

PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA DEL ECUADOR

ESCUELA DE BIOANÁLISIS

DISERTACIÓN PREVIA A LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO DE

LICENCIATURA EN MICROBIOLOGÍA CLÍNICA Y APLICADA

“EVALUACIÓN DE LA PREVALENCIA DE *Listeria monocytogenes* EN PRODUCTOS LÁCTEOS Y EMBUTIDOS EN TRES MERCADOS DE LA CIUDAD DE QUITO MEDIANTE LA TÉCNICA DE LA REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA EN TIEMPO REAL”

MARÍA CAROLINA MENA PALACIOS

DIRECTORA: LIC. ELENA GRANDA MORENO

QUITO, DICIEMBRE DEL 2010

DECLARACION Y AUTORIZACION

Yo, MARIA CAROLINA MENA PALACIOS, C.I. 171920975-9 autora del trabajo de graduación intitulado: “Evaluación de la prevalencia de *Listeria monocytogenes* en productos lácteos y embutidos en tres mercados de la ciudad de Quito mediante la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real”, previa a la obtención del grado académico de Licenciada en Microbiología Clínica y Aplicada en la Escuela de Bioanálisis:

1.- Declaro tener pleno conocimiento de la obligación que tiene la Pontificia Universidad Católica del Ecuador, de conformidad con el artículo 144 de la Ley Orgánica de Educación Superior, de entregar a la SENESCYT en formato digital una copia del referido trabajo de graduación para que sea integrado al Sistema Nacional de Información de la Educación Superior del Ecuador para su difusión pública respetando los derechos de autor.

2.- Autorizo a la Pontificia Universidad Católica del Ecuador a difundir a través de sitio web de la Biblioteca de la PUCE el referido trabajo de graduación, respetando las políticas de propiedad intelectual de la Universidad.

Quito, 14 de abril del 2011

María Carolina Mena Palacios
C.I. 171920975-9

DEDICATORIA

¶ Dios por guiar mi camino y darme la sabiduría necesaria para seguir adelante conquistando nuevos retos.

¶ mis padres y hermanos ya que constituyen un pilar fundamental para mi desarrollo y formación, sin ellos nada sería posible.

¶ mis abuelitos José Ignacio Palacios y María Tránsito Jácome a quienes amo con toda el alma y significan mucho para mí, ya que con su dulzura y cariño me han inspirado y alentado siempre para seguir ejerciendo como ser humano.

AGRADECIMIENTO

A la PUCE, por promover la investigación científica en todo momento y apoyar económica y moralmente a la realización de proyectos que fortalecen la formación integral de sus estudiantes.

A todo el gran equipo humano que conforma la Escuela de Bioanálisis, por su entrega y sacrificio en cada labor.

Al Lic. Marco Gudiño por incluirme en el desarrollo de este proyecto además de haber constituido una guía fundamental en mi aprendizaje.

A mi querido hermano Hugo Santiago por estar presente en cada instante de mi vida y brindarme soporte en la ejecución de objetivos como éste, ya que me acompañó de manera desinteresada desde etapas iniciales del proceso, como el muestreo.

A mi mejor amiga Gabriela Maldonado y a todas mis compañeras de trabajo quienes además de motivarme para la culminación de esta meta, han demostrado ser excelentes personas que me han ofrecido su apoyo incondicional.

Y a todos mis compañero/as y amigo/as que colaboraron de alguna manera en la realización del presente trabajo.

TABLA DE CONTENIDOS

DEDICATORIA.....	iii
AGRADECIMIENTO.....	iv
LISTA DE ABREVIATURAS	vii
ÍNDICE DE FIGURAS	viii
ÍNDICE DE TABLAS	ix
ÍNDICE DE ANEXOS	ix
RESUMEN	xi
ABSTRACT	xii

CAPÍTULO I

ASPECTOS PRELIMINARES

1.1 INTRODUCCIÓN	1
1.2 JUSTIFICACIÓN	2
1.3 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	3
1.4 OBJETIVOS DE LA INVESTIGACIÓN	4
1.4.1 OBJETIVO GENERAL.....	4
1.4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	4

CAPÍTULO II

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1 Listeria monocytogenes en el contexto de las Enfermedades Transmitidas por Alimentos (ETA).....	5
2.2 Género Listeria	5
2.2.1 Taxonomía:	5
2.2.2 Características generales del microorganismo.....	7
2.2.3 Características de crecimiento.....	8
2.2.4 Distribución	9
2.2.5 Clasificación serológica.....	10
2.2.6 Epidemiología.....	11
2.2.7 Características filogenéticas:	13
2.2.8 Ciclo de vida intracelular:	15
2.2.9 Enfermedad:.....	18
2.2.10 Fisiopatología de la Infección:	21
2.2.11 Legislación microbiológica	23
2.2.12 Diagnóstico de Laboratorio	23
2.2.13 Sensibilidad antibiótica	33
2.2.14 Tratamiento:	34

CAPÍTULO III MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Localización:.....	35
3.2 Muestra:	36
3.2.1 Cálculo del tamaño de la muestra:.....	36
3.2.2 Recolección y transporte de las muestras:	36
3.2.3 Identificación de las muestras:	37
3.3 Procesamiento de las muestras:.....	37
3.3.1 Pre-enriquecimiento – enriquecimiento de las muestras:	38
3.4 Identificación molecular de <i>Listeria monocytogenes</i>	39
3.4.1 Extracción por ebullición:.....	40
3.4.2 Determinación de la calidad de ADN extraído de las muestras:.....	41
3.4.3 Reacción en Cadena de la Polimerasa en Tiempo Real (qPCR)	42
3.5 Análisis estadístico.....	45

CAPITULO IV RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Extracción de ADN de <i>Listeria monocytogenes</i> :	46
Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (qPCR)	47
Análisis de curvas de disociación:.....	48
Análisis Estadístico.....	49

CAPITULO V

CONCLUSIONES.....	57
RECOMENDACIONES	59
BIBLIOGRAFÍA	60
ANEXOS.....	72

LISTA DE ABREVIATURAS

ADN	Acido desoxirribonucleico
APPCC	Análisis de Peligros y Puntos Críticos de Control
ARN	Acido ribonucleico
BAM	<i>Bacteriological Analytical Manual</i> (Manual de Análisis Bacteriológicos)
CIM	Concentración Inhibitoria Mínima
CMB	Concentración Mínima Bactericida
Ct	Threshold cycle (ciclo umbral)
ETA	Enfermedades Transmitidas por Alimentos
FAO	<i>Food and Agriculture Organization of the United Nations</i> (Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación)
FDA	<i>Food and Drug Administration</i> (Administración de Drogas y Alimentos)
I	Ñaquito
ISO	<i>International Organization Standardization</i> (Organización Internacional de Normalización)
M	Mayorista
MgCl ₂	Cloruro de Magnesio
OMS	Organización Mundial de la Salud
PCC	Puntos Críticos de Control
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i> (Reacción en Cadena de la Polimerasa)
qPCR	<i>Real Time quantitative PCR</i> (PCR en tiempo real)
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
Tm	<i>Melting temperature</i> (Temperatura de fusión)
S	Salchichas
SR	San Roque
UFC	Unidades Formadoras de Colonias
Y	Yogurt

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Morfología microscópica	7
Figura 2: Organización transcripcional y física del grupo de genes de virulencia (LIPI-1)	14
Figura 3: Ciclo de vida intracelular de <i>Listeria monocytogenes</i>	15
Figura 4: Representación esquemática y microscopia electrónica de ciclo intracelular	17
Figura 5: Poder Patógeno de <i>Listeria monocytogenes</i>	18
Figura 6: Colonización de tejidos	23
Figura 7: Prueba de CAMP	26
Figura 8: Reacción en Cadena de la Polimerasa.....	31
Figura 9: Descripción del Sistema LightCycler 1.5	32
Figura 10: Mercado Mayorista 1.....	35
Figura 11: Mercado Mayorista 2.....	35
Figura 12: Mercado Mayorista 3.....	35
Figura 13: Transporte de las Muestras	37
Figura 14: Recolección de las Muestras	37
Figura 15: Procesamiento de las muestras.....	39
Figura 16: Fase Molecular.....	39
Figura 17: Extracción de ADN bacteriano	40
Figura 18: Centrifugación	41
Figura 19: Termobloque	41
Figura 20: Preparación PCR mix.....	43
Figura 21: Capilares	44
Figura 22: Ligth cycler 1.5 Roche.....	44
Figura 23: Curva Estándar de Amplificación qPCR	48
Figura 24: Temperatura de fusión	49
Figura 25: Distribución de <i>Listeria monocytogenes</i> por mercados	52
Figura 26: Electroforesis N° 1	78
Figura 27: Electroforesis N° 2	79

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Clasificación científica de <i>Listeria</i>	6
Tabla 2: Características Generales de <i>Listeria monocytogenes</i>	8
Tabla 3: Serovariedades de <i>L. monocytogenes</i> y su respectivo aislamiento	11
Tabla 4: Linaje filogenético de <i>Listeria monocytogenes</i> con su respectivo serotipo.....	11
Tabla 5: Brotes epidémicos	12
Tabla 6: Características clínicas de <i>Listeria monocytogenes</i>	20
Tabla 7: Comparación entre métodos para el aislamiento de <i>Listeria monocytogenes</i>	25
Tabla 8: Características fenotípicas para la identificación de especies de <i>Listeria</i>	26
Tabla 9: Datos de la curva de calibración para el gen hly de la cepa de <i>L. monocytogenes</i> ATCC 19112	47
Tabla 10: Datos de Tm para el gen hly de la cepa de <i>L. monocytogenes</i> ATCC 19112	49
Tabla 11: Muestras de Salchichas Positivas por qPCR	50
Tabla 12: Muestras de Yogures Positivas por qPCR	50
Tabla 13: Prevalencia por tipo de producto	51
Tabla 14: Prevalencia por mercado.....	52
Tabla 15: Resultados de la qPCR en tiempo real y del cultivo para Salchichas.....	53
Tabla 16: Resultados de la PCR en tiempo real y del cultivo para Yogures.....	54
Tabla 17: Concentración de ADN extraído a partir de BHI y SS.....	75
Tabla 18: Calidad de DNA extraído a partir de BHI y SS.....	75
Tabla 19: Calidad de ADN de muestras extraídas con Lisozima vs Ebullición	76
Tabla 20: Concentración de ADN extraído por ebullición y DNAzol	77

ÍNDICE DE ANEXOS

ANEXO 1: Manejo de muestras	73
ANEXO 2: Registro de muestreo	74
ANEXO 3: Técnica de extracción por ebullición (ensayos previos).....	75
ANEXO 4: Extracción de DNA de <i>Listeria monocytogenes</i> por medio enzimático.....	80
ANEXO 5: Extracción de DNA de <i>Listeria monocytogenes</i> con DNAzol®	81
ANEXO 6: Programa de Amplificación.....	82
ANEXO 7: Resultados de Secuenciación.....	87

RESUMEN

La presencia de *Listeria monocytogenes* constituye un peligro para la salud pública, especialmente cuando se asocia con la ingesta de alimentos listos para consumo ya que mediante una dosis infectiva mínima (≤ 100 UFC/g o mL de alimento) puede causar enfermedad en personas inmunodeprimidas, niños con algún grado de desnutrición, adultos mayores, embarazadas, entre otros grupos de riesgo y al considerar que tanto lácteos como embutidos son productos accesibles a la población y de frecuente consumo, surge la necesidad de evaluar la prevalencia de dicho microorganismo en lácteos y embutidos expendidos en tres mercados de la ciudad de Quito: Mayorista, San Roque e Ñaquito. Por lo cual, se analizaron 100 muestras de yogures y 100 muestras de salchichas obtenidos en dichos puntos de venta. La técnica empleada para el análisis fue la Reacción en Cadena de la Polimerasa en tiempo real (qPCR), la cual demuestra la presencia del fragmento de 106pb del gen *hly* que codifica para listeriolisina O.

Se cuantificó de forma absoluta el producto de la amplificación de ácido desoxirribonucleico (ADN) y se utilizó SYBER Green I, técnica basada en el principio de emisión de fluorescencia del marcador que se une a los productos de la PCR, los cuales se identifican en base a la curva de temperatura de fusión (T_m) generada. Los resultados obtenidos fueron los siguientes: en yogures 4% y en salchichas el 9%, porcentajes relativamente altos considerando que son productos listos para la venta y de consumo masivo. Por tanto se sugiere la necesidad de implementar metodologías modernas que aseguren la ausencia de este microorganismo durante la fabricación de alimentos.

La qPCR demostró ser una alternativa complementaria al cultivo ya que además de ser un método sencillo, genera resultados rápidos, que podrían emplearse para el análisis de rutina en los laboratorios de la industria de alimentos al incrementar el número de muestras examinadas optimizando así procesos de inspección y acción de los equipos de vigilancia en salud.

Palabras Claves: *Listeria monocytogenes*, alimentos, inmunodepresión, lácteos, embutidos, mercados, prevalencia, qPCR, gen *hly*, SYBER Green I.

ABSTRACT

The presence of *Listeria monocytogenes* is a public health hazard especially when associated with the ingestion of food ready for consumption and that means minimal infective dose (<100 CFU / g or ml of food) can cause disease in immunocompromised populations, children with some degree of malnutrition, elderly, pregnant women, among other risk groups, and whereas both dairy and meats are products available to the public and frequent consumption, the need to assess the prevalence of this microorganism in milk and sausages sold at three markets in the city of Quito: Mayorista, San Roque and Iñaquito. Therefore, we analyzed 100 samples of yogurt and 100 sausage samples obtained from these outlets. The technique used for analysis was Chain Reaction Polymerase real-time (qPCR), which shows the presence of 106pb fragment of the *hly* gene encoding listeriolysin O.

Was quantified in absolute terms the product of amplification of deoxyribonucleic acid (DNA) using Syber Green I technique based on the principle of fluorescence marker that binds to the PCR products, which are identified based on melting curve (T_m) generated. The results were as follows: in yoghurt 4% and sausages 9%, whereas high frequencies are ready for sale products and consumer goods. For these reason suggested the need to implement methodologies that ensure the absence of this organism in food manufacturing.

The qPCR proved to be a complementary alternative to culture as well as a simple method produces quick results, which could be used for routine analysis in the laboratories of the food industry to increase the number of samples tested and optimized inspection processes and action on health monitoring equipment.

Key words: *Listeria monocytogenes*, food, immunocompromised, milk, sausages, markets, prevalence, qPCR, *hly* gene, SYBER Green I.

CAPÍTULO I

ASPECTOS PRELIMINARES

1.1 INTRODUCCIÓN

Listeria monocytogenes es un microorganismo bacteriano ambiental que puede contaminar los alimentos, bien sea a partir de su origen, o por los manipuladores de los mismos. (Córdoba M. , 2004) Su aparición ocurre en 1980, a partir de la evidencia de su transmisión alimentaria y la amplia difusión mediática que acompañó a cada una de las epidemias, especialmente en el hemisferio norte. (Schwartz, Hexter, & Broome, 1989)

El hábitat natural de estos microorganismos es probablemente la materia orgánica vegetal en descomposición y los rumiantes domésticos contribuyen al mantenimiento de *Listeria spp.* en el ambiente rural a través de un ciclo continuo de enriquecimiento oral-fecal. Una amplia variedad de especies animales puede infectarse por *Listeria monocytogenes*, entre las que se encuentran mamíferos, aves, peces y crustáceos, aunque la mayoría de casos de listeriosis clínica tienen lugar en rumiantes; los cerdos raras veces desarrollan la enfermedad y, generalmente, las aves son portadoras subclínicas del microorganismo.

