



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

DOCTORADO EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN
Y DE LA SALUD ANIMAL

VIRULENCIA Y TIPIFICACIÓN MOLECULAR DE
Listeria monocytogenes AISLADA DE
EXPLORACIONES CAPRINAS

T E S I S

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

DOCTOR EN CIENCIAS

P R E S E N T A:

GUICELA RAMÍREZ BERNAL

TUTOR: DR. VÍCTOR RUBÉN TENORIO GUTIÉRREZ
FES CUAUTITLÁN, UNAM

COMITÉ TUTOR: DR. CARLOS GERARDO GARCÍA TOVAR
FES CUAUTITLÁN, UNAM

DR. EFRÉN DÍAZ APARICIO
FMVZ, UNAM



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.

Laboratorio de Infectología, Departamento de medicina experimental, Facultad de Medicina. Unidad de medicina experimental de la UNAM, Hospital General.

Fue financiado por:

Proyecto SAGARPA 46599

Proyecto CONACyT SIN-2008/90945

Beca CONACyT no. 173630

ÍNDICE

	Pag
Resumen	
Abstract	
1. Introducción	1
2. Antecedentes	3
2.1 Listeriosis	3
2.2 Epidemiología	4
2.3 Etiología	7
2.4 Patogenia	9
2.5 Virulencia	14
2.6 Tipificación molecular	17
2.7 Blast	20
2.8 Cabras	21
3. Justificación	23
4. Objetivos	24
4.1 Objetivo General	24
4.2 Objetivos Particulares	24
5. Hipótesis	24
6. Cuadro metodológico	25
7. Materiales y métodos	26
7.1 Bacterias	26
7.2 Ratones	27
7.3 Células	27
7.4 Virulencia relativa de las cepas de <i>L. monocytogenes</i> en ratones BALB/c	27
7.4.1 Pase en ratones BALB/c	27
7.4.2 Virulencia relativa en ratones BALB/c	28
7.5 Crecimiento intracelular de las cepas de <i>L. monocytogenes</i> en macrófagos J774A.1 y células Caco-2	29
7.6 Presencia de mutaciones en los principales genes que intervienen en la virulencia de <i>Listeria monocytogenes</i> .	30
7.6.1 Amplificación de los genes por PCR	30
7.6.2 Análisis de polimorfismo en los genes amplificados (RFLP)	31
7.6.3 Detección de mutaciones	31
7.7 Tipificación molecular de las cepas de <i>L. monocytogenes</i> mediante Macro restricción y electroforesis de campo eléctrico pulsado REA-PFGE	33

8. Resultados	35
8.1 Virulencia relativa en ratones BALB/c	35
8.2 Crecimiento intracelular en macrófagos J774A.1 y células epiteliales Caco-2	38
8.3 Presencia de mutaciones en los principales genes que intervienen en la virulencia de <i>L. monocytogenes</i> .	41
8.3.1 Amplificación de los genes por PCR	41
8.3.2 Análisis de polimorfismo en los genes amplificados (RFLP)	41
8.3.3 Detección de mutaciones	54
8.4 Tipificación molecular	63
9. Discusión	68
10. Conclusiones	81
11. Referencias	82

ÍNDICE DE TABLAS

	pag
Tabla 1. Cepas de <i>L. monocytogenes</i> evaluadas en este estudio.	26
Tabla 2. Secuencia de los iniciadores utilizados para la amplificación de los genes que intervienen en la virulencia de <i>Listeria monocytogenes</i> .	32
Tabla 3. Resultados del ensayo de virulencia en ratones BALB/c.	36
Tabla 4. Amplificación de los genes que intervienen en la virulencia de <i>Listeria monocytogenes</i> , tamaño obtenido en pares de bases (pb).	43
Tabla 5. Análisis de polimorfismo, grupos generados en base a los patrones de corte obtenidos por las 7 endonucleasas en los principales genes que intervienen en la virulencia de <i>L. monocytogenes</i> (PCR-RFLP), y por la macro restricción del ADN de las cepas (REA-PFGE).	48
Tabla 6. Comparación de los fragmentos generados por las endonucleasas en las cepas de referencia EGD-e y F2365 mediante el software NEB cutter V2.0, con los obtenidos en el ensayo de polimorfismo (PCR-RFLP) en los genes <i>inIA</i> , <i>inIB</i> , <i>plcA</i> y <i>plcB</i> de las cepas procedentes de cabras y subproductos lácteos.	52
Tabla 7. Comparación de los fragmentos generados por las endonucleasas en las cepas de referencia EGD-e y F2365 mediante el software NEB cutter V2.0, con los obtenidos en el ensayo de polimorfismo (PCR-RFLP) en los genes <i>hly</i> , <i>mpl</i> , <i>actA</i> y <i>prfA</i> de las cepas procedentes de cabras y subproductos lácteos.	53
Tabla 8. Homología observada en la secuencia de los genes <i>inIA</i> , <i>inIB</i> y <i>actA</i> entre las cepas de <i>L. monocytogenes</i> evaluadas y las cepas <i>L. monocytogenes</i> EGD-e (serotipo 1/2a), <i>L. monocytogenes</i> F2365 y <i>L. monocytogenes</i> Clip80459 (ambas serotipo 4b).	55
Tabla 9. Variaciones en la secuencia de nucleótidos detectadas en los genes <i>inIA</i> , <i>inIB</i> y <i>actA</i> de las cepas de <i>L. monocytogenes</i> evaluadas, respecto a la cepa <i>L. monocytogenes</i> EGD-e.	62

ÍNDICE DE FIGURAS

	pag
Figura 1. Conteos bacterianos (ufc) en bazo de ratones BALB/c, posteriores a la inoculación intravenosa o intragastrica de doce cepas de <i>L. monocytogenes</i> evaluadas y dos cepas control.	37
Figura 2. Invasión de las cepas de <i>L. monocytogenes</i> en células epiteliales Caco-2 y Macrófagos J774.	39
Figura 3. Crecimiento intracelular de las cepas de <i>Listeria monocytogenes</i> . A)Células epiteliales Caco-2, B)Macrófagos J774A.1. Valores de ufc (log ₁₀) registrados 2, 4, 8 y 24 horas posteriores a infección.	40
Figura 4. Amplificación por PCR del gen <i>inIA</i> de las cepas de <i>Listeria monocytogenes</i> evaluadas, electroforesis en geles de agarosa.	44
Figura 5. Amplificación por PCR del gen <i>inIB</i> de las cepas de <i>Listeria monocytogenes</i> evaluadas, electroforesis en geles de agarosa.	44
Figura 6. Amplificación por PCR del gen <i>plcA</i> de las cepas de <i>Listeria monocytogenes</i> evaluadas, electroforesis en geles de agarosa.	45
Figura 7. Amplificación por PCR del gen <i>plcB</i> de las cepas de <i>Listeria monocytogenes</i> evaluadas, electroforesis en geles de agarosa.	45
Figura 8. Amplificación por PCR del gen <i>hly</i> de las cepas de <i>Listeria monocytogenes</i> evaluadas, electroforesis en geles de agarosa.	46
Figura 9. Amplificación por PCR del gen <i>mpl</i> de las cepas de <i>Listeria monocytogenes</i> evaluadas, electroforesis en geles de agarosa.	46
Figura 10. Amplificación por PCR del gen <i>actA</i> de las cepas de <i>Listeria monocytogenes</i> evaluadas, electroforesis en geles de agarosa.	47
Figura 11. Amplificación por PCR del gen <i>prfA</i> de las cepas de <i>Listeria monocytogenes</i> evaluadas, electroforesis en geles de agarosa.	47
Figura 12. Patrones electroforéticos obtenidos por la digestión del gen <i>inIB</i> de las cepas de <i>Listeria monocytogenes</i> con la endonucleasa <i>Hind</i> III, electroforesis en geles de agarosa al 2%.	49
Figura 13. Patrones electroforéticos obtenidos por la digestión del gen <i>InIA</i> de las cepas de <i>Listeria monocytogenes</i> con la endonucleasa <i>Tsp</i> 5091, electroforesis en geles de agarosa al 2%.	49
Figura 14. Patrones electroforéticos obtenidos por la digestión del gen <i>hly</i> de las cepas de <i>Listeria monocytogenes</i> con la endonucleasa <i>Hae</i> III, electroforesis en geles de agarosa al 2%.	50
Figura 15. Patrones electroforéticos obtenidos por la digestión del gen <i>plcA</i> de las cepas de <i>Listeria monocytogenes</i> con la endonucleasa <i>Hha</i> I, electroforesis en geles de agarosa al 2%.	50

	pag
Figura 16. Patrones electroforéticos obtenidos por la digestión del gen <i>prfA</i> de las cepas de <i>Listeria monocytogenes</i> con la endonucleasa <i>Alu I</i> , electroforesis en geles de agarosa al 2%.	51
Figura 17. Patrones electroforéticos obtenidos por la digestión del gen <i>mpl</i> de las cepas de <i>Listeria monocytogenes</i> con la endonucleasa <i>Rsa I</i> , electroforesis en geles de agarosa al 2%.	51
Figura 18. Alineamiento del gen <i>inlA</i> de las cepas de <i>L. monocytogenes</i> evaluadas respecto a la cepa <i>L. monocytogenes</i> EGD-e, posición 139 a 898.	56
Figura 19. Alineamiento del gen <i>inlA</i> de las cepas de <i>L. monocytogenes</i> evaluadas respecto a la cepa <i>L. monocytogenes</i> EGD-e, posición 1609 a 2410.	57
Figura 20. Alineamiento del gen <i>inlB</i> de las cepas de <i>L. monocytogenes</i> evaluadas respecto a la cepa <i>L. monocytogenes</i> EGD-e, posición 40 a 797.	58
Figura 21. Alineamiento del gen <i>inlB</i> de las cepas de <i>L. monocytogenes</i> evaluadas respecto a la cepa <i>L. monocytogenes</i> EGD-e, posición 1033 a 1863.	59
Figura 22. Alineamiento del gen <i>actA</i> de las cepas de <i>L. monocytogenes</i> evaluadas respecto a la cepa <i>L. monocytogenes</i> EGD-e, posición 13 a 792.	60
Figura 23. Alineamiento del gen <i>actA</i> de las cepas de <i>L. monocytogenes</i> evaluadas respecto a la cepa <i>L. monocytogenes</i> EGD-e, posición 1021 a 1834.	61
Figura 24. Electroforesis de campo eléctrico pulsado (PFGE), patrones electroforéticos obtenidos por la digestión del ADN de las cepas de <i>Listeria monocytogenes</i> con la endonucleasa <i>Asc I</i> .	64
Figura 25. Electroforesis de campo eléctrico pulsado (PFGE), patrones electroforéticos obtenidos por la digestión del ADN de las cepas de <i>Listeria monocytogenes</i> con la endonucleasa <i>Apa I</i> .	65
Figura 26. Dendograma que representa la similitud entre las cepas de <i>Listeria monocytogenes</i> , construido con la matriz elaborada a partir de los patrones de restricción generados con la endonucleasa <i>Asc I</i> y electroforesis de campo eléctrico pulsado (PFGE), usando el método de agrupamiento UPGMA.	66
Figura 27. Dendograma que representa la similitud entre las cepas de <i>Listeria monocytogenes</i> , construido con la matriz elaborada a partir de los patrones de restricción generados con la endonucleasa <i>Apa I</i> y electroforesis de campo eléctrico pulsado (PFGE), usando el método de agrupamiento UPGMA.	67

RESUMEN

La listeriosis es una infección causada por la bacteria *Listeria monocytogenes* en humanos y animales. La mayoría de los casos de listeriosis clínica en animales han sido reportados en rumiantes. En México son escasos los estudios realizados para evaluar la virulencia y tipificar molecularmente las cepas de *Listeria monocytogenes*. En este estudio fue evaluada la virulencia de doce cepas de *L. monocytogenes* serotipo 4b procedentes de explotaciones caprinas y subproductos lácteos. Se observaron niveles de virulencia variables cuando se comparó la virulencia relativa (% de letalidad) en ratones BALB/c inoculados vía intravenosa o intragástrica y su capacidad para infectar macrófagos J774A.1 y células epiteliales Caco-2. Dos cepas aisladas de alimento de cabras (alfalfa) produjeron una virulencia relativa de 100% por ambas vías de inoculación y no mostraron diferencia significativa con la cepa control ($p > 0.05$) respecto al porcentaje de invasión y a los parámetros de la cinética de crecimiento cuadrática observada en ambas líneas celulares. Si bien todas las cepas lograron invadir y crecer intracelularmente en los macrófagos y las células Caco-2, solamente algunas consiguieron invadir el bazo después de la inoculación por vía intragástrica. Además se detectó polimorfismo en ocho de los genes que intervienen en la virulencia y se encontraron diversos cambios en las secuencias de aminoácidos respecto a la cepa *L. monocytogenes* EGD-e, producidos por deleciones, inserciones y sustitución de nucleótidos en los genes *inIA*, *inIB* y *actA*, los cuales mostraron una homología promedio de 96% con los respectivos genes de las cepas *L. monocytogenes* F2365 y Cip8045, aisladas de brotes de listeriosis. La electroforesis en campo pulsado PFGE fue útil para la tipificación molecular de las cepas evaluadas, mostrando un patrón de restricción idéntico para las dos cepas aisladas de alfalfa. En base a los resultados obtenidos, se confirmó la variación en la virulencia entre cepas de este patógeno y la necesidad de combinar los ensayos moleculares con la evaluación *in vivo* o *in vitro*, para corroborar el potencial patogénico de los aislamientos de esta bacteria.

Palabras clave: *Listeria monocytogenes*, cabras, virulencia relativa, crecimiento intracelular, PCR-RFLP, secuenciación de ADN, PFGE.

ABSTRACT

Listeriosis is an infection caused by the bacterium *Listeria monocytogenes* in humans and animals. Most clinical cases of listeriosis in animals have been reported in ruminants. In México the studies conducted to assess the virulence and molecularly characterize *L. monocytogenes* strains are scarce. In this study, the virulence of twelve *L. monocytogenes* serotype 4b strains isolated from goats and their byproducts was evaluated. Variable virulence levels were observed when the relative virulence (% lethality) was compared in BALB/c mice inoculated intravenously or intragastric and its ability to infect J774A.1 macrophages and epithelial cells Caco-2. Two strains isolated from goat feed (alfalfa) produced a 100% relative virulence by both routes of inoculation and showed no significant difference with the control strain ($p > 0.05$) compared to the percentage of invasion and kinetic parameters of quadratic growth observed in both cell lines. While all strains were able to invade and grow intracellularly in macrophages and Caco-2 cells, only a few managed to invade the spleen after intragastric inoculation. Polymorphism was also detected in eight of the genes involved in virulence and various changes in the amino acid sequences was found with regard to *L. monocytogenes* strain EGD-e, produced by deletions, insertions and nucleotide substitution in *inlA*, *InlB* and *actA* genes which showed an average of 96% homology with the corresponding genes of *L. monocytogenes* strains F2365 and Cip8045, isolated from listeriosis outbreaks. The pulsed-field electrophoresis PFGE was useful for molecular typing of the strains tested, showing a restriction pattern identical for both strains isolated from goat feed. Based on the results, the variations was confirmed in virulence between isolates of the pathogen and the need to combine with molecular assays, in vitro or in vivo tests, to confirm the pathogenic potential of these bacteria isolates.

Keywords: *Listeria monocytogenes*, goats, relative virulence, intracellular growth, PCR-RFLP, DNA sequencing, PFGE.

1. INTRODUCCIÓN

La listeriosis es una infección causada por la bacteria *Listeria monocytogenes* en humanos y animales. Es uno de los patógenos más costosos e importantes provenientes de alimentos debido a su elevada letalidad y proporción de casos que requieren hospitalización. Si bien el número de casos de listeriosis es muy bajo comparado con los de salmonelosis o campilobacteriosis, gran parte de estos causa morbilidad y mortalidad. Aunque fue considerado un patógeno emergente desde los años 80s, permanece siendo un problema de salud pública importante. Además de su impacto económico en la especie animal, también se produce un impacto en la salud pública debido a la transmisión zoonótica de dicha enfermedad (Kathariou, 2002; Noriega, 2008; Allerberg and Wagner, 2010; CDC 2013; ECDC, 2013).

Tres de los 13 serotipos de *Listeria monocytogenes* que han sido identificados, son responsables de la mayoría de casos de listeriosis en humanos, siendo las cepas de serotipo 4b las causantes de numerosos casos esporádicos y gran parte de los brotes de listeriosis (Vazquez-Boland *et al.*, 2001; Swaminathan and Gerner-Smidt, 2007; Rocourt and Buchrieser, 2007; Wesley, 2007; Latorre *et al.*, 2007).

La mayoría de los casos de listeriosis clínica en animales han sido reportados en rumiantes. La habilidad de *L. monocytogenes* para contaminar leche y su derivados representa un problema para la seguridad alimentaria y la salud pública (Linnan *et al.*, 1988; MacDonald *et al.*, 2005; Wesley, 2007; Ryser, 2007a,b; Smith and Sherman, 2009). Uno de los principales países productores de leche y carne de cabra en el continente americano es México. La leche de cabra es industrializada y transformada en queso artesanal, cajeta o dulces por pequeños productores o empresas (FAO, 2011; SIAP, 2012). Diversos trabajos en México han reportado la presencia de este patógeno en leche y quesos (Morales *et al.*, 1995; Saltijeral *et al.*, 1999; Vázquez *et al.*, 2001; Amaya *et al.*, 2003; Díaz *et al.*, 2006; Moreno *et al.*, 2007; Ramírez, 2007; Pérez y Basurto, 2011).

Estudios de patogénesis molecular han identificado determinantes de virulencia que permiten a *L. monocytogenes* invadir leucocitos y células no fagocíticas, escapar de la vacuola antes de la fusión fagolisosomal con la célula, multiplicarse y moverse libremente dentro del citoplasma e inducir la formación de protrusiones en la membrana las cuales son interiorizadas por las células adyacentes (Vazquez-Boland *et al.*, 2001; Dussurget *et al.*, 2004; Orndorff *et al.*, 2006; Hamon *et al.*, 2006; Kuhn and Goebel, 2007; Liu *et al.*, 2007).

Actualmente, las autoridades regulatorias de alimentos consideran todos los aislados de *Listeria monocytogenes* igualmente virulentos, sin embargo diversos estudios han demostrado variaciones extensas en la virulencia entre cepas de esta bacteria. Hasta ahora no se tiene una visión de la relación entre su estructura genética poblacional y el grado de virulencia (Liu *et al.*, 2007; Roche *et al.*, 2012).

Los métodos de subtipificación fenotípicos y los basados en ADN nos permiten la diferenciación de *L. monocytogenes* más allá del nivel de especie y subespecie. Estos métodos mejoran nuestra habilidad para detectar y trazar brotes de listeriosis humana, proveen de herramientas para el trazado de fuentes de contaminación de la bacteria a través de los sistemas de alimentación y proporcionan una oportunidad para comprender mejor las poblaciones genéticas, epidemiología y ecología de este patógeno (Wiedman, 2002; Graves *et al.*, 2007; Chen and Knabel, 2008).

2. ANTECEDENTES

2.1 Listeriosis

Las enfermedades causadas debido al consumo de alimentos contaminados tienen un gran impacto económico y en la salud pública, en todo el mundo (Mead *et al.*, 1999). Cerca del 75% de las enfermedades transmisibles que han afectado a los seres humanos en los últimos 10 años, han sido provocadas por patógenos provenientes de animales o de productos de origen animal. Uno de los mayores riesgos que existen actualmente, es su capacidad de difusión, lo que implica que se generen problemas de carácter global (WHO, 2008).

La listeriosis es una infección bacteriana causada por el patógeno intracelular facultativo *Listeria monocytogenes*. Durante la década de los 80s una serie de brotes estableció que este microorganismo es el responsable de dicha enfermedad, causada por alimentos contaminados (Schlech *et al.*, 1983; Fleming *et al.*, 1985; Linnan *et al.*, 1988). Es una infección severa, asociada con una letalidad de hasta el 30% y puede transcurrir un periodo de tiempo amplio entre el cual el alimento es ingerido y la persona se enferma, lo que dificulta la identificación del patógeno y el trazado del alimento contaminado, además permanece siendo poco o mal diagnosticada. Si bien su incidencia es baja, tiene un impacto sanitario y económico considerable debido a su letalidad, y a que en la mayoría de los casos (93%) se requiere hospitalización (Wing and Gregory, 2002; CDC, 2012; CDC, 2013; EFSA and ECDC, 2013).

Aunque la listeriosis se puede considerar una enfermedad rara, sigue causando una mortalidad importante en los países industrializados. La enfermedad se observa cada vez más en personas sanas de edad avanzada, en donde los alimentos son la principal fuente de contaminación (Farber y Peterkin, 1991; Pimmer *et al.*, 1992; Painter and Slutsker, 2007; Liu, 2008; Allerberg and Wagner, 2010). *L. monocytogenes* es responsable de aproximadamente 21% de las muertes en USA relacionadas con los principales patógenos transmitidos comúnmente por alimentos (CDC, 2012; CDC, 2013). Después de un declive en el número de casos de listeriosis en Francia, estos se han

elevado, la incidencia aumentó de 3.5 casos por millón durante el periodo 2001-2005, a 4.6 en 2006 y 5.6 en 2007. Este incremento también ha sido observado en la Unión Europea en los últimos años. Un total de 1624 casos confirmados de listeriosis fueron reportados en 28 países miembros de la comunidad europea (UE) en 2010 (ECDC, 2008; Roche *et al.*, 2009b; ECDC, 2013; EFSA and ECDC, 2013). Los alimentos implicados en los brotes de listeriosis, incluyen productos pertenecientes a todos los grupos principales de alimentos: lácteos, carne, vegetales y pescado/marisco (McLauchlin, 1990; Orndorf *et al.*, 2006; Painter and Slutsker, 2007; Liu, 2010). En México no se cuenta con información disponible sobre la incidencia de listeriosis en humanos y/o en el ganado, sólo existen reportes aislados (Escárcega *et al.*, 1999).

Las pérdidas económicas, que puede causar la listeriosis en la industria pecuaria implican el incremento en los costos de producción de los animales, debido a la pérdida de cabras a causa de los síntomas nerviosos, al incremento de la infertilidad, a los abortos provocados y a la disminución en la producción de leche por la mastitis en animales afectados. Además de su impacto económico en la especie animal, también se produce un impacto en la salud pública debido a la transmisión zoonótica de dicha enfermedad al hombre, la cual se puede dar por el contacto directo con animales infectados en la granja o en los rastros y mediante el consumo de productos de origen animal contaminados (Orndorff *et al.*, 2006; Painter *et al.*, 2007; Wesley, 2007; Barbuddhe *et al.*, 2012).

2.2 Epidemiología

Debido a su habilidad para tolerar condiciones extremas, las especies de *Listeria* están presentes en una gran diversidad de ambientes y el suelo se ha considerado su hábitat natural. Se puede aislar de plantas, vegetación en descomposición, ensilado, agua residual, aves o animales silvestres quienes al poseerla pueden contaminar con sus heces el medio agrícola, agua y alimentos. 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.

En los rebaños no siempre es claro el foco de infección. Al estar expuestos a la contaminación con este patógeno, los animales pueden convertirse en portadores sanos y durante periodos de estrés se pueden tornar clínicamente enfermos y liberar grandes cantidades de organismos en las heces, diseminando la infección al medio ambiente y a otros animales especialmente cuando están bajo condiciones de manejo intensivo. Por lo tanto, adquirir animales portadores sanos puede introducir la infección en otros rebaños. Cuando las cabras han presentado septicemia o aborto puede estar el organismo en cantidades grandes en heces, leche, placenta, feto y recién nacidos. En heces puede diseminarse durante 28 días después de la infección y solo 2 días en la leche. El riesgo de contaminación para los veterinarios y trabajadores que están en contacto con estos materiales es alto, por lo cual es necesario tomar precauciones al manejar estos tejidos para evitar la infección. La liberación del microorganismo es más frecuente en casos de aborto o septicemia que en la forma encefalítica de la enfermedad (Sauders and Wiedman, 2007; Wesley, 2007; Brugère-Picoux, 2008; Smith and Sherman, 2009).

Cuando son eliminadas en la materia fecal, si las condiciones ambientales son propicias, las listerias sobreviven en el suelo y en los vegetales durante mucho tiempo, y es probable que incluso se multipliquen siendo un foco de contaminación para los ensilados y ocasionen la contaminación de los animales que lo consumen. Se han aislado cepas idénticas de los casos clínicos y de ensilados. Se considera que la presentación "estacional" de la enfermedad está asociada con el consumo de ensilado en mal estado, lo que suele coincidir con la época más fría del año. Se ha observado un incremento en la presentación de la listeriosis en otoño, invierno y principio de la primavera aunque pueden ocurrir todo el año (Green, 1994; Ho *et al.*, 2007; Wesley, 2007; Smith and Sherman, 2009).

Una amplia variedad de especies animales puede infectarse, aunque la mayoría de los casos de listeriosis clínica en animales han sido reportados en rumiantes. La capacidad de desarrollar listeriosis clínica, está relacionada con la patogenicidad de la cepa, condición inmune y predisposición genética del hospedero. La encefalitis puede

afectar animales de cualquier edad pero es más común en rumiantes viejos. La enfermedad se hace más prevalente en situaciones inmunosupresoras como: gestación, parasitosis, edad, tratamientos con corticoesteroides, cambios repentinos de clima, particularmente con mucho frío y humedad, en periodos de inundación que dificultan el acceso a los pastizales, los cambios bruscos de alimentación, cuando se incrementa el estrés por una nutrición deficiente, o en los procedimientos generales de manejo. La listeriosis puede producirse esporádicamente o de forma epidémica. Las granjas representan ecosistemas que podrían facilitar el surgimiento de subtipos más virulentos de este patógeno en un ambiente con alta frecuencia de transmisión, las cuales podrían ser introducidas en la cadena de alimentación humana (Eliertz *et al.*, 1993; McDonough and Wiedman, 2004; Nightingale *et al.*, 2004; Wesley, 2007; Liu, 2008; OIE, 2008; Smith and Sherman, 2009; Oeverman *et al.*, 2010).

La salud humana se ha ligado directamente a la salud animal y a la producción de alimentos de origen animal por lo cual, la Organización Internacional de Epizootias (OIE) ha reconocido que los servicios veterinarios juegan un papel clave dentro del sistema global de detección y control de las enfermedades animales (Chavarrías, 2006). La leche y los productos lácteos han sido implicados frecuentemente en numerosos brotes de listeriosis, son los alimentos que primero se investigaron y los más ampliamente estudiados (Todd, 2007; Ryser, 2007a,b; Liu, 2008; Montville and Matthews, 2008; Painter and Slutsker, 2008; Allerberg and Wagner, 2010; Melo *et al.*, 2013). En diversos estudios *Listeria monocytogenes* ha sido aislada de los animales y del medio ambiente en explotaciones de caprinos (Salas y Días, 1988; Gaya *et al.*, 1996; Barbuddhe *et al.*, 2000; OIE, 2008; Smith and Sherman, 2009; Oeverman *et al.*, 2010; Barbuddhe *et al.*, 2012). Aunque en México la leche cruda es ampliamente consumida, la incidencia de enfermedades causadas por leche contaminada es desconocida. Si bien *Listeria monocytogenes* ha sido aislada de leche de vaca y quesos elaborados con leche de cabra y vaca, la información relacionada con las cepas aisladas de cabras y sus derivados, así como la virulencia de las mismas es escasa (Morales *et al.*, 1995; Saltijeral *et al.*, 1999; Vázquez *et al.*, 2001; Amaya *et al.*, 2003; Díaz *et al.*, 2006; Moreno *et al.*, 2007; Ramírez, 2007; Pérez y Basurto, 2011).

Listeria monocytogenes causa dos formas de listeriosis: listeriosis gastrointestinal no-invasiva y listeriosis invasiva. Puede causar septicemia o meningoencefalitis en pacientes inmunosuprimidos, abortos en mujeres embarazadas o infecciones generalizadas en neonatos infectados y gastroenteritis en personas sanas, así como infecciones asintomáticas. Asimismo, en las cabras produce tres tipos de cuadros clínicos principalmente: encefalitis, aborto y septicemia, así como infecciones asintomáticas y mastitis asociada con la infección por este microorganismo. La encefalitis es la forma más frecuentemente reportada de listeriosis en cabras con una letalidad de casi 60% y se ha considerado la posibilidad de que las cabras sean más susceptibles que los borregos a la encefalitis causada por *Listeria* (Painter and Slutsker, 2007; Wesley, 2007; OIE, 2008; Liu *et al.*, 2010; Smith and Sherman, 2009; Allerberg and Wagner, 2010; Oeverman, 2010; Barbuddhe *et al.*, 2012).

2.3 Etiología

El género *Listeria* abarca un grupo estrechamente relacionado. Es una bacteria Gram-positiva, anaerobia facultativa, en forma de bacilo de tamaño 0.4-0.5 μm x 1-1.5 μm , no formadora de esporas, con un contenido relativamente bajo de G+C (36-39%). Tiene la habilidad para crecer en un amplio rango de temperaturas (0-45°C) y pH (4.4-9). Asimismo, puede sobrevivir en concentraciones elevadas de cloruro de sodio (20-30%). Siendo su desarrollo óptimo a 30-37°C, pH neutro y 0.5% de sal. Sin embargo puede ser eliminada a 60°C. Taxonómicamente *Listeria* comprende diez especies: *L. fleischmanni*, *L. grayi*, *L. innocua*, *L. ivanovii*, *L. marthii*, *L. monocytogenes*, *L. rocourtiae*, *L. seeligeri*, *L. weihenstephanensis* y *L. welshimeri*. Sin embargo, sólo *L. monocytogenes* y *L. ivanovii* han sido consideradas patógenas hasta ahora. Mientras que *L. monocytogenes* es un patógeno intracelular facultativo de humanos y animales, *L. ivanovii* infecta principalmente animales, y las otras cuatro especies son esencialmente saprófitas que se han adaptado a una vida libre en tierra y vegetación en descomposición (Rocourt and Buchrieser, 2007; Montville and Matthews, 2008; Liu, 2010; Hain *et al.*, 2012; EFSA and ECDC, 2013).

L. monocytogenes posee trece serotipos basados en la expresión de antígenos somáticos O y flagelares H: 1/2a, 1/2b, 1/2c, 3a, 3b, 3c, 4a, 4ab, 4b, 4c, 4d, 4e y 7. En modelos experimentales con ratones a través de la inoculación intragástrica, los serotipos 4b, 1/2a, 1/2b, y 1/2c tienden a exhibir mayor infectividad. Sin embargo, todos los serotipos de *L. monocytogenes* excepto 4a, tienen la capacidad de causar mortalidad en ratón cuando son inoculados por la vía intraperitoneal. Mediante análisis de tipificación genética, *L. monocytogenes* ha sido agrupada en cuatro linajes, es probable que la mayoría de los aislamientos pertenezcan a los linajes I (1/2b, 3b, 3c, 4b) y II (1/2a, 1/2c y 3a), los cuales contienen la mayoría de los serotipos comúnmente asociados con casos clínicos humanos; y en los linajes III y IV (4a, 4b y 4c) la mayoría de las cepas han sido aisladas de rumiantes. Algunos estudios han mostrado que la prevalencia de las cepas del linaje I es mayor en los casos de listeriosis clínica en humanos comparada con la observada en casos de listeriosis en animales y en aislamientos de alimentos. Por otro lado, las cepas del linaje II muestran una prevalencia mayor en aislados de alimentos y casos clínicos de animales que en casos de listeriosis en humanos. De acuerdo con su potencial de virulencia en hospederos mamíferos, *L. monocytogenes* está diferenciada en cepas patógenas y no patógenas. Los serotipos 4b, 1/2a, 1/2b y 1/2c son responsables del 98% de los aislamientos de casos clínicos de listeriosis en humanos. El serotipo 4b es encontrado en por lo menos el 50% de los brotes y casos esporádicos de listeriosis provenientes de alimentos a nivel mundial, mientras que los serotipos del grupo 1/2 son en su mayoría asociados con casos esporádicos en humanos. En las cabras, los casos de encefalitis y septicemia han sido asociados a los serotipos 4b y 1/2, y el aborto al serotipo 1/2. Se ha observado que la seroprevalencia depende del área geográfica y que el serotipo 4b muestra mayor neurovirulencia comparado con el serotipo 1 (Nightingale *et al.*, 2005b; Schmid *et al.*, 2005; Rocourt and Buchrieser, 2007; Wesley, 2007; Liu, 2008; Smith and Sherman, 2009; Oevermann *et al.*, 2010; Orsi *et al.*, 2011; EFSA, 2013).

2.4 Patogenia

Debido a su amplia especificidad de hospederos, la infección causada por *L. monocytogenes* puede ser evaluada en una variedad de animales de laboratorio con el propósito de aclarar las características inmunológicas, mecanismos de invasión y características patológicas de esta bacteria. El modelo animal más comúnmente aplicado es el ratón, aunque también han sido usados cobayos, jerbos, conejos, ovejas y primates no humanos para la investigación de aspectos específicos de la listeriosis (Wesley, 2007).

Los alimentos contaminados son la principal fuente de infección y por ello el tracto gastrointestinal es considerado como el sitio primario de entrada en el hospedero. Hay dos mecanismos por los cuales *L. monocytogenes* puede entrar en el hospedero a través de la mucosa intestinal. Uno es la invasión directa de los enterocitos que revisten el epitelio de las microvellosidades, conduciendo a la infección de las células intestinales. Este mecanismo enteropatógeno involucra interacciones ligando-receptor específicas y se piensa que sucede solamente en los animales hospederos en los cuales las células intestinales expresan isoformas de los receptores susceptibles a las invasinas listerianas (Humano o cobayo). La otra vía de entrada involucra la fagocitosis de la bacteria por las células M de las placas de Peyer en el intestino delgado. Este Segundo mecanismo de traslocación intestinal es inespecífico, tiene lugar en hospederos que no expresan la isoforma susceptible del receptor para las invasinas listerianas (ratas y ratones), y se considera que es menos eficiente que el mecanismo anterior. Cualquiera que sea el mecanismo inicial de entrada, la bacteria subsecuentemente se localiza dentro de fagocitos profesionales y las células presentadoras de antígeno, en focos inflamatorios en la lámina propia, donde se lleva a cabo la replicación bacteriana. El cruce de la barrera epitelial provee a la bacteria con un portal de entrada al sistema linfático y a la sangre. Posteriormente son transportadas por la sangre a los linfonódulos regionales, al hígado y al bazo; siendo estas primeras etapas esencialmente subclínicas. Si la respuesta inmune mediada por células T del hospedero es inadecuada, las listerias se multiplican en los hepatocitos y en los

macrófagos, de esta manera son llevadas por la sangre a varios órganos como son meninges, cerebro o el útero mediante el mecanismo llamado “Caballo de Troya”. Por consiguiente, la infección no está localizada en el sitio de entrada, sino que implica la entrada y multiplicación en una gran variedad de tipos de células y tejidos. Siendo por ello, un proceso multietapa en el cual el patógeno primero tiene que cruzar la barrera intestinal, luego establecerse y multiplicarse en órganos primarios y finalmente cruzar dos barreras posteriores (la barrera endotelial-particularmente a nivel de cerebro y la barrera materno-fetal) para establecerse y multiplicarse en órganos secundarios donde la bacteria causa la enfermedad clínica. Una fase prolongada silenciosa inicial es consistente con el largo periodo de incubación de la listeriosis invasiva, típicamente 20-30 (incluso hasta 70) días después del consumo del alimento contaminado. Debido a esto es considerada una de las bacterias más invasoras conocidas y es uno de los ejemplos más notables de bacterias que explotan a su favor las funciones de las células de los mamíferos (Groisman *et al.*, 2001; Vazquez-Boland *et al.*, 2001; Ordorf *et al.*, 2006; Wesley, 2007; Kuhn *et al.*, 2008; Allerberg and Wagner, 2010).

