacional en el número de casos de listeriosis en animales ha sido observada frecuentemente. Sucede con mayor frecuencia al final del otoño, durante el invierno e inicio de la primavera, con la mayor incidencia durante febrero y marzo. Factores que generan estrés como son los cambios en la alimentación, enfermedades concurrentes, cambios de dentición, daños fisiológicos o virales en el revestimiento epitelial del tracto digestivo, introducción de nuevos animales al rebaño, cambios climáticos tales como lluvia excesiva o periodos de frío extremo, sobrepoblación en los corrales y en general malas prácticas en el manejo del ganado, son determinantes que podrían predisponer al animal a la infección (4,31,33).

Ha sido documentado que en rumiantes se ha recuperado más frecuentemente *L. monocytogenes* serotipo 4b y 1/2. Los casos de encefalitis y septicemia en cabras han sido asociados a los serotipos 4b y 1/2, mientras que el aborto se ha asociado principalmente al serotipo 1/2. Asimismo, se ha observado que la seroprevalencia depende del área geográfica (9,31,34).

## **2.2 Reservorio**

*L. monocytogenes* está ampliamente distribuida, se considera su hábitat natural la tierra, el agua, aguas negras y materia vegetal, especialmente la que se encuentra en descomposición. Se considera a la tierra como fuente de contaminación porque recibe material vegetal en descomposición, desechos de animales y aguas negras. El ensilado ha sido considerado una fuente de listeriosis en animales (3,24).

Cuando las cabras han presentado septicemia o aborto, puede estar el organismo en cantidades grandes en heces, leche, fluidos del feto, placenta, feto y recién nacidos. El potencial zoonótico de estos materiales para los veterinarios y trabajadores que están en contacto con los animales es alto. Se ha detectado la

excreción de *L. Monocytogenes* en las heces de las personas sanas a las que se denomina portadores asintomáticos, trabajadores de rastros, laboratoristas que manejan esta bacteria y manipuladores de alimentos. También en las heces de una amplia variedad de especies de animales sanos tales como borregos, cabras y vacas en un porcentaje de 10 a 52% (9,31,33,35).

Los rumiantes domésticos juegan un papel importante en mantener constante la presencia de listeria en el medio ambiente a través del ciclo fecal-oral, especialmente cuando se ha presentado un brote en la granja. La influencia de la dieta en la excreción de la bacteria ha sido estudiada especialmente en esta especie animal.

Los portadores desarrollan al microorganismo a través de la transmisión secundaria la cual se transfiere de las heces del primer huésped a otro individuo, diseminándolo hacia las plantas procesadoras de alimentos, los mataderos y otras explotaciones animales (9,24,36,37).

La salud animal constituye un factor determinante en la seguridad alimentaria porque ciertas enfermedades, denominadas zoonosis, como la brucelosis, la salmonelosis y la listeriosis, pueden transmitirse a las personas a través de alimentos contaminados por los microorganismos que las producen. Aunque la transmisión a personas puede realizarse por distintas vías, las infecciones a través de los alimentos son unas de las principales causas de la enfermedad. El problema reside en que los alimentos pueden contaminarse con patógenos zoonóticos de varias formas. Si un animal sufre una enfermedad determinada, sus tejidos y en particular, su carne o leche, pueden ser fuentes de infección para las personas si entran en la cadena alimentaria. Por ello la salud humana se liga directamente a la salud animal y a la producción de alimentos de origen animal (38,39).

## 2.3 Enfermedad

### 2.3.1 Características

La listeriosis en animales constituye un problema económico, debido a que causa encefalitis denominada “enfermedad del círculo o rodeo” septicemia y a los abortos espontáneos en la hembra, así como infecciones asintomáticas. La encefalitis por *Listeria* en rumiantes resulta fatal en el 60% de los casos (33,40,41).

Las evidencias indican que la listeriosis animal es sobre todo una enfermedad de transmisión alimentaria, siendo el ambiente la fuente principal de contaminación de los alimentos. El ensilado es la fuente más frecuente de listeriosis transmitida por alimentos. La mucosa intestinal es la vía de entrada principal, después de la ingestión oral. En los animales, las manifestaciones clínicas de la listeriosis incluyen encefalitis, septicemia y aborto, especialmente en ovejas, cabras y vacas. La forma septicémica es relativamente poco común y por lo general se produce en el recién nacido. Se caracteriza por depresión, inapetencia, descenso en la producción de leche, fiebre y muerte producida por el daño causado en el hígado y neumonía focal. La forma encefálica se denomina a veces “enfermedad en círculo” debido a la tendencia a dar vueltas en una dirección, y es la manifestación más común de la enfermedad en los rumiantes. Los signos comprenden depresión, anorexia, caída de la cabeza o torcimiento de la cabeza hacia un lado, parálisis facial unilateral y queratoconjuntivitis bilateral, salivación excesiva, visión y locomoción dañados en estados avanzados e incrementa la irritabilidad por lo que esta enfermedad es confundida con la rabia o envenenamiento. En las hembras preñadas, puede atravesar la placenta, entrar al feto donde se replica y causar aborto o nacimiento prematuro del producto muerto. El aborto se produce, por lo general, en la última etapa (después de 7 meses en vacas y 12 semanas en ovejas). Normalmente sólo tiene lugar una forma clínica de listeriosis en un grupo particular de animales. También se ha descrito la oftalmitis ovina y se asocia la mastitis de rumiantes con la infección por *L. monocytogenes* (2,3,33,40,42,43).



### 2.3.2 Factores predisponentes

La capacidad de desarrollar listeriosis clínica, está relacionada con la patogenicidad de la cepa, condición inmune y predisposición genética del hospedero. La gran mayoría de individuos con listeriosis tienen una condición predisponente a la infección relacionada con la inmunidad mediada por células T. Los factores de riesgo incluyen: estación del año, interferencia de alimentación en la granja, prácticas de manejo; enfermedad (malignidad), situaciones inmunosupresoras y estado fisiológico (extremos de la edad y animales preñados). Estos factores indican que la ingestión de *L. monocytogenes*, en general no conduce a la enfermedad en ausencia de un factor de riesgo predisponente (33,43,44,45).

### 2.4 Etiología

*L. monocytogenes* fue clasificada en el Manual Bergey de Bacteriología Determinativa en la familia *Corynebacteriaceae*. Con base en una serie de estudios taxonómicos, bioquímicos, homologaciones de DNA y caracterizaciones de la fracción 16 de RNAr, el género *Listeria* incluye las especies: *L. fleischmanni*, *L. grayi*, *L. innocua*, *L. ivanovii*, *L. marthii*, *L. monocytogenes*, *L. rocourtiae*, *L. seeligeri*, *L. weihenstephanensis* y *L. welshimeri*. Solo las especies *L. monocytogenes* y *L. ivanovii* son consideradas como patógenas para humanos y animales; *L. ivanovii* raramente ha sido involucrada en patologías humanas, y *L. seeligeri* fue reportada sólo una vez como causante de meningitis en un adulto sano, pero en general es considerada no virulenta (15,46,47).

*L. monocytogenes* es un bacilo corto Gram positivo, de 0.4-0.5µm de longitud, con extremos redondeados, algunas células pueden ser curvadas. Es una bacteria anaerobia facultativa, tiene la habilidad para crecer en un amplio rango de temperaturas (0-45°C) y pH (4.4-9), siendo su desarrollo óptimo a 30-37°C y pH neutro. Asimismo, puede sobrevivir en concentraciones de sal de 20-30%. Sin embargo puede ser eliminada a 60°C. En cultivos jóvenes ocasionalmente se agrupan en cadenas cortas

formando empalizadas paralelas o arreglos en forma de "V" o "Y". Los cultivos viejos (3-5 días), principalmente las cepas rugosas, presentan formas filamentosas de 6.0-20.0µm de longitud. No forman esporas, no tienen cápsula. Cuando el germen crece entre 20 y 25°C, se produce flagelina que se une en la superficie, dando lugar a flagelos peritricos, lo cual le da una movilidad característica en forma de tumbos o giros, pero a 37°C su producción es reducida en forma considerable (15,36,48).

Las especies de *Listeria* crecen en medios simples con valores de pH de 5 a 9. En medios sólidos, como agar nutritivo, forman colonias de 0.5-1.5 mm, circulares, translúcidas, con apariencia de gotas de rocío, convexas, con una textura fina y margen entero. Cuando se exponen a la luz blanca a un ángulo de 45°C, se observan azul grisáceo o verdoso con apariencia de vidrio esmerilado. Si el medio contiene carbohidratos fermentables, las colonias pueden alcanzar hasta 3 mm de diámetro. En agar sangre a 37°C por 48h, las colonias pueden ser de 0.2-1.5mm, semejantes a gotas de rocío, translúcidas, de color blanco grisáceo hasta opaco con la edad. La hemólisis puede observarse en agar sangre, pero la zona de hemólisis es tan débil, que es necesario remover la colonia de la superficie. Todas las especies de *Listeria* son catalasa positiva, oxidasa negativa, rojo de metilo y Voges Proskauer positivos e Indol negativo. La caracterización a nivel de especie se basa en la actividad hemolítica sobre agar sangre de carnero, (prueba de CAMP) y en la fermentación de carbohidratos. En la tabla 2 se muestran algunas pruebas bioquímicas para la diferenciación fenotípica de *Listeria monocytogenes* (15,29,36,48,49,50,51).

Tabla 2. Diferenciación fenotípica de *Listeria monocytogenes*

Características	<i>L. monocytogenes</i>	<i>L. innocua</i>	<i>L. ivannovi</i>	<i>L. seeligeri</i>	<i>L. weishmeri</i>	<i>L. grayi</i>
Hemólisis	+	-	+	(+)	-	-
CAMP <i>S. aureus</i> <i>R. equi</i>	+ -	- -	- +	(+) -	- -	- -
Fermentación: Manitol L-ramnosa D-Xilosa	- + -	- V -	- - +	- - +	- V +	+ V -
Hidrólisis de hipurato	+	+	+	No determinado	No determinado	-
Reducción de nitratos	-	-	-	No determinado	No determinado	-
Patogenicidad Murina	+	-	+	-	-	-

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

## 2.5 Tipificación

La identificación reglamentaria de *L. monocytogenes* no exige ninguna tipificación específica de los aislados. Sin embargo, los esquemas de tipificación pueden ser de utilidad en las investigaciones epidemiológicas, en el seguimiento de los casos medioambientales y en la vigilancia de los casos de salud pública. *Listeria monocytogenes* puede tipificarse mediante diferentes aproximaciones incluyendo el serotipado, el fagotipado, la electroforesis de enzimas multilocus (MEE), el análisis del ADN mediante enzimas de restricción (empleando enzimas con alta frecuencia de corte y electroforesis en gel convencional o utilizando enzimas con baja frecuencia de corte y electroforesis en gel de campo pulsado (PFGE) para separar los fragmentos), tipificación basada en la secuencia de los ácidos nucleicos y la amplificación aleatoria del ADN polimórfico (RAPD) (11,12,29,31,52).