La manifestación primaria de la listeriosis en el hombre puede incluir la presencia de septicemia, meningitis (o meningoencefalitis) y encefalitis, habitualmente precedida de síntomas parecidos a los de la gripe, incluida la fiebre. También se presentan manifestaciones gastrointestinales. A pesar de que la morbilidad de la listeriosis es relativamente baja, la mortalidad puede alcanzar valores de alrededor del 30%. (Chen & Kanabel, 2007). En embarazadas, la infección puede dar lugar a abortos, nacidos muertos o nacimientos prematuros (Rocourt, 1997)

Los brotes a causa de las enfermedades transmitidas por los alimentos son asociados ya sea a un manejo inadecuado, por contaminación cruzada e higiene insuficiente, y a diversos factores ambientales, (Reij & Den Aantrekker, 2004) originando consecuencias adversas a la salud humana y a la economía.

Debido a esto, un control eficaz de la higiene es de vital importancia. En la medida de lo posible, el diseño y la disposición interna de los establecimientos que se dedica a la elaboración de alimentos deben fomentar las buenas prácticas de cuidado alimentario que aseguren la ausencia de cualquier microorganismo patógeno. (Codex Alimentarius, 2003).

1.2 JUSTIFICACIÓN

Actualmente, *Listeria 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 de los alimentos, los cambios en los hábitos de comida de la población, particularmente respecto a la comodidad de los alimentos ya preparados y un incremento del número de personas consideradas de alto riesgo de sufrir la enfermedad: mujeres embarazadas, neonatos, infantes, ancianos o pacientes con patología de base. Entre éstas últimas, hay que hacer especial mención a las neoplasias, sobre todo hematológicas; trasplantes de órganos, colagenosis, diabetes mellitus y SIDA. (Henry, 2007)

Al ser la listeriosis una enfermedad grave, siendo considerada actualmente la infección de origen alimentario con mayor tasa de letalidad y teniendo costos elevados tanto desde el punto de vista médico, así como dentro de la industria agroalimentaria y en vista de la necesidad de controlar las epidemias producidas, (Altekruse, Hyman, & Klontz, 1994) es fundamental la introducción de un método sensible y específico como es la Reacción en Cadena de la Polimerasa en tiempo real (qPCR), que permita identificar la presencia del microorganismo aún cuando se encuentre presente en mínimas cantidades tanto para su control como para aumentar las posibilidades de acción de los equipos de vigilancia en salud pública al determinar su prevalencia en alimentos tales como: salchichas y yogures.

1.3 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Las enfermedades alimentarias transmitidas por patógenos bacterianos son un asunto cada vez más importante de seguridad alimentaria a nivel mundial, debido a que tanto en países desarrollados como en vías de desarrollo, las toxiinfecciones y enfermedades diarreicas agudas constituyen significativamente una causa de morbilidad y mortalidad. (Bhagwat, 2003)

Pacientes sometidos a terapias antineoplásicas son susceptibles de adquirir enfermedades infecciosas; sin descartar que la edad de las personas, también constituye un aspecto influyente sobre el estado inmune. El censo del 2001 determinó que el número de adultos mayores a los 65 años de edad ascendió a 645.191, en 1999, la mortalidad en niños de 1 a 4 años fue 354 por 100 mil; 47% de las cuales fue por causas transmisibles; (Organización Panamericana de la Salud) lo que indica que a etapas de la vida, el individuo es susceptible de contraer infecciones, como ocurriría con *Listeria monocytogenes* por vía alimentaria cuya dosis infectiva mínima en grupos de riesgo se estima es ≤ 100 UFC/g o mL de alimento.

Listeria monocytogenes es un contaminante frecuente de alimentos, estudios realizados en Bogotá demuestran su presencia del 34% para leche sin pasteurizar, 2% para leche pasteurizada y del 26.6% en quesos frescos entre septiembre del 2001 y agosto del 2004. En la misma ciudad se estableció una prevalencia del 17.5% para salchichas. (Vera, 2004)

En los Laboratorios de Certificaciones del Perú en 1996 se constató que de 217 productos marinos evaluados el 20.73% (45) presentaron aislamientos positivos para *Listeria monocytogenes* (Almeida, 1996.) (Guerra, 2005)

En vista de lo expuesto, mediante el presente estudio se pretende resolver, la siguiente interrogante: ¿La prevalencia de *Listeria monocytogenes*, determinada mediante qPCR en yogures y salchichas vendidos en los mercados Mayorista, San Roque e Ññaquito es alta frente a datos reportados en la región?

1.4 OBJETIVOS DE LA INVESTIGACIÓN

1.4.1 OBJETIVO GENERAL

- 1.4.1.1** Evaluar la prevalencia de *Listeria monocytogenes* en productos lácteos y embutidos, que se expenden en los mercados: Mayorista, San Roque e Iñaquito de la ciudad de Quito, mediante Reacción en Cadena de la Polimerasa en tiempo real (qPCR)

1.4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1.4.2.1** Aplicar un protocolo para el tratamiento de las muestras, previo a la identificación molecular de *Listeria monocytogenes*, con la técnica qPCR utilizando SYBR-Green I con el fin de obtener resultados fiables.
- 1.4.2.2** Determinar la prevalencia de *Listeria monocytogenes* por alimento y por mercado, mediante la técnica molecular qPCR SYBR – Green I.
- 1.4.2.3** Comparar la prevalencia de *Listeria monocytogenes* en productos lácteos y embutidos, obtenida con la técnica qPCR SYBR-Green I frente a la encontrada mediante la técnica convencional por cultivo (reportado en el estudio de Gudiño 2010)

CAPÍTULO II

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1 *Listeria monocytogenes* en el contexto de las Enfermedades Transmitidas por Alimentos (ETA)

Las Enfermedades Transmitidas por Alimentos son consideradas como un grave problema de salud pública a escala mundial, figuran en el continente americano entre las cinco primeras causas de muerte en niños menores de cinco años. (Larrea, 1998)

Listeria monocytogenes no fue considerado un patógeno animal hasta fines de la década de los 70. A principios de los años 80 emerge como uno de los patógenos humanos de origen alimentario más importante.

A partir de ese momento, la literatura sobre *Listeria* comenzó a incrementarse y a partir de 1983 una serie de brotes epidémicos humanos en Norteamérica y Europa establecieron claramente a la listeriosis como una grave infección alimentaria. Aproximadamente se registran 2500 casos de listeriosis humana por año, incluyendo 500 muertes (Mead, 2006)

Los alimentos más frecuentemente asociados con brotes y con alto nivel de riesgo son quesos y productos lácteos, patés y salchichas, pescados ahumados, ensaladas y en general productos industrializados, refrigerados, listos para el consumo, sin requerimientos de cocción o calentamiento previo. (Farber & Peterking, 1991)

Los alimentos se pueden contaminar en cualquier eslabón de la cadena productiva, así como también en el almacenamiento en frío.

2.2 Género *Listeria*

2.2.1 Taxonomía:

En principio, el género *Listeria* estaba incluido dentro de la familia *Corynebacteriaceae*. (Jay, 2005). Estudios genéticos demostraron su pertenencia a un linaje algo lejano, de

manera que hoy está en una familia aparte de la Subdivisión *Clostridium*: la familia *Listeria-Brochothrix*.

En la edición del *Manual de Bacteriología Sistemática de Bergey* lo incluyen en la familia propuesta "*Listeriaceae*" en el orden *Bacillales*, clase "*Bacilli*" en el filo *Firmicutes*. Ver Tabla 1 (Garrity & Holt, 2000)

Tabla 1. Clasificación científica de *Listeria*

Dominio:	Bacteria
Filo:	Firmicutes
Clase:	Bacilli
Orden:	Bacillales
Familia:	Listeriaceae
Género:	Listeria

Fuente: (Koneman, 2006) Adaptado por Mena C.

Durante muchos años, el género *Listeria* consistió en ocho especies *L. monocytogenes*, *L. grayi*, *L. innocua*, *L. ivanovii*, *L. murrayi*, *L. seeligeri*, *L. welshimeri*, y *L. denitrificans* (Seeliger & Jones, 1986)

Sobre la base de la secuenciación de rRNA 16S de *L. denitrificans* este microorganismo fue excluido del género *Listeria* y colocado en el género *Jonesia*. (Mantilla, 2007). Después de algunos estudios electroforéticos enzimáticos multilocus y análisis de homología de DNA, surgió una reclasificación ya que se determinó que *L. ivanovii* podía ser dividida en dos grupos genómicos o subespecies, es así como finalmente el género *Listeria* incluye ahora seis especies: *L. monocytogenes*, *L. ivanovii* subsp. *ivanovii*, *L. ivanovii* subsp. *londoniensis*, *L. seeligeri*, *L. innocua*, *L. welshimeri* y *L. grayi*. (Seeliger & Jones, 1986) De las cuales *Listeria monocytogenes*, es la única especie considerada como patógeno para humanos y animales de origen alimentario responsable de listeriosis y *Listeria ivanovii* patógeno para animales principalmente ovejas y cabras.

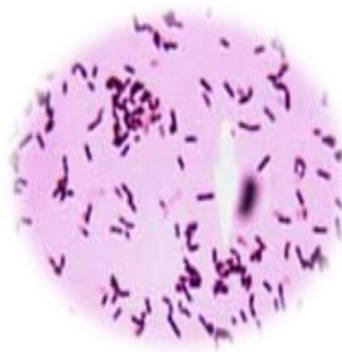
En 1926, tres microbiólogos: Murray, Webb y Swann, aíslan esta bacteria zoonótica en conejos en un laboratorio experimental de la Universidad de Cambridge. Analizaron animales enfermos (entre ellos roedores con un extraño trastorno caracterizado por fiebre y monocitosis), cultivaron su sangre y otros órganos e identificaron una nueva especie bacteriana, un bacilo gram positivo no esporulado al que lo bautizaron como *Bacterium monocytogenes* por ser la monocitosis uno de los síntomas de la enfermedad. (Murray E G D, 1926)

Un año más tarde en 1927, Pirie descubrió también su bacilo y lo llamó *Listerella hepatolytica* por su asociación con una alteración del hígado. Sucesivos estudios y cambios de nombres llevarían a descubrir una identidad única para los diferentes bacilos encontrados, pasando por *Bacterium monocytogenes hominis* de Nyfeldt (1932), *Corynebacterium parvulum* de Schultz (1934), *Erysipelothrix monocytogenes* de Miles y Wilson (1946), *Corynebacterium infantisepticum* de Potel (1950), para terminar en 1957 como *Listeria monocytogenes* gracias a Seeliger y en honor a Joseph Lister. (Correa, 1992) (Ledermann, 2008)

2.2.2 Características generales del microorganismo

Las bacterias pertenecientes al género *Listeriaceae*, son pequeños bacilos gram positivos, no formadores de esporas, ni encapsulados, anaerobios facultativos, móviles entre 10°C y 25°C. Algunas cepas de *Listeria* son no móviles a 37°C debido a la falta de expresión de flagelina a esta temperatura. (Way, 2004)

Figura 1: Morfología microscópica



Fuente: (Disease pictures)

La movilidad se debe a flagelos peritricos y se manifiesta mejor a temperatura ambiente, ya que a 37° C pierden casi todos sus flagelos, quedando monotricas. Se mueve de forma característica mediante un lanzamiento rápido combinado con saltos y rotación.

2.2.3 Características de crecimiento

Listeria monocytogenes posee la capacidad para crecer en un amplio rango de temperaturas (1°C – 45°C) lo que la hace capaz de sobrevivir en los alimentos; su rango óptimo de crecimiento se encuentra entre los 30°C y 37°C, aunque hay informes que reportan el crecimiento a 0°C, soportando repetidos congelamientos y descongelamientos. (Lovett & Twedt, 1988) (Seeliger & Jones, 1996) (Franco & Landgraft, 1996)

Es característico de estas bacterias su crecimiento en condiciones extremas y diversas debido a que: resisten medios con un pH tan alcalino como 9,6; toleran altas concentraciones de cloruro de sodio de hasta un 10% siendo lo ideal 0,5% de NaCl, es microaeróbica, creciendo mejor con baja tensión de oxígeno y tensión incrementada de CO₂. (Dworkin, 2006) Además reúne ciertas características que se detallan a continuación en la Tabla 2

Tabla 2: Características Generales de <i>Listeria monocytogenes</i>	
Relación con O₂	Facultativa
β hemolisis	+
Crecimiento a 4° C	+
Catalasa	+
Motilidad	+
Hidrólisis de la esculina	+
Utilización del Gluconato	+
Voges – Proskauer	+
Producción de H₂S en Agar TSI	-
Mol% G+C	36 – 38

Fuente: (Henry, 2007)

2.2.4 Distribución

Listeria monocytogenes es una bacteria ampliamente difundida en la naturaleza ya que habita múltiples nichos ecológicos como: polvo, aguas residuales, suelo, tierra, vegetación, ensilados y como parte de la flora fecal de una amplia variedad de animales (roedores, conejos, ovejas, rumiantes) provocándoles sepsis, romboencefalitis, prematuridad y aborto. (Schuchat, Swaminathan, & Broome, 1991) (Henry, 2007)

Además se encuentra en plantas de elaboración y conservación de alimentos, lo que le confiere una importante oportunidad para contaminarlos ya que crece en biopelículas sobre la superficie de los mismos y por tanto su principal vía de contagio es a través de la ingestión. Sin descartar que también puede ser adquirida por otras vías, especialmente en el contexto ocupacional, por veterinarios y personas que tienen cercanía con animales. (Schlech, y otros, 1983)(Swaminathan & Gerner-Smidt, 2007)

Es probable que los seres humanos al tener contacto diario con este microorganismo, se conviertan en portadores fecales, provocando de esta manera un problema mayor para la salud pública. (Gerner-Smidt P, 2005)

Al ser un componente transitorio de la flora intestinal humano, puede ser excretado en las heces en un 1 – 10 % de individuos sanos. (Schuchat A, 1993)

La amplia distribución de *Listeria monocytogenes* se debe a la capacidad de sobrevivir durante períodos de tiempo prolongados en diferentes medios. Los alimentos asociados más frecuentemente con listeriosis humana son los productos listos para consumo que promueven el crecimiento de dicha bacteria, por ser productos que tienen un tiempo de conservación prolongado en condiciones de refrigeración y que se consumen sin tratamiento listericida como por ejemplo: carne, leche y sus derivados, crustáceos y peces. (Galiana, 1968) (Qvist, Sehested, & Zeuthen, 1994) (Salvat, Toquin, Michel, & Collin, 1995) (Marth & Steele, 2001)

El primer brote importante se produjo en 1983, por el consumo de ensalada de coles en Nueva Escocia, Canadá; debido a que fueron conservadas en refrigeración por un período prolongado, factor que originó el crecimiento de *Listeria monocytogenes*.

(Schlech, y otros, 1983): Las coles se cultivaron en campos en los que habían pastado ovinos cuya materia fecal contaminó la tierra con la bacteria.

2.2.5 Clasificación serológica

Existen hasta el momento 13 serotipos reconocidos de *Listeria monocytogenes*: 1/2a, 1/2b, 1/2c, 3a, 3b, 3c, 4a, 4ab, 4b, 4c, 4d, 4e y 7, clasificados en base a los antígenos somáticos (O) y flagelares (H). Tres de ellos (1/2a, 1/2b y 4b), son responsables de 95% de las infecciones en humanos (Gener-Smidt, y otros, 2005); su serotipificación es útil desde el punto de vista epidemiológico más que clínico.

En alimentos no asociados con casos de listeriosis, predominan los serotipos 1/2, mientras que el serotipo 4b es muy escaso, posiblemente debido a que estas cepas podrían tener una menor capacidad para formar biopelículas en las plantas de procesamiento de alimentos en comparación con las de los serotipos 1/2, lo cual explica su escasez en ellos.