La infección experimental de roedores con *L. monocytogenes* ha sido utilizada para observar el proceso infeccioso. Cuando los roedores son expuestos a un inóculo de *L. monocytogenes*, la infección que sobreviene sigue un curso definido, que dura aproximadamente 1 semana. Transcurridos 10 minutos después de la inyección intravenosa, el 90% del inóculo está captado por el hígado y el 5-10% está captado por el bazo. Durante las primeras 6 horas, el número de listerias viables en el hígado disminuye 10 veces, indicando la destrucción rápida de la mayor parte de las bacterias. Después, los organismos que sobreviven se multiplican en el interior de los macrófagos sensibles y crecen exponencialmente en el hígado y el bazo durante las siguientes 48 horas, alcanzando el número máximo los días 2° y 3° siguientes a la infección. Durante los 3 ó 4 días siguientes sobreviene la inactivación rápida, que indica la recuperación del hospedero (Rocourt and Cossart, 2000; Wesley, 2007).

L. monocytogenes es un microorganismo intracelular facultativo capaz de invadir y multiplicarse dentro de diversos tipos de células de mamíferos. Los macrófagos y las

células epiteliales son ampliamente usados para estudiar la interacción de la bacteria con células hospederas de mamíferos. Sin embargo se ha mostrado también que los neutrófilos, las células dendríticas, los fibroblastos, las células endoteliales o las células gliales, podrían servir de hospederas para este patógeno *in vitro* e *in vivo*. La capacidad del microorganismo de penetrar en el citoplasma de la célula, escapar del fagosoma, proliferar y diseminarse a las células adyacentes es esencial para la expresión plena de su potencial patogénico. Aparte del paso de internalización, el ciclo de vida intracelular de la bacteria en las células de mamíferos fagocíticas y no fagocíticas es esencialmente idéntico. Una serie de factores de virulencia son producidos por *L. monocytogenes* para facilitar cada paso de la infección, los cuales están localizados en una isla de patogenicidad (LIPI-1) en el genoma; sin embargo, no todos están localizados en esta isla, por ejemplo las dos internalinas *inlA* e *inlB*. Las células de este microorganismo inicialmente se adhieren a los enterocitos intestinales y penetran la pared intestinal. La entrada del patógeno a las células de mamíferos es un proceso dinámico que requiere de la polimerización de la actina y el remodelado de la membrana, para lo cual la bacteria manipula la señalización de la célula hospedera y las vías endocíticas a su favor. Su internalización a las células se realiza mediante fagocitosis tanto en las células fagocíticas como en los fagocitos no especializados, en este último caso, el proceso es desencadenado por el microorganismo (fagocitosis inducida). El proceso de internalización es mediado por las internalinas InlA e InlB y otras internalinas (InlC, InlJ, etc.) las cuales podrían estar involucradas en estados posteriores de la infección (post intestinal). Mientras que la InlB reconoce C1q-R (o Met) para facilitar la entrada de este patógeno a un amplio rango de tipos de células del hospedero incluyendo hepatocitos, fibroblastos y células epitelioideas. La entrada de *L. monocytogenes* a las células epiteliales es mediada por la interacción de la proteína de superficie, internalina A, con su receptor E-caderina, una glicoproteína transmembranal, involucrada en las interacciones célula-célula y requerida para las uniones adherentes entre células epiteliales. La interacción internalina-E-caderina es especie específica y se basa en la presencia de un solo aminoácido de diferencia en el residuo 16 en la molécula de E-caderina, el cual es prolina en humanos y ácido glutámico en el ratón. El patógeno es interiorizado en vacuolas (fagosomas) que son lisadas en 30 minutos aproximadamente.

La listeriolisina O (LLO) codificada por el gen *hly*, y la fosfolipasa C fosfatidil inositol (PI-PLC) codificada por el gen *plcA*, actúan sinérgicamente lisando el fagosoma para permitir el escape de las bacterias. La actividad de LLO es óptima a pH ácido (<6) y su secreción es estrictamente regulada, porque la bacteria necesita balancear eficientemente el escape del fagosoma y prevenir el daño en la célula hospedera y así permita su supervivencia intracelular. Las bacterias intracelulares quedan libres en el citosol y comienzan a duplicarse con un tiempo de 40 a 60 minutos. La propagación bacteriana dentro del citosol es mediada por un transportador de fosfato hexosa bacteriano (Hpt) y una ligasa protein lipoato (LpLA1) que le permiten al microorganismo captar el carbono necesario de la célula hospedera. El transportador es una permeasa homóloga estructural, que es responsable de la captación de glucosa 6 fosfato (G6P) del citosol en el retículo endoplásmico. Una vez que las bacterias se multiplicaron en el citosol de la célula hospedera, el movimiento de *Listeria* es realizado mediante la polimerización de microfilamentos de actina en el citosol inducida por la bacteria. El único factor bacteriano responsable de esta actividad es la proteína de superficie ActA (codificada por el gen *actA*), la cual imita a las proteínas homólogas de la célula eucariota pertenecientes a la familia WASP (Wiskott-Aldrich síndrome protein). Su distribución asimétrica en la superficie bacteriana produce la formación de una cola de cometa y el efecto propulsivo de la bacteria a través del citoplasma. La cola de actina está fija en el citosol y su longitud de hasta 40 μm es proporcional a la velocidad de desplazamiento la cual varía desde 0.1 hasta 1 $\mu\text{m/s}$. Esto produce un movimiento dirigido de las bacterias hacia la membrana celular de la célula hospedera. Cuando las células bacterianas llegan a la membrana plasmática, emiten protrusiones tipo filopodio de gran tamaño, cada una con una bacteria en su extremo, dichas protuberancias son interiorizadas por una célula adyacente, originando una vacuola rodeada por una membrana doble. Este mecanismo hace que se infecte la célula y la bacteria quede dentro de una vacuola de doble membrana. La fosfolipasa C fosfatidilcolina (PC-PLC) de *Listeria* (codificada por el gen *plcB*) y es activada por la metalproteasa Mpl (codificada por el gen *mpl*), junto con la LLO lisan la vacuola de doble membrana y liberan las bacterias que infectan la célula vecina. Después de la lisis de esta vacuola, comienza un nuevo ciclo de replicación, desplazamiento y propagación de las bacterias.

El ciclo entero se completa en aproximadamente 5 horas. La mayoría de las proteínas que han sido identificadas en la virulencia de *L. monocytogenes* son controladas por el regulador transcripcional PrfA (codificado por el gen *prfA*) el cual es estrictamente autoregulado por las condiciones ambientales (T° , pH, osmolaridad, concentración de Fe, presencia de azúcares fermentables, estrés, y condiciones en el compartimiento intracelular de la célula hospedera). Similar a muchos otros patógenos, *L. monocytogenes* puede detectar condiciones en el hospedero mamífero y responder expresando genes de virulencia. La estrategia de la propagación directa célula a célula permite que la bacteria se disemine en los tejidos del hospedador y establezca focos infecciosos a la vez que está protegida de las defensas del hospedador tales como los anticuerpos circulantes, lo cual podría explicar por qué los anticuerpos no desempeñan un papel importante en la eliminación de la infección o en la protección frente a la infección secundaria (Vázquez-Boland, 2001; Cossart *et al.*, 2003; Hamon *et al.*, 2006; Kuhn and Goebel, 2007; Kuhn *et al.*, 2008; Roche *et al.*, 2008; Bonazzi *et al.*, 2009).

La capacidad de este patógeno para crecer dentro y fuera del hospedero, colonizar un amplio rango de ecosistemas y sobrevivir largos periodos en el medio ambiente se debe a su resistencia a condiciones ambientales adversas, reflejándose en el genoma de este organismo, el cual contiene un amplio número de genes que codifican proteínas regulatorias (su genoma contiene 16 sistemas regulatorios de dos componentes) y de transporte (11.6% de todos sus genes), con una cuarta parte de estas últimas dedicadas al transporte de carbohidratos y el número más grande de sistemas fosfotransferasa. Asimismo, involucra cambios en la transcripción de genes y diversos mecanismos de adaptación, ejemplo de ello es la inducción de la respuesta a tolerancia ácida (ATR), la habilidad de crecer en un amplio rango de temperatura y la respuesta al estrés osmótico. Antes de alcanzar el intestino, las bacterias ingeridas deben soportar el ambiente adverso del estómago (enzimas proteolíticas, pH 2.0, sales biliares, ataque inflamatorio no específico), al menos 3 proteínas de estrés oxidativo y 14 proteínas de "shock" tóxico, son inducidas bajo condiciones de estrés en *L. monocytogenes* (Vázquez-Boland *et al.*, 2001; Kuhn and goebel, 2004; Hammon *et al.*, 2006; Gandhi and Chikindas, 2007; Kuhn and Goebel, 2007; Kuhn *et al.*, 2008).

2.5 Virulencia

Se ha observado una heterogeneidad considerable en los niveles de virulencia de las cepas de *L. monocytogenes*, sin alguna correlación sistemática establecida entre el nivel de virulencia y las características de identificación u origen específicas. Algunas muestran una virulencia elevada, mientras que otras muestran una virulencia escasa o rara vez, no manifiestan virulencia. Se ha observado que la respuesta inmune de las personas y/o la dosis del patógeno ingerida juega un papel importante en las presentaciones invasivas o gastrointestinales y que las diferencias entre la virulencia de las cepas también podrían contribuir a las diversas manifestaciones clínicas. Uno de los principales problemas para la ciencia básica y las perspectivas regulatorias en cuanto a la comprensión de la listeriosis causada por alimentos contaminados, gira en torno al papel de los factores de virulencia de este patógeno y cómo estos interactúan con la susceptibilidad del hospedero para producir la incidencia de dicha enfermedad. Este problema ha sido ampliamente investigado y han sido descubiertos diversos factores de virulencia. Sin embargo, las deleciones en estos genes producen la reducción en sus funciones de virulencia. Uno de los factores que contribuye al conflicto, en cuanto a la evaluación y el manejo del riesgo de listeriosis causada por alimentos, es el hecho de que aunque la contaminación con *L. monocytogenes* en nivel bajo en ciertos alimentos es relativamente común, sugiriendo una amplia exposición, la enfermedad se asocia con solo una subpoblación relativamente pequeña (serotipos 4b, 1/2a y 1/2b) y ocurre en solo una proporción de individuos susceptibles (situaciones inmunosupresoras) (Liu *et al.*, 2007; Sauders and Wiedmann, 2007; Brugère-Pcoux, 2008; Montville and Mathews, 2008; Roche *et al.*, 2009a, b; Smith and Sherman, 2009; Liu *et al.*, 2010; Roche *et al.*, 2012).

Los principales métodos para evaluar la virulencia de las bacterias incluyen bioensayos *in vivo*. Los ensayos de virulencia en ratones han sido a menudo considerados como una referencia para la comparación y validación de cualquier ensayo nuevo desarrollado que esté específicamente diseñado para la determinación de la virulencia de *L. monocytogenes*, porque cubre todos los determinantes de virulencia potenciales. Generalmente los ensayos en ratones se realizan inoculando

grupos con varias dosis (3 ó 4 diluciones) de cepas de *L. monocytogenes* vía oral (ig), intranasal (in), intraperitoneal (ip), intravenosa (iv) o subcutánea (sp). Las dosis correspondientes son estimadas a través de la enumeración de unidades formadoras de colonia (ufc). La virulencia de una cepa es entonces averiguada por la mortalidad de los ratones resultante en relación con las ufc, y frecuentemente expresada como dosis letal media (LD₅₀). Alternativamente, la virulencia puede ser evaluada mediante el conteo de células bacterianas que alcanzan el hígado y el bazo algunos días después del inicio de la infección experimental. Para realizar el cálculo del valor de la DL₅₀, la estimación de las ufc es un proceso en el cual son obtenidos resultados inconstantes, debido a que las cepas con diferentes niveles de virulencia, tienden a mostrar variaciones marcadas en su velocidad de crecimiento en medios no selectivos, obteniéndose cepas que causan mayor mortalidad en ratón produciendo mayor número de ufc respecto a las cepas que causan menor mortalidad en los ratones. Como una consecuencia indirecta de esto, la determinación del valor de DL₅₀ a menudo exagera la patogenicidad de las cepas más virulentas mientras que disminuye la patogenicidad de las cepas menos virulentas, por lo cual es común que las ufc para determinada cepa muestren variación significativa entre ensayos. Para evitar este efecto observado en la estimación de las ufc al obtener los valores de la DL₅₀, la virulencia relativa (%) se basa en una simple división del número de ratones muertos entre el número total de ratones evaluados. Ya que la virulencia relativa es independiente de las ufc, no solamente evita el riesgo inherente de la estimación de las ufc, sino que también da una evaluación sencilla y más fácil de interpretar. Además la virulencia relativa es más económica debido a que requiere menos grupos de ratones, y apoya la cada vez más aceptada minimización en el uso de animales de laboratorio en investigación biomédica (Barbour *et al.*, 1996; Barbour *et al.*, 2001; Czuprynski *et al.*, 2002; Roche *et al.*, 2003; Takeuchi *et al.*, 2003; Jaradat and Bhunia, 2003; Liu, 2004; Liu, 2006; Takeuchi *et al.*, 2006; Roche *et al.*, 2008).

Los ensayos de virulencia en ratón no son aplicados rutinariamente para la determinación del potencial patogénico de *L. monocytogenes* dado su costo, además de la necesidad de sacrificar los animales. Por lo tanto se han realizado ensayos en células *in vitro* como una alternativa económica. *L. monocytogenes* es una de las bacterias más

invasivas conocidas, puede invadir diferentes líneas celulares tales como: macrófagos, fibroblastos, hepatocitos y células epiteliales. Posiblemente ha desarrollado estrategias específicas que le permiten la entrada a diferentes tipos de células pero conservan cierto tropismo hacia determinados órganos. Los ensayos *in vitro*, han sido desarrollados bajo las premisas de que este patógeno tiene la capacidad de adherirse, entrar, crecer en el citosol y diseminarse a células de mamíferos fagocíticas y no fagocíticas, para lo cual cuenta con una amplia colección de moléculas especializadas y estas características han sido utilizadas para medir la virulencia de diferentes cepas de esta bacteria. Dichos ensayos han sido diseñados para utilizar varias líneas celulares de mamíferos que simulan estados o fases específicos de la bacteria durante la infección. Por ejemplo para emular la barrera intestinal son utilizadas las líneas celulares enterocitos Caco-2, HT-29, células epiteliales Henle 407 y L2. Para simular las barreras posteriores al paso de la bacteria a través de la fase intestinal se han seleccionado los hepatocitos Hep-G2, macrófagos J774A.1 y fibroblastos L929. En general, estos ensayos se realizan incubando una cantidad conocida de la bacteria en monocapas confluentes de células de mamíferos. Las bacterias extracelulares son removidas y eliminadas mediante lavados y tratamiento con gentamicina la cual no entra en las células de mamíferos en concentraciones específicas. Posteriormente las listerias que sobreviven en la células hospedera son ennumeradas en placas de agar y dependiendo del propósito de la prueba se pueden realizar 4 protocolos de ensayos *in vitro* (adhesión, invasión, crecimiento intracelular y diseminación célula a célula) (Van-Langendonck *et al.*, 1998; Rocourt and Cossart, 2000; Larsen *et al.*, 2002; Olier *et al.*, 2002; Jaradat and Bhunia, 2003; Kim *et al.*, 2004; Chatterjee *et al.*, 2006b; Liu, 2006; Roche *et al.*, 2008).

Los análisis moleculares de los genes asociados a la virulencia de este patógeno y la tipificación molecular también tienen valor predictivo de la virulencia de dicho microorganismo ya que se ha encontrado una asociación entre subtipos y la virulencia de las cepas o aislados. *L. monocytogenes* secreta diversas proteínas que son importantes para la virulencia, debido a que los aislados contienen mutaciones en genes fundamentales para estas proteínas, frecuentemente producen proteínas

truncadas o no funcionales, produciendo atenuación en la virulencia de las cepas. Por esta razón, las proteínas asociadas a la virulencia representan elementos útiles para los procedimientos de laboratorio que incorporan substratos en medios de cultivo para evaluar su funcionalidad. Sin embargo puesto que estas proteínas asociadas a la virulencia frecuentemente son producidas por cepas silvestres virulentas y no virulentas, su uso no ha sido del todo satisfactorio. Por ello continuamente se buscan nuevas metodologías que permitan la evaluación de la virulencia a través de ensayos moleculares. Por ejemplo la detección de mutaciones en los genes que intervienen en la virulencia del patógeno a través de diferentes ensayos o la detección de genes específicos que estén presentes únicamente en las cepas virulentas y ausentes en las no virulentas. Asimismo la secuenciación es el método más preciso para la determinación de diferencias o similitudes genéticas aunque relativamente costosa (Rocourt and Cossart 2000; Ward *et al.*, 2004; Franciosa *et al.*, 2005; Roberts *et al.*, 2005; Roche *et al.*, 2005; Zhou *et al.*, 2005; Liu, 2006; Graves *et al.*, 2007; Kuhn and Goebel, 2007; Roche *et al.*, 2008; Temoin *et al.*, 2008; Donaldson *et al.*, 2011; Roche *et al.*, 2012).

2.6 Tipificación molecular

La tipificación de cepas es el proceso por el cual una especie bacteriana puede ser posteriormente separada en diferentes subgrupos. Una función de la tipificación es discriminar entre diferentes cepas que pertenecen al mismo género ó especie. Las técnicas de tipificación han experimentado diversas mejoras y varios métodos nuevos han permitido un mejor desempeño. Nuestro entendimiento de la epidemiología, evolución, filogenética y la genética de población de *L. monocytogenes*, han evolucionado con el desarrollo de estas técnicas de tipificación (Chen and Knabel, 2008).

Los métodos de subtipado microbiano mejoran nuestra habilidad para la detección y el trazado de brotes causados por alimentos en humanos. El objetivo del empleo de técnicas moleculares para el subtipado es conseguir mayor discriminación de cepas que la alcanzada por serotipado. La información obtenida puede ser aplicada

en la vigilancia de enfermedades provenientes de alimentos, detección de brotes, seguridad alimentaria, salud pública, estudios de población genética y epidemiología. Un enfoque significativo es su aplicación para definir los subtipos y grupos clonales de los microorganismos, los cuales podrían diferir en sus características fenotípicas y su potencial patogénico. El subtipado de *L. monocytogenes* permite su caracterización para determinar cuál de los posibles subtipos dentro de un serotipo es causante de la listeriosis o es un factor de contaminación. Esta información es importante desde el punto de vista epidemiológico y del rastreo de la fuente del patógeno, y es necesaria para identificar las cepas precisas que son responsables de causar la listeriosis, o que contaminan cierto tipo específico de alimento, entender mejor la ecología y características de las cepas y subtipos microbianos, incluyendo las diferencias en su habilidad para causar enfermedades en humanos y animales (Nandon *et al.*, 2001; Wiedmann, 2002; Churchill *et al.*, 2006). La habilidad para diferenciar aislamientos de *L. monocytogenes* es particularmente importante para el trazado de la transmisión de cepas patógenas a través de la cadena alimentaria y el desarrollo de estrategias de intervención efectivas para prevenir enfermedades en humanos y animales. Al respecto, se están empleando diversas técnicas de subtipado para investigar la ecología de *L. monocytogenes* en el campo agrícola, las granjas, las plantas procesadoras y los alimentos, definir el riesgo de estas como fuentes de brotes causados por alimentos y formular recomendaciones para un mejor control (Tompkin, 2002; USDA-ARS, 2003; Manfreda *et al.*, 2005; Liu *et al.*, 2006; Graves *et al.*, 2007; Chen and Knabel, 2008).

Los principales métodos de subtipado de microorganismos son los métodos fenotípicos y los moleculares. Mientras que las técnicas fenotípicas de subtipado (serotipado, fagotipado, electroforesis de enzimas multilocus-MLEE) tienen baja capacidad de discriminación y reproducibilidad, las técnicas moleculares son muy sensibles y reproducibles. Las técnicas moleculares de tipificación están basadas en hibridación de ADN, PCR, análisis con enzimas de restricción o secuenciación directa de ADN. Los diversos métodos incluyen el análisis del ADN mediante enzimas de restricción, [ribotipificación y electroforesis en campo pulsado (PFGE)], técnicas basadas en PCR [amplificación aleatoria del ADN polimórfico (RAPD), polimorfismo de

fragmentos amplificados (AFLP), polimorfismo en fragmentos de restricción (PCR-RFLP) y elementos repetitivos (REP-PCR)] y métodos basados en la secuenciación de ADN [Tipificación multi-locus de secuencias (MLST)] (Wiedman, 2002; Nightingale *et al.*, 2004; Gasanov *et al.*, 2005; Liu *et al.*, 2006; Graves *et al.*, 2007; Chen and Knabel, 2008).

En el análisis con enzimas de restricción (REA) la endonucleasa reconoce y corta secuencias particulares dentro de moléculas de DNA. La digestión de DNA produce un patrón de bandeo de fragmentos con tamaños variables. La relación genética es determinada mediante la comparación del número y tamaño de fragmentos los cuales son separados y visualizados usando electroforesis en gel. El análisis de ADN cromosómico bacteriano con enzimas de restricción (REA), es referido como análisis de macrorestricción, el desempeño de la prueba es mejorado significativamente por la combinación de electroforesis en campos pulsados (PFGE) y se considera que con algunos pequeños ajustes, esta técnica puede ser aplicada a casi cualquier bacteria. En este tipo de electroforesis, las moléculas de ADN están sujetas a cambios periódicos en la dirección y/o la intensidad del campo eléctrico aplicado. Las moléculas de ADN pueden ser separadas de acuerdo a su tamaño porque las moléculas más pequeñas responden mejor a los cambios en el campo eléctrico que las moléculas más grandes. Usando la electroforesis convencional pueden ser separadas moléculas de ADN de 20 kb, mientras que la electroforesis en campos pulsados es capaz de separar moléculas de ADN de hasta 12Mb. REA-PFGE es una de las pruebas más discriminatorias en particular para la tipificación de serotipos de *L. monocytogenes* 1/2 y 4. A pesar de las desventajas de este método, como son la reproducibilidad y el difícil análisis de los patrones de bandeo obtenidos en el gel; este método de subtipificación ha probado ser útil en diversas circunstancias y ha facilitado la investigación epidemiológica de los brotes de listeriosis. Una de sus ventajas es que ha sido usado para subtipificar decenas de miles de aislados en todo el mundo en las últimas décadas, con la implementación de Pulse Net (Red nacional de laboratorios que trabaja en conjunto con CDC en USA y posee una base de datos con información de microorganismos patógenos). Los patrones obtenidos con este método son mostrados electrónicamente

en una base de datos compartida del CDC, lo cual permite el rápido intercambio y comparación de datos de subtipificación a nivel nacional. Posteriormente el sistema PulseNet se ha expandido a otras regiones incluyendo Canadá, Europa, Asia y América. Por ello, la amplia base de datos de aislados clínicos, de alimentos y ambiente subtipificados con este método, apoya en gran medida a cualquier investigación epidemiológica actual o futura y también ayuda a entender la transmisión a largo plazo de este agente infeccioso (Baloga and Harlander, 1991; Bille and Rocourt, 1996; Wiedman, 2002; Sauders *et al.*, 2003; Gasanov *et al.*, 2005; Liu *et al.*, 2006; Graves *et al.*, 2007; Chen and Knabel, 2008).

En la última década, los métodos de subtipificación basados en secuencias han incrementado su popularidad debido al aumento de la disponibilidad de genomas secuenciados, contenido de información amplio y preciso de la secuencia, incremento de la relación costo-eficiencia, rapidez de la secuenciación de ADN y la habilidad para analizar y compartir la información de las secuencias vía internet. En general los métodos basados en las secuencias son más reproducibles y precisos porque la secuenciación de ADN es inherentemente específica y altamente informativa. Anteriormente, el análisis de secuencia de nucleótidos no era ampliamente usado para la identificación, tipificación y determinación de virulencia rutinaria de *L. monocytogenes* debido a su costo elevado. Sin embargo este ha disminuido paulatinamente en años recientes por lo cual el uso de esta técnica se ha incrementado considerablemente para la investigación de los genes y genomas de este microorganismo (Chen and Knabel, 2008; Roche *et al.*, 2008).

2.7 BLAST

La bioinformática puede ser considerada como la tecnología de información aplicada al manejo y análisis de datos biológicos. Los principales puntos de investigación incluyen el alineamiento de secuencias, la predicción de genes y su expresión, montaje del genoma, alineamiento y predicción estructural de proteínas, interacciones proteína-proteína y modelado de la evolución (Camacho *et al.*, 2008).

BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) es un programa informático para la búsqueda de similitud en una base de datos con secuencias de ADN, ARN o proteínas que puede ser usado gratuitamente mediante una interfase en el sitio web del Centro Nacional para la Información Biotecnológica (NCBI por sus siglas en inglés). El programa ha sido desarrollado por el NCBI y los Institutos Nacionales de Salud del gobierno de USA. Es capaz de comparar una secuencia problema (query) contra las secuencias que se encuentren en las bases de datos con que cuenta. Usa un algoritmo heurístico el cual encuentra las secuencias de la base de datos que tienen mayor parecido a la secuencia problema y provee información estadística, calculando la significación de sus resultados y proporcionando así un parámetro para juzgar los resultados que se obtienen. BLAST es probablemente la herramienta de búsqueda bioinformática más usada para investigar la similitud entre secuencias y para la anotación y predicción funcional de genes o secuencias proteicas. La búsqueda de similitud de secuencias es una de las actividades bioinformáticas más importantes y frecuentemente provee la primera evidencia de la función de un nuevo gen o parte de este secuenciado. El NCBI introdujo BLAST en 1989 y en 2009 una versión nueva con diversas mejoras que permiten búsquedas más rápidas y más flexibilidad en los formatos empleados. Además del mantenimiento de la base de datos de secuencias de ácidos nucleicos (GenBank), la cual recibe información a través de colaboración internacional así como de la comunidad científica, el NCBI provee sistemas computacionales y de recuperación de información para el análisis de datos del GenBank y diversos tipos de datos biológicos (McGinnis and Madden, 2004; Johnson *et al.*, 2008; Camacho *et al.*, 2008; Camacho *et al.*, 2009; Sayers *et al.*, 2010; Boratyn *et al.*, 2013; Zaretskaya, 2013).

2.8 CABRAS

La importancia de las cabras como proveedoras de alimentos se ha reflejado en el incremento de la población caprina y la producción de sus derivados. A pesar de la función socioeconómica significativa de la cría de esta especie animal en todo el mundo,

la investigación en cabras es limitada en comparación con la investigación en otras especies de animales y sus sistemas de producción (Haenlein *et al.*, 1999; Morand-Fehr and Boyazoglu, 1999; Haenlein, 2001; Haenlein, 2004; Haenlein, 2007; Dubeuf *et al.*, 2004; FAO, 2011).

México es uno de los principales países productores de leche y carne de cabra en América, ocupando el segundo lugar por el número de animales con los que cuenta. Durante las últimas 2 décadas se ha visto una mayor oferta de productos lácteos y cárnicos caprinos. La población caprina fue aproximadamente de 9 millones de cabezas en el año 2011. En México se producen anualmente 160 millones de litros de leche de cabra y 42 mil toneladas de carne. La producción de leche de cabra es una actividad que se extiende a una amplia región del centro, occidente y norte del país, e involucra a miles de familias que se dedican a la producción de leche. Los principales estados productores de leche de cabra son: Coahuila, Durango, Guanajuato, Chihuahua y Jalisco. La leche de cabra es industrializada y transformada en queso artesanal, cajeta o dulces por pequeños productores o empresas de gran tamaño como Sigma Alimentos, Cilchota, Caprico, Bimbo (Coronado) y Nestlé (Hernández, 2007; FAO, 2011; SIAP, 2012).

El Consejo Mexicano de criadores de ganado caprino (Comecapri) considera la posibilidad que en México se incremente la población caprina debido a diversas causas como son: 1) La caprinocultura se desarrolla en 23 estados de la República; 2) La inversión inicial de esta actividad es pequeña; y 3) Las cabras son aptas para zonas con poca disponibilidad de agua y aprovechan forraje no aceptable para otros rumiantes. Dicho organismo pretende impulsar la producción de alimentos con valor agregado elaborados con leche de cabra como son yogur y helados, así como desarrollar mercados para éstos. Además se contempla la posibilidad de exportación de productos como cajeta y quesos a Centro y Sudamérica.

3. JUSTIFICACIÓN

México es uno de los principales países productores de leche y carne de cabra en América. Su principal objetivo es la producción de carne y leche la cual es destinada a la producción de quesos y dulces. Durante los últimos 15 años se ha visto una mayor oferta de productos lácteos y cárnicos caprinos (SIAP, 2012; Hernández, 2007). La leche y los productos lácteos han sido involucrados en diversos brotes de listeriosis causados por el patógeno bacteriano *Listeria monocytogenes*, el cual ha sido considerado en las últimas décadas como un patógeno importante causante de la listeriosis transmitida por alimentos y es por lo tanto un problema de salud pública. Sin embargo, en México no se cuenta con información respecto a brotes, incidencia de listeriosis en humanos y/o en el ganado y frecuencia de aislamiento en alimentos, ya que en nuestro país su búsqueda no es de carácter obligatorio. No obstante, *Listeria monocytogenes* ya ha sido aislada en muestras de leche de vaca y de cabra, alimento y materia fecal provenientes de explotaciones caprinas y quesos elaborados con leche de vaca y de cabra. Desde un punto de vista pecuario, el problema de listeriosis está relacionado con la seguridad alimentaria, salud pública y las pérdidas por enfermedad en los animales. Una vez contaminada, la leche representa un vehículo para la introducción de esta bacteria a la planta donde se elaboran productos lácteos y una posible fuente de listeriosis en humanos si la consumen sin pasteurizar. El problema de la presencia de este patógeno en las granjas no solo representa un riesgo de diseminación hacia la plantas procesadoras de alimentos, también existe el peligro para las personas que trabajan en granjas y en los rastros. Diversos estudios, han mostrado la variación de la virulencia en cepas de *L. monocytogenes* lo cual dificulta la evaluación y gestión del riesgo de listeriosis por organismos internacionales (FAO/OMS), por ello la investigación de dicho tema se ha encaminado hacia la vinculación de la virulencia y el subtipado de este patógeno. Cabe mencionar que en México son escasos los estudios realizados para evaluar la virulencia y tipificar molecularmente las cepas de *Listeria monocytogenes* aisladas a nivel de granja y de subproductos pecuarios.

4. OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GENERAL

Determinar la virulencia y tipificar molecularmente cepas de *Listeria monocytogenes* provenientes de explotaciones caprinas y subproductos lácteos.

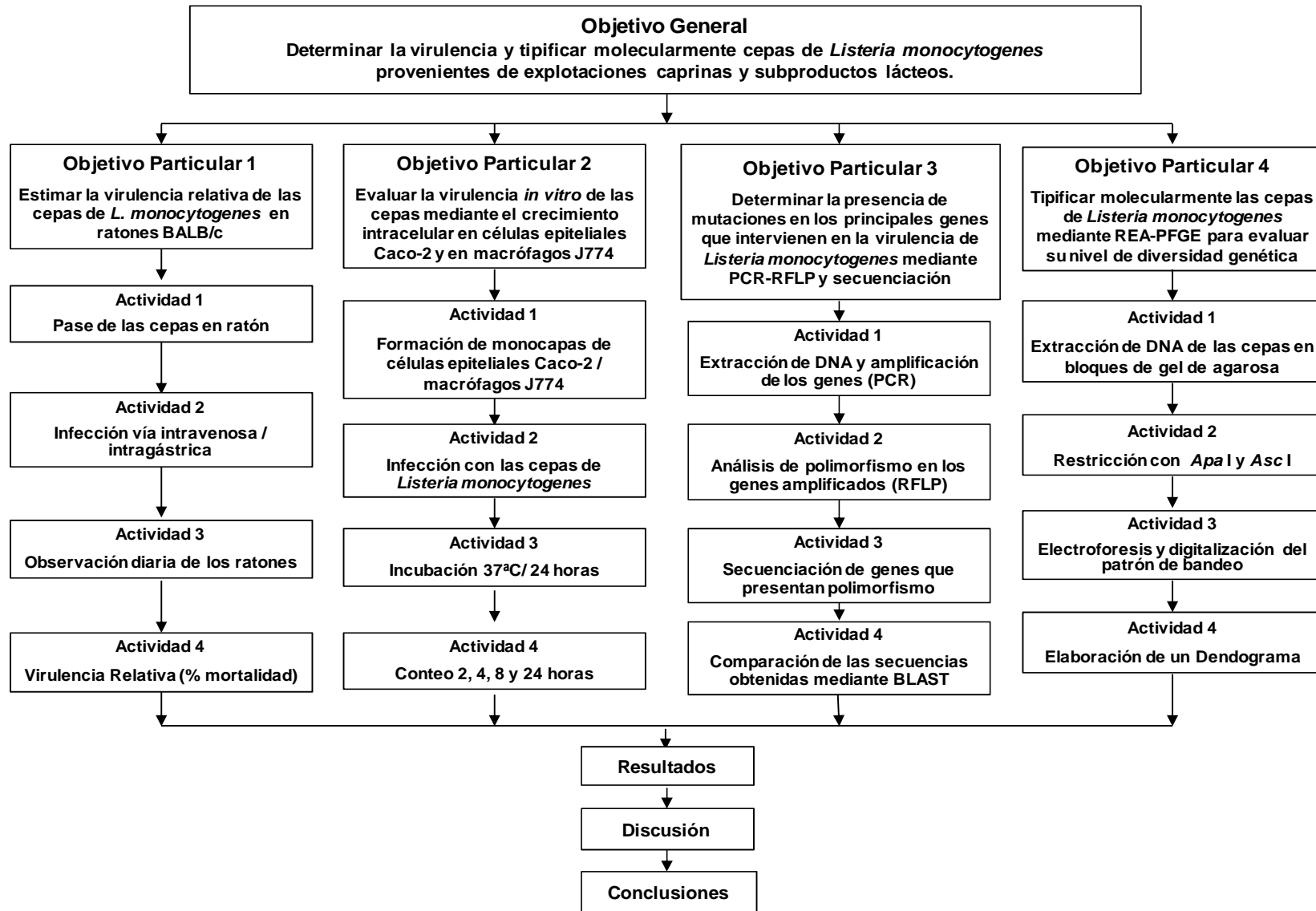
4.2 OBJETIVOS PARTICULARES

- 1.- Estimar la virulencia relativa de las cepas de *L. monocytogenes* en ratones BALB/c.
- 2.- Evaluar la virulencia *in vitro* de las cepas mediante el crecimiento intracelular en células epiteliales Caco-2 y en macrófagos J774A.1.
- 3.- Determinar la presencia de mutaciones en los principales genes que intervienen en la virulencia de *Listeria monocytogenes* mediante PCR-RFLP y secuenciación.
- 4.- Tipificar molecularmente las cepas de *Listeria monocytogenes* mediante macro restricción y electroforesis en campo pulsado (REA-PFGE) para evaluar su nivel de diversidad genética.

