



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO  
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES  
CUAUTILÁN

---

---

**AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE *Listeria monocytogenes*  
 EN FRUTAS Y HORTALIZAS MÍNIMAMENTE PROCESADAS.**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

**INGENIERA EN ALIMENTOS**

PRESENTA:

**DEYCY ESCOBEDO PÉREZ**

ASESORA DE TESIS:

**DRA. CLARA INÉS ÁLVAREZ MANRIQUE**

CUAUTILÁN IZCALLI, ESTADO DE MÉXICO 2014



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



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

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

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

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



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTÓNOMA DE  
MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN  
UNIDAD DE ADMINISTRACIÓN ESCOLAR  
DEPARTAMENTO DE EXÁMENES PROFESIONALES

U.N.A.M.  
ASUNTO: VOTO APROBATORIO

M. EN C. JORGE ALFREDO CUELLAR ORDAZ  
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLAN  
PRESENTE

ATN: M. EN A. ISMAEL HERNÁNDEZ MAURICIO  
Jefe del Departamento de Exámenes  
Profesionales de la FES Cuautitlán.

Con base en el Reglamento General de Exámenes, y la Dirección de la Facultad, nos permitimos a comunicar a usted que revisamos el: Trabajo de Tesis

Aislamiento e identificación de Listeria monocytogenes en frutas y hortalizas mínimamente procesadas

Que presenta la pasante: Deycy Escobedo Pérez  
Con número de cuenta: 402031169 para obtener el Título de: Ingeniera en Alimentos

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el EXAMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestro VOTO APROBATORIO.

ATENTAMENTE  
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPÍRITU"  
Cuautitlán Izcalli, Méx. a 21 de Febrero de 2014.

PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO

	NOMBRE	FIRMA
<b>PRESIDENTE</b>	Dra. Clara Inés Álvarez Manrique	
<b>VOCAL</b>	IBQ. Leticia Figueroa Villarreal	
<b>SECRETARIO</b>	IA. Sandra Margarita Rueda Enriquez	
<b>1er. SUPLENTE</b>	M. en C. María Guadalupe Amaya León	
<b>2do. SUPLENTE</b>	IA. Ana María Sabina de la Cruz Javier	

NOTA: los sinodales suplentes están obligados a presentarse el día y hora del Examen Profesional (art. 127).

## AGRADECIMIENTOS

*A la Universidad Nacional Autónoma de México, por haberme otorgado el regalo más valioso que es el conocimiento, a la Facultad por haber recibido de ella una formación profesional y una educación de calidad, por los excelentes profesores de los que tuve la oportunidad de aprender, por haber permitido seguir preparándome, al departamento de Bacteriología por todo el apoyo y las facilidades prestadas en la realización de esta tesis.*

*Me gustaría que estas líneas sirvieran para expresar mi más profundo y sincero agradecimiento a todas aquellas personas que con su ayuda han colaborado en la realización del presente trabajo, en especial a la Dra. Clara Inés Álvarez asesora de tesis por la orientación, seguimiento y la supervisión continua de la misma, pero sobre todo por la motivación y el apoyo recibido a lo largo de estos años.*

*A mis sinodales IBQ. Leticia Figueroa Villarreal, IA. Sandra Margarita Rueda Enríquez, M. en C. María Guadalupe Amaya León, IA. Ana María Sabina de la Cruz Javier gracias por su tiempo y sus comentarios los cuales fueron de gran ayuda y enriquecieron este proyecto.*

***Detrás de cada sueño siempre hay personas que nos apoyan y creen en nosotros. Son seres especiales que nos animan a seguir adelante en nuestros proyectos brindándonos de diferente manera su solidaridad y quienes me alentaron a lograr esta hermosa realidad.***

***A mis padres Ma. Magdalena Pérez y Rosalio Escobedo, que son los seres más maravillosos de todo el mundo, gracias por el apoyo moral, su cariño y comprensión, por guiar mi camino y estar junto a mí en todo momento, agradezco el esfuerzo para la culminación de mi carrera profesional y el hacerles sentirse orgullosos de esta persona que tanto los ama.***

***A mi hermana gracias por ser la mejor amiga y hermana ejemplar por ayudarme cada día a cruzar con firmeza el camino de la superación y gracias por la bendición de mis tres angelitos Ale, Axel y Ángel.***

***A mi amorcito José Juan Angel por su ayuda en impulsarme a terminar este proyecto y enseñarme que hay que disfrutar cada día e ir cambiando nuestras estrellas, Te amo.***

***A la familia Angel Martínez, por su apoyo y comprensión.***

***A mis amigos y compañeros, por el apoyo y el tiempo que pasamos juntos., en especial a Esther Zúñiga quien me ha enseñado el disfrutar la vida plenamente y superar cualquier contratiempo.***

## ÍNDICE DE CONTENIDO

	Pag.
ÍNDICE DE TABLAS	i
ÍNDICE DE DIAGRAMAS	ii
ÍNDICE DE FIGURAS	ii
ÍNDICE DE GRÁFICOS	iii
<b>INTRODUCCIÓN</b>	<b>1</b>
<b>CAPÍTULO 1.-GENERALIDADES</b>	<b>3</b>
1.1. Enfermedades transmitidas por alimentos	3
1.1.1. Enfermedades transmitidas por alimentos de origen bacteriano	4
1.1.2. Dosis infecciosa	6
1.2. Género <i>Listeria</i>	8
1.3. Características generales de <i>Listeria monocytogenes</i>	9
1.3.1. Propiedades de virulencia	10
1.4. Antecedentes históricos de <i>Listeria monocytogenes</i>	14
1.5. Importancia de <i>Listeria monocytogenes</i> en la salud pública	15
1.6. Principales factores que contribuyen a las toxiinfecciones alimentarias.	15
1.6.1. Fisiopatología de la infección listerial	15
1.6.2. Síntomas de listeriosis	16
1.6.3. Particularidades ecológicas	18
1.6.4. Factores de contaminación de frutas y hortalizas	19
1.6.5. Brotes	21
1.6.6. Estatus de <i>L. monocytogenes</i> en la legislación de alimentos	23
1.7. Características del cultivo y detección.	23
1.7.1. Crecimiento	24
1.7.2. Métodos de detección convencionales	25
1.7.2.1. Pre-enriquecimiento selectivo	27
1.7.2.2. Enriquecimiento selectivo	27
1.7.2.3. Aislamiento	28
1.7.2.4. Identificación	29
1.7.3. Métodos de detección rápidos	29
1.7.3.1. Pruebas de identificación de género	29
1.7.3.1.1. Reacciones de inmunoprecipitación VIP (Visual immunoprecipitate assay).	29
1.7.3.1.2. Ensayos inmunoenzimáticos Locate® ( <i>Listeria</i> , screening test for <i>Listeria</i> species).	30
1.7.3.2. Pruebas de identificación de <i>Listeria monocytogenes</i>	32
1.7.3.2.1. BBL™ CHROMagar™ <i>Listeria</i> .	32

1.7.3.2.2. Pruebas bioquímicas que emplean sustratos convencionales fluorogénicos y cromogénicos modificados (BD BBL Crystal™, identification system id kit for gram positives).	33
1.7.3.2.3. Reacción en cadena de la polimerasa.	34
<b>CAPÍTULO 2.-OBJETIVOS</b>	<b>37</b>
<b>CAPÍTULO 3.-METODOLOGÍA</b>	<b>38</b>
3.1. Cuadro metodológico	39
3.2. Muestras	40
3.3. Preparación de las muestras	40
3.4. Aislamiento de <i>Listeria</i>	41
3.4.1. Pruebas de identificación del género <i>Listeria</i>	43
3.4.1.2. Tinción de Gram	43
3.4.1.3. Confirmación del Gram	43
3.4.1.4. Prueba de la Catalasa	43
3.4.1.5. Prueba de la oxidasa (método de Kovac)	44
3.4.2. Reacciones de inmunoprecipitación VIP (Visual immunoprecipitate assay).	44
3.4.3. Ensayos inmunoenzimáticos Locate ( <i>Listeria</i> , screening test for <i>Listeria</i> species).	45
3.4.4. BBL CHROMagar <i>Listeria</i> , medio cromogénico para la diferenciación e identificación.	46
3.5. Identificación de las especies de <i>Listeria</i>	46
3.5.1. Pruebas bioquímicas tradicionales	46
3.5.1.1. Prueba de movilidad a 25° C	46
3.5.1.1.1. Movilidad en fresco (Gota pendiente)	47
3.5.1.1.2. Movilidad en agar	47
3.5.1.2. Prueba de fermentación de hidratos de carbono	47
3.5.1.3. Prueba de hemólisis	47
3.5.1.4. Test de CAMP	48
3.5.1.5. Reducción de Nitrato	49
3.5.2. BD BBL Crystal, identification system id kit for gram positives.	49
3.6. Confirmación de la especie <i>Listeria monocytogenes</i>	52
3.6.1. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).	52
3.6.1.1. Extracción de ADN	53
3.6.1.1.1. Preparación de la muestra	54
3.6.1.1.2. Fijación del DNA	56
3.6.1.1.3. Lavado del DNA	57
3.6.1.1.4. Separación del DNA	58
3.6.1.1.5. Electroforesis	59
3.6.1.1.6. Reacción en Cadena de la Polimerasa PCR	62

<b>CAPÍTULO 4.- RESULTADOS</b>	63
4.1. Aislamiento de <i>Listeria monocytogenes</i>	64
4.2. Identificación del género <i>Listeria spp.</i> por morfología colonial	65
4.3. Confirmación del género <i>Listeria spp.</i>	66
4.3.1. Identificación de la presencia del género <i>Listeria spp.</i> para cada grupo formado según procedencia, mediante la prueba de inmunoprecipitación visual (VIP).	66
4.3.2. Identificación del género <i>Listeria spp.</i> para cada cepa sospechosa mediante pruebas inmunoenzimáticas (Locate®)	67
4.3.3. Identificación del género <i>Listeria spp.</i> para cada cepa sospechosa por método cromogénico (CHROMagar®)	68
4.5. Identificación de las especies de <i>Listeria</i>	69
4.5.1. Identificación de las especies de <i>Listeria</i> por medio de pruebas bioquímicas tradicionales para cada cepa sospechosa.	69
4.5.2. Identificación de las especies de <i>Listeria</i> por medio de pruebas bioquímicas que emplean sustratos convencionales fluorogénicos y cromogénicos modificados (BBL Crystal®) para cada una de las colonias sospechosas	74
4.5.3. Confirmación de <i>Listeria monocytogenes</i> mediante la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) para cada una de las colonia sospechosa.	75
<b>CAPÍTULO 5.-ANÁLISIS DE RESULTADOS</b>	78
<b>CONCLUSIONES</b>	84
<b>Bibliografía</b>	85



## ÍNDICE DE TABLAS

	Pag.
Tabla 1. Factores que contribuyen a los brotes de enfermedades transmitidas por alimentos.	3
Tabla 2. Características de algunos patógenos microbianos que se han relacionado con brotes de enfermedades asociadas con los alimentos.	7
Tabla 3. Caracterización de especies de <i>Listeria</i> .	8
Tabla 4. Principales proteínas de virulencia en <i>L. monocytogenes</i> .	13
Tabla 5. Serología de las diferentes especies de <i>Listeria</i> .	14
Tabla 6. Las fuentes de microorganismos patógenos en productos frescos y las condiciones que influyen en su supervivencia y crecimiento.	19
Tabla 7. Grupos de alimentos con riesgos asociados de <i>Listeria</i> .	20
Tabla 8. Brotes de enfermedades alimentarias debidas a <i>L. monocytogenes</i> .	21
Tabla 9. Retiros de productos del mercado ( julio-septiembre 2012).	22
Tabla 10. Límites de crecimiento de <i>L. monocytogenes</i> .	24
Tabla 11. Medios de cultivo recomendados por ciertas instituciones nacionales para la detección de <i>Listeria monocytogenes</i> .	26
Tabla 12. Caldos de enriquecimiento selectivo de <i>Listeria</i> (concentración de agentes selectivos)	26
Tabla 13. Substratos empleados en el sistema BBL Crystal.	33
Tabla 14. Identidades y secuencia de <i>L. monocytogenes</i> Internalina genes de primers determinación de especies y virulencia.	35
Tabla 15. Identidades y Secuencias de Pimers de <i>Listeria</i> para la Identificación de Especies Especificas.	36
Tabla 16. Muestreo y nomenclatura de cócteles y en saladas según lugar de procedencia.	40
Tabla 17. Colonias sospechosas del género <i>Listeria spp.</i> en agar Oxford modificado en dos periodos de incubación, para cada grupo según procedencia.	64
Tabla 18. Resultados de pruebas bioquímicas primarias para cepas sospechosas del género <i>Listeria spp.</i>	65
Tabla 19. Resultado de la identificación de colonias sospechosas del género <i>Listeria spp.</i> por reacciones de inmunoprecipitación.	66
Tabla 20. Resultados de la reacción inmunoenzimática de cepas sospechosas del género <i>Listeria spp.</i> mediante la prueba Locate®.	67
Tabla 21. Resultados de la reacción de medios cromogénicos para las cepas sospechosas del género <i>Listeria spp.</i> con placas de CROMagar®.	68
Tabla 22. Resultado de las pruebas bioquímicas tradicionales para las especies de <i>Listeria</i> de las cepas sospechosas de cada grupo.	70
Tabla 23. Resultado de la identificación de las especies de <i>Listeria</i> mediante pruebas bioquímicas tradicionales de las cepas sospechosas para cada grupo.	72
Tabla 24. Resultado de la identificación de las especies de <i>Listeria</i> por medio de sustratos convencionales fluorogénicos y cromogénicos modificados de las cepas sospechosas.	74
Tabla 25. Confirmación de las cepas sospechosas para la especie <i>Listeria monocytogenes</i> mediante PCR.	76
Tabla 26. Resultado de las pruebas efectuadas para la identificación de género y especie de <i>Listeria</i> a cada cepa sospechosas de cada grupo.	80
Tabla 27. Resultado de la especie <i>Listeria monocytogenes</i> por PCR para cada tipo de muestra y lugar de procedencia.	83

## ÍNDICE DE DIAGRAMAS

	Pag.
Diagrama 1. Mecanismo patogénico de <i>L.monocytogenes</i> y su distribución tisular.	12
Diagrama 2 Listeriosis: Caracterización de la enfermedad.	17
Diagrama 3. Hábitat de <i>L. monocytogenes</i> y vías de contaminación.	18
Diagrama 4. Aislamiento e identificación de <i>Listeria monocytogenes</i> .	42
Diagrama 5. Sistema BBL CRYSTAL de identificación gram (+).	50
Diagrama 6. Preparación de reactivos para la extracción de ADN.	54
Diagrama 7. Preparación de la muestra para la extracción de ADN.	55
Diagrama 8. Fijación de ADN.	56
Diagrama 9. Lavado de ADN.	57
Diagrama 10. Separación de ADN.	58
Diagrama 11. Electroforesis.	60

## ÍNDICE DE FIGURAS

	Pag.
Figura 1. Representación esquemática de la biología de la infección intracelular por <i>L. monocytogenes</i> .	11
Figura 2. Pruebas de inmunoabsorción ligada a enzimas.	30
Figura 3. <i>L. innocua</i> y <i>L. monocytogenes</i> en placas de Chromagar.	32
Figura 4. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).	35
Figura 5. VIP (Visual immunoprecipitate assay).	44
Figura 6. Kit Locate® <i>Listeria spp</i> R-Biopharm.	45
Figura 7. <b>BD BBL™ CHROMagar™ <i>Listeria</i></b> .	46
Figura 8. <b>B-hemolisis de <i>L. monocytogenes</i> en agar sangre.</b>	48
Figura 9. <b>Prueba de CAMP para <i>L. monocytogenes</i> con <i>S. aureus</i>.</b>	48
Figura 10. BD BBL Crystal, identification system id kit for gram positives.	49
Figura 11. Prueba BBL Crystal gram (+).	51
Figura 12. Perfil de resultados prueba BBL Crystal gram (+).	51
Figura 13. Lectura de resultados para la prueba BBL Crystal gram (+).	52
Figura 14. Kit para PCR Master Mix Promega.	53
Figura 15. Kit gDNA ChargeSwitch®.	53
Figura 16. Colonias de <i>Listeria</i> en agar Oxford modificado.	64
Figura 17. Tinción de Gram positivo, bacterias en forma de cocobacilos.	66
Figura 18. VIP (Visual immunoprecipitate assay) positivo.	66
Figura 19. LOCATE® <i>Listeria spp</i> . prueba positiva.	67
Figura 20. <b>BD BBL™ CHROMagar™ <i>Listeria</i></b> , prueba positiva para <i>L. monocytogenes</i> / <i>L. Ivannovi</i> .	69
Figura 21. Movilidad en medio SIM.	71
Figura 22. Reducción de nitritos.	71
Figura 23. Prueba de CAMP.	71
Figura 24. Productos de PCR empleando los primers LIM2 y LIMRE para la replicación del gen <i>iap</i> con amplificación de 175pb.	77

## ÍNDICE DE GRÁFICOS

	Pag.
Gráfico 1. Resultados de la identificación de las especies de <i>Listeria</i> mediante pruebas bioquímicas.	73
Gráfico 2. Resultados de la identificación de las especies de <i>Listeria</i> para cada grupo de muestras mediante pruebas bioquímicas.	73
Gráfico 3. Resultados de la identificación de la especie de <i>Listeria monocytogenes</i> para cada grupo de muestras mediante la prueba BBL Crystal®.	75
Gráfico 4. Porcentaje de identificación de cepas de <i>L.monocytogenes</i> para cada una de las zonas muestreadas, por medio de la prueba PCR	77
Gráfico 5. Porcentaje de identificación de especies de <i>Listeria</i> en cada uno de los métodos empleados.	79

## INTRODUCCIÓN

Las enfermedades transmitidas por alimentos son aquellas que se originan por la ingestión de alimentos naturales, preparados, o por bebidas simples como el agua, infectados con agentes patógenos afectando la salud del consumidor en forma individual o colectiva, originando enfermedades provocadas por patógenos, tales como bacterias, virus, hongos, parásitos o componentes químicos, que se encuentran en su interior (González et al., 1993).

Tanto los países desarrollados como en los que se encuentran en vías de desarrollo, las enfermedades causadas por alimentos son uno de los problemas de salud más importantes. En el 2005, de acuerdo con la Dirección General de Epidemiología de México, las infecciones intestinales ocuparon el segundo lugar dentro de las enfermedades que aquejan a la república.

Entre 1993 y 2002, ocurrieron 152 brotes de enfermedades transmitidas por alimentos en Argentina que ocasionaron 3309 casos y 4 muertes. Mientras que en los demás países de América Latina y el Caribe se produjeron, durante el mismo período, 6324 brotes de ETA, que provocaron 228,579 casos y 314 muertes. Estos son los brotes que fueron notificados al Sistema Regional de Vigilancia Epidemiológica de las ETA del Instituto Panamericano de Protección de Alimentos y Zoonosis (PANALIMENTOS). En México, en el periodo de 1980-1989, se notificaron a la Dirección General de Epidemiología 314 brotes de ETA con un total de 12344 casos y 348 defunciones (Parrilla et al., 1993 y Bourgeois, 1994).

De acuerdo con el Sistema Único de Información para la Vigilancia Epidemiológica de la Secretaria de Salud, 1999, hubo un total de 6,864,686 casos notificados de enfermedades potencialmente causadas por alimentos; sin embargo, es importante considerar que en México, existe una falta de información en cuanto a las necesidades de notificar este tipo de enfermedades.

Hoy en día, *L. monocytogenes* se considera uno de los agentes más importantes de enfermedades de transmisión alimentaria. Las explicaciones posibles de la emergencia de la listeriosis humana transmitida por alimentos como un asunto del máximo interés de Salud Pública comprenden los cambios importantes en la producción, procesamiento y distribución de los alimentos, la utilización cada vez mayor de la refrigeración como medio de conservación primaria; la capacidad de este microorganismo para crecer en muchos alimentos a temperaturas refrigeradas permite la multiplicación a partir de una población inicialmente baja (incluida en las materias primas que originalmente albergaban al patógeno y la que contamina los productos después del calentamiento), un nivel capaz de causar infección durante la refrigeración de los alimentos. Los cambios en los hábitos de comida de la población, particularmente el incremento en el consumo de alimentos respecto a la comodidad de los alimentos ya preparados “listos para comer”, que se almacenan durante largos periodos, y el hecho de que se consuman sin un apropiado calentamiento en horno de microondas, ha dado margen a que este patógeno cause daño (Ray y Arun, 2010), asociado a su severidad y alta tasa de mortalidad causando infecciones graves principalmente en los recién nacidos, mujeres embarazadas, ancianos y personas inmunocomprometidas. Las principales manifestaciones sintomáticas son septicemias, infecciones del sistema nervioso central, abortos y meningitis.

La venta de alimentos en la vía pública en América Latina está en aumento, estimulada por las dificultades económicas que enfrenta la sociedad, el desempleo, que crea innumerables vendedores callejeros potenciales, la demanda de alimentos baratos cerca de los lugares de trabajo y la escasez o ausencia de establecimientos permanentes que sirvan ese tipo de alimentos. Este tipo de comercio contribuye a un gran número de empleos y movilización de recursos siendo un factor socioeconómico importante. Desde el punto de vista sanitario, las deficientes prácticas de higiene en la preparación de esos alimentos y las instalaciones inadecuadas tienden a presentar riesgos considerables para la salud (Primo et al., 1995).

Las frutas y hortalizas frescas son una parte importante de la dieta humana en todo el mundo debido a los beneficios de salud y su fácil consumo. En México el consumo de frutas y hortalizas ha ido en aumento y son expendidas con frecuencia en puestos callejeros, los que pueden estar contaminados con agentes patógenos tales como la *Listeria monocytogenes*, que ha sido aislada en vegetales mínimamente procesados y que tiene la capacidad de sobrevivir y crecer incluso a bajas temperaturas (Allende et al., 2007 y Beauchat, 2002). Este patógeno ha causado brotes de toxiinfecciones alimentarias, encontrándose en una gran variedad de materias primas y alimentos procesados como leche, productos lácteos, carne de vacuno, carne de cerdo, salchichas, vegetales como rábanos, col, en mariscos y productos pesqueros (González et al., 1993). Así como en heces fecales, el suelo, las aguas de ríos y canales (Beauchat, 1999).

La patogénesis de la infección bacteriana incluye el inicio del proceso infeccioso y los mecanismos que inducen el desarrollo de signos y síntomas de la enfermedad. Las características de las bacterias patógenas incluyen transmisibilidad, adherencia a las células del huésped, invasión de células y tejidos del huésped, toxigenicidad y capacidad para evadir al sistema inmunitario del huésped (Brooks, Bute y Ornston, 2002).

Algunos países han establecido límites legales del número de microorganismos que son permisibles en alimentos, en especial en alimentos listos para el consumo. El gobierno de los Estados Unidos tienen las políticas más rigurosas, en las cuales, cualquier alimento listo para el consumo que contenga este microorganismo puede considerarse contaminado y como consecuencia, debe ser retirado del mercado o decomisado (Jay et al., 2005). La Norma Oficial Mexicana NOM-121-SSA1-1994 Bienes y servicios. Quesos: frescos, maduros y procesados establece la ausencia de este patógeno en 25 g, en caso de detectar la presencia, la Secretaria de Salud, ordenará la realización de un plan de trabajo, para controlar dicho patógeno.

Para determinar este tipo de enfermedades bacterianas que son transmitidas por alimentos requieren del uso de medios de diagnóstico microbiológicos cada vez más rápidos y eficientes. Es así, que las empresas productoras de medios para detección y recuento de microorganismos han desarrollado una gran variedad de medios de cultivos, kits y equipos que permiten un diagnóstico cada vez más rápido, que conducen a obtener resultados sobre la presencia de determinado patógeno en tan solo 24 a 48 horas, frente a métodos tradicionales que requieren de entre 5 a 7 días para obtener un resultado.

Por ello en este trabajo se detectará la presencia de *Listeria monocytogenes* en ensaladas y cocteles de fruta, mediante diferentes técnicas microbiológicas y se evaluará su eficiencia.

## CAPÍTULO 1.- GENERALIDADES

### 1.1. Enfermedades Transmitidas por Alimentos

Las enfermedades transmitidas por alimentos (ETAs) son aquellas que se originan por la ingesta de alimentos y/o agua infectados con agentes contaminantes en cantidades suficientes para afectar la salud del consumidor.

Los agentes responsables de la ETAs contaminantes pueden ser: bacterias, virus, parásitos, sustancias químicas, metales, tóxicos de origen vegetal y sustancias químicas tóxicas que provienen de herbicidas, plaguicidas, fertilizantes. Los síntomas de este tipo de enfermedades varían de acuerdo al tipo de contaminación y la cantidad de alimento ingerido, entre otros factores. Se desarrollan entre 1 a 7 días después de haber ingerido el alimento, dando signos comunes como diarreas y vómitos, dolores abdominales, dolores de cabeza, fiebre, dificultades renales, problemas de visión, etc. (González y Rojas, 2005). Algunos factores que contribuyen a los brotes de enfermedades transmitidas por los alimentos son mostrados en la Tabla 1.

<b>Tabla 1. Factores que contribuyen a los brotes de enfermedades transmitidas por alimentos.</b>	
<b>Factor contribuyente</b>	<b>%<sup>a</sup></b>
<i>Factores relativos al crecimiento microbiano</i>	
Almacenamiento a temperatura ambiente	43
Enfriamiento inadecuado	32
Preparación mucho antes del consumo	41
Tiempo de retención con calor inadecuado	12
Aprovechamiento de restos de comida	5
Descongelación y almacenamientos incorrectos	4
Preparación de cantidades muy grandes	22
<i>Factores relacionados con la supervivencia microbiana</i>	
Recalentamiento inadecuado	17
Tratamiento térmico deficiente	13
<i>Factores relacionados con la contaminación</i>	
Empleados de empresas alimentarias	12
Alimentos procesados contaminados sin enlatar	19
Alimentos crudos contaminados	7
Contaminación cruzada	11
Limpieza deficiente del equipo	7
Fuentes inseguras	5
Alimentos enlatados contaminados	2

<sup>a</sup>Los porcentajes superan el total (100) porque a menudo son múltiples o varios los factores que contribuyen a las ETAs. (Forsythe, 2000)

### 1.1.1. Enfermedades transmitidas por alimentos de origen bacteriano

Son aquellas que resultan de la presencia de bacterias infectivas o sus toxinas en un alimento y que actúan cuando son ingeridas. Estas enfermedades transmitidas por alimentos se dividen en dos grupos: en infecciones e intoxicaciones.

Las *infecciones*, son aquellas enfermedades que resultan de la ingestión de alimentos o agua que contienen microorganismos vivos perjudiciales como bacterias, virus, hongos, parásitos, que en el intestino humano pueden multiplicarse y/o producir toxinas.

Las *intoxicaciones*, son las ETAs producidas por la ingestión de toxinas formadas en tejidos animales o vegetales o de productos metabólicos de los microorganismos en los alimentos o por sustancias químicas incorporadas de manera accidental o intencionalmente (Pascual, Anderson y Calderón 2000).

El consumo de alimentos contaminados por bacterias patógenas productoras de enfermedades, pueden no modificar el aspecto, ni otras características del alimento (olor, sabor, color o textura), por lo que su presencia y multiplicación no se observa a simple vista ni en alimentos crudos ni en elaborados.

Las ETAs de origen bacteriano son las que se presentan comúnmente y los responsables más frecuentes son:

\* ***Clostridium perfringens***:

Son comunes en carnes vacunas, pollo, salsas cocidas y no refrigeradas. Se encuentra en desagües, tracto intestinal de animales y seres humanos o tierra, se desarrolla en ambientes con ausencia o poco oxígeno. Prolifera en los recipientes que contienen comida que se enfrían muy lentamente o que están a temperatura ambiente.

\* ***Escherichia coli O157:H7***:

Se transmite por vía fecal oral, de persona a persona, la transmisión más frecuente es por agua y alimentos contaminados. Como el organismo puede vivir en el intestino del ganado saludable, la carne puede contaminarse durante el proceso de sacrificio por contacto fecal. Los alimentos más comunes son: carnes crudas o mal cocidas, leche mal pasteurizada, embutidos, lácteos y hortalizas crudas.

\* ***Clostridium botulinum***:

El botulismo es una intoxicación resultante de la ingestión de alimentos en los cuales *C. botulinum* se ha desarrollado y ha producido la toxina botulínica. Es posible encontrarlos en alimentos más frecuentemente en frutas, vegetales y pescados preparados en forma casera (conservas, mermeladas, condimentos). También se puede encontrar en alimentos empacados al vacío o ahumados.

\* ***Campylobacter jejuni***:

Se encuentra en el tracto intestinal de animales, agua no potable y desagües. Es la causa más común de diarrea. Los alimentos contaminados más comunes son: leche no pasteurizada, agua contaminada, carnes rojas, carnes blancas y mariscos crudos o mal cocinados.

\* ***Shigella***:

Es una bacteria cuyo único reservorio es el ser humano, se presenta en grupos de mayor vulnerabilidad. Se transmite por vía fecal oral directa (contacto físico directo), a través de un vehículo (juguetes, utensilios, etc) o indirecta (al contaminar los alimentos) desde una persona enferma. Los brotes de la enfermedad han sido asociados con medidas sanitarias deficientes, suministros de agua inadecuados, alimentos contaminados, condiciones de hacinamiento e infestación de moscas.

\* ***Yersinia enterocolitica***:

Los alimentos involucrados en brotes epidémicos por este microorganismo han sido la carne, mejillones, ostras, helados, chocolate, en algunos casos probablemente la infección en el hombre es debida al contacto con animales, los productos especialmente crudos o poco cocinados del cerdo, la leche no pasteurizada, beber el agua no tratada puede también transmitir la infección (González y Rojas, 2005).

\* ***Staphylococcus aureus***:

Las bacterias estafilococos son difíciles de evitar ya que están en el aire, en el polvo, en las aguas residuales, en el agua, en la leche y en los alimentos. Los brotes son comunes cuando las personas que manipulan los alimentos diseminan en ellos las infecciones cutáneas y luego los dejan a temperatura ambiente permitiendo el desarrollo de bacterias. Cualquier tipo de alimento que necesite manipulación es susceptible de infectarse, aunque las carnes, las ensaladas de huevo o de atún y los productos lácteos, especialmente la leche cruda, son los ambientes más comunes de reproducción de las bacterias.

\* ***Bacillus cereus***:

Tiene una toxina resistente al calor, normalmente, la causa de la presencia de *B. cereus* en los alimentos, asociada a enfermedades de origen alimenticio, se debe al manejo inadecuado de los mismos después de cocinarlos. Se encuentra en alimentos crudos o cocidos, arroz cocido recalentado, carne cocinada, cremas con alto contenido en almidón, verduras y pescado.

\* ***Vibrio parahaemolyticus***:

Es una bacteria de hábitat marino, tiene como reservorios: sedimento, partículas suspendidas, plancton, pescados y mariscos (almejas, ostiones, camarón, calamar y cangrejo) (Zamora, 2005).



\* *Salmonella spp*:

Puede encontrarse fácilmente en nuestra cadena alimenticia y el medio ambiente. Esta bacteria patógena produce salmonellosis es ocasionada por la ingestión de carne infectada, pollo, leche cruda, huevos, productos que contienen huevo, repollo y otros alimentos de los que se sospeche, e inclusive el agua para beber contaminada.

\* *Listeria monocytogenes*:

Está ampliamente distribuida en el ambiente, se encuentra en tierra y agua, los vegetales llegan a ser contaminados directamente por la tierra o simplemente de estiércol usado como fertilizante. Está presente en animales saludables (especialmente el ganado vacuno, ovejas y aves), estos pueden tener la bacteria y ser asintomáticos pero pueden contaminar alimentos de origen animal como carnes y producto lácteos. También está presente en el alcantarillado, la vegetación y materia vegetal, agua de arroyos, forraje conservado en silos, y en el hombre.

Puede estar presente en una amplia variedad de alimentos frescos y procesados, incluso la leche como es el caso de leches no pasteurizadas (crudas) o alimentos fabricados con esta, como queso fresco (blando), los productos cárnicos (especialmente productos de carne cruda o derivados sin cocinar como lo son: cortes de cecinas en vitrinas refrigeradas y vienasas), las aves y sus productos, los productos vegetales como ensaladas y alimentos del mar como pescados y mariscos (Sirveta, 2002).

### **1.1.2. Dosis infecciosa**

La dosis infecciosa (números mínimos de los organismos necesarios para causar la enfermedad) es muy bajo, en muchos casos, lo que significa que el microorganismo necesita sólo contaminar el alimento para sobrevivir sin reproducirse. Por ejemplo, parásitos y virus patógenos son incapaces de multiplicarse fuera de un huésped humano o animal y sólo necesitan sobrevivir en números suficientes para causar enfermedad (Adams y Moss, 1997). En la Tabla 2 se muestran las características de bacterias patógenas que suelen ser más comunes en los alimentos.