### 2.5.1 Serotipificación

Aunque *L. monocytogenes* posee un potencial zoonótico evidente, también es un importante contaminante medioambiental, de relevancia a nivel de salud pública. Se dispone de una tipificación de cepas de dicha especie patógena, establecida mediante una variedad de métodos y con fines de investigación epidemiológica, pero aún no ha sido resuelta la cuestión de si todas las cepas son o no capaces de causar enfermedad. Las especies de *Listeria* se caracterizan por poseer antígenos cuya combinación da origen a 16 serotipos (1,11,12,29,31).

La serotipificación es uno de los métodos fenotípicos más comúnmente utilizados para la subtipificación y es una herramienta útil para los estudios epidemiológicos de *L. monocytogenes*. Las variaciones antigénicas usadas en la serotipificación en las superficies celulares, incluyen antígenos somáticos (O), capsulares (K) y flagelares (H). Las estructuras terciarias diferentes de estos antígenos reaccionan con anticuerpos monoclonales y policlonales específicos del torrente sanguíneo de un animal

hospedero. Diferentes cepas pueden entonces ser asignadas serotipos basados en sus patrones de reacción con un panel de anticuerpos.

La serotipificación de este patógeno inició en 1969. Las especies de *Listeria* poseen múltiples marcadores de superficie tales como los antígenos somáticos (O) y flagelares (H) que demuestran especificidad de grupo y pueden ser utilizados como objetivos para la serotipificación. Los antígenos somáticos (O) de *Listeria* han sido separados en 15 subespecies (I-XV), y los antígenos flagelares en 4 subtipos (A-D). Los serotipos de cepas individuales de *Listeria* son determinados a través de sus combinaciones únicas de antígenos O y H. En el análisis de los antígenos O y H grupo-específicos de *Listeria* a través de la aglutinación en placa, por lo menos 13 serotipos son reconocidos en *L. monocytogenes* (1/2a, 1/2b, 1/2c, 3a, 3b, 3c, 4a, 4b, 4ab, 4c, 4d, 4e, 7), varias en *L. seeligeri*, una en *L. ivanovii*, y algunas en *L. innocua*, *L. welshimeri* y *L. grayi* (Tabla 3). Los antígenos H son útiles para la identificación de *Listeria* spp. Porque el antisuero generado contra estos no produce reacción cruzada con otras especies bacterianas. Los factores H-antigénicos A, B y C pueden ser usados para detectar todas las especies de *Listeria* excepto para *L. grayi*, la cual puede ser identificada por la detección del factor H-antigénico (10,53).

No todos de los aislados reportados en la literatura son tipificables usando este protocolo y algunas veces se producen reacciones cruzadas entre los serotipos de este patógeno. Además, la serotipificación aporta poder discriminatorio relativamente bajo. Por ejemplo, la mayoría de los brotes de listeriosis son causados por cepas de los serotipos 4b, 1/2a y 1/2b, lo cual hace la serotipificación de uso limitado para las investigaciones epidemiológicas. En 1996, la Organización Mundial de la Salud (WHO por sus siglas en inglés), llevó a cabo un estudio de subtipificación internacional para este patógeno usando la serotipificación. La reproducibilidad interlaboratorio fue del 61.3% y la reproducibilidad intralaboratorio varió del 33 al 100% dependiendo de los diferentes serotipos con un valor medio de 91%. Las principales limitaciones de la serotipificación son su costo elevado y ocupa mucho tiempo debido a la necesidad para mantener y manejar antisueros monoclonales y policlonales, y por lo tanto, es más accesible para laboratorios de referencia que realizan la serotipificación rutinariamente. Otro problema asociado a la serotipificación es que los antígenos de cepas diferentes

podrían tener reacción cruzada con diferentes anticuerpos y algunas cepas podrían no expresar antígenos en sus superficies.

Sin embargo la serotipificación se ha desempeñado bien para la subtipificación de *L. monocytogenes*. La serotipificación ha sido usada para evaluar la concordancia epidemiológica de otros diversos métodos de subtipificación. Los métodos moleculares de subtipificación que proveen datos concordantes con la serotipificación son generalmente considerados significativos epidemiológica y filogenéticamente (11,12,29,54,55,56).

Tabla 3. Esquema para la tipificación serológica de *Listeria*.

Serotipo	Antígeno O	Antígeno H	Especie
1/2a	I, II	A, B	<i>L. monocytogenes</i>
1/2b	I, II	A, B, C	
1/2c	I, II	B, D	
3a	II, IV	A, B	
3b	II, IV	A, B, C	
3c	II, IV	B, D	
4a	(V), VII, IX	A, B, C	
4ab	V, VI, VII, IX	A, B, C	
4b	V, VI	A, B, C	
4c	V, VII	A, B, C	
4d	(V), VI, VIII	A, B, C	
4e	V, VI, (VIII), (IX)	A, B, C	
7	XII, XIII	A, B, C	
5	(V), VI, (VIII), X	A, B, C	<i>L. ivanovii</i>
6a	V, (VI), (VII), (IX), XV	A, B, C	<i>L. innocua</i>
6b	(V), (VI), (VII), IX, X, XI	A, B, C	
	(III), XII, XIV	E	<i>L. grayi</i>

(29) Los antígenos entre paréntesis podrían no estar presentes en todos los aislados

## 2.5.2 Tipificación molecular

Actualmente, la identificación de *L. monocytogenes* se realiza por métodos convencionales, que requieren mínimo de 5 días para declarar si un alimento está libre de *Listeria* y 10 días adicionales para reconocer la especie. Sin embargo, en la industria de alimentos estos métodos no permiten la toma de decisiones rápidas, causando incrementos en el costo de producto final por concepto de cuarentena antes de su liberación. Por este motivo, se busca estandarizar técnicas rápidas y sensibles como la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) que permitan detectar el patógeno en alimentos crudos o procesados. Estas técnicas permitirían llevar un control más eficiente del proceso de producción, monitorear las prácticas de limpieza e higiene y tomar decisiones a corto plazo (29,57,58,59).

La introducción de métodos de biología molecular en los laboratorios de microbiología supone un gran apoyo para obtener diagnósticos sensibles y específicos en el menos espacio de tiempo posible. Estos métodos no sustituyen, sino que complementan los métodos microbiológicos tradicionales. El análisis integrado de todos ellos está llevando a resultados más fiables y eficaces. De entre todas las técnicas moleculares utilizadas, la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) ha adquirido un gran valor diagnóstico, permitiendo la detección de agentes etiológicos, y de sus genotipos de virulencia y resistencia, con gran sensibilidad y rapidez. Desde algunos años, ha tomado gran interés el desarrollo de las denominadas PCR múltiples, reacciones que consiguen amplificar simultáneamente y en un único tubo diferentes secuencias diana, permitiendo la detección e identificación simultánea de distintos genes de interés (29,58,60,61)

En el caso de una PCR multiplex, lo que se persigue es amplificar simultáneamente en un único tubo distintas secuencias específicas, lo cual necesariamente implica que los reactivos mezclados y el programa utilizado sean suficientes y adecuados para permitir la detección de cada diana y no inhibir la de las demás. Con este fin, algunos parámetros, como la concentración de magnesio y de cebadores, y el tipo y la cantidad de ADN polimerasa, pueden ajustarse

experimentalmente. Para otros, en cambio, debe realizarse un diseño exhaustivo previo (29,58,60,61).

Las enfermedades infecciosas son una de las cargas más pesadas para la población y muchas de estas infecciones son originadas o complicadas por agentes bacterianos. Por tanto la humanidad se encuentra en una situación en la que es prioritaria la optimización de la lucha contra las enfermedades infecciosas. Como parte de este objetivo global, la microbiología necesita optimizar el nivel de especificidad, sensibilidad y rapidez, en la detección de agentes infecciosos y de sus genes de virulencia y de resistencia, lo cual permitirá ejecutar programas adecuados de prevención y tratamiento de estas enfermedades. Para lograr este propósito, la constante optimización de la PCR multiplex se plantea como una gran alternativa que permitirá la detección simultánea de un número cada vez mayor de dianas, a partir de un número también creciente de tipos de muestras y necesitando una cantidad menor de ácido nucleico molde (62).

El procedimiento adoptado en las investigaciones de brotes es la caracterización del serotipo que provee información valiosa para una clasificación de los grupos de las cepas. La información que proporciona la serotipificación permite discriminar entre aislados que probablemente pertenecen a un brote y aquellos que no son parte de él y así disminuir el número de cepas las cuales necesitan ser caracterizadas por un método de subtipificación como la electroforesis en campo pulsado (PFGE) para incrementar la discriminación. Además la serotipificación es ampliamente usada en la vigilancia epidemiológica de la listeriosis humana. Para la industria alimentaria, donde la presencia de *L. monocytogenes* es un problema, el trazado de las cepas contaminantes dentro de la cadena alimentaria y el ambiente de la planta es de vital importancia y la serotipificación es una herramienta útil para este fin (11,59,63,64).

Por lo anterior, se han probado diversos ensayos como una alternativa que proporcionen la misma información que la serotipificación sin las desventajas descritas. Existe un formato de inmunoensayo, usando en conjunto un kit disponible comercialmente, el cual fue descrito por Palumbo (65). Posteriormente han sido propuestos diversos métodos moleculares basados en PCR ó su combinación con otros



ensayos, algunos de ellos basados en la metodología descrita por Doumith y col. con algunas modificaciones (66-74).

Doumith y col. (64) describieron un nuevo ensayo de PCR multiplex para separar los cuatro principales grupos de serotipos de las cepas de *L. monocytogenes* (1/2a, 1/2b, 1/2c y 4b) en cuatro grupos distintos. Los genes marcadores seleccionados para dicho PCR fueron *Imo0737* y *Imo1118*, identificados en la secuencia de la cepa de *L. monocytogenes* EGDe (1/2a), y *ORF2819* y *ORF2110*, identificada en la secuencia de la cepa de *L. monocytogenes* CLIP 80459 (4b). El gen *prs*, específico de las cepas del género *Listeria* fue seleccionado como control de amplificación interno.