5. HIPÓTESIS

Si en las cepas de *Listeria monocytogenes* evaluadas se presenta la ausencia o mutación de alguno de los principales genes que intervienen en la virulencia de este patógeno, entonces es posible que se vea afectada su virulencia.

6. CUADRO METODOLÓGICO



7. MATERIALES Y MÉTODOS

7.1 BACTERIAS

Tabla 1. Fuente de las cepas de *L. monocytogenes* evaluadas en este estudio.

CEPA	FUENTE
LMC1	ATCC 43249
LMC2	Hospital SSA, D.F. México
AC1	Alimento, alfalfa, Edo. México
AC2	Alimento, alfalfa, Edo. México
AC3	Alimento, alfalfa, 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* serotipo 4b, de las cuales 3 fueron obtenidas de alimento de cabra (alfalfa), 1 de leche de cabra, 3 de materia fecal de cabra y 5 de queso de cabra (Amaya *et al*, 2003; Ramírez, 2007; Strassburger *et al*, 2010), además fueron empleados como controles una cepa de *Listeria monocytogenes* ATCC 43249 serotipo 1/2a y una cepa serotipo 4b donada por el hospital Manuel Gea González (SSA). Las cepas se replicaron 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 RATONES

Ciento ochenta ratones BALB/c de 4 ó 10 semanas de edad obtenidos del Bioterio del Centro Médico Nacional Siglo XXI (IMSS), fueron empleados para el pase e infección. Se permitió que los ratones se aclimataran durante dos semanas y fueron alimentados con agua y alimento estériles *ad libitum*. Su cuidado y manejo se llevó a cabo de acuerdo a los procedimientos indicados por la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999 y el Subcomité Institucional para el Cuidado de Animales en Experimentación (SICUAE) de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la UNAM.

7.3 CÉLULAS

Fueron empleadas las líneas celulares de macrófagos J774A.1 (pases 5 al 10) y Caco-2 (pases 7 al 12) adquiridas de la *American Type Culture Collection* (ATCC). Ambas líneas celulares fueron crecidas en medio Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) suplementado con 20/10% (vol/vol) de suero fetal bovino respectivamente (inactivado 30 minutos a 56°C), aminoácidos no esenciales (0.1 mM) y penicilina-estreptomicina (100 IU/ml:µg/ml) excepto en los ensayos de crecimiento intracelular (Invitrogen). Las células fueron mantenidas en incubadora a 37°C y con 5% de CO₂.

7.4 VIRULENCIA RELATIVA DE LAS CEPAS DE *L. monocytogenes* EN RATONES BALB/c.

7.4.1 Pase en ratones BALB/c

Dos ratones BALB/c de 12 semanas de edad fueron inoculados vía intraperitoneal con $\approx 10^7$ unidades formadoras de colonia (ufc) de cada una de las cepas de *L. monocytogenes* en fase de crecimiento logarítmica. Se utilizaron como control negativo ratones inoculados con solución salina fisiológica (NaCl 0.15 M). El tamaño del inóculo fue confirmado por conteo de ufc en placas de agar BHI. Tres días después de la inoculación, las bacterias fueron aisladas de los ratones. Los bazoos fueron homogeneizados en 1 ml de solución salina fisiológica y diluciones de estos homogeneizados fueron sembradas e incubadas en placas de agar BHI a 37°C durante 48 horas. Las cepas fueron confirmadas mediante siembra en placas de agar Oxford

(Difco), tinción Gram y PCR (Manzano *et al.*, 1998). Asimismo, las cepas fueron replicadas y almacenadas como se describió en la sección 7.1 (Barbour *et al.*, 1996).

7.4.2 Virulencia relativa en ratones BALB/c

Para la evaluación de la virulencia de las cepas, por cada vía de inoculación, intravenosa (iv) e intragástrica (ig), y por cada cepa, se empleó un grupo de 5 ratones BALB/c de 6 semanas de edad. Se utilizaron cultivos del microorganismo en fase de crecimiento logarítmica, centrifugados, lavados y resuspendidos en solución salina fisiológica. La inoculación intravenosa se hizo en la vena caudal con 0.2ml ($\approx 10^5$ ufc) empleando una jeringa de 1 ml (longitud de aguja 13 mm/calibre 27Gx Becton Dickinson). A los ratones inoculados por la vía intragástrica se les retiró el alimento 12 horas previas a la inoculación con el fin de evitar el riesgo del vómito durante o posterior a la inoculación. Se inocularon 0.1 ml ($\approx 10^9$ ufc) vía intragástrica mediante una sonda de alimentación de acero inoxidable (calibre 22, longitud 1.5 in) conectada a una jeringa de 1 ml. Se utilizó como control negativo un grupo de 5 ratones inoculados con solución salina por cada una de las vías (iv e ig). El tamaño del inóculo se verificó mediante conteo de ufc en placas de agar BHI, después de incubación a 37°C durante 48 horas (Barbour *et al.*, 1996; Liu, 2004). Los ratones fueron observados durante 7 días y los ratones que sobrevivieron fueron sacrificados mediante la aplicación de CO₂ seguida de dislocación cervical. Se extrajo el bazo de todos los ratones muertos o sacrificados de cada grupo y se realizaron los conteos del microorganismo de prueba que logró invadirlos. Los bazos fueron homogeneizados en 1 ml de solución salina fisiológica y diluciones de estos homogeneizados fueron sembradas e incubadas en placas de agar BHI a 37°C durante 48 horas. Las cepas fueron confirmadas mediante siembra en placas de agar Oxford (Difco), tinción Gram y PCR (Manzano *et al.*, 1998). La virulencia relativa expresada como porcentaje de letalidad fue calculada dividiendo el número de ratones muertos entre el número de ratones empleados por cepa usando los datos de letalidad de las cepas control como punto de referencia (Liu, 2004; Roche *et al.*, 2008).

7.5 CRECIMIENTO INTRACELULAR DE LAS CEPAS DE *L. monocytogenes* EN MACRÓFAGOS J774A.1 Y CÉLULAS Caco-2.

Fueron crecidas monocapas de macrófagos J774A.1 y células epiteliales Caco-2 a 37°C durante 3 y 5 días respectivamente, en placas para cultivo celular de 6 pozos hasta obtener una confluencia de 95% ($\approx 10^5$ células/pozo). Las monocapas fueron inoculadas con el microorganismo evaluado en fase de crecimiento logarítmica a una concentración de $\approx 10^6$ ufc por pozo, obteniéndose una multiplicidad de infección (MOI) ≈ 10 bacterias por célula en medio DMEM e incubadas a 37°C durante 1 hora; transcurrido este tiempo fueron lavadas con Phosphate Buffered Saline (PBS) (Difco) e incubadas 2 horas a la misma temperatura en medio DMEM suplementado con gentamicina (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de medio). Posteriormente, se lavaron las monocapas con PBS y para determinar el crecimiento intracelular, fueron incubadas a la misma temperatura en medio DMEM con gentamicina [10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de medio] durante 22 horas más. Se consideró que los conteos obtenidos 2 horas posteriores a la infección representaron el número de bacterias que habían sido internalizadas. La invasión de la bacteria fue calculada con base en la relación entre las bacterias internalizadas y el inóculo, y se expresó en porcentaje. El crecimiento intracelular fue evaluado después de una incubación a 37°C durante 2, 4, 8 y 24 horas después de la infección. Los ensayos se realizaron por duplicado y el experimento se repitió dos veces para cada cepa evaluada (Olier *et al.*, 2002; Larsen *et al.*, 2002; Faith *et al.*, 2007).

Para el análisis estadístico se utilizó el software R versión 2.14 (R Development Core Team R, 2011). En la evaluación del crecimiento intracelular en las células epiteliales Caco-2 y los macrófagos J774A.1, los datos obtenidos de las ufc fueron transformados (\log_{10}) y analizados considerando como prerequisites para el análisis la normalidad y la homogeneidad de varianza de los datos. La significancia estadística fue establecida a $P < 0.05$. Se realizó un análisis de regresión para ajustar un modelo a las cinéticas de crecimiento y un análisis de varianza para la comparación de los modelos de las cepas evaluadas con el control. La prueba de Dunnett se empleó para comparar el porcentaje de invasión de las cepas y su crecimiento en 24 horas con el control.

7.6 PRESENCIA DE MUTACIONES EN LOS PRINCIPALES GENES QUE INTERVIENEN EN LA VIRULENCIA DE *Listeria monocytogenes*.

7.6.1 Amplificación de los genes

Las cepas de *L. monocytogenes* fueron crecidas en caldo BHI 24 horas a 37°C en agitación, separadas del medio por centrifugación (4200 xg/10 minutos) y resuspendidas en 2.5 ml de amortiguador TE [Tris Cl 10 mM, EDTA 1 mM]. Se incubaron 2 horas a 37°C con 2 mg/ml de lisozima y se adicionaron 10 µg/ml de SDS y 50 µg/ml de proteinasa K manteniéndolas a 37°C 1 hora; se mezclaron con 84 µl de NaCl [5 M] y 60 µl de Bromuro de hexadecil-trimetil-amonio CTAB [CTAB 10% w/v en NaCl 0.7 M] y mantuvieron a 65°C durante 20 minutos. Posteriormente se les añadió y mezcló fenol-cloroformo en volumen 1:1 y fueron centrifugadas (4200 xg/10 minutos). Los sobrenadantes se mantuvieron una noche a 4°C con 5 µg/ml de RNAsa; para separar cada ADN, se mezclaron los sobrenadantes con un volumen de fenol-cloroformo (1:1) y se centrifugaron (4200 xg/10 minutos). La fase acuosa se mezcló e incubó con dos volúmenes de etanol a -20°C 2 horas, finalmente se centrifugaron (9000 xg/10 minutos), se decantó el sobrenadante, se permitió que el ADN secase a temperatura ambiente y finalmente fueron resuspendidos en amortiguador TE (Burbano *et al.*, 2006).

Los iniciadores que fueron empleados para la amplificación de los genes asociados a la virulencia de *L. monocytogenes* se encuentran enlistados en la tabla 2. Las reacciones de PCR con cada iniciador fueron realizadas por separado. Se empleó un volumen de reacción de 25 µl que contenía 10 mM TrisHCl pH 8.3, 50 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂, 0.120 mM de cada desoxinucleótido trifosfato, 2.5 µM de cada iniciador, 2 U de Polimerasa termoestable y 1 µg de ADN. La amplificación se llevó a cabo con una desnaturalización inicial a 94°C durante 5 minutos, seguida de 30-35 ciclos (94°C/45 s desnaturalización, 45-60°C/90s alineación de iniciadores y 72°C/2 minutos extensión dependiendo de las T[°]m de los iniciadores), y una extensión final a 72°C durante 10 minutos. Los resultados de la prueba de PCR se compararon con los controles positivo y negativo; como control positivo fueron empleadas las cepas control LMC1 y LMC2, y

como control negativo, el ADN fue reemplazado por agua destilada estéril. Los productos de PCR (10 µl) 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 (Wiedmann *et al.*, 1997).

7.6.2 Análisis de polimorfismo en los genes amplificados (RFLP)

Los productos de la reacción de PCR fueron digeridos con endonucleasas de acuerdo con las especificaciones del fabricante (Fermentas). Se eligieron 7 enzimas en base a reportes de estudios previos: *Hind III*, *Sau3 AI*, *Hae III*, *Hha I*, *Alu I*, *Tsp 5091*, *Rsa I* (Rousseaux *et al.*, 2004; Kabuki *et al.*, 2004; Franciosa *et al.*, 2005; Graves *et al.*, 2007). Los productos digeridos fueron separados por electroforesis en geles de agarosa al 2% con bromuro de etidio y visualizados en un transiluminador de luz UV. El tamaño de los productos de la digestión se obtuvo comparando su posición en el gel con la de un marcador de tamaño conocido, utilizando el coeficiente de movilidad relativo o Rf. Mediante el software NEB cutter V2.0 se obtuvo el sitio de corte de referencia (Franciosa *et al.*, 2005).

7.6.3 Detección de mutaciones

De acuerdo a los resultados obtenidos en los ensayos de virulencia relativa, crecimiento intracelular y frecuencia de polimorfismo en los principales genes que intervienen en la virulencia de *L. monocytogenes* (PCR-RFLP); fueron seleccionados los genes *inIA*, *ilnB* y *actA*, para realizar el análisis de su secuencia. Se llevó a cabo la secuenciación de ≈1550 bases de cada gen seleccionado (extremos 5' y 3'), para ello se utilizaron los iniciadores descritos en la tabla 2. Las secuencias obtenidas fueron alineadas y comparadas mediante BLAST y el software Bio Edit Sequence Alignment Editor, para determinar la presencia de mutaciones.

Tabla 2. Secuencia de los iniciadores utilizados para la amplificación de los genes que intervienen en la virulencia de *Listeria monocytogenes*.

Proteína	Gen	Secuencia 5´- 3´	Amp. (pb)	Te (°C)	Referencia
InIA	<i>inIA</i>	CAGGCAGCTACAATTACACA ATATAGTCCGAAAACCACATCT	2341	59	Wiedmann <i>et al.</i> , 1997
InIB	<i>inIB</i>	AGGAGAGGATAGTGTGAA TTATTTCTGTGCCCTTAA	1905	51	Franciosa <i>et al.</i> , 2005
PI-PLC	<i>plcA</i>	ACCAGGTACACATGATACGA CCGAGGTTGCTCGGAGATAT	803	53	Vines and Swaminathan, 1998
PC-PLC	<i>plcB</i>	GCAAGTGTTCTAGTCTTTCCGG ACCTGCCAAAGTTTGCTGTGA	794	52	Cooray <i>et al.</i> , 1994
LLO	<i>hly</i>	GAGAGGAGGGGCTAAACAGTAT TCGTGTGTGTGTTAAGCGGT	1698	49	Vines and Swaminathan, 1998
Mpl	<i>mpl</i>	TATGACGGTAAAAGCAGATT TTCCAAGCTTCAGCAACTT	1458	52	Vines <i>et al.</i> , 1992
ActA	<i>actA</i>	TAGCGTATCACGAGGAGG TTTTGAATTTTCATATCATTACC	1994	50	Wiedmann <i>et al.</i> , 1997
PrfA	<i>prfA</i>	CATGAACGCTCAAGCAGAAG AATTTTCCAAGTAGCAGGA	706	59	Vines <i>et al.</i> , 1992

7.7 TIPIFICACIÓN MOLECULAR DE LAS CEPAS DE *L. monocytogenes* MEDIANTE MACRO RESTRICCIÓN Y ELECTROFORESIS DE CAMPO ELECTRICO PULSADO REA-PFGE.

Se empleó la técnica de macro restricción y electroforesis de campo pulsado (Pulse-field gel electrophoresis PFGE) en base al protocolo descrito por Pulse Net (red nacional de laboratorios, USA) con modificaciones (Graves and Swaminathan, 2001; Graves and Swaminathan, 2006). Las cepas de *L. monocytogenes* fueron crecidas 48 horas a 37°C en caldo BHI. Las células bacterianas fueron lavadas y resuspendidas en 150 µl de buffer PIV [Tris 1 M, NaCl 1 M, pH 7.6] al cual se le adicionaron 30 µl de lisozima [20 mg/ml]. Las bacterias fueron mantenidas a 25°C en agitación (500 rpm) durante 3 horas. Transcurrido este tiempo se les adicionó un volumen igual de agarosa [1.6%] a 50°C y se mezclaron suavemente. La mezcla se vació en los moldes para formar dos bloques por muestra y se permitió que enfriara a temperatura ambiente durante 30 minutos. Los bloques fueron transferidos a tubos de 1.5ml que contenían 1 ml de buffer de lisis [Tris 1 M, NaCl 1 M, EDTA 100 mM, Brij 0.5%] adicionado con 50 µg de RNAsa y se incubaron a 50°C en agitación una noche (500 rpm). El buffer de lisis se reemplazó por 1 ml de buffer ESP [EDTA 0.4 M, Lauril sarcosinato de sodio 0.1%, pH 9-9.5] adicionado con 25 µl de proteinasa K [20 mg/ml] y los bloques fueron incubados a 50°C en agitación (500 rpm) una noche. Después de la proteólisis, los bloques fueron lavados 7 veces con 10 ml de buffer TE 1X y 3 veces con buffer TE 0.1X [Tris 5 mM, EDTA 5 mM, fenil metil sulfonil fluoruro 1mM, pH 7.5] a 37°C en agitación (120 rpm) durante 30 minutos. Posteriormente, los bloques fueron cortados y el DNA que contenían fue digerido por separado con las endonucleasas *Apa* I y *Asc* I de acuerdo a las especificaciones del fabricante (New England BioLabs). La restricción se realizó durante 18 horas a 25 y 37°C respectivamente. Los fragmentos de restricción de DNA en los bloques fueron separados mediante electroforesis empleando un gel de agarosa al 1% en buffer de TBE 0.5X [Tris 0.089M, Borato 0.089M, EDTA 2.5mM] en el equipo de campos pulsados Gene Path System (Bio Rad). Los parámetros electroforéticos usados fueron los siguientes: tiempo inicial 5.3 s; tiempo final 34.9 s; tiempo total de corrida 19.5-20 h; ángulo de 120°; voltaje 6.0 V/cm; temperatura, 14°C.

Después de la electroforesis los geles fueron teñidos con bromuro de etidio (1 mg/ml) durante 10 minutos, seguido de 2 lavados en agua destilada durante 30 minutos cada uno. La imagen del gel fue obtenida utilizando un equipo de foto documentación (Gel Doc. 2000 Bio-Rad) con luz ultravioleta.

A partir de las imágenes obtenidas se realizó el análisis de los patrones de restricción generados por macro restricción y electroforesis de campo eléctrico pulsado (PFGE). Se hizo una matriz de datos binarios de presencia (1) y ausencia (0), con respecto a cada uno de los marcadores (bandas) obtenidos con cada cepa en los perfiles electroforéticos. Una vez obtenida esta matriz se realizó el análisis numérico mediante el programa NTSYSpc 2.0 (Rohlf, 1998), en el cual, inicialmente se construyó una matriz de similitud a partir de la matriz binaria original utilizando el índice de DICE (D) (Dice, 1945), considerando:

$$D= 2a/ (2a+b+c)$$

Donde:

a: es la banda presente en ambas cepas

b: es la banda presente en la primera pero ausente en la segunda

c: es la banda presente en la segunda pero ausente en la primera

Una vez obtenida la matriz de similitud se construyó un dendograma por medio del método de agrupamiento por promedios aritméticos no ponderados (UPGMA), el cual nos permite observar gráficamente la relación existente entre cada una de las cepas evaluadas.

8. RESULTADOS

8.1 VIRULENCIA RELATIVA EN RATONES BALB/c

En este trabajo se encontró que la virulencia relativa en ratones BALB/c varió entre las 12 cepas probadas, obteniéndose porcentajes de letalidad de 100 a 0% en ambas vías de inoculación. En la tabla 3 se muestra la distribución de la virulencia relativa de las cepas con relación a la fuente. Once de ellas produjeron el mismo porcentaje de letalidad por ambas vías de inoculación; sin embargo, las cepas control positivo (LMC1 y LMC2) y una procedente de alfalfa (AC3) produjeron una letalidad de 100% al ser inoculadas por vía intravenosa, pero no fue así por la vía intragástrica en donde mostraron porcentajes de 0 o 20%. Dos cepas (16.7%) provenientes de alfalfa mostraron 100% de letalidad en ambas vías de inoculación y seis (50%) no produjeron muerte en los ratones por ninguna vía de inoculación (iv o ig). Siete de las doce cepas y las dos cepas control lograron invadir y crecer en el bazo de los ratones en ambas vías de inoculación con diferentes proporciones (Figura 1). Los ratones inoculados vía intravenosa ($5.09 \pm 1.98 \log_{10}$ ufc) y los ratones muertos ($7.52 \pm 0.41 \log_{10}$ ufc) presentaron conteos en bazo superiores respecto a los observados en los ratones inoculados vía intragástrica ($3.04 \pm 2.70 \log_{10}$ ufc) y los sacrificados ($2.98 \pm 2.12 \log_{10}$ ufc) respectivamente. Todas las cepas fueron recuperadas del bazo de los ratones inoculados por la vía intravenosa, no obstante con cinco de las cepas inoculadas en ratones por vía intragástrica esto no fue posible.

Tabla 3. Resultados del ensayo de virulencia en ratones BALB/c.

CEPA	FUENTE	% Letalidad	
		IV	IG
LMC1	Control	100	0
LMC2	Control	100	40
AC1	Alfalfa	100	100
AC2	Alfalfa	100	100
AC3	Alfalfa	100	0
LC1	Leche	0	0
MFC1	Mat. Fecal	0	0
MFC2	Mat. Fecal	40	20
MFC3	Mat. Fecal	0	0
QC1	Queso	0	0
QC2	Queso	0	0
QC3	Queso	40	20
QC4	Queso	0	0
QC5	Queso	60	20
Control negativo	---	0	0

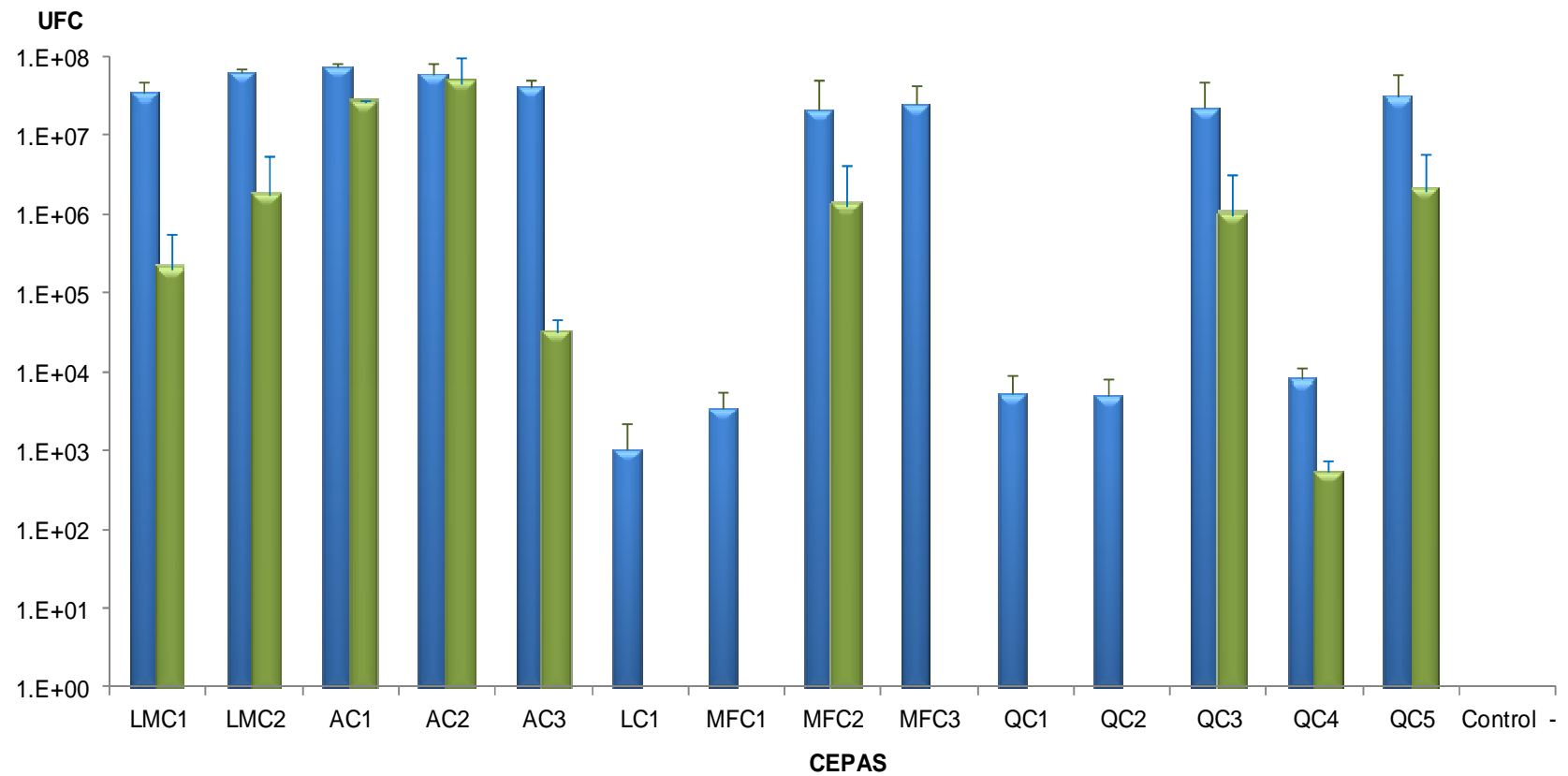


Figura 1. Conteos bacterianos (ufc) en bazo de ratones BALB/c, posteriores a la inoculación intravenosa (barras color azul) o intragástrica (barras color verde) de doce cepas de *L. monocytogenes* evaluadas y dos cepas control. Las barras de error representan las desviaciones estándar de las medias.

8.2 CRECIMIENTO INTRACELULAR EN MACRÓFAGOS J774A.1 Y CÉLULAS EPITELIALES Caco-2.

La diversidad de los niveles de virulencia se reflejó también en el crecimiento de las cepas de *L. monocytogenes* en las líneas celulares J774A.1 y Caco-2. Fueron determinadas las ufc intracelulares para cada cepa probada 2, 4, 8 y 24 horas posteriores a la infección, hallándose que todos los aislados pueden invadir y replicarse intracelularmente en ambas líneas celulares (Figuras 2 y 3). Se observó que seis aislados en los macrófagos J774A.1 (AC3, LC1, MFC1, MFC2, QC1 y QC4) y siete en las células Caco-2 (AC3, LC1, MFC1, MFC2, MFC3, QC1 y QC4) obtenidos de alimento, leche, materia fecal y queso, muestran diferencia significativa con la cepa control ATCC 43249 (LMC1) a una $p < 0.05$ en relación al porcentaje de invasión. También se encontró que para ambas líneas celulares, cinco de las cepas obtenidas de materia fecal, leche y queso (LC1, MFC1, MFC2, QC2 y QC4) mostraron diferencia significativa con la cepa control LMC1 a una $p < 0.05$ respecto al crecimiento intracelular en 24 horas. Del mismo modo, se observó que independientemente del aislado, los porcentajes de invasión y el crecimiento intracelular fueron menores en los macrófagos J774A.1 ($0.09 \pm 0.43\%$; $0.65 \pm 1.07 \log_{10}$ ufc) que en las células Caco-2 ($1.25 \pm 1.07\%$; $3.0 \pm 0.85 \log_{10}$ ufc) (figura 2 y 3). El crecimiento de las cepas de *L. monocytogenes* en los macrófagos presentó una disminución entre las 8 y las 24 horas posteriores a la infección, excepto AC1, AC2 y las cepas control LMC1 y LMC2 (Figura 3B). La cepa procedente de leche (LC1) tuvo dificultades para sostener el crecimiento en los macrófagos mostrando una disminución en las ufc cuatro horas posteriores a la infección. Asimismo, se encontró que el modelo cuadrático de la forma $\log UFC = At^2 + Bt + C$, donde t representa el tiempo, es adecuado para describir la cinética de crecimiento promedio de todas las cepas evaluadas en ambas líneas celulares ($r^2 \geq 0.85$). Por medio de la comparación de modelos se confrontaron las cinéticas de las cepas con el control LMC1, con lo cual se encontró que en Caco-2 nueve de las cepas probadas (AC3, LC1, MFC1, MFC2, QC1, QC2, QC3, QC4, QC5) presentaron diferencia significativa ($p < 0.05$) en por lo menos uno de los valores estimados de los parámetros del modelo (A, B y C), mientras que en los macrófagos J774A.1, fueron diez las cepas que mostraron alguna diferencia con el control (AC3, LC1, MFC1, MFC2, MFC3, QC1, QC2, QC3, QC4 y QC5).

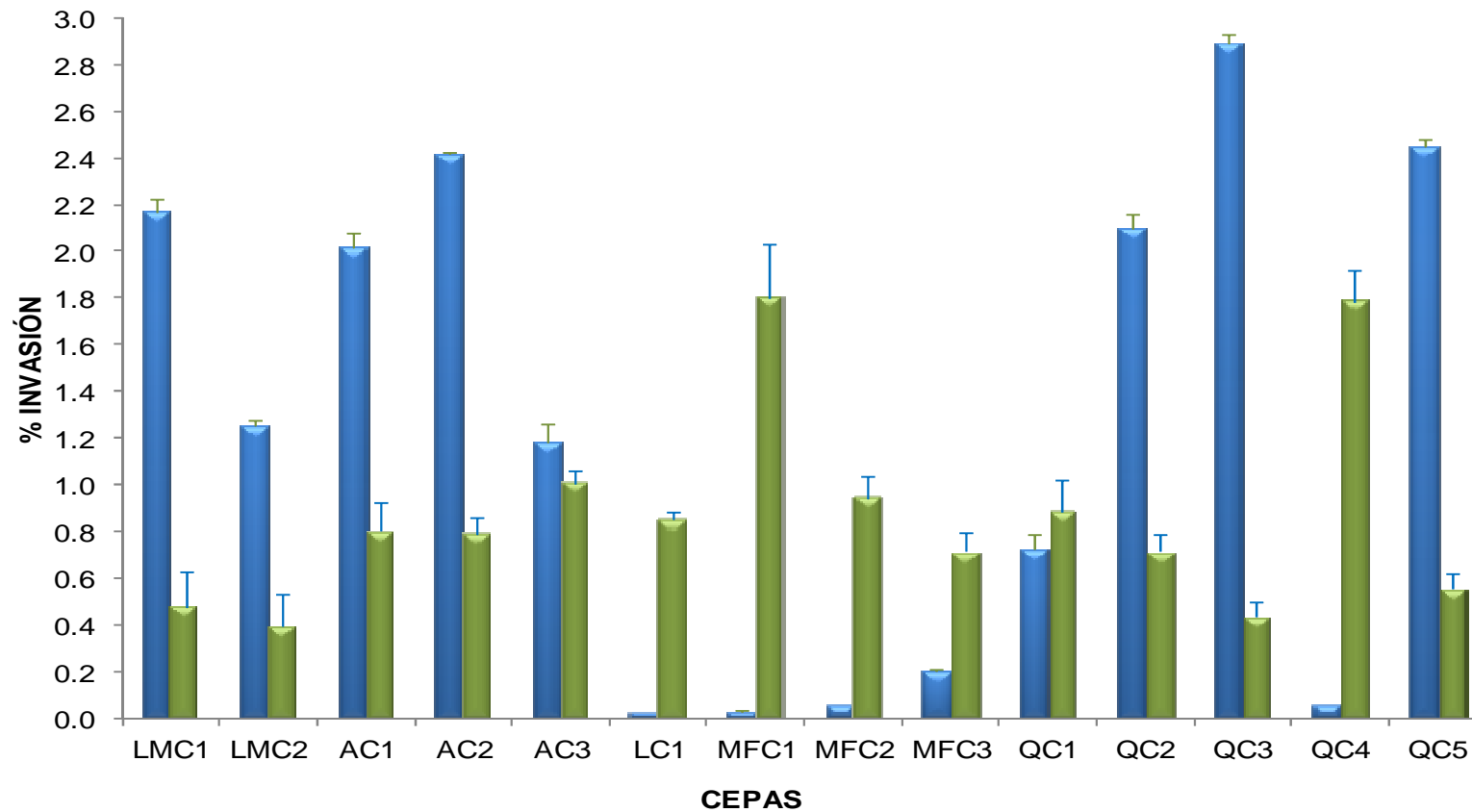
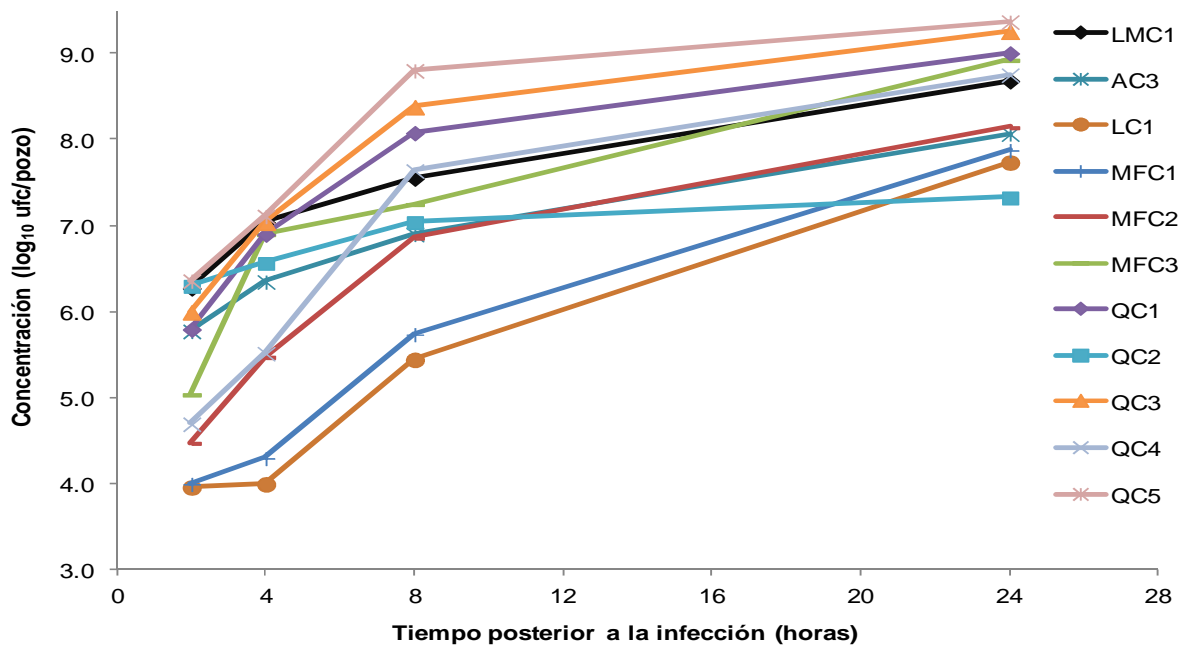
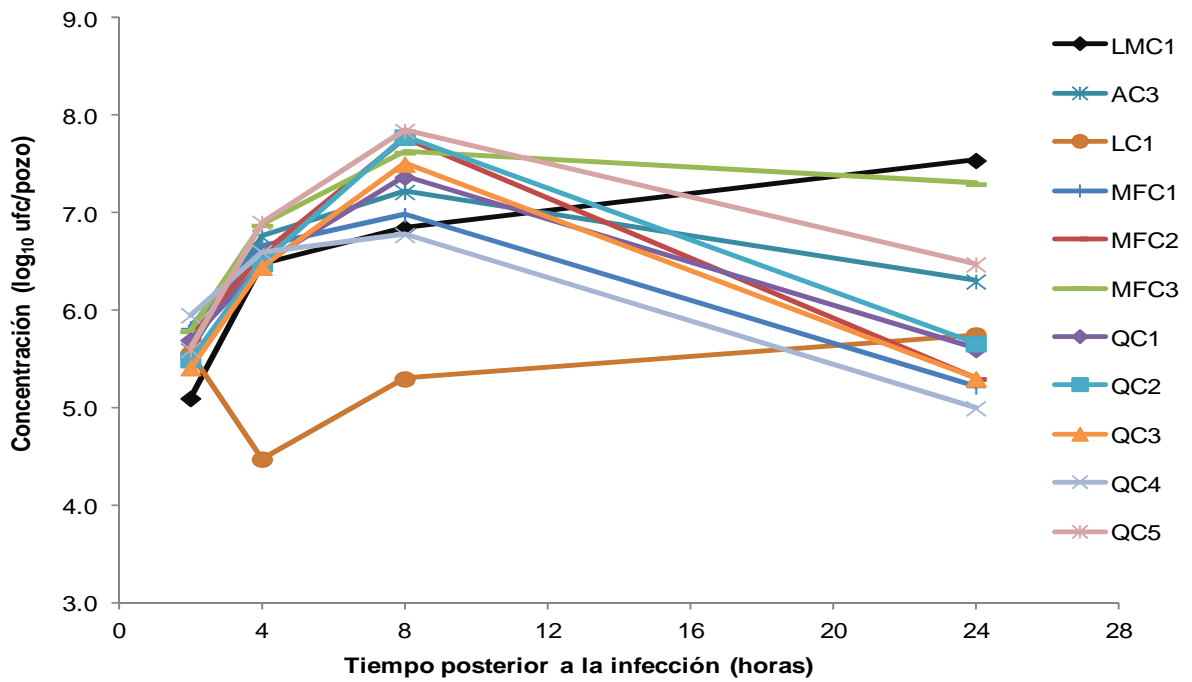


Figura 2. Invasión de las cepas de *Listeria monocytogenes* en células epiteliales Caco-2 (barras color azul) y Macrófagos J774A.1 (barras color verde); calculada con base en la relación entre el inóculo y las bacterias internalizadas 2 horas posteriores a la infección, y expresada en porcentaje. Las barras de error representan las desviaciones estándar de las medias.