**Tabla 2.- Características de algunos patógenos microbianos que se han relacionado con brotes de enfermedades asociadas con los alimentos**

Microorganismo	Características	Periodo de incubación	Síntomas	Dosis Infecciosas (UFC)
<i>Clostridium botulinum</i>	Bacilo de la familia <i>Bacillaceae</i> , aerobio estricto, formador de esporas termoresistentes.	12 a 36 h	Náuseas, vómitos, fatiga, mareos, sequedad de boca y garganta, parálisis muscular, dificultad para tragar, respirar, visión doble o borrosa y párpados caídos.	10–100 esporas
<i>Escherichia coli</i> O157: H7	Bacilo de la familia <i>Enterobacteriaceae</i> , anaerobio facultativo, no esporulado.	2 a 5 d	La diarrea con sangre, dolor abdominal, síndrome hemolítico urémico e insuficiencia renal, especialmente en niños y ancianos.	10-1000
<i>Salmonella</i> spp.	Bacilo de la familia <i>Enterobacteriaceae</i> , no esporulado pequeño, anaerobio facultativo,	18 a 72 h	Dolor abdominal, diarrea, escalofríos, fiebre, náuseas, vómitos.	10 a 100,000
<i>Shigella</i> spp.	Bacilos Gram negativos, no móviles, no esporulados e incapaces de fermentar la lactosa.	1 a 3 d	Dolor abdominal, diarrea, fiebre, vómitos	10 a 100
<i>Listeria monocytogenes</i>	Bacilo pequeño, móvil, no esporulado, próximo a la familia <i>Lactobacillaceae</i> , anaerobio facultativo psicotrofo.	1 a 5 o más semanas (90 días)	Gastroenteritis febril en adultos sanos, severa septicemia, aborto espontáneo o muerte fetal en mujeres embarazadas y meningitis en los recién nacidos e inmunodeprimidos, la mortalidad puede ser de 20 a 40%.	10 <sup>3</sup> -10 <sup>5</sup>
<i>Campylobacter jejuni</i>	Bacilo con forma de espiral de la familia <i>Vibrionaceae</i> , móvil, no esporulado, termotrofo, microaerófilo,	1 a 10 días	Diarrea frecuentemente con presencia de sangre en las heces, dolor abdominal, fiebre, dolor de cabeza, náuseas y/o vómitos.	400-500
<i>Staphylococcus aureus</i>	Cocobacilo de la familia <i>Staphylococcaceae</i> , pequeño, anaerobio facultativo, no esporulado.	1 a 6 h	Infecciones de la piel (forúnculos, ampollas, vejigas) y abscesos cutáneos, neumonía meningitis, endocarditis, síndrome de shock toxico y sepsis.	10 <sup>5</sup> -10 <sup>6</sup>
<i>Bacillus cereus</i>	Bacilo de la familia <i>Bacillaceae</i> , anaerobio facultativo, formador de esporas resistente al tratamiento térmico.	8 a 16 h	Diarrea profusa y acuosa, vómitos dolor abdominal.	10 <sup>5</sup> -10 <sup>11</sup>
<i>Yersinia enterocolitica</i>	Bacilo o cocobacilo de la familia <i>Enterobacteriaceae</i> , anaerobio facultativo, psicotrofo.	1 a 14 días	Dolor, la fiebre y dolores abdominales pueden ser los síntomas predominantes, y se pueden confundir con apendicitis, diarrea, que es a menudo sangrienta.	10 <sup>9</sup>
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	Bacilo de la familia <i>Vibrionaceae</i> , anaerobio facultativo, móvil, no esporulado, halófilo.	12 a 24 h	Diarrea acuosa con moco y sangre, cólicos abdominales, fiebre, náuseas, vómitos, cefalea, gastroenteritis, septicemia e infección de heridas	10 <sup>5</sup> - 10 <sup>7</sup>

(Bello et al., 2000; Busta, 2011 y González y Rojas, 2005)

## 1.2- El género *Listeria*

El género *Listeria* pertenece a la subrama de *Clostridium* junto con *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Lactobacillus* y *Brochotrix*. La posición filogenética de *Listeria* es compatible con su bajo contenido de G + C (36 a 42%). Con base en la hibridación DNA-DNA al análisis de las enzimas multiloculares y al secuenciado del rRNA 16S (Doyle, Beuchat y Monteville, 2007). El género *Listeria* está constituido por seis especies: *Listeria innocua*, *Listeria welshimeri*, *Listeria seeligeri*, *Listeria ivanovii*, *Listeria grayi*, *Listeria murrayi*. Únicamente dos especies de este género son patógenas: *L. monocytogenes* asociada con infección en humanos y animales y *Listeria ivanovii* asociada únicamente con infección en animales (Seeliger y Jones, 1986 y Torres et al., 2005).

Se trata de bacilos gram positivos, que no forman esporas, todas las especies de *Listeria* producen catalasa, pero no oxidasa, e hidrolizan la esculina. No obstante, estas especies pueden distinguirse por su diferente capacidad de fermentar carbohidratos y hemolizar la sangre.

Los resultados obtenidos con la fermentación de xilosa, ramnosa, y manitol, la capacidad hemolítica sobre el medio agar sangre y la prueba de Christie, Atkins, Munch y Peterson (CAMP) las cuales sirven para diferenciar a nivel de especie las cepas aisladas y catalogadas como pertenecientes al género *Listeria*, son descritas en la Tabla 3 (Labbé y Garcia, 2001).

<i>Listeria spp.</i>	Hemolítico (beta)	Nitrato	Ácidos			CAMP		Azucares			Mol %
			Manitol	Ramnosa	Xilosa	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Rodococcus E</i>	Dextrosa	Esculina	Maltosa	G + C
<i>L. monocytogenes</i>	+	-	-	+	-	-	-	+	+	+	37-39
<i>L. ivanovii</i>	+	-	-	-	+	-	+	+	+	+	37-38
<i>L. innocua</i>	-	-	-	bv	-	-	-	+	+	+	36-38
<i>L. welshimeri</i>	-	-	-	bv	+	-	-	+	+	+	36
<i>L. seeligeri</i>	+	-	-	-	+	-	-	+	+	+	36
<i>L. grayi</i>	-	-	+	-	-	-	-	+	+	+	41-42
<i>L. murrayi</i>	-	+	+	bv	-	-	-	+	+	+	41-42

(NOM-143-SSA1-1995; y Jay et al., 2005)

Algunos estudios han comprobado que *Listeria grayi* y *Listeria murrayi* son una misma especie, desapareciendo *Listeria murrayi*, que fue la última en describirse. Se ha descrito recientemente una nueva subespecie de *L. ivanovii* (*Listeria ivanovii* subespecie *londoniensis*) (Reguera et al., 1995).

### **1.3- Características generales de *Listeria monocytogenes***

La especie *L. monocytogenes* está integrada por bacilos cortos, de extremos redondeados y, a veces, puntiagudos (cocobacilos), de 0,5 - 2 micras de largo por 0,5 micras de grueso, con las puntas redondeadas (Cliver, 1990). Observados al microscopio se presentan aislados, en parejas o cadenas cortas de 3-5 elementos, teniendo en ocasiones, aspecto de V y/o empalizadas.

En cultivos frescos, las células forman cadenas cortas, pero en condiciones de estrés, como en presencia de alto contenido de sal (>5%) o temperaturas elevadas (>45°C), las cadenas pueden parecer alargadas o en cadenas largas (Ray y Arun, 2010).

Carecen de cápsula y esporos Gram positivos, aunque en cultivos viejos pueden aparecer como Gram negativos al perder su capacidad de retener el colorante.

#### **Movilidad:**

Son móviles, mediante flagelos peritricos de 1 a 5, confiriéndole movilidad cuando se cultiva a 20-25°C. La movilidad es mucho menor o se pierde por completo al cultivar la bacteria a 37°C. El característico movimiento caótico puede observarse directamente mediante un examen microscópico de una preparación en gota pendiente.

Los flagelos son altamente antigénicos, y por ello se usan para producir anticuerpos que sirven en inmunoensayos para la detección de *L. monocytogenes* (Ray y Arun, 2010).

#### **Oxígeno:**

*Listeria monocytogenes* crece sin problemas en condiciones aerobias y microaerófilas. El crecimiento óptimo se produce en una atmósfera constituida por 5% de oxígeno y 5.10% de dióxido de carbono (Reguera et al., 1995).

El crecimiento de esta bacteria en agar sangre demuestra su actividad  $\beta$ -hemolítica, aunque a veces sólo se aprecie una estrecha zona de hemólisis. Este microorganismo es homofermentativo, rindiendo lactato, acetato y acetoina al metabolizar la glucosa en aerobiosis.

#### **Temperatura:**

El intervalo de temperaturas que le permite crecer va desde 1°C hasta 45°C, situándose la óptima entre 30°C y 37°C comportándose como un microorganismo psicotrófico. Para que se destruya este microorganismo son necesarios 70°C, aplicados durante 2 a 3 minutos siempre que esta temperatura/tiempo, alcance el centro del producto (Pascual, Anderson y Calderón, 2000).

A temperaturas de refrigeración su crecimiento es lento, siendo su tiempo de generación entre 30 y 40 horas en leche a unos 4°C (Reguera et al., 1995).

Como característica particular, presenta una inusual resistencia a los ambientes extremos (resistiendo temperaturas de  $-0.4^{\circ}\text{C}$  y  $50^{\circ}\text{C}$ ), e incluso temperaturas de hasta  $-20^{\circ}\text{C}$  durante dos años, viable después de congelación y descongelación reiteradas (Blood y Radostits, 1992).

Se aprovecha su capacidad de multiplicación en temperaturas bajas como un factor de diferenciación, realizando enriquecimientos en refrigeración antes de proceder al aislamiento del patógeno a partir de un alimento (Yousef y Carlstrom, 2006).

En alimentos como camarones, se ha aislado luego de tratamientos térmicos de  $100^{\circ}\text{C}$  por 3 minutos cuando la contaminación es importante. Además, como resiste la deshidratación, el polvo ambiental puede ser un vehículo importante en la contaminación de los productos en la línea de procesamiento industrial (Arrieta, 1989). Además, tiene la capacidad de poder resistir la pasteurización considerándose un microorganismo termodúrico (Mayorga, 2004).

Si después, de la manipulación o la conservación inadecuada, la bacteria puede reaparecer y proliferar de nuevo permaneciendo latente durante semanas en condiciones de congelación, por debajo de los  $-18^{\circ}\text{C}$  (ICMSF, 1996).

#### **pH:**

Esta bacteria puede crecer en condiciones ácidas teniendo un amplio intervalo de pH entre 4.3 hasta 10.0, pasando estos límites inhibe su crecimiento, pero puede sobrevivir (Yousef y Carlstrom, 2006).

#### **Sales:**

También en presencia de cloruro de sodio al 10%, y sobrevivir en soluciones de salmuera refrigerada de cloruro de sodio al 25,5 % por 4 meses (Marth y Steele, 1998).

### **1.3.1. Propiedades de virulencia**

Las bacterias de *Listeria monocytogenes* poseen toxinas alterantes de las membranas (toxinas de tipo II), estas toxinas constan de las subunidades A y B, que no se separan y actúan rompiendo las membranas de las células del hospedero, por ejemplo la listeriolisina O. Se subdividen en toxinas que forman canales (formadoras de poros) permitiendo la salida del contenido citoplasmático de la célula hospedadora, provocando fugas.

Antes de llegar al intestino, los organismos de *Listeria* ingeridos deben soportar el ambiente adverso del estómago, esto indica que la acidez gástrica (pH 2.0) pueden destruir un número significativo de los organismos de *Listeria* que se ingieren con alimentos contaminados, además de la exposición de enzimas proteolíticas, sales biliares y ataques inflamatorios no específicos, en gran parte a través de las acciones de varios genes de respuesta al estrés (*opuCA*, *lmo1421*, y *bsh*) y proteínas relacionadas (Vázquez-Boland, 2001).

En un modo típico de la infección, entra en el anfitrión a través de alimentos contaminados, se adhiere a la mucosa intestinal, posiblemente son los residuos de  $\alpha$ -D-galactosa de la superficie bacteriana los que se unen a sus receptores de las células intestinales e invaden las células de la mucosa. Las bacterias se incorporan por fagocitosis inducida, al ser fagocitadas por los pseudópodos de las células epiteliales, formándose las correspondientes vesículas (Forsythe, 2001).

*Listeria monocytogenes* es encerrada y rodeada de una membrana vesicular a la que rompe utilizando hemolisina O (responsable de la zona de hemólisis  $\beta$  que rodea a las colonias aisladas de agar sangre). La bacteria también produce catalasa y superoxidodismutasa que la protegen de la exposición oxidativa en el fagosoma como se muestra en la Figura 1 (Forsythe, 2001).

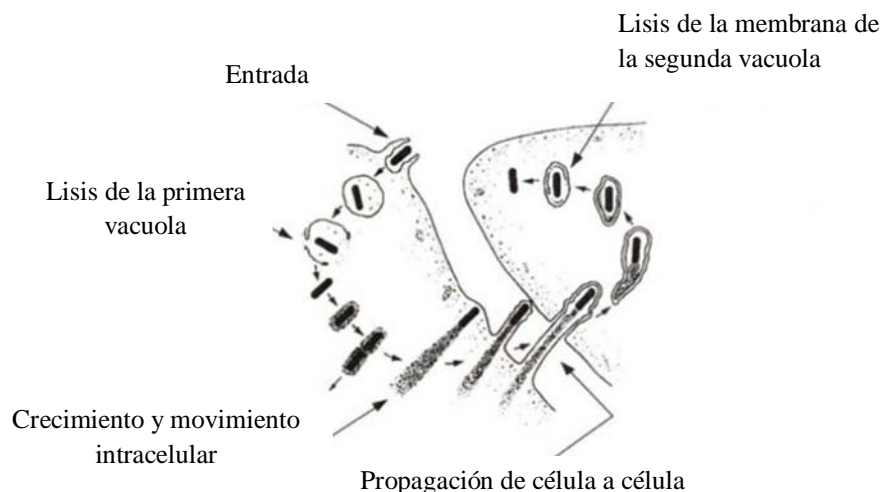


Figura 1. Representación esquemática de la biología de la infección intracelular por *L. monocytogenes*

La listeriolisina O LLO (529 aminoácidos, 58 kDa proteína codificada por hly) es un formador de poros, es una hemolisina, debido al empleo de células sanguíneas para detectar la presencia de la toxina; se comporta como un importante factor de virulencia, *L. monocytogenes* elabora asimismo dos fosfolipasas C, enzimas que rompen las membranas de las células hospedadoras al hidrolizar sus lípidos, como el fosfatidilinositol–fosfolipasa C (PI-PLC), PI-PLC (una proteína de 33 kDa codificada por plcA), actuando en sinergia con fosfatidilcolina–fosfolipasa-C (PC-PLC una proteína de 29 kDa codificada por plcB), LLO ayuda en la lisis de las primeras vacuolas (Dongyou, 2010).

Las citolisinas tilo-activadas ligadas al colesterol (52-60Kda) se unen al colesterol de la célula hospedadora formando poros de unos 30-40nm, como la listeriolisina (Forsythe, 2001).

En el citoplasma de la célula hospedadora la bacteria se multiplica rápidamente (doblando posiblemente la población cada 50 minutos). Para invadir las células adyacentes las bacterias se mueven por el citoplasma polimerizando la actina y formando así colonias largas. Este tipo de movilidad le permite desplazarse de 0.1-1.5µm/seg la movilidad intracelular y la propagación célula a célula de *L. monocytogenes* necesita reservar otra proteína de superficie, ActA (una proteína de 67 kDa codificada por actA) (Dongyou, 2010). La bacteria origina protusiones en las células adyacentes, repitiendo el ciclo (Forsythe, 2001) mostrado en la Diagrama 1.

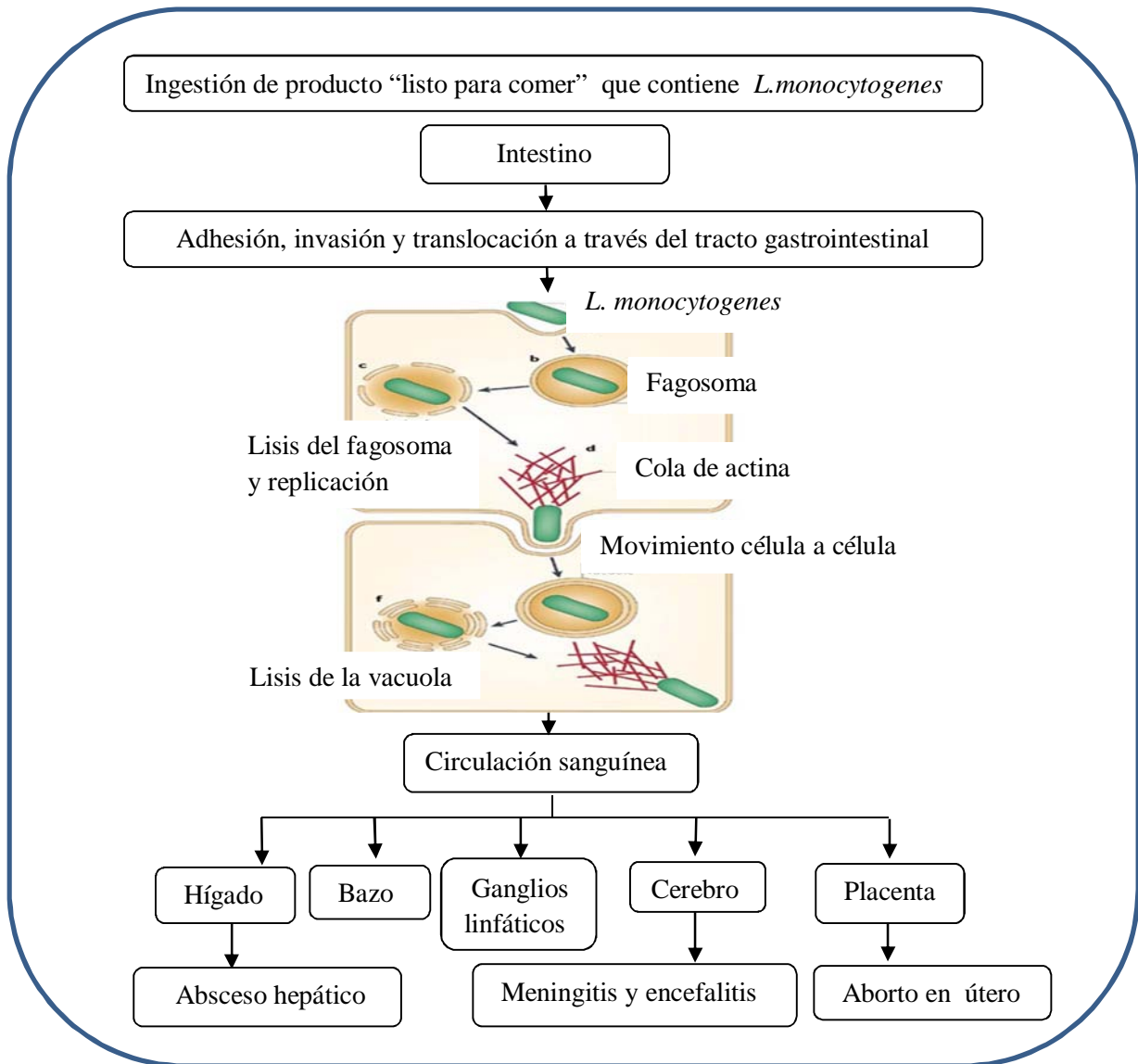


Diagrama 1. Mecanismo patogénico de *L. monocytogenes* y su distribución tisular (Ray y Arun, 2010)

Además de estos genes asociados con la virulencia y proteínas, muchos otros genes como el *iap* (codificación asociada a la invasión proteica, o *Iap*, ahora conocido como p60) juegan papeles esenciales en la virulencia y patogenicidad de *L. monocytogenes*. La pertenencia a la familia de proteínas con otros dos nombres en *L. monocytogenes* (p45, un peptidoglicano (PG) proteína lítica codificada por el gen *spl*, y la hipotética proteína codificada por *lmo394*), p60 es una proteína altamente básica de 484 aminoácidos con un papel indirecto en la modificación del comportamiento bacteriano a través de su impacto en la división celular (Vázquez-Boland, 2001 y Dongyou, 2010). En la Tabla 4 se muestran las funciones de las principales proteínas de virulencia asociadas.

**Tabla 4. Principales proteínas de virulencia en *L. monocytogenes***

Factores de virulencia	Tamaño (kDa)	Función
Factor regulador de proteína (PerfA)	27	Regulación de la expresión de la proteína de virulencia.
Internalina ( InlA)	80	Responsable de la invasión de las células epiteliales del intestino y placenta durante el embarazo.
Internalina B ( InlB)	70	Entrar en los hepatocitos, y la fase hepática de la infección.
Proteína de invasión virulenta ( Vip)	96	Invasión de células epiteliales.
Proteína de adhesión <i>Listeria</i> ( LAP)	104	Adhesión a las células epiteliales del intestino.
Amidasa autolisina	102	Adhesión a las células del hospedero.
Listeriolisina (LLO)	58-60	Una hemolisina responsable de la lisis de los eritrocitos. También ayuda al escape de las bacterias de las vacuolas dentro de las células.
Proteína de polimerización de actina (ActA)	90	Nucleación de la cola de actina por el movimiento bacteriano dentro del citoplasma.
Hidrolasa de sales biliares (BSH)	36	Supervivencia en el intestino.
Fosfolipasa	29 a 33	Lisis de la membrana de las vacuolas.
Metaloproteasa	29	Ayuda a la síntesis de PCL.

(Ray y Arun, 2010)

La constitución antigénica de *L. monocytogenes* posee 13 (1 al 13) factores antigénicos somáticos (0) termoestables y 4 (A, B, C, D) antígenos flagelares (H) termolábiles. De acuerdo con su estructura antigénica, se distinguen tres grupos serológicos: 1/2, 3 y 4; y 13 serotipos: 1/2a, 1/2b, 1/2c, 3a, 3b, 3c, 4a, 4ab, 4b, 4c, 4d, 4e y 7 (Reguera et al., 1995), siendo más frecuentes las de tipo 1/2a, 1/2b y 4b aisladas de personas enfermas (Mayorga, 2004). La Tabla 5 presenta las relaciones serológicas de *Listeria spp.*



**Tabla 5. Serología de las diferentes especies de *Listeria***

Especie	Serovariedad
<i>L. monocytogenes</i>	½ a, ½ b, ½ c, 3a, 3b, 3c, 4a, 4ab, 4c, 4d, 4e, “7”
<i>L. ivanovii</i>	5
<i>L. innocua</i>	4ab, 6a, 6b, In <sup>a</sup>
<i>L. welshimeri</i>	6a, 6b
<i>L. seeligeri</i>	½ b, 4c, 4d, 6b, In <sup>a</sup>

In<sup>a</sup>, indefindo (FDA, 2012)

#### 1.4. Antecedentes históricos

*Listeria monocytogenes* fue aislada por primera vez a principios del siglo XX como un bacilo Gram positivos en muestras de tejido de pacientes infectados.

En 1891, el investigador francés Hayen, describió por primera vez unos organismos pequeños Gram positivos con forma de vara aislados de tejidos humanos. Dos años más tarde, en Alemania, Henle aisló unos organismos muy similares a los descritos por Hayen en 1911.

En 1919, Hülphers denominó esta bacteria *Bacillus hepatis*, aislada en tejido de hígado necrótico de conejos. En 1926, el nombre de la especie *monocytogenes* fue dada por Murray y sus colegas para describir un bacilo nuevo, con potentes monocitosis productores de actividad en conejos y conejillos de indias (ICMSF, 1996).

En 1927, en honor al cirujano británico Lord Joseph Lister, Pirie propuso el nombre de *Listerella hepatolytica*, bacilo responsable de una epizootia entre los roedores en la región del río Tigre del Sur de África (Ryser y Marth, 2007).

En 1929, el primer aislamiento de estas bacterias a los humanos fueron reportados por Nyfeldt, el cual aisló esta bacteria a partir de sangre de pacientes que sufrían una enfermedad parecida a la mononucleosis infecciosa. En 1936, Burn, aisló el microorganismo de cadáveres de neonatos e implicó a la bacteria como causa de meningitis en adultos. Otro caso en seres humanos, en 1940, fue dado su nombre definitivo de *Listeria monocytogenes* (Groisman, 2001).

Otros nombres aplicado a lo que presumiblemente fue *L. monocytogenes* son: *Bacterium hepatitis*, *B. monocytogenes*, *Corynebacterium infantisepticum*, *C. parvulum*, *Erysipelothrix monocytogenes*, *Listerella hepatolytica*, *L. monocytogenes hominis*, *L. ovis* y *Listeria infantiseptica* (Cliver, 1990).

## **1.5. Importancia de *Listeria monocytogenes* en la salud pública.**

*Listeria monocytogenes* se ha aislado del agua, la leche, ensilado, de las aguas residuales, de las heces de muchos animales, e incluso de las heces de las personas. En los bovinos, puede producir mastitis y abortos, y los animales infectados eliminan el microorganismo en la leche. Otros animales infectados, entre los que se incluyen los óvidos y las gallinas, pueden actuar como fuentes del microorganismo en los alimentos (Frazier y Westhoff, 2000).

La listeriosis humana es una enfermedad que se adquiere por ingestión de dicho patógeno presente en alimentos. Siendo el resultado de interacciones complejas entre varios factores que reflejan cambios en los modelos sociales, estos factores incluyen:

- a) El progreso médico y los siguientes cambios demográficos, por ejemplo la proporción creciente de personas inmunocomprometidas y de personas mayores.
- b) El cambio en la producción de alimentos de primera necesidad (producción en gran escala de materias primas, las modificaciones en la tecnología del tratamiento de los alimentos, la expansión de la industria agrícola, el desarrollo de sistemas de almacenaje frío).
- c) Los cambios en hábitos alimenticios (mayor demanda en los consumidores del alimento que tienen un sabor a recién cocido, que se puede comprar listo para comer, refrigerado, o congelado, que puede ser preparado rápidamente, y que esencialmente necesita poca cocción antes del consumo), y los cambios en las costumbres de manipulación y preparación (Doyle, 2007).

Se incluye una transmisión secundaria entre una madre y el feto o recién nacido. El desenlace de la listeriosis puede ser grave, con un porcentaje de fatalidad que puede estimarse entre el 20 y el 30% en el sector de la población de mayor riesgo, es decir, personas inmunodeprimidas, mujeres gestantes, niños, fetos y ancianos. Se estima que este espectro de individuos comprende el 15-20% de la población y se espera que aumente debido a la tendencia a incrementar la esperanza de vida (ICMSF, 2004).

## **1.6. Principales factores que contribuyen a las toxiinfecciones alimentarias**

### **1.6.1. Fisiopatología de la infección listerial**

La patogenicidad de *L. monocytogenes* se debe a la capacidad para adherirse, invadir y multiplicarse dentro de una gran variedad de células no fagocíticas (enterocitos, hepatocitos, fibroblastos, células endoteliales y células dendríticas). Esta propiedad, ha sido estudiada detalladamente en cultivos celulares, y es el punto de partida para el análisis fisiopatológico de la listeriosis humana.

La entrada de *L. monocytogenes* y la colonización de los tejidos del hospedero se lleva a cabo en cuatro etapas:

- a. Cruce de la barrera intestinal: Antes de alcanzar el intestino, las *L. monocytogenes* ingeridas tiene que soportar el ambiente adverso del estómago (Doyle 2007). Al menos 13 proteínas de estrés oxidativo y 14 proteínas de “shock” tóxico, son inducidas bajo condiciones de estrés en *L. monocytogenes* (Vázquez-Boland, 2001).
- b. Multiplicación en el hígado: Las células de *Listeria*, cruzan la barrera intestinal a través de la linfa y la sangre hacia los nódulos linfáticos mesentéricos, el bazo y el hígado. Infecciones experimentales de ratones por vía intravenosa han mostrado que *L. monocytogenes* es retirada rápidamente de la corriente sanguínea por los macrófagos residentes en el bazo y el hígado. El sitio principal de multiplicación bacteriana en el hígado es el hepatocito.
- c. En humanos la infección placentaria es caracterizada por numerosos microabscesos e inflamación de las vellosidades con necrosis focal. La colonización de la membrana trofoblástica seguida por la traslocación a través de la barrera endotelial, permite a la bacteria alcanzar la corriente sanguínea fetal, conduciendo a una infección generalizada y la posterior muerte del feto en útero o la muerte prematura del neonato infectado con lesiones piogranulomatosas miliares (Vázquez-Boland, 2001).
- d. Invasión del cerebro: en humanos, la infección del sistema nervioso central se presenta en forma de meningitis, sin embargo, esta meningitis está asociada frecuentemente con la presencia de focos infecciosos en el parénquima cerebral, especialmente en el tallo cerebral lo que sugiere *L. monocytogenes* tiene tropismo por el tejido nervioso (Torres et al., 2005).

### 1.6.2. Síntomas de listeriosis

La listeriosis, causada por la bacteria *Listeria monocytogenes* está considerada una de las intoxicaciones alimentarias más letales. En adultos la enfermedad listeriosis, es caracterizada por dos síndromes primarios, una forma invasiva de la enfermedad contra una forma no invasiva, representado en el Diagrama 2.

Los síntomas de la listeriosis en personas sanas inmunocompetentes son confundidos con los síntomas de la gripe (dolor de cabeza, letargia, fatiga, mialgia). Es debido a esto que para los propósitos de tasación del riesgo a ella se hacen distinciones entre listeriosis no invasiva, con los síntomas suaves de una gripe (también referida como gastroenteritis listerial), y listeriosis invasiva.

En el caso de listeriosis no invasiva, los síntomas están más asociados con el sistema digestivo (diarrea, dolor abdominal, náuseas, vómitos y calambres) (FDA, 2001).

La enfermedad invasiva, puede tener un largo periodo de incubación (sobre los tres meses) y un amplio rango de síntomas como: fiebre, alteraciones gastrointestinales o dolor muscular, la infección se extiende a través del sistema nervioso, lo que da lugar a otros síntomas como pérdida del equilibrio, dolor de cabeza o confusión, y puede desembocar bacteriemia, meningitis bacteriana, infección del sistema nervioso central, encefalitis, endocarditis, meningococcal meningitis, septicemia, enfermedad neonatal, osteomielitis, peritonitis, infección pleural, neumonía, en el caso de mujeres embarazadas hay partos prematuros y abortos (Labbé, 2001).

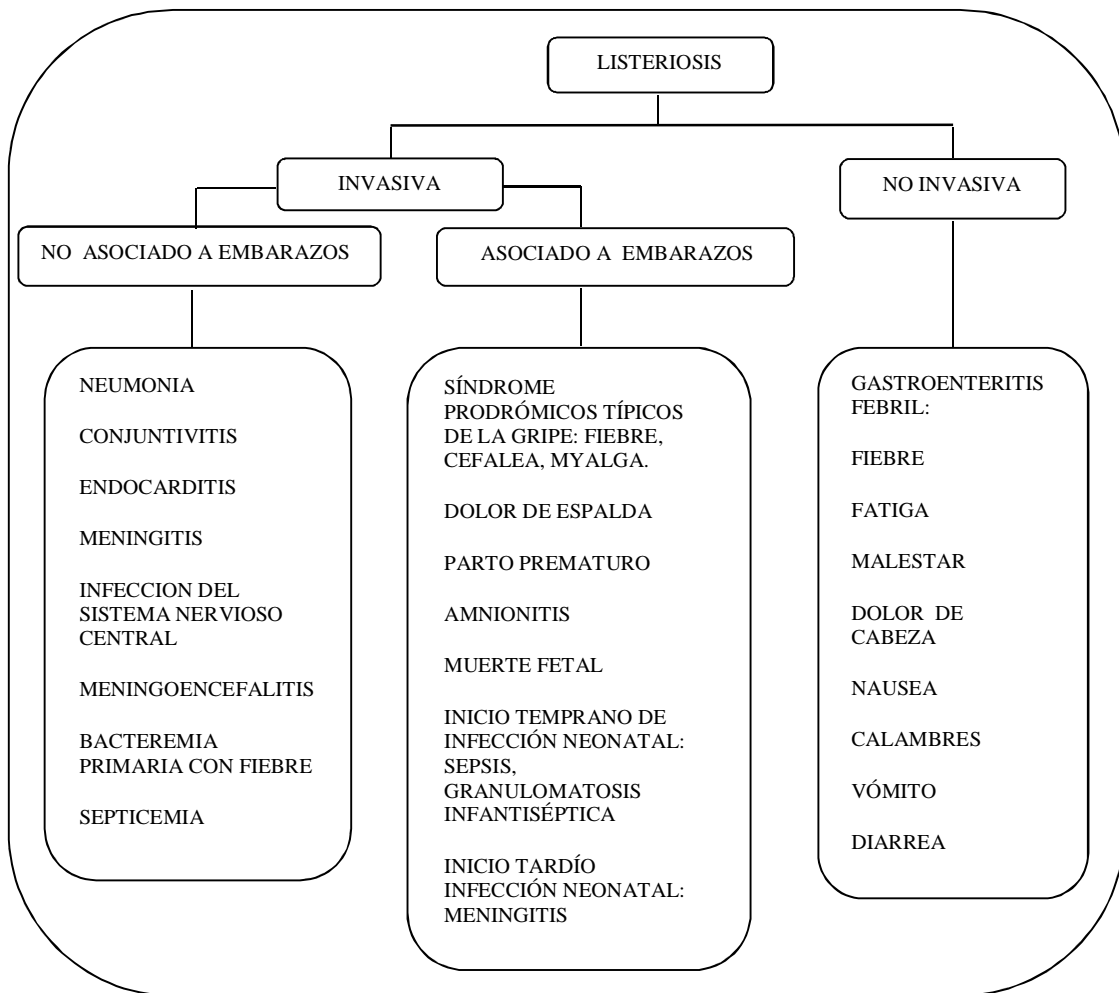


Diagrama 2 Listeriosis: Caracterización de la enfermedad (Labbé, 2001)

Afecta seriamente a personas que están en situación de riesgo, como embarazadas, recién nacidos (10 casos por 100,000 habitantes), ancianos (1.4 casos por 100,000 habitantes), o personas con el sistema inmunitario deprimido, así como las personas sometidas a trasplantes de órganos y malignidades hematológicas, hemocromatosis, diabetes mellitus, cirrosis y falla renal con hemodiálisis o diálisis peritoneal (Schlech, 2000; Mayorga, 2004; y FDA, 1992).

*Listeria monocytogenes* puede invadir los ojos y la piel por exposición directa (Cliver, 1990).

La condición de portador fecal es un factor de riesgo para otros individuos más que para el propio portador, sin embargo, los portadores pueden convertirse en enfermos si se presenta un factor desencadenante, por ejemplo, gestación, inmunodepresión, etc. (Reguera et al., 1995).