### 3. JUSTIFICACIÓN

En México existen pocos datos sobre la listeriosis y su epidemiología debido a que no se diagnostica adecuadamente, por otro lado éste patógeno cobra cada vez mayor importancia en salud pública a nivel mundial. Las pérdidas económicas que la listeriosis puede causar al productor se reflejan en la disminución en la producción de leche por la mastitis en el ganado crónicamente, por la mortalidad debida a los síntomas nerviosos, abortos, además del problema de salud pública que puede generar.

Los métodos de tipificación se han convertido en una herramienta valiosa durante la investigación de brotes de enfermedades transmitidas por alimentos. Anteriormente los brotes causados por microorganismos provenientes de alimentos eran de escala local, ligados generalmente a una zona o evento social y frecuentemente atribuidos a un manejo inapropiado de los alimentos. Actualmente, los brotes pueden involucrar alimentos que son elaborados y distribuidos a otros lugares dentro o fuera del país donde se producen, lo que ha ocasionado que algunos casos de enfermedades sean difusos geográficamente, dificultando la detección, investigación y control de los brotes.

El análisis rutinario para la serotipificación de *L. monocytogenes* con el método tradicional de aglutinación es una herramienta útil para identificar los diferentes aislamientos, pero está limitado por los costos, la disponibilidad de los antisueros y la habilidad técnica para llevar a cabo el ensayo, ya que la reproducibilidad y especificidad de dicha prueba no siempre son satisfactorias. En el mercado nacional difícilmente se consiguen los antisueros para la serotipificación de *Listeria monocytogenes*, además, estos métodos no permiten la toma de decisiones rápidas. Por lo anterior, es necesario contar con pruebas alternas para este sistema de clasificación, como la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) que permite una mejor discriminación de *Listeria monocytogenes* en los serotipos más importantes, de una forma rápida y específica, útil para estudios epidemiológicos y de trazabilidad en la industria de los alimentos.

## **4. OBJETIVOS**

### **4.1 Objetivo general**

Estandarizar una PCR múltiplex como método de identificación de serotipos de *Listeria monocytogenes*, comparándola con la técnica de aglutinación convencional.

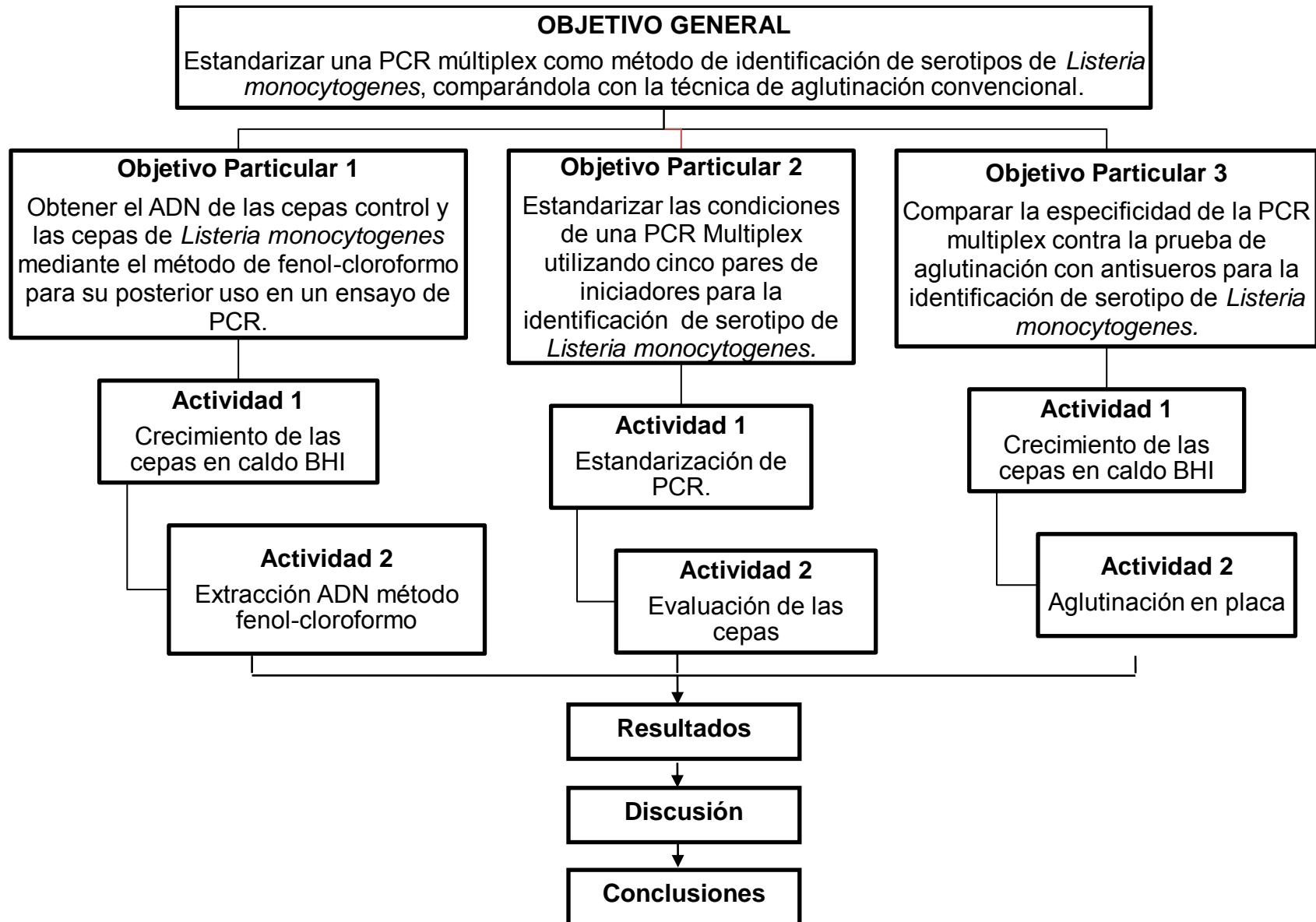
### **4.2 Objetivos particulares**

- 1.-Obtener el ADN de las cepas control y las cepas de *Listeria monocytogenes* mediante el método de fenol-cloroformo para su posterior uso en un ensayo de PCR.
- 2.-Estandarizar las condiciones de una PCR Multiplex utilizando cinco pares de iniciadores para la identificación de serotipo de *Listeria monocytogenes*.
3. Comparar la especificidad de la PCR multiplex contra la prueba de aglutinación con antisueros para la identificación de serotipo de *Listeria monocytogenes*.

## **5. HIPÓTESIS**

Si la PCR multiplex diferencia los principales serotipos de *Listeria monocytogenes*, entonces es posible utilizar esta técnica para su identificación.

## 6. CUADRO METODOLÓGICO



## 7. MATERIALES Y MÉTODOS

### 7.1 Bacterias

Tabla 4. Cepas evaluadas.

CEPA	FUENTE
LMC1	ATCC 43249
LMC2	Hospital SSA, D.F. México
AC1	Alimento, Edo. México
AC2	Alimento, Edo. México
AC3	Alimento, Edo. México
LC1	Leche, Guanajuato
MFC1	Materia fecal, Guanajuato
MFC2	Materia fecal, Guanajuato
MFC3	Materia fecal, Querétaro
QC1	Queso, Edo. México
QC2	Queso, Edo. México
QC3	Queso, Edo. México
QC4	Queso, Edo. México
QC5	Queso, Edo. México

Se evaluaron 12 cepas de *L. monocytogenes*, de las cuales 3 fueron obtenidas de alfalfa, 1 de leche de cabra, 3 de materia fecal de cabra y 5 de queso de cabra (75,76). Además fueron empleados como controles una cepa de *Listeria monocytogenes* ATCC 43249 serotipo 1/2a y una cepa donada por el hospital Manuel Gea González (SSA). Las cepas fueron replicadas en caldo BHI a 37°C en agitación (180 rpm) y se mantuvieron almacenadas en caldo BHI suplementado con glicerol y suero bovino (1:1:1) a -70°C hasta su uso.

## 7.2 Extracción de DNA

Las cepas de *Listeria* fueron crecidas en caldo BHI por 24 horas a 37°C en agitación, separadas del medio por centrifugación a 4125 Xg durante 10 minutos y resuspendidas en 2.5ml de amortiguador TE (Tris HCl 10Mm, EDTA 1Mm), se adicionó y mezcló por inversión 2mg/ml de lisozima incubándolas 2 horas a 37°C; fueron agregados y mezclados 125µl de SDS (preparado al 20%) y 50µg/ml de proteinasa K manteniéndolas a 37°C por 1 hora; después fue mezclado con 84µl de NaCl 5M y 60µl de Bromuro de hexadecil-trimetil-amonio CTAB (CTAB 10% w/v en NaCl 0.7M) y mantenido a 65°C durante 20 minutos. Posteriormente se añadió y mezcló un volumen de fenol-cloroformo 1:1 y fueron centrifugadas a 4125 Xg por 10 minutos, el sobrenadante se puso en contacto con 5µg/ml de RNAsa y se mantuvo una noche a temperatura ambiente (77).

Para separar el DNA se mezcló con un volumen de fenol-cloroformo 1:1 y se centrifugó 10 minutos a 4125 Xg, la fase acuosa superior fue transferida a tubos eppendorf, se mezcló por inversión con dos volúmenes de etanol y fue mantenido 2 horas a -20°C, finalmente se centrifugó a 9000 Xg por 10 minutos, se decantó el sobrenadante, se permitió que el tubo seicara por una noche a temperatura ambiente y el DNA fue resuspendido en amortiguador TE.