El serotipo 4b causa más del 50% de casos de listeriosis a nivel mundial, demuestra mejor adaptabilidad en tejidos de mamíferos; mientras que los serotipos 1/2a, 1/2b y 1/2c son los que predominan en aislamientos procedentes de alimentos siendo responsables de la mayoría de brotes en seres humanos. Es decir que determinadas cepas de *Listeria monocytogenes* tienen más probabilidades de causar enfermedad que otras ya que existen diferencias en el tropismo patogénico, así por ejemplo, las cepas serovariedad 4b han sido aisladas de fetos más que de casos no asociados con el embarazo (McLauchlin, 1990). En ovejas, las dos formas clínicas de infección: meningoencefalitis y aborto, no ocurren simultáneamente en el mismo rebaño (Vázquez-Boland, y otros, 1996)

Wiedman en 1997, encontró una correlación entre las tres serovariedades relacionadas evolutivamente, que permitió agrupar los aislamientos de *Listeria monocytogenes* (Wiedmann, y otros, 1997) y determinar el potencial patogénico para humanos y animales. Así, un grupo de cepas (serovariedades 1/2b y 4b) fue aislado de epidemias de origen alimentario en humanos y de casos esporádicos en humanos y animales, otro grupo de cepas (serovariedades 1/2a, 1/2c y 3a) fueron aisladas

únicamente de casos esporádicos en humanos y animales y un tercer grupo (serovariedad 4a) aislado de casos esporádicos en animales. (Rasmussen, Skouboe, Dons, Rossen, & Olsen, 1995) Dicha agrupación se explica en la tabla siguiente:

Tabla 3: Serovariedades de <i>L. monocytogenes</i> y su respectivo aislamiento	
1/2b, 4b*	Muestras aisladas a partir de epidemias en humanos y casos esporádicos en humanos y animales (ingesta alimentos contaminados)
1/2a, 1/2c, 3a	Muestras aisladas a partir de casos esporádicos en humanos y animales (no asociados a la ingesta de alimentos contaminados)
4^a	Muestras aisladas a partir de casos esporádicos en animales

* Serotipo aislado con mayor frecuencia a partir de muestras de humanos

Fuente: Rev.MVZ Cordoba, Adaptado por Mena C.

2.2.6 Epidemiología

El análisis filogenético propuesto por Rasmussen demostró que *Listeria monocytogenes* se divide en tres linajes (Nadon, 2001) (Meinersmann, 2004) (Sauders, 2006) según la secuencia de los genes de virulencia *hly*, *iap* y el gen *fla* que codifica para la flagelina. Posteriormente Wiedmann y colaboradores confirmaron la existencia de los tres linajes genéticamente distintos, mediante ribotipificación y PCR-RFLP del gen de virulencia *hly*. (Tabla 4)

Tabla 4: Linaje filogenético de <i>Listeria monocytogenes</i> con su respectivo serotipo	
Linaje filogenético	Serotipo
I	4b, 1/2b, 3b, 4d, 4e
II	1/2a, 1/2c, 3a, 3c
III	4a, 4c

Fuente: (Ragon, 2008)

Los linajes I y II, representan dos grupos evolutivos separados. Se ha observado que estudios realizados con cepas de *Listeria monocytogenes* procedentes de casos

clínicos de listeriosis animal han mostrado que el linaje I es de naturaleza clonal, más citopatogénico, y se asocia predominantemente con casos de encefalitis, mientras que el linaje II es más diverso desde el punto de vista genético y se asocia por igual con los distintos cuadros clínicos del ganado (Pohl, Wiedmann, & Nightingale, 2006).

Las cepas de serotipo 4b aisladas de la mayoría de los brotes epidémicos forman cuatro grupos genéticos homogéneos estrechamente relacionados, que se han denominado “clones epidémicos” ECI, ECII, ECIII, ECIV (Miettinen, y otros, 1999)

Un grupo clonal cosmopolita, fue asociado a varios brotes en diferentes países, relacionados con los siguientes alimentos: coles (Nueva Escocia, 1981), queso blando (Suiza, 1983 a 1987 y California, 1981) y lengua de cerdo (Francia, 1992)

El clon epidémico ECII fue identificado en USA (1998-1999), en un brote en varios estados, asociado a salchichas y en el 2002 a un brote por carne de pavo feteada.

El clon ECIV (serovariedad 4b) causó un brote producido por paté (Reino Unido, 1988) y por vegetales (Boston, 1983).

El clon ECIII corresponde a aislamientos de la serovariedad 1/2a y fue la causa de un brote por salchichas (USA, 1989) y carne de pavo (USA, 2000). (Kathariou, 2002) Estos aislamientos ECIII estaban relacionados epidemiológicamente, dado que se encontraron en la misma planta procesadora de alimentos y correspondían a idénticos subtipos, de acuerdo a diferentes estudios realizados por métodos moleculares. Ver

Tabla 5

Tabla 5: Brotes epidémicos

Pais	Año	Nº de casos	Nº de muertes	Serotipo	Alimento	Referencia
Halifax, Canadá	1981	41	18	4b	Coles	Schlech <i>et al.</i> (1983)
Massachussets, USA	1983	49	14	4b	Leche	Fleming <i>et al.</i> (1985)
Vaud, Suiza	1983-87	122	34	4b	Queso	Bula <i>et al.</i> (1995)
California, USA	1985	142	48	4b	Queso	Linnan <i>et al.</i> (1995)
Reino Unido	1989-90	300	0	4b	Paté	McLauchlin <i>et al.</i> (1991)
Francia	1992	279	88	4b	Lengua de cerdo	Jacquet <i>et al.</i> (1995)
Francia	1993	39	0	4b	Paté de cerdo	Goulet <i>et al.</i> (1995)
Francia	1995	36	0	4b	Queso blando	Goulet <i>et al.</i> (1995)
Multiestados, USA	1998-99	40	4	4b	Carne feteada	CDC (1998)
Finlandia	1988-99	25	6	3a	Manteca	Lyytikainen <i>et al.</i> (2000)
Francia	1999	29	7	NI	Lengua de cerdo	WHO (2000)
Multiestados, USA	2000	29	4	4b	Pavo feteado	CDC (2002)
Carolina del Norte, USA	2000-01	12	0	4b	Queso	CDC (2002a)
Multiestados, USA	2002	46	7	NI	Pollo y pavo	CDC (2002b)
Québec, Canadá	2002	17	0	NI	Queso	Gaulin <i>et al.</i> (2003)

NI: serovariedad no informada

Fuente: (Callejo R, 2008)

2.2.7 Características filogenéticas:

El genoma de *Listeria monocytogenes* fue secuenciado recientemente y posee un cromosoma circular de 2.944.528 pb con un promedio de G+C de 39%. Se han identificado 2853 genes, sin embargo al 35.3% no se les conoce función. En el caso de *L. innocua* posee un único cromosoma circular de 3.011.209 pb con un contenido promedio de G+C del 37% (Von-Both, 1999)

Los factores de virulencia en *Listeria monocytogenes* está influenciado por varios genes que codifican para la hemolisina (listeriolisina O), internalinas, fosfolipasas y otros. Además se sigue estudiando más factores para establecer su interacción con la susceptibilidad del huésped y dar lugar a la enfermedad.

La habilidad de *Listeria* spp, para colonizar y crecer en un amplio rango de ecosistemas se correlaciona con la presencia de 331 genes que codifican para diferentes proteínas de transporte. El número de componentes reguladores del genoma de *Listeria monocytogenes* es similar a otras bacterias, tales como *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Clostridium* spp., *Staphylococcus* spp., *Streptococcus* spp., *Lactobacillus* spp., *Bronchothrix* spp., y superior a *M. tuberculosis* y *Neisseria meningitidis*.

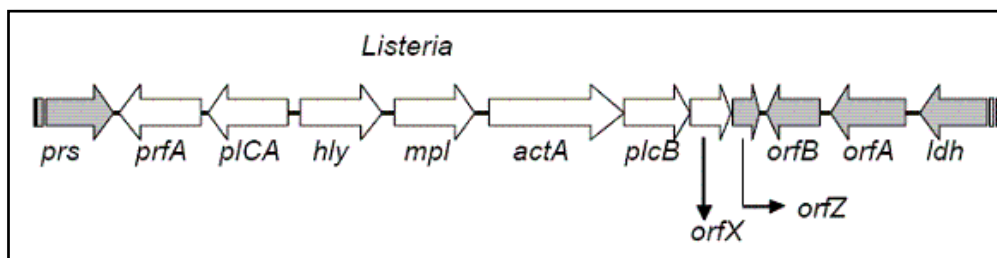
Los genes de virulencia de *Listeria monocytogenes* se organizan dentro de unidades genéticas conocidas como islas de patogenicidad, que son adquiridas por la bacteria por mecanismos de transferencia genética horizontal, algunas veces como parte de un elemento genético móvil, por lo cual son importantes en la evolución bacteriana (Chakraborty, 2000)

Seis de los genes de los factores de virulencia responsables del parasitismo intracelular de *Listeria monocytogenes* (*prfA*, *plcA*, *hly*, *mpl*, *actA* y *plcB*) están en una región del cromosoma de 9 kb conocida como “isla 1 de patogenicidad de *Listeria*” (*Listeria pathogenicity island 1*, *LPI-1*) o “agrupamiento de genes de virulencia” (*virulence gene cluster*, *vgc*) (Figura 2) (Kreft J, 2001)

El locus de virulencia está formado por tres unidades transcripcionales. La posición central está ocupada por el monocistrón *hly*, que codifica para la LLO requerida para la

ruptura de la vacuola fagocítica y la liberación de la bacteria dentro del citoplasma. Corriente abajo del monocistrón *hly*, y en el mismo sentido de transcripción se encuentra el operón lecitinasa de 5.7Kb que comprende tres genes: *mpl*, *actA* y *plcB* y tres pequeños marcos de lectura abiertos (ORFs) adicionales. El gen *actA* codifica para la proteína *ActA*, el gen *plcB* para la fosfolipasa C fosfatidilcolina específica (PC-PLC), y el gen *mpl* codifica para la proteasa, la cual procesa extracelularmente el propéptido inactivo de la PC-PLC. (López & Suárez, 2006)

Figura 2: Organización transcripcional y física del grupo de genes de virulencia (LIPI-1)



Fuente: Modificado de (Vázquez-Boland, y otros, 2001b)

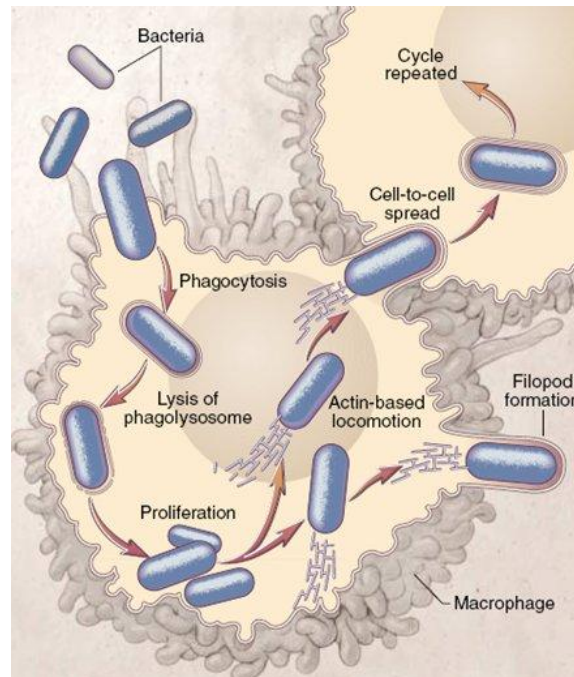
La proteína reguladora PrfA es absolutamente indispensable para la expresión de la virulencia en las especies patógenas de *Listeria* (Ripio MT, 1997). La expresión del regulón de virulencia a través de PrfA depende de diversas señales ambientales (Gray MJ, 2006). Estas señales de activación incluyen temperatura alta (37 °C), condiciones de estrés y “secuestro” de componentes del medio de crecimiento celular por carbón activado (Ripio, 1996); por otro lado la expresión de los genes de virulencia a través de PrfA también está sujeta a represión por catabolito. (Sokolovic Z, 1993)

A partir de la secuenciación del genoma de *L. monocytogenes* se han descubierto nuevos factores de virulencia, entre los que destacan nuevas proteínas de superficie del tipo de la internalina, las sortasas SrtA y SrtB (transpeptidasas que unen a la pared celular diferentes proteínas de superficie como la internalina), y una hidrolasa de sales biliares, BSH, que permite a la bacteria sobrevivir en el intestino y que no se encuentra en *L.innocua* (Dussurget O, 2004)

2.2.8 Ciclo de vida intracelular:

El ciclo incluye la fagocitosis inducida por el propio patógeno, la lisis de la vacuola fagocítica, el movimiento en el citoplasma y la diseminación a las células vecinas (Vazquez-Boland, 2001) (Figura 3)

Figura 3: Ciclo de vida intracelular de *Listeria monocytogenes*



Fuente: (Olivares, 2009)

a) **Adhesión e invasión:**

El ciclo comienza con la adhesión a la superficie de la célula eucariota y la subsecuente penetración de la bacteria dentro de la célula hospedadora mediante fagocitosis.

El único mecanismo conocido que permite la unión covalente de las proteínas de superficie de la pared celular de bacterias gram-positivas a la célula eucariota requiere proteínas con una secuencia conservada LPXTG (Leu-Pro-X-Thr-Gly, donde X es cualquier aminoácido).

En el genoma de *Listeria monocytogenes* se han detectado 41 genes que codifican para proteínas LPXTG.

Las primeras proteínas de este tipo identificadas fueron la internalina (o InIA) y la proteína InIB, codificadas ambas por el operón *inIAB* (Braun L, 1997) (Lecuit, y otros, 2001); la primera interviene en la adhesión e invasión de células epiteliales polarizadas, como las intestinales, mientras que InIB lo hace en el caso de células epiteliales no polarizadas, como los hepatocitos (Pizarro-Cerda & Cossart, 2006)

Existen otras moléculas necesarias para la invasión a la célula eucariota, entre las que se encuentran varias autolisinas (Ami, p60, Auto), una proteína fijadora de fibronectina (FbpA) y proteínas que también intervienen en fases posteriores del ciclo intracelular, como ActA y la hemolisina o listeriolisina O (LLO) (Dussurget, Pizarro-Cerda, & Cossart, 2004)

b) Vacuola primaria de lisis:

Una vez fagocitada, la bacteria es capaz de escapar del ambiente hostil del fagosoma gracias a la secreción de LLO, una hemolisina activa a bajo pH codificada por el gen *hly* y activada por tiol. LLO reconoce el colesterol de la membrana, forma poros y favorece la lisis de la membrana del fagolisosoma, lo que provoca la migración de *Listeria monocytogenes* al citosol de la célula hospedadora (Kayal S, 2006) (Mengaud J, 1989). La hemolisina de *L. ivanovii* tiene características especiales que la diferencian de LLO (Gonzalez-Zorn B, 1999)

Listeria monocytogenes secreta al medio extracelular dos fosfolipasas C asociadas con la virulencia, que pueden contribuir a dañar las membranas y a la correspondiente citólisis. Una de ellas, PI-PLC, tiene como sustrato específico al fosfatidilinositol (PI), está codificada por *plcA* y es capaz de romper los anclajes glicosil-PI. La otra, PC-PLC, es una lecitinasa codificada por *plcB*, que tiene un rango más amplio de sustrato, dado que hidroliza fosfatidilcolina, fosfatidilserina y fosfatidiletanolamina (Vázquez-Boland JA, 1992)

c) Desarrollo intracelular:

La propagación bacteriana dentro del citosol es mediada por un transportador de fosfato hexosa bacteriano (Hpt) y una ligasa protein lipoato (LpLA1) que permiten que *Listeria monocytogenes* capte de la célula huésped fuentes de carbono.

d) **Diseminación de una célula a otra:**

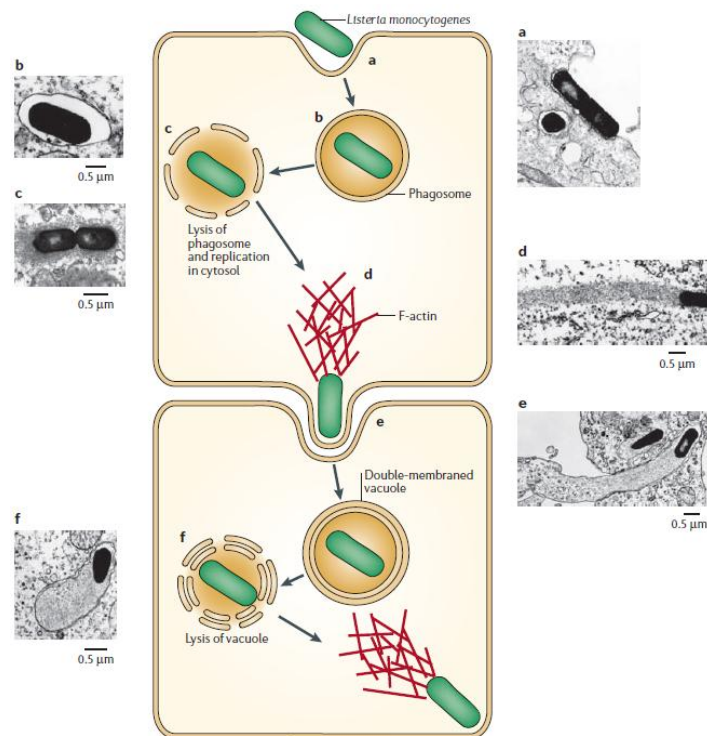
Una vez alcanzado el citoplasma, la bacteria utiliza el citoesqueleto de la célula hospedadora para desplazarse en su interior, utilizando la nucleación de filamentos de una proteína, actina (ActA). Esto produce un movimiento dirigido de las bacterias hacia la membrana celular de la célula huésped y promueve la formación de evaginaciones citoplásmicas que se extienden dentro de las células vecinas. Este mecanismo hace que se infecte la célula adyacente y la bacteria quede dentro de una vacuola de doble membrana (Tilney, 1989.)

e) **Lisis de la vacuola de doble membrana:**

La fosfolipasa C fosfatidilcolina específica (PC-PLC) de *Listeria* junto con la LLO lisan la vacuola de doble membrana y liberan las bacterias que infectan la nueva célula. (Figura 4)

Al ser un mecanismo que permite la diseminación de la bacteria por los tejidos del hospedador sin entrar en contacto con los efectores humorales del sistema inmune, este fenómeno de paso directo de célula a célula es crucial en la patogénesis.