A



B

Figura 3. Crecimiento intracelular de las cepas de *Listeria monocytogenes*. A) Células epiteliales Caco-2, B) Macrófagos J774A.1. Valores de ufc (\log_{10}) registrados 2, 4, 8 y 24 horas posteriores a infección.

8.3 PRESENCIA DE MUTACIONES EN LOS PRINCIPALES GENES QUE INTERVIENEN EN LA VIRULENCIA DE *Listeria monocytogenes*.

8.3.1 Amplificación de los genes por PCR

En la Tabla 4 se muestran los resultados de la amplificación de los genes que intervienen en la virulencia de *Listeria monocytogenes*. Fueron obtenidos amplificadores del tamaño esperado en seis de los ocho genes evaluados (Figuras 4-8 y 11). Sin embargo con los genes *mpl* y *actA* se obtuvieron amplificadores de menor tamaño (1400 y 1950 pb) respecto a los esperados de 1458 y 2000 pb respectivamente (Figuras 9 y 10). En algunos casos se obtuvieron dos amplicones, al amplificar el gen *inl A* se obtuvo un segundo amplificado de 1620 pb en todas las cepas evaluadas y la cepa control LMC2; en el caso del gen *plc A* se obtuvo uno de 700 pb en los aislados LC1 y QC1; finalmente con el gen *mpl* se obtuvo uno de 400 pb en las cepas LMC2, AC1, LC1 y MFC3. Además, no fue posible amplificar los genes *inlA*, *hly* y *actA* de la cepa MFC3 procedente de materia fecal y los genes *hly* y *actA* de la cepa de leche de cabra LC1.

8.3.2 Análisis de polimorfismo en los genes amplificados (RFLP)

Los resultados del ensayo de polimorfismo (RFLP) en los genes que intervienen en la virulencia de *L. monocytogenes* amplificados por PCR se resume en la tabla 5, en la cual se muestran los grupos generados por las endonucleasas en los genes evaluados, en base al total de patrones de corte obtenidos. Tomando en cuenta todos los patrones de corte obtenidos en los genes de *Listeria monocytogenes* evaluados, *Hae* III fue la enzima con mayor capacidad de diferenciación en las cepas generando 13 grupos, seguida de las endonucleasas *Sau* 3AI y *Rsa* I, las cuales generaron 8 y 6 grupos respectivamente. La enzima con menor capacidad de diferenciación fue *Tsp* 5091 (2 grupos). Excepto *Tsp* 5091 y *Rsa* I, las endonucleasas produjeron grupos diferentes en las cepas control (LMC1 y LMC2) respecto a las cepas aisladas de cabras y subproductos lácteos. *Hae* III pudo diferenciar todas las cepas excepto AC1 y AC3. *Hind* III, *Hae* III y *Rsa* I fueron capaces de diferenciar las cepas procedentes de alfalfa, mientras que *Hind* III, *Sau* 3AI, *Hae* III y *Tsp* 5091 lograron diferenciar las cepas aisladas de materia fecal; asimismo, *Hind* III, *Hae* III, *Alu* I, y *Rsa* I consiguieron diferenciar las

cepas provenientes de queso. El mayor grado de polimorfismo fue observado en los genes *inIA*, *inIB* y *mpl*. La restricción del gen *inIB* con las endonucleasas *Hae* III y *Alu* I reveló 5 y 4 patrones diferentes entre las cepas respectivamente mientras que los genes *inIA* y *mpl* tratados con las endonucleasas *Hind* III y *Sau* 3AI expusieron 3 patrones. Las endonucleasas *Hind* III (*plcA*), *Sau* 3AI (*plcA*, *plcB*, *hly*), *Alu* I (*plcA*, *hly* y *prfA*), *Tsp* 5091 (*inIB*, *plcA*, *hly*, *actA* y *prfA*) y *Rsa* I (*plcB*, *hly* y *prfA*) produjeron un solo patrón de corte en algunos de los genes evaluados. Finalmente, no se obtuvo corte del gen *prfA* de ninguna cepa tratado con las enzimas *Hae* III o *Hha* I, así como el gen *plcB* tratado con la enzima *Hind* III o *Hha* I; la enzima *Hind* III tampoco produjo corte en el gen *mpl*. En las figuras 12 a la 17 se muestran algunos ejemplos representativos de geles de agarosa en los cuales se observan los patrones de corte obtenidos.

Se compararon los fragmentos generados en el ensayo de polimorfismo (PCR-RFLP) por las endonucleasas (*Hind* III, *Sau*3 AI, *Hae* III, *Hha* I, *Alu* I, *Tsp* 5091 y *Rsa* I) en los genes *inIA*, *inIB*, *plcA* y *plcB*, *hly*, *mpl*, *actA* y *prfA* de las cepas de *L. monocytogenes* procedentes de cabras y subproductos lácteos, con los obtenidos por dichas endonucleasas mediante el software NEB cutter V2.0, en los respectivos genes de las cepas patógenas de referencia *L. monocytogenes* EGD-e (serotipo 1/2a, clave de acceso a GenBank AL591824) y *L. monocytogenes* F2365 (serotipo 4b, clave de acceso a GenBank AE017262), cuya información de su genoma secuenciado se encuentra en la base de datos de la NCBI. Estas cepas patógenas de referencia fueron seleccionadas para la comparación debido a que mostraron una homología con las cepas estudiadas respecto a los genes secuenciados (Sección 8.3.3). En la comparación se observó que en la mayoría de los genes probados se obtuvieron diferencias en cuanto al número y tamaño de los fragmentos obtenidos. Las endonucleasas *Hind* III y *Hha* I coincidieron al no producir corte en los genes *plcB* y *prfA* en ninguna de las cepas probadas (Tablas 6 y 7).

Tabla 4. Amplificación de los genes que intervienen en la virulencia de *Listeria monocytogenes*, tamaño obtenido en pares de bases (pb).

Cepas	Tamaño de amplificadores pb							
	<i>inl A</i>	<i>inl B</i>	<i>plc A</i>	<i>plc B</i>	<i>hly</i>	<i>mpl</i>	<i>act A</i>	<i>prf A</i>
LMC1	2350	1900	800	800	1700	1400	2000	720
LMC2	2350 1620	1900	800	800	1700	1400 400	1950	720
AC1	2350 1620	1900	800	800	1700	1400 400	1950	720
AC2	2350 1620	1900	800	800	1700	1400	1950	720
AC3	2350 1620	1900	800	800	1700	1400	1950	720
LC1	2350 1620	1900	800 700	800	&	1400 400	&	720
MFC1	2350 1620	1900	800	800	1700	1400	1950	720
MFC2	2350 1620	1900	800	800	1700	1400	1950	720
MFC3	&	1900	800	800	&	1400 400	&	720
QC1	2350 1620	1900	800 700	800	1700	1400	1950	720
QC2	2350 1620	1900	800	800	1700	1400	1950	720
QC3	2350 1620	1900	800	800	1700	1400	1950	720
QC4	2350 1620	1900	800	800	1700	1400	1950	720
QC5	2350 1620	1900	800	800	1700	1400	1950	720

&: No se produjo amplificación

inIA

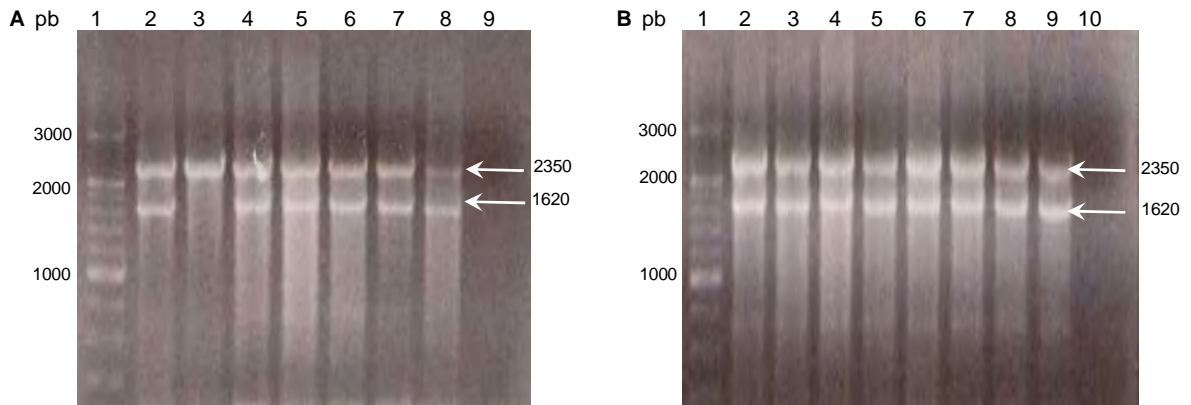


Figura 4. Amplificación por PCR del gen *inIA* de las cepas de *Listeria monocytogenes* evaluadas, electroforesis en geles de agarosa. A) Carril 1-Marcador de tamaño (200 pb), 2-LMC2, 3-LMC1, 4-AC1, 5-AC2, 6-AC3, 7-LC1, 8-MFC1, 9-control negativo. B) Carril 1-Marcador de tamaño, 2,3-LMC2, 4-MFC2, 5-QC1, 6-QC2, 7-QC3, 8-QC4, 9-QC5, 10-control negativo.

inIB

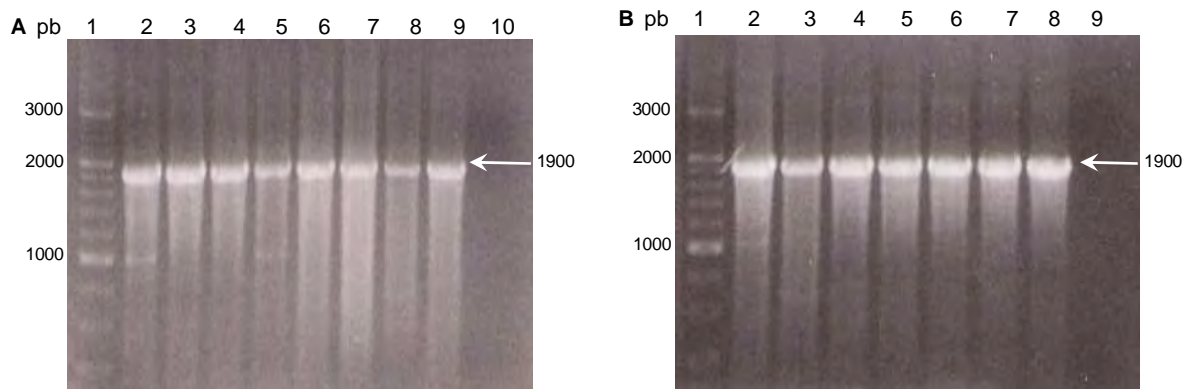


Figura 5. Amplificación por PCR del gen *inIB* de las cepas de *Listeria monocytogenes* evaluadas, electroforesis en geles de agarosa. A) Carril 1-Marcador de tamaño (200 pb), 2-LMC1, 3-LMC2, 4-AC1, 5-AC2, 6-AC3, 7-LC1, 8-MFC1, 9-MFC2, 10-control negativo. B) Carril 1-Marcador de tamaño, 2-LMC2, 3-MFC3, 4-QC1, 5-QC2, 6-QC3, 7-QC4, 8-QC5, 9-control negativo.

plcA

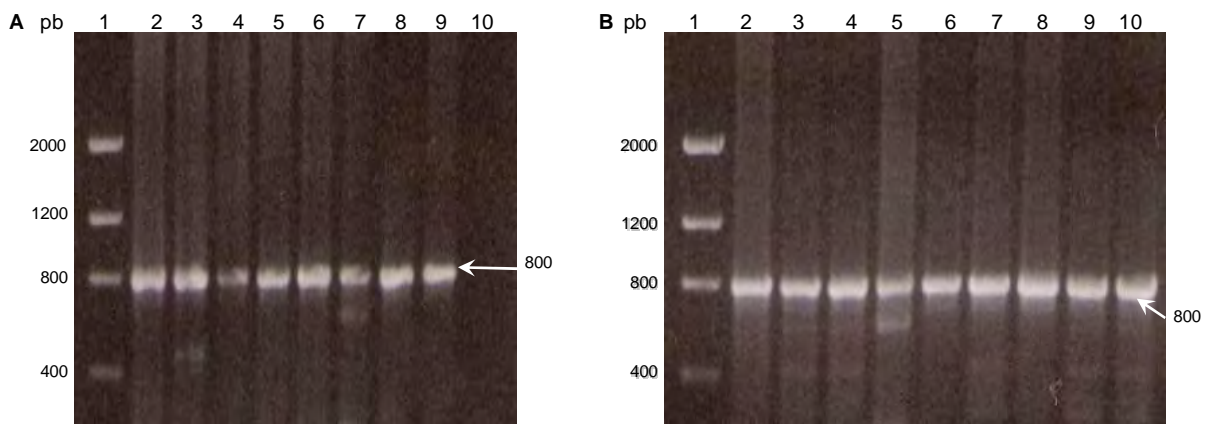


Figura 6. Amplificación por PCR del gen *plcA* de las cepas de *Listeria monocytogenes* evaluadas, electroforesis en geles de agarosa. A) Carril 1-Marcador de tamaño (2000 pb), 2-LMC1, 3-LMC2, 4-AC1, 5-AC2, 6-AC3, 7-LC1, 8-MFC1, 9-MFC2, 10-control negativo. B) Carril 1-Marcador de tamaño, 2-LMC1, 3-LMC2, 4-MFC3, 5-QC1, 6-QC2, 7-QC3, 8-QC4, 9 y 10-QC5.

plcB

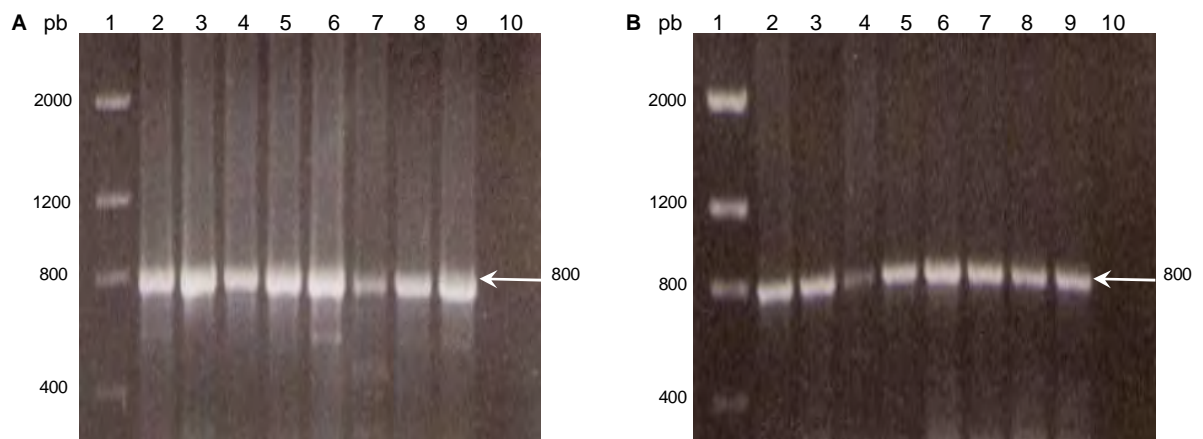


Figura 7. Amplificación por PCR del gen *plcB* de las cepas de *Listeria monocytogenes* evaluadas, electroforesis en geles de agarosa. A) Carril 1-Marcador de tamaño (2000 pb), 2-LMC1, 3-LMC2, 4-AC1, 5-AC2, 6-AC3, 7-LC1, 8-MFC1, 9-MFC2, 10-control negativo. B) Carril 1-Marcador de tamaño, 2-LMC1, 3-LMC2, 4-MFC3, 5-QC1, 6-QC2, 7-QC3, 8-QC4, 9-QC5, 10-control negativo.

hly

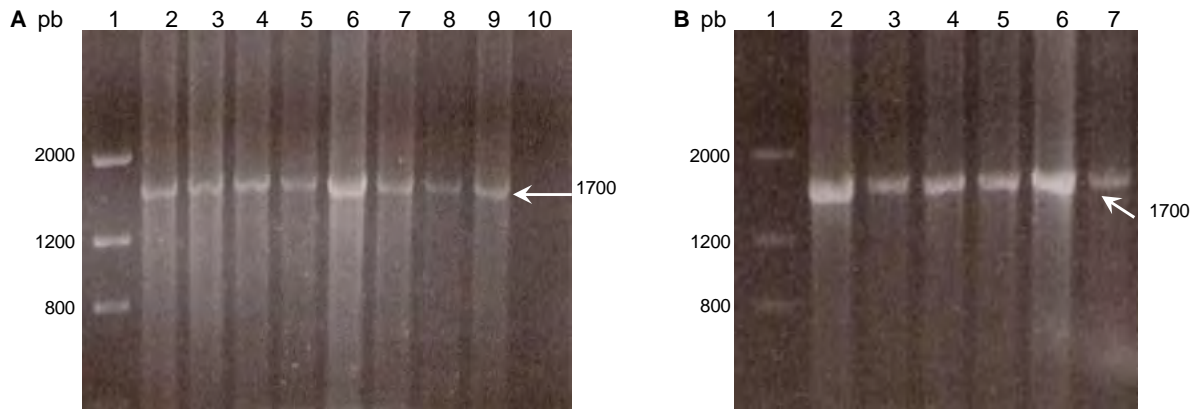


Figura 8. Amplificaci3n por PCR del gen *hly* de las cepas de *Listeria monocytogenes* evaluadas, electroforesis en geles de agarosa. A) Carril 1-Marcador de tama1o (2000 pb), 2-LMC1, 3-LMC2, 4-AC1, 5-AC2, 6-AC3, 7-MFC1, 8-MFC2, 9-QC1, 10-control negativo. B) Carril 1-Marcador de tama1o, 2-LMC1, 3-LMC2, 4-QC2, 5-QC3, 6-QC4, 7-QC5.

mpl

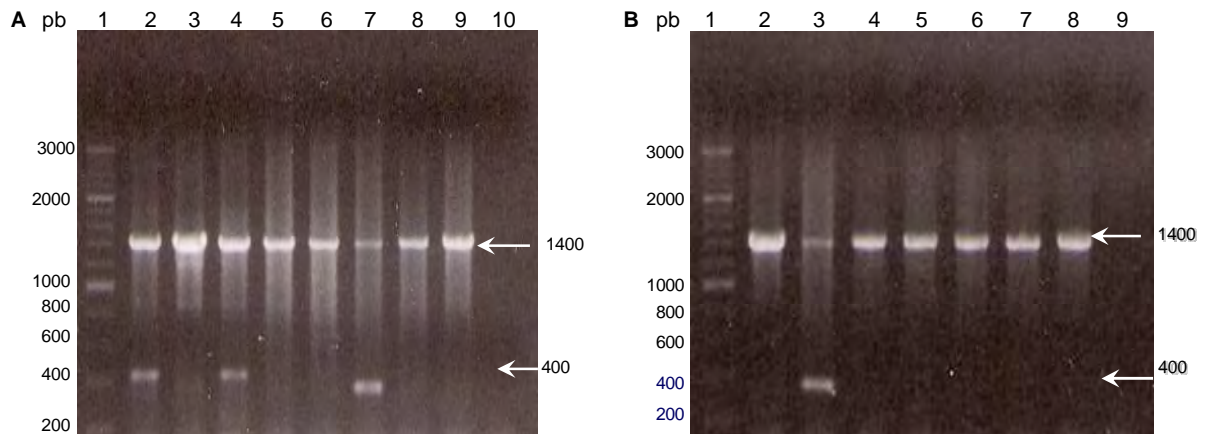


Figura 9. Amplificaci3n por PCR del gen *mpl* de las cepas de *Listeria monocytogenes* evaluadas, electroforesis en geles de agarosa. A) Carril 1-Marcador de tama1o (200 pb), 2-LMC2, 3-LMC1, 4-AC1, 5-AC2, 6-AC3, 7-LC1, 8-MFC1, 9-MFC2, 10-control negativo. B) Carril 1-Marcador de tama1o, 2-LMC2, 3-MFC3, 4-QC1, 5-QC2, 6-QC3, 7-QC4, 8-QC5, 9-control negativo.

actA

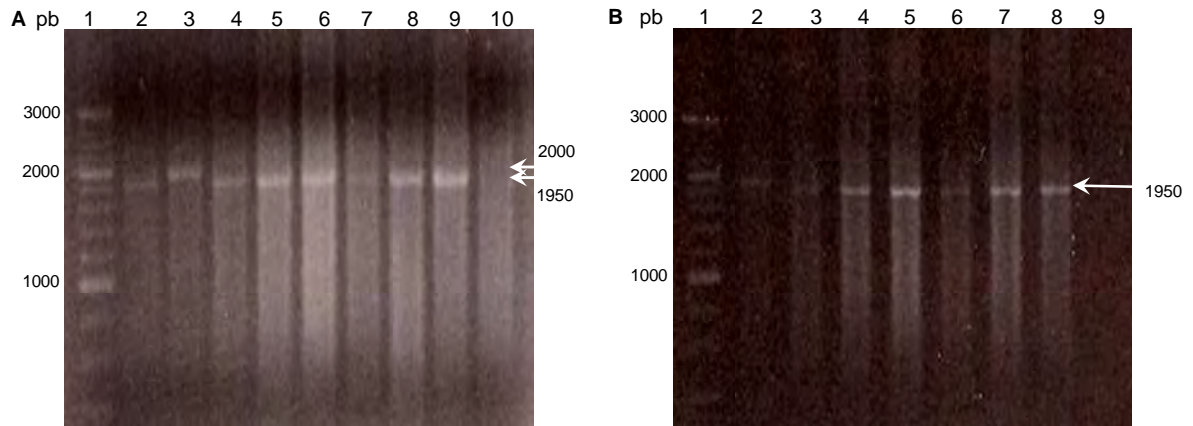


Figura 10. Amplificaci3n por PCR del gen *actA* de las cepas de *Listeria monocytogenes* evaluadas, electroforesis en geles de agarosa. A) Carril 1-Marcador de tama1o (200 pb), 2-LMC1, 3-LMC2, 4-AC1, 5-AC2, 6-AC3, 7-LC1, 8-MFC1, 9-MFC2, 10-MFC3. B) Carril 1-Marcador de tama1o, 2-LMC1, 3-LMC2, 4-QC1, 5-QC2, 6-QC3, 7-QC4, 8-QC5, 9-control negativo.

prfA

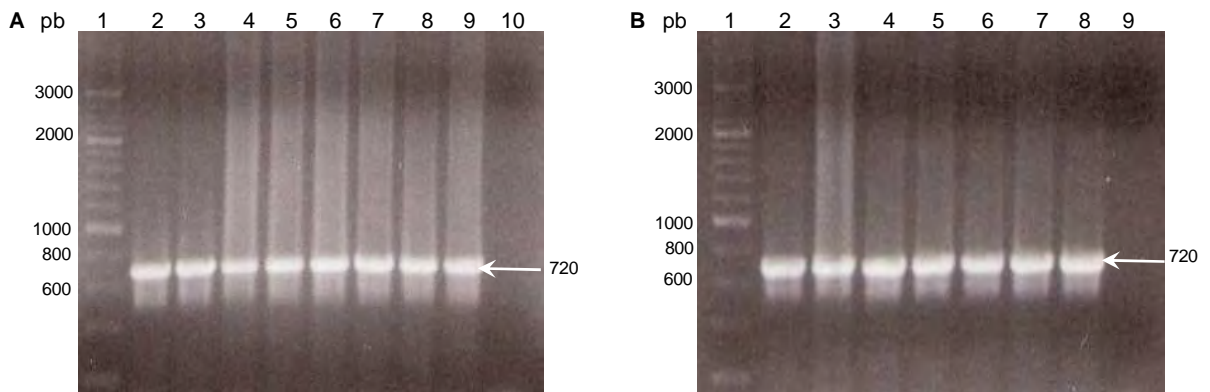


Figura 11. Amplificaci3n por PCR del gen *prfA* de las cepas de *Listeria monocytogenes* evaluadas, electroforesis en geles de agarosa. A) Carril 1-Marcador de tama1o (200 pb), 2-LMC1, 3-LMC2, 4-AC1, 5-AC2, 6-AC3, 7-LC1, 8-MFC1, 9-MFC2, 10-control negativo. B) Carril 1-Marcador de tama1o, 2-LMC2, 3-MFC3, 4-QC1, 5-QC2, 6-QC3, 7-QC4, 8-QC5, 9-control negativo.

Tabla 5. Análisis de polimorfismo, grupos generados en base a los patrones de corte obtenidos por las 7 endonucleasas en los principales genes que intervienen en la virulencia de *L. monocytogenes* (PCR-RFLP), y por la macro restricción del ADN de las cepas (REA-PFGE).

CEPA	PCR-RFLP							PFGE		
	<i>inIA</i>	<i>InIB</i>	<i>plcA</i>	<i>plcB</i>	<i>hly</i>	<i>mpl</i>	<i>actA</i>	<i>prfA</i>	<i>Asc I</i>	<i>Apa I</i>
LMC1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
LMC2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
AC1	3	3	2	2	3	3	3	3	2	2
AC2	3	3	2	2	2	4	4	3	2	2
AC3	3	3	2	2	3	4	4	3	3	3
LC1	3	4	2	3	&	5	&	3	4	4
MFC1	3	5	2	3	3	6	4	3	4	5
MFC2	3	5	2	2	2	7	4	3	5	6
MFC3	&	6	3	1	&	7	&	3	6	7
QC1	3	7	2	4	2	4	5	3	7	8
QC2	4	8	4	4	3	4	5	3	7	8
QC3	5	9	2	4	3	4	5	3	7	9
QC4	5	8	2	4	2	4	2	3	8	9
QC5	5	8	2	4	4	4	2	3	9	9

&: Sin amplicón

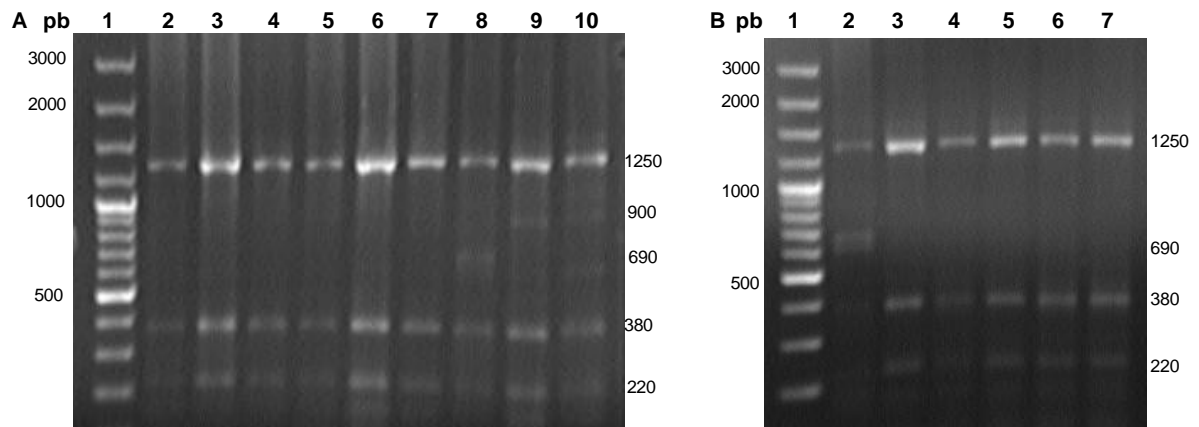


Figura 12. Patrones electroforéticos obtenidos por la digestión del gen *inlB* de las cepas de *Listeria monocytogenes* con la endonucleasa *Hind* III, electroforesis en geles de agarosa al 2%. A) Carril 1-Marcador de tamaño (100 pb), 2-LMC1, 3 y 4-LMC2, 5-AC1, 6-AC2, 7-AC3, 8-LC1, 9-MFC1, 10-MFC2. B) Carril 1-Marcador de tamaño, 2-MFC3, 3-QC1, 4-QC2, 5-QC3, 6-QC4, 7-QC5.

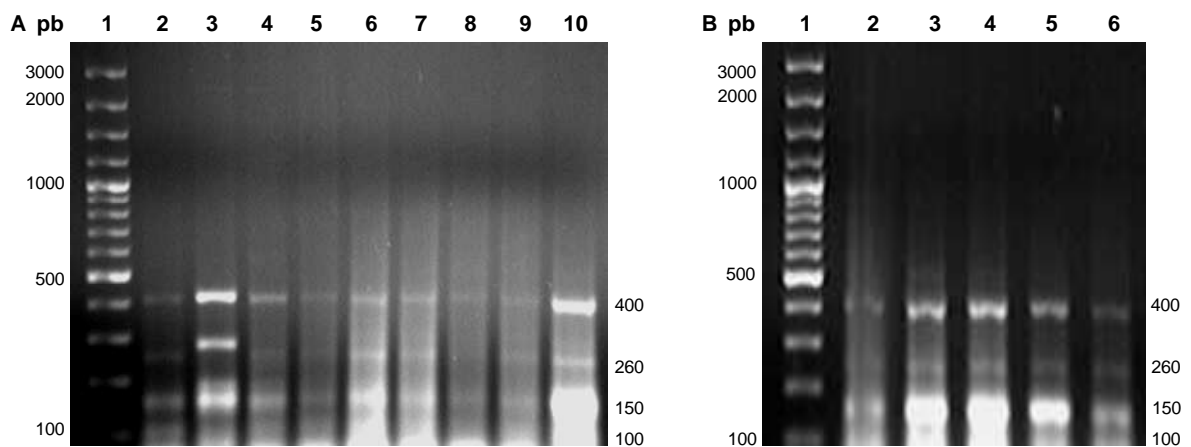


Figura 13. Patrones electroforéticos obtenidos por la digestión del gen *InlA* de las cepas de *Listeria monocytogenes* con la endonucleasa *Tsp* 5091, electroforesis en geles de agarosa al 2%. A) Carril 1-Marcador de tamaño (100 pb), 2-LMC1, 3 -LMC2, 4-AC1, 5-AC2, 6-AC3, 7-LC1, 8-MFC1, 9-MFC2, 10-QC1. B) Carril 1-Marcador de tamaño, 2-LMC1, 3-QC2, 4-QC3, 5-QC4, 6-QC5.