## 7.3 Serotipificación molecular mediante PCR multiplex

Fue utilizada una PCR multiplex según el protocolo reportado por Doumith y col. (64), la cual separa los cuatro principales serotipos de *L. monocytogenes* aisladas de alimentos y pacientes (1/2a, 1/2b, 1/2c y 4b) en distintos grupos: I) 1/2a, 3a; II) 1/2b, 3b, 7; III) 1/2c, 3c; IV) 4b, 4d, 4e y un quinto grupo general para todas las especies de *Listeria*. Se emplearon 5 pares de iniciadores que están diseñados con base en regiones variables del genoma de este patógeno las cuales son específicas para los diferentes serotipos y amplifican fragmentos de tamaños que van de 370 a 906 pares de base (Tabla 5 y 6). La reacción se llevó a cabo en un volumen de 25 µl que contenía 50 mM TrisHCl pH 8.3, 10 mM KCl, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.2 mM desoxinucleótidostrifosfato, 2U de Polimerasa termoestable, 2.5 µl de DNA y 10µl de la mezcla de iniciadores (1µl

de *Imo 0737*, 1.5µl de *Imo 1118*, 1µl de *ORF 2819*, 1 µl de 2110 y 0.5µl de *prs*). La amplificación se llevó a cabo con una desnaturalización inicial a 94°C durante 5 minutos, seguida de 35 ciclos 1 minuto a 94°C, 90 segundos a 57°C y 2 minutos a 72°C, y finalmente una extensión a 72° durante 10 minutos. Se utilizó como control positivo la cepa ATCC y como control negativo el DNA fue reemplazado por agua destilada estéril. 10 µl de los productos de PCR fueron analizados por electroforesis en geles de agarosa al 1% (0.5 µg/ml de bromuro de etidio) y visualizados en transiluminador de luz UV. El tamaño de los productos de PCR se obtuvo comparando su posición en el gel con la de un marcador de tamaño conocido, utilizando el coeficiente de movilidad relativo o Rf.

#### **7.4 Serotipificación mediante aglutinación en placa**

Las cepas fueron evaluadas por el método convencional de aglutinación en placa. Para ello se utilizó un kit de serotipificación disponible comercialmente (BD Difco Listeria Antisera and Antigens) de acuerdo con las instrucciones del fabricante, el cual contiene aglutininas para los serotipos 1 y 4 (Listeria O antisuero tipo 1, Listeria O antisuero tipo 4 y Listeria O antisuero poli (10)).

El reactivo Difco Listeria O Antisera tipos 1, 4 y Poly son antisueros de conejo policlonales liofilizados. Listeria O Antisera Tipos 1 y 4 son específicos para los serotipos respectivos de *L. monocytogenes* mientras Listeria Antiserum Poly contiene aglutininas para todos los serotipos de *L. monocytogenes*.

Las 12 cepas aisladas se cultivaron en agar BHI a 37°C por 24 horas. Fueron centrifugadas a 5000 rpm y resuspendidas en buffer PBS. Las suspensiones obtenidas fueron colocadas en baño maría a 80-100°C durante 1 hora. Se preparó una solución de 1:20 de Difco Listeria Antiserum deseado en una solución de NaCl al 0,85%. En un portaobjetos, se colocó una gota del antisuero diluido y una gota de suspensión bacteriana y se observó presencia o ausencia de grumos. Se utilizó como control negativo el buffer PBS.

Tabla 5. Iniciadores utilizados en la PCR múltiplex para la determinación de serotipo reportados por Doumith y col. (64).

INICIADOR	SECUENCIA	AMPLIFICADO (pb)	ESPECIFICIDAD SEROVARIEDAD	PROTEÍNA CODIFICADA
lmo0737 lmo0737	F 5'AGGGCTTCAAGGACTTACCC 3' R 5'ACGATTTCTGCTTGCCATTG 3'	691	1/2a, 1/2c, 3a y 3c	Desconocida No similitud
lmo1118 lmo1118	F 5'AGGGGTCTTAAATCCTGGAA 3' R 5'CGGCTTGTTTCGGCATACTTA 3'	906	1/2c y 3c	Desconocida No similitud
ORF2819 ORF2819	F 5'AGCAAAATGCCAAACTCGT 3' R 5'CATCACTAAAGCCTCCCATTG 3'	471	1/2b, 3b, 4b, 4d y 4c	Regulador transcripcional
ORF2110 ORF2110	F 5'AGTGGACAATTGATTGGTGAA 3' R 5'CATCCATCCCTTACTTTGGAC 3'	597	4b, 4d y 4c	Proteína secretada
prs prs	F 5'GCTGAAGAGATTGCGAAAGAAG 3' R 5'CAAAGAAACCTTGGATTTGCGG 3'	370	Todas las especies de Listeria	fosforibosil pirofosfato sintetasa



Tabla 6. PCR Múltiplex para la serotipificación molecular de *L. monocytogenes* reportado por Doumith y col. (64).

Serotipos	Lmo118 (906 pb)	Lmo0737 (906 pb)	ORF2110 (597 pb)	ORF2819 (471 pb)	Prs (370pb)	Grupo PCR (2)
1/2 a 3a	-	+	-	-	+	Gp 1
1/2 c 3c	+	+	-	-	+	Gp 2
1/2b 3b 7	-	-	-	+	+	Gp 3
4b 4d 4e	-	-	+	+	+	Gp 4

## **8. RESULTADOS**

### **8.1 Serotipificación molecular mediante PCR multiplex.**

En la tabla 7 se muestran los resultados de la PCR múltiplex, todas las especies de *Listeria* amplifican el fragmento del gen *prs* (370pb). En este estudio se encontró que 11 de las 12 cepas probadas pertenecen al grupo 4. La excepción fue la cepa procedente de leche la cual pertenece al serotipo 4a o 4c. En las figuras 1 y 2 se muestran las imágenes de las amplificaciones de la PCR múltiplex para la serotipificación molecular de las cepas de *L. monocytogenes*, en las que se obtuvieron los amplificadores del tamaño esperado.

### **8.2 Serotipificación con antisueros.**

En los resultados de la serotipificación de *L. monocytogenes* mediante aglutinación en placa se observó que dos cepas, una de leche (LC1) y una de materia fecal de cabra (MFC1) no pudieron ser tipificadas por este método. Además se determinó que las cepas pertenecen al serotipo 4 (Tabla 8). Las imágenes de la aglutinación en placa son mostradas en las figuras 3, 4 y 5.

### **8.3 Comparación de las técnicas utilizadas para la serotipificación de las cepas de *L. monocytogenes*.**

En la Tabla 9 se resumen los resultados obtenidos en el presente estudio y se comparan con los resultados de un estudio previo en el que se realizó una tipificación parcial de las cepas de *L. monocytogenes* (76). Relacionando los resultados de la serotipificación mediante aglutinación con la serotipificación molecular mediante PCR múltiplex y PCR-RFLP, se puede diferenciar específicamente los serotipos de las cepas evaluadas excepto en el caso de la cepa de leche de cabra la cual fue identificada como serotipo 4a, 4c o 4b. Obteniéndose así, 11 cepas y la cepa control LMC2 pertenecientes al serotipo 4b y la cepa ATCC 43249 confirmada como serotipo 1/2a.

Tabla 7. Resultado de la serotipificación molecular de las cepas de *L. monocytogenes* mediante PCR Múltiplex.

<b>CEPA</b>	<b>SEROTIPO PCR</b>
LMC1	1/2a o 3a
LMC2	4b, 4d o 4e
AC1	4b, 4d o 4e
AC2	4b, 4d o 4e
AC3	4b, 4d o 4e
LC1	4a o 4c
MFC1	4b, 4d o 4e
MFC2	4b, 4d o 4e
MFC3	4b, 4d o 4e
QC1	4b, 4d o 4e
QC2	4b, 4d o 4e
QC3	4b, 4d o 4e
QC4	4b, 4d o 4e
QC5	4b, 4d o 4e

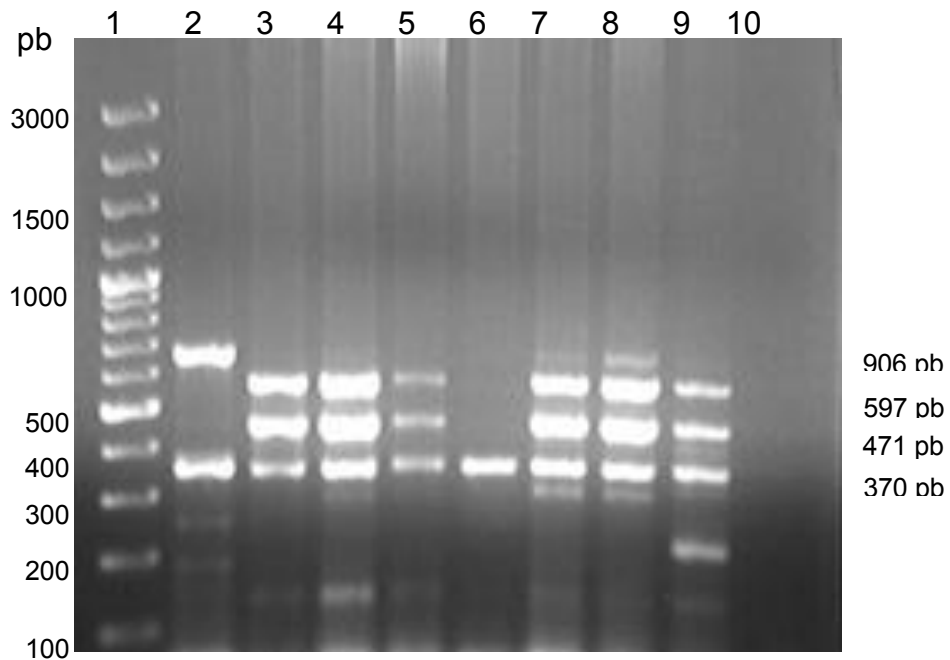


Figura 1. Amplificados de PCR Múltiplex: Carril 1 Marcador de tamaño (100 pb), 2-LMC1 (*L. monocytogenes* ATCC 2349), 3-AC1, 4-AC2, 5-AC3, 6-LC1, 7-MFC1, 8-MFC2, 9-MFC3, 10-control negativo.