### 1.6.3. Particularidades ecológicas

Son reservorios de *Listeria monocytogenes*: los intestinos o vejiga de seres humanos que pueden ser portadores asintomáticos, animales domésticos, animales salvajes, aves, huevo, roedores, artrópodos, peces, crustáceos, larvas de insectos, batracios, ambiente, aguas superficiales, aguas de estanques, aguas de río, aguas de alcantarillado, alimentos procesados con calor y preparaciones listas para comer, plantas y vegetales en especial los tubérculos (papa y rábanos); suelo, se han aislado con frecuencia en distintas áreas de procesamiento de alimentos y en las áreas de almacenamiento, etc. (Pascual, Anderson y Calderón, 2000 & Ray y Arun, 2010).

Los alimentos donde se ha aislado son numerosos, entre ellos: leches y productos lácteos; carnes y productos cárnicos; canales de aves y alimentos vegetales.

*L. monocytogenes* es uno de los patógenos transmitidos por alimentos, esto puede dar lugar, en parte a las posibles vías de transmisión a seres humanos a través de la contaminación de las verduras frescas, como se muestra en el Diagrama 3 (Beuchat, 1996).

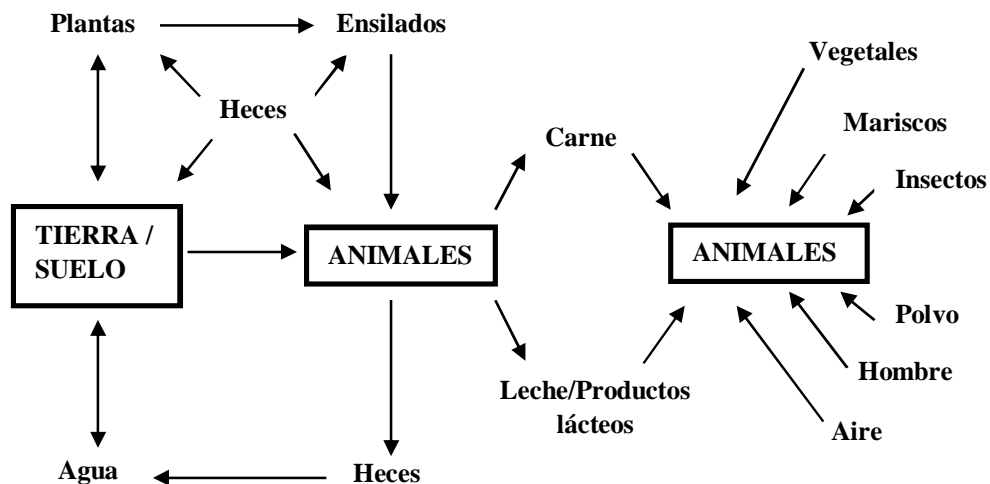


Diagrama 3. Hábitat de *L. monocytogenes* y vías de contaminación (Reguera et al., 1995)

#### 1.6.4. Factores de contaminación de frutas y hortalizas

Una gran variedad de factores contribuye a la contaminación de frutas y hortalizas por microorganismos causantes de enfermedades a los humanos. Algunos de los factores que pudieran considerarse de riesgo en la calidad microbiológica de los productos frescos incluyen: el uso de agua de riego contaminada con materia fecal de humanos y animales; procesos inadecuados en los campos de cultivo; prácticas deficientes de desinfección; condiciones inapropiadas durante empaque; higiene deficiente de los trabajadores; y el mal manejo durante almacenamiento y transporte, ver Tabla 6. Aunado a esto, una vez que ocurre la contaminación, muchos microorganismos patógenos poseen la capacidad de sobrevivir por largos períodos de tiempo en frutas y hortalizas frescas. Algunos microorganismos son también capaces de sobrevivir a procesos de desinfección, e incluso de multiplicarse en el producto durante almacenamiento.

**Tabla 6. Las fuentes de microorganismos patógenos en productos frescos y las condiciones que influyen en su supervivencia y crecimiento**

<b>Antes de la cosecha</b>
Suelo
El agua de riego
El abono verde o compost inadecuado
Aire (polvo)
Los animales salvajes y domésticos
Manipulación humana
Agua para otros usos (por ejemplo, pesticidas, tratamientos foliares, hormonas del crecimiento)
<b>Post-cosecha</b>
Manejo humano (trabajadores, consumidores)
El equipo de recolección
Transporte de contenedores (campo del envasado cobertizo)
Los animales salvajes y domésticos
Aire (polvo)
Agua de lavado y enjuague
Equipo de clasificación, embalaje, corte y procesamiento posterior
Hielo
Los vehículos de transporte
Almacenamiento incorrecto (temperatura, ambiente físico)
Embalaje inadecuado (incluye las nuevas tecnologías de envasado)
La contaminación cruzada (otros alimentos en las áreas de almacenamiento, preparación y presentación)
Visualización de la temperatura incorrecta
La manipulación inadecuada después de la compra al por mayor o al por menor
El agua de refrigeración (por ejemplo, hidroenfriamiento)

(Busta, 2011)

*Listeria monocytogenes* se encuentra presente con frecuencia en hortalizas frescas (rábanos, pepino, col, plantas), las hortalizas para ensalada de acidez baja, los tomates y las zanahorias no son un sustrato adecuado para su crecimiento (Doyle, 2007).

En un estudio sobre la supervivencia y el crecimiento de *L. monocytogenes* en alimentos, se observó la incidencia de *Listeria spp.*, incluyendo *L. monocytogenes*, en 10 diferentes variedades de verduras en crudo sin lavar (en un total de 1000 muestras) obtenidos a partir de dos supermercados del área de Minneapolis entre octubre de 1987 y agosto de 1988, se detectaron en una o más muestras de col, pepino, lechuga, champiñones, patatas y rábanos, pero no se encuentran en el brócoli, zanahorias, coliflor, o tomates. *Listeria monocytogenes*, *L. innocua*, *L. welshimeri*, y *L. seeligeri* fueron recuperados de 5.0, 2.6, 0.8, y 1.3% de todos los productos crudos examinados, respectivamente (Beuchat, 1995).

Teniendo en cuenta que las zanahorias poseen algunas inherentes, actividades antilisteriales, parece que los tubérculos como las papas y rábanos con frecuencia se encuentran más *Listerias* viables que en otras verduras, debido a su estrecha asociación con el suelo. Por ello la importancia del saneamiento y manejo para minimizar la contaminación con *L. monocytogenes* de ensaladas y verduras.

Otro factor considerado en la contaminación por *L. monocytogenes* en ensaladas de vegetales es probablemente el resultado de una manipulación incorrecta por parte de los trabajadores de servicio de alimentos y no por la contaminación natural de la materia prima. Durante la elaboración de alimentos cabe mencionar que este patógeno es capaz de adherirse a varios tipos de superficie (que incluyen el acero inoxidable, el vidrio y el caucho), y en ocasiones han sido encontradas biopelículas (Ray y Arun, 2010).

La Administración de Alimentos y Fármacos (FDA) llevó a cabo en el 2003 un estudio para evaluar el riesgo de transmisión alimentaria por *L. monocytogenes*, se analizaron un gran número de productos “listos para comer” y los clasificó en cinco categorías en base al riesgo que conllevan, ver la Tabla 7.

**Tabla 7. Grupos de alimentos con riesgos asociados de *Listeria***

Categoría de riesgo	Alimentos
Muy alto	Carnes frías y salchichas de tipo alemán (no recalentadas).
Alto	Productos lácteos con alto contenido de grasa. Leche líquida pasteurizada. Sesos y derivados de la carne. Quesos suaves no madurados. Productos marinos ahumados. Leche líquida no pasteurizada.
Moderado	Crustáceos cocidos y ensaladas “listas para comer”. Embutidos fermentados secos y semisecos. Quesos suaves frescos. Frutas. Queso semisuave. Queso suave madurado. Vegetales. Salchichas recalentadas.
Bajo	Pescados conservados, alimentos marinos crudos.
Muy bajo	Productos lácteos cultivados. Queso duro. Helados de crema y quesos procesados.

(Ray y Arun, 2010)

## 1.6.5. Brotes

Se han asociado muchos alimentos, tanto a casos esporádicos como brotes alimentarios con niveles desde 100 hasta  $1 \times 10^9$  UFC/g, mostrándose algunos casos en la Tabla 8.

**Tabla 8. Brotes de enfermedades alimentarias debidas a *L. monocytogenes***

Lugar (año)	Núm. de casos (muertes)	Perinatal / no perinatal	UFC/g	Alimento implicado	Serotipo	Referencia
Boston, USA (1979)	20 (5)*	0/20	NC**	Apio crudo, tomate, lechuga	4b	Ho y col, 1986
Nueva Zelanda (1980)	29 (9)	22/7	NC	Marisco, pescado crudo	Mayoría 1/2b	Lennon y col, 1994
Maritime Prov. (1981)	41 (17)	34/7	NC	Ensalada de col.”	4b	Sohlech y col, 1983
Massachusetts, EE UU (1983)	49 (14)	7/42	NC	Leche pasteurizada.”	4b	Fleming y col, 1985
California, EE UU (1985)	142 (48)	93/49	$10^3 - 10^4$	Queso blanco fresco	4b	Linnan y col, 1988
Suiza (1983-1987)	122 (31)	65/57	$10^4 - 10^6$	Quesos de leche cruda	4b	Bille, 1990
Connecticut, EE UU (1989)	9 (1)	2/7	NC	Gambas. “	4b	Riedo y col, 1994
Reino Unido (1987-1989)	355 (94)&	185/129#	$<10^2 - 10^6$	Paté. “	4b	McLauchlin y col, 1991
Australia (1990)	11** (6)	11/0	$8.8 \times 10^3$	Paté. “	1/2a	Kittson y col, 1992
Nueva Zelanda (1992)	3 (2)	2/1	NC	Mejillones ahumados	1/2a	Baker y Wilson y col, 1998
Francia (1993)	39 (12)	31/8	$<100 - 1.1 \times 10^4$	Paté	4b	Goulet, 1995
Francia (1992)	279 (85)	92/187	NC	Lengua de cerdo con gelatina	4b	Coblet y col, 1993
Italia (1993)	23 (0)	0/23	NC	Ensalada de arroz. “	1/2b	Salamina, 1996
EE UU (1994)	45 (0)	1/44	$2.9 \times 10^{11}$	Chocolate lacteado	1/2b	Dalton, 1997
Francia (1995)	20 (4)	9/11	NC	Queso blando de leche cruda	4b	Goulet y col, 1995
Finlandia (1999)	18 (4)	0/18	$<100 - 1.15 \times 10^4$	Mantequilla	3a	Lyytikäinen y col, 1996
EE UU (1998-1999)	101 (20)	NC	NC	Frankfurters en lonchas	4b	CDC, 1999
France (1999-2000)	27 (7)	NC	NC	Lengua de cerdo con gelatina	4b	Anon., 2000b
USA (2000)	13 (8)	NC	NC	Queso blando estilo mexicano	4b	MacDonald et al., 2005
USA (2001)	16 (0)	NC	NC	Pavo cocido en rebanadas	1/2a	Frye et al., 2002
Sweden (2001)	50 (0)	NC	NC	Queso	¿?	Carrique-Mas et al., 2003
Japón (2001)	38 (0)	NC	NC	Queso	1/2b	Makino et al., 2005
USA (2002)	54 (11)	NC	NC	Carne de pavo cocido	4b	Gottlieb et al., 2006
Inglaterra (2003)	17 (4)	NC	NC	Mantequilla	4b	Gillespie et al., 2006
Suiza (2005)	10 (5)	NC	NC	Queso	1/2a	Bille et al., 2005
República Checa (2006)	78 (13)	NC	NC	Queso maduro	1/2b	EFSA, 2007b; Vit et al., 2007
Alemania (2006)	6 (1)	NC	NC	Queso	¿?	EFSA, 2007b
EE UU (2011)	146 (30)	30/1	NC	Cantaloupe	1/2a y 1/2b	Laksanalamai P. y col, 2012

\* De esas 5 muertes, dos se debieron, al parecer, a una enfermedad subyacente, no a la listeriosis.

\*\* Se asociaron a los alimentos epidemiológicamente

& Sólo se conoció el desenlace de 252 casos

\*\* Incluye dos parejas de gemelos

(Labbé, 2001; ICMSF, 2002; Cliver, 2009; y [www.fda.gov](http://www.fda.gov))



La FDA publicó comunicados de prensa y otros avisos de retiros de mercado de empresas involucradas con presencia de *L. monocytogenes* como un servicio a los consumidores, indicando que la FDA no aprueba el producto o la empresa, mostrados en la Tabla 9, de julio a septiembre del 2012.

**Tabla 9. Retiros de productos del mercado ( julio-septiembre 2012).**

Fecha	Descripción del producto	Marca	Empresa
09/19	Espinacas	Kroger frescas Selecciones	Kroger
09/17	Queso	Ricotta Salata Frescolina	Peterson Empresa
09/14	Queso	Marte	Forever Cheese, Inc.
09/12	Queso	Ricotta Salata Frescolina	Whole Foods Market
09/12	Productos Varios Deli	Espartano	Spartan Stores
09/10	Ricotta Salata (Queso)	Frescolina	Forever Cheese Inc.
09/07	Tortas de pescado	3Pescados, inc.	3Pescados, inc.
09/07	Pasteles de cangrejo relleno de mariscos y productos del mar	Harris Teeter, Inc.	Harris Teeter, Inc.
08/31	Brotos y Productos Tofu	Soonyeowon, Jinga	Orgánicos Manna, Inc.
08/26	Corazones de Romaine Salad	Fresh Express	Fresh Express
08/22	Salmón Ahumado	Wellsley, Spence & Co	Spence & Co Ltd
08/22	Ensalada en bolsas	Subsidio de desempleo	Dole Fresh Vegetables
08/18	Bandejas de setas	Meijer	Pure Foods Hothouse, Inc.
08/14	Champiñones en rodajas	Highline	Producir Ciolino
08/10	Manzanas	Ready Pac	Missa Bay, LLC
08/10	Melones y melones Honeydew	Burch y Cottle Farms Inc. Fresa en melones sin etiqueta en melones	Burch Equipment LLC
08/08	Queso	Tomales Bay Foods, Granjas Pastor Way, Granjas Tumalo	Tomales Bay Foods, Inc.
08/06	Bocado de Apple, Pizza Kit	Dippin 'Stix, paquetes de blindaje activo	Reichel Foods, Inc.
08/03	Los melones enteros	Burch Farms, Cottle Fresa	Burch Equipment LLC
08/01	Confort (para cocinar) Kits Verdes	Cortar N Limpiar	San Miguel Produce, Inc.
07/31	Listo para comer ensaladas	Acme, cocina de chef, Copperwood Cocinas, Dairy Fresh, mejores tradiciones, Jardín-Fresh, abuelos, Marsh, Archer Farms, Market Pantry, la nuestra, Rogges, Roundy, Spartan, Spoon River, Weis	Jardín-Fresh Foods Inc.
07/30	Tartar Sauce, barbacoa Salsa de Frijoles, Ensalada de Col aderezo, salsa tártara, salsa tártara	Golden Corral, Dickey, de Lee, Fatz, Ken	Los alimentos de Ken, Inc.
07/28	Cantaloupes	Burch Farms	Hannaford Supermarkets
07/27	Paquetes específicos de los productos que contienen cebollas	Creaciones frescas y Fiesta Garden Fresh Salsa	Creaciones Cool, LLC
07/27	Los alimentos preparados que contienen picado / cortado en cubitos cebollas blancas.	Wegmans	Wegmans Food Markets, Inc.
07/27	Varios productos que contienen cebollas amarillas.	Delish, Marketside, Raley y de varias marcas.	GH Alimentos CA, LLC
07/27	Ensalada	Trader Joe	Cocina Huxtable
07/27	Ensaladas Aderezos, y rollos de sándwich	Whole Foods Market	Whole Foods Market
07/27	Productos Varios Deli	Busch	Mercado de alimentos frescos Busch
07/27	Salsa y Balela	Trader Joe	Simmering Soup, Inc.
07/26	Sub Sandwiches	Publix	Publix Super Markets
07/26	Tres ensalada de frijoles y brócoli salteado	Selecciones frescas	Spartan Stores

([www.fda.gov](http://www.fda.gov))

### **1.6.6. Estatus de *L. monocytogenes* en la legislación de alimentos**

El gobierno de los Estados Unidos tiene las políticas más rigurosas para *L. monocytogenes*, manteniendo la ausencia del microorganismo en muestras de 50g para cualquier alimento listo para el consumo.

La directiva de la Comunidad Europea (CE) sobre leche y productos lácteos especifica la tolerancia cero (ausencia en 25g), para quesos blandos y la ausencia del microorganismo en 1g de otros productos.

Las directrices británicas provisionales para algunos alimentos listos para el consumo establecen cuatro grupos de calidad basados en la carga del patógeno, no detectados en 25g es satisfactorio;  $>10^2/25g$  es bastante satisfactorio;  $10^2 - 10^3/25g$  es insatisfactorio; y recuentos  $>10^3/25g$  hacen que el producto sea inaceptable. El punto de vista en Alemania, considera a los productos que tienen  $>10^4$  UFC /g, se retiren del mercado de inmediato (Jay et al., 2005).

Canadá ha establecido un nivel de aceptación de 100UFC/g para productos de bajo riesgo y no han observado un aumento del nivel basal de listeriosis humana (ICMSF, 2002). Francia exige la ausencia en 25g de muestra para personas de riesgo.

La Comisión Internacional para Especificaciones Microbiológicas de Alimentos (ICMSF) han concluido que si este microorganismo no supera 100 UFC/g de alimento en el momento del consumo, el alimento se considera aceptable para personas que no sean de riesgo (Jay et al., 2005).

La Norma Oficial Mexicana NOM-121-SSA1-1994 Bienes y servicios. Especificaciones sanitarias de quesos, establece la ausencia de este patógeno en 25 g. Observándose de igual manera las mismas especificaciones en el proyecto de la Norma Mexicana PROY-NMX-F-721-COFOCALEC-2012 Sistema de producto leche, alimentos lácteos, sueros de leche (líquido o en polvo). La cual establece las especificaciones y métodos de prueba, destinadas para el consumo directo o como materia prima para la elaboración de otros productos, comercializados en el territorio de los Estados Unidos Mexicanos.

### **1.7. Características del cultivo y detección.**

Como suele ser habitual en la detección de gérmenes en alimentos, se necesita una fase de enriquecimiento previo al aislamiento en medios sólidos selectivos. En 1948, Gray aprovechaba las características psicrotróficas de la *Listeria* para suprimir gran parte de la flora competitiva, pero con la desventaja de requerir periodos de incubación prolongados.

En la actualidad se utilizan medios de enriquecimiento en medios selectivos, integrando sustancias como los antibióticos, los cuales suprimen o inhiben el crecimiento de la mayor parte de la flora competitiva.

Entre las sustancias que integran los distintos medios, figuran: feniletanol (inhibe el crecimiento de la flora gram negativa); cloruro de litio, y glicina (suprime la flora gram negativa y gram positiva distintas de *L. monocytogenes*). En cuanto a los antibióticos (maxolactam, ácido nalidixico, bacitracina y otros) son selectivos para *Listeria* y suprimen la mayoría de los gérmenes de origen alimentario (Pascual, Anderson y Calderón, 2000).

### 1.7.1. Crecimiento

Las necesidades nutritivas de las *Listerias* son las típicas de otras muchas especies de bacterias gram positivas. Crecen bien en muchos medios ordinarios tales como el caldo con infusión de cerebro y corazón, el caldo con soja y tripticasa, y el caldo con triptosa. Las *Listerias* necesitan al menos cuatro vitaminas del grupo B-biotina, riboflavina, tiamina y ácido tióctico (ácido alfa-lipoico; se trata de un factor de crecimiento necesario para algunas bacterias y para algunos protozoos) y también necesitan los aminoácidos cisteína, glutamina, isoleucina, leucina, y valina. La glucosa mejora el crecimiento de todas las especies a partir de este azúcar se produce ácido L (+) - láctico.

Si bien todas las especies utilizan la glucosa por la vía de Embden-Meyerhof, algunas utilizan otros carbohidratos, tanto sencillos como complejos.

Las especies de *Listeria* se parecen a la mayor de los enterococos por ser capaces de hidrolizar la esculina, de crecer en presencia de 10% o del 40% (volumen/peso) de bilis, en aproximadamente el 10% de NaCl, en medios con un 0,025% de acetato de talio, y en medios con un 0,04% de telurito potásico, pero a diferencia de los enterococos no crecen en presencia de un 0,02% de azida sódica. A diferencia de la mayoría de las demás bacterias grampositivas, crecen en agar MacConkey. Si bien el hierro es importante en su crecimiento in vivo, parece ser que *L. monocytogenes* no posee compuestos específicos que fijen el hierro y satisface sus necesidades mediante movilización reductora del hierro libre, que se une a receptores de superficie (Jay et al., 2005).

Las especies de *Listerias* son capaces de multiplicarse en los medios simples y no tienen especiales exigencias nutritivas. En la Tabla 10 se resumen los límites del crecimiento.

<b>Tabla 10. Límites de crecimiento de <i>L. monocytogenes</i></b>			
	Mínimo	Óptimo	Máximo
Temperatura (°C)	-0.4	37	45
Ph	4.39	7.0	9.4
Actividad de agua	0.92	-	-

(ICMSF, 1996)

Cuando *Listeria monocytogenes* se encuentra en un alimento, su concentración, por regla general, es muy escasa, por lo que no resulta posible un recuento directo. La dosis infectiva de esta bacteria es pequeña y, por tanto, su mera presencia en un producto ya constituye un peligro sanitario de consideración.

Por consiguiente, el objetivo del análisis de *Listeria* en los alimentos suele poner de manifiesto la existencia del patógeno más que su enumeración; es decir, se busca la «detección» de la bacteria. La muestra de alimento que se analiza suelen ser 25 g, el límite de detección mínimo teórico del análisis será una *Listeria* por 25 g de alimento (Yousef y Carlstrom, 2006).

### **1.7.2. Métodos de detección convencionales**

Los métodos de detección convencionales comprenden los siguientes pasos:

#### **1.- Enriquecimiento**

El enriquecimiento consiste en incubar una mezcla de la muestra en un medio rico en nutrientes, caracterizado por ser muy poco o nada selectivo. Durante la incubación, las células de *L. monocytogenes* dañadas se recuperan y la población del patógeno aumentará en número. Anterior mente se empleaba el enriquecimiento en frío, antes mencionado.

En la actualidad suele preferirse un método más moderno, consistente en dos pasos de enriquecimiento, incluyendo un preenriquecimiento en un medio de cierta selectividad y un segundo y verdadero enriquecimiento en un medio selectivo (Yousef y Carlstrom, 2006).

#### **2.-Aislamiento:**

Los medios que se han venido utilizando para el aislamiento de este patógeno a partir de los enriquecimientos han sido agares selectivos/diferenciales. Los más utilizados han sido el medio Oxford, el Oxford modificado (MOX) y el agar PALCAM, cuyos componentes relevantes son polimixina, acriflavina, cloruro de litio, ceftazidina, esculina y manitol.

Estos medios son muy selectivos ya que contienen sales (cloruro de litio) o antibióticos (por ejemplo, polimixina) y otras sustancias antimicrobianas toleradas por *Listeria spp.*, pero no por otros muchos microorganismos.

La presencia de esculina y sales férricas (sustancias diferenciadoras) en estos medios facilita el aislamiento de *Listeria*, ya que todas las especies de este género hidrolizan la esculina, liberándose 6,7-dihidroxicumarina, que reacciona posteriormente con el ion férrico generando un producto final color negro.

El agar *Listeria* de McBride se utilizó años atrás para el aislamiento de este patógeno, pero es menos selectivo que los medios Oxford o PALCAM (Yousef y Carlstrom, 2006).

Se han desarrollado diversos medios de cultivo para la identificación de *Listeria monocytogenes* cuya aprobación oficial varía, ver Tabla 11.

**Tabla 11. Medios de cultivo recomendados por ciertas instituciones nacionales para la detección de *Listeria monocytogenes***

Institución	Medios de enriquecimiento	Medios de cultivo en placa
FDA	Caldo de enriquecimiento de <i>Listerias</i> (ELB)	Agar de Mc Bride modificado (MMA). Agar Oxford. Agar LPM
USDA	Caldo UVM 1 Caldo Fraser	Agar de Oxford modificado (MOX)
BSI/ISO/IDF/AOAC para leches y productos lácteos	Caldo de enriquecimiento de <i>Listerias</i> (ELB)	Agar de Oxford
BSI/ISO propuesta provisional para alimentos	Caldo Fraser de fuerza media Caldo Fraser	Agar de Oxford
AFNOR (por confirmar) Ministerio de Agricultura Método Estándar Nacional	Caldo Fraser de fuerza media Caldo Fraser	Agar de Oxford Agar PALCAM

(Forsythe, 2000)

En los medios para el aislamiento de *Listerias* se utilizan una gran variedad de agentes selectivos mostrados en la Tabla 12, en cuya presencia *L. monocytogenes* crece y se desarrolla mejor que sus competidoras (Forsythe, 2000).

**Tabla 12. Caldos de enriquecimiento selectivo de *Listeria* (concentración de agentes selectivos)**

	Agente selectivo			
	Acriflavina HCL mg/L	Ácido nalidíxico mg/L	Cicloheximida mg/L	Cloruro de litio g/L
Caldo de enriquecimiento de <i>Listerias</i> de la FDA	15	40	50	-
Caldo de enriquecimiento tamponado de la FDA	15	40	50	-
Caldo de enriquecimiento de <i>Listerias</i> de la FDA modificado	10	40	50	-
UVM 1	12	20	-	-
UVM 2	25	20	-	-
Fraser	25	20	-	3
Fraser de fuerza media	12.5	10	-	3
Fraser Organonteknika	12.5	20	-	3

(Forsythe, 2000)

Van Netten recomienda el empleo de 2.5mg/L de acriflavina, ya que concentraciones más elevadas pueden afectar el crecimiento de *Listeria monocytogenes* (Netten y col, 1989).

### **3.-Identificación:**

Las colonias presuntivas, aisladas en los medios selectivos/diferenciales, pueden identificarse como *Listeria monocytogenes* después de caracterizarlas bioquímicamente (confirmar). Para diferenciar *L. monocytogenes* de los demás miembros del género se recurre a la producción de ácido a partir de ramnosa, pero no de xilosa. También pueden utilizarse, como pruebas de caracterización, la reacción de la catalasa y la actividad hemolítica (por ej., la prueba CAMP utilizada para la identificación de *S. aureus*). El subcultivo de las colonias presuntivas en medios no selectivos [por ej., agar triptona soja con extracto de levadura (TSAYE)] debería permitir al analista apreciar la típica tonalidad azul grisácea o azul verdosa de las colonias de *L. monocytogenes*. La movilidad de esta bacteria puede examinarse microscópicamente en células crecidas en caldos de cultivo incubados a 20 - 25°C durante 24 horas. Los tiempos de incubación más prolongados y las temperaturas superiores debilitan la movilidad de este patógeno. Resulta recomendable la rutina de un examen microscópico de la tinción de Gram de las cepas aisladas. En un cultivo de 24 horas, *L. monocytogenes* debería observarse como bacilos cortos gram positivos. En cultivos más antiguos pueden aparecer formas cocáceas y de reacción variable a la técnica de Gram (Yousef y Carlstrom, 2006).

#### **1.7.2.1. Pre-enriquecimiento selectivo**

##### **Caldo UVM1**

Se trata de un medio rico con cierto carácter selectivo para *Listeria spp.*, que se utiliza en el paso de preenriquecimiento. Contiene ácido nalidíxico, que inhibe a la mayor parte de las bacterias gram negativas, y acriflavina que impide el crecimiento de casi todas las gram positivas. Este medio es menos selectivo que el caldo de Fraser (que también es un medio de enriquecimiento) cuando se trata de reparar las células dañadas. Aunque el medio contiene esculina, como carece de sales férricas solubles, no se le considera de diferenciación (Yousef y Carlstrom, 2006).

#### **1.7.2.2. Enriquecimiento selectivo**

##### **Caldo de Fraser**

La selectividad de este medio se debe a la presencia conjunta de acriflavina, ácido nalidíxico y cloruro de litio. El cloruro de litio inhibe el desarrollo de los enterococos y permite el de *Listeria spp.*, ya que estos microorganismos son tolerantes a esta sal. La esculina y el citrato amónico férrico son componentes del medio utilizados en la diferenciación, *Listeria spp.*, mediante la esculina y citrato de amonio y hierro (III) se hace posible la identificación de la  $\beta$ -D-glucosidasa de las *Listerias*. Por la acción de la  $\beta$ -D-glucosidasa se escinde el glucósido esculina en esculina y glucosa.

La esculina forma entonces con los iones hierro (III) un complejo verde oliva a negro (Mayorga, 2004). Esta reacción es la que provoca el oscurecimiento del caldo. Por consiguiente, los medios que contienen presuntas *Listerias* se oscurecen, mientras las muestras negativas mantendrán el tono amarillento del medio (Yousef y Carlstrom, 2006).

La composición del caldo es proteosa peptona, peptona de caseína, extracto de levadura, extracto de carne, cloruro sódico, hidrógenofosfato disódico, dihidrogenofosfato potásico, esculina, cloruro de litio (Merck, 1994 y Mayorga, 2004).

### **1.7.2.3. Aislamiento**

Las muestras enriquecidas en caldo de Fraser se siembran en la superficie de dos medios de gran capacidad diferencial y selectiva, los agares MOX y PALCAM. La detección de colonias de *Listeria* con su morfología típica indica el éxito en el aislamiento del patógeno.

#### **Agar Oxford modificado (MOX)**

Es un medio selectivo/diferencial empleado para el aislamiento de *Listeria spp.* La composición del Agar Oxford se basa en la formulación del Agar Columbia. La selectividad de este medio se debe al cloruro de litio, al sulfato de colistina acriflavina, cefotetano, cicloheximida, fosfomicina (Mayorga, 2004) y al moxalactamo. Las especies de *Listeria* pueden crecer en presencia de estas sustancias antimicrobianas. La esculina y el citrato amónico férrico actúan conjuntamente como agentes diferenciadores.

Los microorganismos pertenecientes al género *Listeria* producen una enzima que hidroliza la esculina y uno de los metabolitos liberados en esta hidrólisis reacciona con los iones férricos del citrato, formándose un característico precipitado negro. El cloruro de litio inhibe el desarrollo de los microorganismos gram negativos mientras que *Listeria spp.* pueden crecer en su presencia dada su tolerancia a las sales (Yousef y Carlstrom, 2006).

#### **Agar triptona soja con sangre (TSA-sangre)**

Este medio se utiliza para el crecimiento de microorganismos muy exigentes y para diferenciar a los hemolíticos. Para preparar el TSA-sangre, se funde primero el agar triptona soja y luego se enfría hasta unos 50°C. A 1L de TSA fundido se le añaden 50 ml de sangre desfibrinada de oveja y ambos componentes se mezclan bien, cuidando de no incorporar burbujas de aire. Seguidamente se deposita el TSA-sangre en placas de Petri en una capa gruesa, alrededor de 20 ml por placa. El medio debe tener un aspecto firme, opaco y rojo brillante. Las placas con el agar se dejan reposar a temperatura ambiente (aproximadamente 22°C) durante 48 horas antes de su uso, lo que asegura la desecación de la superficie de la placa. Para obtener resultados óptimos, *L. monocytogenes* debe inocularse mediante picadura en el TSA-sangre e incubarse a 35°C durante 48 horas, preferiblemente en una atmósfera enriquecida en dióxido de carbono. En estas condiciones, el patógeno produce unas áreas inconfundibles, aunque estrechas, de hemólisis alrededor de las zonas de inoculación.

Pueden apreciarse diferentes tipos de hemólisis en TSA-sangre:

- $\alpha\beta\gamma$ -Hemólisis: decoloración del típico color rojo sangre, apareciendo un tono verdoso alrededor de las colonias, que surge como consecuencia de la conversión de la hemoglobina en metahemoglobina por el microorganismo.
- $\beta$ -Hemólisis: se aprecia una zona más clara alrededor de las colonias debido a la lisis de los hematíes de la sangre por el microorganismo.
- $\gamma$ -Hemólisis: en este caso no se produce hemólisis y no se aprecia ningún cambio en el color de la sangre alrededor de las colonias (Yousef y Carlstrom, 2006).

#### **1.7.2.4. Identificación**

Cuatro colonias presuntamente pertenecientes al género *Listeria* se siembran en la superficie de agar BHI. Las placas se incuban y se examinan las colonias aisladas. La identificación de estos aislamientos se consigue gracias al examen morfológico de las colonias y a pruebas bioquímicas (Yousef y Carlstrom, 2006).

#### **Agar triptona soja con extracto de levadura (TSAYE)**

Este medio se compone de TSA y un 2% de levadura. Se trata de un medio no selectivo y relativamente rico. Se utiliza para que el fondo sobre el que crece el microorganismo sea suficientemente claro para poder examinar la morfología de las colonias desarrolladas, ya que no interfiere en absoluto con la tonalidad típica azul grisácea de las *Listerias*. Las colonias obtenidas en este medio pueden utilizarse para la prueba de catalasa (Yousef y Carlstrom, 2006).

#### **1.7.3. Métodos de detección rápidos**

Los métodos rápidos diseñados para detectar *L. monocytogenes* consisten en una técnica de enriquecimiento seguida de una prueba de identificación inmunológica o genética. Por consiguiente cuando se aplican estos métodos se ahorra todo el tiempo que se invierte en el aislamiento y en la caracterización bioquímica descritas anteriormente. No obstante, los resultados obtenidos por los métodos rápidos requieren de una confirmación mediante el cultivo tradicional y las técnicas bioquímica.

##### **1.7.3.1. Pruebas de identificación de género**

###### **1.7.3.1.1. Reacciones de inmunoprecipitación VIP (Visual immunoprecipitate assay).**

AOAC Oficial Method 997.03. Detección de *Listeria monocytogenes* y especies de *Listeria* relacionadas en muestras de alimentos y superficies ambientales.

El ensayo VIP, tiene anticuerpos con alto grado de especificidad a los antígenos de *L. monocytogenes* y *Listeria spp.* Esta impuesta a un portador cromógeno y se mantiene separado de un soporte sólido, los agentes son configurados en un dispositivo individual, esto produce una reacción en presencia de *Listeria* que se determina visualmente.