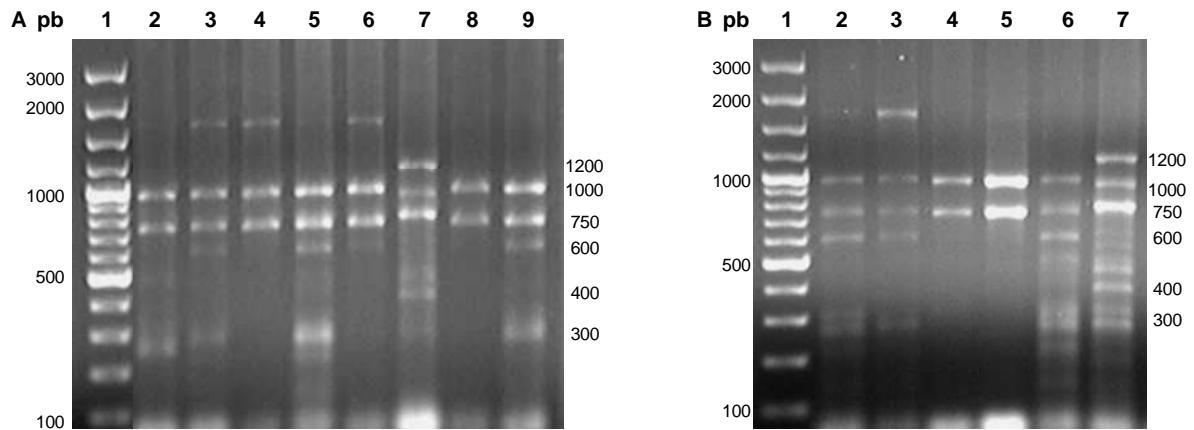


Figura 14. Patrones electroforéticos obtenidos por la digestión del gen *hly* de las cepas de *Listeria monocytogenes* con la endonucleasa *Hae* III, electroforesis en geles de agarosa al 2%. A) Carril 1-Marcador de tamaño (100 pb), 2-LMC1, 3-LMC2, 4-AC1, 5-AC2, 6-AC3, 7-QC5, 8-MFC1, 9-MFC2. B) Carril 1-Marcador de tamaño, 2-LMC2, 3-QC1, 4-QC2, 5-QC3, 6-QC4, 7-QC5.

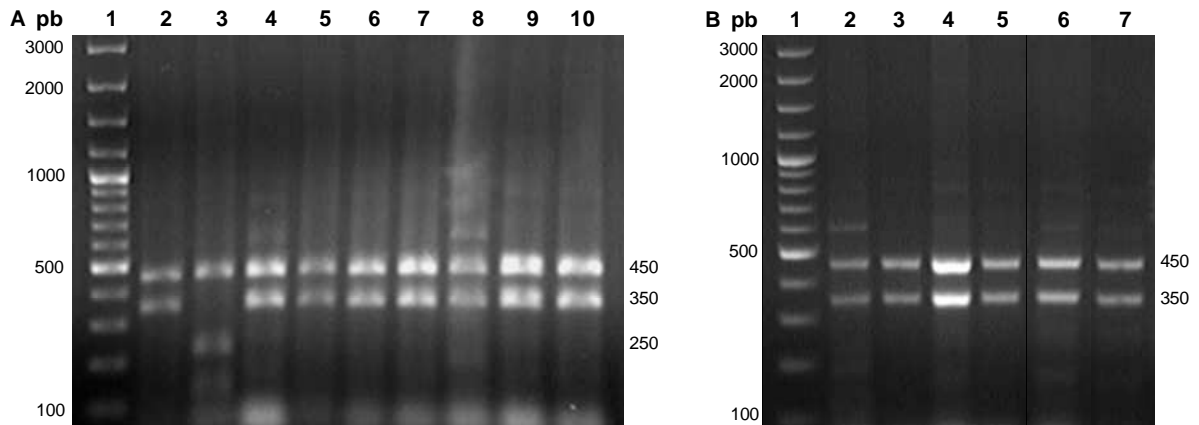


Figura 15. Patrones electroforéticos obtenidos por la digestión del gen *plcA* de las cepas de *Listeria monocytogenes* con la endonucleasa *Hha* I, electroforesis en geles de agarosa al 2%. A) Carril 1-Marcador de tamaño (100 pb), 2-LMC2, 3-LMC1, 4-AC1, 5-AC2, 6-AC3, 7-LC1, 8-MFC1, 9-MFC2, 10-MFC3. B) Carril 1-Marcador de tamaño, 2-LMC2, 3-QC1, 4-QC2, 5-QC3, 6-QC4, 7-QC5.

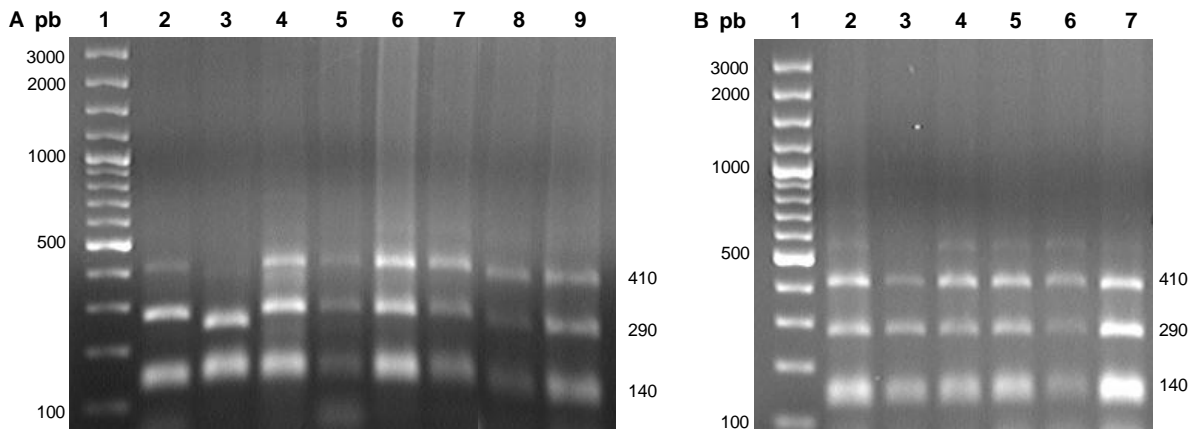


Figura 16. Patrones electroforéticos obtenidos por la digestión del gen *prfA* de las cepas de *Listeria monocytogenes* con la endonucleasa *Alu* I, electroforesis en geles de agarosa al 2%. A) Carril 1-Marcador de tamaño (100 pb), 2-LMC1, 3-LMC2, 4-AC1, 5-AC2, 6-AC3, 7-LC1, 8-MFC1, 9-MFC2, 10-MFC3. B) Carril 1-Marcador de tamaño, 2-LMC1, 3-QC1, 4-QC2, 5-QC3, 6-QC4, 7-QC5.

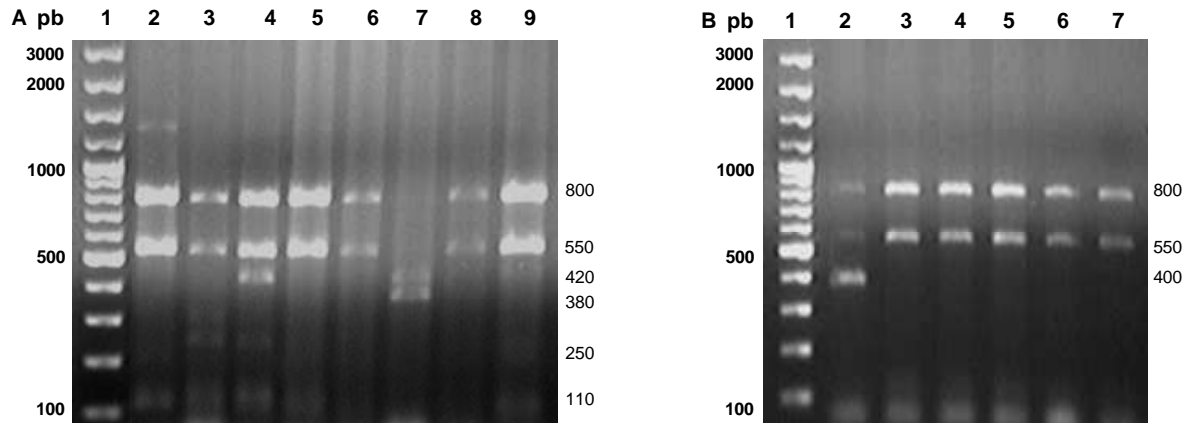


Figura 17. Patrones electroforéticos obtenidos por la digestión del gen *mpl* de las cepas de *Listeria monocytogenes* con la endonucleasa *Rsa* I, electroforesis en geles de agarosa al 2%. A) Carril 1-Marcador de tamaño (100 pb), 2-LMC1, 3-LMC2, 4-AC1, 5-AC2, 6-AC3, 7-LC1, 8-MFC1, 9-MFC2. B) Carril 1-Marcador de tamaño, 2-MFC3, 3-QC1, 4-QC2, 5-QC3, 6-QC4, 7-QC5.

Tabla 6. Comparación de los fragmentos generados por las endonucleasas en las cepas de referencia EGD-e y F2365 mediante el software NEB cutter V2.0, con los obtenidos en el ensayo de polimorfismo (PCR-RFLP) en los genes *inIA*, *inIB*, *plcA* y *plcB* de las cepas procedentes de cabras y subproductos lácteos.

Gen	<i>inIA</i> (2403/2403/2350 pb)*							<i>plcA</i> (954/954/800 pb)*						
Enzima	<i>Alu</i> I	<i>Hae</i> III	<i>Hha</i> I	<i>Hind</i> III	<i>Rsa</i> I	<i>Sau</i> 3AI	<i>Tsp</i> 5091	<i>Alu</i> I	<i>Hae</i> III	<i>Hha</i> I	<i>Hind</i> III	<i>Rsa</i> I	<i>Sau</i> 3AI	<i>Tsp</i> 5091
EGD-e	≤100,110 135, 165 195, 210 260, 300 385		75, 220 365, 425 545, 775	110 1085 1210	150, 160 455, 605 1040	51, 219 965, 1165	10-160 420	40, 210 215, 485	350 605	125, 180 205, 475	250 740	30, 80 135, 195 555	480 505	10-50 75, 135 240, 340
F2365	≤100- 130 190-210 260, 300 330		75, 220 365, 425 545, 775	110 1085 1210	150, 160 455, 605 1040	220 995 1215	10-160 420	40 210 700	350 605	330 655	250 740	25, 40 80, 135 160, 555	480 505	10-50 100, 135 230, 325
Cepas	≤130,220 250, 300 350, 400 650	240 500 750 1000	75, 220 380, 420 600, 670 800	150 200 650 1000 1300 1500	200, 300 450, 600 750 1000	<100, 300 600, 750 1000,1250 1300	≤100, 150 260, 400	<100 280 520	170, 250 350, 400 630	250, 350 450, 600	200 600	170 250 550	200 600	≤150 240
Gen	<i>inIB</i> (1893/1893/1900 pb)*							<i>plcB</i> (870/843/800 pb)*						
Enzima	<i>Alu</i> I	<i>Hae</i> III	<i>Hha</i> I	<i>Hind</i> III	<i>Rsa</i> I	<i>Sau</i> 3AI	<i>Tsp</i> 5091	<i>Alu</i> I	<i>Hae</i> III	<i>Hha</i> I	<i>Hind</i> III	<i>Rsa</i> I	<i>Sau</i> 3AI	<i>Tsp</i> 5091
EGD-e	25, 50 170, 190 215, 445 805		55 140 200 1500		40, 70 100, 190 370 1055	235 1660	20-90 110, 120 160, 230	25, 40 70, 110 120, 505	375 495			345 525	35 280 555	10-60, 80 120-150 210
F2365	25, 50 75, 120 305, 510 740		45, 55 130, 140 200, 1325 1500	215 380 1300	35 190 370 1120	35, 100 200, 560 990	10-90 110, 120 160, 230	25, 70 85, 120 545	375 465			320 525	75 215 555	10-60 100-130 160-180
Cepas	<100,150 200, 300 450, 500 800, 850 1300	100, 170 350, 500 600, 700 800,1000	55, 150 220, 350 500, 600 1400	220, 380 690, 900 1250	≤100,200 260, 280 350, 420 550,1000	220, 350 430, 580 850, 1000	≤100 150 250	≤110, 220, 450 500, 520	100, 170 210, 300 350, 450			270 310 500	<100 250 550	≤100, 190 250, 350 450

*Tamaño del gen en la cepas: EGD-e / F2365 / Cepas procedentes de cabras y subproductos lácteos (pb).

Tabla 7. Comparación de los fragmentos generados por las endonucleasas en las cepas de referencia EGD-e y F2365 mediante el software NEB cutter V2.0, con los obtenidos en el ensayo de polimorfismo PCR-RFLP en los genes *hly*, *mpl*, *actA* y *prfA* de las cepas procedentes de cabras y subproductos lácteos.

Gen	<i>hly</i> (1590/1590/1700 pb)*							<i>actA</i> (1920/1815/2000-1950 pb)*						
Enzima	<i>Alu</i> I	<i>Hae</i> III	<i>Hha</i> I	<i>Hind</i> III	<i>Rsa</i> I	<i>Sau</i> 3AI	<i>Tsp</i> 5091	<i>Alu</i> I	<i>Hae</i> III	<i>Hha</i> I	<i>Hind</i> III	<i>Rsa</i> I	<i>Sau</i> 3AI	<i>Tsp</i> 5091
EGD-e	10, 45 80-90 120-140 245, 585	695 895	60 130 280, 470 655	355 585 650	270 655 665	60 270 1265	10-70 90-110 150-170 200, 260	70, 90- 100, 130 185, 250 380, 410		420 530 970		355 680 890	650 1270	10-20 50-70 110-120 150, 310 360, 380
F2365	10, 45 80-90 120-140 245, 585	695 895	60 130 480 655	355 585 650	270 655 665	60 270 1265	10-70 90-110 150-170 260	30, 60- 70 100, 130 190, 200 250, 360 410	300 1515	10-20, 30 130, 350 420, 860	365 1450	680 1140	360 650 800	10-30 60-70, 90 150-160 285, 360 430
Cepas	≤100 250 680	300, 400 600, 750 1000, 1200	≤220, 300 530, 650 800	350, 420 700, 1100	290 550 750	<100 300 1400	≤100, 150 200, 250	≤100 450 560	350, 1600 2000	400, 450 550, 900 1000	420, 800 1200, 1530	600, 700 1200	400, 600 700, 800 980	≤160, 280 380, 480
Gen	<i>mpl</i> (1533/1533/1400 pb)*							<i>prfA</i> (714/714/720 pb)*						
Enzima	<i>Alu</i> I	<i>Hae</i> III	<i>Hha</i> I	<i>Hind</i> III	<i>Rsa</i> I	<i>Sau</i> 3AI	<i>Tsp</i> 5091	<i>Alu</i> I	<i>Hae</i> III	<i>Hha</i> I	<i>Hind</i> III	<i>Rsa</i> I	<i>Sau</i> 3AI	<i>Tsp</i> 5091
EGD-e	20-40 80, 100 130, 965	300 560 670	40-90 245 330 390	30 140 1370	130 545 860	310 415 810	20-40, 65 100-130 180-190 530	5, 30 130, 140 160, 245			300 415	90 625	95 620	10-80 115 140
F2365	20-40 80, 100 130, 230 860	300 560 670	40, 70 85, 140 245, 330 390	30 1505	130 545 860	125 185 415 810	20-40 65, 100 150, 180 295, 530	5, 140 170 245			140 575	90 625	95 620	10-80 115 140
Cepas	≤150, 250 300, 750 1000	100, 180 300, 550 600, 900	≤100,130 200, 250 320, 400 420, 650 750		130, 250 380, 400 550, 800	140, 180 200, 300 390, 410 600, 770 1200	≤130, 200 250, 290 330, 400 500	≤140 290 410			140, 200 300, 430 580	100 620	100, 200 350, 600	≤100 130

*Tamaño del gen en la cepas: EGD-e / F2365 / Cepas procedentes de cabras y subproductos lácteos (pb).

8.3.2 Detección de mutaciones

En base a los resultados obtenidos en los ensayos de virulencia relativa en ratón, crecimiento intracelular y en el análisis de polimorfismo (PCR-RFLP) en ocho genes que intervienen en la virulencia de *L. monocytogenes*, fueron seleccionados los genes *InIA*, *InIB* y *actA* para llevar a cabo el análisis de su secuencia. Se realizó la secuenciación de ≈1550 bases de cada gen seleccionado, lo que representa el 66, 81 y 83% de los genes respectivamente, para ello se utilizaron los iniciadores descritos en la tabla 2. Comparando las secuencias obtenidas con las de los respectivos genes de la cepa patógena EGD-e, del gen *inIA* fue secuenciada su posición 139 a 898 y 1609 a 2410 (figuras 18 y 19), en el caso del gen *inIB* la posición 40 a 797 y 1033 a 1863 (figuras 20 y 21), y con respecto al gen *actA* la base 13 a 792 y 1021 a 1834 (figuras 22 y 23). Las secuencias de nucleótidos obtenidas fueron comparadas mediante BLAST con las secuencias que se encuentran en la base de datos de la NCBI, obteniéndose que los fragmentos secuenciados presentaron homología promedio de 90.8% o superior con los respectivos genes de las cepas *L. monocytogenes* EGD-e (serotipo 1/2a), *L. monocytogenes* F2365 y *L. monocytogenes* Clip8045 (serotipo 4b, clave de acceso a Gen Bank FM242711), mostrando en general una homología ligeramente superior con las dos cepas de serotipo 4b (Tabla 8).

Empleando el software Bio Edit Sequence Alignment Editor, se realizaron alineamientos múltiples con las secuencias de los genes *inIA*, *inIB* y *actA* obtenidas en este trabajo y las de las cepas *L. monocytogenes* F2365, Clip80459 y EGD-e obtenidas de la base de datos de la NCBI, los resultados son mostrados en las figuras 12 a la 17. Fueron encontradas diversas variaciones en las secuencias incluyendo sustituciones, inserciones y deleciones, entre las cepas procedentes de cabras y derivados lácteos, y las cepas *L. monocytogenes* F2365, Clip 80459 y EGD-e. La variación de las secuencias se encuentra resumida en la tabla 9. En los 3 genes secuenciados se presentaron mayor número de sustituciones en el extremo 3', en los genes *inIB* y *actA*, y en las cepas QC1 y QC3. Las deleciones e inserciones se presentaron con mayor frecuencia en el gen *actA* y en las cepas QC1 y QC3.

Tabla 8. Homología observada en la secuencia de los genes *inIA*, *inIB* y *actA* entre las cepas de *L. monocytogenes* evaluadas y las cepas *L. monocytogenes* EGD-e (serotipo 1/2a), *L. monocytogenes* F2365 y *L. monocytogenes* Clip80459 (ambas serotipo 4b).

Cepas	Homología (%)								
	<i>InIA</i>			<i>inIB</i>			<i>actA</i>		
	EGD-e	F2365	Clip 80459	EGD-e	F2365	Clip 80459	EGD-e	F2365	Clip 80459
	LMC2	96	99	98	91	96	97	92	98
AC1	94	96	96	91	96	97	93	97	97
AC2	95	97	97	90	96	97	88	93	93
AC3	94	97	97	93	93	94	93	97	97
MFC1	95	97	97	91	97	97	92	98	97
MFC2	95	98	98	91	98	97	91	96	96
QC1	93	95	94	90	96	97	88	93	92
QC2	96	97	96	91	97	98	91	97	97
QC3	93	95	94	91	97	98	85	89	89
QC4	95	98	98	91	97	98	94	99	99
QC5	94	97	96	91	97	96	92	97	97
X	94.5	96.9	96.5	91.0	96.4	96.9	90.8	95.8	95.6

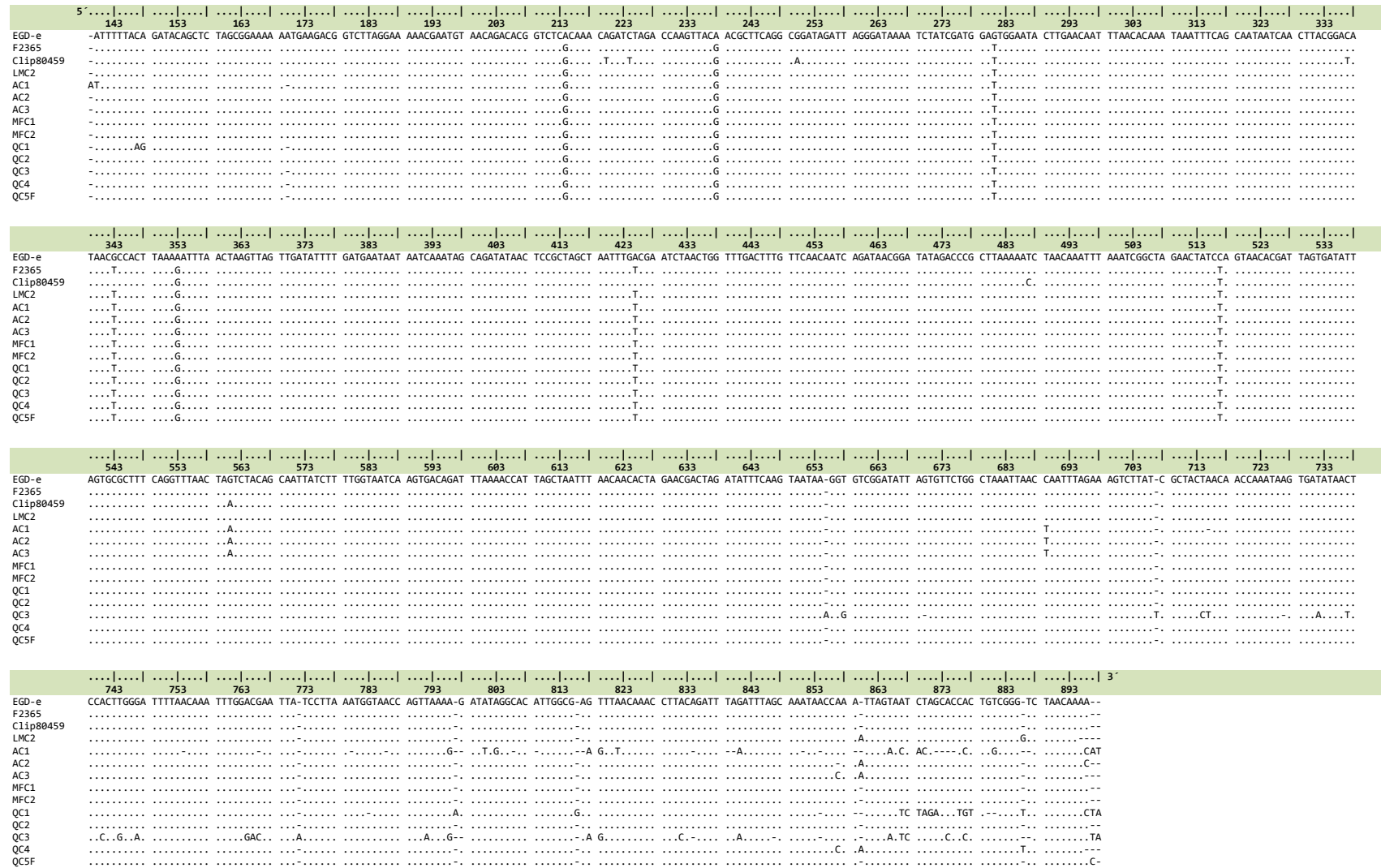


Figura 18. Alineamiento del gen *inlA* de las cepas de *L. monocytogenes* evaluadas respecto a la cepa *L. monocytogenes* EGD-e, posición 139 a 898.

		1613	1623	1633	1643	1653	1663	1673	1683	1693	1703	1713	1723	1733	1743	1753	1763	1773	1783	1793	1803
EGD-e	GATGCCCAA	CAGGCGGAAC	-TAAATGGAA	TTTCAGTAGC	GATAAAATGC	CGAC-AAATG	ACATCAATTT	AT-ATGCA-C	AATTTAGTAT	TAACAGCTAC	ACA-GCAACC	TTTGATAATG	ACGGT-GTAA	CAACATCTCA	AACAGTAGAT	TATCAAGGCT	TGTTACAAGA	ACCTACGGCA	CCAAACAAAG	AAGTTATAC	
F2365C.....G.....G.....G.....G.....G.....G.....G.....G.....G.....G.....G.....G.....G.....G.....G.....G.....G.....G.....G.....	
C1ip80459C.....G.....G.....G.....G.....G.....G.....G.....G.....G.....G.....G.....G.....G.....G.....G.....G.....G.....G.....G.....	
LMC2C.....G.....G.....G.....G.....G.....G.....G.....G.....G.....G.....G.....G.....G.....G.....G.....G.....G.....G.....G.....	
AC1C.....G.....G.....G.....G.....G.....G.....G.....G.....G.....G.....G.....G.....G.....G.....G.....G.....G.....G.....G.....	
AC2C.....G.....G.....G.....G.....G.....G.....G.....G.....G.....G.....G.....G.....G.....G.....G.....G.....G.....G.....G.....	
AC3C.....G.....G.....G.....G.....G.....G.....G.....G.....G.....G.....G.....G.....G.....G.....G.....G.....G.....G.....G.....	
MFC1C.....G.....G.....G.....G.....G.....G.....G.....G.....G.....G.....G.....G.....G.....G.....G.....G.....G.....G.....G.....	
MFC2C.....G.....G.....G.....G.....G.....G.....G.....G.....G.....G.....G.....G.....G.....G.....G.....G.....G.....G.....G.....	
QC1C.....G.....G.....G.....G.....G.....G.....G.....G.....G.....G.....G.....G.....G.....G.....G.....G.....G.....G.....G.....	
QC2C.....G.....G.....G.....G.....G.....G.....G.....G.....G.....G.....G.....G.....G.....G.....G.....G.....G.....G.....G.....	
QC3C.....G.....G.....G.....G.....G.....G.....G.....G.....G.....G.....G.....G.....G.....G.....G.....G.....G.....G.....G.....	
QC4C.....G.....G.....G.....G.....G.....G.....G.....G.....G.....G.....G.....G.....G.....G.....G.....G.....G.....G.....G.....	
QC5	...TG.....	...T.....	...G.....	...G.....	...G.....	...T...GG.	...A.....	...T.....	...G.....	...T.....	...G.....	...T.....	...G.....	...T.....	...G.....	...T.....	...G.....	...T.....	...G.....	...T.....	

		1813	1823	1833	1843	1853	1863	1873	1883	1893	1903	1913	1923	1933	1943	1953	1963	1973	1983	1993	2003
EGD-e	TTTTAAAGGC	TGATGATGAC	CAAAAACG	TGGTGACAAG	TGGGATTTCT	CAACTAGCAA	AATGCTGCT	AAAAAATCA	CCTT-ATATG	CCCAATATAG	CGCCAATAGC	TATACAGCAA	CGTTTGATGT	TGATGGAAAA	TCACAGACTC	AAGCAGTAGA	CTATCAAGGA	CTTCTAAAG	AACCAAAGGC	ACCAACGAAA	
F2365	...C.....	...T.....	...T.....	...T.....	...T.....	...T.....	...T.....	...T.....	...T.....	...T.....	...T.....	...T.....	...T.....	...T.....	...T.....	...T.....	...T.....	...T.....	...T.....	...T.....	
C1ip80459	...C.....	...T.....	...T.....	...T.....	...T.....	...T.....	...T.....	...T.....	...T.....	...T.....	...T.....	...T.....	...T.....	...T.....	...T.....	...T.....	...T.....	...T.....	...T.....	...T.....	
LMC2	...C.....	...T.....	...T.....	...T.....	...T.....	...T.....	...T.....	...T.....	...T.....	...T.....	...T.....	...T.....	...T.....	...T.....	...T.....	...T.....	...T.....	...T.....	...T.....	...T.....	
AC1	...C.....	...T.....	...T.....	...T.....	...T.....	...T.....	...T.....	...T.....	...T.....	...T.....	...T.....	...T.....	...T.....	...T.....	...T.....	...T.....	...T.....	...T.....	...T.....	...T.....	
AC2	...C.....	...T.....	...T.....	...T.....	...T.....	...T.....	...T.....	...T.....	...T.....	...T.....	...T.....	...T.....	...T.....	...T.....	...T.....	...T.....	...T.....	...T.....	...T.....	...T.....	
AC3	...C.....	...T.....	...T.....	...T.....	...T.....	...T.....	...T.....	...T.....	...T.....	...T.....	...T.....	...T.....	...T.....	...T.....	...T.....	...T.....	...T.....	...T.....	...T.....	...T.....	
MFC1	...C.....	...T.....	...T.....	...T.....	...T.....	...T.....	...T.....	...T.....	...T.....	...T.....	...T.....	...T.....	...T.....	...T.....	...T.....	...T.....	...T.....	...T.....	...T.....	...T.....	
MFC2	...C.....	...T.....	...T.....	...T.....	...T.....	...T.....	...T.....	...T.....	...T.....	...T.....	...T.....	...T.....	...T.....	...T.....	...T.....	...T.....	...T.....	...T.....	...T.....	...T.....	
QC1	...C.....	...T.....	...T.....	...T.....	...T.....	...T.....	...T.....	...T.....	...T.....	...T.....	...T.....	...T.....	...T.....	...T.....	...T.....	...T.....	...T.....	...T.....	...T.....	...T.....	
QC2	...C.....	...T.....	...T.....	...T.....	...T.....	...T.....	...T.....	...T.....	...T.....	...T.....	...T.....	...T.....	...T.....	...T.....	...T.....	...T.....	...T.....	...T.....	...T.....	...T.....	
QC3	...C.....	...T.....	...T.....	...T.....	...T.....	...T.....	...T.....	...T.....	...T.....	...T.....	...T.....	...T.....	...T.....	...T.....	...T.....	...T.....	...T.....	...T.....	...T.....	...T.....	
QC4	...C.....	...T.....	...T.....	...T.....	...T.....	...T.....	...T.....	...T.....	...T.....	...T.....	...T.....	...T.....	...T.....	...T.....	...T.....	...T.....	...T.....	...T.....	...T.....	...T.....	
QC5	...C.....	...T.....	...T.....	...T.....	...T.....	...T.....	...T.....	...T.....	...T.....	...T.....	...T.....	...T.....	...T.....	...T.....	...T.....	...T.....	...T.....	...T.....	...T.....	...T.....	

		2013	2023	2033	2043	2053	2063	2073	2083	2093	2103	2113	2123	2133	2143	2153	2163	2173	2183	2193	2203
EGD-e	GCCGGATATA	CTTTCAAAGG	CTGGTATGAC	GAAAAACAG	ATGGGAAAA	ATGGGATTTT	GCGACGGATA	AAATGCCAGC	AAATGACATT	ACGCTGTACG	CTCAATTAC	GA AAAATCT	GTGGCACCAC	CAACAAGTGG	AGGGACACA	CGCCCTACAA	CAATAACGG	CGGGAACTACT	ACACCACCTT	CGCAATAT	
F2365T.....T.....T.....T.....T.....T.....T.....T.....T.....T.....T.....T.....T.....T.....T.....T.....T.....T.....T.....T.....	
C1ip80459T.....T.....T.....T.....T.....T.....T.....T.....T.....T.....T.....T.....T.....T.....T.....T.....T.....T.....T.....T.....	
LMC2T.....T.....T.....T.....T.....T.....T.....T.....T.....T.....T.....T.....T.....T.....T.....T.....T.....T.....T.....T.....	
AC1T.....T.....T.....T.....T.....T.....T.....T.....T.....T.....T.....T.....T.....T.....T.....T.....T.....T.....T.....T.....	
AC2T.....T.....T.....T.....T.....T.....T.....T.....T.....T.....T.....T.....T.....T.....T.....T.....T.....T.....T.....T.....	
AC3T.....T.....T.....T.....T.....T.....T.....T.....T.....T.....T.....T.....T.....T.....T.....T.....T.....T.....T.....T.....	
MFC1T.....T.....T.....T.....T.....T.....T.....T.....T.....T.....T.....T.....T.....T.....T.....T.....T.....T.....T.....T.....	
MFC2T.....T.....T.....T.....T.....T.....T.....T.....T.....T.....T.....T.....T.....T.....T.....T.....T.....T.....T.....T.....	
QC1T.....T.....T.....T.....T.....T.....T.....T.....T.....T.....T.....T.....T.....T.....T.....T.....T.....T.....T.....T.....	
QC2T.....T.....T.....T.....T.....T.....T.....T.....T.....T.....T.....T.....T.....T.....T.....T.....T.....T.....T.....T.....	
QC3	...A.AT...A...T.....T.....T.....T.....T.....T.....T.....T.....T.....T.....T.....T.....T.....T.....T.....T.....T.....T.....T.....	
QC4T.....T.....T.....T.....T.....T.....T.....T.....T.....T.....T.....T.....T.....T.....T.....T.....T.....T.....T.....T.....	
QC5T.....T.....T.....T.....T.....T.....T.....T.....T.....T.....T.....T.....T.....T.....T.....T.....T.....T.....T.....T.....	

		2213	2223	2233	2243	2253	2263	2273	2283	2293	2303	2313	2323	2333	2343	2353	2363	2373	2383	2393	2403
EGD-e	ACCTGGAAGC	GACACATCTA	ACACATCAAC	TGGGAATTCA	GCCAGCACAA	CAAGTACAAT	GAACGCTTAT	GACCCTTATA	ATTCAAAGA	AGCTTCACCTC	CCTACAAGTG	GCGATAGCGA	TAATGCGCTC	TACCTTTTGT	TAGGGTTATT	AGCAGTAGGA	ACTGCAATGG	CTCTTACTAA	AAAAGCACGT	GCTAGTAATAG	
F2365A.....T.....T.....T.....T.....T.....T.....T.....T.....T.....T.....T.....T.....T.....T.....T.....T.....T.....T.....T.....	
C1ip80459A.....T.....T.....T.....T.....T.....T.....T.....T.....T.....T.....T.....T.....T.....T.....T.....T.....T.....T.....T.....	
LMC2A.....T.....T.....T.....T.....T.....T.....T.....T.....T.....T.....T.....T.....T.....T.....T.....T.....T.....T.....T.....	
AC1A.....T.....T.....T.....T.....T.....T.....T.....T.....T.....T.....T.....T.....T.....T.....T.....T.....T.....T.....T.....	
AC2A.....T.....T.....T.....T.....T.....T.....T.....T.....T.....T.....T.....T.....T.....T.....T.....T.....T.....T.....T.....	
AC3A.....T.....T.....T.....T.....T.....T.....T.....T.....T.....T.....T.....T.....T.....T.....T.....T.....T.....T.....T.....	
MFC1A.....T.....T.....T.....T.....T.....T.....T.....T.....T.....T.....T.....T.....T.....T.....T.....T.....T.....T.....T.....	
MFC2A.....T.....T.....T.....T.....T.....T.....T.....T.....T.....T.....T.....T.....T.....T.....T.....T.....T.....T.....T.....	
QC1A.....T.....T.....T.....T.....T.....T.....T.....T.....T.....T.....T.....T.....T.....T.....T.....T.....T.....T.....T.....	
QC2A.....T.....T.....T.....T.....T.....T.....T.....T.....T.....T.....T.....T.....T.....T.....T.....T.....T.....T.....T.....	
QC3A.....T.....T.....T.....T.....T.....T.....T.....T.....T.....T.....T.....T.....T.....T.....T.....T.....T.....T.....T.....	
QC4A.....T.....T.....T.....T.....T.....T.....T.....T.....T.....T.....T.....T.....T.....T.....T.....T.....T.....T.....T.....	
QC5A.....T.....T.....T.....T.....T.....T.....T.....T.....T.....T.....T.....T.....T.....T.....T.....T.....T.....T.....T.....	