Figura 4: Representación esquemática y microscopía electrónica de ciclo intracelular



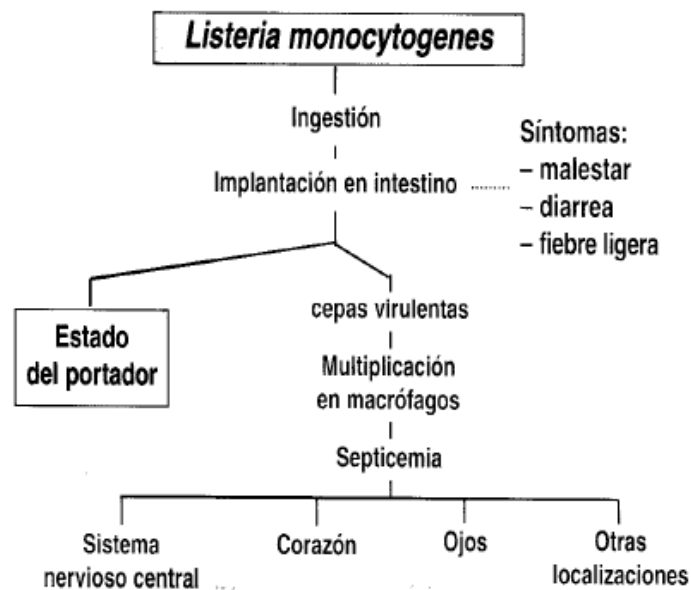
Fuente: (Nature Publishing Group, 2006)

2.2.9. Enfermedad:

La listeriosis humana puede presentarse como epidemias o en forma de casos esporádicos, y es fundamentalmente una infección de carácter oportunista que ataca principalmente a segmentos de la población cuya vulnerabilidad se encuentra afectada, como es el caso de personas inmunodeprimidas, adultos mayores, mujeres embarazadas, recién nacidos, pacientes con enfermedades crónicas como cáncer, hemodiálisis, SIDA, pacientes diabéticos, oncológicos e insuficientes renales.

La mayoría de los casos de listeriosis en humanos son atribuidos a ingesta de alimentos contaminados con *Listeria monocytogenes*, derivado de cambios de hábitos de alimentación en la población, o de factores asociados a la preparación o conservación de alimentos y que posteriormente su multiplicación involucrará importantes órganos (Figura 5)

Figura 5: Poder Patógeno de *Listeria monocytogenes*



Fuente: (James, 1978)

Las graves manifestaciones clínicas características de la listeriosis (meningitis y/o encefalitis, abortos o infecciones neonatales, y septicemias) hacen que, aunque sea una enfermedad infecciosa de baja morbilidad, presente una alta mortalidad, con tasas que van entre del 20-50% (McLauchlin J. , 1990) la más altas de todas las infecciones alimentarias.

La infección generalmente comienza alrededor de las 20 horas después de la ingestión del alimento contaminado en los casos de gastroenteritis (Dalton C B, 1997), mientras que el período de incubación para la forma invasiva es generalmente más larga, alrededor de 20 a 30 días. (Linnan M J, 1988) Los mismos períodos de incubación han sido descritos para animales, tanto para la gastroenteritis como para la forma diseminada.

Existen dos formas de presentación clínica de la infección:

a) Listeriosis feto materna y listeriosis neonatal

La infección se produce por invasión del feto por vía placentaria y desarrollo de corioamnionitis. Como consecuencia, puede ocurrir el aborto, generalmente a partir de los 5 meses de embarazo, el parto prematuro o el nacimiento a término con infección generalizada del neonato, síndrome conocido como granulomatosis infantiséptica.

Se caracteriza por la presencia de microabscesos piogranulomatosos diseminados en el cuerpo y con alta mortalidad (Klatt E C, 1986). En la madre, la infección es generalmente asintomática y puede presentarse como un síndrome gripal leve con escalofríos, fatiga, dolor de cabeza, muscular y articular alrededor de 2 a 14 días antes del aborto.

La listeriosis neonatal tardía se observa con menos frecuencia. Generalmente ocurre de 1 a 8 semanas posteriores al parto y se presenta con un síndrome febril acompañado por meningitis y en algunos casos gastroenteritis y neumonía. La vía de contaminación del neonato es por aspiración de exudados maternos contaminados durante el parto. También se han registrado casos intrahospitalarios en unidades de neonatología por transmisión horizontal a través de instrumental y las manos del personal de salud (Farber J M, 1991). La mortalidad de la listeriosis neonatal tardía es más baja (10 al 20%), pero al igual que la listeriosis temprana, puede dejar secuelas tales como hidrocefalia y retraso psicomotor (Lorber, 1996)

b) Listeriosis del adulto

La infección más frecuente en el adulto es la invasión del sistema nervioso central SNC (55 al 70% de los casos). Desarrolla generalmente como meningoencefalitis acompañada por cambios severos de la conciencia,

desórdenes del movimiento y en algunos casos parálisis de los nervios craneales. La mortalidad de la infección del SNC es del 20%, pero puede ser del 40 al 60% si está asociada a una enfermedad de base.

En ciertos grupos de riesgo, como enfermos de cáncer, *Listeria monocytogenes* es la causa más frecuente de meningitis bacteriana (Lorber, 1996). Otra forma frecuente de listeriosis es la bacteriemia o septicemia que tiene una alta tasa de mortalidad (hasta el 70%), si está asociada a una enfermedad inmunosupresiva.

Hay otras formas clínicas atípicas (5 al 10% de casos) tales como endocarditis, miocarditis, neumonía, pleuritis, hepatitis, colecistitis, peritonitis, abscesos localizados, artritis. En vacas la forma más frecuente es la mastitis (Blenden D C, 1987). Investigaciones de brotes alimentarios han dado la evidencia de que un síndrome gastrointestinal es la manifestación clínica de la infección por *L. monocytogenes* (Aureli P, 2000) Ver Tabla 6.

Tabla 6: Características clínicas de <i>Listeria monocytogenes</i>	
Período de incubación	9 a 48 horas después de la ingestión del alimento contaminado
Presentación de las características	Diarrea acuosa (sangre rara vez presentes en las heces) Síntomas observados durante un brote de gastroenteritis febril: -Fiebre > 38 ° C (adultos: 57%, niños 76%) -Dolor de cabeza (adultos: 88%, niños 86%) -Dolor abdominal (adultos: 72%, niños: 72%) -Náuseas (adultos: 60%, niños: 54%) -Vómitos (adultos: 19%, niños: 40%) -Diarrea (adultos: 52%, niños: 40%) -Dolor en articulaciones (adultos: 45%, niños: 24%)
Laboratorio	<i>L. monocytogenes</i> se puede aislar de sangre, en las heces o en ocasiones, si se produce bacteremia
Complicaciones	Infecciones sistémicas: - Infección del Sistema Nervioso Central (meningitis, rombencefalitis, absceso cerebral) -Bacteremia -Infección localizada -Endocarditis -Para las mujeres embarazadas, la infección del feto o del recién nacido
Tasa de letalidad	Gastroenteritis febril no es mortal, a menos que la infección progrese a enfermedad invasiva Mujeres embarazadas y sus fetos, recién nacidos, pacientes inmunocomprometidos y los ancianos corren un mayor riesgo de enfermedad invasiva

Fuente: Adaptado de (Lorber, 1996)

2.2.10. Fisiopatología de la Infección:

La diseminación de la bacteria por los tejidos del hospedador sin entrar en contacto con los efectores humorales del sistema inmune, es crucial en la patogénesis. (Lecuit M, 2002)

La patogenicidad de *Listeria 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). (Gilot P, 1999) Ver Figura 6.

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

a) Cruce de la barrera intestinal:

Listeria monocytogenes tiene que soportar el ambiente adverso del estómago. Al menos 13 proteínas de estrés oxidativo y 14 proteínas de “shock” tóxico, son inducidas bajo condiciones de estrés en este microorganismo (Doyle, 2001)

b) Multiplificación 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 (Pron B, 1998)(Cousens L P, 2000).

Más del 90% de bacterias son acumuladas en el hígado y capturadas por las células de Kupffer.(Ebe Y, 1999)

El sitio principal de multiplicación bacteriana en el hígado es el hepatocito (Conlan J W, 1992) Existen dos vías posibles para el acceso de *Listeria* al parénquima del hígado: vía células de Kupffer, por la diseminación célula a célula o por la invasión directa de hepatocitos después de cruzar la barrera endotelial fenestrada que rodea los sinusoides hepáticos.

El paso de hepatocito a hepatocito conduce a la formación de un foco infeccioso en el que *Listeria monocytogenes* se disemina a través del parénquima hepático sin entrar en contacto con los efectores humorales del sistema inmune; lo que pudiera explicar por qué los anticuerpos no son importantes en la inmunidad anti-*Listeria* (Edelson B, 1999) Los neutrófilos juegan un papel importante en el control de la fase aguda de la infección y en la destrucción “in vivo” de *Listeria* en hepatocitos infectados (Rogers H W, 1993)

Listeria monocytogenes es un patógeno multisistémico que puede infectar un amplio rango de tejidos hospederos. Sin embargo, las principales formas clínicas de listeriosis muestran que este microorganismo posee tropismo por el útero grávido y el sistema nervioso central.

c) Colonización de útero grávido y feto:

Listeria monocytogenes accede al feto por penetración hematogena de la barrera placentaria cuya infección se caracteriza por numerosos microabscesos e inflamación de las vellosidades con necrosis focal (Parkash V, 1998) (Abram M, 1997)(Guleria I, 2000)

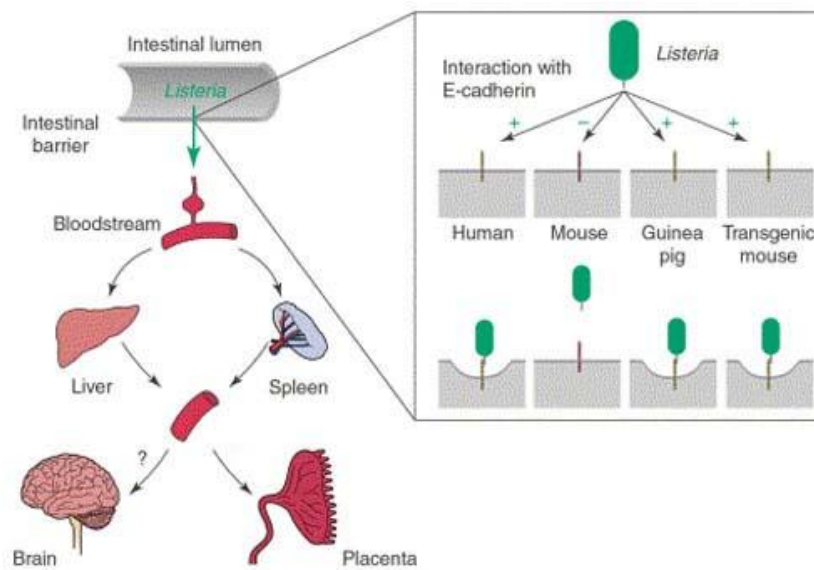
La colonización de la membrana trofoblástica seguida por la traslocación a través de la barrera endotelial, permite a la bacteria alcanzar la corriente sanguínea fetal, conduciendo a una infección generalizada y la posterior muerte del feto en útero o la muerte prematura del neonato infectado en el que produce lesiones piogranulomatosas.

d. Invasión del cerebro:

La infección del sistema nervioso central se presenta en forma de meningitis, que se asocia frecuentemente con la presencia de focos infecciosos en el parénquima cerebral.

Listeria monocytogenes invade el cerebro por migración centrípeta a lo largo de los nervios craneales. La parálisis unilateral del nervio craneal es característica de romboencefalitis en rumiantes, conduciendo al desarrollo de la enfermedad “circling” que se caracteriza por tortícolis involuntaria y desplazamiento sin rumbo, en círculos como resultado de las lesiones del tallo cerebral

Figura 6 Colonización de tejidos



Fuente: (Institut Pasteur, 2000)

2.2.11 Legislación microbiológica

A mediados de la década de 1990, la industria alimentaria introdujo una iniciativa denominada: Análisis de Riesgos en puntos de Control Críticos (Hazard Analysis at Critical Control Points, HACCP) para mejorar la vigilancia y el control de *Listeria monocytogenes* y otros patógenos transmitidos por alimentos en el medioambiente de la planta procesadora de alimentos. La Food and Drug Administration (FDA) ha exigido un enfoque de “cero tolerancia” para el control de la listeriosis, con incrementos tanto en la cantidad de inspecciones en los centros de procesamiento de alimentos como el retiro del mercado de los alimentos sospechosos de albergar patógenos. (Tappero, 1995)

2.2.12 Diagnóstico de Laboratorio

Para la identificación de *Listeria monocytogenes* se dispone de una variedad de técnicas convencionales ya sea en muestras de alimentos o en muestras clínicas procedentes de animales o humanos que presenten listeriosis.

El método tradicional de aislamiento del microorganismo el cultivo, sigue siendo el “patrón de oro” con el que se comparan el resto de procedimientos de identificación. Sin embargo para llevarlo a cabo es necesaria la utilización de agentes selectivos y de enriquecimiento que permitan la multiplicación del agente en cuestión y reduzcan el número de microorganismos contaminantes.

Métodos de cultivo

Los métodos convencionales para el aislamiento de *Listeria monocytogenes* a partir de alimentos que han ganado aceptación con propósitos reglamentarios internacionales son el método de la Administración de Drogas y Alimentos de los Estados Unidos (FDA) (HITCHINS, 1998), el método oficial de la Asociación Oficial de Químicos Analistas (AOAC) (AOAC OFFICIAL METHOD, 2000), los Estándares ISO 11290 (INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION, 1996) el método del Servicio de Inspección y Seguridad Alimentaria (FSIS) del Departamento de Agricultura de los Estados Unidos (USDA) y los Estándares franceses (AFNOR, 2000)

De acuerdo con la naturaleza de la muestra, un método particular puede ser más adecuado que otro. El Comité Técnico de la Organización Internacional para la Estandarización ISO/TC, Subcomité SC9, Microbiología, de Productos Agroalimentarios, afirma que el Estándar ISO 11290, partes 1 y 2 puede utilizarse para la detección de *Listeria monocytogenes* en una gran variedad de alimentos y productos alimenticios. Aunque reconocen que este estándar puede no ser el más apropiado en ciertos casos, recomiendan que se lleve a cabo el máximo esfuerzo para aplicar este método, en lo posible.