Durante la hidratación inicial del dispositivo, la *Listeria* reacciona con un complejo anticuerpo-cromógeno contenido en el dispositivo.



Se forma un complejo antígeno-anticuerpo-cromógeno, con el flujo de la muestra que atraviesa la membrana, subsecuentemente el anticuerpo se une y se inmoviliza en la membrana. Si hay presencia de *Listeria*, se detectará la formación de una línea que se observa a través del visor en la ventana del dispositivo.

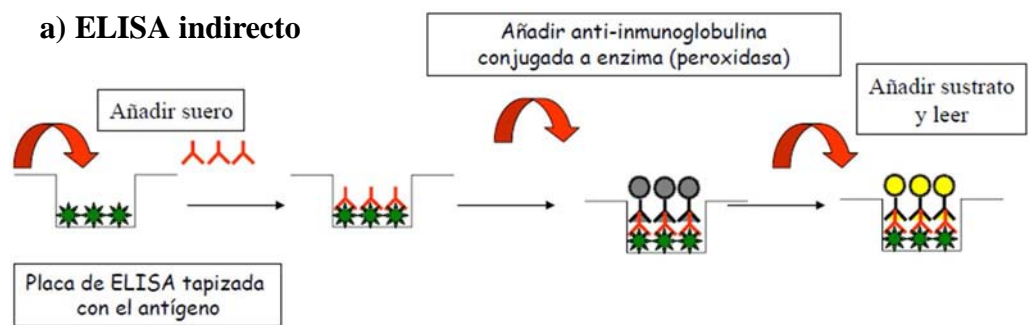
### 1.7.3.1.2. Ensayos inmunoenzimáticos Locate® (*Listeria*, screening test for *Listeria* species).

Es un ensayo con enzimas inmunoabsorbentes (EIA) para la detección de *Listeria* en muestras de alimentos. Locate® *Listeria*, emplea un anticuerpo monoclonal de alta especificidad de cobertura para los antígenos de *Listeria* para cultivos de muestras alimentarias, en una microplaca, las muestras son rápidamente identificadas visualmente o empleando un lector de microplacas (Tortora, Funke y Case, 2007).

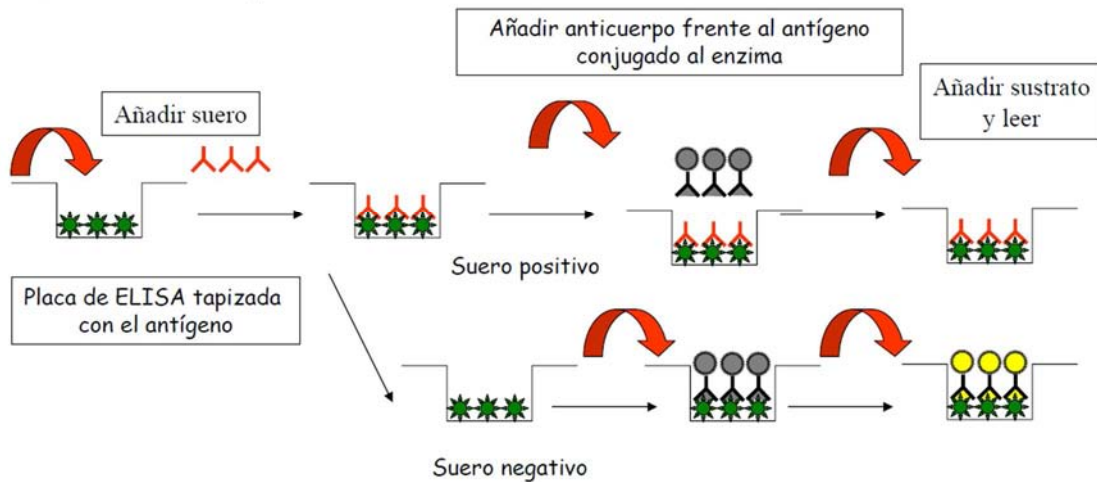
Las pruebas inmunoenzimáticas se basan en una reacción antígeno anticuerpo que tiene lugar sobre un soporte sólido (normalmente una microplaca de plástico) a la que se ha adsorbido un antígeno o un anticuerpo. La prueba puede desarrollarse en diferentes modalidades pero en todas ellas la reacción final se revela mediante un enzima que modifica un sustrato que adquiere color. Se trata de pruebas muy sensibles y específicas. El ELISA directo detecta antígenos y el ELISA indirecto detecta anticuerpos (Tortora, Funke y Case, 2007).

En las pruebas de tipo directo se siguen los siguientes pasos: Se tapiza la placa con el anticuerpo específico frente al antígeno a determinar. Se añade la muestra con el antígeno. Se adiciona el anticuerpo secundario marcado con la enzima que en presencia de su sustrato da un producto coloreado soluble, este producto es cuantificado mediante el lector de ELISA Figura 2a. La prueba de tipo indirecto o competitivo, se diferencia del caso anterior en que se añaden los anticuerpos, previamente incubados con la muestra, los anticuerpos que no se han unido a los antígenos de la muestra lo harán a los antígenos de los pocillos Figura 2b.

El ELISA de captura o tipo sándwich (análisis de captura de antígeno), los anticuerpos antígenos-específicos se unen a la placa. Éstos son capaces de unir antígeno con gran afinidad y de este modo concentrarlo en la superficie de la placa, incluso con antígenos que se encuentran a muy baja concentración en la mezcla inicial. Para detectar el antígeno unido se utiliza un anticuerpo marcado diferente que reconoce un epítipo distinto al que reconoce el primer anticuerpo inmovilizado sobre la placa Figura 2c.



## b) ELISA de competición



## c) ELISA de captura

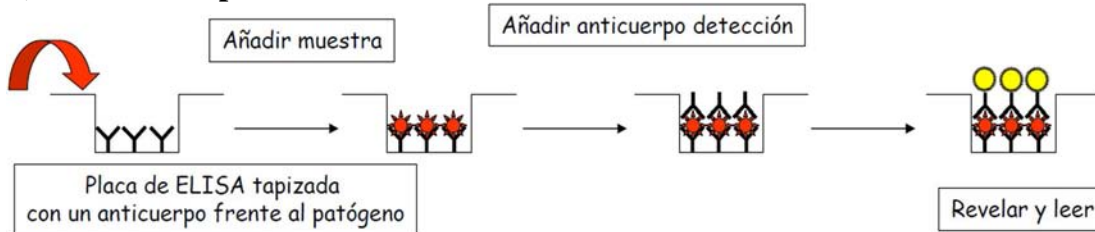


Figura 2. Pruebas de inmunoabsorción ligada a enzimas (Koneman y Allen, 2008)

Después del enriquecimiento selectivo las muestras se someten a un tratamiento térmico y se adiciona a los pozos correspondientes en la microplaca. Todos los antígenos se encuentran sobre la superficie de cada pozo. Los pozos son lavados minuciosamente para remover cualquier materia. Las enzimas del anticuerpo monoclonal (conjugado) son adheridas con los antígenos de *Listeria*, formando un inmunocomplejo. Los pozos son lavados para remover los excesos y deshacer el conjugado. El sustrato es adicionado el cual convierte los productos de color azul en la presencia de anticuerpo fijado al conjugado enzimático.

Los resultados pueden ser leídos visualmente o la reacción se detiene con solución de ácido sulfúrico ( $H_2SO_4$ ), y se mide utilizando un espectrofotómetro a una absorbancia de 450nm. El color de los productos indica la presencia del antígeno de *Listeria* en las muestras.

### 1.7.3.2. Pruebas de identificación de *Listeria monocytogenes*

#### 1.7.3.2.1. BBL™ CHROMagar™ *Listeria*.

Es un medio selectivo para el aislamiento, diferenciación e identificación de *Listeria monocytogenes* y *L. Ivanovii* en alimentos y muestras ambientales.

Estas placas contienen agentes selectivos que inhiben el crecimiento de microorganismos gram positivos, hongos y levaduras. El cromógeno es un sustrato cromogénico que produce un compuesto de coloración azul-verdosa que es hidrolizado por una enzima específica del género *Listeria*. Una enzima encontrada en *Listeria monocytogenes* y *Listeria ivanovii*, actúa sobre el sustrato fosfolipídico produciendo un halo blanco opaco alrededor de las colonias azul-verdosas que facilita la detección y diferenciación de *L. monocytogenes* y *L. ivanovii* de otros microorganismos y de otras especies de *Listeria* (Mcnamara, 2005) ver Figura 3.

Se emplea la escisión del sustrato, L- $\alpha$ -fosfatidil-inositol por el factor fosfatidilinositol fosfolipasa C (PI-PLC) y C-fosfatidilcolina fosfolipasa (PC-PLC) producido por *L. monocytogenes* como resultado la formación de una zona de precipitado blanco (halo) alrededor de la colonia, en combinación con el sustrato cromogénico 5-bromo-4-cloro-3-indoxi- $\beta$ -D-glucopiranosido para la detección de  $\beta$ -D-glucosidasa producido por *Listeria spp.* (Reissbrodt, 2004 y Hegdea et al., 2006).

Otras especies de *Listeria* pueden producir colonias azul-verdosas sin presencia de halo. Los microorganismos Gram negativos son inhibidos. Los microorganismos Gram positivos y otras especies de *Listeria*, serán inhibidas o producirán colonias de color blanco.

BBL™ CHROMagar™ *Listeria* ha sido validado por el instituto de investigación de la AOAC™ para el análisis de carne molida de res cruda, salmón ahumado, lechuga y queso Brie, usando métodos FDA, BAM, USDA, FSIS, AOAC e ISO. Estudios realizados empleando este cromógeno para analizar una gran variedad de alimentos y muestras ambientales demuestran un 99-100% de especificidad con nivel de detección de 1-18 UFC/25g (BD BBL).

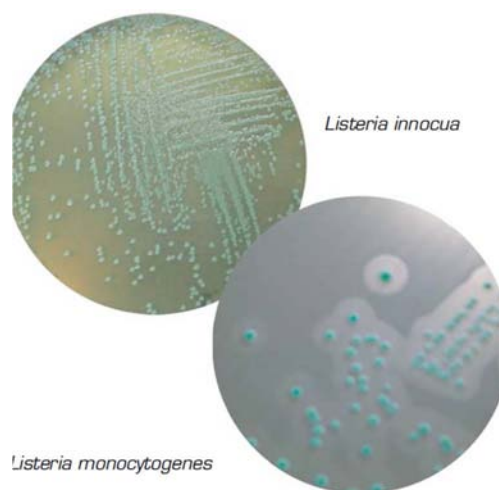


Figura 3. *L. innocua* y *L. monocytogenes* en placas de CHROMagar

**1.7.3.2.2. Pruebas bioquímicas que emplean sustratos convencionales fluorogénicos y cromogénicos modificados (BD BBL Crystal™, identification system id kit for gram positives).**

El sistema BBL Crystal para la identificación de bacterias gram positivas es un método de identificación en miniatura que utiliza sustratos convencionales, fluorogénicos y cromogénicos modificados.

Los paneles del sistema BBL Crystal contienen 29 sustratos bioquímicos y enzimáticos deshidratados mostrados en la Tabla 13.

**Tabla 13. Sustratos empleados en el sistema BBL Crystal**

Posición en el panel	Sustrato	Código	Principio	
4A	Control fluorescente negativo	FCT	Control para estandarizar los resultados del sustrato fluorescente.	
2A	Glucósido	FGC	La hidrólisis enzimática del enlace amídico o glicosídico resulta en la producción de un derivado cumarínico fluorescente.	
1A	Valina	FVA		
4B	L-fenilalanina	FPH		
2B	Glucósido	FGS		
1B	L-ácido piroglutamico-AMC	FPY		
4C	L-triptófano-AMC	FTR		
2C	Arginina-AMC	FAR		
1C	4MU-N-acetil-β-D-glucosaminida	FGA		
4D	Fosfato	FHO		
2D	4MU-β-D-glucurónido	FGN		
1D	Isoleucina-AMC	FIS		
4E	Trehalosa	TRE		Control fluorescente negativo carbohidratos resulta en una caída del pH y un cambio en el indicador (rojo de fenol).
2E	Lactosa	LAC		
1E	Metil-α-β-glucósido	MAB		
4F	Sacarosa	SUC		
2F	Manitol	MNT		
1F	Maltotriosa	MTT		
4G	Arabinosa	ARA		
2G	Glicerol	GLR		
1G	Fructosa	FRU		
4H	Glucósido	BGL	La hidrólisis enzimática del glicósido incoloro arilo sustituido resulta en un p-nitrofenol amarillo.	
2H	Celobiósido	PCE		
1H	Prolina y leucina-p-nitroanilida	PLN	La hidrólisis enzimática del sustrato amídico incoloro resulta en una p-nitroanilina amarilla.	
4I	Fosfato	PHO	La hidrólisis enzimática del glicósido incoloro arilo sustituido resulta en un p-nitrofenol amarillo.	
2I	Maltósido	PAM		
1I	Galactósido	PGO		
4J	Urea	URE	La hidrólisis de la urea y el amonio que resulta cambian el color del indicador de pH (azul de bromotimol).	
2J	Esculina	ESC	La hidrólisis de la esculina en la presencia de ion férrico resulta en un precipitado negro.	
1J	Arginina	ARG	La utilización de la arginina resulta en una subida del pH y un cambio en el color del indicador (púrpura de bromocresol).	

(Becton Dickinson, 2002)

Para rehidratar los sustratos, se utiliza una suspensión de bacterias en el fluido de inóculo. Las pruebas usadas en el sistema, se basa en la utilización y degradación microbiana de sustratos específicos detectados para varios sistemas indicadores. La hidrólisis enzimática de los sustratos fluorogénicos que contienen derivados cumarínicos del 4-metil-umbeliterona o de 7-amino-4-metilcumarín resulta en un aumento de la fluorescencia que se detecta fácilmente a simple vista con una lámpara de luz ultravioleta. Los sustratos cromogénicos después de sufrir la hidrólisis, producen cambios de color que pueden detectarse visualmente.

### **1.7.3.2.3. Reacción en cadena de la polimerasa.**

La reacción en cadena de la polimerasa o PCR (polymerase chain reaction) es un método enzimático de amplificación de secuencias específicas de ADN, concebido por Kary Mullis y sus colaboradores en 1983. Este método permite la síntesis *in vitro* de un fragmento de ADN de forma tal que, en cada ciclo del proceso, se duplica el número de moléculas.

El principio del PCR consiste en determinar la secuencia de interés y seleccionar pequeños segmentos de nucleótidos llamados iniciadores o cebadores, complementarios con la secuencia de nucleótidos de los extremos opuestos de las cadenas que flanquean a dicha secuencia, a partir de los cuales se inicia la elongación o síntesis de nuevas cadenas en el extremo 3' de cada iniciador. Por tanto la reacción en cadena de la polimerasa consiste en tres fases repetitivas, lo que constituye la base de la porción “reacción en cadena” del nombre. Estas tres fases son:

- 1) Desnaturalización del DNA (o la separación de las dos hebras de DNA),
- 2) Hibridación de cebador y
- 3) Extensión del cebador (la porción de la reacción donde sucede la síntesis de DNA).

En esta técnica se consideran importantes los siguientes parámetros: un suministro abundante de iniciadores y de desoxinucleótidos trifosfatados (dNTPs); una fuente de ADN polimerasa (enzima encargada de la síntesis de las cadenas complementarias); y los ciclos periódicos de cambios de temperatura. Estos últimos consisten en: desnaturalización del ADN a 95° C, a esta temperatura el DNA bicatenario se separa en dos hebras simples ya que la energía térmica rompe los puentes de hidrogeno.

La próxima etapa es la hibridación del cebador comienza cuando la mezcla de la reacción se enfría y los cebadores oligonucleótidos que se encuentran a los lados de las zonas de amplificación, se hibridan con las hebras simples de la molécula de DNA molde. Los oligonucleótidos cebadores son fragmentos cortos de ADN, por lo común de entre 12 y 20 nucleótidos Figura 4 (Koneman y Allen, 2008).

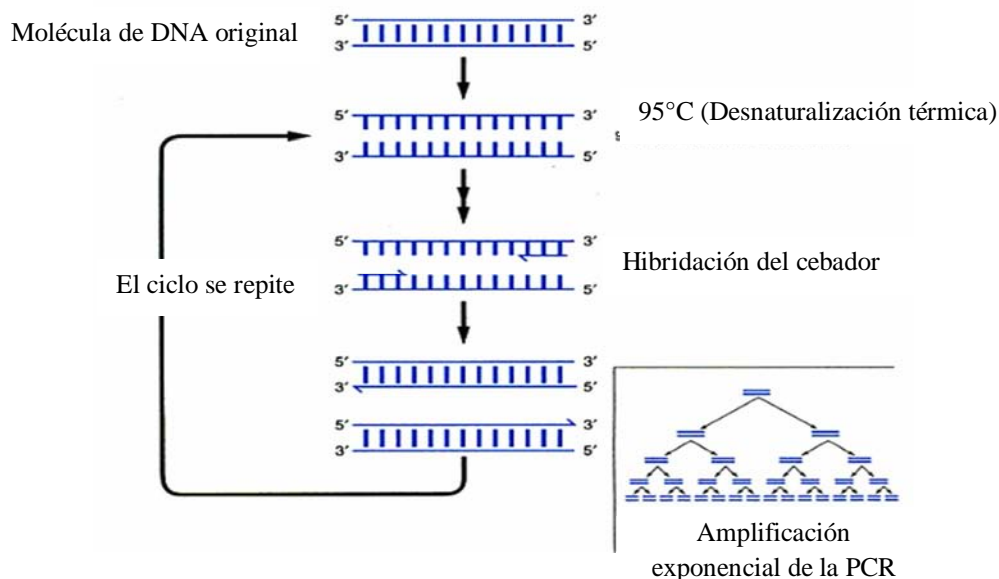


Figura 4. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Con la introducción de la llamada Taq polimerasa, una ADN polimerasa aislada de la bacteria *Thermus aquaticus* que vive en aguas termales y tiene una temperatura óptima entre 70 y 75° C, la PCR se hizo más eficiente, más accesible e incluso fue posible automatizarla. Para la extensión completa de la amplificación, la DNA polimerasa sintetiza la hebra complementaria nueva a una tasa aproximada de 25 pb/seg (Koneman y Allen, 2008). En la Tabla 14 se muestran virulencia, y secuencias de primers para la identificación de especies en la Tabla 15.

<b>Tabla 14. Identidades y secuencia de <i>L. monocytogenes</i> Internalina genes de primers determinación de especies y virulencia</b>				
<b>Gen dina</b>	<b>Especificidad</b>	<b>Secuencia del primer (5'→3')</b>	<b>Posición del nucleotido</b>	<b>Productos PCR (pb)</b>
inIA	Todas las serovariedades de <i>L. monocytogenes</i>	ACGAGTAACGGGACAATGC CCCGACAGTGGTGCTAGATT	94612-94631 95411-95392	800
inIC	Todas las serovariedades de <i>L. monocytogenes</i> y algunas 4a y 4c	ATTCCACAGGACACAACC CGGGAATGCAATTTTCACTA	107306-107325 107822-107802	517
inIJ	Todas las serovariedades de <i>L. monocytogenes</i> y algunas 4a y IIIB	TGTAACCCCGCTTACACAGTT AGCGGCTTGGCAGTCTAATA	188989-109009 189226-189207	238
p60	<i>L. monocytogenes</i>	CTA AAG CGG GAA TCT CCC TT CCA TTG TCT TGC GCG TTA AT	1214-1233 1369-1388	175

(Dongyou, 2010 y Hein et al., 2001)

<b>Tabla 15 Identidades y secuencias de primers de <i>Listeria</i> para la identificación de especies específicas</b>			
<b>Gen diana</b>	<b>Especificidad</b>	<b>Secuencia del primer (5'→ 3')</b>	<b>Productos de PCR (pb)</b>
Lwe 7-571 (codifica la enzima de sistema de fosfotransferasa IIBC)	<i>L. welshimeri</i>	Pool 1 TCCCACCATTGGTGCTACTCA TTGGCGTACCAAAGAAATACG	608
Lmo 0733( codifica el regulador transcripcional)	todos los linajes <i>L. monocytogenes</i> pero linajes subgrupo IIIB	CGCAAGAAGAAATTGCCATC TCCGCGTTAGAAAAATTCCA	453
Lse 24-315( codificación internalina)	<i>L. seeligeri</i>	CGCGAGGCTAAAGTACTAA ATTGCTCGCTTTGAAGTCGT	375
Pool 2			
Liv 22-228( codificación N-acetilmuramidasa)	<i>L. ivanovii</i>	(N) <sub>15</sub> CGAATTCCTTATTCACCTTGAGC (N) <sub>15</sub> GGTGCTGCGAATTA ACTCA	493
Lgr 20-246( codificación de oxidoreductasa)	<i>L. grayi</i>	CTGCACGATCAAGGTCAATC CGTATTGCGCACCAGTGATA	420
iap (codificación asociada a la proteína de invasión)	<i>L. innocua</i>	TTGCTACTGAAGAAAAAGCA TCTGTTTTGCTTCTGTAGC	325
iap (codifica la proteína p60)	<i>L. monocytogenes</i>	CTA AAG CGG GAA TCT CCC TT CCA TTG TCT TGC GCG TTA AT	175

(Dongyou, 2010 y Dadkhah et al., 2012)

## **CAPÍTULO 2.- OBJETIVOS**

**OBJETIVO GENERAL:** Identificar *Listeria monocytogenes* en alimentos mínimamente procesados en establecimientos de comida rápida, empleando métodos tradicionales, pruebas bioquímicas rápidas, métodos cromogénicos, inmunológicos y moleculares para evidenciar este género.

**OBJETIVO PARTICULAR 1:** Aislar *Listeria* en cócteles y ensaladas de venta dentro y fuera de tres instituciones educativas de Cuautitlán Izcalli, empleando el método presencia–ausencia de la USDA / FSIS y confirmando mediante pruebas inmunológicas para poder proseguir con su identificación.

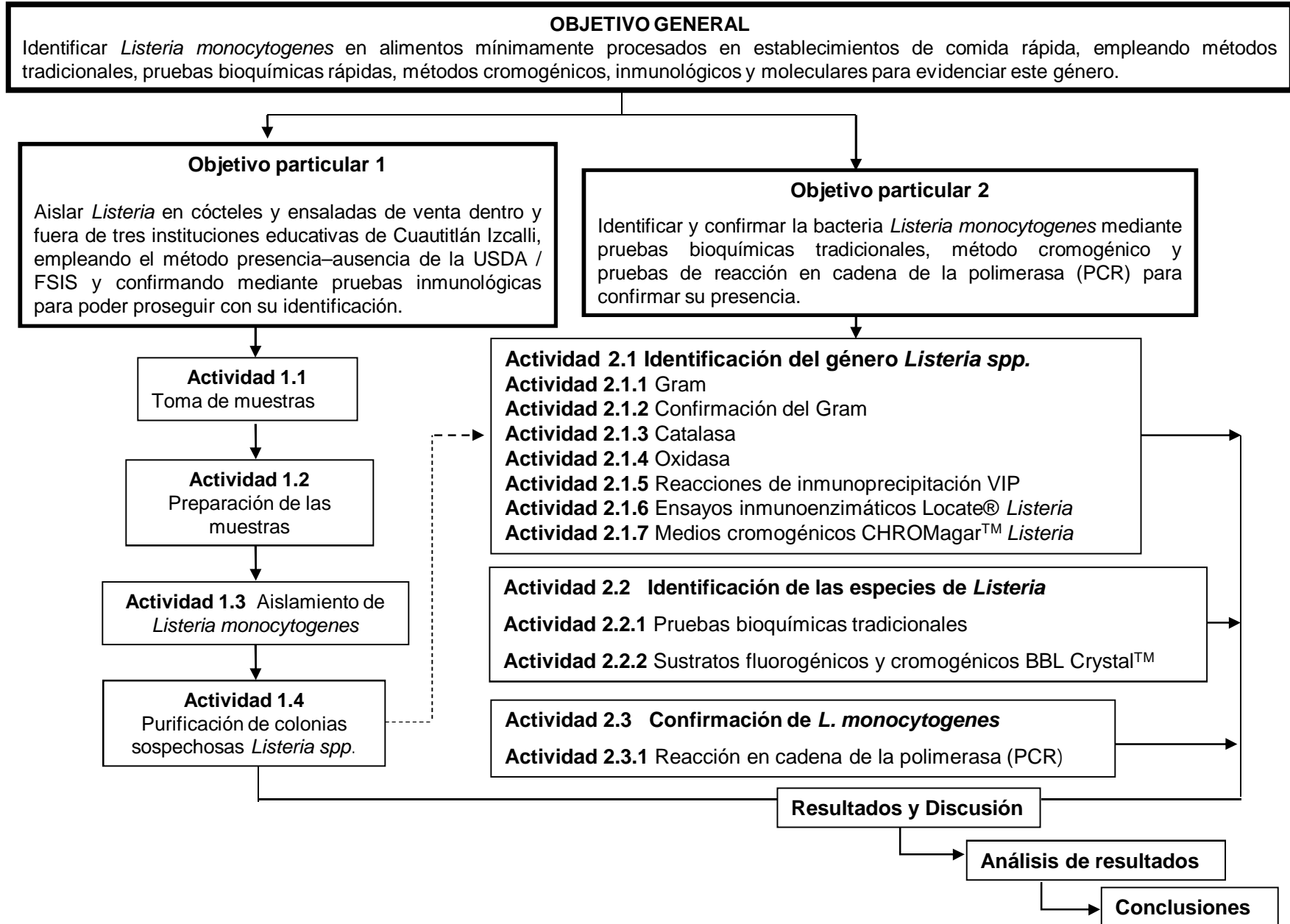
**OBJETIVO PARTICULAR 2:** Identificar y confirmar la bacteria *Listeria monocytogenes* mediante pruebas bioquímicas tradicionales, método cromogénico y pruebas de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para confirmar su presencia.



# **CAPÍTULO 3**

# **METODOLOGÍA**

## CUADRO METODOLÓGICO



### 3.1. MUESTREO

Se realizó el estudio de 100 muestras, para las cuales se seleccionaron un total de 5 comedores y 15 puestos ambulantes de comida, ubicados dentro y fuera de tres instituciones educativas en la zona de Cuautitlán Izcalli, donde se ofrecen cócteles de fruta y ensaladas de fruta. Se realizó el muestreo por un periodo de cinco días en cada uno de los locales.

Tabla 16. Muestreo y nomenclatura de cócteles y en saladas según lugar de procedencia.

Lugar	Local		Muestra	Nomenclatura del grupo de muestras
F-1	T	Puesto	Lechuga, aguacate, jitomate y nopal cocido.	F-1.1
	G	Puesto	Zanahoria, pepino, mango, sandía y melón.	F-1.2
	S	Puesto	Lechuga, aguacate y jitomate.	F-1.3
	R	Puesto	Lechuga, jitomate, apio y vinagreta.	F-1.4
	K	Comedor	Melón, plátano y mango.	F-1.5
F-4	F	Puesto	Lechuga, jitomate, pepino y aguacate.	F-4.1
	V	Puesto	Papaya, piña, mango y melón.	F-4.2
	Cv	Comedor	Lechuga, jitomate, aguacate y jícama.	F-4.3
	P	Puesto	Lechuga, jitomate, apio y zanahoria.	F-4.4
	Ci	Comedor	Sandía, melón, plátano y papaya.	F-4.5
CB-1	C1	Comedor	Jícama y pepino	CB-1.1
	C2	Comedor	Jitomate, lechuga, aguacate, pepino, zanahoria, chayote cocido y calabaza cocida.	CB-1.2
	C1	Comedor	Durazno, manzana, guayaba y ciruela	CB-2.1
	C2	Comedor	Durazno, manzana, guayaba y ciruela	CB-2.2
	P1	Puesto	Piña, sandía, plátano, papaya y melón	CB-3
	P2	Puesto	Lechuga, jitomate y aguacate	CB-4
	P3	Puesto	Zanahoria, coco, sandía y jícama, melón chino, naranja, melón, papaya y manzana.	CB-5
	P4	Puesto	Durazno, manzana, guayaba y ciruela	CB-6
	P5	Puesto	Durazno, manzana, guayaba y ciruela	CB-7
P6	Puesto	Papaya y melón	CB-8	

Facultad campo 1: (F-1), Facultad campo 4: (F-4), Preparatoria: (CB-1).

Las muestras se guardaron en bolsas estériles, debidamente etiquetados y cerradas, estas se mantuvieron en congelación a una temperatura de  $-27^{\circ}\text{C}$ .

### 3.2. Preparación de las muestras

Las muestras se conservaron en congelación hasta su análisis.

Se formaron 20 grupos, con cinco muestras de cada lugar muestreado.

La nomenclatura empleada para cada grupo de muestras corresponde a la Tabla 16.

Para homogeneizar los grupos de muestras, se mezclaron 50g de dicho grupo de muestra con 450ml agua peptonada, incubándose a 30°C durante un periodo de 6 h, esto para fomentar la multiplicación de las posibles *Listerias* presentes, estresadas por los cambios de temperatura.

### **3.3. Aislamiento de *Listeria monocytogenes***

El análisis de las muestras se basó en el criterio presencia-ausencia en 25 g, descrito por USDA/FSIS (United States Department of Agriculture/Food Safety and Inspection Service).

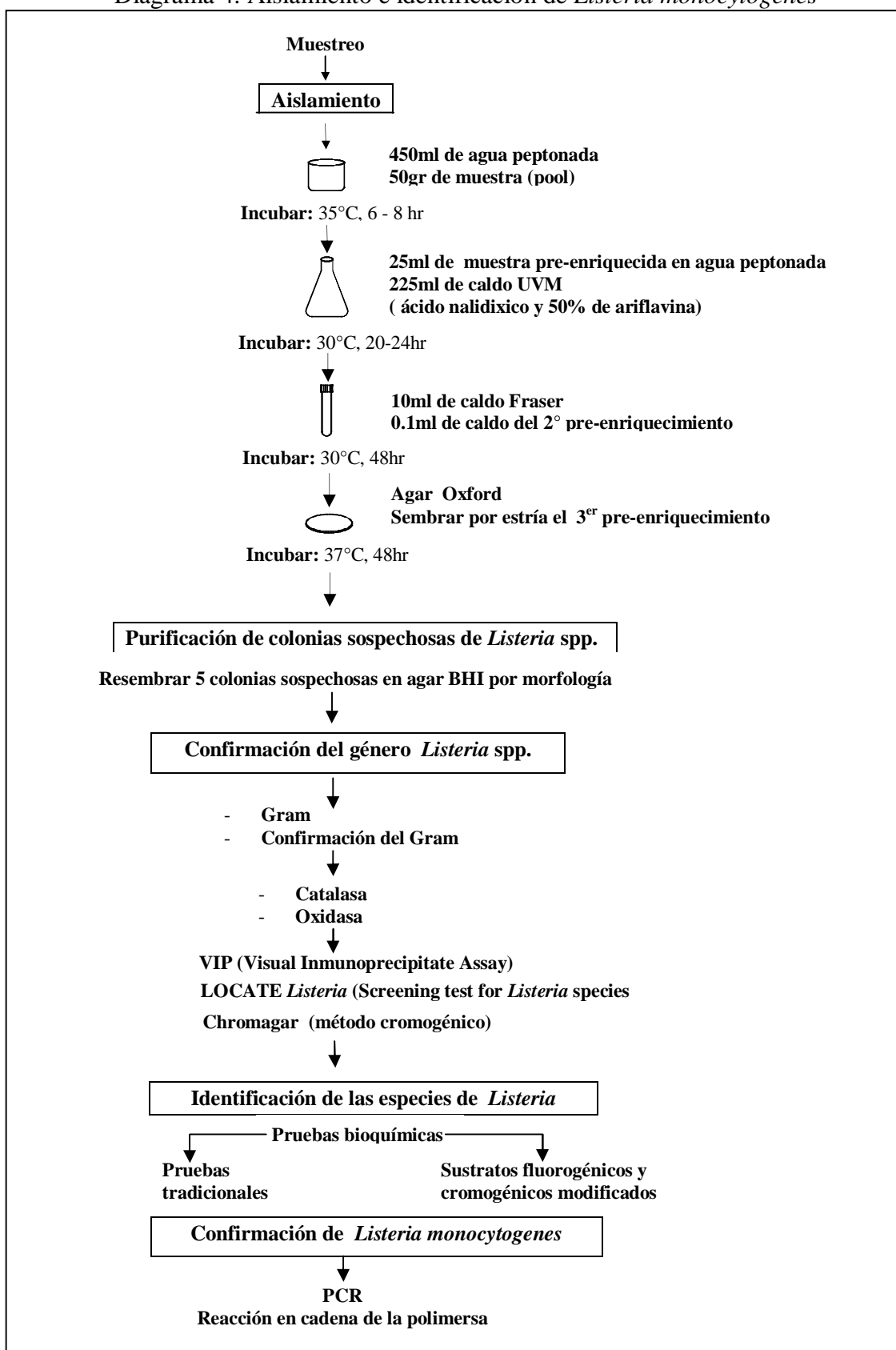
Se efectuó un pre-enriquecimiento, con 25 ml del inóculo del punto 3.2 en 225 ml de caldo UVM I (University of Vermont) suplementado con ácido nalidíxico y acriflavina, la concentración de este último compuesto fue disminuido en un 50 % debido a que la acriflavina puede inhibir el crecimiento de *Listeria spp.* (Netten et al., 1989). Incubándose a 30 °C durante 20 a 24 h.

Posteriormente se realizó un enriquecimiento, transfiriendo 0.1 ml del caldo del pre-enriquecimiento a 10 ml de caldo Fraser con ácido nalidíxico, acriflavina y citrato férrico anionico, incubándose a 30 °C durante un periodo de 24 a 48 h. Los medios con presuntas *Listerias* se oscurecieron debido a la utilización de la esculina y las sales férricas, mientras que las muestras negativas mantuvieron el tono amarillento del medio (Yousef y Carlstrom, 2006).