Figura 19. Alineamiento del gen *inIA* de las cepas de *L. monocytogenes* evaluadas respecto a la cepa *L. monocytogenes* EGD-e, posición 1609 a 2410.

	5'																										
EGD-e	1037	1047	1057	1067	1077	1087	1097	1107	1117	1127	1137	1147	1157	1167	1177	1187	1197	1207	1217	1227							
F2365	ACTGCACCTA	AACCTCCGAC	TAAACAAGGC	TATGTTTTT	AAAGATGGT	AT-ACTGAAA	AAATGCTGG	GCATGAG-TG	GAATTTTAA	ACGGATTATA	TGTCGG-AA	ATGATTTTAC	TTTGACGCA	GTATTTAAG	CGGAACGAC	CG-AAAAAGC	AGTCAACTTA	ACCCTATG	TCAA-TATA	TTCCGGG-A							
C11p80459							
LMC2							
AC1							
AC2							
AC3	.TATGT							
MFC1							
MFC2							
QC1							
QC2							
QC3							
QC4							
QC5							
<hr/>																											
EGD-e	ATGCAGGCAT CTACAAACTT -CCACGAGAA G-ATAACTCG CTT-AAACAA GGAACCTAG CC-TCCGACC GCTGTAAAG TCTAACTGT -GATAGAGAA GCCCGAAA-T GCGCGAAAT TATGG-TACA GGTTAAAAA TATTGGCTGG ACTAAA-GCG GAAAACCTTT CCTTAGCCG ATACGATAAA ATGGAATATG																										
F2365																										
C11p80459																										
LMC2																										
AC1																										
AC2																										
AC3																										
MFC1																										
MFC2																										
QC1																										
QC2																										
QC3																										
QC4																										
QC5																										
<hr/>																											
EGD-e	1437	1447	1457	1467	1477	1487	1497	1507	1517	1527	1537	1547	1557	1567	1577	1587	1597	1607	1617	1627							
F2365	ACAAAGGGT	TACCGTTAT	GCAAGAGTGA	GAATGCGTC	TGGAAATTC	GTTTGACAA	AACCTTACAA	CACAGCCGAG	GCTAAACAG	TGAATAAGT	ATCGGCTAC	CAAGGATAA	ATATGCGTAT	CTTGCGCGAA	GCCAAAACAC	CAATTACTAC	ATGGTATCAA	TTTAGCATG	GTGGTAAAGT	AATTGGTTGG							
C11p80459							
LMC2							
AC1							
AC2							
AC3							
MFC1							
MFC2							
QC1							
QC2							
QC3							
QC4							
QC5							
<hr/>																											
EGD-e	GTCGATACCC GAGCACTTAA CACATCTTAC AAACAAGCA TGGAAAGCC AACCCGTTA ACTCGTTATG TCAGCGCAA TAAAGTGGC GAATCTACT ATAAAGTCCC GGTAGCAGAT AATCCAGTCA AAAGGGTAC TTTAGCCAAG TATAAAAATC AAAAGTAAAT TGTTGATGTT CAAGCAACA TCGAAGGTC																										
F2365																										
C11p80459																										
LMC2																										
AC1																										
AC2																										
AC3																										
MFC1																										
MFC2																										
QC1																										
QC2																										
QC3																										
QC4																										
QC5																										
<hr/>																											
EGD-e	1837	1847	1857																							3'
F2365	ACTTTGGTAC	CGAATAAGGA	CTAGTTCCAC																							
C11p80459																							
LMC2																							
AC1																							
AC2																							
AC3																							
MFC1																							
MFC2																							
QC1																							
QC2																							
QC3																							
QC4																							
QC5																							

Figura 21. Alineamiento del gen *inlB* de las cepas de *L. monocytogenes* evaluadas respecto a la cepa *L. monocytogenes* EGD-e, posición 1033 a 1863.

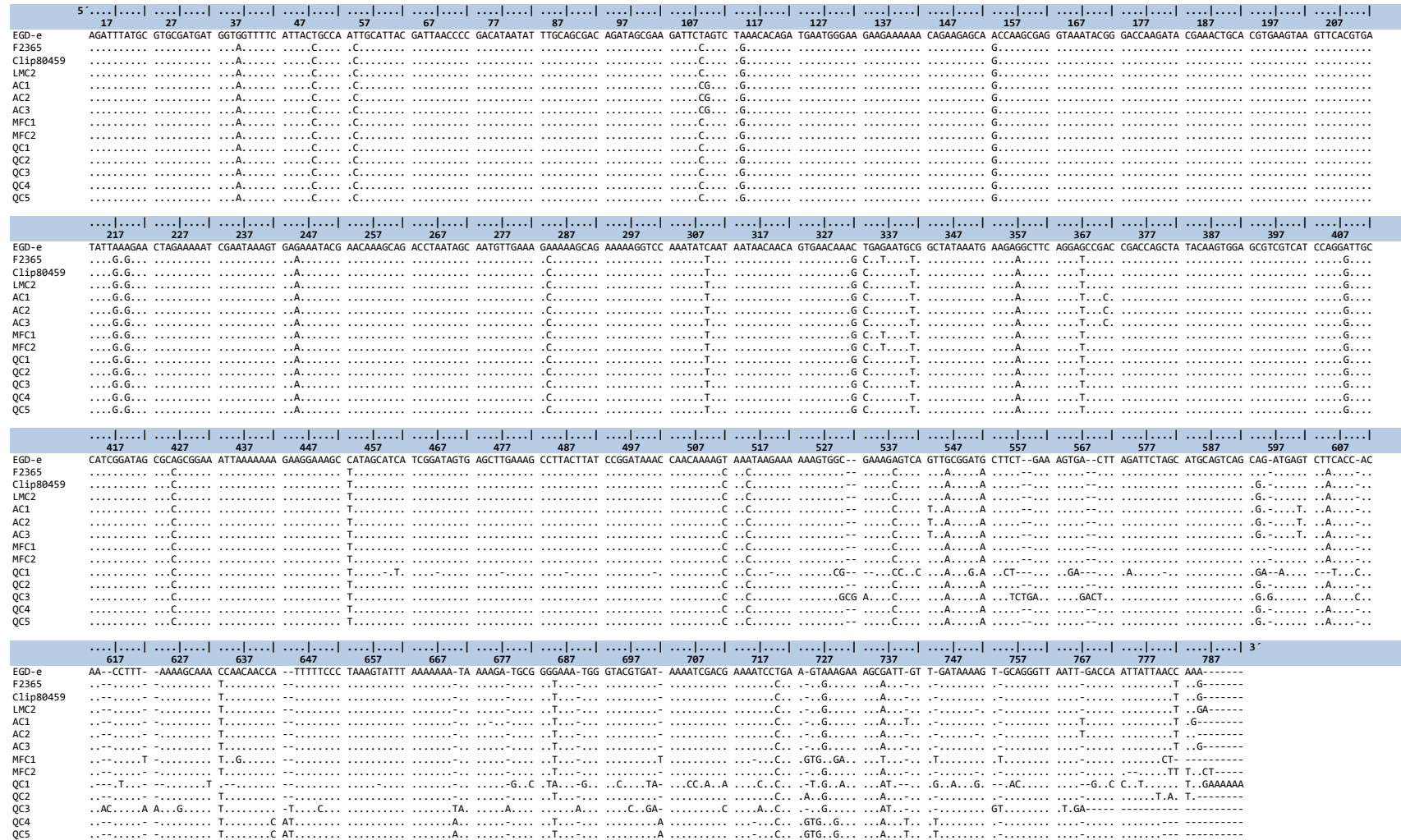


Figura 22. Alineamiento del gen *actA* de las cepas de *L. monocytogenes* evaluadas respecto a la cepa *L. monocytogenes* EGD-e, posición 13 a 792.

	5'	1025	1035	1045	1055	1065	1075	1085	1095	1105	1115	1125	1135	1145	1155	1165	1175	1185	1195	1205	1215	1225	
EGD-e		---AATTTCT	CTGATTTCCC	A---CCATC	CCACAGAA	AGAG---GTGA	ACGGAGAGG	CGGTAGACCA	ACATCTGAAG	AA-TTTAGTT	CGTGAATAG	TGCTGATTTT	ACAGATGACG	AAACAGCGCA	GACACAGAA	GAAGAAATTG	ATCGCTAGC	TGATTTAAGA	GATAGAGGAA	CAGG---AAAC			
F2365		-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
C11p80459		-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
LMC2		-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
AC1		-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
AC2		-----	TCTGA	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
MFC1		-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
MFC2		-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
QC1		GGATGCTATT	AGG.G.A.TA	TCC...G.AA	T-T.TGT.	.C.TGC.C.	GA.G....	CG.A...T	.T...G	-.T..	-.T..	-.T..	-.T..	-.T..	-.T..	-.T..	-.T..	-.T..	-.T..	-.T..	-.T..	-.T..	-.T..
QC2		-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
QC3		-----	CGA	GAGGC.A.A	.GC..AG.AA	.TCT.TG.	T.AC.TGC..C	.GA.GAAGAG	TGAC.GAGA.	T...T	-.T..	-.T..	-.T..	-.T..	-.T..	-.T..	-.T..	-.T..	-.T..	-.T..	-.T..	-.T..	-.T..
QC4		-----	-----	CA..A	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
QC5		-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----

	1225	1235	1245	1255	1265	1275	1285	1295	1305	1315	1325	1335	1345	1355	1365	1375	1385	1395	1405	1415		
EGD-e	ACTCAAGAAA	TGCGGTTTT	TTACCATTAA	ATCCGTTGCG	TAGCAGCCCG	GTTCCTTGT	TAAGTCCAAA	GGTATCGAAA	ATAAGCGCAC	CGGCCTGAT	AAGTGACAT	AACTAAAAAA	ACGGCATTTA	AGAATCCATC	ACAGCCATTA	AATGTGTTTA	ATAAAAAAAC	TACAAGGAAA	ACAGTGACTA	AAAAAC---CAA		
F2365	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
C11p80459	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
LMC2	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
AC1	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
AC2	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
AC3	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
MFC1	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
MFC2	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
QC1	C.....	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
QC2	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
QC3	C.A.C..G.	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	A.GTC..G.	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
QC4	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
QC5	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----

	1425	1435	1445	1455	1465	1475	1485	1495	1505	1515	1525	1535	1545	1555	1565	1575	1585	1595	1605	1615		
EGD-e	CCCTGTAAA	GACCCAGCA	AACTAGCAG	AACCTTCCTGC	CACAAAACCA	CAAGAAACCG	TACTTAGGGA	AAATAAAACA	CCCTTTATAG	AAAAACAAGC	AGAAACAAC	AAGCAGTC-A	ATTAATATGC	CGAGCTACC	AGTAATCCAA	AAAGAAGCTA	CAGAGAGCGA	TAAGAGGAAA	ATGAAACCAC	AAACCAGGGA		
F2365	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
C11p80459	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
LMC2	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
AC1	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
AC2	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
AC3	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
MFC1	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
MFC2	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
QC1	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
QC2	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
QC3	-----	GGG.TT	GGG.C	AG...C	CC...T	AT.CAGG	.GGG	.C...G	.AT.G	G...G	.G	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
QC4	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
QC5	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----

	1625	1635	1645	1655	1665	1675	1685	1695	1705	1715	1725	1735	1745	1755	1765	1775	1785	1795	1805	1815		
EGD-e	AAAAATGGTA	GAGGAAGCG	AATCAGCTAA	TAAGCGAAC	GGAAAAAAT	GTTCCTCTGG	CATTAGAGAA	GGAAAAACTAA	TTGCTAAAG	TGCAGAGAC	GAAAAAGGA	AGGAAGAAC	AGGGAACAT	ACGACGTAA	TTCCTGCAAT	GTAGCTATT	GGCGTGTCT	CTTTAGGGGC	GTTTTACAA	ATTATTCAAT		
F2365	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
C11p80459	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
LMC2	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
AC1	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
AC2	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
AC3	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
MFC1	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
MFC2	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
QC1	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
QC2	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
QC3	-----	GG.T.G	-----	-----	CC...T.T	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
QC4	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
QC5	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----

	1825	1835	1845	1855	1865	1875	1885	1895	1905	1915	1925	1935	1945	1955	1965	1975	1985	1995	2005			
EGD-e	TAAGAAAAA	TAAT																				
F2365	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	
C11p80459	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
LMC2	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
AC1	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
AC2	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
AC3	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
MFC1	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
MFC2	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
QC1	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
QC2	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
QC3	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
QC4	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
QC5	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----

Figura 23. Alineamiento del gen *actA* de las cepas de *L. monocytogenes* evaluadas respecto a la cepa *L. monocytogenes* EGD-e, posición 1021 a 1834.

Tabla 9. Variaciones en la secuencia de nucleótidos detectadas en los genes *inIA*, *inIB* y *actA* de las cepas de *L. monocytogenes* evaluadas, respecto a la cepa *L. monocytogenes* EGD-e.

Cepa	Sustitución de nucleótidos			Delección			Inserción			Codones de terminación prematuros		
	<i>inIA</i>	<i>inIB</i>	<i>actA</i>	<i>inIA</i>	<i>inIB</i>	<i>actA</i>	<i>inIA</i>	<i>inIB</i>	<i>actA</i>	<i>inIA</i>	<i>inIB</i>	<i>actA</i>
F2365	41	128	97	0	3	1	0	3	1	0	0	0
Clip80459	46	108	96	0	1	0	0	1	0	0	0	0
LMC2	42	131	97	2	1	1	4	3	0	3	1	21
AC1	58	132	96	20	1	1	1	0	3	32	16	3
AC2	46	131	100	1	0	1	0	2	2	0	17	2
AC3	45	157	96	0	15	1	0	12	0	2	29	5
MFC1	41	141	101	0	6	3	0	2	6	0	20	9
MFC2	41	140	98	0	1	1	0	2	1	0	3	3
QC1	61	140	171	5	2	55	3	2	2	40	36	21
QC2	40	132	98	4	4	1	0	1	1	12	1	23
QC3	66	133	257	8	2	12	4	3	24	40	29	12
QC4	43	117	101	2	0	3	0	2	7	50	16	23
QC5	47	127	102	6	8	0	4	1	6	53	45	18

8.4 TIPIFICACIÓN MOLECULAR.

De las 12 cepas evaluadas, fueron obtenidos ocho grupos en base a los patrones de restricción generados por las endonucleasas *Apa* I y *Asc* I (figuras 24 y 25). Con la matriz de datos binaria construida a partir de la presencia y ausencia de los marcadores y con la ayuda del software NTSYSpc 2.0 se construyeron los dendrogramas (Figuras 26 y 27). En ambos dendrogramas derivados de las endonucleasas utilizadas se obtuvieron 9 grupos o ramas con valores de similitud que van desde 0.37 hasta 1. Ambas endonucleasas distinguieron entre las cepas de acuerdo a su fuente y las tres cepas de materia fecal; sin embargo las cepas procedentes de alimento de cabra y de queso fueron divididas en dos o tres grupos por cada fuente. En ambos dendrogramas dos ramas agrupan a dos cepas de alimento de cabra (AC1 y AC2) y la cepa control LMC2 con la tercera cepa de alimento de cabra (AC3), con un índice de similitud de 1 en las cepas presentes en cada grupo y de 0.90-0.95 entre los grupos. Asimismo, la endonucleasa *Asc* I asocia en un mismo grupo a la cepa obtenida de leche con una de materia fecal (MFC1) y a la cepa QC4 procedente de queso con una de materia fecal (MFC2). La cepa de leche (LC1) produjo un perfil único con la enzima *Apa* I, igualmente la cepa control ATCC 43249 y la cepa de materia fecal MFC3 con ambas endonucleasas.

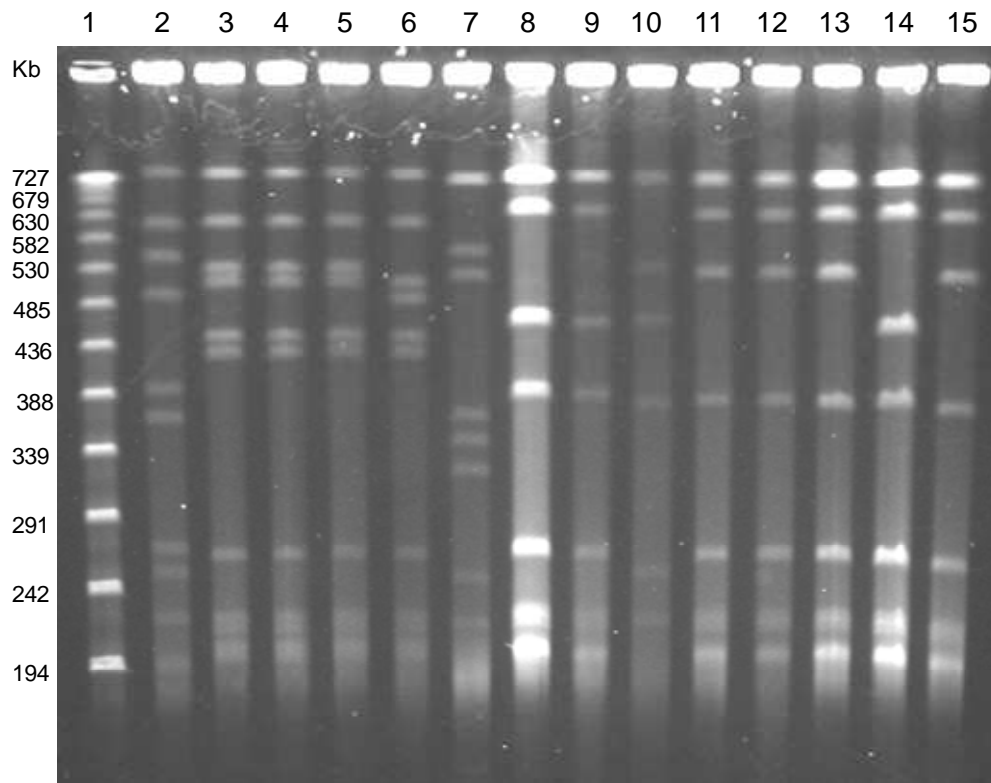


Figura 24. Electroforesis de campo eléctrico pulsado (PFGE), patrones electroforéticos obtenidos por la digestión del ADN genómico de las cepas de *Listeria monocytogenes* evaluadas con la endonucleasa *Asc* I. Carril 1-Marcador de tamaño (Lambda Ladder PFG Marker), 2-LMC1, 3-LMC2, 4-AC1, 5-AC2, 6-AC3, 7-LC1, 8-MFC1, 9-MFC2, 10-MFC3, 11-QC1, 12-QC2, 13-QC3, 14-QC4, 15-QC5.

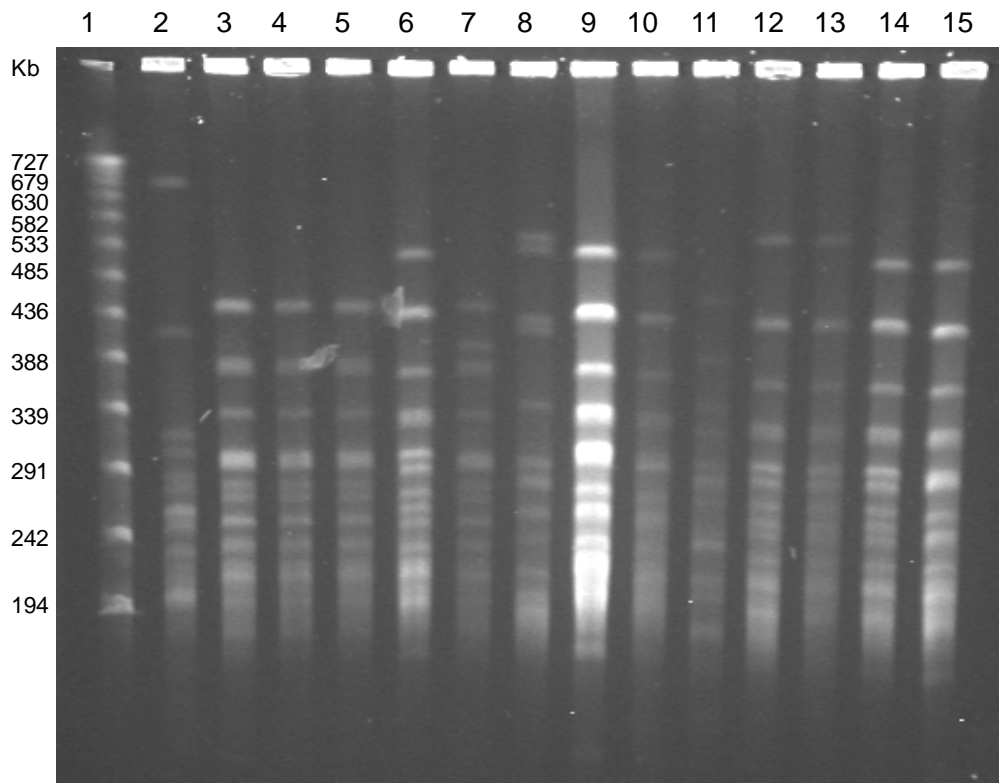


Figura 25. Electroforesis de campo eléctrico pulsado (PFGE), patrones electroforéticos obtenidos por la digestión del ADN genómico de las cepas de *Listeria monocytogenes* evaluadas con la endonucleasa *Apa* I. Carril 1-Marcador de tamaño (Lambda Ladder PFG Marker), 2-LMC1, 3-LMC2, 4-AC1, 5-AC2, 6-QC4, 7-AC3, 8-LC1, 9-MFC1, 10-MFC2, 11-MFC3, 12-QC1, 12-QC2, 14-QC3, 15-QC5.

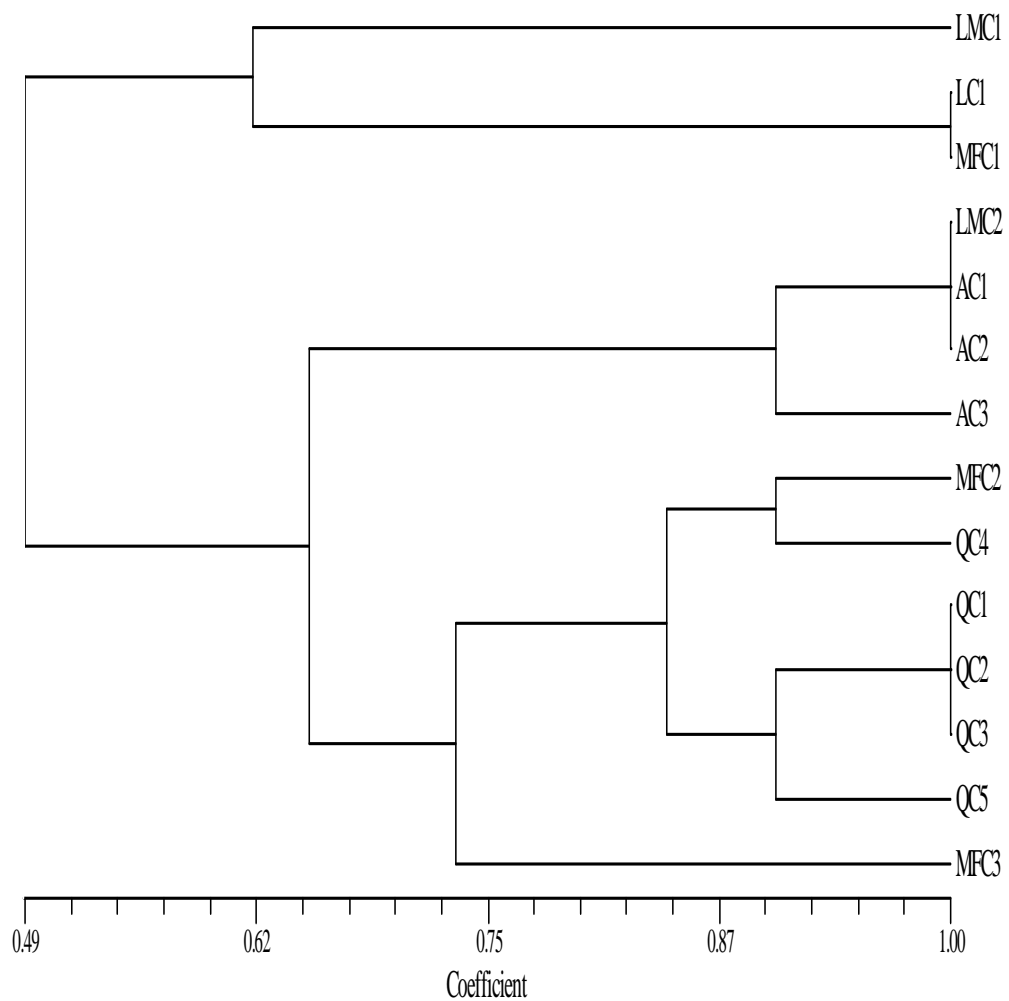


Figura 26. Dendrograma que representa la similitud entre las cepas de *Listeria monocytogenes*, construido con la matriz elaborada a partir de los patrones de restricción generados con la endonucleasa *Asc I* y electroforesis de campo eléctrico pulsado (PFGE), usando el método de agrupamiento UPGMA. Los coeficientes de similitud son mostrados abajo del dendrograma y el origen de las cepas se muestra en la tabla 1.

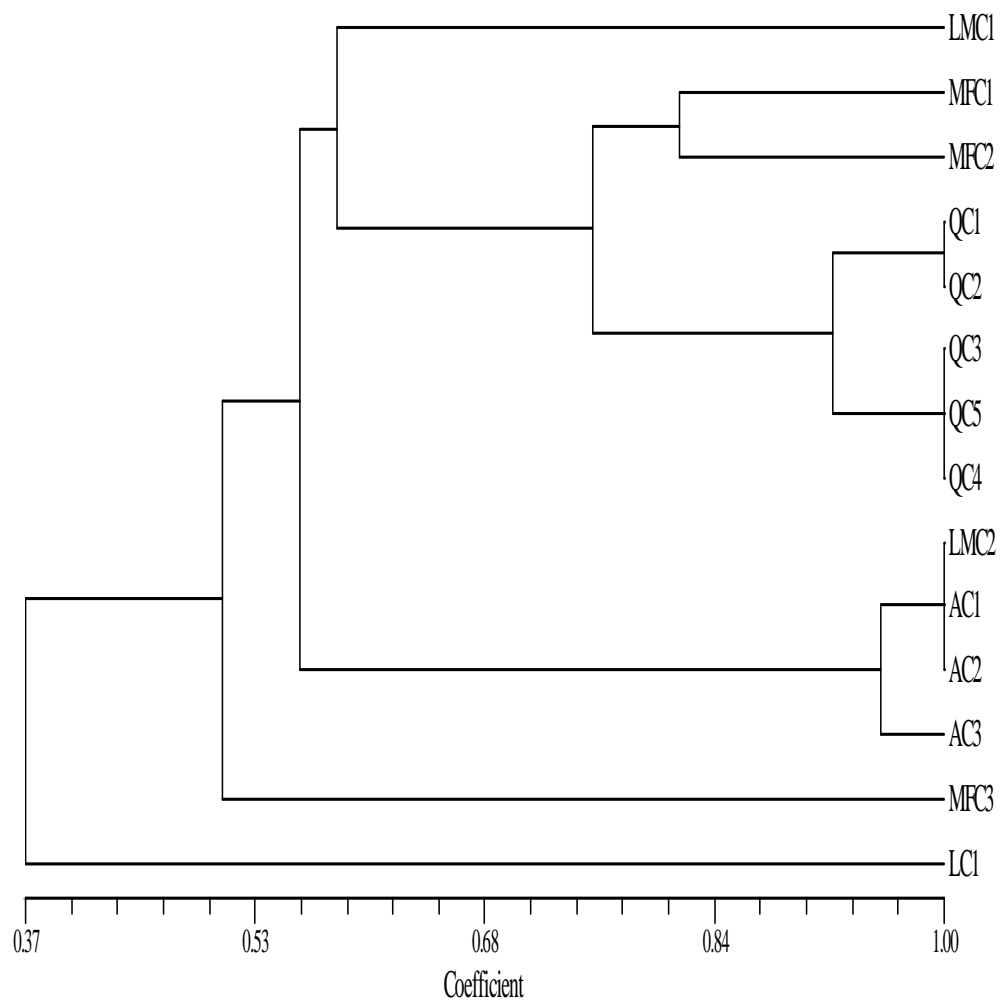


Figura 27. Dendrograma que representa la similitud entre las cepas de *Listeria monocytogenes*, construido con la matriz elaborada a partir de los patrones de restricción generados con la endonucleasa *Apa* I y electroforesis de campo eléctrico pulsado (PFGE), usando el método de agrupamiento UPGMA. Los coeficientes de similitud son mostrados abajo del dendrograma y el origen de las cepas se muestra en la tabla 1.

9. DISCUSIÓN

Actualmente las agencias regulatorias de alimentos consideran todos los aislados de *L. monocytogenes* igualmente virulentos. Sin embargo en diversos estudios se ha mostrado una amplia variación en la virulencia de este patógeno, incluso dentro del mismo serotipo (Van-Langendonck, 1998; Jaradat and Bhunia 2003; Kim *et al.*, 2004; Teomin *et al.*, 2008; Nightingale *et al.*, 2008). Diversas publicaciones han reportado que 10-20% de las cepas de *L. monocytogenes* aisladas en la industria alimentaria muestran virulencia baja o nula en los ensayos con animales o células, y hasta un 50% del total de las cepas aisladas podrían tener una virulencia baja debido a mutaciones en determinados genes de virulencia (Roche *et al.*, 2009a, b; Roche *et al.*, 2012). Las cepas serotipo 4b, aunque no son las más prevalentes en alimentos, han sido implicadas en gran parte de los brotes de listeriosis. Un restringido número de estas cepas (4b) representando diferentes genotipos, es responsable de la mayoría de dichos brotes en humanos en todo el mundo ($\geq 50\%$), sugiriendo que ciertos clones de la bacteria podrían ser más patogénicos (Barbour *et al.*, 2001; Kathariou, 2002; Czuprynski *et al.*, 2002; Kuhn *et al.*, 2008). En este estudio fue evaluada la virulencia de 12 cepas de *L. monocytogenes* serotipo 4b procedentes de cabras y subproductos lácteos.

Se evaluó la virulencia relativa de las cepas en ratones BALB/c, para ello fueron inoculados por la vía intravenosa o intragástrica. La determinación de la virulencia relativa, la cual se expresa como porcentaje de letalidad, representa una alternativa para los ensayos de virulencia en ratón ya que requiere menor número de animales por ensayo, porque es independiente de las ufc (Liu, 2004). Los resultados mostraron que las cepas de *L. monocytogenes* inoculadas en ratones BALB/c variaron en el porcentaje de letalidad que causan y en su habilidad para crecer en el bazo de ratón. Se encontró que la infectividad de algunas cepas fue diferente cuando se comparó la vía de inoculación. El 50% de las cepas no mostró virulencia en los ratones independientemente de la vía de inoculación (iv o ig) y no lograron infectar el bazo de los ratones después de la inoculación intragástrica. Se ha reportado que el porcentaje de cepas de *L. monocytogenes* no patógenas varía entre 1.6 y 90% (Van-

Langendonck, 1998). En diversos trabajos se observa que la incapacidad de ciertos aislados para infectar el bazo y en general la baja virulencia de cepas de campo, podría reflejar la mutación o ausencia de uno ó más factores de virulencia, lo cual afectaría la patogenicidad del microorganismo (Roche *et al.*, 2003; Takeuchi *et al.*, 2003; Teomín *et al.*, 2008). Aunque la cuantificación de bacteria viable en el bazo o el hígado ha provisto los resultados más consistentes en la evaluación cuantitativa de la virulencia (Manzano *et al.*, 1998; Van-Langendonck *et al.*, 1998; Barbour *et al.*, 2001; Czuprynski *et al.*, 2002; Kim *et al.*, 2004; Kushwaha *et al.*, 2010), existen trabajos que muestran una amplia variación en la infectividad en ratones, en los cuales se han obtenido conteos promedio $<3 \log_{10}$ ufc en el bazo y/o hígado de ratones inoculados por la vía intragástrica (Barbour *et al.*, 2001). En este estudio se encontró que una cepa aislada de materia fecal (MFC3) inoculada por vía intravenosa, produjo conteos en bazo semejantes a los obtenidos en ratones muertos ($7.38 \pm 7.3 \log_{10}$ ufc) sin causar muerte en los ratones. Esto podría indicar que un conteo elevado del microorganismo en el bazo de ratones inoculados por vía intravenosa, no necesariamente asegura la virulencia del mismo. Se ha observado que la evaluación de la virulencia por conteos en el bazo después de la inoculación intravenosa, podría fallar para detectar aislamientos de *L. monocytogenes* con poca infectividad para la ruta intragástrica y la mayoría crecen mejor en el bazo que en el hígado debido a la inoculación vía intravenosa, por ello se cree que la ruta de entrada podría afectar la distribución de la bacteria en dichos órganos y que el ambiente celular del bazo e hígado difiere, requiriéndose mecanismos de virulencia específicos para su crecimiento en cada uno (Barbour *et al.*, 1996; Kushwaha *et al.*, 2010).

L. monocytogenes puede entrar en el hospedero a través de la mucosa intestinal mediante la invasión directa que implica interacciones ligando-receptor específicas (InIA-E-caderina), considerada únicamente en hospederos en los que las células intestinales expresan las isoformas susceptibles de los receptores a las invasinas listerianas ó con la fagocitosis por de las células M en las placas de Peyer, la cual sucede en hospederos (entre ellos los ratones) que no expresan dichas

isoformas de los receptores (Hamon *et al.*, 2006; Kuhn *et al.*, 2008; Bonazzi *et al.*, 2009). Por ello, aunque la E-caderina de ratón no es un receptor eficiente para la internalina A de *L. monocytogenes*, diversos estudios muestran que algunas líneas de ratón como la BALB/c usada en este trabajo, son susceptibles a la infección vía intragástrica por *L. monocytogenes* (Barbour *et al.*, 2001; Jaradat *et al.*, 2003; Franciosa *et al.*, 2005; Hamon *et al.*, 2006). En un estudio donde se usaron diferentes cepas de *L. monocytogenes* reveló que en contraste con la cepas de otros serotipos, las cepas epidémicas del serotipo 4b parece que son capaces de causar infección sistémica en ratones infectados oralmente, sugiriendo que podría haber factores de virulencia serotipo-específicas (Czuprynski *et al.*, 2002; Roche *et al.*, 2008).