Aislamiento:

Las muestras utilizadas para el análisis deben ser representativas: en alimentos 25 gr ó mL incluyendo la superficie externa e interna, en el caso de la listeriosis animal, las muestras deberían escogerse de acuerdo con la presentación clínica de la enfermedad: material procedente de lesiones del hígado, placenta, riñones y/o bazo.

Se deben emplear temperaturas de refrigeración (4°C) para la manipulación, conservación y transporte de muestras.

Los métodos de cultivo convencional conllevan un procedimiento de enriquecimiento basado en la utilización de medios de cultivo líquidos que contengan agentes selectivos. La naturaleza de los medios y los agentes selectivos varían con el método.

En la Tabla 7 se muestra la comparación de diferentes protocolos para el aislamiento de *Listeria monocytogenes* de acuerdo con métodos establecidos por organizaciones internacionales, éstos incluyen el medio de cultivo líquido, medio de cultivo sólido y morfología colonial.

Tabla 7: Comparación entre métodos para el aislamiento de *Listeria monocytogenes*

Protocolo	Proceso	Medio de cultivo líquido	Medio de cultivo sólido	Morfología colonial
USDA-FSIS y AOAC	Caldo de enriquecimiento	Caldo Fraser con ácido nalidíxico, cloruro de litio y acriflavina	Agar Oxford Modificado (MOX) contiene cloruro de litio, colistina y moxalactam.	Pequeñas, negras y rodeadas de un halo negro
FDA	Pre-enriquecimiento 30°C durante 4 horas en caldo	Tripticasa-soja con extracto de levadura (TSB YE) con acriflavina, ácido nalidíxico y cicloheximida	Agar Oxford incluye cloruro de litio/feniletanol/moxalactam (LPM) o Agar PALCAM	Pequeñas, negras y rodeadas de un halo negro
ISO 11290	Enriquecimiento primario y secundario 24 horas c/u a 30°C en presencia de agentes selectivos	Caldo Fraser Con: acriflavina, ácido nalidíxico, esculina	ALOA Agar Listeria acc. to Ottaviani and Agosti	Pequeñas, azules rodeadas de halo opaco

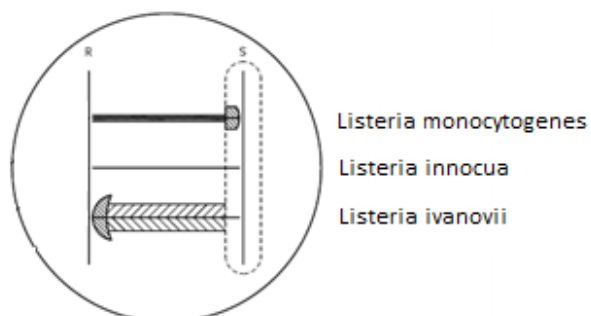
Fuente: Manual de la OIE sobre animales terrestres, adaptado por Mena Carolina

Identificación:

Las colonias típicas de *Listeria* spp, crecidas en el medio selectivo/diferencial, se seleccionan para su identificación a nivel de especie, para lo cual se utiliza una batería de pruebas (Tabla 8). Estas pruebas comprenden la tinción de Gram, catalasa, ensayos de motilidad a 25° C, hemólisis y utilización de carbohidratos.

La prueba de CAMP (Christie–Atkins–Munch–Peterson) es una herramienta muy útil que facilita la identificación de las especies de *Listeria* spp a partir de los aislamientos. (Figura 7)

Figura 7: Prueba de CAMP



Fuente: (INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION, 1996)

Tabla 8: Características fenotípicas para la identificación de especies de *Listeria*

Características	<i>L. grayi</i>	<i>L. innocua</i>	<i>L. ivanovii</i>	<i>L. ivanovii</i> subesp. <i>londoniensis</i>	<i>L. monocytogenes</i>	<i>L. seeligeri</i>	<i>L. welshimeri</i>
Hemólisis beta	-	-	++	++	+	+	-
Prueba de CAMP							
<i>S. aureus</i>	-	-	-	-	+	+	-
<i>R. equi</i>	-	-	+	+	-/+	-	-
Fermentación de:							
Manitol	+	-	-	-	-	-	-
L-ramnosa	V	V	-	-	+	-	V
D-Xilosa	-	-	+	+	-	+	+
Hidrólisis de hipurato	-	+	+	+	+	No determinado	No determinado
Reducción de nitratos	-	-	-	-	-	No determinado	No determinado
Serotipo	Específico	4ab 6a 6b	5	5	1/2a, 1/2b, 1/2c, 3a, 3b, 3c, 4a, 4ab, 4b, 4c, 4d, 4e, 7	1/2a, 1/2b 1/2c, 4b 4d, 6b	1/2b, 4c 6a, 6b
Patogenicidad murina	-	-	+	?	+	-	-
Ecología	No patógeno	No patógeno	Suelo, alimento, Heces. Patógeno animal		Suelo, alimento, heces. Patógeno humano y animal	No patógeno	No patógeno

Fuente: (Callejo R, 2008)

Algunos protocolos emplean pruebas convencionales y no convencionales disponibles comercialmente como por ejemplo: Vitek, API, MICRO-ID, kits de enzimoimmunoensayo (ELISA) y kits de ensayo de ácidos nucleicos que ayudan en la identificación de *Listeria monocytogenes*.

MICRO-ID Listeria

El MICRO-ID *Listeria* es un sistema disponible para la identificación presuntiva de las especies de *Listeria*, aisladas a partir de muestras medioambientales y de alimentos. Supone una alternativa a las pruebas bioquímicas convencionales de los aislados de *Listeria* spp. Se basa en el principio de que el inóculo de la prueba contiene enzimas preformados que pueden detectarse después de 24 horas de incubación a 37°C

Sistema de identificación microbiana automatizada

Vitek (Vitek Automicrobic System) es un sistema automatizado que puede emplearse para la identificación presuntiva de las especies de *Listeria* de transmisión alimentaria y para la detección de aislados diferentes a *Listeria*.

El sistema utiliza una tarjeta que incluye pruebas bioquímicas y una cámara incubadora con un lector óptico, una unidad de llenado/sellado para la inoculación del kit de la prueba y un ordenador. Los cambios se analizan mediante el ordenador, que asigna al microorganismo problema un género y/o una especie.

Otros métodos disponibles comercialmente para la identificación de especies de *Listeria* incluyen el API LISTERIA (bioMérieux), el MICROBACT 12L (Microgen), el Sistema *MicroLog* (Biolog.), el Sistema de Identificación Microbiana *Sherlock* (MIS) (*Microbial ID*; basado en patrones de ácidos grasos) y el Sistema *Walk/Away* (*MicroScan*).

Métodos inmunológicos de detección rápida

Enzimoimmunoensayo colorimétrico monoclonal (*Listeria*-Tek)

Se ha diseñado para la detección de *Listeria* spp. en productos lácteos, carnes y mariscos. Como en la prueba se utilizan anticuerpos monoclonales (MAbs) pueden producirse reacciones cruzadas con otras *Listeria* spp., por tanto, la prueba no es confirmatoria para *Listeria monocytogenes*.

Método colorimétrico de detección mediante un enzoinmunoensayo policlonal (TECRA® *Listeria* Visual Immunoassay [TLVIA])

Diseñado para la detección de *Listeria* spp. en productos lácteos, mariscos, carne de ave y carnes (excepto carne cruda picada) y verduras de hoja.

Los cultivos de enriquecimiento que den positivo deben inocularse en medios selectivos y las colonias sospechosas se identificarán de acuerdo a los criterios especificados en los métodos de la FDA y del USDA.

Método Assurance® de enzoinmunoensayo policlonal

Para la detección de *Listeria* spp., incluyendo *Listeria monocytogenes*, en productos lácteos, carnes rojas, cerdo, productos avícolas, frutas, frutos secos, mariscos, pastas, verduras, quesos, piensos, chocolate y huevos.

Las lecturas por encima del valor de corte se consideran presuntos positivos y a continuación los cultivos enriquecidos se confirman mediante los procedimientos de cultivo e identificación que se describen en el método de la FDA.

Ensayo visual de inmunoprecipitación (VIPTM)

Es un ensayo de un simple paso con efecto visual que sirve para detectar *Listeria monocytogenes* y otras *Listeria* spp.

La técnica se basa en el desarrollo de un complejo cromógeno antígeno-anticuerpo en caso de estar presente *Listeria* en la muestra analizada

La prueba se lleva a cabo con un cultivo enriquecido de las muestras problema. Las pruebas con resultado presunto positivo deben confirmarse mediante los procedimientos de cultivo e identificación que se describen en el método de la FDA.

Método de detección mediante ensayo VIDAS LIS

Basado en el enzoinmunoensayo fluorescente (ELFA), se realiza con un instrumento automatizado VIDAS®, el ordenador compara el valor obtenido con un patrón y se genera un informe positivo o negativo. Los resultados positivos deben confirmarse mediante métodos de cultivo estándar como se describe en el método de la FDA. Se emplea para la detección de productos lácteos, verduras, marisco, carnes crudas y de ave, así como para la detección de antígenos de *Listeria* spp. En carnes procesadas y de ave.

Métodos de reconocimiento de los ácidos nucleicos

Se han desarrollado varios métodos basados en el reconocimiento de los ácidos nucleicos para identificar *Listeria monocytogenes* en alimentos, constituyendo una alternativa adecuada, debido a que estos métodos son exactos, sensibles y específicos.

Ensayo GENE-TRAK para *Listeria*

El ensayo GENE-TRAK para *Listeria* es un método colorimétrico de hibridación del ADN para la detección de las secuencias de *Listeria*. La técnica se basa en la utilización de sondas que permiten la identificación de genes de virulencia. La presencia de una secuencia de un gen blanco es detectada mediante una sonda marcada que es complementaria a la secuencia de ADN de la muestra.

Las partes de la prueba que den resultado positivo en el ensayo de hibridación del ADN deben confirmarse mediante la siembra por estría en placa de una suspensión microbiana en tampón fosfato salino empleando un medio selectivo para *Listeria*, seguido de la identificación bioquímica de los aislados presuntivos de *Listeria*, como se describe en el método de la FDA.

Método AD713

La FDA utiliza el método AD713 para detectar *L. monocytogenes* que consiste en una combinación de sondas: para el gen de la proteína asociada a la invasión y para el de la hemolisina (hly). Este método combina la detección del gen de la hemolisina (también llamada listeriolisina O) de *L. monocytogenes* utilizando el oligonucleótido sonda AD13 y la detección del gen de la proteína asociada a la invasión mediante una sonda sintética, la AD07. Ambas sondas se utilizan en combinación (se denomina AD713) para evitar los resultados falsos-negativos debidos a las mutaciones “silenciosas” en el gen (cambios de nucleótidos que afectan a la capacidad de unión de la sonda al ADN pero no modifican la función del gen).

Reacción en cadena de la Polimerasa PCR:

Se disponen de métodos comerciales que están basados en el reconocimiento de ácidos nucleicos como son: (PCR) Foodproof® *Listeria monocytogenes* (Biotecon Diagnostics) y el ensayo de la PCR PROBELIATM (*L. monocytogenes*) (Sanofi Diagnostics).

La PCR es una técnica biotecnológica que permite la amplificación de un fragmento específico de DNA en la cual se obtienen múltiples copias de dicho fragmento mediante la duplicación sucesiva del mismo. (Figura 8). Su nombre lo debe a que la actividad de la enzima DNA polimerasa permite fabricar una cadena de DNA complementaria a otra ya existente. (Sislema, 2008)

Se desarrolla de manera habitual en tres etapas:

Desnaturalización de la doble cadena de DNA:

Consiste en la separación de las dos hebras que conforman el DNA por ruptura de los puentes de hidrógeno que unen una a la otra, esto se logra aumentando la temperatura a un nivel promedio de entre 94 a 95°C. De esta manera las dos hebras se tornan accesibles a los cebadores que se encuentran en el medio y que son críticos en los siguientes pasos.

Hibridación de los iniciadores a la zona 3' específica de cada una de las hebras:

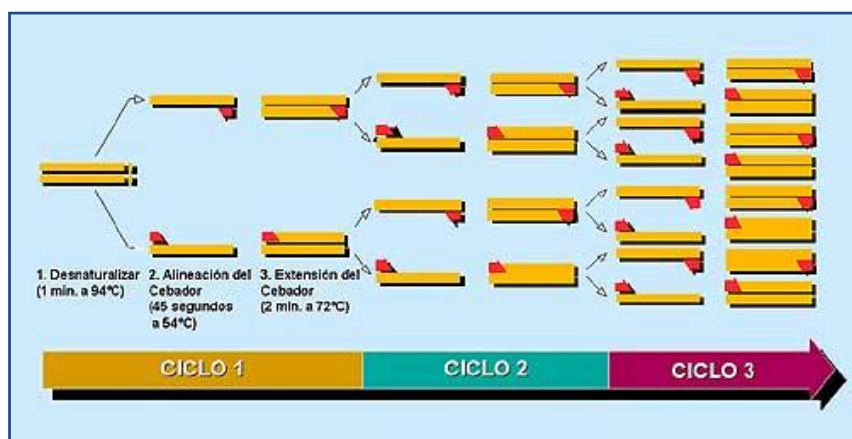
Conocido también como "Fase de Apareamiento" o de "Annealing", consiste en la unión de los primers o cebadores a sus secuencias complementarias en el extremo 3' de cada una de las dos hebras del DNA molde; para esto se necesita que la temperatura descienda hasta alcanzar ente 50 a 60°C.

Extensión del cebador por activación de la DNA polimerasa:

En esta fase se eleva nuevamente la temperatura a 72°C, condición necesaria para que la Taq Polimerasa alcance su máxima actividad. Partiendo del cebador la enzima "lee" la secuencia de cada hebra del DNA molde y va incorporando los nucleótidos complementarios correspondientes (dNTP) que progresivamente alargan el cebador obteniéndose una copia exacta de la molécula de DNA original (molde).

Cada proceso completo de desnaturalización, hibridación, extensión toma el nombre de ciclo en los que se duplicará el número de copias de la secuencia incrementándola exponencialmente.

Figura 8: Reacción en Cadena de la Polimerasa



Fuente: (Amgen, 2010)

Para llevar a cabo la PCR se requiere de un proceso de extracción y purificación de los ácidos nucleicos del microorganismo de la muestra, seguida de la amplificación de un segmento seleccionado del genoma y finalmente la detección de los fragmentos analizados (amplicones) por electroforesis en gel de agarosa y tinción con bromuro de etidio o mediante hibridación con sondas específicas.