Se efectuó el aislamiento, sembrando con asa los cultivos de Fraser que se visualizaron como positivos tanto en 24 como en 48h, en agar Oxford modificado con el suplemento selectivo para *Listeria* (Oxoid SR140E) constituido por cicloheximida, sulfato de colistina, acriflavina, cefotetan y fosfomicina, se incubaron a 37 °C durante 24 a 48 h, ver Diagrama 4.

Aquellas colonias con morfología característica de *Listeria spp.*, redondas, café oscuras (hidrólisis de esculina positiva), con centro negro, fueron sembradas en agar infusión cerebro corazón para su posterior purificación e identificación, se confirmó el género *Listeria* con tinción de Gram, pruebas de oxidasa, catalasa, confirmación del gram, movilidad; completando con pruebas de identificación del género *Listeria*, y posteriormente, pruebas de confirmación de la especie (*Listeria monocytogenes*) como se describen posteriormente en el punto 3.4.1.

Diagrama 4. Aislamiento e identificación de *Listeria monocytogenes*



### **3.4.1. Pruebas de identificación del género *Listeria***

#### **3.4.1.2. Tinción de Gram**

La tinción de Gram es usada para clasificar bacterias sobre la base de sus morfologías celulares (cocos, bacilos y cocobacilos) y reacción de gram (color) (Koneman y Allen, 2008).

Procedimiento: Se realizó un frotis fino con las colonias presuntivas dejando secar al aire, se fijó el material al portaobjetos pasándolo tres o cuatro veces a través de la llama del mechero Bunsen, se recubrió la superficie con solución de violeta de genciana, luego de un minuto, se lavó exhaustivamente con agua destilada, se cubrió el frotis con lugol durante 1 minuto.

Se impregnó la superficie del frotis con unas gotas de decolorante alcohol-acetona, 5 a 10 segundos.

Se lavó con agua y se cubrió la superficie con la tinción de safranina durante 1 minuto, se lavó con agua y dejó secar el frotis.

Posteriormente se examinó el frotis teñido, con el microscopio bajo el objetivo de inmersión a 100x, para su morfología. Las bacterias gram positivas se tiñen de color azul oscuro; las bacterias gram negativas aparecen de color rosa o rojo (Arauz, 2011).

#### **3.4.1.3. Confirmación del Gram**

Determinación de gram positivas o negativas en virtud de la pared celular al reaccionar con una solución alcalina diluida (KOH al 3%).

Procedimiento: En un portaobjeto se colocó una gota de KOH y se añadió una asada del cultivo puro y fresco, se mezcló durante unos segundos, se levanto ligeramente el asa. Si se observó la formación de un hilo, la reacción se consideraba positiva, lo cual significaba que la bacteria pertenecía al grupo de bacterias gram negativas, mientras que las bacterias que no producían viscosidad se consideraban como gram positivas (Koneman y Allen, 2008).

#### **3.4.1.4. Prueba de la Catalasa**

La enzima catalasa interviene en la degradación del peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) en oxígeno y agua. La presencia de la enzima en un aislamiento bacteriano se pone en evidencia cuando se pone en contacto una colonia de la bacteria con una gota de  $H_2O_2$  (solución al 3%) provocando una formación rápida de burbujas de oxígeno (Forbes, Saham y Weissfeld, 2004).

Procedimiento: Con un palillo de madera, se transfirió parte del centro de una colonia en la superficie de un porta objetos de vidrio, se le agregó una gota de peróxido de hidrogeno al 3%, sí se observó, la aparición rápida y sostenida (20 a 30 seg.) de burbujas o de efervescencia se consideraba una reacción positiva (Koneman y Allen, 2008).

#### 3.4.1.5. Prueba de la oxidasa (método de Kovac)

Esta prueba se utiliza para determinar la presencia de citocromo oxidasa bacteriana mediante el empleo de la oxidación del sustrato dihidroclorhidrato de tetrametil-*p*-fenilendiamina a indofenol, como producto final de color violeta oscuro.

Procedimiento: Se humedeció un papel filtro con el sustrato (dihidroclorhidrato de tetrametil-*p*-fenilendiamina al 1%). Se tomó una porción pequeña de una colonia bacteriana con un palillo de madera estéril, se frotó la superficie del papel filtro. Se observó en el área inoculada un cambio de color a azul o violeta oscuro dentro de los 10 segundos (Forbes, Saham y Weissfeld 2004).

#### 3.4.2. Reacciones de inmunoprecipitación VIP (Visual immunoprecipitate assay).

Esta prueba presenta una región de siembra y una región inmunocromatográfica, con una zona de ensayo y una zona control donde se produce la reacción antígeno-anticuerpo-cromogénico, con alto grado de especificidad para los antígenos de *L. monocytogenes* y *Listeria spp.* (Feldsine et al., 2002).

Procedimiento: Cada una de las cepas aisladas se inocularon en un mililitro de caldo infusión cerebro corazón incubándose por un tiempo de 18-24 h a 37°C, posteriormente se trataron térmicamente en autoclave a una temperatura de 100°C por 5 min.

Se adicionó 0.1ml de la muestra tratada térmicamente en el pozo del dispositivo, incubándose a temperatura ambiente durante 10 min.

Posteriormente se examinó la presencia de la línea a través del visor en la ventana del dispositivo. La formación de la línea indicó una reacción positiva. Adicionalmente, una ventana donde existe una segunda línea (Control positivo) indicó una terminación completa de la prueba, Figura 5.



Figura 5. VIP (Visual immunoprecipitate assay).

### 3.4.3. Ensayos inmunoenzimáticos Locate (*Listeria*, screening test for *Listeria* species).

Esta es una prueba con enzimas inmunoabsorbentes (EIA) para la identificación del género *Listeria spp.* Basada en el empleo de un anticuerpo monoclonal de alta especificidad con los antígenos de *Listeria* (FDA, 1984).

Procedimiento: Cada una de las cepas aisladas se inocularon en 1ml de caldo infusión cerebro corazón, incubándose 18-24 h, posteriormente se colocaron en Baño María a 80°C durante 20 min.

Se adicionaron 100µl de control positivo y control negativo incluidos en el kit, y 100µl de las muestras tratadas térmicamente en los respectivos pozos, incubando la microplaca a una temperatura de 37°C por 30 min.

Se lavó cada pozo con el buffer de lavado, vaciando los residuos invirtiendo rápidamente la microplaca, removiendo cualquier residuo del buffer sacudiendo sobre una toalla de papel en una superficie plana.

Se adicionaron 100µl del conjugado (anti-anticuerpo) en cada pozo, incubándose durante 30 min a 37°C. Posteriormente se realizó el lavado de cada pozo como se mencionó anteriormente.

Se adicionaron 100µl del sustrato (TMB-3,3,5,5,-Tetramethylbenzidine) en cada pozo, secando inmediatamente la superficie con un papel absorbente, incubándose en un cuarto oscuro durante 30min.

En la interpretación de los resultados, un color azul indicó que las muestras fueron positivas y un color transparente que las muestras fueron negativas, tomando como referencia el control positivo y negativo presentes en los pozos correspondientes, posteriormente se adicionó una solución ácida para detener la reacción, produciendo un vire de color amarillo Figura 6.



Figura 6. Kit Locate® *Listeria spp* R-Biopharm.



### 3.4.4. BBL CHROMagar *Listeria*, medio cromogénico para la diferenciación e identificación.

Prueba para la identificación de *L. monocytogenes* / *L. Ivanovii*, mediante placas que contienen un medio cromogénico 5-bromo-4-cloro-3-indoxi- $\beta$ -D-glucopiranosido, produciendo un compuesto de color azul-verdoso que es hidrolizado por la  $\beta$ -D-glucosidasa una enzima específica del género *Listeria*; y enzimas fosfatidilinositol fosfolipasa C (PI-PLC) y la fosfatidilcolina fosfolipasa C (PC-PLC) de *L. monocytogenes* / *L. Ivanovii* actúan sobre el sustrato fosfolipídico produciendo un halo blanco opaco alrededor de las colonias azul-verdosas (Ritter, et al., 2003; y Hegdea et al., 2006).

Procedimiento: Se inoculó por el método de estría cada una de las cepas en las placas para efectuar su identificación. Incubándose las placas aeróbicamente a  $35 \pm 2^\circ\text{C}$  en posición invertida por 24 a 48 horas.

Posterior a su inoculación, las placas fueron leídas sobre un fondo blanco con una buena iluminación. Las colonia azul-verdosa rodeada de un halo blanco opaco en la placa indicaron la presencia de *Listeria monocytogenes* / *L. Ivanovii* Figura 7.



Figura 7. BD BBL™ CHROMagar™ *Listeria*

## 3.5. Identificación de las especies de *Listeria*

### 3.5.1. Pruebas bioquímicas tradicionales

#### 3.5.1.1. Prueba de movilidad a 25° C

Esta prueba se realiza para determinar si el microorganismo posee flagelos (Forbes, Saham y Weissfeld, 2004).

#### **3.5.1.1.1. Movilidad en fresco (Gota pendiente)**

Procedimiento: Se colocó una gota de cultivo joven (6 a 24 horas) en caldo en fase de crecimiento activo a 25°C en el centro de un cubreobjetos, más una pequeña gota de aceite de inmersión en cada ángulo del cubreobjetos excavado.

Se observó con objetivo de inmersión en un microscopio de contraste de fase o microscopio de campo oscuro. Las células de *Listeria spp.*, son bacilos cortos con movilidad rotatoria o como si brincaran (NOM-143-SSA1-1995).

#### **3.5.1.1.2. Movilidad en agar**

Procedimiento: Se inoculó el medio SIM incubado por 7 días a temperatura 25°C. Observándose diariamente, las especies de *Listeria* son móviles, dando un crecimiento típico en forma de paraguas (NOM-143-SSA1-1995).

#### **3.5.1.2. Prueba de fermentación de hidratos de carbono**

Determina la capacidad de un microorganismo para fermentar u oxidar (degradar) un hidrato de carbono específico incorporado en un medio basal y producir ácido o ácido con gas visible (Mac Faddin, 2003).

Procedimiento: Se inocularon tubos con campana de Durham y caldo purpura que contenía, cada uno de los hidratos de carbono al 0.5% (dextrosa, esculina, maltosa, ramnosa, manitol y xilosa) con un crecimiento bacteriano proveniente de un cultivo de 18 a 24 horas, incubándose los tubos a 35°C en aerobiosis hasta 7 días.

Una coloración amarilla indicó una prueba positiva, producción de ácido, si hay presencia de gas se observa una burbuja en la campana de Durham (Mac Faddin, 2003; Pascual, Anderson y Calderón, 2000). *Listeria monocytogenes* es manitol negativo, ramnosa positiva y xilosa negativa. (NOM-143-SSA1-1995).

#### **3.5.1.3. Prueba de hemólisis**

Prueba para detectar la presencia de hemolisinas, *L. monocytogenes* y *L. seeligeri* presenta una suave hemólisis ( $\beta$ -hemólisis) observando un ligero aclaramiento del agar sangre. Al contrario *Listeria ivanovii*, presenta una hemólisis fuerte e intensa, y *Listeria innocua* no presenta hemólisis (NOM-143-SSA1-1995 & Pascual, Anderson y Calderón, 2000). Sin embargo estudios realizados han demostrado la presencia de una cepa atípica no virulenta de *Listeria monocytogenes* (American Type Culture Collection ATCC15313), la cual no presenta hemólisis en sangre de cordero, solo es  $\beta$ -hemolítica en sangre de conejo (Kathoriou y Pine 1991; Donyou Liu y col, 2003).

Procedimiento: Se prepararon placas de agar sangre de cordero al 5%, con aproximadamente 15 mL de agar, con una profundidad inferior a 5 mm, se dibujó una cuadrícula de 20 a 25 espacios en el fondo de la placa, e inoculó por estría un cuadro por cada cultivo, incubándose por 48 h a 35°C. Se observaron las placas con luz brillante para evidenciar la presencia de hemólisis ver Figura 8.



Figura 8.  $\beta$ -hemólisis de *L. monocytogenes* en agar sangre

#### 3.5.1.4. Test de CAMP

La prueba de CAMP empleada para diferenciar entre especies de *Listeria* hemolíticas; *L. monocytogenes*, *L. ivanovii* y *L. seeligeri*. Ciertos microorganismos producen una proteína extracelular difusible (Factor de CAMP) que actúa de forma sinérgica con la  $\beta$ -lisina del *Staphylococcus aureus* para producir un aumento de la lisis de los eritrocitos (Forbes, Saham y Weissfeld, 2004). En esta prueba solo se empleó una cepa de *S. aureus*  $\beta$ -hemolítico que diferencía entre *L. monocytogenes* y *L. seeligeri* de las demás especies (MacFaddin, 2003).

Procedimiento: Se inocularon por estría una cepa de *S. aureus*  $\beta$ -hemolítico en un aplaca de agar sangre de cordero. Sembrados por estría varios cultivos sujetos a estudio en paralelo el uno del otro en forma uniforme pero en ángulo recto con *S. aureus* sin tocar el inóculo estafilocócico. Incubándose a 35° C por 24 a 48 h (MacFaddin, 2003).

Se observaron las reacciones hemolíticas después de la incubación, *L. monocytogenes* y *L. seeligeri* incrementan la zona de hemólisis frente a la cepa de *S. aureus*, con la producción de una característica zona en punta de flecha $\uparrow$  (Forbes, Saham y Weissfeld, 2004 & MacFaddin, 2003) ver Figura 9.



Figura 9. Prueba de CAMP para *L. monocytogenes* con *S. aureus*

### 3.5.1.5. Reducción de Nitrato

Esta prueba se utiliza para determinar la capacidad de un microorganismo de reducir el nitrato, y se observa mediante la adición de ácido sulfanílico y alfa-naftilamina (Forbes, Saham y Weissfeld, 2004).

Procedimiento: Se inocularon tubos con caldo de nitratos, incubándose a 35°C por 5 días. Para la lectura se agregó 0.2ml del reactivo A y 0.2 ml del reactivo B, un color rojo indicó una prueba positiva (presencia de nitritos) (NOM-143-SSA1-1995 y Singleton, 2004).

El reactivo A contiene: 0.5g de Alfa-naftilamina y 100 ml de ácido acético 5N; y el reactivo B, 1g de ácido sulfanílico y 125 ml de ácido acético 5N.

### 3.5.2. BD BBL Crystal, identification system id kit for gram positives.

Pruebas bioquímicas miniaturizadas que emplean sustratos convencionales fluorogénicos y cromogénicos modificados, empleadas para la identificación de género y especie de bacterias gram positivas (Koneman y Allen, 2008) ver Figura 10.



Figura 10. **BD BBL Crystal, identification system id kit for gram positives**

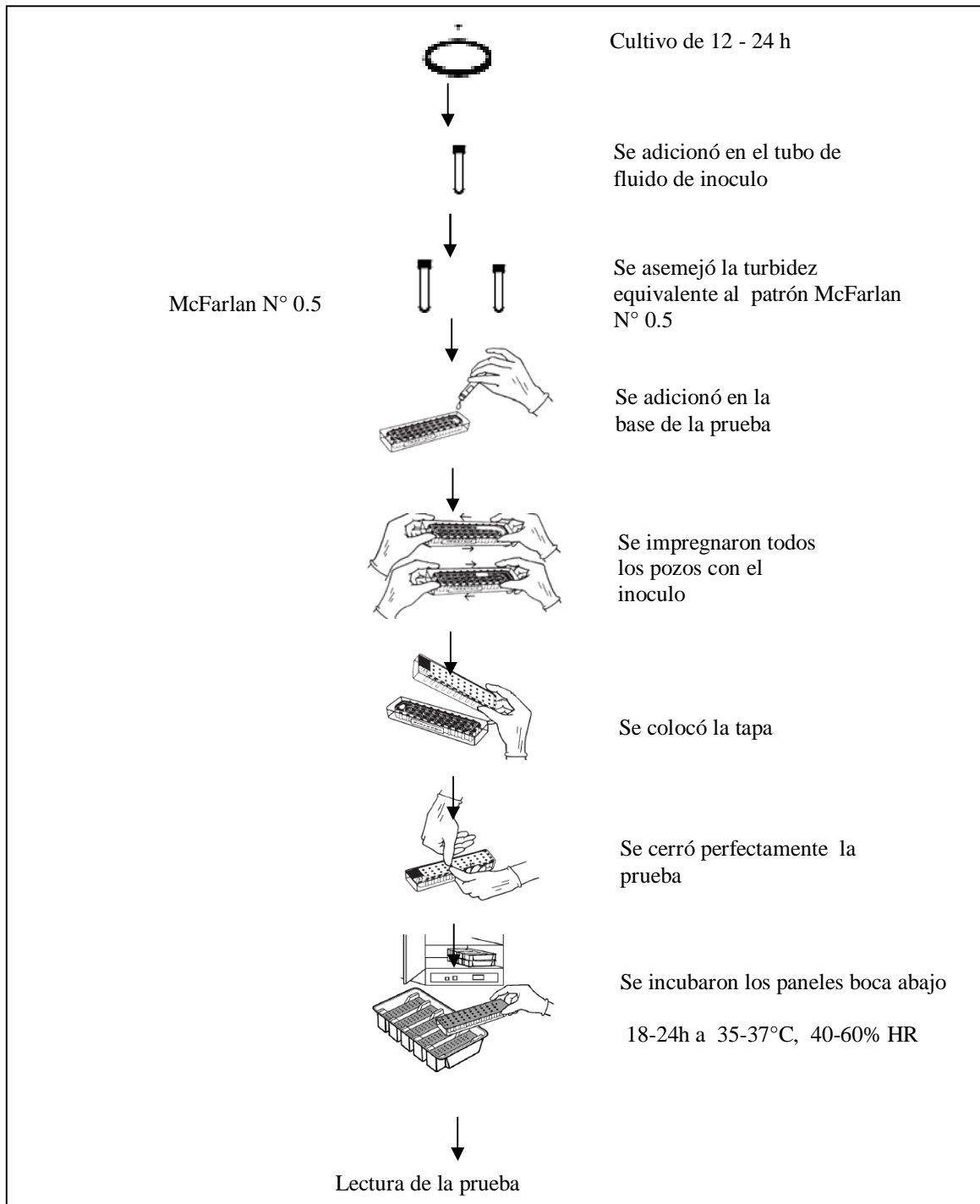
Procedimiento: Se emplearon colonias previamente aisladas de cultivos puros de no más de 18 a 24 h en agar soya trypticasa con 5% de sangre de cordero. A las cuales, se les realizó la prueba de gram para identificar su morfología.

Se tomaron varias colonias de la misma morfología con una asa plástica desechable y se colocaron en el tubo de fluido de inóculo hasta que la turbidez fuera la equivalente a un patrón de McFarlan N° 0.5.

Se vertió el contenido del tubo de fluido de inóculo BBL CRYSTAL en el área delimitada de la base de la prueba, balanceándose hasta que los pozos quedaran completamente llenos, se colocó la tapa cerrando perfectamente.

Posteriormente se incubaron los paneles boca abajo durante 18 a 24h a una temperatura de 35-37°C, con 40-60% de humedad relativa, ver Diagrama 5.

Diagrama 5. Sistema BBL CRYSTAL de identificación gram (+)



La lectura de los paneles se realizó consultando la plantilla de reacciones de color, para las columnas A - D (sustratos fluorescentes), ver Figura 11.

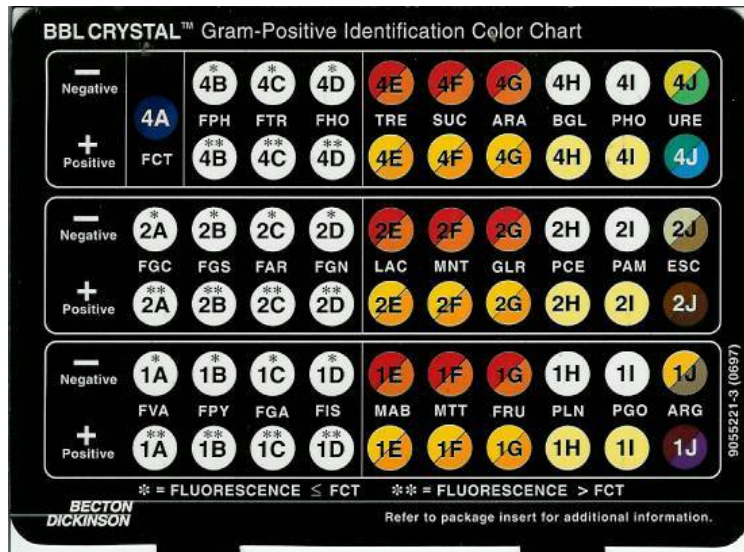


Figura 11. Plantilla BBL Crystal gram (+)

Figura 12. Perfil de resultados prueba BBL Crystal gram (+)

Cada reacción positiva recibió un valor de 4, 2 ó 1, correspondiente a la fila donde se encuentra la reacción, los resultados negativos se tomaron con el valor de cero.

Los resultados de cada columna se colocan en el perfil de resultados para gram (+) mostrado en la Figura 12, se sumaron los valores obteniendo un número de 10 dígitos siendo éste el número de perfil, mostrado en la Figura 13. El número de perfil y la morfología celular se introdujeron en el software BBL Crystal para obtener la identificación de dichas bacterias.

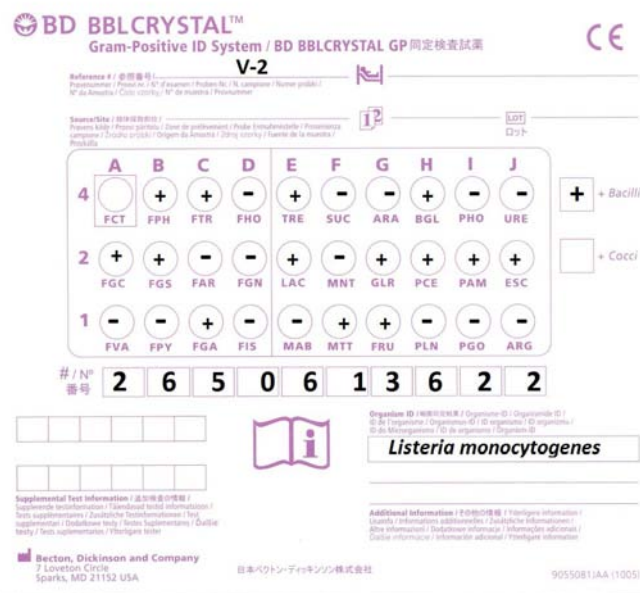


Figura 13. Lectura de resultados para la prueba BBL Crystal gram (+)

### 3.6. Confirmación de la especie *Listeria monocytogenes*

#### 3.6.1. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

Se utilizó el kit para PCR Master Mix Promega ver Figura 14, para la prueba molecular empleada para la identificación por medio de la detección del gen *iap* presente en *Listeria monocytogenes* teniendo una amplificación de 175 pares de bases, por medio de primers LIM2 y LIMRE con una secuencia (5' a 3') de CTA AAG CGG GAA TCT CCC TT y CCA TTG TCT TGC GCG TTA AT respectivamente. Empleando el ADN purificado de las cepas aisladas y una cepa de referencia.

Posteriormente se visualizaron los productos en un gel de electroforesis usando 1.5% de agarosa que contenía bromuro de etidio (Hein et al., 2001).



Figura 14. Kit para PCR Master Mix Promega

### 3.6.1.1 EXTRACCION DEL ADN

Se realizó la purificación de ADN genómico del cultivo bacteriano con la prueba gDNA ChargeSwitch®, la cual se basa en el empleo de perlas magnéticas con un grupo único funcional ionizable, cuya afinidad para los ácidos nucleicos es dependiente del pH para facilitar la purificación de ácido nucleico (Dauphin, et al., 2010) ver Figura 15.



Figura 15. Kit gDNA ChargeSwitch®



### 3.6.1.1.1. PREPARACIÓN DE LA MUESTRA

Se inocularon 3ml de caldo BHI con cada una de las cepas presuntivas de *Listeria monocytogenes*, incubándose por 24 h a una temperatura de 37°C.

Se colocaron 200µL del cultivo anterior en un microtubo para centrifugarse a 3.5 rpm durante 5 min, posteriormente, se eliminó el sobrenadante.

Se resuspendió el pellet celular en 100µL de buffer de resuspensión (R4) con RNasa A y 5µL de solución de Lisosima (50mg/mL) mezclado suavemente por pipeteo, quedando la célula perfectamente distribuida, se incubó la muestra a una temperatura de 37°C por 10 min, durante la incubación, se mezclaron 500µL de buffer de lisis (L14) con 10µL de la solución Proteinasa K por cada muestra, ver Diagrama 6.

Se adicionaron 500µL de buffer de Lisis/ Proteniasa K a la muestra, esta fue mezclada invirtiendo el microtubo en 6 tiempos, posteriormente se incubó la muestra por un tiempo de 10 min a una temperatura de 55°C, mostrado en el Diagrama 7.

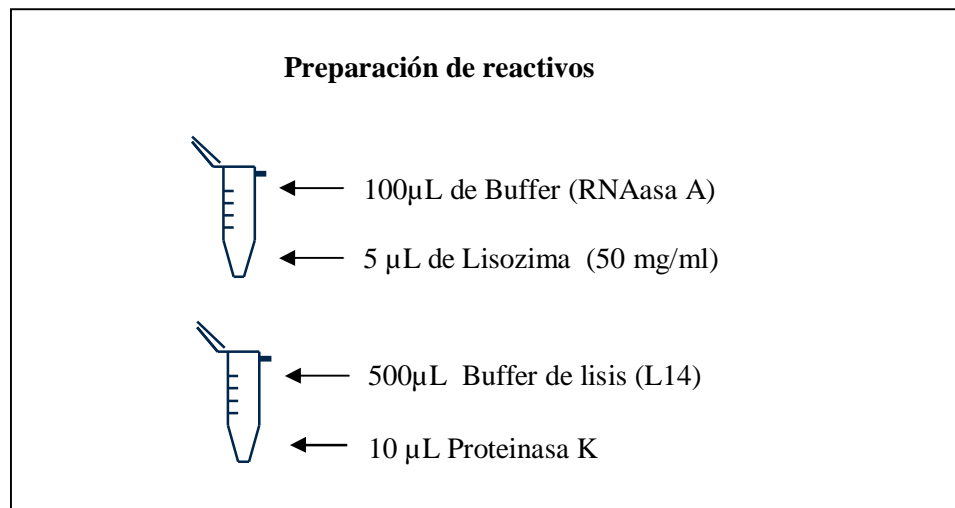


Diagrama 6. Preparación de reactivos para la extracción de ADN

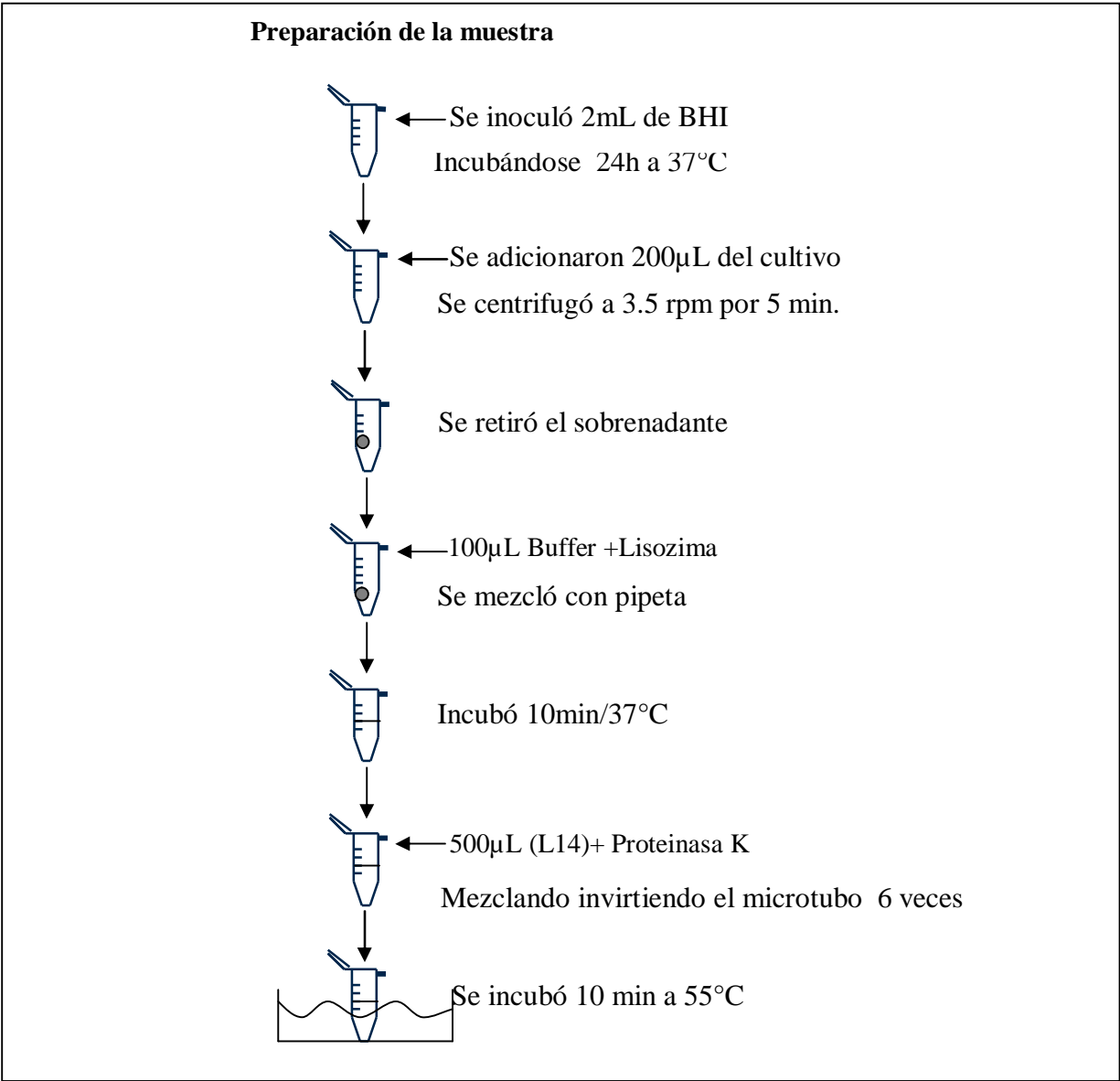


Diagrama 7. Preparación de la muestra para la extracción de ADN

### 3.6.1.1.2. FIJACIÓN DEL DNA

Se adicionaron 40 $\mu$ L de perlas magnéticas previamente mezcladas en el vortex (hasta su perfecta distribución en el buffer), a la muestra incubadas anteriormente, mezclando por pipeteo, arriba y abajo sin formar burbujas.

Se adicionaron 300 $\mu$ L de buffer obligatorio (B8), mezclando con el vortex de 5-6 pulsaciones cada uno de 1-2 seg, incubando a temperatura ambiente por un minuto.

Se colocó la muestra en el rack magnético por un minuto o hasta la formación del pellet, sin remover el microtubo del rack magnético, posteriormente, se removió cuidadosamente y descartó el sobrenadante sin deshacer el pellet, como se muestra en el Diagrama 8.

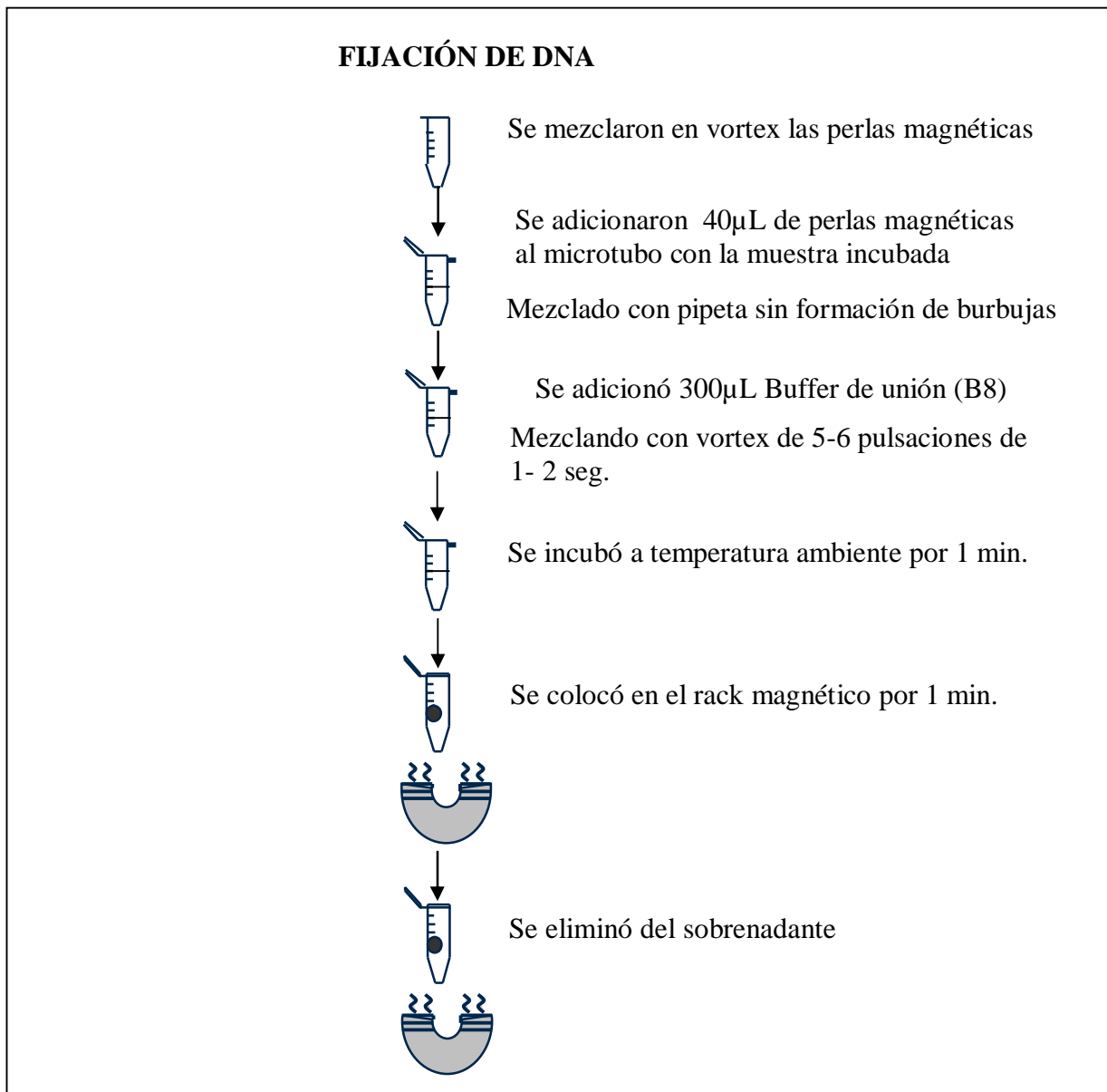


Diagrama 8. Fijación de ADN

### 3.6.1.1.3.- LAVADO DE DNA

Se removió del rack magnético el microtubo que contenía el pellet de perlas magnéticas, se adiciono 1mL buffer de lavado (W12) al microtubo, mezclando con una pipeta de 1mL succionando y descargando en 3 tiempos sin formar burbujas.