Un aspecto importante en la virulencia de *L. monocytogenes* es su habilidad para invadir y replicarse dentro de una amplia variedad de células eucariotas (Donaldson *et al.*, 2011). Las bacterias generalmente crecen de manera exponencial en medios enriquecidos (Zwietering *et al.*, 1990; Fakurdin *et al.*, 2011); intracelularmente, *L. monocytogenes* comienza a replicarse poco después de que escapa de la vacuola en la que fue internalizada a la célula hospedera con tiempos de generación intracelular de 40 a 60 minutos, lo cual es comparable a lo observado en caldo de cultivo enriquecido (Kuhn *et al.*, 2008). En este trabajo encontramos que las cepas de *L. monocytogenes* aisladas de cabras y sus derivados mostraron un crecimiento intracelular polinomial de segundo grado en ambas líneas celulares macrófagos J774A.1 y Caco-2. Se observó que las cepas evaluadas difieren en su habilidad para invadir ambas líneas celulares, Caco-2 y los macrófagos, aunque mostraron el mismo potencial de crecimiento dentro de las células. En general se obtuvo una invasividad y crecimiento intracelular ligeramente superior en las células epiteliales Caco-2, mostrando también mayor dispersión en los datos obtenidos respecto a las cepas evaluadas. Los resultados de crecimiento intracelular en ambas líneas celulares concuerdan con los obtenidos en otros estudios, en los que cepas de *L. monocytogenes* crecen 2-3 log₁₀ (10-12 horas) en las células Caco-2, comenzando a declinar su crecimiento hacia las 24 horas, y 1.5-3 log₁₀ (6-14 horas) en los

macrófagos J774A.1, disminuyendo su crecimiento entre 10 y 24 horas posteriores a la infección (Sun *et al.*, 1990; Smith *et al.*, 1995; Van-Langendonck *et al.*, 1998; Larsen *et al.*, 2002; Roberts *et al.*, 2005; Chatterjee *et al.*, 2006a, b).

Los resultados obtenidos en el ensayo *in vivo* usando inoculación intragástrica en ratones BALB/c no pudieron reproducirse del todo en el ensayo *in vitro*. A pesar de que todas las cepas evaluadas lograron invadir las células Caco-2, no todas consiguieron invadir el bazo después de la inoculación por vía intragástrica. Estos resultados concuerdan con lo encontrado en otros estudios indicando que la virulencia no solamente está determinada por su capacidad de invasión y crecimiento intracelular sino también por su habilidad para crecer *in vivo* (Barbour *et al.*, 2001; Larsen *et al.*, 2002; Roche *et al.*, 2005). En diversos trabajos, las cepas virulentas o avirulentas de *L. monocytogenes* muestran variaciones mínimas en su habilidad de adherirse, entrar o crecer intracelularmente en líneas celulares tales como L929, Caco-2 o macrófagos J774 (Chakraborty *et al.*, 1994; Larsen *et al.*, 2002; Werbrouck *et al.*, 2006; Yamada *et al.*, 2006). La habilidad de *L. monocytogenes* para sobrevivir en el tracto gastrointestinal e invadir a través de la mucosa, y la presencia de condiciones fisiológicas e interacciones microbianas con bacterias comensales en la mucosa intestinal, posiblemente sean factores limitantes para la infección natural y requieran factores de virulencia diferentes de aquellos necesarios para la invasión y multiplicación de células *in vitro* (Manzano *et al.*, 1998; Barbour *et al.*, 2001; Cotter *et al.*, 2001). Estas podrían ser algunas de las razones por las cuales los resultados de los ensayos en células humanas no siempre muestren una correlación clara con los resultados obtenidos en el modelo de ratón inoculados por la vía oral.

Las cepas evaluadas en este trabajo presentaron diferente nivel de virulencia en los ensayos realizados, a pesar de pertenecer al serotipo 4b. Dos de las cepas evaluadas de *Listeria monocytogenes* (AC1 y AC2) causaron el 100% de letalidad en ratones como consecuencia de la inoculación intravenosa e intragástrica, estas cepas mostraron concentraciones altas del microorganismo en el bazo, un crecimiento sostenido en ambas líneas celulares y sus parámetros cinéticos no

tuvieron diferencia significativa al compararlos con la cepa control LMC1 (ATCC 43249), lo cual podría sugerir que dichas cepas estarían mejor capacitadas para sobrevivir en el tracto gastrointestinal, llegar a sangre traspasando la mucosa intestinal y multiplicarse en los órganos. Asimismo, la cepa obtenida de leche de cabra fue incapaz de desarrollar un crecimiento sostenido en los macrófagos mostrando una disminución en su crecimiento intracelular 4 horas posteriores a la infección y en general un menor crecimiento intracelular comparado con el resto de los aislados en ambas líneas celulares. Se han encontrado cepas consideradas avirulentas capaces de iniciar una infección dentro de los macrófagos pero no logran prolongarla por al menos 7 horas, esta capacidad la han asociado con la expresión de proteínas de reparación de ADN y de respuesta a estrés, y consideran que estas diferencias podrían determinar la habilidad de *L. monocytogenes* para sobrevivir en los macrófagos (Donaldson *et al.*, 2011).

Aunque no han sido identificados marcadores genéticos definitivos asociados con la virulencia de *L. monocytogenes*, estudios previos han identificado múltiples mutaciones en diversos genes. Para evaluar la virulencia molecular en el presente estudio, se determinó la presencia de mutaciones en 8 genes asociados a la virulencia de *L. monocytogenes*. Para ello, inicialmente se llevó a cabo su amplificación por PCR, obteniéndose amplificadores del tamaño esperado respecto a los iniciadores utilizados, excepto por los genes *mpl* y *actA*, los cuales tuvieron tamaños menores a los esperados de 1458 y 2000 pb respectivamente; sin embargo el tamaño de los genes amplificados *linA*, *plcA*, *plcB* y *mpl* de las cepas fue menor que el tamaño de los genes pertenecientes a la cepa patógena *L. monocytogenes* EGD-e. Posteriormente, en el análisis de polimorfismo en los genes ampificados por PCR, *Hae* III fue la endonucleasa con mayor capacidad de diferenciación entre las cepas generando 13 grupos, esta enzima y *Hha* I fueron capaces de distinguir entre las cepas que observaron mayor virulencia en el ensayo en ratón (AC1, AC2, y AC3) y el resto de las cepas probadas. Además, el mayor grado de polimorfismo fue observado en los genes que codifican las internalinas A y B y la metalproteasa Mpl. No fue posible amplificar los genes, *inlA*, *hly* y *actA* a partir de la cepa MFC3

procedente de materia fecal, y los genes *hly* y *actA* de la cepa aislada de leche de cabra LC1; lo que podría significar que dichos genes no se encuentran presentes en el genoma de estas cepas o que las secuencias en las cuales alinean los iniciadores utilizados son diferentes, como ha sido observado en otros trabajos (Franciosa *et al.*, 2005). Asimismo, fueron observadas diferencias en los patrones de corte obtenidos en el ensayo de polimorfismo al compararlos con los generados mediante el software NEB cutter V2.0 en los genes de las cepas patógenas *L. monocytogenes* EGD-e y F2365 obtenidos del Gen Bank. Los resultados obtenidos en este trabajo concuerdan con estudios previos en los que se ha reportado la utilidad del análisis de polimorfismo (PCR-RFLP) en los genes *inIA*, *inIB* y *actA* de *L. monocytogenes* para la diferenciación molecular de cepas aisladas (Rousseaux *et al.*, 2004; Kabuki *et al.*, 2004; Franciosa *et al.*, 2005; Graves *et al.*, 2007; Kuhn *et al.*, 2008; Teomin *et al.*, 2008; Roche *et al.*, 2009a; Chen *et al.*, 2011).

Las secuencias de los genes *inIA*, *inIB* y *actA* obtenidas de las cepas mostraron una homología promedio de 90% con las secuencias de los respectivos genes de las cepas *L. monocytogenes* EGD-e (serotipo 1/2a), *L. monocytogenes* F2365 y *L. monocytogenes* Clip80459, ambas de serotipo 4b y linaje I. *L. monocytogenes* F2365 serotipo 4b es una cepa que fue aislada de un brote de listeriosis ocurrido en USA (1985), en el que fueron reportados 142 casos de listeriosis humana con 48 muertes. La investigación realizada implicó como el vehículo de la infección, queso suave estilo mexicano contaminado en la planta productora con leche no pasteurizada; de los aislados de *L. monocytogenes* disponibles en dicha investigación, el 82% fueron identificados como serotipo 4b (Linnan *et al.*, 1988). En investigaciones posteriores, se han encontrado un total de 51 genes específicos en la cepa *L. monocytogenes* F2365 que probablemente contribuyen a las diferencias observadas en su virulencia, y la habilidad del organismo para sobrevivir y crecer en su nicho ambiental (Nelson *et al.*, 2004). Estudios del genoma de *L. monocytogenes* F2365 indican que tiene un tamaño ligeramente menor (40 kb) que el de la cepa EGD-e serotipo 1/2a, aislada de animal; mediante espectroscopia de masas se identificaron mayor número de proteínas en la

cepa EGD-e, en particular las cepas difieren en la expresión de proteínas involucradas en la fisiología de la pared celular y la biosíntesis flagelar así como proteínas de reparación de ADN y de respuesta al estrés (Fouts *et al.*, 2003; Donaldson *et al.*, 2009). Se ha visto recientemente que la cepa F2365 contiene mutaciones de cambio de marco y mutaciones no detectadas en diversos genes incluyendo las internalinas, y que algunas producen codones prematuros de terminación (Nightingale *et al.*, 2007; Hain *et al.*, 2012). La cepa *L. monocytogenes* Clip804594b serotipo 4b, fue aislada de un brote de listeriosis por consumo de alimentos contaminados en Francia el cual afectó a 42 personas. Su genoma, a diferencia de la cepa F2365, contiene su gen asociado a la invasión *inlB* intacto (de Valk *et al.*, 2001; Hain *et al.*, 2012).

Roche y cols. han demostrado en diversos estudios, que las diferentes cepas que muestran baja virulencia contienen mutaciones en los mismos genes de virulencia por lo que se cree podrían tener vías evolutivas comunes. En estudios comparativos del genoma de cepas virulentas serotipo 4b y EGD-e (1/2a), se ha encontrado diferencias en los genes asociados con la pared celular entre ellos las internalinas, las cuales muestran un índice de mutación alto (Nelson *et al.*, 2004). En un estudio reciente fueron evaluadas cepas coleccionadas de fuentes independientes en Francia y encontraron cepas con baja virulencia pertenecientes a los linajes I y II, las cuales poseen diversas mutaciones en el gen *inlA*, producidas por eventos de inserción, deleción, sustitución de nucleótidos y codones de terminación prematuros. En base a sus observaciones han sugerido que existe una correlación entre el nivel de virulencia y mutaciones puntuales (sustituciones de bases que inducen a codones de terminación prematuros o inactivación de proteínas de virulencia), más que una transferencia horizontal o pérdida de genes (Roche *et al.*, 2012). No obstante que todos los aislados evaluados en el presente trabajo, pertenecen al serotipo 4b y presentaron una homología mínima de 89% con las cepas patógenas F2365 y EGD-e, se encontró mayor número de codones de terminación prematuros en los genes de las cepas evaluadas, principalmente en ambas internalinas (A y B), en las cuales se se observó casi el doble, comparadas con el gen *actA*. En el gen *inlA*, estos se

presentaron con mayor frecuencia en dos cepas de queso de cabra (QC1-QC5) y no estuvieron presentes en una de alfalfa y dos de materia fecal (AC2, MFC1 y MFC2) (Tabla 9). Aunque en la cepa AC1 se observaron varios codones de terminación prematuros en *inIA*, ésta mostró una virulencia relativa de 100% (letalidad) al ser inoculada vía intragástrica en los ratones. Orsi y cols. Han sugerido que los aislados del linaje I (incluyendo el serotipo 4b) parecen haber evolucionado a portar un alelo *InIA* que no facilita una mutación de “cambio de marco” en *InIA*, mientras que la mayoría de los aislados del linaje II parecen haber evolucionado a mecanismos que permiten un “switching de fase” como regulación de la expresión de *InIA* (Orsi *et al.*, 2007), lo cual podría estar sucediendo en dicho aislado AC1. Además, es posible que algunas cepas evaluadas en este trabajo no pertenezcan al linaje I aunque sean serotipo 4b, y en cambio pertenezcan al linaje III ó IV, ya que se ha reportado que las cepas serotipo 4b pertenecientes a este linaje son atípicas y la mayoría han sido aisladas de rumiantes (Orsi *et al.*, 2011). Se ha observado que las cepas de *L. monocytogenes* serotipo 4b pertenecientes a los linajes I y III poseen distintas características moleculares. Debido a la baja incidencia de cepas pertenecientes a los linajes III y IV entre los casos clínicos en humanos, se creía que esas cepas podrían mostrar virulencia reducida en humanos. Sin embargo, estudios subsecuentes sugirieron que podría deberse a que raramente son aislados de alimentos (Wiedman *et al.*, 1997; Gray *et al.*, 2004; Sauders *et al.*, 2004; Liu *et al.*, 2006; Roberts *et al.*, 2006a).

InIA es una proteína de superficie, la cual tiene una región en el extremo C-terminal que comprende un motivo LPXTG seguida de una región hidrofóbica de 20 aminoácidos que atraviesa la membrana. En este trabajo se obtuvo un motivo compuesto por 5 aminoácidos “LPTTG”, en el gen *inIA* de la mayoría de las cepas evaluadas de *L. monocytogenes*, excepto en AC1, QC2 y QC5. Este como otros motivos similares en diversas proteínas de superficie ligadas covalentemente al péptidoglicano en las bacterias Gram positivas, es responsable de la adhesión de *InIA* a la envoltura celular de la bacteria (Glaser *et al.*, 2001; Kuhn and Goebel, 2007; Kuhn *et al.*, 2008). El polimorfismo en *inIA* que conduce a la atenuación de la

virulencia de aislados de *L. monocytogenes* es posiblemente el mejor estudiado. Han sido observados 18 diferentes polimorfismos en *inlA* que originan codones de terminación prematuros, los cuales producen 18 diferentes alelos de InlA que codifican proteínas de varios tamaños. La mayoría de los genes que contienen estos codones codifican una InlA truncada (189 a 700 aminoácidos) que carece de anclaje a la pared celular y por ello es más secretada que anclada. Las mutaciones que producen dichos codones en *inlA* han sido observadas entre aislados de *L. monocytogenes* recolectados de varios países incluyendo Francia, Estados Unidos, Portugal y Japón, y esas mutaciones causan la atenuación en la invasión de las células epiteliales intestinales. Diversos estudios sugieren que entre 25 y 50% de los aislados de alimentos tienen este tipo de mutaciones que atenúan la virulencia. Las cepas con estos codones de terminación prematuros son raramente encontradas entre los aislados clínicos en humanos y virtualmente no fueron encontradas entre los aislados de casos asociados a mujeres embarazadas, sin embargo, probablemente sean comunes en portadores asintomáticos humanos. Al parecer, los aislados del linaje II contienen dichos codones prematuros en InlA más frecuentemente que los aislados del linaje I. Es por ello que se ha especulado la alta frecuencia de cepas pertenecientes al linaje I (principalmente del serotipo 4b) entre casos de listeriosis humana y podría ser debido en parte, a que estas raramente tienen codones de terminación prematuros (Jonquieres *et al.*, 1998; Olier *et al.*, 2002; Olier *et al.*, 2003; Jacquet *et al.*, 2004; Rousseaux *et al.*, 2004; Nightingale *et al.*, 2005a; Olier *et al.*, 2005; Hamon *et al.*, 2006; Felicio *et al.*, 2007; Handa-Miya *et al.*, 2007; Orsi *et al.*, 2007; Nightingale *et al.*, 2008; Ragon *et al.*, 2008; Van Stelten and Nightingale, 2008; Van Stelten *et al.*, 2010; Orsi *et al.*, 2011).

A diferencia de la InlA, InlB es una proteína de superficie que no contiene el motivo LPXTG ni la región que atraviesa la membrana. Sin embargo, contiene módulos GW en su extremo C-terminal, a través de los cuales se une a la superficie bacteriana mediante su interacción con el ácido lipoteicoico en la pared celular (Glaser *et al.*, 2001; Kuhn and Goebel, 2004; Ireton, 2007; Kuhn and Goebel, 2007; Kuhn *et al.*, 2008). En el presente trabajo encontramos que únicamente la cepa

control LMC2 y las cepas AC3, MFC2 y QC1 contienen dichos módulos GW, en el resto de las cepas no pudieron ser observados ya que debido a las variaciones encontradas en la secuencia de nucleótidos, al realizar su transcripción mediante el software Bio Edit se encontraron cambios en las secuencias de aminoácidos obtenidas. Si bien las cepas AC1 y AC2 presentaron dichos cambios en la secuencia de nucleótidos de InIB, fueron las únicas cepas probadas que mostraron virulencia relativa del 100% al ser inoculadas por vía intragástrica en ratón. En algunos trabajos, se ha observado que las cepas mutantes que tienen lesiones en inIB o inIA muestran poca ó nula atenuación en modelo animal cuando son inoculadas parenteralmente, pero las cepas difieren en la infección sistémica cuando son inoculadas por la vía oral (Dramsi *et al.*, 1995; Dramsi *et al.*, 1997; Czuprynski *et al.*, 2003; Nelson *et al.*, 2004). Pentecost y col., (2010) descubrieron un mecanismo de sinergia entre las internalinas A y B durante la invasión del intestino; encontraron que la InIB no actúa como una adhesina, ayuda acelerando la internalización bacteriana después de la adhesión activando su receptor Met e incrementando la endocitosis de los componentes de las uniones multicelulares incluyendo E-cadherina, acelerando de esta manera la invasión bacteriana al intestino. Sin embargo, los resultados de otros trabajos sugieren que la entrada de este patógeno a las células eucariotas es compleja y requiere factores adicionales a las internalinas, los cuales se encuentran presentes en algunos serotipos y contribuyen a su alta invasividad (Chatterjee *et al.*, 2006b). Asimismo, otros factores de virulencia también importantes para la entrada a las células y la virulencia respecto a la vía de inoculación oral continúan descubriéndose (Cabanés *et al.*, 2005; Sabet *et al.*, 2005; Kuhn *et al.*, 2008).

ActA es la proteína que media la movilidad basada en actina, juega un papel clave en los movimientos intracelulares de *L. monocytogenes*, la diseminación célula-célula y por lo tanto, la diseminación bacteriana en los tejidos del hospedero. También se ha reportado que es requerida para la entrada de este patógeno en las células epiteliales (Glaser *et al.*, 2001; Orndorff *et al.*, 2006; Hamon *et al.*, 2006; Kuhn and Goebel, 2007; Kuhn *et al.*, 2008). En algunos estudios se ha observado que el gen *actA* es altamente polimórfico por lo que ha sido sugerida la secuenciación de

dicho gen como una herramienta útil para estudios epidemiológicos (Papageorgiou *et al.*, 2007). De los tres genes secuenciados en el presente trabajo, se observó variación (sustituciones, deleciones e inserciones) con mayor frecuencia en el gen *actA*. Además se encontró que su secuencia contiene codones de terminación prematuros aunque con menor frecuencia respecto los otros dos genes secuenciados (internalinas A y B). La proteína ActA contiene 4 repeticiones ricas en prolina (PRR) que se localizan en la parte central de la proteína (Cossart and Bierne, 2000; Roberts and Wiedman, 2006b). En este trabajo no fue secuenciada esta parte del gen por lo que no fue posible realizar su análisis. Sin embargo en los fragmentos secuenciados (extremos 5' y 3'), se observó variación entre la secuencia de aminoácidos de los aislados y las cepas de *L. monocytogenes* EGD-e, F2365 y Clip80459, principalmente hacia la parte central del gen. Las mutantes con deleción de *actA* crecen como microcolonias en células infectadas y su virulencia es severamente afectada. Sin embargo las mutaciones que impiden pasos específicos en la movilidad basada en actina, producen una atenuación modesta en ratones. Ha sido observado que la variación alélica de *actA* no es responsable de incrementar la diseminación célula-célula observada en cepas epidémicas, debido a estos resultados se ha sugerido que la motilidad intracelular es menos importante para la diseminación de *L. monocytogenes* en tejidos, comparada con la evasión de las células T citotóxicas (Brundage *et al.*, 1993; Auerbuch *et al.*, 2001; Portnoy *et al.*, 2002; Roberts and Wiedman, 2006b; Conter *et al.*, 2009).

Al realizar mediante el software Bio Edit, la transcripción de las secuencias de nucleótidos obtenidas de los genes *inlA*, *inlB* y *actA* pertenecientes a las cepas evaluadas, se observaron cambios importantes con respecto a la cepa patógena *L. monocytogenes* EGD-e en gran parte de las secuencias de aminoácidos. Diversos trabajos han reportado que la baja virulencia de ciertas cepas de *L. monocytogenes* podrían ser explicadas por mutaciones puntuales atenuantes en uno o más genes importantes en la virulencia del patógeno. Lo que podría explicar la baja virulencia de la mayoría de las cepas evaluadas en el presente trabajo, sin embargo, en este y otros, estudios también se han encontrado cepas que a pesar de tener diversas

mutaciones en varios de sus principales genes que intervienen en la virulencia, muestran virulencia en ensayos *in vitro* e *in vivo*, por lo que se ha sugerido que posiblemente evolucionaron adquiriendo nuevos genes de virulencia (Rousseaux *et al.*, 2004; Kabuki *et al.*, 2004; Franciosa *et al.*, 2005; Graves *et al.*, 2007; Kuhn *et al.*, 2008; Teomín *et al.*, 2008; Roche *et al.*, 2009a; Chen *et al.*, 2011).

Entre los diferentes métodos de genotipado, la electroforesis en campo pulsado (PFGE) es actualmente considerada el criterio estándar para el subtipado de la epidemiología molecular de *Listeria* en América y Europa, ya que se ha visto que es un método reproducible y discriminatorio. Particularmente, útil para la tipificación de los aislados del serotipo 4b, los cuales no se tipifican de forma satisfactoria mediante la mayoría de los métodos disponibles (Brosch *et al.*, 1991; Lukinmaa *et al.*, 2004; OIE, 2008; Gasanov *et al.*, 2005; Liu, 2006; Park *et al.*, 2012). Generalmente se utiliza la endonucleasa *Asc* I (denominada primaria) para revisar la relación entre las cepas de *L. monocytogenes* aisladas. Se ha observado que los patrones de corte obtenidos con esta enzima son estables y produce menor número de bandas, siendo éstas de mayor tamaño. La endonucleasa *Apa* I (denominada secundaria) es usada para confirmar los resultados de *Asc* I y el empleo de ambas endonucleasas produce mayor discriminación (Graves and Swaminathan, 2001; Chen and Knabel 2008). En este estudio los resultados indicaron que la electroforesis en campo pulsado PFGE es útil para la subtipificación de *L. monocytogenes*. La electroforesis del DNA de 12 cepas restringido con las endonucleasas *Asc* I y *Apa* I mostró 10-13 y 7-9 fragmentos de aproximadamente 100-730 y 100-530 kb respectivamente. En los resultados de ambas endonucleasas fue observada una similitud de 1.0 entre las 2 cepas de alimento de cabra (AC1 y AC2) las cuales produjeron una virulencia relativa de 100% en los ratones, además de la cepa utilizada como control positivo LMC2 la cual fue donada por un hospital público en México. La cepa control LMC1 (serotipo 1/2a) y la cepa aislada de leche mostraron la menor similitud respecto a las demás cepas con ambas endonucleasas. Las cepas de queso mostraron mayor similitud con las de materia fecal de cabra, en ambos casos de las endonucleasas. Incluso las cepas de queso mostraron una similitud superior al 0.9 aunque fueron aisladas de diferentes

marcas de quesos. Estos resultados coinciden con reportes anteriores en los cuales ya se ha observado similitud entre aislados de materia fecal y de alimentos, es por ello que se ha indicado la necesidad de crear bases de datos, que contengan cepas aisladas de diferentes fuentes, con la finalidad de interpretar los datos de subtipado en investigaciones epidemiológicas e identificar tipos de PFGE comunes así como fuente-específicos (Buchrieser *et al.*, 1993; Buroki *et al.*, 2004; Nightingale *et al.*, 2004; Fugguet *et al.*, 2007; Neves *et al.*, 2008; Park *et al.*, 2012).

La detección de genes asociados a la virulencia de *L. monocytogenes* y otros métodos moleculares no han establecido por sí mismos una relación convincente y definitiva entre los genes y la virulencia de la bacteria. Los resultados de este estudio coinciden con reportes previos en los que se sugiere que diferentes mecanismos específicos y eventos genéticos independientes son responsables de la atenuación natural de la virulencia en *L. monocytogenes* (Liu *et al.*, 2007). Por lo cual es improbable que un solo ensayo molecular, en cultivo celular o en animal sea capaz de detectar todos los aislados con virulencia atenuada. Por lo tanto, se ha sugerido la combinación de ensayos moleculares y la evaluación *in vivo* o *in vitro* de la virulencia, para confirmar el potencial patogénico de los aislados de este microorganismo. Sin embargo los métodos alternativos para la detección de moléculas específicas involucradas en la patogenia, podrían algún día prescindir de la necesidad de realizar ensayos *in vitro* o *in vivo* para la evaluación de la virulencia de este patógeno.

Comparada con la especie animal bovina, son pocos los estudios que se han realizado respecto a *Listeria* en cabras, aunque en diversos trabajos se ha reportado su aislamiento de esta especie animal y sus derivados. En Canadá se notificó el aislamiento de *L. monocytogenes* a partir de muestras de cerebro de cabras. En México ya ha sido aislada de cabras destinadas para el abasto, alimento (alfalfa), materia fecal, leche y quesos de cabra (Salas y Díaz, 1988; Saltijeral *et al.*, 1999; Ramírez, 2007; Wesley, 2007; Smith and Sherman, 2009; Oeverman *et al.*, 2010; Barbuddhe *et al.*, 2012).

10. CONCLUSIONES

Este estudio muestra que las cepas evaluadas de *L. monocytogenes* serotipo 4b provenientes de cabras y sus derivados, presentaron diferente nivel de virulencia en los ensayos realizados, la cual no sólo está determinada por la capacidad de invasión y crecimiento intracelular *in vitro*, sino también por su habilidad para crecer *in vivo*.

La baja ó nula virulencia mostrada por la mayoría de las cepas evaluadas probablemente fue causada por mutaciones puntuales atenuantes en uno o más genes importantes en la virulencia del patógeno. Aunque las dos cepas que mostraron virulencia también presentaron cambios en la secuencia de nucleótidos en los genes evaluados, es posible que las mutaciones producidas por dichos cambios no hayan sido atenuantes, que la atenuación de la virulencia haya sido solventada por otros genes que intervienen en la virulencia ó que estas cepas hayan evolucionado adquiriendo nuevos genes de virulencia.

En base a los resultados obtenidos, se confirmó la variación en la virulencia entre cepas de este patógeno aisladas de cabras y subproductos, y la necesidad de combinar los ensayos moleculares con la evaluación *in vivo* o *in vitro*, para corroborar el potencial patogénico de los aislamientos de esta bacteria.

La electroforesis en campo pulsado PFGE fue útil para la tipificación molecular de las cepas evaluadas, mostrando nueve grupos en base a los patrones de restricción generados con ambas endonucleasas. Los perfiles electroforéticos permitieron diferenciar las cepas procedentes de alfalfa, de leche y de queso. Las dos cepas de alimento de cabra que mostraron el mayor nivel de virulencia generaron un patrón idéntico y se observó similitud entre cepas procedentes de leche y queso, y dos cepas aisladas de materia fecal de cabra, aunque ninguna muestra provenía del mismo lugar. Lo cual podría indicar el peligro que representa la

transmisión secundaria debida a la amplificación del microorganismo a través de los portadores sanos.

Si bien las cepas con mayor nivel de virulencia provienen de alfalfa utilizada como alimento de cabras, estas representan un riesgo para la salud animal y la salud humana, ya que pueden ser diseminadas en el hato y de este a otras explotaciones o a las instalaciones donde se elaboran alimentos. Por ello, cualquier alimento suministrado a los animales representa un factor de riesgo y por lo mismo se debe tener cuidado para evitar la listeriosis en cabras.

Debido a que los rumiantes de granja y la leche han sido frecuentemente implicados en casos de listeriosis y la importancia de las cabras como fuente de alimentos, es necesario incrementar la investigación en esta especie animal.

11. REFERENCIAS

- Allerberg** F, Wagner M. Listeriosis a resurgent foodborne infection. *Clinical Microbiol Infect dis* 2010; 16:16-23.
- Amaya** MG, Álvarez MCI, Doniz ME, Morales R, Martínez HA. Calidad microbiológica de diferentes tipos de quesos de cabra. *Memorias de la XVIII Reunión nacional sobre caprinocultura*; Puebla, México, 2003:132-134.
- Auerbuch** V, Lenz LL, Portnoy DA. Development of a competitive index assay to evaluate the virulence of *Listeria monocytogenes actA* mutants during primary and secondary infection of mice. *Infect Immun* 2001; 69:5953–5957.
- Baloga** AO, Harlander SK. Comparison of methods for discrimination between strains of *Listeria monocytogenes* from epidemiological surveys. *Appl Environ Microbiol* 1991; 57:2324–2331.
- Barbour** AH, Rampling A, Hormaeche CE. Comparison of the infectivity of isolates of *Listeria monocytogenes* following intragastric and intravenous inoculation in mice. *Microbial Pathogenesis* 1996; 20:247–253.
- Barbour** AH, Rampling A, Hormaeche CE. Variation in the infectivity of *Listeria monocytogenes* isolates following intragastric inoculation of mice. *Infect Immun* 2001; 69:4657–4660.
- Barbuddhe** SB, Malik SVS, Bhilegaonkar KN, Kumar P, Gupta LK. Isolation of *Listeria monocytogenes* and anti-listeriolysin O detection in sheep and goats. *Small Rum Res* 2000; 38:151-155.
- Barbuddhe** SB, Malik SVS, Ashok Kumar J, Kalorey DR, Chakraborty T. Epidemiology and risk management of listeriosis in India. *Int J Food Microbiol* 2012; 154:113–118.
- Bille** J, Rocourt J. WHO International multicenter *Listeria monocytogenes* subtyping study– rationale and set-up of the study. *Int J Food Microbiol* 1996; 32:251–262.
- Bonazzi** M, Lecuit M, Cossart P. *Listeria monocytogenes* internalin and E-cadherin: from structure to pathogenesis. *Cellular Microbiol* 2009; 11(5):693–702.
- Boratyn** GM, Camacho C, Cooper PS, Coulouris G, Fong A, Ma N, *et al.* BLAST: a more efficient report with usability improvements. *Nucleic Acids Res* 2013; 41:29-33.
- Brosch** R, Buchrieser C, Rocourt J. Subtyping of *Listeria monocytogenes* serovar 4b by use of low-frequency cleavage restriction endonucleases and pulsed-field gel electrophoresis. *Res Microbiol* 1991; 142: 667–675.
- Brugere-Picoux** L. Ovine listeriosis. *Small Rum Res* 2008; 76:12-20.
- Brundage** RA, Smith GA, Camilli A, Theriot JA, Portnoy DA. Expression and phosphorylation of the *Listeria monocytogenes* ActA protein in mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; 90:11890–11894.
- Buchrieser** C, Brosch R, Catimel B, Rocourt J. Pulsed-field gel electrophoresis applied for comparing *Listeria monocytogenes* strains involved in outbreaks. *Can J Microbiol* 1993; 39:395–401.
- Burbano** E, Sierra S, Torres K, Mercado M, Carrascal A, Poutou R. Rapid DNA extraction and PCR validation for direct detection of *Listeria monocytogenes* in raw milk. *MVZ Córdoba* 2006; 11(1):715-724.
- Borucki** MK, Reynolds J, Gay CC, McElwain KL, Kim SH, Knowles DP, Hu J. Dairy farm reservoir of *Listeria monocytogenes* sporadic and epidemic strains. *J Food Prot* 2004; 67:2496–2499.

Cabanes D, Sousa S, Cebria A, Lecuit M, Garcia-del Portillo F, Cossart P. Gp96 is a receptor for a novel *Listeria monocytogenes* virulence factor, Vip, a surface protein. *EMBO J* 2005; 24: 2827–2838.

Camacho C, Madden T, Coulouris G, Ning M, Tao T, Agarwala R, Morgulis A. BLAST Command line applications user manual. 2008 Jun 23 [Updated 2013 Mar 25]. In: BLAST® Help. Bethesda (MD): National Center for Biotechnology Information (USA); 2008. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1763/>

Camacho C, Coulouris G, Avagyan V, Ma N, Papadopoulos J, Bealer K, Madden TL. BLAST+: architecture and applications. *BMC Bioinformatics* 2009; 10:421.

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.

CDC, Centers for Disease Control and Prevention. National *Listeria* Surveillance Annual Summary, 2011. Atlanta, Georgia: US Department of Health and Human Services, CDC 2013.

Chakraborty T, Ebel F, Wehland J, Dufrenne J, Notermans S. Naturally occurring virulence-attenuated isolates of *Listeria monocytogenes* capable of inducing long term protection against infection by virulent strains of homologous and heterologous serotypes. *FEMS Immun Med Microbiol* 1994; 10:1-9.

Chatterjee SS, Hossain H, Otten S, Kuenne C, Kuchmina K, Machata S, *et al*. Intracellular gene expression profile of *Listeria monocytogenes*. *Infection Immun* 2006a; 74:1323–1338.

Chatterjee SS, Otten S, Hain T, Lingnau A, Carl UD, Wehland J, *et al*. Invasiveness is a variable and heterogeneous phenotype in *Listeria monocytogenes* serotype strains. *Int J Med Microbiol* 2006b; 296:277–286.

Chavarrias M. Zoonosis y seguridad alimentaria. Boletín semanal 24 mayo 2006. <http://www.wconsumaseguridad.com> Consultado Agosto 2013.

Chen Y, Knabel SJ. Strain Typing. In: Liu D, editor. Handbook of *Listeria monocytogenes*. Boca Ratón, FL, USA: CRC Press, 2008:203-240.

Chen Y, Ross WH, Whiting RC, Van Stelten A, Nightingale KK, Wiedmann M, Scott VN. Variation in *Listeria monocytogenes* dose responses in relation to subtypes encoding a full-length or truncated internalin A. *Applied Environ Microbiol* 2011; 77(4):1171–1180.

Churchill RLT, Lee H, Hall JC. Detection of *Listeria monocytogenes* and the toxin listeriolysin O in food. *J Microbiol Methods* 2006; 64:141–170.

Conter M, Vergara A, Di Ciccio P, Zanardi E, Ghidini S, Ianieri A. Polymorphism of *actA* gene is not related to in vitro virulence of *Listeria monocytogenes*. *Int J Food Microbiol* 2009; 137:100–105.

Cooray KJ, Nishibori T, Xiong H, Matsuyama T, Fujita M, Mitsuyama M. Detection of multiple virulence associated genes of *Listeria monocytogenes* by PCR in artificially contaminated milk samples. *Appl Environ Microbiol* 1994; 60(8):3023–3026.