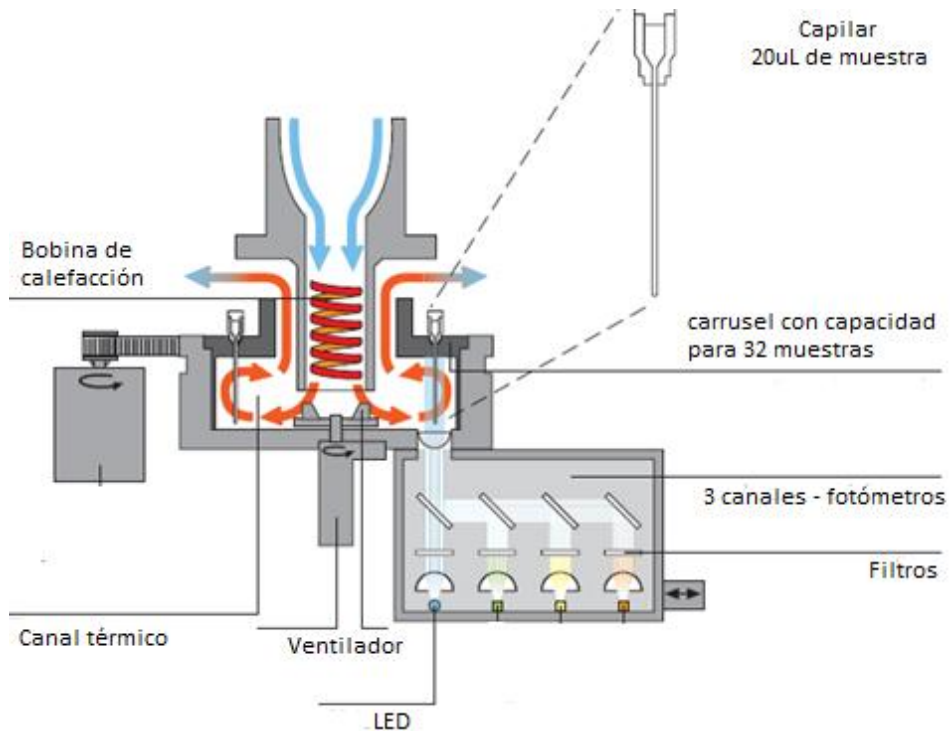
Se ha desarrollado la aplicación de la PCR en tiempo real como método de detección cuantitativo y específico para *Listeria monocytogenes* (Hough A.J., 2002) demostrando tener un buen potencial para ser utilizado en análisis de rutina ya que mediante el empleo de (primers) se identifican genes de virulencia o genes de una de las subunidades del ARN mensajero a partir de un caldo en el cual se ha conseguido enriquecimiento de la muestra del alimento analizado.

Los procesos de amplificación y detección se producen de manera simultánea en el mismo vial cerrado. Mediante la detección por fluorescencia se puede medir durante la amplificación la cantidad de ADN sintetizado en cada momento ya que la reacción es directamente proporcional. Los sistemas de detección de fluorescencia pueden ser de dos tipos: agentes intercalantes y sondas específicas marcadas con fluorocromos

Los termocicladores para llevar a cabo la PCR en tiempo real incorporan un lector de fluorescencia y una cámara térmica la cual asegura la circulación de aire eficiente y la homogenización de la temperatura durante los ciclos. Para la medición de

fluorescencia emitida por las muestras un motor gira paso a paso el carrusel de muestras dentro de la cámara térmica para observar la posición de la punta de los capilares precisamente en el punto focal de la óptica del fotómetro. Figura 9

Figura 9: Descripción del Sistema LightCycler 1.5



Fuente: (Roche Applied Science)

Tipificación:

La identificación reglamentaria de *Listeria monocytogenes* no exige ninguna tipificación específica de los aislados. Sin embargo, los esquemas de tipificación pueden ser de utilidad en las investigaciones epidemiológicas, en el seguimiento de los casos medioambientales y en la vigilancia de los casos de salud pública.

Listeria monocytogenes puede tipificarse mediante diferentes aproximaciones incluyendo el serotipado, el fagotipado, la electroforesis de enzimas multilocus (MEE), el análisis del ADN mediante enzimas de restricción (empleando enzimas con alta frecuencia de corte y electroforesis en gel convencional o utilizando enzimas con baja frecuencia de corte y electroforesis en gel de campo pulsado [PFGE] para separar los

fragmentos), tipificación basada en la secuencia de los ácidos nucleicos y la amplificación aleatoria del ADN polimórfico (RAPD).

2.2.13 Sensibilidad antibiótica

El patrón de sensibilidad a los antibióticos de *Listeria monocytogenes* ha permanecido relativamente estable con el paso de los años. Generalmente, este microorganismo es sensible a una amplia gama de antibióticos como penicilina, ampicilina, gentamicina, eritromicina, tetraciclinas, rifampicina, cotrimoxazol y vancomicina. Presentan una pobre actividad las fluorquinolonas actuales y las cefalosporinas, especialmente las de tercera y cuarta generación como cefotaxima y cefepima. Casi todas las cepas son resistentes a fosfomicina.

Se han descrito resistencias a macrólidos y a tetraciclinas en algunos aislamientos; suelen estar codificadas por plásmidos, aunque también hay casos de resistencia a tetraciclinas codificada por el cromosoma. La rifampicina tiene muy buena actividad in vitro pero se seleccionan con mucha facilidad cepas resistentes durante el tratamiento.

La mayor parte de los antibióticos se muestran bacteriostáticos frente a *Listeria monocytogenes*. En particular los β -lactámicos tienen un gran intervalo entre la CMI y la CMB. Solo se ha observado actividad bactericida en los aminoglucósidos, glucopéptidos y cotrimoxazol (principalmente asociada al trimetoprim)

A continuación se menciona las Normas para realizar las pruebas de sensibilidad a los antimicrobianos; decimosexto suplemento informativo (NCCLS, Enero 2006)

Información y criterios de interpretación para pruebas de sensibilidad por microdilución en caldo

Condiciones del estudio

Medio: Caldo Mueller Hinton y con ajuste de cationes y sangre lisada (2.5 ml al 5% v/v)

Inoculo: Suspensión directa de las colonias con turbidez equivalente al estándar 0.5 de McFarland

Incubación: 35 °C, en atmósfera normal durante 20 a 24 horas

Comentarios generales

Características de desarrollo en medios de rutina: frecuentemente fastidiosos; requieren medios suplementado con sangre para un crecimiento adecuado; atmósfera normal; 20 a 24 horas.

Información adicional:

Resistencia

Listeria monocytogenes presenta resistencia intrínseca a cefalosporinas

Razones para la realización o no del ensayo

No se ha descrito resistencia a ampicilina o penicilina. El ensayo debe ser limitado a sospecha de falla de tratamiento o a pacientes alérgicos a penicilina.

2.2.14 Tratamiento:

Al ser la listeriosis una enfermedad relativamente rara en humanos, no hay estudios prospectivos y controlados que establezcan el mejor tratamiento antibiótico.

Se han descrito fallos terapéuticos con penicilina, pero nunca se ha demostrado *in vitro* resistencia al compuesto β -lactámico utilizado. En el manejo de estas infecciones son de gran importancia el empleo de dosis altas y la duración adecuada del tratamiento, que deben individualizarse.

En las enfermedades graves como la cerebritis o la granulomatosis infantiséptica, el inicio precoz del tratamiento es fundamental para el control de la infección. Estudios *in vitro* han demostrado sinergia de ampicilina y penicilina con aminoglucósidos.

La combinación de trimetoprim y sulfametoxazol se ha utilizado con éxito en pacientes alérgicos a penicilinas, considerándose en la actualidad la terapia alternativa en esta circunstancia.

La duración apropiada del tratamiento tampoco está clara. Tras dos semanas de terapia se han descrito recurrencias en pacientes inmunodeprimidos. Parece conveniente, por tanto, prolongar la terapia entre tres y seis meses en estos casos. En general dos semanas parecen ser suficientes en bacteriemias mientras que en meningitis se deberían utilizar ciclos más largos.

CAPÍTULO III

MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Localización:

El muestreo fue realizado en tres mercados de la ciudad de Quito: Mayorista (Ver figuras: 10-11-12), San Roque e Iñaquito ubicados al Sur – Centro y Norte de la capital.

El Procesamiento primario y secundario de las muestras se realizó en los Laboratorios de Microbiología y Biología Molecular de la Escuela de Bioanálisis de la Pontificia Universidad Católica del Ecuador.

Figura 10: Mercado Mayorista 1



Fuente: Mena C.

Figura 11: Mercado Mayorista 2



Fuente: Mena C.

Figura 12: Mercado Mayorista 3



Fuente: Mena C.

3.2 Muestra:

3.2.1 Cálculo del tamaño de la muestra:

Se utilizó la fórmula en base a estimación de proporciones, la cual se explica a continuación:

$$n = pq \left(\frac{z(0,95)}{e} \right)^2$$

$$n = 0,15 \times 0,85 \left(\frac{1,96}{0,07} \right)^2$$

$$n = 99,96 = 100$$

Donde:

n = tamaño de la muestra

p = probabilidad (prevalencia bibliográfica)

q = 1- p = probabilidad de muestras sin *Listeria*

z = valor de la normal estadística al 0,95

e = error admisible

3.2.2 Recolección y transporte de las muestras:

Se recolectaron muestras de 100 yogures y 100 salchichas en los puestos de venta ya mencionados, entre el 6 de julio y el 4 de noviembre del 2009; tal cual las expenden los vendedores. Las muestras fueron transportadas en cadena de frío (4°C) a las instalaciones de la PUCE como se indica en las figuras 13 y 14 respectivamente, sin que transcurran más de cuatro horas desde el momento de su recolección y el inicio de su análisis.

Se tomaron 15 muestras semanales tanto de yogures como de salchichas en los días programados para el muestreo (Ver Anexo 1), las mismas fueron colocadas dentro de una bolsa estéril debidamente rotulada.

Figura 13: Transporte de las Muestras



Fuente: Mena C.

Figura 14: Recolección de las Muestras



Fuente: Mena C.

3.2.3 Identificación de las muestras:

Todas las muestras fueron cuidadosamente identificadas con la siguiente información: número de muestra, fecha, hora de muestreo, datos informativos del establecimiento al que pertenece y características organolépticas del alimento, entre otras observaciones pertinentes (Ver Anexo 2).

Para la rotulación se utilizó un sistema de códigos con el siguiente orden: Iniciales del alimento, iniciales del mercado, número. Así por ejemplo: YSR001 (Yogurt – San Roque – muestra número 1; SM100 (Salchicha – Mayorista – muestra número 100).

3.3 Procesamiento de las muestras:

Las bacterias del género *Listeria* spp. pueden estar presentes en pequeñas cantidades y a menudo acompañadas por bacterias de otros géneros en los alimentos; por tanto el pre-enriquecimiento y el enriquecimiento selectivo es necesario, como también lo es para evidenciar bacterias injuriadas. Dichos procesos se realizaron conforme a lo establecido en la norma (ISO 11290, 2004)

Materiales

- Tubos de tapa rosca de 15 mL
- Matraces Erlenmeyer de 500 mL
- Frascos plásticos estériles

Reactivos

- Medio base para el caldo de Fraser
- Suplemento para el caldo de Fraser

Equipos

- Balanza analítica
- Incubadora a 30°C
- Incubadora a 37°C

3.3.1 Pre-enriquecimiento – enriquecimiento de las muestras:

El procedimiento para llevar a cabo el pre-enriquecimiento y enriquecimiento es el siguiente:

- Homogenizar las muestras: sólidas empleando una licuadora, mientras que para muestras líquidas se requiere agitación rotatoria.
- Pesar 25 g o medir 25 mL de la muestra, bajo condiciones de asepsia e inocularlos en 225 mL del caldo medio de Fraser (Difco™ USA)
- Llevar a incubar a 30 grados centígrados por 24 horas +/-3 horas.
- Inocular 0.1 mL de este crecimiento en 9.9 mL del caldo de Fraser.
- Incubar a 37 grados centígrados por 24 horas +/- 3 horas.

En la figura 15 se observa el proceso de homogenización en caso de muestras sólidas y pasos posteriores después de la incubación.

Figura 15: Procesamiento de las muestras

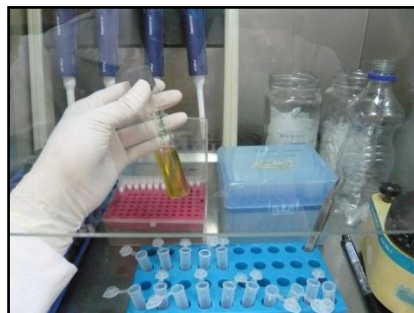


Fuente: Mena C.

3.4 Identificación molecular de *Listeria monocytogenes*

A partir del crecimiento en el caldo Medio de Fraser inoculado con las muestras, se tomó la alícuota correspondiente para realizar la extracción de ADN bacteriano por ebullición y su posterior análisis, mediante Reacción en Cadena de la Polimerasa en tiempo real (qPCR) con SYBR Green I, como se observa en la Figura 16.

Figura 16: Fase Molecular



Fuente: Mena C.

3.4.1 Extracción por ebullición:

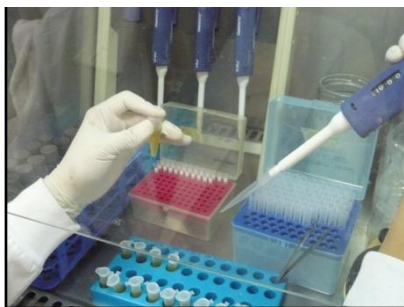
Para probar que la técnica de extracción por ebullición funciona de manera adecuada, fue necesario realizar ensayos previos que aseguren la eficiencia del ensayo (Ver Anexo 3), por tanto se trabajó con cepas control (ATCC) y cepas donadas por el Dr. Knabel (cepa R250) del estudio “*Multiplex PCR for simultaneous detection of bacteria of the genus Listeria, Listeria monocytogenes, and major serotypes and epidemic clones of L. monocytogenes*” (Knabel & Chen, October 2007)

Una vez comprobada tal funcionalidad se siguió con pasos posteriores.

El procedimiento fue el siguiente:

- Centrifugar un mililitro de crecimiento bacteriano en medio líquido (caldo Fraser) a 10000 rpm por cinco minutos. (Figura 17, 18, 19) y decantar el sobrenadante.
- Resuspender el sedimento en solución estéril de cloruro de sodio al 0.85%.
- Centrifugar nuevamente a 10000 g durante cinco minutos.
- Resuspender el sedimento en 100 μ L de buffer TE 1x.
- Incubar en el termobloque a 95°C durante 25 min
- Centrifugar a 10000g durante tres minutos.
- Recoger el sobrenadante que contiene el DNA.
- Guardar cuidadosamente el producto de la extracción en viales de 1mL.
- Almacenar a - 20°C hasta el momento de la amplificación.

Figura 17: Extracción de ADN bacteriano



Fuente: Mena C.

Figura 18: Centrifugación



Fuente: Mena C.

Figura 19: Termobloque



Fuente: Mena C.

3.4.2 Determinación de la calidad de ADN extraído de las muestras:

Se analizó la calidad de ADN extraído por ebullición de 22 muestras escogidas al azar. La evaluación de dicho parámetro garantiza el éxito de cualquier determinación posterior.

Para ello fue necesario: agua MilliQ, DNA a evaluar, espectrofotómetro UV marca Perkin Elmer, modelo Lambda 25UV/VIS con lámpara generadora de luz con longitudes de onda de 260 y 280 nm, pipetas automáticas, tubos de ensayo de cuatro mililitros estériles, cubetas de cuarzo y cabina de bioseguridad.

Procedimiento:

- Encender el espectrofotómetro con el programa de lectura de las longitudes de onda de 260 y 280 nm (Ejemplo de programa: HP2) cuatro horas antes de realizar las lecturas de absorbancia.
- Pipetear 3mL de agua MilliQ en los tubos de ensayo según el número de muestras que se vayan analizar; recordar: el pipetear dos tubos extra para los blancos en el equipo.
- Añadir 5µL de las respectivas muestras de DNA en los tubos ya identificados.
- Pipetear en los tubos que corresponden a los blancos 5 de agua MilliQ.
- Leer las absorbancias de cada una de las muestras frente al blanco (agua MilliQ) conforme las especificaciones del equipo empleando cubetas de cuarzo.
- Una unidad a A260 es igual a 50ng de ADN por ml de muestra.
- Para saber la calidad de ADN se debe dividir el valor obtenido a 260nm para el valor obtenido a 280nm, el valor que resulta esta división denota la calidad del

ADN. Un valor de 1.5 es considerado de muy buena calidad , pero se aceptan valores dentro del rango de 1,3 a 2,0 (Surzycki, 2000)

3.4.3 Reacción en Cadena de la Polimerasa en Tiempo Real (qPCR)

Para la detección de *Listeria monocytogenes* se amplificó un fragmento de 106 pb del gen *hly* empleando los primers *hly* – F (5'-GGGAAATCTGTCTCAGGTGATGT-3') y el *hly* – R (5'-CGATGATTTGAACTTCATCTTTTGC-3') sintetizados por Invitrogen (São Paulo, Brasil). (Guilbaud, 2005) (Hough, 2002.)