Se colocó el microtubo en el rack magnético por un minuto o hasta la formación del pellet, sin remover el microtubo del rack magnético descartando el sobrenadante, sin destruir el pellet, este paso del lavado se realizó tres veces, Diagrama 9.

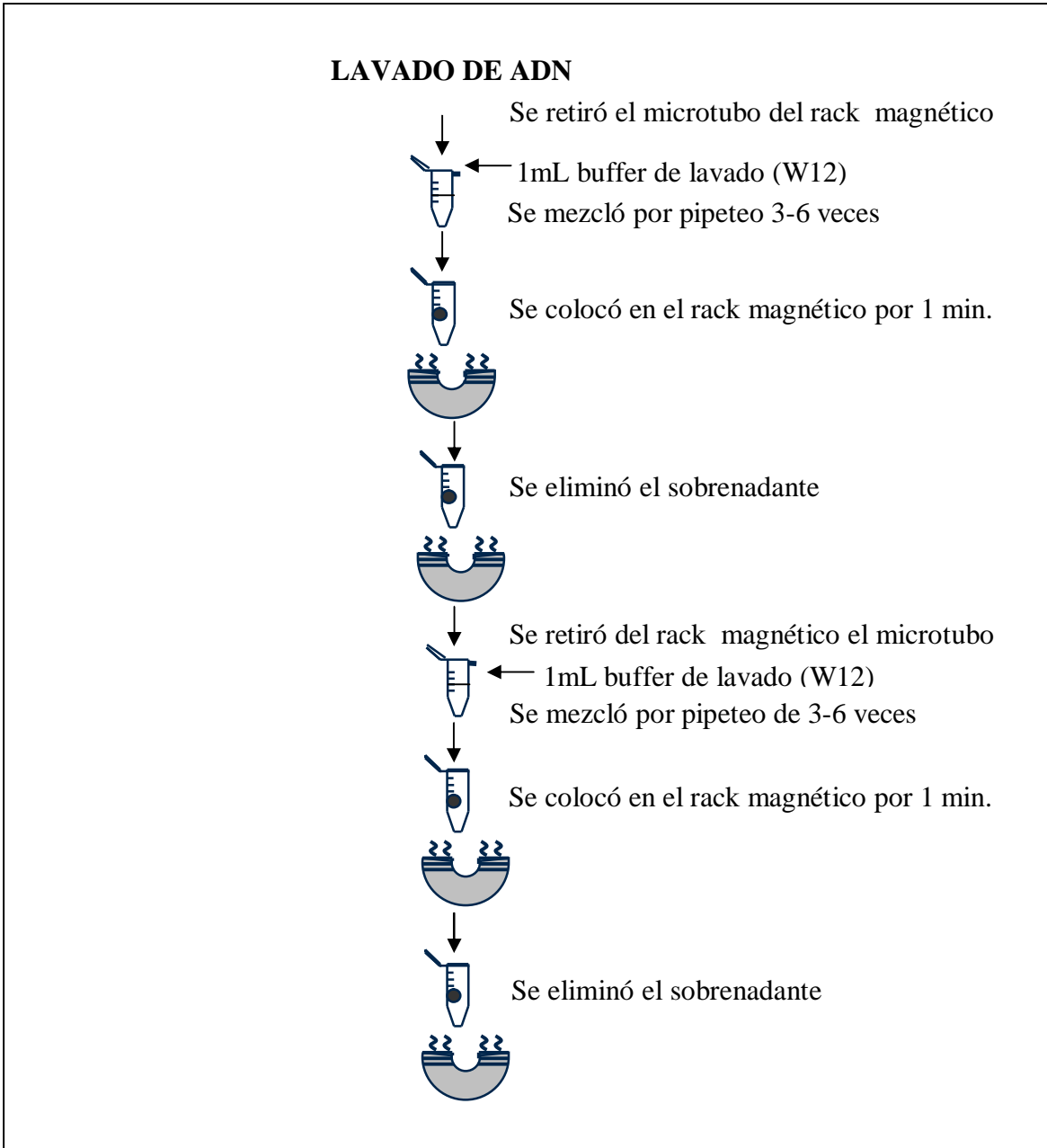


Diagrama 9. Lavado de ADN

### 3.6.1.1.4. SEPARACIÓN DEL DNA

Se removió del rack magnético el microtubo que contenía el pellet de perlas magnéticas y adicionaron 200 $\mu$ L de buffer de elusión (E5; 10mM Tris-HCl, Ph = 8.5), mezclando con pipeta en 5-10 tiempos sin la formación de burbujas, se incubó a temperatura ambiente durante 5 minutos mezclando con pipeta en el minuto 2.5. Se colocó el microtubo en el rack magnético por un minuto o hasta la formación del pellet, sin remover el microtubo del rack magnético, se extrajo el sobrenadante (conteniendo el DNA), sin destruir el pellet colocándolo en otro microtubo, Diagrama 10. Posteriormente se realizó la electroforesis con gel de agarosa al 8%, para observar su correcta extracción. El DNA se conservó a una temperatura de -20°C para futuras pruebas.

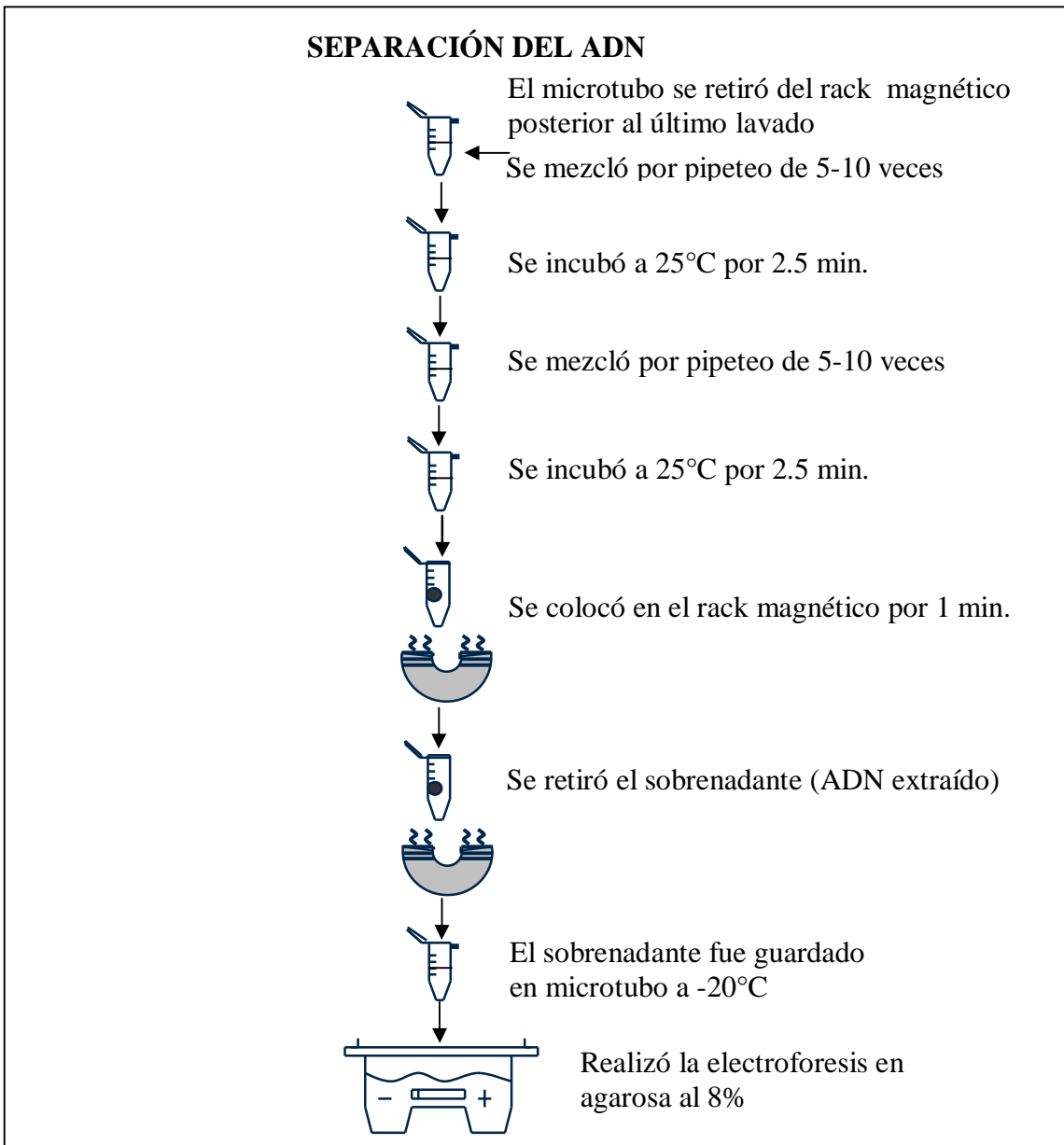


Diagrama 10. Separación de ADN

### 3.6.1.1.5. ELECTROFORESIS

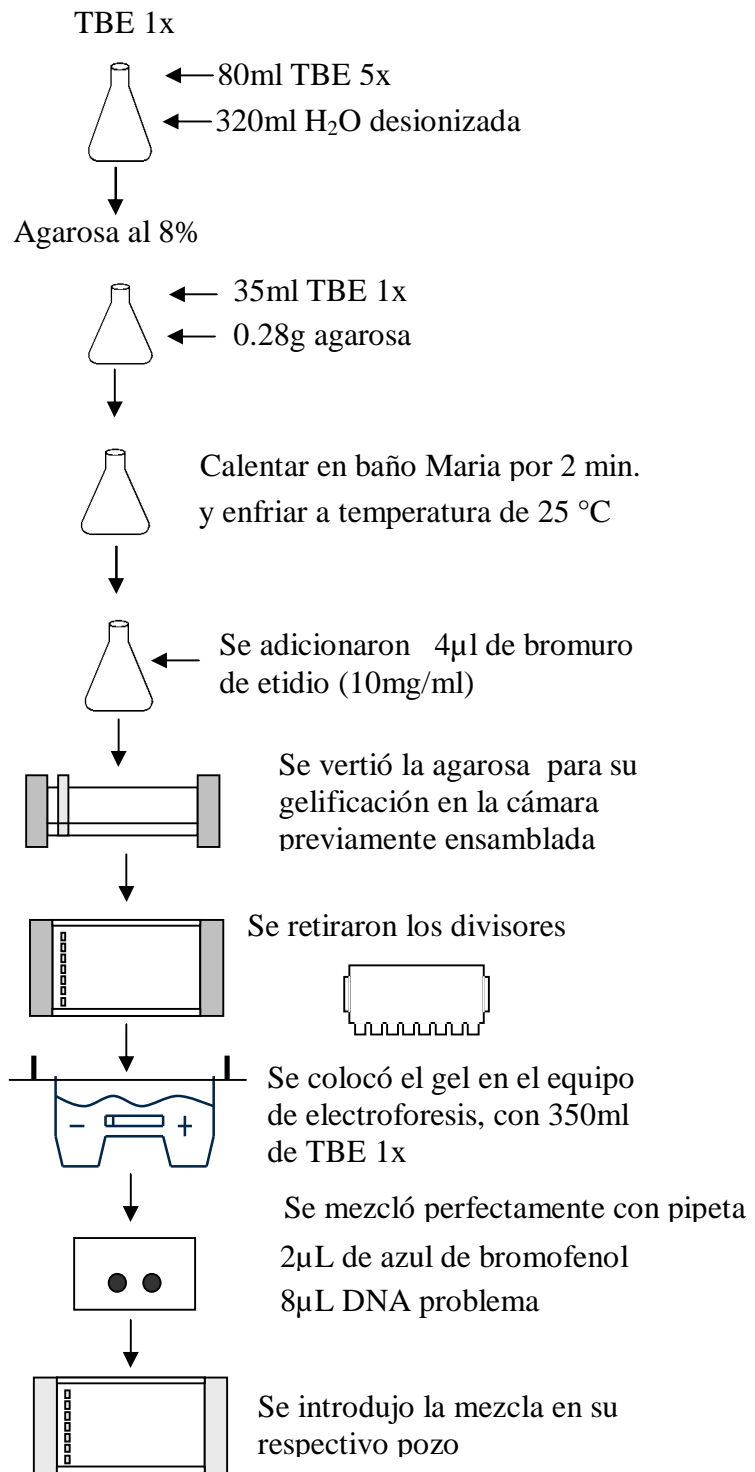
La electroforesis en gel de agarosa es un método empleado para la identificación fragmentos de ADN. La agarosa es un polímero lineal, extraído de algas marinas, en el cual las moléculas de ADN de doble cadena migran de manera inversamente proporcional al logaritmo en base 10 ( $\log 10$ ) de sus tamaños moleculares. Dado que el ADN está cargado negativamente debido a los grupos fosfatos de las moléculas, la migración en la cámara de electroforesis ocurre del polo negativo hacia el polo positivo (Puerta y Urueña, 2009).

Se realizó la prueba de electroforesis con agarosa al 8% para visualizar los segmentos de ADN purificados de las bacterias aisladas y agarosa al 1.5% para visualizar los productos de PCR.

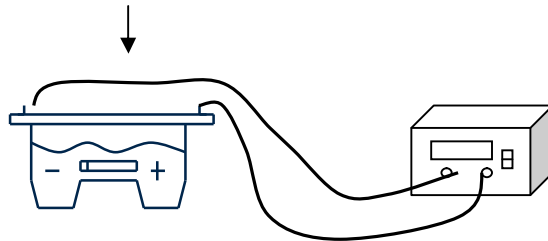
#### Procedimiento

1. Se preparó el TBE al 1x (1:5) con agua desionizada.
2. El gel de agarosa se preparó al 8% con el TBE al 1x, calentando en baño maría hasta hidratación del gel, se mantuvo a temperatura ambiente para adicionar 4 $\mu$ L de Bromuro de Etidio (10mg /mL) empleando guantes ya que es altamente toxico.
3. Se vertió la agarosa en la cámara ya ensamblado, con un espesor de 0.5cm, dejando gelificar.
4. Se retiraron los divisores, colocando la cámara en el carrito de electroforesis, adicionando 300mL de TBE al 1x.
5. Mezclando con pipeta 2 $\mu$ L de azul de bromofenol más 8 $\mu$ L de DNA problema, se introdujo en un pozo cuidadosamente cada una de las mezclas (ADN más el azul de bromofenol).
6. Se colocó la tapa del carrito de electrofóresis y conectando a la fuente de poder, programando el convertidor a 70 volts, hasta que se observó, que las mezclas de DNA salieron de los pozos.
7. Posterior mente se aumentó el voltaje, apagando el convertidor cuando la mezcla de ADN se encontrara a la mitad de la cámara.
8. Se extrajo el gel y se colocó en el trans-iluminador.
9. Observando la presencia del DNA (segmentos de línea color naranja) Diagrama 11.

## Diagrama 11. ELECTROFORESIS



Continuación Diagrama 11. ELECTROFORESIS



Se conectaron los electrodos a la fuente de poder.



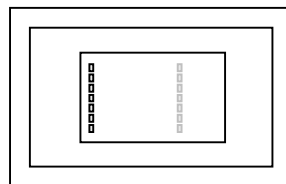
Iniciando con un voltaje de 70 volts, hasta que las muestras salieron de los pozos; aumentando a 100 volts.



Se apagó el convertidor de energía cuando la muestra se encontró a  $\frac{3}{4}$  del equipo.



Se desmonto del equipo la placa de agarosa para ser colocado en el transiluminador



Se efectuó la lectura del gel con el transiluminador



### 3.6.1.1.6. Reacción en Cadena de la Polimerasa PCR

Procedimiento:

1. Primers.
  - 1.1 Se resuspendió el primer LIM2 a una concentración de 115 $\mu$ M y LIMRE con 120 $\mu$ M en 500 $\mu$ L H<sub>2</sub>O libre de DNAsas.
  - 1.2 Se alícuotaron 60 $\mu$ L de cada uno de los primers en los microtubos.
  - 1.3 Los primers se mantuvieron a una temperatura de -18°C, para su conservación.
2. Se empleó un kit de PCR Master Mix, 2X (Promega®) que contenía: 50 unidades/ml de Taq DNA polimerasa resuspendida en un buffer de reacción con pH 8.5, 400 $\mu$ M dATP, 400 $\mu$ M dGTP, 400 $\mu$ M dCTP, 400 $\mu$ M dTTP, 3mM MgCl<sub>2</sub>. Se empleó H<sub>2</sub>O de grado molecular.
  - 2.1 Se conservaron a -18°C, y fueron descongelados al momento de emplearlos.
3. Mezcla de reactivos.
  - 3.1 Se descongelaron los reactivos: master mix, primer LIM2, primer LIMRE, el DNA de la muestra, el DNA de referencia y el H<sub>2</sub>O de grado molecular.
  - 3.2 En un microtubo, se adicionaron 12.5 $\mu$ L de reactivo master mix, 2.5 $\mu$ L de cada uno de los primers LIM2 y LIMRE, 3.5 $\mu$ L de H<sub>2</sub>O y por último 4.0 $\mu$ L de DNA problema (Ingeborg, 2001).
  - 3.3 Se mezcló cuidadosamente con micropipeta.
  - 3.4 Posteriormente se prepararon los controles positivo y negativo, colocando en un microtubo, 12.5 $\mu$ L de reactivo master mix, 2.5 $\mu$ L de cada uno de los primers LIM2 y LIMRE, 3.5 $\mu$ L de H<sub>2</sub>O y por último para el control positivo se adicionó 4.0 $\mu$ L de DNA control (*Listeria monocytogenes*) y para el control negativo 4.0 $\mu$ L H<sub>2</sub>O respectivamente (Promega corp., 2002)
  - 3.5 Se mezcló suavemente con micropipeta.
  - 3.6 Se centrifugaron los microtubo por 5seg para asegurar que el líquido no se encontrara en las paredes del microtubo.
4. Reacción de PCR
  - 4.1. En el termociclador se colocaron los microtubo que contenían la mezcla de control positivo, el control negativo y el DNA problema de cada muestra.
  - 4.2. Se inició con el programa correspondiente para la amplificación del gen: se empleó un paso inicial de 10min a 94°C, 30 ciclos de 0.5 min a 94°C para la desnaturalización, 30 ciclos de 0.5 min a 53°C para la hibridación, 30 ciclos de 0.5 min a 72°C para la elongación, y 5 min a 72°C para una extensión final (Hein et al., 2001).
5. Electroforesis
  - 5.1 Se realizó la electroforesis con gel de agarosa al 1.5% (Puerta y Urueña, 2009), observando la amplificación del gen *iap*.

# **CAPÍTULO 4. RESULTADOS**

#### 4.1 Aislamiento de *Listeria monocytogenes*

Se encontraron 78 colonias presuntivas a *Listeria monocytogenes* con color café oscuro y halo negro típico del agar Oxford modificado para cada uno de los grupos (ver Tabla 17).

**Tabla 17 Colonias sospechosas del género *Listeria spp.* en agar Oxford modificado en dos periodos de incubación, para cada grupo según procedencia.**

Zona de muestreo	Nomenclatura de los grupos formados	Colonias presuntivas				
		Presencia en 24hr	Colonias aisladas	Presencia en 48hr	Colonias aisladas	Total
F-1	F-1.1	-	-	-	-	-
	F-1.2	+	7	+	6	13
	F-1.3	-	-	+	5	5
	F-1.4	-	-	-	-	-
	F-1.5	-	-	-	-	-
F-4	F-4.1	-	-	-	-	-
	F-4.2	+	8	+	4	12
	F-4.3	+	13	+	8	21
	F-4.4	-	-	-	-	-
	F-4.5	-	-	+	8	8
CB-1	CB-1.1	-	-	-	-	-
	CB-1.2	-	-	+	5	5
	CB-2.1	-	-	+	2	2
	CB-2.2	-	-	+	2	2
	CB-3	-	-	-	-	-
	CB-4	-	-	-	-	-
	CB-5	-	-	-	-	-
	CB-6	-	-	+	5	5
	CB-7	-	-	+	5	5
CB-8	-	-	-	-	-	
Total	20		28		50	78

Facultad campo 1: (F-1), Facultad campo 4: (F-4), Preparatoria: (CB-1).

Se obtuvieron 10 (50%) grupos con cepas presuntivas del género *Listeria*, distribuidas en las tres zonas del muestreo, de estas se aislaron 28 (35.9%) cepas en un periodo de incubación de 24hr, y 50 (64.1%) cepas en un periodo de 48hr en agar Oxford modificado (ver Figura 16).

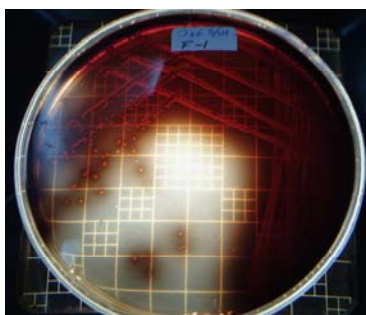


Figura 16. Colonias de *Listeria* en agar Oxford modificado

## 4.2 Identificación del género *Listeria spp.* por morfología colonial

Las colonias sospechosas fueron sometidas a pruebas bioquímicas primarias de género, realizando tinción de Gram, confirmación del Gram, prueba de catalasa y prueba de oxidasa (ver Tabla 18).

**Tabla 18. Resultados de pruebas bioquímicas primarias para la identificación del género *Listeria spp.***

Grupo	Cepa	Gram		Confirmación del Gram (KOH)	Catalasa	Oxidasa	Género
		Forma	Tinción				
F-1.2	F-1.2a1	Bacilos cortos	+	+	+	-	<i>Listeria spp.</i>
	F-1.2a2	Bacilos cortos	+	+	+	-	<i>Listeria spp.</i>
	F-1.2a3	Cocobacilos	+	+	+	-	<i>Listeria spp.</i>
	F-1.2a4	Cocobacilos	+	+	+	-	<i>Listeria spp.</i>
	F-1.2a5	Cocobacilos	+	+	+	-	<i>Listeria spp.</i>
	F-1.2a6	Cocobacilos	+	+	+	-	<i>Listeria spp.</i>
	F-1.2b1	Bacilos cortos	+	+	+	-	<i>Listeria spp.</i>
	F-1.2b2	Cocobacilos	+	+	+	-	<i>Listeria spp.</i>
	F-1.2b3	Cocobacilos	+	+	+	-	<i>Listeria spp.</i>
	F-1.2b4	Cocobacilos	+	+	+	-	<i>Listeria spp.</i>
	F-1.2b5	Cocobacilos	+	+	+	-	<i>Listeria spp.</i>
F-4.2	F-4.2b1	Bacilos cortos	+	+	+	-	<i>Listeria spp.</i>
	F-4.2b2	Bacilos cortos	+	+	+	-	<i>Listeria spp.</i>
	F-4.2b3	Bacilos cortos	+	+	+	-	<i>Listeria spp.</i>
	F-4.2b4	Bacilos cortos	+	+	+	-	<i>Listeria spp.</i>
	F-4.2b5	Bacilos cortos	+	+	+	-	<i>Listeria spp.</i>
F-4.3	F-4.3a1	Cocobacilos	+	+	+	-	<i>Listeria spp.</i>
	F-4.3a2	Cocobacilos	+	+	+	-	<i>Listeria spp.</i>
	F-4.3a3	Cocobacilos	+	+	+	-	<i>Listeria spp.</i>
	F-4.3a4	Cocobacilos	+	+	+	-	<i>Listeria spp.</i>
	F-4.3b1	Cocobacilos	+	+	+	-	<i>Listeria spp.</i>
	F-4.3b2	Cocobacilos	+	+	+	-	<i>Listeria spp.</i>
	F-4.3b3	Cocobacilos	+	+	+	-	<i>Listeria spp.</i>
	F-4.3b4	Cocobacilos	+	+	+	-	<i>Listeria spp.</i>
	F-4.3b5	Cocobacilos	+	+	+	-	<i>Listeria spp.</i>
F-4.3b6	Cocobacilos	+	+	+	-	<i>Listeria spp.</i>	
F-4.3b7	Cocobacilos	+	+	+	-	<i>Listeria spp.</i>	
F-4.3b8	Cocobacilos	+	+	+	-	<i>Listeria spp.</i>	

a.- incubación 24hr y b.- incubación 48hr

Por las pruebas bioquímicas primarias de Gram (ver Figura 17), oxidasa y catalasa utilizadas para identificar el género de *Listeria* según menciona Lauchlin, (1997) y Moreno et al., (2012). Se confirmaron 29/78 (37.1%) de las colonias aisladas pertenecientes a 3/20 (15%) grupos muestreados. También se observó que la incubación de 48hr favoreció el aislamiento de mayor número de colonias sospechosas en agar Oxford modificado como lo reporta también Jamali, et al., (2013). Obteniendo 10/29 (34.5%) colonias presuntivas en 24hr y 19/29 (65.5%) para la incubación de 48hr.

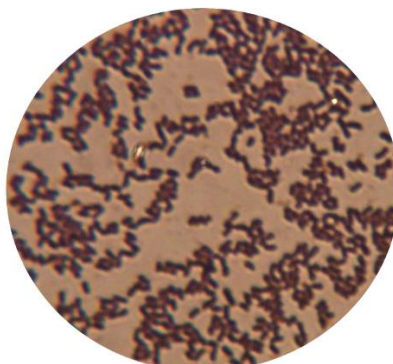


Figura 17. Tinción de Gram positivo, bacterias en forma de cocobacilos

### 4.3 Confirmación del género *Listeria spp.*

#### 4.3.1 Identificación de la presencia del género *Listeria spp.* para cada grupo formado según procedencia, mediante la prueba de inmunoprecipitación visual (VIP).

Se identificó la presencia del género *Listeria* en cada grupo de muestras formadas según su procedencia, analizando solo una cepa ya que todas provenían del mismo grupo (ver Tabla 19).

**Tabla 19. Resultado de la identificación de colonias sospechosas del género *Listeria spp.* por reacciones de inmunoprecipitación.**

Grupo	Cepa	Resultados
F-1.2	F-1.2a1	+
F-4.2	F-4.2b2	+
F-4.3	F-4.3b2	+

Se observó la formación del complejo antígeno-anticuerpo-cromogénico, el cual indicó una reacción positiva confirmando el género *Listeria spp.* para los tres grupos de muestras (ver Figura 18). En un estudio realizado por Moscalewski et al., (2011) confirman la alta sensibilidad que tiene la prueba de inmunoprecipitación visual ante los métodos tradicionales sobre la detección de *Listeria monocytogenes*, por lo que podemos ver una alternativa rápida para la identificación de *Listeria spp.*

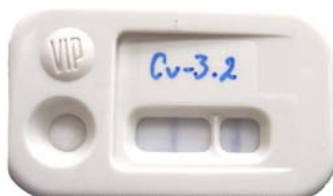


Figura 18. VIP (Visual immunoprecipitate assay) positivo.

### 4.3.2. Identificación del género *Listeria* spp. para cada cepa sospechosa mediante pruebas inmunoenzimáticas (Locate®)

Se llevó acabo la identificación del género *Listeria* spp. para cada cepa sospechosa de los tres grupos de muestras presuntivas de este patógeno por medio de pruebas inmunoenzimáticas LOCATE® *Listeria* spp. (ver Tabla 20).

**Tabla 20 Resultados de la reacción inmunoenzimática de cepas sospechosas del género *Listeria* spp. mediante la prueba Locate®**

Grupo	Cepa	Inmunocomplejo enzimático	Grupo	Cepa	Inmunocomplejo enzimático
F-1.2	F-1.2a1	+	F-4.3	F-4.3a1	+
	F-1.2a2	+		F-4.3a2	+
	F-1.2a3	+		F-4.3a3	+
	F-1.2a4	+		F-4.3a4	+
	F-1.2a5	+		F-4.3b1	+
	F-1.2a6	+		F-4.3b2	+
	F-1.2b1	+		F-4.3b3	+
	F-1.2b2	+		F-4.3b4	+
	F-1.2b3	+		F-4.3b5	+
	F-1.2b4	+		F-4.3b6	+
	F-1.2b5	+		F-4.3b7	+
	F-1.2b6	+		F-4.3b8	+
	F-4.2	F-4.2b1		+	
F-4.2b2		+			
F-4.2b3		+			
F-4.2b4		+			
F-4.2b5		+			

Se observó la formación del inmunocomplejo enzimático antígeno-anticuerpo-cromógeno en las cepas sospechosas considerándose positivas al género *Listeria* spp. para todas las cepas inoculadas en esta prueba, visualizando una reacción positiva en el vire de color en la microplaca (ver Figura 19). Lathrop et al., (2003) confirman la alta sensibilidad que tienen este tipo de pruebas en la identificación de género.

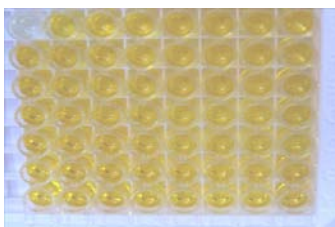


Figura 19. LOCATE® *Listeria* spp. prueba positiva.

### 4.3.3. Identificación del género *Listeria* spp. para cada cepa sospechosa por método cromogénico (CHROMagar®)

Se efectuó la identificación del género *Listeria* spp. para cada una de las cepas sospechosas de los tres grupos de muestras, por medio de placas cromogénicas CHROMagar®, las cuales realizan la identificación de bacterias *Listeria monocytogenes* / *L. ivannovi* (ver Tabla 21).

**Tabla 21. Resultados de la reacción de medios cromogénicos para las cepas sospechosas del género *Listeria* spp. con placas de CROMagar®**

Grupo	Cepa	Características de las colonias		Género
		Colonias azul verdosas	Formación de halo blanco	
F-1.2	F-1.2a1	+	-	<i>Listeria</i> spp
	F-1.2a2	+	-	<i>Listeria</i> spp
	F-1.2a3	+	-	<i>Listeria</i> spp
	F-1.2a4	+	-	<i>Listeria</i> spp
	F-1.2a5	+	-	<i>Listeria</i> spp
	F-1.2a6	+	-	<i>Listeria</i> spp
	F-1.2b1	+	-	<i>Listeria</i> spp
	F-1.2b2	+	-	<i>Listeria</i> spp
	F-1.2b3	+	-	<i>Listeria</i> spp
	F-1.2b4	+	-	<i>Listeria</i> spp
	F-1.2b5	+	-	<i>Listeria</i> spp
F-4.2	F-4.2b1	+	+	<i>L. monocytogenes</i> / <i>L. ivannovi</i>
	F-4.2b2	+	+	<i>L. monocytogenes</i> / <i>L. ivannovi</i>
	F-4.2b3	+	+	<i>L. monocytogenes</i> / <i>L. ivannovi</i>
	F-4.2b4	+	+	<i>L. monocytogenes</i> / <i>L. ivannovi</i>
	F-4.2b5	+	+	<i>L. monocytogenes</i> / <i>L. ivannovi</i>
F-4.3	F-4.3a1	+	+	<i>L. monocytogenes</i> / <i>L. ivannovi</i>
	F-4.3a2	+	+	<i>L. monocytogenes</i> / <i>L. ivannovi</i>
	F-4.3a3	+	+	<i>L. monocytogenes</i> / <i>L. ivannovi</i>
	F-4.3a4	+	+	<i>L. monocytogenes</i> / <i>L. ivannovi</i>
	F-4.3b1	+	+	<i>L. monocytogenes</i> / <i>L. ivannovi</i>
	F-4.3b2	+	+	<i>L. monocytogenes</i> / <i>L. ivannovi</i>
	F-4.3b3	+	+	<i>L. monocytogenes</i> / <i>L. ivannovi</i>
	F-4.3b4	+	+	<i>L. monocytogenes</i> / <i>L. ivannovi</i>
	F-4.3b5	+	+	<i>L. monocytogenes</i> / <i>L. ivannovi</i>
F-4.3b6	+	+	<i>L. monocytogenes</i> / <i>L. ivannovi</i>	
F-4.3b7	+	+	<i>L. monocytogenes</i> / <i>L. ivannovi</i>	
F-4.3b8	+	+	<i>L. monocytogenes</i> / <i>L. ivannovi</i>	

En esta prueba se observó la presencia del género *Listeria* spp. ya que se efectuó la reacción del sustrato, L- $\alpha$ -fosfatidil-inositol por el factor fosfatidilinositol fosfolipasa C (PI-PLC) y C-fosfatidilcolina fosfolipasa (PC-PLC) producido por *L. monocytogenes* dando como resultado la formación de una zona de precipitado blanco (halo)

alrededor de la colonia, en combinación con el sustrato cromogénico 5-bromo-4-cloro-3-indoxi- $\beta$ -D-glucopiranosido para la detección de  $\beta$ -D-glucosidasa producido por *Listeria spp.* (ver Figura 20).



Figura 20. BD BBL™ CHROMagar™ *Listeria*, prueba positiva para *L. monocytogenes* / *L. ivannovi*

Obteniendo la tasa de confirmación del género *Listeria spp.* para 29/29 (100%) colonias sospechosas, siendo igual a lo mencionado por Hegde et al., (2007) para este tipo de medio cromogénico, donde la tasa de confirmación de colonias se determinó como la relación entre el número de casos confirmados de colonias de *Listeria spp.*(C), entre el número total de sospechoso de colonias analizadas (S), expresada como:  $[C / S] \times 100\%$ .