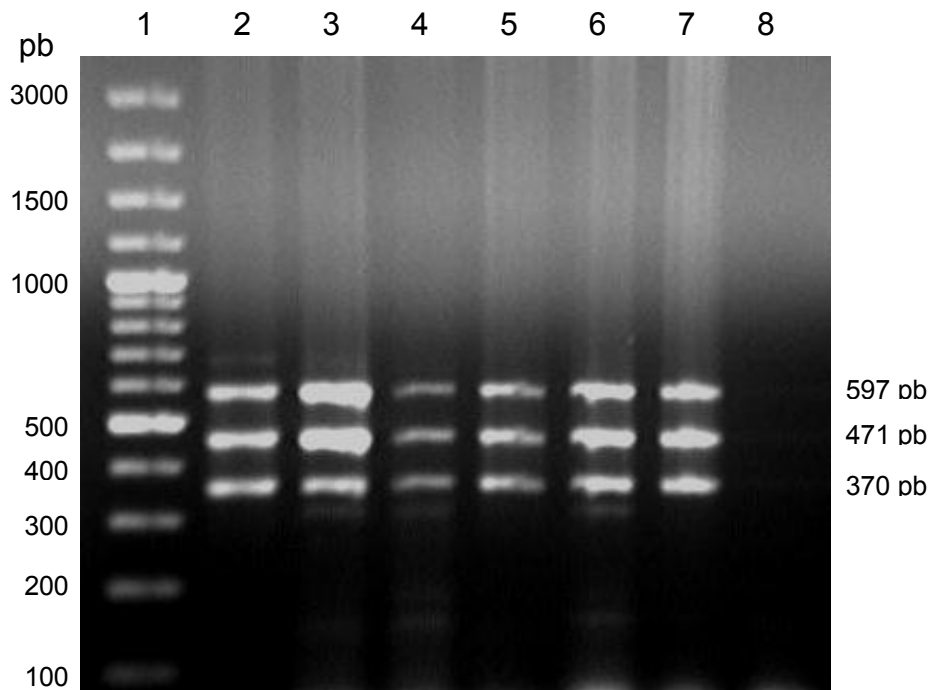


Figura 2. Amplificados de PCR Múltiplex: Carril 1 Marcador de tamaño (100 pb), 2-LMC2, 3-QC1, 4-QC2, 5-QC3, 6-QC4, 7-QC5, 8-control negativo.

Tabla 8. Resultado de la serotipificación de *L. monocytogenes* mediante aglutinación en placa.

<b>CEPA</b>	<b>SEROTIPO</b>
LMC1	1
LMC2	4
AC1	4
AC2	4
AC3	4
LC1	---
MFC1	---
MFC2	4
MFC3	4
QC1	4
QC2	4
QC3	4
QC4	4
QC5	4
Control negativo	---

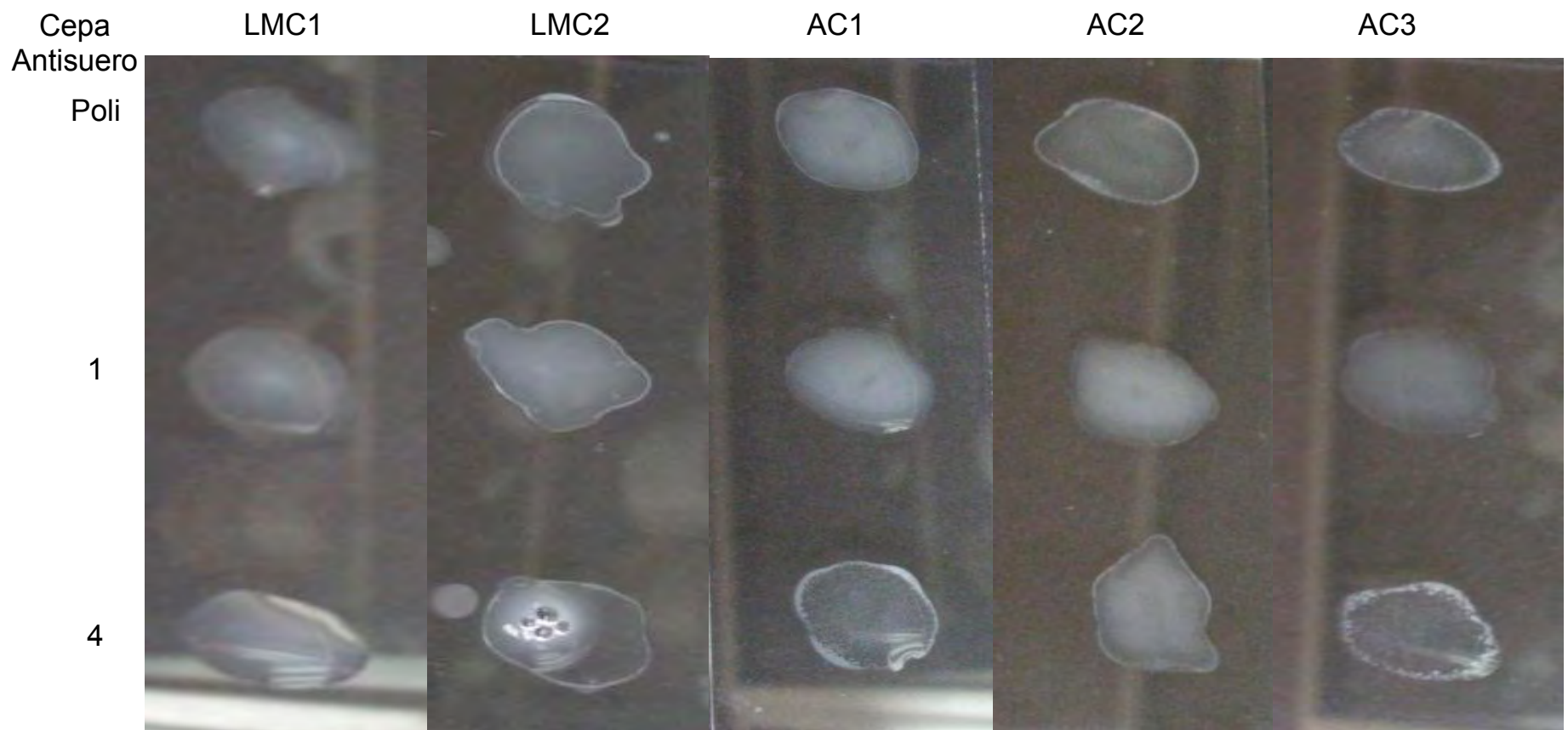


Figura 3. Resultados de la aglutinación en placa con los antisueros Poli, 1 y 4 (Difco), para la serotipificación de las cepas de *L. monocytogenes*. LMC1 Y LMC2 (Cepas control), y las tres cepas aisladas de alfalfa (AC1, AC2, AC3).

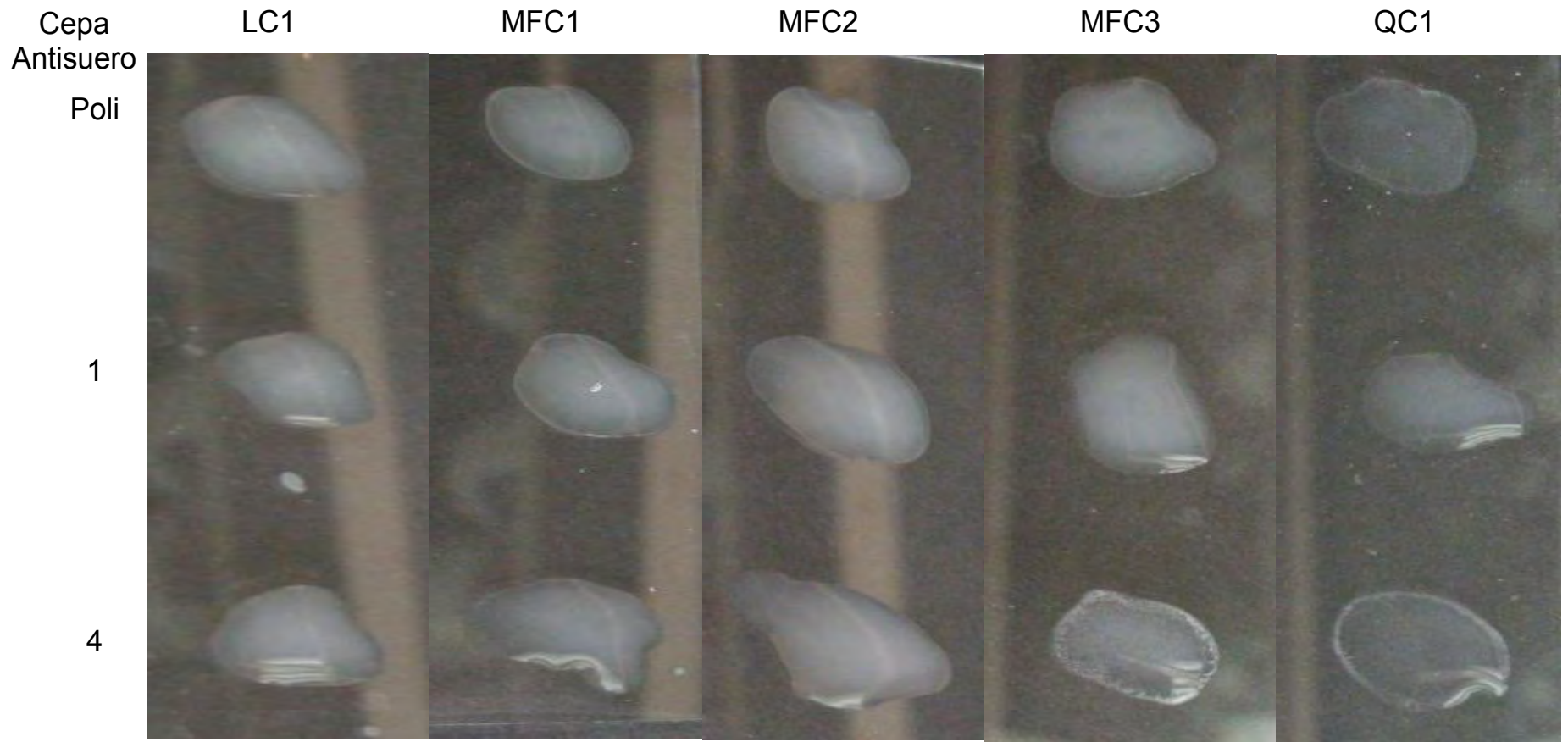


Figura 4. Resultados de la aglutinación en placa con los antisueros Poli, 1 y 4 (Difco), para la serotipificación de las cepas de *L. monocytogenes*. Cepa aislada de leche de cabra (LC1), Tres cepas de materia fecal de cabra (MFC1, MFC2 Y MFC3), y una de queso de cabra (QC1).