Para la amplificación se empleó LightCycler® FastStart DNA MasterPLUS SYBR Green I, el cual es un fluorocromo que aumenta notablemente la emisión de fluorescencia cuando se une a ADN de doble hélice. La DNA Taq polimerasa FastStart es una forma químicamente modificada de la enzima Taq DNA polimerasa termoestable recombinante que no muestra ninguna actividad bajo los 75°C; siendo activa solamente a altas temperaturas lo que evita hibridaciones inespecíficas de los primers a 95°C por 10 minutos que corresponde a la temperatura de activación de la enzima.

La PCR en tiempo real fue realizada en el termociclador LighCycler® 1.5 (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany).

3.4.3.1 Procedimiento

a) Preparación del Master Mix

IMPORTANTE: No tocar la superficie de los capilares; al manipular emplear guantes.

- Descongelar un vial “Reaction mix” (vial 1b de tapa verde).
- Rápidamente centrifugar un vial “Enzyme” (vial 1a de tapa blanca) y el vial descongelado “Reaction mix” colocar los viales en la placa de enfriamiento.
- Pipetear 14 µL del vial 1a en el vial 1b
- Homogeneizar la mezcla con una pipeta

- Etiquetar correctamente.
- Almacenar en bloques de hielo hasta su utilización.

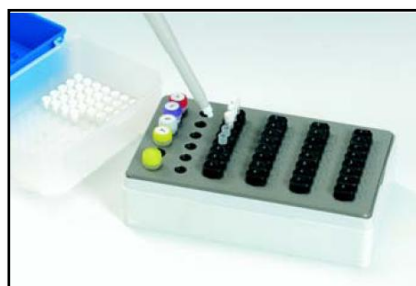
b) Preparación del PCR mix

- Dependiendo del total del número de reacciones, colocar el número requerido de capilares pre enfriados en el adaptador de centrifuga.
- Preparar una solución 10 μM de cada uno de los primers a partir de la solución 100 μM de cada primer.
- En un tubo de reacción de 1.5 mL mantenido en la placa de enfriamiento; preparar la PCR mix por cada 20 μL de reacción; añadiendo los siguientes elementos en el orden mostrado:

Reactivo	Concentración Inicial	Volumen 1X (μL)	Concentración final	Volumen X 18
Master Mix	5X	4	1X	72 μL
Agua BM		9		162
Primer F	10 μM	1	0,5 μM	18 μL
Primer R	10 μM	1	0,5 μM	18 μL
ADN		5		5 μL
		Final: 20 μL		

- Mezclar cuidadosamente pipeteando hacia arriba y hacia abajo.
- Pipetear 15 μL del PCR mix en cada capilar pre enfriado en el adaptador Light Cycler Capilar y añada 5 μL de la muestra de DNA extraído.
- Tape cada capilar con ayuda del LightCycler Capping tool. (Figura 20)

Figura 20: Preparación PCR mix



Fuente: Roche Diagnostics

- Colocar los capilares junto con sus adaptadores dentro de la microcentrífuga.
- Centrifugar a 3,000 rpm por 5 segundos
- Colocar los capilares en el carrusel en posición vertical. (Figura 21 y 22)

Figura 21: Capilares



Fuente: Mena C.

Figura 22: Ligth cycler 1.5 Roche



Fuente: Mena C.

- Amplificar según el programa: pre – calentamiento a 95°C por 10 minutos seguido de 45 ciclos de 10 segundos a 95°C, 5 segundos a 63°C y finalmente 5 segundos a 72°C; el paso final consistió en el incremento de 0.1°C/segundo de forma continua de 65°C a 95°C con el fin de establecer la temperatura de fusión (T_m). Los resultados de la amplificación y de la T_m fueron visualizados y analizados en el LightCycler Software Versión 4.05 (Roche Instrument Center, Switzerland).

3.4.3.2 Elaboración de curva estándar

Con el propósito de evaluar la capacidad de detección del material genético de *Listeria monocytogenes* y la linealidad de la PCR en tiempo real se realizó una curva de calibración con la cepa de *Listeria monocytogenes* ATCC 19112

- Para la elaboración de dicha curva estándar se utilizaron controles externos con concentraciones conocidas y crecientes de ADN diana extraídos previamente por la técnica de ebullición. Desde 10^{-1} hasta 10^{-6}
- Se siguió el mismo procedimiento de amplificación descrito en el apartado anterior. (Ver Anexo 6)
- Una vez definidas las curvas de amplificación y temperatura de fusión T_m , se procedió a la recolección de las muestras para su posterior análisis

3.4.3.3 Purificación de los productos de PCR para secuenciación

Los productos de 106pb del gen *hly* amplificados por PCR en tiempo real fueron purificados y concentrados con QIAquick PCR Purification Kit siguiendo las instrucciones del fabricante para lo cual se resuspendió el producto en un volumen final de 20uL.

Los productos purificados fueron ensamblados en microplacas, un volumen de 20,0 uL por muestra y 15,0 uL de cada primer. Las placas fueron enviadas a través de Fedex para su secuenciamiento en Macrogen (EEUU). Se enviaron a secuenciar tres muestras escogidas al azar.

Los resultados de secuenciamiento fueron enviados por Macrogen vía e-mail en formato FASTA, Adobe Acrobat.

3.5 Análisis estadístico

Los datos obtenidos fueron examinados en la hoja de cálculo del programa informático Excel del Sistema Operativo Windows.

CAPITULO IV

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En esta tesis se realizó un ensayo de PCR en tiempo real, la cual permitió la detección e identificación simultánea del género *Listeria* y de la especie *monocytogenes*, en salchichas y yogures en tres mercados de la ciudad de Quito, incluyó un período de enriquecimiento en caldo medio de Fraser con el cual se concentró el número de bacterias en la muestra de alimento y un protocolo de extracción de ADN por ebullición que demostró mayor eficiencia en la lisis celular y logró la detección rápida del microorganismo.

No se ensayó la detección directa por qPCR a partir del alimento mismo, debido a que la naturaleza sólida de las muestras hace más difícil la manipulación, generando un homogenizado viscoso con muchos restos de alimento, difíciles de retirar. (Duffy G, 1999) (Golsteyn, 1991). Es por esto que un período de enriquecimiento previo, fue necesario para minimizar los factores limitantes y por tanto optimizar el rendimiento en las fases posteriores.

Extracción de ADN de *Listeria monocytogenes*:

Aunque varios métodos para extracción de ADN han sido reportados, el método de extracción por ebullición usado en este estudio fue igual de efectivo que métodos enzimáticos como el de lisozima y proteinasa K (Torres K, 2004) Ver Anexo 3 y 4

Al comparar la concentración de ADN extraído por ebullición, frente a la extraída con DNAzol, se demostró que la técnica de ebullición fue superior ya que se obtuvo mayor cantidad de ADN. Ver Anexo 3 y 5

Las muestras de ADN extraídas por ebullición y medidas por espectrofotometría para determinar su calidad, presentaron una proporción de A260/A280 promedio de 1,42. Siendo el valor máximo de 2,80 y el mínimo de 0,84. Dichos valores indican un ADN de buena calidad y relativamente puro.

Esto nos indica que el método modificado de lisis por ebullición a 95°C utilizado en este estudio y descrito por (Oravcová, 2008.) garantiza la hidrólisis del peptidoglucano de la pared celular de *Listeria monocytogenes* consiguiendo la liberación del DNA del microorganismo previamente concentrado en buffer TE 1x que mantiene la estabilidad del material genético.

Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (qPCR)

Después de realizar PCR convencional (Ver Anexo 3) confirmando que la extracción de ADN fue efectiva y el ADN obtenido de buena calidad permitiendo la amplificación del gen *hly*, se evaluó las mismas muestras en PCR en tiempo real con el fin de determinar la detección del material genético de *Listeria monocytogenes* y la linealidad de la qPCR por medio de la elaboración de una Curva Estándar de Amplificación. Con las concentraciones previamente conocidas de los controles externos y sus Crossing point (Cp) correspondientes se estableció una curva patrón. (Ver Tabla 9)

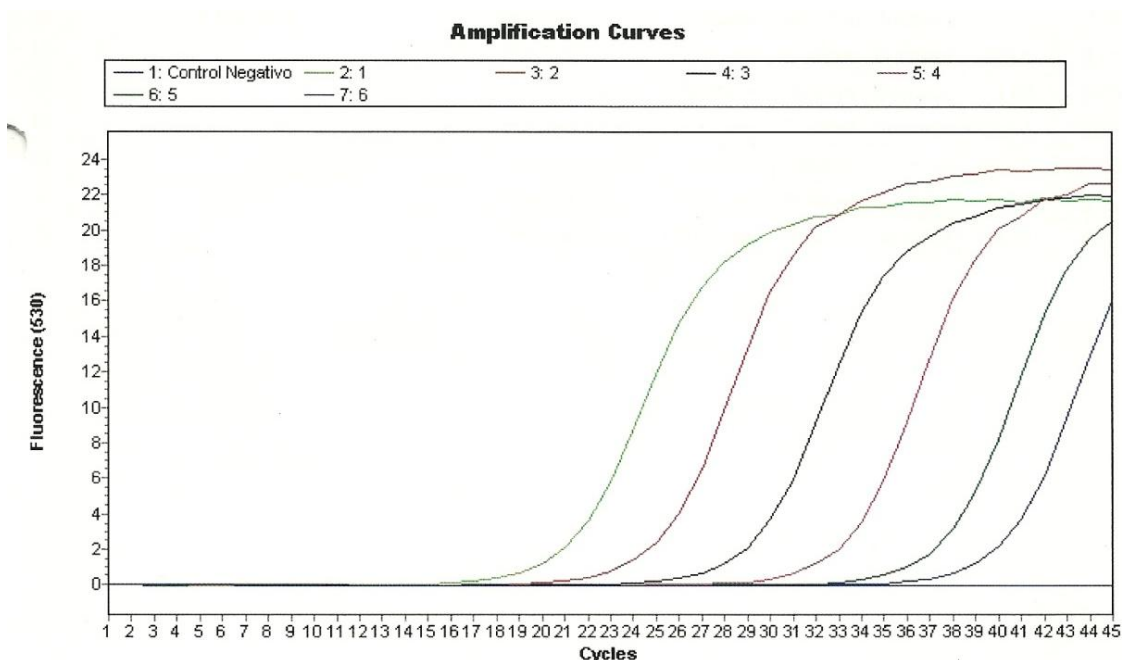
Tabla 9: Datos de la curva de calibración para el gen *hly* de la cepa de *L. monocytogenes* ATCC 19112

Inc	Pos	Name	Type	CP	Conc	Std	Comb	Calls Target	Control
<input checked="" type="checkbox"/>	1	Control Negativo	Negative Control				Success	Negative	Success
<input checked="" type="checkbox"/>	2	1	Standard	20.06	9.66E-2	1.00E-1	Success	Positive	Success
<input checked="" type="checkbox"/>	3	2	Standard	23.99	1.03E-2	1.00E-2	Success	Positive	Success
<input checked="" type="checkbox"/>	4	3	Standard	28.02	1.04E-3	1.00E-3	Success	Positive	Success
<input checked="" type="checkbox"/>	5	4	Standard	32.20	9.65E-5	1.00E-4	Success	Positive	Success
<input checked="" type="checkbox"/>	6	5	Standard	36.26	1.00E-5	1.00E-5	Success	Positive	Success
<input checked="" type="checkbox"/>	7	6	Standard	>40.00	1.34E-6	1.00E-6	Success	Positive	Success

Fuente: Mena, C.

Para cada muestra el programa informático calcula el número de ciclo en el que el lector empieza a detectar un incremento de fluorescencia significativo, con respecto a la señal de base. El ciclo en el que se empieza a detectar el aumento de fluorescencia se denomina punto de corte (Cp o crossing point) o ciclo umbral (Ct, o threshold cycle). El Ct depende de la concentración inicial de DNA de la muestra. Una muestra con una baja concentración inicial de DNA blanco requiere más ciclos de amplificación. Una muestra con gran concentración requiere en cambio de menos ciclos. (Ver Figura 23)

Figura 23: Curva Estándar de Amplificación qPCR



Fuente: Mena, C.

Así se obtuvo que diluciones de 10^{-1} a 10^{-6} presentaron un C_p de 20 hasta 36.26 con concentraciones comprendidas entre 9.66×10^2 a 1×10^5 ng/ μ L. (Error: 0.00615; Eficiencia: 1.767)

Análisis de curvas de disociación:

Se basa en la aplicación de un gradiente de temperaturas creciente después de la PCR para monitorizar la cinética de disociación de los fragmentos amplificados. Mediante este proceso se puede determinar la temperatura de fusión (T_m) de los amplicones para comprobar su especificidad.

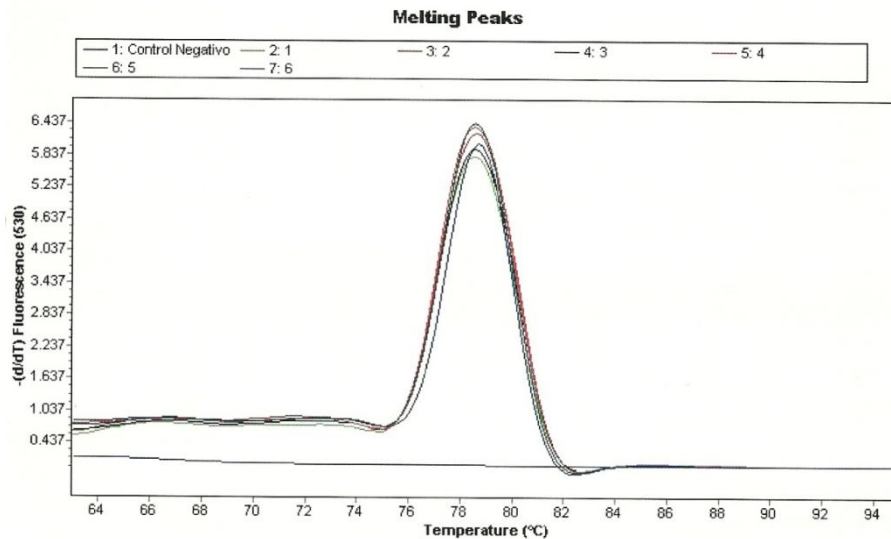
Una vez que se produjo la amplificación del material genético, se analizó el valor de la T_m , cuyo valor en el presente estudio fue entre 78.05°C y 79.86°C (Ver Tabla 10 y Figura 24). De este modo el análisis de la curva de fusión post-amplificación puede usarse para diferenciar organismos estrechamente relacionados.

Tabla 10: Datos de Tm para el gen *hly* de la cepa de *L. monocytogenes* ATCC 19112

Results				Peak 1			
Inc	Pos	Sample Name	Tm	Area	Wide	High	
<input checked="" type="checkbox"/>	1	Control Negativo					
<input checked="" type="checkbox"/>	2	1	78.47	18.95	2.90	6.10	
<input checked="" type="checkbox"/>	3	2	78.68	21.06	2.85	6.66	
<input checked="" type="checkbox"/>	4	3	78.67	20.01	2.85	6.32	
<input checked="" type="checkbox"/>	5	4	78.64	21.32	2.90	6.75	
<input checked="" type="checkbox"/>	6	5	78.66	20.09	3.04	6.77	
<input checked="" type="checkbox"/>	7	6	78.80	16.61	3.52	6.46	

Fuente: Mena, C.

Figura 24: Temperatura de fusión



Fuente: Mena, C.

La demostración de la temperatura de fusión adecuada fue indispensable para confirmar que la identificación es correcta, en lugar de obtener resultados erróneos de un organismo relacionado desde el punto de vista taxonómico.