En las investigaciones realizadas por (Mioni et al., 1998; Garcia-Aguado y Úbeda, 1998; Vlaemynck et al., 2000 & Artault et al., 2000) mencionan la puesta en evidencia de la patogenicidad de la especie en cultivos por el factor de virulencia, fosfolipasa C, que permite a *Listeria monocytogenes* crecer en el interior de las células del huésped (también presente en *L. ivannovi*), obteniendo en esta investigación 17/29 (58.6%) colonias aisladas identificadas como *L. monocytogenes* y *L. ivannovi* observadas por la formación de halo blanco alrededor de las colonias por la degradación del sustrato fosfolipídico presente en el medio cromogénico (Chromagar®) y 12/29 (41.4%) colonias identificadas como *Listeria spp.* diferentes a *L. monocytogenes* y *L. ivannovi* al no poseer las enzimas fosfolipasa C.

Reissbrodt, (2004) encontró cepas de *Listeria monocytogenes* que no expresan la actividad PI-PLC; ya que el 12% de cepas obtenidas en este estudio, no produjeron la formación de halo blanco, las cuales fueron confirmadas por la prueba de la Reacción en Cadena de la Polimerasa.

#### 4.5. IDENTIFICACIÓN DE LAS ESPECIES DE *Listeria*

##### 4.5.1 Identificación de las especies de *Listeria* por medio de pruebas bioquímicas tradicionales para cada cepa sospechosa.

Se realizó la batería de pruebas bioquímicas tradicionales como las mencionadas por Wadud et al., (2010) prueba del CAMP (Christie-Atring-Munch-Peterson) motilidad, reducción de nitrato, prueba de hemolisis, utilización de carbohidratos como maltosa, manitol, ramnosa, dextrosa, xilosa y esculina para la identificación de las especies de *Listeria* para cada una de las cepas sospechosas de los grupos de muestras formadas (ver Tabla 22).



**Tabla 22. Resultado de las pruebas bioquímicas tradicionales para las especies de *Listeria* de las cepas sospechosas de cada grupo**

Grupo	CEPA	CAMP	HEMOLITICO	MOVILIDAD		CARBOHIDRATOS						NITRATOS
		<i>Staphylococcus aureus</i>	$\beta$	AGAR	MICROSCOPIO	DEXTROSA	XILOSA	MALTOS A	RAMNOSA	MANITO L	ESCULINA	
F-1.2	F-1.2a1	+	-	+	+	+	-	+	-	-	+	-
	F-1.2a2	+	-	+	+	+	-	+	-	-	+	-
	F-1.2a3	+	-	+	+	+	-	+	-	-	+	-
	F-1.2a4	+	-	+	+	+	-	+	-	-	+	-
	F-1.2a5	+	-	+	+	+	+	+	-	-	+	-
	F-1.2a6	+	-	+	+	+	-	+	-	-	+	-
	F-1.2b1	+	-	+	+	+	-	+	-	-	+	-
	F-1.2b2	+	-	+	+	+	-	+	-	-	+	-
	F-1.2b3	+	-	+	+	+	-	+	-	-	+	-
	F-1.2b4	+	-	+	+	+	-	+	-	-	+	-
	F-1.2b5	+	-	+	+	+	-	+	-	-	+	-
F-1.2b6	+	-	+	+	+	-	+	-	-	+	-	
F-4.2	F-4.2b1	+	+	+	+	+	-	+	-	-	+	-
	F-4.2b2	+	+	+	+	+	-	+	-	-	+	-
	F-4.2b3	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+	-
	F-4.2b4	+	+	+	+	+	-	+	-	-	+	-
	F-4.2b5	+	+	+	+	+	-	+	-	-	+	+
F-4.3	F-4.3a1	+	+	+	+	+	-	+	-	-	+	-
	F-4.3a2	+	+	+	+	+	-	+	-	-	+	-
	F-4.3a3	+	+	+	+	+	-	+	-	-	+	-
	F-4.3a4	+	+	+	+	+	-	+	-	-	+	-
	F-4.3b1	+	+	+	+	+	-	+	-	-	+	-
	F-4.3b2	+	+	+	+	+	-	+	-	-	+	-
	F-4.3b3	+	+	+	+	+	-	+	-	-	+	-
	F-4.3b4	+	+	+	+	+	-	+	-	-	+	-
	F-4.3b5	+	+	+	+	+	-	+	-	-	+	-
	F-4.3b6	+	+	+	+	+	-	+	-	-	+	-
F-4.3b7	+	+	+	+	+	-	+	-	-	+	-	
F-4.3b8	+	+	+	+	+	-	+	-	-	+	-	

Todas las cepas analizadas poseen flagelos al presentar movimiento, tanto en la observación microscópica de la preparación en gota pendiente con movimientos pequeños al azar (Brownianos); como en la prueba de movilidad en agar SIM, *Listeria* crece con formación de sombrilla como lo menciona Kathoriou y Pine (1991) (ver Figura 21).



Figura 21. Movilidad en medio SIM

Para el empleo de hidratos de carbono Wadud et al., (2010) se observó que 1 (3.4%) cepa dio positivo a xilosa la cual se considera de la especie *welshimeri* y el resto 28(96.6%) como *monocytogenes* al no usar dicho hidrato. Y 1 (3.4%) cepa positiva a manitol, considerada especie *grayi* y el resto 28(96.6%) como *monocytogenes*.

En la prueba de Nitratos se encontró 1 (3.4%) cepa positiva a la reducción de nitratos destinada especie *murrayi* y el resto 28(96.6%) para *monocytogenes*. (ver Figura 22).



Figura 22. Reducción de nitritos

En la prueba de CAMP Smola, (1989) menciona la producción característica de una zona en punta de flecha, localizada en el punto de la estría estafilocócica, observando una reacción positiva para las cepas analizadas.

En el caso de la prueba  $\beta$ -hemolítica se observaron 12 (41.4%) cepas sin la producción de hemólisis y 17 (58.6%) de cepas con hemólisis; Kathoriou y Pine (1991) comentan en su investigación que existen cepas ATCC 15313 (American Type Culture Collection) la cual no produce zona  $\beta$  hemolítica en agar sangre de carnero para las especies *monocytogenes*. (ver Figura 23).

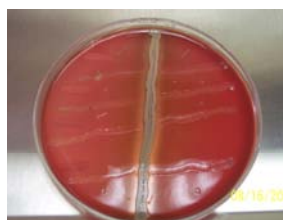


Figura 23. Prueba de CAMP.

**Tabla 23 Resultado de la identificación de las especies de *Listeria* mediante pruebas bioquímicas tradicionales de las cepas sospechosas para cada grupo**

Grupo	Cepas	Especie <i>Listeria</i>
F-1.2	F-1.2a1	<i>L. innocua</i>
	F-1.2a2	<i>L. innocua</i>
	F-1.2a3	<i>L. innocua</i>
	F-1.2a4	<i>L. innocua</i>
	F-1.2a5	<i>L. welshimeri</i>
	F-1.2a6	<i>L. innocua</i>
	F-1.2b1	<i>L. innocua</i>
	F-1.2b2	<i>L. innocua</i>
	F-1.2b3	<i>L. innocua</i>
	F-1.2b4	<i>L. innocua</i>
	F-1.2b5	<i>L. innocua</i>
	F-1.2b6	<i>L. innocua</i>
F-4.2	F-4.2b1	<i>L. monocytogenes</i>
	F-4.2b2	<i>L. monocytogenes</i>
	F-4.2b3	<i>L. grayi</i>
	F-4.2b4	<i>L. monocytogenes</i>
	F-4.2b5	<i>L. murrayi</i>
F-4.3	F-4.3a1	<i>L. monocytogenes</i>
	F-4.3a2	<i>L. monocytogenes</i>
	F-4.3a3	<i>L. monocytogenes</i>
	F-4.3a4	<i>L. monocytogenes</i>
	F-4.3b1	<i>L. monocytogenes</i>
	F-4.3b2	<i>L. monocytogenes</i>
	F-4.3b3	<i>L. monocytogenes</i>
	F-4.3b4	<i>L. monocytogenes</i>
	F-4.3b5	<i>L. monocytogenes</i>
	F-4.3b6	<i>L. monocytogenes</i>
	F-4.3b7	<i>L. monocytogenes</i>
F-4.3b8	<i>L. monocytogenes</i>	

Se encontraron cinco diferentes especies de *Listeria* de acuerdo a las pruebas bioquímicas tradicionales las cuales son características para la identificación de las especies de *Listeria* mencionadas por Rodríguez et al. (2009) para cada una de las cepas sospechosas de los tres grupos de muestras.

En los cuales 11/29 (37.9%) corresponden a *L. innocua*, 1/29 (3.4%) *L. welshimeri* 1/29 (3.4%) *L. grayi*, 1/29(3.4%) *L. murrayi* y 15/29(51.7%) *L. monocytogenes*, (ver Gráfico 1).

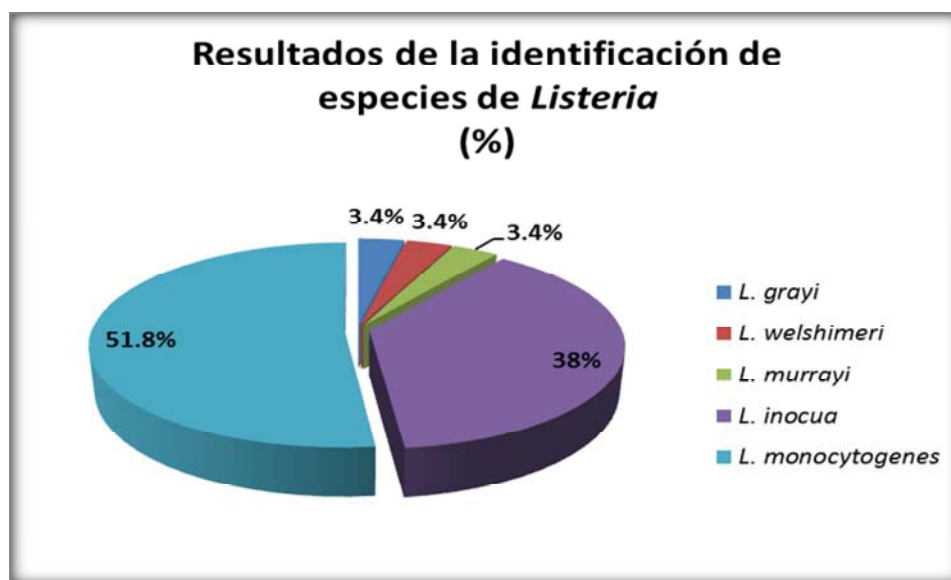


Gráfico 1. Resultados de la identificación de las especies de *Listeria* mediante pruebas bioquímicas tradicionales.

Para el grupo F-1.2 se encontraron dos especies de *Listeria*, en los cuales se observó una cepa de *L. welshimeri* 1/12 (8.3%) y 11/12 (91.6%) *L. innocua*; en el grupo F-4.2 se identificaron tres especies, observando la presencia de *L. grayi* 1/5 (20%), 1/5 (20%) *L. murrayi* y 3/5 (60%) *L. monocytogenes*; y en el grupo F-4.3 se identificó solo una especie 12/12 (100%) correspondiente a *L. monocytogenes*; (ver Tabla 23 y Gráfico 2).

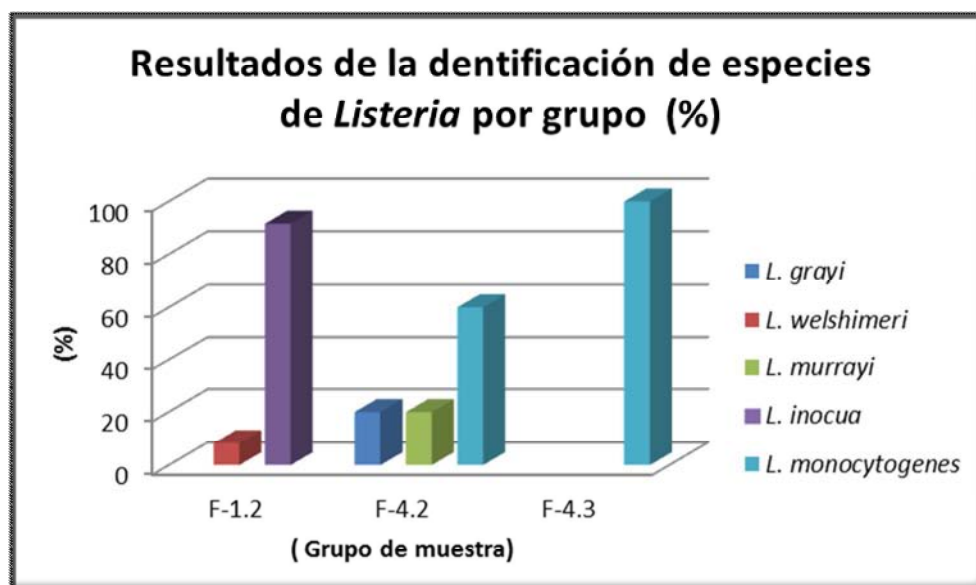


Gráfico 2. Resultados de la identificación de las especies de *Listeria* para cada grupo de muestras mediante pruebas bioquímicas tradicionales.

**4.5.2. Identificación de las especies de *Listeria* por medio de pruebas bioquímicas que emplean sustratos convencionales fluorogénicos y cromogénicos modificados (BBL Crystal®) para cada una de las colonias sospechosas**

Se efectuaron las pruebas bioquímicas con el sistema de identificación BBL Crystal® para gram positivos el cual emplea sustratos convencionales fluorogénicos y cromogénicos modificado para cada una de las colonias sospechosas aisladas de los grupos de muestras formados (ver Tabla 24).

**Tabla 24. Resultado de la identificación de las especies de *Listeria* por medio de sustratos convencionales fluorogénicos y cromogénicos modificados de las cepas sospechosas**

<b>Grupo</b>	<b>Cepas</b>	<b>Especie <i>Listeria</i></b>
F-1.2	F-1.2a1	<i>Listeria monocytogenes</i>
	F-1.2a2	<i>Listeria monocytogenes</i>
	F-1.2a3	<i>Listeria monocytogenes</i>
	F-1.2a4	<i>Listeria monocytogenes</i>
	F-1.2a5	<i>Listeria monocytogenes</i>
	F-1.2a6	<i>Listeria monocytogenes</i>
	F-1.2b1	<i>Listeria monocytogenes</i>
	F-1.2b2	<i>Listeria monocytogenes</i>
	F-1.2b3	<i>Listeria monocytogenes</i>
	F-1.2b4	<i>Listeria monocytogenes</i>
	F-1.2b5	<i>Listeria monocytogenes</i>
	F-1.2b6	<i>Listeria monocytogenes</i>
F-4.2	F-4.2b1	<i>Listeria monocytogenes</i>
	F-4.2b2	<i>Listeria monocytogenes</i>
	F-4.2b3	<i>Listeria monocytogenes</i>
	F-4.2b4	<i>Listeria monocytogenes</i>
	F-4.2b5	<i>Listeria monocytogenes</i>
F-4.3	F-4.3a1	<i>Listeria monocytogenes</i>
	F-4.3a2	<i>Listeria monocytogenes</i>
	F-4.3a3	<i>Listeria monocytogenes</i>
	F-4.3a4	<i>Listeria monocytogenes</i>
	F-4.3b1	<i>Listeria monocytogenes</i>
	F-4.3b2	<i>Listeria monocytogenes</i>
	F-4.3b3	<i>Listeria monocytogenes</i>
	F-4.3b4	<i>Listeria monocytogenes</i>
	F-4.3b5	<i>Listeria monocytogenes</i>
	F-4.3b6	<i>Listeria monocytogenes</i>
	F-4.3b7	<i>Listeria monocytogenes</i>
F-4.3b8	<i>Listeria monocytogenes</i>	

En los resultados se observó una identificación de 29/29 (100%) de las cepas sospechosas para la especie de *Listeria monocytogenes* en cada uno de los grupos ver Gráfico 3, obteniendo una tasa de confirmación del 100%, obteniendo una alta tasa de identificación global con sistema BBL Crystal® coincidiendo con el estudio de Moll et al., (1996) para el kit.

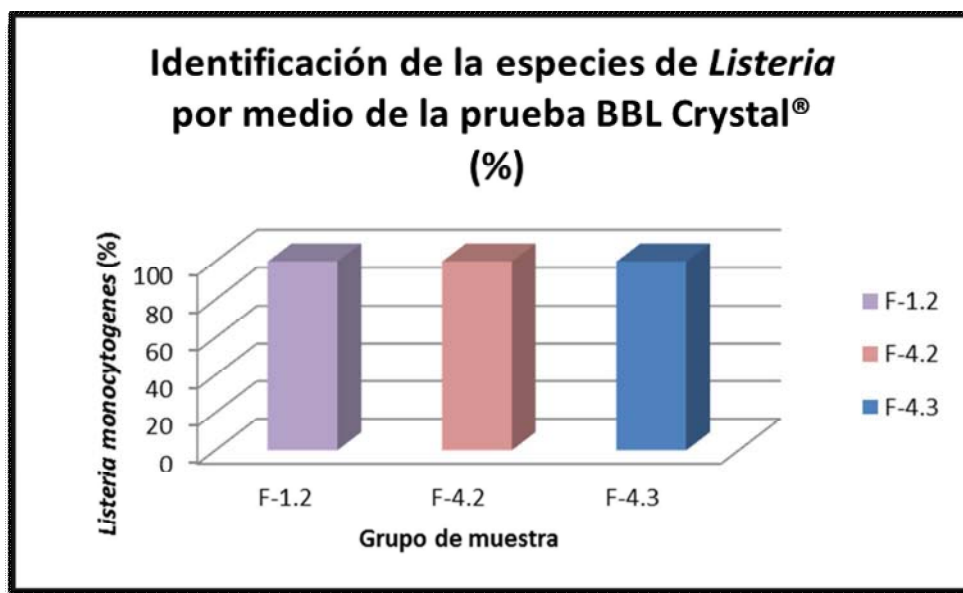


Gráfico 3. Resultados de la identificación de la especie de *Listeria monocytogenes* para cada grupo de muestras mediante la prueba BBL Crystal®.

#### 4.5.3. Confirmación de *Listeria monocytogenes* mediante la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) para cada una de las colonia sospechosa.

Se realizó la prueba de PCR para la replicación del gen *iap* para la amplificación de 175pb, en cada una de las colonias presuntivas de *Listeria monocytogenes* aisladas en los tres grupos de muestras sospechosas, empleando los primers LIM2 y LIMRE con una secuencia (5' a 3') de CTA AAG CGG GAA TCT CCC TT y CCA TTG TCT TGC GCG TTA AT respectivamente, obteniendo el ADN de cada una de las muestras por medio de un kit minibacterial "Metodo Change Switch g DNA" y el kit Master mix para la prueba de PCR (ver Tabla 25).

El gen *iap* (proteína de 60 kDa) se localiza en la superficie bacteriana y además de resultar trascendental para la división celular también participa en la invasión intestinal por *L. monocytogenes* Garza et al., (2002).

**Tabla 25. Confirmación de las cepas sospechosas para la especie *Listeria monocytogenes* mediante PCR**

<b>Grupo</b>	<b>Cepas</b>	<b><i>Listeria monocytogenes</i></b>
F-1.2	F-1.2a1	(+)
	F-1.2a2	(+)
	F-1.2a3	(+)
	F-1.2a4	(+)
	F-1.2a5	(+)
	F-1.2a6	(+)
	F-1.2b1	(+)
	F-1.2b2	(+)
	F-1.2b3	(+)
	F-1.2b4	(+)
	F-1.2b5	(+)
	F-1.2b6	(+)
F-4.2	F-4.2b1	(+)
	F-4.2b2	(+)
	F-4.2b3	(+)
	F-4.2b4	(+)
	F-4.2b5	(+)
F-4.3	F-4.3a1	(+)
	F-4.3a2	(+)
	F-4.3a3	(+)
	F-4.3a4	(+)
	F-4.3b1	(+)
	F-4.3b2	(+)
	F-4.3b3	(+)
	F-4.3b4	(+)
	F-4.3b5	(+)
	F-4.3b6	(+)
	F-4.3b7	(+)
F-4.3b8	(+)	

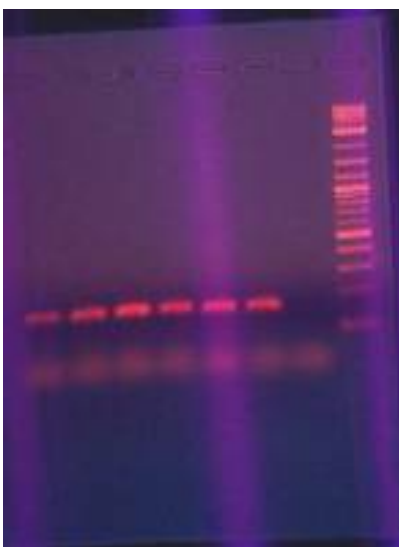


Figura 24. Productos de PCR empleando los primers LIM2 y LIMRE para la replicación del gen *iap* con amplificación de 175pb

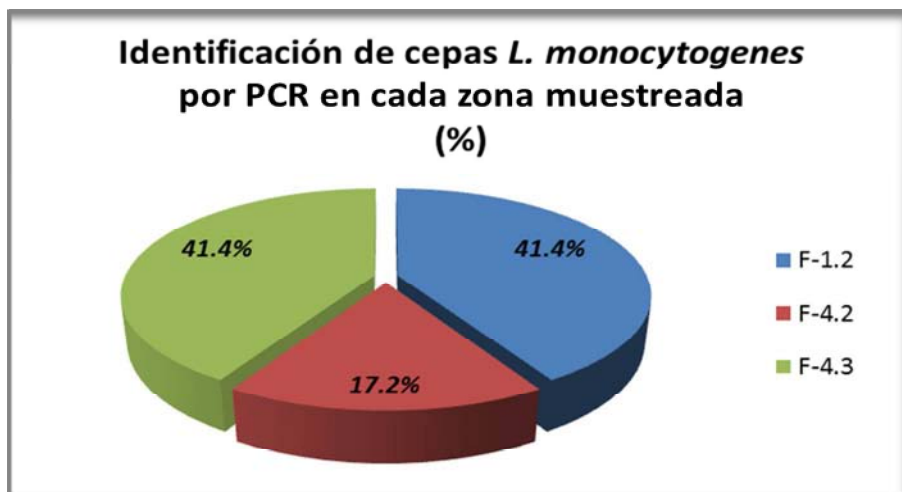


Gráfico 4. Porcentaje de identificación de cepas de *L.monocytogenes* para cada una de las zonas muestreadas, por medio de la prueba PCR

Coincidiendo con la investigación realizada por Hein et al., (2001), se obtuvo la detección del gen *iap* de la especie *monocytogenes* 29/29 (100%) en cada una de las cepas aisladas en las tres zonas muestreadas, 12 (41.4%) cepas para la zona (F-1.2), 5 (17.2%) cepas para la zona (F-4.2) y 12 (41.4%) cepas para (F-4.3), la afinidad obtenida con estos primers, se observaron los segmentos de cadenas replicadas con una amplificación de 175 pares de bases por medio de la prueba de electroforesis, coincidiendo con la sensibilidad que tienen este tipo de pruebas con la investigación realizada por Dadkhah et al. (2012) (ver Figura 24).



# **CAPÍTULO 5. ANÁLISIS DE RESULTADOS**

Siguiendo el objetivo particular 1 del presente estudio se observó la presencia de *Listeria monocytogenes* en 3/20 (15%) grupos de muestras formados, de las cuales 2/13 (15.3%) pertenecen a puestos callejeros y 1/7 (14%) comedor de dos instituciones educativas.

Las muestras estaban compuestas por: sandía, papaya, piña, mango, melón, lechuga, zanahoria, pepino, jitomate, aguacate y jícama. Jamali et al., (2012) comentan sobre la elevada contaminación de *L. monocytogenes* en ensaladas y verduras de venta en puestos callejeros las cuales son un motivo de preocupación a nivel mundial, ameritando una vigilancia e intervención de las autoridades para controlar la contaminación de este patógeno en alimentos listos para el consumo.

En cuanto a la resolución del objetivo particular 2, se presenta un cuadro comparativo con los resultados de las pruebas efectuadas para la identificación de género y especie de *Listeria* de cada una de las cepas sospechosas de los tres grupos de muestras (ver Tabla 26), en el cual observamos un 100% en la identificación y confirmación del género *Listeria spp.* en todas las pruebas efectuadas.

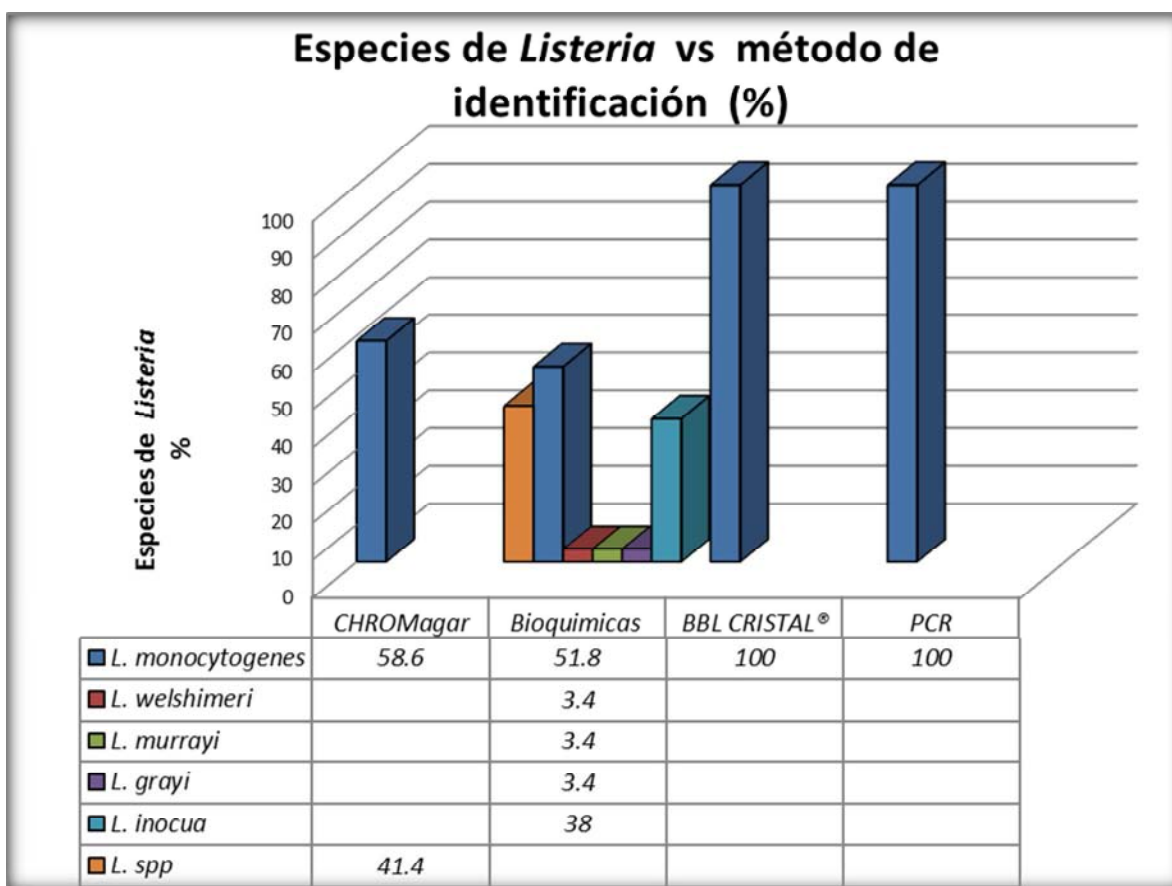


Gráfico 5. Porcentaje de identificación de especies de *Listeria* en cada uno de los métodos empleados.

**Tabla 26. Resultado de las pruebas efectuadas para la identificación de género y especie de *Listeria* a cada cepas sospechosas de cada grupo**

Grupo	CEPA	PRUEBAS						
		IDENTIFICACIÓN DEL GÉNERO				IDENTIFICACIÓN DE ESPECIE		CONFIRMATORIAS
		BIOQUÍMICAS PRIMARIAS	VIP	Locate®	CHROMagar	BIOQUÍMICAS TRADICIONALES	BBL CRYSTAL	PCR
F-1.2	F-1.2a1	<i>Listeria spp.</i>	<i>Listeria spp</i>	<i>Listeria spp</i>	<i>Listeria spp</i>	<i>L. innocua</i>	<i>L. monocytogenes</i>	<i>L. monocytogenes</i>
	F-1.2a2	<i>Listeria spp</i>	<i>Listeria spp</i>	<i>Listeria spp</i>	<i>Listeria spp</i>	<i>L. innocua</i>	<i>L. monocytogenes</i>	<i>L. monocytogenes</i>
	F-1.2a3	<i>Listeria spp</i>	<i>Listeria spp</i>	<i>Listeria spp</i>	<i>Listeria spp</i>	<i>L. innocua</i>	<i>L. monocytogenes</i>	<i>L. monocytogenes</i>
	F-1.2a4	<i>Listeria spp</i>	<i>Listeria spp</i>	<i>Listeria spp</i>	<i>Listeria spp</i>	<i>L. innocua</i>	<i>L. monocytogenes</i>	<i>L. monocytogenes</i>
	F-1.2a5	<i>Listeria spp</i>	<i>Listeria spp</i>	<i>Listeria spp</i>	<i>Listeria spp</i>	<i>L. welshimeri</i>	<i>L. monocytogenes</i>	<i>L. monocytogenes</i>
	F-1.2a6	<i>Listeria spp</i>	<i>Listeria spp</i>	<i>Listeria spp</i>	<i>Listeria spp</i>	<i>L. innocua</i>	<i>L. monocytogenes</i>	<i>L. monocytogenes</i>
	F-1.2b1	<i>Listeria spp</i>	<i>Listeria spp</i>	<i>Listeria spp</i>	<i>Listeria spp</i>	<i>L. innocua</i>	<i>L. monocytogenes</i>	<i>L. monocytogenes</i>
	F-1.2b2	<i>Listeria spp</i>	<i>Listeria spp</i>	<i>Listeria spp</i>	<i>Listeria spp</i>	<i>L. innocua</i>	<i>L. monocytogenes</i>	<i>L. monocytogenes</i>
	F-1.2b3	<i>Listeria spp</i>	<i>Listeria spp</i>	<i>Listeria spp</i>	<i>Listeria spp</i>	<i>L. innocua</i>	<i>L. monocytogenes</i>	<i>L. monocytogenes</i>
	F-1.2b4	<i>Listeria spp</i>	<i>Listeria spp</i>	<i>Listeria spp</i>	<i>Listeria spp</i>	<i>L. innocua</i>	<i>L. monocytogenes</i>	<i>L. monocytogenes</i>
	F-1.2b5	<i>Listeria spp</i>	<i>Listeria spp</i>	<i>Listeria spp</i>	<i>Listeria spp</i>	<i>L. innocua</i>	<i>L. monocytogenes</i>	<i>L. monocytogenes</i>
	F-1.2b6	<i>Listeria spp</i>	<i>Listeria spp</i>	<i>Listeria spp</i>	<i>Listeria spp</i>	<i>L. innocua</i>	<i>L. monocytogenes</i>	<i>L. monocytogenes</i>
F-4.2	F-4.2b1	<i>Listeria spp</i>	<i>Listeria spp</i>	<i>Listeria spp</i>	<i>L. monocytogenes / L. ivannovi</i>	<i>L. monocytogenes</i>	<i>L. monocytogenes</i>	<i>L. monocytogenes</i>
	F-4.2b2	<i>Listeria spp</i>	<i>Listeria spp</i>	<i>Listeria spp</i>	<i>L. monocytogenes / L. ivannovi</i>	<i>L. monocytogenes</i>	<i>L. monocytogenes</i>	<i>L. monocytogenes</i>
	F-4.2b3	<i>Listeria spp</i>	<i>Listeria spp</i>	<i>Listeria spp</i>	<i>L. monocytogenes / L. ivannovi</i>	<i>L. grayi</i>	<i>L. monocytogenes</i>	<i>L. monocytogenes</i>
	F-4.2b4	<i>Listeria spp</i>	<i>Listeria spp</i>	<i>Listeria spp</i>	<i>L. monocytogenes / L. ivannovi</i>	<i>L. monocytogenes</i>	<i>L. monocytogenes</i>	<i>L. monocytogenes</i>
	F-4.2b5	<i>Listeria spp</i>	<i>Listeria spp</i>	<i>Listeria spp</i>	<i>L. monocytogenes / L. ivannovi</i>	<i>L. murrayi</i>	<i>L. monocytogenes</i>	<i>L. monocytogenes</i>
F-4.3	F-4.3a1	<i>Listeria spp</i>	<i>Listeria spp</i>	<i>Listeria spp</i>	<i>L. monocytogenes / L. ivannovi</i>	<i>L. monocytogenes</i>	<i>L. monocytogenes</i>	<i>L. monocytogenes</i>
	F-4.3a2	<i>Listeria spp</i>	<i>Listeria spp</i>	<i>Listeria spp</i>	<i>L. monocytogenes / L. ivannovi</i>	<i>L. monocytogenes</i>	<i>L. monocytogenes</i>	<i>L. monocytogenes</i>
	F-4.3a3	<i>Listeria spp</i>	<i>Listeria spp</i>	<i>Listeria spp</i>	<i>L. monocytogenes / L. ivannovi</i>	<i>L. monocytogenes</i>	<i>L. monocytogenes</i>	<i>L. monocytogenes</i>
	F-4.3a4	<i>Listeria spp</i>	<i>Listeria spp</i>	<i>Listeria spp</i>	<i>L. monocytogenes / L. ivannovi</i>	<i>L. monocytogenes</i>	<i>L. monocytogenes</i>	<i>L. monocytogenes</i>
	F-4.3b1	<i>Listeria spp</i>	<i>Listeria spp</i>	<i>Listeria spp</i>	<i>L. monocytogenes / L. ivannovi</i>	<i>L. monocytogenes</i>	<i>L. monocytogenes</i>	<i>L. monocytogenes</i>
	F-4.3b2	<i>Listeria spp</i>	<i>Listeria spp</i>	<i>Listeria spp</i>	<i>L. monocytogenes / L. ivannovi</i>	<i>L. monocytogenes</i>	<i>L. monocytogenes</i>	<i>L. monocytogenes</i>
	F-4.3b3	<i>Listeria spp</i>	<i>Listeria spp</i>	<i>Listeria spp</i>	<i>L. monocytogenes / L. ivannovi</i>	<i>L. monocytogenes</i>	<i>L. monocytogenes</i>	<i>L. monocytogenes</i>
	F-4.3b4	<i>Listeria spp</i>	<i>Listeria spp</i>	<i>Listeria spp</i>	<i>L. monocytogenes / L. ivannovi</i>	<i>L. monocytogenes</i>	<i>L. monocytogenes</i>	<i>L. monocytogenes</i>
	F-4.3b5	<i>Listeria spp</i>	<i>Listeria spp</i>	<i>Listeria spp</i>	<i>L. monocytogenes / L. ivannovi</i>	<i>L. monocytogenes</i>	<i>L. monocytogenes</i>	<i>L. monocytogenes</i>
	F-4.3b6	<i>Listeria spp</i>	<i>Listeria spp</i>	<i>Listeria spp</i>	<i>L. monocytogenes / L. ivannovi</i>	<i>L. monocytogenes</i>	<i>L. monocytogenes</i>	<i>L. monocytogenes</i>
	F-4.3b7	<i>Listeria spp</i>	<i>Listeria spp</i>	<i>Listeria spp</i>	<i>L. monocytogenes / L. ivannovi</i>	<i>L. monocytogenes</i>	<i>L. monocytogenes</i>	<i>L. monocytogenes</i>
F-4.3b8	<i>Listeria spp</i>	<i>Listeria spp</i>	<i>Listeria spp</i>	<i>L. monocytogenes / L. ivannovi</i>	<i>L. monocytogenes</i>	<i>L. monocytogenes</i>	<i>L. monocytogenes</i>	

En cuanto a los los medios cromogénicos CROMagar™ *Listeria*, coincidimos con la alta sensibilidad y especificidad que tienen estos medios como lo mencionado Odumeru, (2005) y McNamara, (2005) para la identificación de *Listeria spp*

En las reacciones de inmunoprecipitación visual VIP se concuerda con la alta sensibilidad de la prueba, citado por Moscalewski et al., (2011). Los ensayos inmunoenzimáticos Locate® *Listeria* muestran una alta sensibilidad y especificidad en la identificación de género como lo señala Churchill et al. (2006) en su investigación.