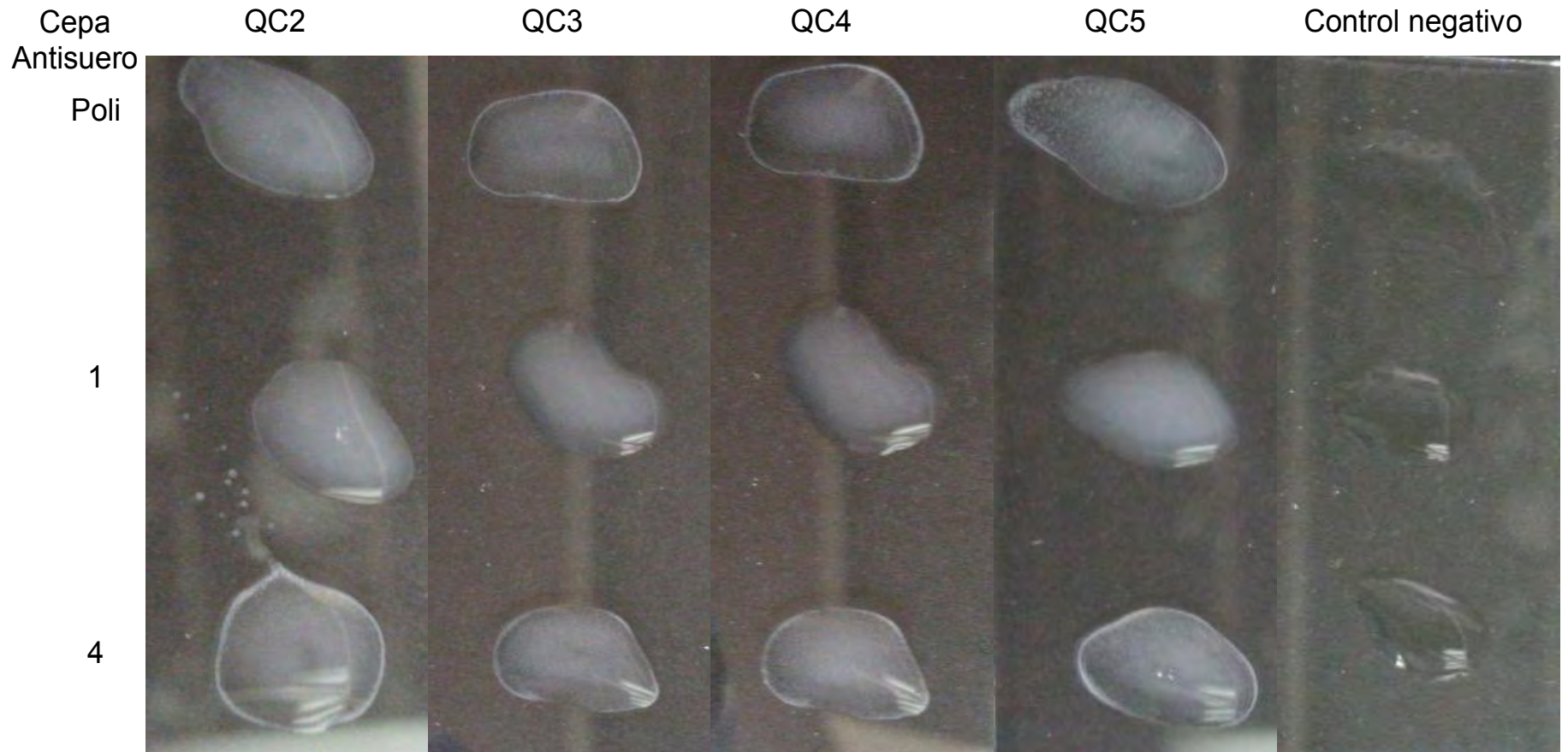


Figura 5. Resultados de la aglutinación en placa con los antisueros Poli, 1 y 4 (Difco), para la serotipificación de cepas de *L. monocytogenes*. Cepa de queso de cabra (QC2, QC3, QC4 Y QC5) y el control negativo.



Tabla 9. Comparación de la serotipificación mediante aglutinación con la serotipificación molecular mediante PCR múltiplex y PCR-RFLP.

CEPA	SEROTIPIFICACIÓN		
	AGLUTINACIÓN	MOLECULAR PCR MULTIPLEX	MOLECULAR PCR-RFLP (76)
LMC1	<b>1</b>	<b>1/2a o 3a</b>	<b>1/2a o 1/2c</b>
LMC2	<b>4</b>	<b>4b, 4d o 4e</b>	1/2b, 3b o <b>4b</b>
AC1	<b>4</b>	<b>4b, 4d o 4e</b>	1/2b, 3b o <b>4b</b>
AC2	<b>4</b>	<b>4b, 4d o 4e</b>	1/2b, 3b o <b>4b</b>
AC3	<b>4</b>	<b>4b, 4d o 4e</b>	1/2b, 3b o <b>4b</b>
LC1	---	<b>4a o 4c</b>	1/2b, 3b o <b>4b</b>
MFC1	---	<b>4b, 4d o 4e</b>	1/2b, 3b o <b>4b</b>
MFC2	<b>4</b>	<b>4b, 4d o 4e</b>	1/2b, 3b o <b>4b</b>
MFC3	<b>4</b>	<b>4b, 4d o 4e</b>	1/2b, 3b o <b>4b</b>
QC1	<b>4</b>	<b>4b, 4d o 4e</b>	1/2b, 3b o <b>4b</b>
QC2	<b>4</b>	<b>4b, 4d o 4e</b>	1/2b, 3b o <b>4b</b>
QC3	<b>4</b>	<b>4b, 4d o 4e</b>	1/2b, 3b o <b>4b</b>
QC4	<b>4</b>	<b>4b, 4d o 4e</b>	1/2b, 3b o <b>4b</b>
QC5	<b>4</b>	<b>4b, 4d o 4e</b>	1/2b, 3b o <b>4b</b>

## 9.-DISCUSIÓN

En la PCR multiplex las amplificaciones de los cuatro fragmentos serotipo-específicos permiten la separación de las cepas de *L. monocytogenes* en cuatro grupos. El grupo 1 comprende cepas de las serovariedades 1/2a y 3a (amplificación únicamente del fragmento de DNA del gen *Imo0737*); el grupo 2 comprende cepas de los serotipos 1/2c y 3c (amplificación de un fragmento del gen *Imo0737* y uno del gen *Imo1118*); el grupo 3 comprende cepas de los serotipos 1/2b, 3b y 7 (amplificación de un fragmento del gen *ORF2819*); y el grupo 4 comprende cepas de los serotipos 4b, 4d y 4e (amplificación de un fragmento del gen *ORF2819* y uno del gen *ORF2110*) (64). Con la prueba de PCR multiplex fue posible definir el serotipo de todas las cepas evaluadas, no así con la prueba de aglutinación en placa.

Los resultados obtenidos mediante PCR multiplex coincidieron con los obtenidos por el método convencional de aglutinación en placa para 10 de las 12 cepas (83.33%) así como para las cepas control. Sin embargo con la prueba de aglutinación en placa no fue posible definir el serotipo de dos de las cepas evaluadas procedentes de leche (LC1) y materia fecal de cabra (MFC1), las cuales mediante la PCR múltiplex fueron determinadas con su pertenencia al serotipo 4 (a ó c) y 4 (b, d ó e) respectivamente. La cepa control LMC2 y 11 cepas obtenidas de alfalfa, materia fecal y queso, se determinaron con su pertenencia al serotipo 4 (b, d ó e). Asimismo, se corroboró el serotipo de la cepa control de *L. monocytogenes* ATCC 43249 con su pertenencia al serotipo 1/2a de acuerdo a datos obtenidos de la ATCC. Los resultados en el presente trabajo coinciden con los obtenidos en un estudio realizado previamente utilizando la técnica de PCR-RFLP (76), con las cepas evaluados en este trabajo (Tabla 9). En dicho estudio los productos del PCR obtenidos de la identificación especie específica de este patógeno (fragmento de 450 pares de bases del gen *iap*) fueron digeridos con la enzima de restricción *Hind* III, los fragmentos generados permiten una distinción entre dos grupos de serotipos de *Listeria monocytogenes*: en el grupo 1 (serotipos 1/2a y 1/2c) producen dos fragmentos, uno de 365 y otro de 88 pb. En el grupo 2 (serovariedades 1/2b, 3b, y 4b), no corta los fragmentos previamente amplificados (68,76).

En el presente trabajo se encontró que 11 de las 12 cepas probadas pertenecen al serotipo 4b, estos resultados coinciden con lo reportado en diversos estudios en América, Asia y Europa en los que se ha encontrado que la mayor parte de los casos de listeriosis, brotes o casos esporádicos en humanos en las últimas décadas, han sido causados por cepas de *L. monocytogenes* pertenecientes al serotipo 4b. Sugiriendo que estas cepas podrían poseer propiedades de virulencia únicas (56,78,79,80,81). Relacionando la distribución de los serotipos con su origen geográfico, Hofer y col. (82) observaron el predominio del serotipo 4b en todas las regiones de Brasil durante los periodos de 1969 y 1972-2000. En un estudio realizado en Portugal por Pintado y cols. (83), aislaron 24 cepas de *Listeria monocytogenes* a partir de quesos elaborados con leche de oveja, 20 de las cuales fueron identificadas como serotipo 4b. Ramaswamy y col. (84) reportaron que el brote más invasivo fue causado por cepas de la serotipo 4b. Moledo de Vasconcelos y col. (73) reportaron la presencia de *L. monocytogenes* en una muestra clínica de fluido cerebro-espinal de un recién nacido prematuro, el aislado fue identificado como serotipo 4b.

La especificidad y precisión de este método de PCR fue evaluada por Doumith y col. (64) primero con 12 cepas de referencia de los serotipos de *L. monocytogenes* y posteriormente fueron confirmadas con 222 cepas de *Listeria* aisladas de humanos y alimentos. Asimismo, la ausencia de amplificación del fragmento de 1/2b serotipo-específico en dos cepas de *L. seeligeri* (serotipo 1/2b) indicó una especificidad alta de este método de PCR para la especie de *L. monocytogenes*.

La PCR múltiple descrita no distingue entre los serotipos de *L. monocytogenes* 1/2a de 3a, 1/2c de 3c, 1/2b de 3b y 7, o 4b de 4d y 4e. Tampoco distingue los serotipos 4a y 4c de otras especies de *L. monocytogenes*. Sin embargo, los serotipos 3a, 3b, 3c, 4a, 4c, 4e, 4d y 7 son muy infrecuentes en alimentos y raramente aislados de casos de listeriosis en humanos. Los datos registrados por el Centro Nacional de Referencia en Francia han mostrado que los serotipos 1/2a, 1/2b, 1/2c y 4b los cuales son separados por este método de PCR en cuatro perfiles de PCR distintos, representaron el 98% de los 5,000 aislados coleccionados de alimentos y pacientes durante tres años. Estas

observaciones sugieren la adaptabilidad de este método de clasificación como una alternativa para la serotipificación, en particular para la vigilancia e investigaciones epidemiológicas (64).