Cossart P, Bierne H. The use of host cell machinery in the pathogenesis of *Listeria monocytogenes*. *Curr Opin Immunol* 2000; 13:96-103.

Cossart P, Pizarro-Cerda J, Lecuit M. Invasion of mammalian cells by *Listeria monocytogenes*: functional mimicry to subvert cellular functions. *Trends Cell Biol* 2003; 13:23–31.

- Cotter PD**, Gahan CGM, Hill C. A glutamate decarboxylase system protects *Listeria monocytogenes* in gastric fluids. *Mol Microbiol* 2001; 40:465-475.
- Czuprynski CJ**, Faith NG, Steinberg H. Ability of the *Listeria monocytogenes* strain Scott A to cause systemic infection in mice infected by the intragastric route. *Applied Environ Microbiol* 2002; 68(6):2893–2900.
- Czuprynski CJ**, Faith NG, Steinberg H. A/J mice are susceptible and C57BL/6 mice are resistant to *Listeria monocytogenes* infection by intragastric inoculation. *Infect Immun* 2003; 71:682–689.
- Díaz CM**, Luchansky J, Moren ER, García GA, Acedo FE, González H, Call J. Characterization of *Listeria monocytogenes* from a survey of fresh retail cheese and associated farms in Sonora, México. In: United States Department of Agriculture. Agricultural Research Service 2006. 29/05/2007. Consultado Agosto 2013. <http://www.ars.usda.gov/research/publications/Publications.htm?se4no115=193748>
- de Valk H**, Vaillant V, Jacquet C, Rocourt J, Le Querrec F, Stainer F, *et al.* Two consecutive nationwide outbreaks of listeriosis in France, October 1999-February 2000. *Am J Epidemiol* 2001; 154:944–950.
- Dice LR**. Measures of the amount of ecologic association between species. *Ecology* 1945; 26:297-302.
- Donaldson JR**, Nanduri B, Burgess SC, Lawrence ML. Comparative proteomic analysis of *Listeria monocytogenes* strains F2365 and EGD. *Applied Environ Microbiol* 2009; 75(2):366–373.
- Donaldson JR**, Nanduri B, Pittman JR, Givaruangsawat S, Burgess SC, Lawrence ML. Proteomic expression profiles of virulent and avirulent strains of *Listeria monocytogenes* isolated from macrophages. *J Proteomics* 2011; 74:1906–1917.
- Dramsi S**, Biswas I, Maguin E, Braun L, Mastroeni P, Cossart P. Entry of *Listeria monocytogenes* into hepatocytes requires expression of *inlB*, a surface protein of the internalin multigene family. *Mol Microbiol* 1995; 16:251–261.
- Dramsi S**, Dehoux P, Lebrun M, Goossens PL, Cossart P. Identification of four new members of the internalin multigene family of *Listeria monocytogenes* EGD. *Infect Immun* 1997; 65:1615–1625.
- Dubeuf JP**, Morand-Fehr P, Rubino R. Situation, changes and future of goat industry around the world. *Small Rumin Res* 2004; 51:165-173.
- Dussurget O**, Pizarro-Cerda J, Cossart P. Molecular determinants of *Listeria monocytogenes* virulence. *Annu Rev Microbiol* 2004; 58:587–610.
- ECDC**, European Centre for Disease Prevention and Control. Annual epidemiological report on communicable diseases in Europe 2008. Stockholm: European Centre for Disease Prevention and Control, 2008.
- 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.
- EFSA** and ECDC (European Food Safety Authority and European Centre for Disease Prevention and Control), 2013. 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.

- Eilertz I**, Danielsson-Tham ML, Hammarberg KE, Reeves MW, Rocourt J, Seeliger HP, *et al.* Isolation of *Listeria monocytogenes* from goat cheese associated with a case of listeriosis in goat. *Acta Vet Scand* 1993; 34:145–149.
- Escárcega H**, Peñaloza R, Montes O, Peña R, Godoy H, Negrin M, *et al.* Listeriosis materno-fetal: reporte de tres casos. *Rev mex pueric ped* 1999; 6(35):290-296.
- Faith NG**, Kathariou S, Neudeck BL, Luchansky JB, Czuprynski CJ. A P60 mutant of *Listeria monocytogenes* is impaired in its ability to cause infection in intragastrically inoculated mice. *Microbial Pathog* 2007; 42:237–241.
- Fakruddin M**, Mazumder RM, Bin-Mannan KS. Predictive microbiology: Modeling microbial responses in food. *Ceylon J Science (Bio Sci)* 2011; 40:121-131.
- FAO** Official statistics (FAOSTAT). The Statistics Division, Economic and Social Department. GLiPHA Global Livestock Production and Health Atlas, Animal Production and Health Division 2011; Available: <http://kids.fao.org/glipha/>. Updated on: 25 September 2012. Consultado Agosto 2013.
- Farber, JM**, PI Peterkin. *Listeria monocytogenes*, a Food-Borne Pathogen. *Microbiol Rev* 1991; 55(3): 476-511.
- Felicio MT**, Hogg T, Gibbs P, Teixeira P, Wiedmann M. Recurrent and sporadic *Listeria monocytogenes* contamination in Alheiras represents considerable diversity, including virulence-attenuated isolates. *Appl Environ Microbiol* 2007; 73:3887–3895.
- 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.
- Fouts DE**, Kolonay J, Forberger HA, Khouri HM, Lindsay JA, Luchansky JB, *et al.* Whole genome sequencing of *Listeria monocytogenes* F2365, a serotype 4b strain, and comparison to other *L. monocytogenes* strains. *American Society Microbiol* 2003; Abstract # R-058:621.
- Franciosa G**, Maugliani A, Floridi F, Aureli P. Molecular and experimental virulence of *Listeria monocytogenes* strains from cases with invasive listeriosis and febrile gastroenteritis. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2005; 43:431-439.
- Fugett EB**, Schoonmaker-Bopp D, Dumas NB, Corby J, Wiedmann M. Pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) analysis of temporally matched *Listeria monocytogenes* isolates from human clinical cases, foods, ruminant farms, and urban and natural environments reveals source-associated as well as widely distributed PFGE types. *J Clinical Microbiol* 2007; 45(3):865–873.
- Gandhi M**, Chikindas LM. *Listeria*: A foodborne pathogen that knows how to survive. *Int J Food Microbiol* 2007; 113:1–15.
- Gasnov U**, Hughes D, Hansbro PM. Methods for the isolation and identification of *Listeria spp.* and *Listeria monocytogenes*: a review. *FEMS Microbiol Rev* 2005; 29:851–875.
- Gaya P**, Saralegui C, Medina M, Núñez M. Occurrence of *Listeria monocytogenes* and other *Listeria spp.* In raw caprine milk. *J Dairy Sci* 1996; 79:1936-1941.
- Glaser P**, Frangeul L, Buchrieser C, Rusniok C, Amend A, Baquero F, *et al.* Comparative Genomics of *Listeria* species. *Science* 2001; 294:849-852.
- Graves LM**, Swaminathan B. PulseNet standardized protocol for subtyping *Listeria monocytogenes* by macrorestriction and pulsed-field gel electrophoresis. *Int J Food Microbiol* 2001; 65:55–62.

- Graves** LM, Swaminathan B. PulseNet's step-by-step laboratory protocol for molecular subtyping of *Listeria monocytogenes* by macrorestriction and Pulse-Field Gel Electrophoresis. In: Adley CC, editor. Food borne pathogens, Methods in biotechnology, method and protocols. New Jersey, USA: Humana Press, 2006:57-72.
- 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.
- Gray** MJ, Zadoks RN, Fortes ED, Dogan B, Cai S, Chen Y, *et al.* *Listeria monocytogenes* isolates from foods and humans form distinct but overlapping populations. *Appl Environ Microbiol* 2004; 70:5833–5841.
- Green** LE, Morgan KL. Descriptive epidemiology of listerial meningoencephalitis in housed lamb. *Preventive Vet Med* 1994; 18:79-87.
- Groisman** EA. Principles of bacterial pathogenesis. San Diego California, USA: Academic Press, 2001.
- Haenlein** GFW, Fahmy MH. Role of small ruminants in the supply of animal products. *Small Rumin Res* 1999; 34:175–308.
- Haenlein** GFW. Past, present, and future perspectives of small ruminant research. *J Dairy Sci* 2001; 84:2097–2115.
- Haenlein** GFW. Goat milk in human nutrition. *Small Rumin Res* 2004; 51:155–163.
- Haenlein** GFW. About the evolution of goat and sheep milk production. *Small Rumin Res* 2007; 68:3-7.
- Hain** T, Ghai R, Billion A, Kuenne CT, Steinweg C, Izar B, *et al.* Comparative genomics and transcriptomics of lineages I, II, and III strains of *Listeria monocytogenes*. *BMC Genomics* 2012; 13:144.
- Hamon** M, Bierne H, Cossart P. *Listeria monocytogenes*: a multifaceted model. *Nature Reviews* 2006; 4:423-434.
- Handa-Miya** S, Kimura B, Takahashi H, Sato M, Ishikawa T, Igarashi K, Fugii T. Nonsense-mutated *inlA* and *prfA* not widely distributed in *Listeria monocytogenes* isolates from ready-to-eat seafood products in Japan. *Int J Food Microbiol* 2007; 117:312–318.
- Hernández** V. La apertura en 2008 traerá un efecto diferente en las ramas productivas del sector agropecuario. *El Siglo de Torreón*, Torreón Coahuila, México 2007 Febrero 22.
- 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.
- Iretton** Keith. Entry of the bacterial pathogen *Listeria monocytogenes* into mammalian cells. *Cellular Microbiol* 2007; 9(6):1365–1375.
- Jacquet** C, Doumith M, Gordon JI, Martin PM, Cossart P, Lecuit M. A molecular marker for evaluating the pathogenic potential of foodborne *Listeria monocytogenes*. *J Infect Dis* 2004; 189:2094–2100.
- Jaradat** Z W, Bhunia AK. Adhesion, Invasion, and translocation characteristics of *Listeria monocytogenes* serotypes in Caco-2 cell and mouse models. *Appl Environ Microbiol* 2003; 69(6):3640–3645.
- Johnson** M, Zaretskaya I, Raytselis Y, Merezhuk Y, McGinnis S, Madden TL. NCBI BLAST: a better web interface. *Nucleic Acids Res* 2008; 36:5-9.

- Jonquieres** R, Bierne H, Mengaud J, Cossart P. The *inlA* gene of *Listeria monocytogenes* LO28 harbors a nonsense mutation resulting in release of internalin. *Infect Immun* 1998; 66:3420–3422.
- Kabuki** DY, Kuaye AY, Wiedmann M, Boor KJ. Molecular Subtyping and Tracking of *Listeria monocytogenes* in Latin-Style fresh-cheese processing plants. *J Dairy Sci* 2004; 87:2803–2812.
- Kathariou** S. *Listeria monocytogenes* virulence and pathogenicity, a food safety perspective. *J. Food Prot* 2002; 11:1811–1829.
- Kim** SH, Bakko MK, Knowles D, Borucki MK. Oral inoculation of A/J mice for detection of invasiveness differences between *Listeria monocytogenes* epidemic and environmental strains. *Infect Immun* 2004; 72:4318-4321.
- Kuhn** M, Goebel W. *Listeria monocytogenes*: inside a cell inside a cell. *Biologist* 2004; 51(1):49-53.
- Kuhn** M, Goebel W. Molecular virulence determinants of *Listeria monocytogenes*. In: Ryser ET, Marth EH, editors. *Listeria, Listeriosis and Food safety*. 3th ed. Boca Ratón FL, USA: CRC Press, 2007:111-155.
- 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.
- Kushwaha** K, Muriana PM. Analysis of tissue invasiveness of adherent strains of *Listeria monocytogenes* by in vivo mouse assay. *Int J Food Microbiol* 2010; 141:104–109.
- Larsen** CN, Nørrung B, Sommer HM, Jakobsen M. In vitro and in vivo invasiveness of different pulsed-field gel electrophoresis types of *Listeria monocytogenes*. *Applied Environ Microbiol* 2002; 68, 5698–5703.
- Latorre** L, Parisi A, Fracalvieri R, Normanno G, La Porta MC, Goffredo E, *et al.* Low prevalence of *Listeria monocytogenes* in foods from Italy. *J Food Prot* 2007; 70:1507–1512.
- 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.
- Liu** D. *Listeria monocytogenes*: comparative interpretation of mouse virulence assay. *FEMS Microbiol Lett* 2004; 233:159-164.
- Liu** M. Identification, subtyping and virulence determination of *Listeria monocytogenes*, an important foodborne pathogen. *J Med Microbiol* 2006; 55:645.
- Liu** D, Lawrence ML, Gorski L, Mandrell RE, Ainsworth AJ, Austin FW. *Listeria monocytogenes* serotype 4b strains belonging to lineages I and III possess distinct molecular features. *J Clin Microbiol* 2006; 44:214–217.
- Liu** M, Lawrence ML, Ainsworth AJ, Austin FW. Toward an improved laboratory definition of *Listeria monocytogenes* virulence. *Int J Food Microbiol* 2007; 118:101-115.
- Liu** D. Epidemiology. In: Liu D, editor. *Handbook of Listeria monocytogenes*. Boca Ratón, FL, USA: CRC Press, 2008:28-59.
- Liu** D, Busse H-J. Listeria. In: Liu D, editor. *Molecular detection of foodborne pathogens*. Boca Raton FL, USA: CRC Press, 2010:207-220.
- Lukinmaa** S, Aarnisalo K, Suihko ML, Siitonen A. Diversity of *Listeria monocytogenes* isolates of human and food origin studied by serotyping, automated ribotyping and pulsed-field gel electrophoresis. *Clin Microbiol Infect* 2004; 10:562–568.

- MacDonald** PD, Whitwam RE, Boggs JD, MacCormack JN, Anderson KL, Reardon JW, *et al.* Outbreak of listeriosis among Mexican immigrants as a result of consumption of illicitly produced Mexican-style cheese. *Clin Infect Dis* 2005; 40:677–682.
- Manfreda** G, De Cesare A, Stella S, Cozzi M, Cantoni C. Occurrence and ribotypes of *Listeria monocytogenes* in Gorgonzola cheeses. *Int J Food Microbiol* 2005; 102:287–293.
- Manzano** M, Coccolin L, Cantón 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.
- McDonough** PL, Wiedmann M. Ecology and transmission of *Listeria monocytogenes* infecting ruminants and in the farm environment. *Appl Environ Microbiol* 2004; 70:4458–4467.
- McGinnis** S, Madden TL. BLAST: at the core of a powerful and diverse set of sequence analysis tools. *Nucleic Acids Res* 2004; 32:20–25.
- McLauchlin** J. Human listeriosis in Britain, 1967-1985, a summary of 722 cases. 2. Listeriosis in non-pregnant individuals, a changing pattern of infection and seasonal incidence. *Epidemiol Infect* 1990; 104:191-201.
- Mead** PS, Slutsker L, Dietz V, McCaig LF, Bresee JS, Shapiro C, *et al.* Food-related illness and death in the United States. *Emerg Infect Dis* 1999; 5(5):607–625.
- Melo** J, Schrama D, Hussey S, Andrew PW, Faleiro ML. *Listeria monocytogenes* dairy isolates show a different proteome response to sequential exposure to gastric and intestinal fluids. *Int J Food Microbiol* 2013; 163:51–63.
- Montville** JT, Matthews KR. *Food Microbiology an Introduction*. 2nd ed. Washington DC, USA: ASM Press, 2008.
- Morales** LJ, Alanís-de la O R, Vázquez-Sandoval ME, Rosas-Barbosa BT. Prevalence of *Listeria monocytogenes* in raw milk in Guadalajara, México. *J Food Prot* 1995; 58:1139-1141.
- Morand-Fehr** P, Boyazoglu J. Present state and future outlook of the small ruminant sector. *Small Rumin Res* 1999; 34:75–188.
- Moreno** ER, García GA, Acedo FE, González RH, Call JE, Luchansky JB, Díaz CM. Prevalence, types, and geographical distribution of *Listeria monocytogenes* from a survey of retail queso fresco and associated cheese processing plants and dairy farms in Sonora, México. *J Food Prot* 2007; 70(11):2596-2601.
- Nandon** CA, Woodward DL, Young C, Rodgers FG, Wiedmann M. Correlations between molecular subtyping and serotyping of *Listeria monocytogenes*. *J Clin Microbiol* 2001; 39(7):2704–2707.
- Nelson** KE, Fouts DE, Mongodin EF, Ravel J, DeBoy RT, Kolonay JF, *et al.* Whole genome comparisons of serotype 4b and 1/2a strains of the food-borne pathogen *Listeria monocytogenes* reveal new insights into the core genome components of this species. *Nucleic Acids Res* 2004; 32:2386–2395.
- Neves** E, Lourenco A, Silva AC, Coutinho R, Brito L. Pulsed-field gelelectrophoresis (PFGE) analysis of *Listeria monocytogenes* isolates from different sources and geographical origins and representative of the twelve serovars. *Syst Applied Microbiol* 2008; 31:387–392.

- Nightingale** KK, Schukken YH, Nightingale CR, Fortes ED, Ho AJ, Her Z, Grohn YT, *et al.* Ecology and transmission of *Listeria monocytogenes* infecting ruminants and in the farm environment. *Appl Environ Microbiol* 2004; 70:458–4467.
- Nightingale** KK, Windham K, Martin KE, Yeung M, Wiedmann M. Select *Listeria monocytogenes* subtypes commonly found in foods carry distinct nonsense mutations in *inlA*, leading to expression of truncated and secreted internalin A, and are associated with a reduced invasion phenotype for human intestinal epithelial cells. *Appl Environ Microbiol* 2005a; 71:8764–8772.
- Nightingale** KK, Windham K, Wiedmann M. Evolution and molecular phylogeny of *Listeria monocytogenes* isolated from human and animal listeriosis cases and foods. *J Bacteriol* 2005b; 187:5537–5551.
- Nightingale** KK, Milillo SR, Ivy RA, Ho AJ, Oliver HF, Wiedmann M. *Listeria monocytogenes* F2365 carries several authentic mutations potentially leading to truncated gene products, including *inlB*, and demonstrates atypical phenotypic characteristics. *J Food Prot* 2007; 70(2):482-8.
- Nightingale** KK, Ivy RA, Ho AJ, Fortes ED, Njaa BL, Peters RM, Wiedmann M. *inlA* premature stop codons commonly found in *Listeria monocytogenes* isolated from food are responsible for virulence attenuation and confer protective immunity against infection by fully virulent *L. monocytogenes*. *Appl Environ Microbiol* 2008; 74:6570–6583.
- Noriega** RLM. *Listeria monocytogenes*: Vieja bacteria, desafío permanente. *Rev Chil Infect* 2008; 25(5):326-327.
- 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.
- OIE**, Organización Internacional de Epizootias. *Listeria monocytogenes*, capítulo 2.9.7. Manual de la OIE sobre animales terrestres 2008 pp. 1-18. Consultada Agosto 2013. http://web.oie.int/esp/normes/mmanual/pdf_es_2008/2.09.07.%20Listeria
- Olier** M, Fabrice P, Jean-Paul L, Charles D, Andréé R, Jean G. Assessment of the pathogenic potential of two *Listeria monocytogenes* human faecal carriage isolates. *Microbiology* 2002; 148:1855–1862.
- Olier** M, Pierre F, Rousseaux S, Lemaitre JP, Rousset A, Piveteau P, Guzzo J. Expression of truncated internalin A is involved in impaired internalization of some *Listeria monocytogenes* isolates carried asymptotically by humans. *Infect Immun* 2003; 71:1217–1224.
- Olier** M, Garmyn D, Rousseaux S, Lemaitre J-P, Piveteau P, Guzzo J. Truncated internalin A and asymptomatic *Listeria monocytogenes* carriage: In vivo investigation by allelic exchange. *Infect Immun* 2005; 73(1):644–648.
- Orndorff** PE, Hamrick TS, Smoak IW, Havell EA. Host and bacterial factors in listeriosis pathogenesis. *Vet Microbiol* 2006; 114:1-15.
- Orsi** RH, Ripoll D Yeung M, Nightingale KK, Wiedmann M. Recombination and positive selection contribute to evolution of *Listeria monocytogenes inlA*. *Microbiol* 2007; 153:2666–2678.
- Orsi** RH, den Bakker HC, Wiedmann M. *Listeria monocytogenes* lineages: Genomics, evolution, ecology, and phenotypic characteristics. *Int J Med Microbiol* 2011; 301:79–96.

- Painter** J, Slutsker L. Listeriosis in humans. In: Ryser ET, Marth EH, editors. *Listeria*, Listeriosis and Food safety. 3th ed. Boca Raton FL, USA: CRC Press, 2007:85-109.
- Papageorgiou** N, Scoulica E, Panoulis C, Maraki S, Christidou A, Tselentis Y. Molecular typing and pathogenic potential of *Listeria monocytogenes* isolates from food and clinical origin. 17th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases ECCMID & 25th International Congress of Chemotherapy ICC. Heraklion, GR, 2007:P1858-S532.
- Park** S, Jung J, Choi S, Oh Y, Lee J, Chae H, *et al.* Molecular Characterization of *Listeria monocytogenes* based on the PFGE and RAPD in Korea. *Advances in Microbiol* 2012; 2:605-616.
- Pentecost** M, Kumaran J, Ghosh P, Amieva MR. *Listeria monocytogenes* internalin B activates junctional endocytosis to accelerate intestinal invasion. *PLoS Pathogens* 2010; 6(5):e1000900.
- Pérez** GAJ, Basurto CM-G. Presencia de *Listeria monocytogenes* en leche cruda. Memorias de veranos de la investigación científica, Universidad de Guanajuato, México, 2011:2308-2316.
- Pimmer** R, Schuchat A, Swaminathan B. Role of foods in sporadic listeriosis II. Microbiologic and epidemiological investigation. *JAMA* 1992; 267:2046-2050.
- Portnoy** DA, Auerbuch V, Glomski IJ. The cell biology of *Listeria monocytogenes* infection: the intersection of bacterial pathogenesis and cell-mediated immunity. *J Cell Biol* 2002; 158:409–414.
- Ragon** M, Wirth T, Hollandt F, Lavenir R, Lecuit M, Le Monnier A, Brisse S. A new perspective on *Listeria monocytogenes* evolution. *PloS Pathogens* 2008; 4:e1000146.
- Ramírez** BG. Estudio de *Listeria monocytogenes* en leche de cabra (tesis maestría). Cuautitlán Izcalli (Estado de México), México: Universidad Nacional Autónoma de México, 2007.
- R Development Core Team** R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna Austria. 2011. ISBN 3-900051-07-0, URL <http://www.R-project.org/>.
- Roberts** A, Chan Y, Wiedmann M. Definition of genetically distinct attenuation mechanisms in naturally virulence-attenuated *Listeria monocytogenes* by comparative cell culture and molecular characterization. *Applied Environ Microbiol* 2005; 71:3900–3910.
- Roberts** A, Nightingale K, Jeffers G, Fortes E, Kongo JM, Wiedmann M. Genetic and phenotypic characterization of *Listeria monocytogenes* lineage III. *Microbiology* 2006a; 152:685–693.
- Roberts** AJ, Wiedmann M. Allelic exchange and site-directed mutagenesis probe the contribution of ActA amino-acid variability to phosphorylation and virulence-associated phenotypes among *Listeria monocytogenes* strains. *FEMS Microbiol Lett* 2006b; 25:4300–307.
- Roche** SM, Gracieux P, Albert I, Gouali M, Jacquet C, Martin PMV, Velge P. Experimental validation of low virulence in field strains of *Listeria monocytogenes*. *Infect and Immun* 2003; 71:3429–3436.
- Roche** SM, Gracieux P, Milohanic E, Albert I, Virlogeux-Payant I, Temoin S, *et al.* Investigation of specific substitutions in virulence genes characterizing phenotypic groups of low virulence field strains of *Listeria monocytogenes*. *Appl Environ Microbiol* 2005; 71:6039–6048.

- Roche SM, Velge P, Liu D.** Virulence Determination. In: Liu D, editor. Handbook of *Listeria monocytogenes*. Boca Ratón, FL, USA: CRC Press, 2008:241-270.
- Roche SM, Grepinet O, Corde Y, Teixeira AP, Kerouanton A, Temoin S, et al.** A *Listeria monocytogenes* strain is still virulent despite nonfunctional major virulence genes. J Infectious Dis 2009a; 200:1944–8.
- Roche SM, Kerouanton A, Minet J, Le Monnier A, Brisabois A, Velge P.** Prevalence of low-virulence *Listeria monocytogenes* strains from different foods and environments. Int J Food Microbiol 2009b; 130:151–155.
- Roche SM, Grépinet O, Kerouanton A, Ragon M, Leclercq A, Témoign S, et al.** Polyphasic characterization and genetic relatedness of low-virulence and virulent *Listeria monocytogenes* isolates. BMC Microbiol 2012; 12:304.
- 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.
- Rocourt J, Cossart P.** *Listeria monocytogenes*. In: Doyle MP, Beuchat LR, Montville TJ editors. Food Microbiology, Fundamentals and Frontiers. Washington DC, USA: ASM Press; 2000:337-352.
- Rohlf FJ.** NTSYSpc Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System Version 2.0 User Guide. Setauket, New York: Applied Biostatistics Inc, 1998:37.
- Rousseaux S, Olier M, Lemaitre JP, Piveteau P, Guzzo J.** Use of PCR-restriction fragment length polymorphism of *inlA* for rapid screening of *Listeria monocytogenes* strains deficient in the ability to invade Caco-2 cells. Appl Environ Microbiol 2004; 70:2180-2185.
- Ryser ET.** Incidence and behaviour of *Listeria monocytogenes* in unfermented dairy products. In: Ryser ET, Mart, EH, editors. *Listeria*, Listeriosis and Food safety. 3th ed. Boca Ratón FL, USA: CRC Press, 2007a:357-403.
- Ryser ET.** Incidence and behaviour of *Listeria monocytogenes* in cheese and other fermented dairy products. In: Ryser ET, Marth EH, editors. *Listeria*, Listeriosis and Food safety. 3th ed. Boca Ratón FL, USA: CRC Press, 2007b:405-501.
- Sabet C, Lecuit M, Cabanes D, Cossart P, Bierne H.** LPXTG protein InlJ, a newly identified internalin involved in *Listeria monocytogenes* virulence. Infect Immun 2005; 73, 6912–6922.
- Salas TE, Díaz AE.** Aislamiento de *Listeria monocytogenes* en caprinos de México. Téc Pec Méx 1988; 28:92-95.
- Saltijeral JA, Álvarez VB, García B.** Presencia de *Listeria* en quesos mexicanos. J Food Saf 1999; 19(4):241-247.
- Sauders BD, Fortes ED, Morse DL, Dumas N, Kiehlbauch JA, Schukken Y, et al.** Molecular subtyping to detect human listeriosis clusters. Emerg Infect Dis 2003; 9:672–680.
- Sauders BD, Mangione K, Vincent C, Schermerhorn J, Farchione CM, Dumas NB, et al.** Distribution of *Listeria monocytogenes* molecular subtypes among human and food isolates from New York State shows persistence of human disease associated *Listeria monocytogenes* strains in retail environments. J Food Prot 2004; 67:1417–1428.

- Sauders** BD, Wiedmann M. Ecology of *Listeria* species and *L. monocytogenes* in the natural environment. In: Ryser ET, Marth EH, editors. *Listeria*, Listeriosis and Food safety. 3th ed. Boca Ratón FL, USA: CRC Press, 2007:21-53.
- Sayers** EW, Barrett T, Benson DA, Bolton E, Bryant SH, Canese K, *et al.* Database resources of the National Center for Biotechnology Information. *Nucleic Acids Res* 2010; 38:5-16.
- Schlech** WF, Lavigne PM, Bortolussi RA, Allen AC, Haldane EV, Wort AJ, *et al.* Epidemic listeriosis—evidence for transmission by food. *N Engl J Med* 1983; 308:203–206.
- Schimid** MW, Eva YWN, Lampidis R, Emmerth M, Walcher M, Kreft J, *et al.* Evolutionary history of the genus *Listeria* and its virulence genes. *Sist Appl Microbiol* 2005; 28:1-18.
- SIAP-SAGARPA.** Producción, Precio, Valor, Animales Sacrificados y Peso de carne en Canal (2011). Producción, Precio, Valor, Leche de Caprino (2011). Elaborados por el Servicio de información y Estadística Agroalimentaria y Pesquera (SIAP), con información de las delegaciones de la SAGARPA. <http://www.siap.sagarpa.gob.mx> Consultado Agosto 2013.
- Smith** MC, Sherman DM. *Goat Medicine*. 2nd ed. Iowa, USA: Wiley-Blackwell; 2009:202-207.
- Smith** GA, Marquis H, Jones S, Johnston NC, Portnoy DA, Goldfine H. The two distinct phospholipases C of *Listeria monocytogenes* have overlapping roles in escape from a vacuole and cell-to-cell spread. *Infect Immun* 1995; 63:4231–4237.
- Strassburger** MM, Ramírez BG, Álvarez MCI, Tenorio GVR. Serotipificación molecular de aislamientos de *Listeria monocytogenes*. *Memorias del XII Congreso internacional de inocuidad de alimentos*. Pto. Vallarta, México, 2010:54
- Sun** AN, Camilli A, Portnoy DA. Isolation of *Listeria monocytogenes* small-plaque mutants defective for intracellular growth and Cell-to-Cell spread. *Infect Immun* 1990; 58:3770-3778.
- Swaminathan** B, Gerner-Smidt P. The epidemiology of human listeriosis. *Microbes Infect* 2007; 9:1236–1243.
- Takeuchi** K, Smith MA, Doyle MP. Pathogenicity of food and clinical *Listeria monocytogenes* isolates in a mouse bioassay. *J Food Prot* 2003; 66:2362–2366.
- Takeuchi** K, Mytle N, Lambert S, Coleman M, Doyle MP, Smith MA. Comparison of *Listeria monocytogenes* virulence in a mouse model. *J Food Prot* 2006; 69:842-826.
- Témoin** S, Roche SM, Grépinet O, Fardini Y, Velge P. Multiple point mutations in virulence genes explains the low virulence of *Listeria monocytogenes* field strains. *Microbiology* 2008; 154:939–948.
- Todd** ECD. *Listeria*: Risk assessment, regulatory control and economic impact. In: Ryser E T, Marth EH editors. *Listeria*, Listeriosis and Food safety. 3th ed. Boca Ratón FL, USA: CRC Press, 2007:767-812.
- Tompkin** RB. Control of *Listeria monocytogenes* in the food-processing environment. *J Food Prot* 2002; 65:709–725.
- USDA-ARS**, United States Department of Agriculture, Agricultural Research Service. Research Project: On Farm Ecology of *Listeria monocytogenes*. Annual Report 2003. Consultado Agosto 2013.
http://www.ars.usda.gov/research/projects/projects.htm?ACCN_NO=406820

- Van-Langendonck N**, Bailly S, Tabouret M, Marly J, Pardon P, Velge P. Tissue culture assays using Caco-2 cell line differentiate virulent from non-virulent *Listeria monocytogenes* strains. *J Appl Microbiol* 1998; 85:337-346.
- Van Stelten A**, Nightingale KK. Development and implementation of a multiplex single-nucleotide polymorphism genotyping assay for detection of virulence-attenuating mutations in the *Listeria monocytogenes* virulence-associated gene *inlA*. *Appl Environ Microbiol* 2008; 74:7365–7375.
- Van Stelten A**, Simpson JM, Ward TJ, Nightingale KK. Revelation by single-nucleotide polymorphism genotyping that mutations leading to a premature stop codon in *inlA* are common among *Listeria monocytogenes* isolates from Ready-to-eat foods but not human listeriosis cases. *Applied Environ Microbiol* 2010; 76(9):2783–2790.
- Vázquez-Boland JE**, Kuhn M, Berche P, Chakraborty T, Domínguez-Bernal G, Goebel W, *et al.* *Listeria* pathogenesis and molecular virulence determinants. *Clinical Microbiol Rev* 2001; 14(3):584-640.
- 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.
- Vines A**, Reeves MW, Hunter S, Swaminathan B. Restriction fragment length polymorphism in four virulence associated genes of *Listeria monocytogenes*. *Res Microbiol* 1992; 143(3):281–294.
- Vines A**, Swaminathan B. Identification and characterization of nucleotide sequence differences in three virulence associated genes of *Listeria monocytogenes* strains representing clinically important serotypes. *Curr Microbiol* 1998; 36(5):309–318.
- Ward TJ**, Gorski L, Borucki MK, Mandrell RE, Hutchins J, Pupedis K. Intraspecific phylogeny and lineage group identification based on the *prfA* virulence gene cluster of *Listeria monocytogenes*. *J Bacteriol* 2004; 186:4994-5002.
- Werbrouck H**, Grijspeerdt K, Botteldoorn N, Van Pamel E, Rijpens N, Van Damme J, *et al.* Differential *inlA* and *inlB* expression and interaction with human intestinal and liver cells by *Listeria monocytogenes* strains of different origins. *Appl Environ Microbiol* 2006; 72(6):3862-71.
- Wesley IV**. Listeriosis in animals. In: Ryser ET, Marth EH, editors. *Listeria*, Listeriosis and Food safety. 3th ed. Boca Ratón FL, USA: CRC Press, 2007:55-84.
- Wiedmann M**, Bruce JL, Keating C, Johnson AE, Mcdonough PL, Batt CA. Ribotypes and virulence gene polymorphisms suggest three distinct *Listeria monocytogenes* lineages with differences in pathogenic potential. *Infect Immun* 1997; 65(7):2707–2716.
- Wiedmann M**. Molecular subtyping methods for *Listeria monocytogenes*. *J AOAC int* 2002; 85:524-531.
- Wing EW**, Gregory SH. *Listeria monocytogenes*: Clinical and experimental update. *J Infect Dis* 2002; 185:18-24.
- WHO**, World Health Organization. Programmes and projects, Food Safety, Zoonoses 2008. <http://www.who.int/entity/foodsafety/en/> Consultado Agosto 2013.
- Yamada F**, Ueda F, Ochiai Y, Mochizuki M, Shoji H, Ogawa-Goto K, *et al.* Invasion assay of *Listeria monocytogenes* using Vero and Caco-2 cells. *J Microbiol Methods* 2006; 66:96-10.
- Zaretskaya I**. BLAST: a more efficient report with usability improvements. *Nucleic Acids Res* 2013; 41:29-33.

Zhou X, Jiao X, Wiedmann M. *Listeria monocytogenes* in the Chinese food system: strain characterization through partial *actA* sequencing and tissue-culture pathogenicity assays. J Medical Microbiol 2005; 54:217-224.

Zwietering MH, Jongenburger I, Rombouts FM, van't-Riet K. Modeling of the bacterial growth curve. Appl Environ Microbiol 1990; 56:1875-1881.