Moreno et al., (2012) menciona que las pruebas bioquímicas tradicionales son empleadas para identificar, y confirmar los resultados obtenidos por los kits anteriormente mencionados teniendo una alta tasa de preferencia por este método en la norma (NOM-143-SSA1-1995) y las metodologías USDA-FISIS.

En la identificación de las especies de *Listeria monocytogenes*, se observan discrepancias, ya que mediante pruebas bioquímicas tradicionales se encontraron cinco especies (*L. welshimeri*, *L. grayi*, *L. Murray*, *L. innocua* y *L. monocytogenes*); y por medio de pruebas bioquímicas que emplean sustratos convencionales fluorogénicos y cromogénicos modificados (BBL Crystal), todas las cepas evaluadas se identificaron como *L. monocytogenes*, las cuales fueron confirmadas mediante la Reacción en Cadena de la Polimerasa.

Dongyou (2006), menciona que los métodos de diagnóstico para *L. monocytogenes* basados en el fenotipo a través de la medición de pruebas bioquímicas y antigénicas, las cuales pueden variar con el cambio de las condiciones externas, con las fases de crecimiento y con espontáneas mutaciones genéticas, conduciendo en ocasiones a resultados erróneos ya que la virulencia varía de una cepa a otra.

En su investigación Roche et al., (1989), comenta que el 8% - 21% de *L.monocytogenes* son cepas no virulentas o débilmente virulentas, teniendo pocas explicaciones para la baja virulencia algunos marcadores de la virulencia fenotípicos como son el grado de hemólisis o genotípicos como las mutaciones en el gen de la hemolisina mencionado por López et al., (2006).

Kathoriou y Pine, (1991) comenta que es fundamental tener en cuenta que las propiedades de las cepas son a menudo inestables y sensibles a los diversos métodos de conservación de cultivo como en el caso de la *L. monocytogenes* 53XXIII de Murray siendo atípica al no producir zonas de beta-hemólisis en agar sangre de carnero.

En varias investigaciones como las mencionadas por Reissbrodt, (2004) & Kathoriou y Pine (1991), se han encontrado cepas las cuales, carecen de ciertas enzimas para poder ser evaluadas comúnmente, como en el caso de la pruebas cromogénicas en las cuales se observaron 12/29 (41.4%) cepas las cuales no produjeron la formación de halo, por la deficiencia de la enzima fosfolipasa C, Larraín y Carvajal (2008) confirma las mutaciones de cepas con poca o nula actividad de fosfatidilinositol (PI-PLC) y fosfatidilcolina

(PC-PLC), de igual manera Reissbrodt (2004), no descarta incluir medidas de control en este tipo de cepas hipovirulentas.

El gen *iap* que codifica la proteína asociada a la invasión Dongyou (2006), a esta proteína (P60) Wuenscher et al., (1993) la clasifica como una autolisina ya que puede lisar su propia pared celular.

Considerando entonces la confirmación de la especie *monocytogenes* mediante la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) al evaluar la replicación del gen *iap*, obteniendo un 100% de sensibilidad de los primers LIM2 y LIMRE como lo menciona Hein et al., (2001) en su investigación.

Como ya se mencionó, los mecanismos de adaptación al estrés provocados por las condiciones ambientales o por el procesado y conservación de los alimentos (temperaturas extremas, falta de nutrientes, acidez) pueden provocar cambios en la célula bacteriana que, por un lado, dificultan la detección de las células dañadas y pueden afectar la virulencia. Por ello es necesario la detección de mutaciones mediante métodos como un PCR multiplex empleando los diferentes genes característicos de *L. monocytogenes*, también es recomendable no descartar las demás especies ya que se consideran como un indicador de buenas prácticas.

Cumpliendo con el objetivo general, en el presente estudio se observó la contaminación de los alimentos con la especie *monocytogenes*, tanto en cócteles de fruta como en ensaladas de vegetales los cuales contenían: mango, melón, sandía, papaya, piña, lechuga, jitomate, aguacate, jícama, zanahoria y pepino, coincidiendo con las investigaciones realizadas por Moreno et al., (2012) & Penteado y Leitão, (2004).

Una amplia variedad de alimentos son distribuidos por vendedores ambulantes siendo una fuente importante de alimentos listos para el consumo. Por otra parte los comedores son otra opción para obtener este tipo de alimentos. Sin embargo, las condiciones higiénicas de la calle y la manipulación de quienes preparan los alimentos son cuestionables, encontrando una alta prevalencia de patógenos transmitidos por alimentos callejeros.

La contaminación en estos puntos de venta han sido revisados por Jamali et al., (2013); Heisick et al., (1989) y Cordano et al., (2009), para dichos alimentos listos para el consumo, (ver Tabla 27), se tuvieron mayor incidencia en dos puestos callejeros (66.66%) debido a las condiciones higiénicas en las que se pueden encontrar expuestos al polvo, insectos y falta de las instalaciones adecuadas para una correcta higiene y manipulación de dichos alimentos, no obstante también se encontró la incidencia en un comedor (33.3%) indicando que la contaminación puede provenir desde la materia prima o las malas prácticas de manufactura como lo comenta Moreno et al., (2012) & Penteado y Leitão, (2004).

La presencia de *Listeria monocytogenes* en frutas y hortalizas listas para el consumo es motivo de gran preocupación, Siendo de gran importancia la vigilancia y la intervención de las autoridades locales para controlar la incidencia de contaminación de dicho patógeno y evitar una posible propagación de *L. monocytogenes* en el país.

**Tabla 27. Resultado de la especie *Listeria monocytogenes* por PCR para cada tipo de muestra y lugar de procedencia**

<b>Grupo</b>	<b>Lugar</b>	<b>Tipo de muestra</b>	<b>Especie</b>
F-1.2	Puesto callejero	Zanahoria, pepino, mango, melón y sandía	<i>L. monocytogenes</i>
F-4.2	Puesto callejero	Papaya, piña, mango y melón	<i>L. monocytogenes</i>
F-4.3	Comedor	Lechuga, jitomate, aguacate y jicama	<i>L. monocytogenes</i>

## CONCLUSIONES

Los objetivos se cumplieron ya que se aislaron e identificaron mediante análisis microbiológico cepas de *Listeria monocytogenes*, en muestras de ensaladas de verdura y cócteles de fruta, en dos zonas de Cuautitlán Izcalli.

En la zona educativa de la Facultad de campo 4 las muestras positivas fueron tomadas de un comedor y un puesto callejero, en la zona de muestreo de la Facultad de campo 1 las muestras fueron de un puesto callejero.

Se confirmó la presencia de este patógeno en los alimentos muestreados contenían sandía, papaya, piña, mango, melón, lechuga, zanahoria, pepino, jitomate, aguacate y jícama.

Se aislaron 78 cepas de *Listeria spp.*, empleando el método presencia–ausencia de la USDA / FSIS, de los cuales se confirmaron 29 cepas presuntivas mediante pruebas bioquímicas primarias.

El género *Listeria spp.* fué confirmado en un 100% mediante medios cromogénicos (CHROMagar® *listeria*) al presentar crecimiento de colonias azul-verdosas y detectar la presencia de la enzima  $\beta$ -D-glucosidasa; las reacciones de inmunoprecipitación visual (VIP) al detectarse la reacción antígeno-anticuerpo; y mediante ensayos inmunoenzimáticos (Locate *Listeria spp.*) mediante la reacción antígeno-anticuerpo.

En las pruebas bioquímicas tradicionales, se identificaron cinco especies de *Listeria*: una cepa identificada como *L. welshimeri*, una *L. grayi*, una *L. murray*, once como *L. innocua* y quince cepas identificadas como *L. monocytogenes*, al observar las reacciones características de cada una de ellas.

El método cromogénico no es eficiente en la identificación de *L. monocytogenes* cuando estas tienen mutaciones o al no desarrollar cualidades propias de la enzima fosfolipasa C.

El kit BBL Crystal confirmó el 100% de las cepas con la especie *monocytogenes* considerándose como una prueba eficiente al efectuarse las reacciones de los sustratos convencionales fluorogénicos y cromogénicos modificados.

La prueba de PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa) confirmó el 100% de las cepas como *Listeria monocytogenes*, al obtener la replicación del gen *iap* con amplificación de 175pb, empleando los primers LIM2 y LIMRE.

## BIBLIOGRAFÍA

Adams, M., y Moss M., traducido por Ramis V. (1997). “*Microbiología de los alimentos*” Zaragoza: Acribia. (pp.171- 403).

Allende, A., Martinez, B., Selma, V., Gil, M., Suarez, J. y Rodriguez, A. (2007). “Growth and bacteriocin production by lactic acid bacteria in vegetable broth and their effectiveness at reducing *Listeria monocytogenes* in vitro and in fresh-cut lettuce”. *Food Microbiology*, 24(7-8): 759– 766.

Arauz, C. L. F. (2011). “*Fitopatología: un enfoque agroecológico*”, 2ª ed., Universidad de Costa Rica.

Arrieta, E. (1989). “*Listeria Monocytogenes, contaminante de alimentos de importancia emergente*”, Vol. 14. (3).

Artault, S., Bind, J.L., Delaval, Y., Dureuil, N., Gaillard, N. (2000) *AFNOR Validation of the ALOA method for the detection of Listeria monocytogenes in foodstuffs*. Colloque de la Société Française de Microbiologie, Paris, 19-20 Octobre, 2000.

Becton Dickinson (2012) BBL Crystal™ Identification Systems Rapid Gram-Positive ID Kit recuperado el 16 agosto de 2012, desde: [https://www.bd.com/ds/technicalCenter/inserts/8809921JAA\(01\).pdf](https://www.bd.com/ds/technicalCenter/inserts/8809921JAA(01).pdf)

Bello, G., Garcia-Jalon, M. y Lopez de Cerain, A. (2000). “*Fundamentos de seguridad alimentaria*”. España: Eunate.

Beuchat, R. y Doyle, M. (1995). “Survival and growth of *Listeria monocytogenes* in foods treated or supplemented with carrot juice”. *Food Microbiol*, 12: 73–80.

Beuchat, R. y Deak, T. (1996). “*Handbook of food spoilage yeasts*”. (pp. 210). CRC Press.

Beuchat, R. (1999). “*Listeria monocytogenes: incidence on vegetables, Microbes and Infection*”, *Food Microbiol*, 223-228.

Beuchat, R. (2002). “Ecological factors influencing survival and growth of human pathogens on raw fruits and vegetables”, *Microbes and Infection* 4, 413–423.

Blood, D. y Radostits, O., con la colaboración de Arundel, J. y Gay, C. (1992). “*Medicina veterinaria: Libro de texto de las enfermedades del ganado vacuno, ovino, porcino, caprino y equino*”. (7 ed.). Mexico: McGraw-Hill.

Book Bad Bug: FDA. (2012). “*Foodborne Pathogenic Microorganisms and Natural Toxins Handbook Listeria monocytogenes*”. (2 ed.). FDA Center for Food Safety & Applied Nutrition. Recuperado el 22 de Julio de 2012, desde:



<http://www.fda.gov/Food/FoodSafety/FoodborneIllness/FoodborneIllnessFoodbornePathogensNaturalToxins/BadBugBook/ucm070064.htm> [2012, 22 de julio].

Brooks, G. F., Bute J. S. y Ornston, N. L. (2002). “*Microbiología médica de Jawetz Melnick y Adelberg*”, Manual Moderno, 17a ed. México.

Bourgeois, C. M. (1994). “Microbiología alimentaria aspectos microbiológicos de la seguridad y calidad alimentaria” 1ª ed., Acribia, Zaragoza, España 460 pp.

Busta, F. (2011). “*Analysis and Evaluation of Preventive Control Measures for the Control and Reduction/Elimination of Microbial Hazards on Fresh and Fresh-Cut*”, Panel Chair and Senior Science Advisor to the Institute of Food Technologists FDA University of Minnesota.

Churchill, R. L.T., Hung Lee, J. and Hall, C. (2006) “Detection of *Listeria monocytogenes* and the toxin listeriolysin O in food”. *Journal of Microbiological Methods*. 64 141–170.

Cliver, O. (1990). “*Foodborne Disease*”. (pp. 248-256). San Diego CA: Academic Press.

Clive de Blackburn y McClure, P. (2009). “*Foodborne pathogens: hazards, risk analysis, and control*”. (2 ed.) North America: Woodhead Publishing Limite and CRC Press.

Cordano, A., Jacquet, C. (2009). “*Listeria monocytogenes* isolated from vegetable salads sold at supermarkets in Santiago, Chile: Prevalence and strain characterization”, *Sección Microbiología de Alimentos, Instituto de Salud Pública de Chile* *France International Journal of Food Microbiology* 132 176.

Dadkhah, H., Reza B., Hashemi, S., Shahraz, F., Hosseini, H., Andreas, G. Karatzas and Khaksar. (2012). “Evaluation and comparison of SYBR Green I Real-Time PCR and TaqMan Real-Time PCR methods for quantitative assay of *Listeria monocytogenes* in nutrient broth and milk”. *Journal of Microbiology Research* 6(9): pp. 1908-1917.

Dauphin, L., Stephens, K., Eufinger, S. and Bowen, M. (2010). “Comparison of five commercial DNA extraction kits for the recovery of *Yersinia pestis* DNA from bacterial suspensions and spiked environmental samples”, *Journal of applied Microbiology*, Jan;108(1):163-72.

Dongyou Liu (2006) “*Identification, subtyping and virulence determination of Listeria monocytogenes, an important foodborne pathogen*”. Department of Basic Sciences, College of Veterinary.

Dongyou, L. (2010). “*Molecular detection of foodborne pathogens*”. (pp. 207-221). Boca Raton: CRC Press.

Doyle, M., Beuchat, R., Montville, T. (2007) “*Microbiología de los alimentos fundamentos y fronteras*”. (pp. 355-367). Zaragoza: Acribia.

Feldsine, P. T., Lienau, A. H., Forgey, R. L., Calhoon, R. D. (1997). "Visual immunoprecipitate assay (VIP) for *Listeria monocytogenes* and related *Listeria* species detection in selected foods: collaborative study". BioControl Systems, Inc., Bothell, WA 98011, USA. J AOAC Int. Jul-Aug;80(4):791-805.

FDA/FSIS (U.S. Food and Drug Administration/USDA Food Safety and Inspection Agency). (2001). "Draft assessment of the relative risk to public health from foodborne *Listeria* among selected categories of ready-to-eat foods". [en línea]. Center for Food Safety and Applied Nutrition (CFSAN) and Food Safety Inspection Service (FSIS-USDA). Recuperado el 25 de octubre del 2012 desde: <http://www.foodsafety.gov/~dms/lmrisk.html>.

FDA/FSIS (U.S. Food and Drug Administration/USDA Food Safety and Inspection Agency) (2003). "Quantitative assessment of the relative risk to public health from foodborne *Listeria* among selected categories of ready-to-eat foods". Center for Food Safety and Applied Nutrition (CFSAN) and Food Safety Inspection Service (FSIS-USDA). Recuperado el 25 de octubre del 2012 desde: <http://www.foodsafety.gov/~dms/lmr2-toc.html>.

Forsythe, S. (2000). "Alimentos Seguros Microbiología". (pp. 151-347). Zaragoza: Acribia.

Forbes, B., Sahn, D., Weissfeld, A. (2004). "Diagnóstico microbiológico", 11<sup>a</sup> ed., Médica Panamericana, 1134 páginas.

Food and Drug Administration. (1984). "Bacteriological Analytical Manual for Foods", 6<sup>th</sup> ed. Washington, D.C, Assoc of Official Analytical Chemists.

Frazier, W. y Westhoff, D. (2000). "Microbiología de los alimentos". (pp.681). 4<sup>a</sup> ed. Zaragoza: Acribia.

García-Aguado, J. M. y Úbeda, P. (1998). "Estudio comparativo de dos métodos para la investigación de *Listeria monocytogenes* en los productos alimentarios". Cuadernos de microbiología 10, 4-5.

Garza, V. R., Silva, M. T. y Hernández G. L. (2002). "La listeriosis humana y el ciclo infeccioso asociado a su agente etiológico". Departamento de Biología, Facultad de Química, UNAM, 14(3) : 73-84

González, S., Camargo, N., Castellanos, J., Gonzalvez, G., Perdomo, M., Grillo, M., Romero, A. (1993). "GUIAVETA: Guía para el establecimiento de sistemas de vigilancia epidemiológica de enfermedades transmitidas por alimentos (VETA) y la investigación de brotes de toxi-infecciones alimentarias". [en línea]. División de Prevención y Control de Enfermedades Transmisibles Programa de Salud Pública Veterinaria. Instituto Panamericano de Protección de Alimentos y Zoonosis. Buenos Aires: INPPZ. Recuperado el 18 de septiembre de 2011 desde:

<http://www.cepis.ops-oms.org/bvstox/e/fulltext/guiaveta/guiaveta.pdf>.

González, F. y Rojas, R. (2005). “*Enfermedades transmitidas por alimentos y PCR: prevención y diagnóstico*”. Instituto Nacional de salud pública de México. [en línea]. (pp. 388-390). vol.47, no.5. Recuperado el 9 de enero de 2012 desde: <http://www.redalyc.org/pdf/106/10647510.pdf>.

Groisman, A. (2001). “*Principles of Bacterial Pathogenesis*”. (pp.752). USA: Academic Press.

Hegde, V., Leon-Velarde, C., Stamb C. y Jaykus, L. (2006). “*Evaluación de agar BBL CHROMagar Listeria para el aislamiento e identificación de Listeria monocytogenes a partir de muestras de alimentos y ambiental*”. Food Science Department North Carolina State University, Raleigh, NC 27695-7624, EE.UU.

Hegde, V., Leon-Velarde, C., Stam, C., Jaykus, L. and Odumeru, J. (2007). “*Evaluation of BBL CHROMagar Listeria agar for the isolation and identification of Listeria monocytogenes from a food and environmental samples*”. *Journal of Microbiological Methods* 68; 82–87.

Hein, H , Klein D, Lehner A, Bubert A, Brandl E, Wagner M. (2001).”*Detection and quantification of the iap gene of Listeria monocytogenes and Listeria innocua by a new real-time quantitative PCR assay*”. *Res Microbiol.*;152(1):37-46.

Heisick, J.E., Harrell. F.M., Peterson, E.H., McLaughlin, S., Wagner, D.E., Wesley, I.V. and Bryner, J. (1989). “*Comparison of four procedures to detect Listeria spp.*” *in foods. J. Food Protect.* 52,154-157.

ICMSF International Commission on Microbiological Specifications for Foods (1982). “*Microorganismos de los alimentos. Técnicas de Análisis Microbiológico*”. Vol. 1, 2ª ed. Zaragoza, España: Acribia.

ICMSF International Commission on Microbiological Specifications for Foods (1996). “*Microorganismos de los alimentos, características de los patógenos*”, (pp. 165-175). Zaragoza, España: Acribia.

ICMSF International Commission on Microbiological Specifications for Foods traducido por Moreno, B. (2000). “*Microorganismos de los alimentos*”. (pp. 41-232). 2 ed. Zaragoza, España: Acribia.

ICMSF International Commission on Microbiological Specifications for Foods. (2004). “*Microorganismos de los Alimentos 7. Análisis Microbiológico en la Gestión de la Seguridad Alimentaria*”. Zaragoza: Acribia.

Ingeborg, Hein ., Klinger, S., Dooms, M., Flekna, G., Stessl, B., Leclercq, A., Hill, C., Allerberger, F. and Wagner, M. (2011). "Stress Survival Islet 1 (SSI-1) Survey in *Listeria monocytogenes* Reveals an Insert Common to *Listeria innocua* in Sequence Type 121 *L. monocytogenes* Strains" *Appl Environ Microbiol.* 2011 March; 77(6): 2169–2173.

Jamali, H., Ching, C., Lin T. (2013). "Detection and isolation of *Listeria* spp. and *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat foods with various selective culture media". *ScienceDirect. Food Control* 32 ;19e 24 t.

Jay, M., James, M., Loessner, D. y Golden, A. (2005). "*Microbiología moderna de los alimentos*". (pp. 587-612). 5ta ed. Zaragoza, España: Acribia.

Kathoriou, S. and Pine, L. (1991). "The Type Strain(s) of *Listeria monocytogenes*: a Source of Continuing Difficulties" *International Union of Microbiological Societies.* Vol. 41, No. 2, 328-330

Koneman, E. y Allen, S. (2008). "*Diagnóstico microbiológico: Texto y Atlas en color*", 6ª ed. Washington: Panamericana.

Labbé, R. y García, S. (2001). "*Guide to Foodborne Pathogens*". (pp. 99-123). New York: Wiley-Interscience.

Lathrop, A. A., Jaradat, Z. W., Haley, T., Bhunia, A. K. (2003). "Characterization and application of a *Listeria monocytogenes* reactive monoclonal antibody C11E9 in a resonant mirror biosensor". *J. Immunol. Methods* 281, 119– 128.

Larraín de la C. D. y Carvajal C. (2008). *Los aspectos fisiopatológicos y moleculares involucrados en el traspaso de L. monocytogenes a través de la barrera placentaria.* Boletín Escuela de Medicina U.C., Pontificia Universidad Católica de Chile vol. 33. Nº1 Recuperado el 15 de noviembre de 2012, desde:  
<http://escuela.med.puc.cl/publ/boletin/20081/AspectosFisiopatologicos.pdf>

Lauchlin, J. (1997). "The identification of *Listeria* species". *International Journal of Food Microbiology, Volume 38, Pages 77-81.*

López, V., Suarez, M., Chico-Calero, I., Navas, J., Martínez-Suarez, V. (2006). "*Listeria monocytogenes* en alimentos: ¿son todos los aislamientos igual de virulentos?". *Revista Argentina de Microbiología* 38: 224-234

Macfaddin, J. F. (2003) "*Pruebas Bioquímicas para la identificación de bacterias de importancia clínica*", 3ª ed., Medica Panamericana.

Marth, E. y Steele, J. (1998). "*Applied dairy microbiology*". Nueva York: Marcel Dekker.

Mayorga, S. (2004). “Presencia de *L. monocytogenes* en leche cruda de tanques de frío en lecherías y tanques comunitarios provenientes de 9 sectores de la provincia de Cautín, IX región”. Facultad de Agricultura y Ciencias Veterinarias. Temulco, Chile.

McNamara, A. (2005). “Evaluation of BBL™ CHROMagar™ *Listeria*: AOAC Performance Tested Method SM BD Diagnostics”, 7 Loveton Circle, Sparks, MD 21152, USA AOAC Meeting.

Merck, E. (1994). “Manual de Medios de Cultivos”. (pp. 364). Alemania: Darmstadt.

Mioni, R., Grimaldi, G., Bordin, P., Miglioranza, F., y Ferrigno, R. (1998). “Investigación de *Listeria monocytogenes* en alimentos: validación de un nuevo medio de cultivo selectivo y diferencial especie-específico y de un sistema rápido de identificación”. Cuadernos de Microbiología 9, 7-9.

Moll, W., Ungerechts, J., Markelein, G. and Schaal, K. (1996). “Comparison of BBL Crystal® ANR ID Kit and API rapid ID 32 A for Identification of Anaerobic Bacteria”. Institut für Medizinische Mikrobiologie und Immunologie, New York .284, 329-347.

Moreno, y., Sánchez-Contreras, J., Montes, R., García-Hernández, J., Ballesteros, L., Ferrús, M. (2012 ). “Detection and enumeration of viable *Listeria monocytogenes* cells from ready-to-eat and processed vegetable foods by culture and DVC-FISH”. *ScienceDirect Food Control* 27; 374e379.

Moscialewski, A., Wiens, A., Silva, A., and Pontarolo, R. ( 2011). “Detection of *Listeria monocytogenes* using visual immunoprecipitate assay method” .Prime Journals of Microbiology Research (PJMR) ISSN: 2251-127X Vol. 1(3), pp. 38-40.

Netten, V., Perales, I., Curtis, G. y Mossel, D. (1989). “Liquid and solid selective differential media for the detection and enumeration of *L. monocytogenes* and other *Listeria* spp.”, *Int J. Food Microbiol.* Jul;8(4):299-316.

(NOM-143-SSA1-1995) NORMA OFICIAL MEXICANA NOM-143-SSA1-1995, BIENES Y SERVICIOS. METODO DE PRUEBA MICROBIOLOGICO PARA ALIMENTOS. DETERMINACION DE *Listeria monocytogenes*.

Odumeru, J. (2005). “Evaluation of New BBL™ CROMagar™ *Listeria* for Isolation of *Listeria monocytogenes* in food”. Propelling applications development in the areas of Biopharm Production, QA/QC & Environmental Monitoring.

Parrilla, C., Vázquez, C., Saldade, C. y Nava, F. (1993). “Brotos de toxii infecciones alimentarias de origen microbiano y parasitario”, *Salud Pública Méx*; Vol. 35(5):456-463, recuperado el día 24 de Noviembre de 2012 desde: (<http://bvs.insp.mx/rsp/articulos/articulo.php?id=001311>).

Pascual, Anderson M., Calderón, V. (2000). “*Microbiología Alimentaria: Metodología Analítica para Alimentos y Bebidas*”. (2da ed.). Madrid: Díaz de Santos.

Penteado, A., Leitão, L., (2004). “Growth of *Listeria monocytogenes* in melon, watermelon and papaya pulps” Departamento de Tecnologia de Alimentos, Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, *International Journal of Food Microbiology* 92 (2004) 89– 94.

Primo, A., Almeiah, C., Cuéllar, J. y Belotto, A. (1995). “*La venta de alimentos en la vía pública en América Latina*”, Bol. Oficina Sanit Panam. 2, 118.

Promega Corporation (2002) PCR Master Mix Part# 9PIM750 Recuperado el día 23 de octubre de 2007, desde: <http://www.promega.com/~media/Files/Resources/Protocols/Product%20Information%20Sheets/G/PCR%20Master%20Mix%20Protocol.pdf>

Puerta, B., y Urueña, P. (2009). “*Prácticas de biología molecular*”, Vol. 14, editorial Pontificia Universidad Javeriana, pag. 23.

Reguera, J., Nieto, J., Eiros, J., González, S. Z. y Oeriz, R. (1995). “*Infeción alimentaria*” Rol. Pediatra, 36: 215 – 224.

Ray, B. y Arun, B. (2010). “*Fundamentos de microbiología de los alimentos*”, 4ta ed., Mc Graw Hill, pp 202-331.

Reissbrodt, R. (2004). “New chromogenic plating media for detection of pathogenic *Listeria* spp. – an overview”. *International Journal of Food Microbiology*. 95:1–9.

Ritter, V., Dick, N., Sturm, K., Kircher, S. (2003). “*Comparison of BBL™ CROMagar™ Listeria to Currently Recommended Media for the Isolation of Listeria monocytogenes from Food Sources*”, BD Diagnostic, American Society for Microbiology, Washintong, Sparks, MD 21152.

Roche, S. M., Gracieux, P., Milohanic E., Albert, I., Virlogeux-Payant, Té moin, S., Gré pinet,1. O., Kerouanton, A., Jacquet, C., Cossart, P. and Velge1, P. (2005). “*Investigation of Specific Substitutions in Virulence Genes Characterizing Phenotypic Groups of Low-Virulence Field Strains of Listeria monocytogenes*”. *Applied and environmental microbiology*, p. 6039–6048 Vol. 71, No. 10

Rodríguez, G., Cabrera, S. y Colina, P. (2009). “*Listeria monocytogenes en queso amarillo madurado tipo Edam y su resistencia al pH y salinidad*”. [ En línea] Departamento de Biología, Facultad Experimental de Ciencias. Universidad del Zulia, 71 - 79/ 124. Recuperado el 27 de diciembre 2012 desde: [http://www}.unicolmayor.edu.co/invest\\_nova/NOVA/artorig10\\_NOVA11.pdf](http://www}.unicolmayor.edu.co/invest_nova/NOVA/artorig10_NOVA11.pdf).

Ryser, E. y Marth, E. (2007). " *Listeria, listeriosis, and food safety*". (pp. 873). 3rd ed. Boca Raton: CRC Press.

Schlech, W. (2000). " *Epidemiology and clinical manifestations of Listeria monocytogenes infection. In Gram-Positive Pathogens*". (pp. 473-479). American Society for Microbiology Press, Washington, D.C.

Schmid, W. M., Lampidis, R., Emmerth, M., Walchera, M., Kreft., J., Goebel, W. and Wagner, M. (2005) " *Evolutionary history of the genus Listeria and its virulence genes*" Systematic and Applied Microbiology Volume 28, Issue 1, 28

Seeliger, H. y Jones, D. (1986). " *The genus Listeria. Bergey's manual of Systematic Bacteriology*". (pp. 1235-1245). Vol. 2. The Williams & Wilkins Co. Baltimore.

SIRVETA ¿Qué son las enfermedades transmitidas por alimentos? [ En línea] Instituto Panamericano de Protección de Alimentos y Zoonosis (PANALIMENTOS). Recuperado el 9 de junio de 2011 desde: <http://www.panalimentos.org>.

Singleton, P. (2004). " *Bacterias en biología, bacteriología y medicina*", editorial Acrivia Zaragoza España, pag. 441-451.

Smola, J. (1989). "Possibilities of differentiation of listerial hemolysins by synergistic hemolytic reactions (CAMP reactions)". *Department of Epizootiology, Microbiology and Immunology, University of Veterinary Science, International Journal of Food Microbiology*, 8 (1989) 265-267 265.

Torres, K., Sierra, S., Poutour, R., Carrascal, A. y Mercado, M. (2005). " *Patogénesis de Listeria monocytogenes, microorganismo zoonótico emergente*". MVZ Córdoba, 10 (1): 511-543.

Tortora, G., Funke, B. y Case, C. (2007). " *Introducción a la microbiología*". (9a ed.). Buenos Aires: Médica Panamericana.

Vázquez-Boland J. (2001). "Patogénesis Listeria y factores moleculares determinantes de virulencia Clínica". *Microbiology Reviews*, 14 (3) 584-640.

Vlaemynck, G., Lafarge, V. y Scotter, S. (2000) "Improvement of the detection of Listeria monocytogenes by the application of ALOA, a diagnostic, chromogenic isolation medium". *Journal of Applied Microbiology* 88 (3), 430-441.

Wadud, S., Leon-Velarde , C., Larson, N., Odumeru, J. (2010) . “Evaluation of immunomagnetic separation in combination with ALOA Listeria chromogenic agar for the isolation and identification of Listeria monocytogenes in ready-to-eat foods”.*Journal of Microbiological Methods* 81 153–159.

Wuenschel, M. D., Kohler, S., Subert, A., Gerike, U. and Goebel, W. (1993). “*The iap Gene of Listeria monocytogenes Is Essential for Cell Viability, and Its Gene Product, p60, Has Bacteriolytic Activity*”. Theodor-Boveri-Institut für Biowissenschaften, Lehrstuhl für Mikrobiologie, Universität.

Yousef, A. y Carlstrom, C. (2006). “*Microbiología de los alimentos: manual de laboratorio*. (pp. 149-180). Zaragoza: Acribia.

Zamora, D. R. (2005) Un enemigo marino silencioso Vibrio parahaemolyticus. *Revista Digital Universitaria* ISSN: 1067-6079. Recuperado el 23 de mayo de 2011, desde [http://www.revista.unam.mx/vol.6/num4/art33/abr\\_art33.pdf](http://www.revista.unam.mx/vol.6/num4/art33/abr_art33.pdf)