Diversos métodos basados en PCR han sido descritos para la rápida subdivisión interespecie de *L. monocytogenes*. Sin embargo estos métodos subdividen las cepas de *L. monocytogenes* en dos o tres subgrupos en los cuales los serotipos 1/2a y 1/2c y/o 1/2b y 4b no son separados (66,67,68,85). Burocki y Call (69) describieron una metodología de PCR que distingue entre los serotipos de *L. monocytogenes* en cinco grupos distintos, sin embargo se requiere llevar a cabo 2 o 3 ensayos de PCR independientes para obtener dicha clasificación y no es capaz de distinguir entre cepas de *L. monocytogenes* serotipo 4b y cepas de *L. innocua*.

El método de PCR múltiplex descrito por Doumith y col. (64), evaluado en este estudio provee mayor capacidad de discriminación empleando diversos genes marcadores y permite la correcta clasificación de las cepas de *L. monocytogenes* en un solo PCR múltiplex. Siendo un ensayo altamente específico para *L. monocytogenes*, proporcionando así en el mismo ensayo la confirmación de la especie patogénica y con resultados de fácil interpretación.

## 10. CONCLUSIONES

1. La técnica de PCR multiplex estandarizada permitió identificar eficazmente los serotipos de las cepas de *Listeria monocytogenes* evaluadas en forma específica.
2. La PCR multiplex fue más específica para la identificación de serotipo de *Listeria monocytogenes*, comparándola contra la prueba de aglutinación con antisueros.
3. La serotipificación molecular de *Listeria monocytogenes* mediante PCR puede ser una alternativa para el método de tipificación por aglutinación con antisueros.

## 11.-REFERENCIAS

1. Farber JM, Peterkin PI. *Listeria monocytogenes*, a foodborne pathogen. Microbiological Reviews 1991; 53(3):476-511.
2. Wing EW, Gregory SH. *Listeria monocytogenes*: Clinical and experimental update. J Infect Dis 2002; 185:18-24.
3. Vázquez-Boland J, Kuhn M, Berche P, Chakraborty T, Dominguez-Bernal G, Goebel W, *et al.* *Listeria*: Pathogenesis and Molecular Virulence Determinants. Clin Microbiol Rev 2001; 14(3): 584-640.
4. Liu D. Epidemiology. In: Liu D editor. Handbook of *Listeria monocytogenes*. Boca Ratón, FL, USA: CRC Press; 2008a:27-60.
5. CDC, Centers for Disease Control and Prevention. National *Listeria* Surveillance Annual Summary, 2011. Atlanta, Georgia: US Department of Health and Human Services, CDC, 2013.
6. Mead PS, Slutsker L, Dietz V, McCaig LF, Bresee JS, Shapiro C, Griffin PM, Tauxe RV. Food-related illness and death in the United States. Emerg Infect Dis 1999; 5(5):607-625.
7. CDC, Centers for Disease Control and Prevention. Foodborne Diseases Active Surveillance Network (FoodNet): FoodNet Surveillance Report for 2011 (Final Report). Atlanta, Georgia: U.S. Department of Health and Human Services, CDC. 2012.
8. ECDC, European Centre for Disease Prevention and Control. Annual Epidemiological Report 2012. Reporting on 2010 surveillance data and 2011 epidemic intelligence data. Stockholm: ECDC; 2013.
9. Smith MC, Sherman DM. Goat Medicine. 2nd ed. Iowa, USA: Wiley-Blackwell; 2009:202-207.
10. Seeliger HPR, Höhne K. Serotyping of *Listeria monocytogenes* and related species. In: Bergen T, Norris J, editors. Methods in microbiology. New York, USA: Academic Press, 1979:31-49.
11. Graves LM, Swaminathan B and Hunter SB. Subtyping *Listeria monocytogenes*. In: Ryser ET, Marth EH editors. *Listeria*, Listeriosis and Food safety. 3th ed. Boca Ratón FL, USA: CRC Press; 2007:283-304.
12. Chen Y, Knabel SJ. Strain Typing. In: Liu D editor. Handbook of *Listeria monocytogenes*. Boca Ratón, FL, USA: CRC Press; 2008:203-240.

13. Murray EG, Weeb RE, Swann MBR. A disease of rabbits characterized by a large mononuclear leucocytosis caused by a hitherto undescribed bacillus *Bacterium monocytogenes*. J Pathol Bacteriol 1926; 29:407-439.
14. Pirie JH. A new disease of veld rodents "Triger river disease". South African Institute of Medical Research Publications 1927; 3:163-86. In: Low JC, Donachie W, editors. A review of *Listeria monocytogenes* and Listeriosis. Vet J 1997; 153:9-29.
15. Rocourt J, Buchrieser C. The genus *Listeria* and *Listeria monocytogenes*: Phylogenetic position, taxonomy, and identification. In: Ryser ET, Marth EH editors. *Listeria, Listeriosis and Food safety*. 3th ed. Boca Ratón FL, USA: CRC Press; 2007:1-20.
16. Gray ML, Killinger AH. *Listeria monocytogenes* and listeric infections. Bacteriol Reviews 1966; 30:309-382.
17. Ho JL, Shands KN, Friedland G, Eckind P, Fraser DW. An outbreak of type 4b *Listeria monocytogenes* infection involving patients from eight Boston hospitals. Arch Intern Med 1986; 146:520.
18. Schlech WF, Lavigne PM, Bortoussi RA, Allen AC, Haldane EV, Wort AJ, *et al.* Epidemic Listeriosis-evidence transmission by food. N Engl J Med 1983; 308:203-206.
19. Fleming DW, Cochi SL, McDonald KL, Brondum J, Hayes PS, Plikaytis BD, *et al.* Pasteurized milk as a vehicle of infection in an outbreak of Listeriosis. N Engl J Med 1985; 312:404-407.
20. Linnan MJ, Mascola L, Lou XD, Goulet V, May S, Salminen C, *et al.* Epidemic Listeriosis associated with Mexican-style cheese. N Engl J Med 1988; 319:823-828.
21. Bille J. Epidemiology of human listeriosis in Europe, with special reference to Swiss outbreak. Amsterdam: Elsevier, 1990.
22. Goulet V, Lepoutre A, Rocourt J, Courtieu AL, Dehaumont P, Veit P. Epidémie de listériose en France: Bilan final et résultats de l'enquête épidémiologique. Bull Epidémiol Hebdom 1993; 4:13-14.
23. Greenwood MH, Roberts D, Burden P. The occurrence of *Listeria* species in milk and dairy products: A national survey in England and Wales. Int J Food Microbiol 1991; 12:197-206.
24. Ryser ET, Marth EH. *Listeria, Listeriosis and Food safety*. 3th ed. Boca Ratón FL, USA: CRC Press, 2007.

25. Morales LJ, Alanis de la OR, Vázquez-Sandoval ME, Rosas-Barbosa BT. Prevalence of *Listeria monocytogenes* in raw milk in Guadalajara, México. J Food Prot 1995; 58:1139-1141.
26. Vázquez C, Rodas O, Quiñones EI. Occurrence of *Listeria* species in raw milk in farms on the outskirts of México City. Food Microbiol 2001; 18(2):177-181.
27. Saltijeral JA, Álvarez VB, García B. Presencia de *Listeria* en Quesos Mexicanos. J Food Saf 1999; 19(4):241-247.
28. Low JC, Wright F, McLauchin J, Donachie W. Serotyping and Distribution of *Listeria* isolates from case of ovine listeriosis. Vet Rec 1993; 133:165-166.
29. Gasanov U, Hughes D, Hansbro PM. Methods for the isolation and identification of *Listeria spp.* and *Listeria monocytogenes*: a review. FEMS Microbiol Reviews 2005; 29(5):851-875.
30. Painter J, Slutsker L. Listeriosis in humans. In: Ryser ET, Marth EH editors. *Listeria, Listeriosis and Food safety*. 3<sup>th</sup> ed. Boca Ratón FL, USA: CRC Press; 2007:85-109.
31. OIE Organización Internacional de Epizootias. *Listeria monocytogenes*, capítulo 2.9.7. Manual de la OIE sobre animales terrestres, 2008:1-18. Consultada Agosto 2013.
32. Alcayaga S, Hott B. *Listeria* y listeriosis: un desafío de los nuevos tiempos. Rev Chil Salud Pública 2008; 12(3):188-195.
33. Wesley IV. Listeriosis in animals. In: Ryser ET, Marth EH, editors. *Listeria, Listeriosis and Food safety*. 3<sup>th</sup> ed. Boca Ratón FL, USA: CRC Press; 2007:55-84.
34. Oevermann A, Zurbriggen A, Vandeveld M. Rhombencephalitis Caused by *Listeria monocytogenes* in Humans and Ruminants: A Zoonosis on the Rise?. Interdisciplinary Perspectives Infect Dis; 2010:22.
35. Ho AJ, Ivanek R, Gröhn YT, Nightingale KK, Wiedmann M. *Listeria monocytogenes* fecal shedding in dairy cattle shows high levels of day-to-day variation and includes outbreaks and sporadic cases of shedding of specific *L. monocytogenes* subtypes. Prev Vet Med 2007; 80:287-305.
36. Montville JT, Matthews KR. Food Microbiology an Introduction. 2<sup>nd</sup> ed. Washington DC, USA: ASM Press, 2008.
37. Brugère-Picoux L. Ovine Listeriosis. Small Rumin Res 2008; 76:12-20.
38. Chavarrias M. Zoonosis y seguridad alimentaria. Boletín semanal 24 mayo 2007. <http://www.consumaseguridad.com>



39. Ivanović S, Zutić M, Pavlović I. Presence of *Listeria monocytogenes* at goats. *Biotech in Animal Husbandry* 2010; 26(3-4):193-202.
40. Engeland IV, Waldeland H, Ropstad E, Kindahl H, Andersen O. Effect of experimental infection with *Listeria monocytogenes* on the development of pregnancy and on concentrations of progesterone, oestrone sulphate and 15-ketodihydro-PFG2 in the goat. *Animal Reproduction Sci* 1997; 45:331-327.
41. Adams CE. *Listeria: The organism and the disease*. United States Department of Agriculture (USDA): Extension service, 1999.
42. Walker JK, Morgan JH. Ovine ophthalmitis associated with *Listeria monocytogenes*. *The Veterinary Record* 1993; 132(25):636.
43. Kuhn M, Scotti M, and Vazquez-Boland JA. Pathogenesis. In: Liu D editor. *Handbook of Listeria monocytogenes*. Boca Ratón, FL, USA: CRC Press; 2008:97-136.
44. Blood DC, Radostits OM, Henderson JA. *Medicina Veterinaria*. 6ta ed. DF, México: Nueva Editorial Interamericana; 1988.
45. Orndorff PE, Hamrick TS, Smoak IW, Havell EA. Host and bacterial factors in listeriosis pathogenesis. *Vet Microbiol* 2006; 114:1-15.
46. Hain T, Ghai R, Billion A, Kuenne CT, Steinweg C, Izar B, Mohamed W, Abu Mraheil M, *et al*. Comparative genomics and transcriptomics of lineages I, II, and III strains of *Listeria monocytogenes*. *BMC Genomics* 2012; 13:144.
47. EFSA and ECDC (European Food Safety Authority and European Centre for Disease Prevention and Control). The European Union Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses, Zoonotic Agents and Food-borne Outbreaks in 2011. *EFSA Journal* 2013; 11(4):3129.
48. Wagner M, McLauchlin J. Biology. In: Liu D, editor. *Handbook of Listeria monocytogenes*. Boca Ratón, FL, USA: CRC Press; 2008:3-25.
49. Allerberger F. *Listeria: growth, phenotypic differentiation and molecular microbiology*. *FEMS Immun and Medical Microbiol* 2003; 35:183-189.
50. Donnelly CW, Nyachuba DG. Conventional methods to detect and isolate *Listeria monocytogenes*. In: Ryser ET, Marth EH, editors. *Listeria, Listeriosis and Food safety*. 3<sup>th</sup> ed. Boca Ratón FL, USA: CRC Press; 2007:215-256.
51. Gorski L. Phenotypic identification. In: Liu D, editor. *Handbook of Listeria monocytogenes*. Boca Ratón, FL, USA: CRC Press; 2008:139-168.
52. Wiedmann M. Subtyping of Bacterial Foodborne Pathogens. *Nutrition Reviews* 2002; 60(7):201-208.

53. Seeliger HPR, Langer B. Serological analysis of the genus *Listeria*. Its values and limitations, *Int J Food Microbiol* 1989; 8(3):245-248 .
54. Schonberg A, Bannerman E, Courtieu AL, Kiss R, McLauchlin J, Shah S, Wilhelms D. Serotyping of 80 strains from the WHO multicentre international typing study of *Listeria monocytogenes*. *Int J Food Microbiol* 1996; 32:279-287.
55. Nadon CA, Woodward DL, Young C, Rodgers G, Wiedmann M. Correlations between molecular subtyping and serotyping of *Listeria monocytogenes*. *J Clin Microbiol* 2001; 39:2704-2707.
56. Kathariou S. *Listeria monocytogenes* virulence and pathogenicity, a food safety perspective. *J Food Prot* 2002; 65:1811-1829.
57. Maukonen J, Matto J, Wirtanen G, Raaska L, Mattila-Sandholm T, Saarela M. Methodologies for the characterization of microbes in industrial environments: a review. *J Ind Microbiol Biotechnol* 2003; 30:327-356.
58. Liu D, Lawrence ML, Ainsworth AJ, Austin FW. Genotypic identification. In: Liu D editor. *Handbook of Listeria monocytogenes*. Boca Ratón, FL, USA: CRC Press; 2008:169-201.
59. Jadhav S, Bhave M, Enzo A. Palombo. Methods used for the detection and subtyping of *Listeria monocytogenes*. *Journal of Microbiological Methods* 2012; 88:327–341.
60. Méndez AS, Pérez RE. La PCR multiple en microbiología clínica. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2004; 22(3):183-192.
61. Brehm-Stecher BF, Johnson EA. Rapid Methods for detection of *Listeria*. In: Ryser ET, Marth EH, editors. *Listeria, Listeriosis and Food safety*. 3<sup>th</sup> ed. Boca Ratón FL, USA: CRC Press; 2007:257-281.
62. Brundtland GH. Organización Mundial de la Salud (OMS), Informe sobre las enfermedades infecciosas. Código de publicación: WHO/CDS/99.1. Organización Mundial de la Salud, 1999. <http://www.who.int/infectious-disease-report/idr99-spanish/pages/textonly.html#ch10>
63. Tappero JW, Schuchat A, Deaver KA, Mascola L, Wenger JD, et al. Reduction in the incidence of human listeriosis in the United States. Effectiveness of prevention efforts?. *JAMA* 1995; 273:1118–1122.
64. Doumith M, Buchrieser C, Glaser P, Jacquet C, Martin P. Differentiation of the major *Listeria monocytogenes* serovars by multiplex PCR. *J Clin Microbiol* 2004; 42(8):3819-3822.

65. Palumbo JD, Burocki MK, Mandrell RE, Gorski L. Serotyping of *Listeria monocytogenes* by enzyme-linked immunosorbent assay and identification of mixed-serotype cultures by colony immunoblotting. *J Clin Microbiol* 2003; 41:564-571.
66. Comi G, Cocolin L, Cantoni C, Manzano M. A RE-PCR method to distinguish *Listeria monocytogenes* serovars. *FEMS Immunol Med Microbiol* 1997; 18:99-104.
67. Manzano M, Cocolin L, Pipan C, Falasca E, Botta GA, Cantoni C, Comi G. Single-strand conformation polymorphism (SSCP) analysis of *Listeria monocytogenes iap* gene as tool to detect different serogroups. *Mol Cell Probes* 1997; 11:459-462.
68. Manzano M, Cocolin L, Cantoni C, Comi G. A rapid method for the identification and partial serotyping of *Listeria monocytogenes* in food by PCR and restriction enzyme analysis. *Int J Food Microbiol* 1998; 42:207-212.
69. Borucki MK, Call DR. *Listeria monocytogenes* serotype identification by PCR. *J Clin Microbiol* 2003; 41:5537-5540.
70. Doumith M, Jacquet C, Gerner-Smidt P, Graves LM, Loncarevic S, Mathisen T, *et al*. Multicenter validation of a multiplex PCR assay for differentiating the major *Listeria monocytogenes* serovars 1/2a, 1/2b, 1/2c, and 4b: toward an international standard. *J Food Prot* 2005; 68:2648-2650.
71. Zhang W, Knabel SJ. Multiplex PCR assay simplifies serotyping and sequence typing of *Listeria monocytogenes* associated with human outbreaks. *J Food Prot* 2005; 68:1907-1910.
72. De Santis EP, Pilo AL, Cosseddu AM, Canu NA, Scarano C, Marongiu P. Multiplex PCR for the identification and serotyping of *L. monocytogenes* isolated from sheep cheese-processing plants. *Vet Res Commun* 2007; 31(Suppl 1):359-363.
73. Moledo de Vasconcelos R, Castro CAE, Hofer E, Matias da Silva NM, Marin VA. Multiplex-PCR serotyping of *Listeria monocytogenes* isolated from human clinical specimens. *Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro* 2008; 103(8): 836-838.
74. Kérouanton A, Marault M, Petit L, Grout J, Tam Dao T, Brisabois A. Evaluation of a multiplex PCR assay as an alternative method for *Listeria monocytogenes* serotyping. *J Microbiological Methods* 2010; 80:134-137.
75. Amaya MG, Álvarez MC, Doniz ME, Morales R, Martínez HA. Calidad microbiológica de diferentes tipos de queso de cabra [resumen]. XVIII Reunión nacional sobre caprinocultura. Puebla, México, 2003:132-134.
76. Ramirez BG. Estudio de *Listeria monocytogenes* en leche de cabra (tesis de maestría). Cuautitlán Izcalli (Edo. De México) México: UNAM, 2007.

77. Burbano E, Sierra S, Torres K, Mercado M, Carrascal A, Potou R. Rapid DNA extraction and PCR validation for direct detection of *Listeria monocytogenes* in raw milk. MVZ Córdoba 2006; 11(1):715-724.
78. Ericsson H, Stålhandske P, Danielsson-Tham ML, Bannerman E, Bille J, Jacquet C, Rocourt J, Tham W. Division of *Listeria monocytogenes* serovar 4b strains into two groups by PCR and restriction enzyme analysis. Appl Environ Microbiol 1995; 61:3872-3874.
79. Doumith M, Cazalet C, Simoes N, Frangeul L, Jacquet C, Kunst F, Martin P, Cossart P, Glaser P, Buchrieser C. New aspects regarding evolution and virulence of *Listeria monocytogenes* revealed by comparative genomics and DNA arrays. Infect Immun 2004b; 72: 1072-1083.
80. Gray M, Zadoks RN, Fortes ED, Dogan B, Cai S, Chen Y, Scott VN, Gombas PE, Boor KJ. *Listeria monocytogenes* isolates from foods and humans form distinct but overlapping populations. Appl Environ Microbiol 2004; 70: 5833-5841.
81. Jacquet C, Doumith M, Gordon JI, Matin PMV, Cossat P, Lecerit M. A molecular marker for evaluating the pathogenic potential of foodborne *Listeria monocytogenes*. J Infect Dis 2004; 189:2094-2100.
82. Hofer E, Reis CMF, Hofer CB. Serovars of *Listeria monocytogenes* and related species isolated from human clinical specimens. Rev Soc Bras Med Trop 2006; 39:32-37.
83. Pintado CMBS, Oliveira A, Pampulha ME, Ferreira MASS. Prevalence and characterization of *Listeria monocytogenes* isolated from soft cheese. Food Microbiol 2005; 22:79–85.
84. Ramaswamy V, Cresence VM, Rejitha JS, Lekshmi MU, Dharsana KS, Prasad SP, Vijila HM. *Listeria*: review of epidemiology and pathogenesis. J Microbiol Immunol Infec 2007; 40:4-13.
85. Jinneman kC, Hill WE. *Listeria monocytogenes* lineage group classification by MAMA-PCR of the listeriolysin gene. Curr Microbiol 2001; 43:129-133.