Análisis Estadístico

Muestra de Salchichas:

De un total de 100 muestras de Salchichas recolectadas: 9 fueron positivas por la técnica molecular: Reacción en Cadena de la Polimerasa en Tiempo Real, con

concentraciones comprendidas entre 1.32×10^4 y 6.74×10^6 con ciclos de entre 28.75 a 38.07 y un T_m promedio de 78.47 (Tabla 11)

Tabla 11: Muestras de Salchichas Positivas por qPCR

Muestra	CP	Concentración	T_m	Mercado
SM009	32.48	1.18×10^5	79.59	Mayorista
SSR012	28.75	9.87×10^5	79.79	San Roque
SSR026	30.06	1.32×10^4	79.86	San Roque
SM031	33.49	1.89×10^5	77.93	Mayorista
SM032	38.07	1.52×10^6	77.96	Mayorista
SM037	35.06	6.74×10^6	77.91	Mayorista
SSR040	36.2	3.59×10^6	77.81	San Roque
SI043	35.93	4.17×10^6	77.8	Iñaquito
SM061	34.73	2.35×10^5	77.82	Mayorista

CP: Crossing Point, T_m : Melting Temperature

Muestra de Yogures:

De un total de 100 muestras de Yogures recolectados: 4 fueron positivos por la técnica molecular: Reacción en Cadena de la Polimerasa en Tiempo Real, con concentraciones comprendidas entre 1.65×10^6 y 6.37×10^6 con ciclos de entre 33.73 a 37.52 y un T_m promedio de 77.9 (Tabla 12)

Tabla 12: Muestras de Yogures Positivas por qPCR

Muestra	CP	Concentración	T_m	Mercado
YSR021	35.44	6.37×10^6	77.92	San Roque
YM031	37.21	2.42×10^6	78.07	Mayorista
YM032	33.73	1.65×10^5	78.05	Mayorista
YI037	37.52	1.76×10^6	77.89	Iñaquito

CP: Crossing Point, T_m : Melting Temperature

Prevalencia por producto:

La prevalencia general de contaminación con *Listeria monocytogenes* por tipo de producto estudiado se presenta en la siguiente tabla:

Tabla 13: Prevalencia por tipo de producto		
PRODUCTO	PREVALENCIA %	(IC95%)
Salchichas	9	4.46 – 16.83
Yogures	4	1.29 – 10.51

Se estableció entonces que bajo las condiciones de este estudio la prevalencia de *Listeria monocytogenes* en Salchichas es del 9.0% mientras que para Yogures es del 4.0%

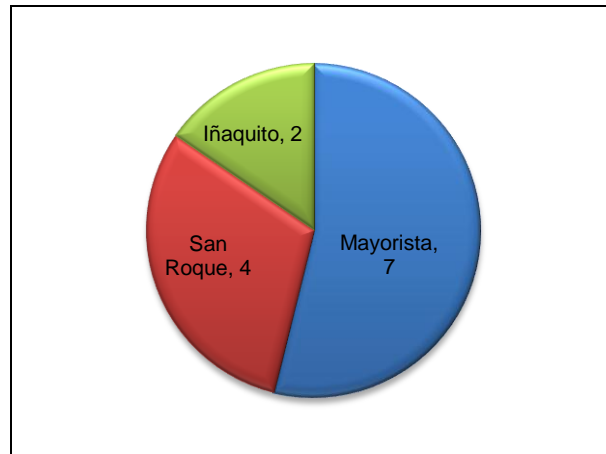
Los resultados obtenidos permitieron evidenciar que la prevalencia es baja en comparación a otros alimentos estudiados en países de Latino América (Hofer, 2006) lo cual podría correlacionarse con el bajo número de casos de listeriosis en pacientes de tres hospitales de la ciudad de Quito con un total de 9 aislamientos entre marzo del 2007 y marzo del 2009.

Datos similares se encontraron en la Clínica Alemana de Santiago de Chile donde se registran entre uno y tres casos de listeriosis al año, principalmente en pacientes inmunodeprimidos por enfermedades oncológicas. (Noriega, 2008)

Prevalencia por mercado:

Al estudiar 100 muestras de salchichas y 100 muestras de yogures recolectados en forma aleatoria en tres mercados de la ciudad de Quito. La distribución por mercado de las muestras que fueron positivas para *Listeria monocytogenes* se presenta en la figura 25.

Figura 25: Distribución de *Listeria monocytogenes* por mercados



Fuente: Mena C.

La mayoría de muestras positivas para *Listeria monocytogenes* en productos lácteos y embutidos se encuentra en el Mercado Mayorista; tal resultado podría estar relacionado con un mal manejo global de la cadena alimenticia o con un cambio de costumbres, de estilo de alimentación, como el consumo cada vez más frecuente de comida rápida o de alimentos que se dejan varios días en refrigeración, en los que pueden proliferar las colonias si están contaminados.

La prevalencia general de contaminación con *Listeria monocytogenes* por tipo de producto y mercado estudiado se presenta en la siguiente tabla

Mercado	Producto	Aislamientos	Prevalencia	IC 95%
Mayorista	Salchichas	5	9,8%	4,38 – 19,83
	Yogures	2		
San Roque	Salchichas	3	6,06%	1,95 – 15,56
	Yogures	1		
Iñaquito	Salchichas	1	3,17%	0,55 – 11,98
	Yogures	1		

Se estableció entonces que bajo las condiciones de este estudio la prevalencia de *Listeria monocytogenes* en productos lácteos y embutidos para el Mercado Mayorista es del 9,8%, Mercado San Roque es del 6,06% e Iñaquito con el 3,03%

Comparación qPCR vs Cultivo:

Para comparar la prevalencia de *Listeria monocytogenes* en productos lácteos y embutidos, obtenida con la técnica qPCR SYBR-Green I frente a la encontrada mediante la técnica convencional por cultivo, se tomaron los datos reportados en el proyecto de la PUCE (Gudiño, 2010), mismo que fue realizado paralelamente a este estudio.

Al analizar el desempeño de la qPCR frente al cultivo para *Listeria monocytogenes*, los hallazgos para muestras de salchichas y yogures se observan en la tabla 15 y 16

Tabla 15: Resultados de la qPCR en tiempo real y del cultivo para Salchichas

		CULTIVO		Σ
		(+)	(-)	
qPCR	(+)	4	5	9
	(-)	2	89	91
	Σ	6	94	100

Sensibilidad de la qPCR = 66.60%

Especificidad de la qPCR = 94.60%

Valor predictivo positivo qPCR = 44.40%

Valor predictivo negativo qPCR = 97.80%

La alta especificidad de la qPCR en tiempo real para éste tipo de alimentos, permite asegurarnos que el análisis de un alimento con resultado negativo, en verdad es negativo; el 94.60% de las muestras analizadas por PCR en tiempo real resultaron efectivamente no contaminadas con éste microorganismo.

La alta especificidad diagnóstica en las plantas procesadoras de salchichas podría asegurar de forma rápida la ausencia de la bacteria durante las fases de elaboración, distribución y expendio del producto.

Sin embargo la baja sensibilidad de la prueba puede ser debido a que la PCR de alimentos, puede verse limitada por la presencia de inhibidores de la reacción, ácidos nucleicos de otras bacterias, baja carga microbiana, etc por tanto sería importante que en estudios posteriores se utilicen kits comerciales que incorporen detectores de inhibición y permitan deshacerse de los mismos, para lograr un extracto puro.

El encontrar microorganismos viables en embutidos, sugiere que en estos alimentos no se toman las medidas adecuadas de limpieza y control durante su elaboración o durante el almacenamiento y distribución del producto. Esto fue posible evidenciar por ejemplo, al momento de adquirir los embutidos en cada uno de los mercados, ya que las personas que los manipulan no portaban ni mascarilla ni guantes al momento del expendio del producto. Además de que tales alimentos no se mantienen a temperatura de refrigeración (2°C – 8°C), sino a temperatura ambiente.

Tabla 16: Resultados de la PCR en tiempo real y del cultivo para Yogures

		CULTIVO		Σ
		(+)	(-)	
qPCR	(+)	0	4	4
	(-)	0	96	96
	Σ	0	100	100

Sensibilidad de la qPCR = NC (No Calculable por cuanto no se obtuvieron resultados positivos por Cultivo)

Especificidad de la qPCR = 96.00%

Valor predictivo negativo = 100.00%

Al no existir ningún cultivo positivo en muestras de Yogures, no se puede determinar la sensibilidad y el valor predictivo positivo de la PCR en tiempo real.

Al igual que en el caso de las salchichas, el método de diagnóstico basado en la identificación genética presentó porcentajes altos de especificidad y de valor predictivo negativo 96.00% y 100.00%.

Por el contrario, en los yogures al no encontrar microorganismo viables, nos permite pensar que las empresas encargadas de la producción de los yogures analizados mantienen programas apropiados de Análisis de Riesgos y de Puntos Críticos de Control, demostrando el cumplimiento adecuado en las buenas prácticas de manufactura. Sin embargo, el hallazgo de 4 muestras positivas por PCR en tiempo real, revela que los malos procesos de ordeño, contaminación cruzada, higienización pobre, inadecuada pasteurización, contaminación post-proceso y/o salud deficiente del ganado son las potenciales fuentes de la contaminación de la materia prima con este microorganismo. Muchas de las bacterias que pueden estar presentes en la leche mueren cuando ésta es sometida a procesos de pasteurización; éste proceso térmico garantiza la no presencia de patógenos en el producto procesado o a su vez pueden intervenir bacteriocinas por parte de las bacterias ácido lácticas presentes en estos alimentos.

Aunque la detección de células muertas o lesionadas es una desventaja inherente de los sistemas basados en la amplificación de ADN, así como la PCR esta tecnología puede ser valiosa para estimar el nivel de contaminación durante el proceso de alimentos, debido a que los resultados son más precisos con respecto a la identificación y cuantificación de patógenos.

Purificación de los Productos de PCR para Secuenciación

El resultado de la secuenciación de las muestras, fue positivo para *Listeria monocytogenes*, al analizar con la Base de Datos Blast (Basic Local Alignment Search Tool) ya que presentó 100% de homología para el gen *hly* que codifica para listeriolisina O. (Anexo 5)

Los cebadores *hly-F* y *hly-R* utilizados en el ensayo de qPCR demostraron su alta afinidad por la secuencia blanco correcta al permitir la detección del gen *hly* de 106pb

que codifica para listeriolosina O, de *Listeria monocytogenes* tal como fue probado con la cepa ATCC Este hallazgo es importante en los casos de que existiera asociación con otras especies de *Listeria* y con otros géneros bacterianos.

CAPITULO V

CONCLUSIONES

La prevalencia de *Listeria monocytogenes* en productos lácteos y embutidos en tres mercados de la ciudad de Quito, utilizando la técnica molecular de la Reacción en Cadena de la Polimerasa en Tiempo Real con Syber Green I, es: en Salchichas 9.0% mientras que para Yogures es de 4.0%.

La prevalencia de *Listeria monocytogenes* en productos lácteos y embutidos, utilizando la técnica molecular de la Reacción en Cadena de la Polimerasa en Tiempo Real con Syber Green I, es: en el Mercado Mayorista del 9,8%, Mercado San Roque del 6,06% e Iñaquito con el 3,03%

El período de enriquecimiento en caldo medio de Fraser concentró el número de bacterias en la muestra de alimento y el protocolo de extracción de ADN por ebullición demostró mayor eficiencia en la lisis celular al lograr la detección rápida de *Listeria monocytogenes*.

La técnica molecular presentó linealidad para concentraciones de ADN comprendidas entre 9.66×10^2 a 1×10^5 ng/ μ L con valores de CP entre 20.06 y 36.26 (Error: 0.00615; Eficiencia: 1.767)

La concentración del amplicón de 106 pares de bases del gen *hly* de *L. monocytogenes* de las muestras analizadas fue de entre 1.32×10^4 ng/ μ L y 6.74×10^6 ng/ μ L a partir de las muestras de salchichas; y de 1.65×10^5 ng/ μ L y 2.42×10^6 ng/ μ L para las muestras de yogures.

La técnica de PCR en tiempo real, demostró en salchichas una sensibilidad de 66.6 %, especificidad de 94,6%, valor predictivo positivo de 44.4 % y un valor predictivo negativo de 97.8%.

La técnica de PCR en tiempo real, demostró en yogures una especificidad de 96%, valor predictivo negativo de 100%.

La técnica molecular PCR en Tiempo Real para productos lácteos y embutidos permitió cuantificar la concentración inicial de ácido nucleico presente en las muestras de manera mucho más sencilla, más rápida y en un mayor rango que en el método microbiológico convencional.

RECOMENDACIONES

La técnica molecular PCR en Tiempo Real se podría utilizar como alternativa complementaria al cultivo para la detección de *Listeria monocytogenes* ya que permitió monitorear la seguridad de productos alimenticios como embutidos y lácteos en tan sólo 72 horas y 40 minutos, acortando con ello el diagnóstico de distintos microorganismo; además de que permite incrementar el número de muestras examinadas en la industria para optimizar el proceso de inspección y seguridad alimentaria.

BIBLIOGRAFÍA

Abram M, D. M. (1997). Primary *Listeria monocytogenes* Infection in Gestating Mice. *Folia Microbiol* , 42: 65-71. .

AFNOR, A. F. (2000). Microbiologie des aliments. Méthode de dénombrement de *Listeria monocytogenes*. Méthode de Routine. *Normalisation Française XP V 08-062*.

Almeida, C. S. (1996.). Contaminación microbiana de los alimentos vendidos en la vía pública. *Organización Panamericana de la Salud* . , 52.

Altekruse, S., Hyman, E., & Klontz, K. (1994). Foodborne bacterial infections in individual with the human immunodeficiency virus. *South Med* , 87:169- 173.

Amgen. (2010). *PCR en Tiempo Real Introduccion*. Recuperado el 26 de Octubre de 2010, de Amgen España: <http://biotec.amgen.es/html/reaccion.html>

AOAC OFFICIAL METHOD. (2000). *Listeria monocytogenes* in Milk and Dairy Products. Selective Enrichment and Isolation Method Official Methods of Analysis of AOAC INTERNATIONAL. *Official Methods of Analysis of AOAC INTERNATIONAL* , I, 138-141.

Aureli P, G. C. (2000). An outbreak of febrile gastroenteritis associated with corn contaminated by *Listeria monocytogenes*. *N Engl J Med* , 342:1236–1241.

Baylis, C. (2000). The Catalogue of Rapid Microbiological Methods,. *Campden & Chorleywood Food Research Association, Chipping Campden, Gloucestershire* , .

Beumer R R, H. V. (2003). *Listeria monocytogenes*: Diagnostic Problems. *FEMS Immunology and Medical Microbiology* , 35: 191 - 197.

Bhagwat, A. (2003). Simultaneous detection of *Escherichia coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes* and *Salmonella* strains by real-time PCR . *International Journal of Food Microbiology* , 84(2):217-224.

Blenden D C, E. H.-A. (1987). Listeriosis. *J Am Vet Med Assoc* , 191:1546–1551.

Boerlin, P., Rocourt, J., & Piffaretti, J.-C. (1991). Taxonomy of the genus *Listeria* by using multilocus enzyme electrophoresis. *Int J Syst Bacteriol* , 41:59-64.

Braun L, D. P. (1997). InlB: an invasion protein of *Listeria monocytogenes* with a novel type of surface association. . *Mol Microbiol* , 25: 285-94.

Callejo R, P. M. (2008). Manual de Procedimientos: Aislamiento, identificación y caracterización de *Listeria monocytogenes*. *WHO Global Salm Surv* , 3.

Chakraborty, T. H. (2000). Genome organization and the evolution of the virulence gene locus in *Listeria* species. *Int J Med Microbiol* , 290: 167-74.

Chen, Y., & Kanabel, S. (2007). Multiplex PCR for Simultaneous Detection of Bacteria for the Genus *Listeria*, *Listeria monocytogenes*, and Major Serotypes and Epidemic Clones of *L. monocytogenes*. *Applied and Environmental Microbiology* , 6299 –6304.

Codex Alimentarius, F. (2003). Recommended International Code of Practice General Principles of Food Hygiene. *Basics Texts Food Hygiene CAC/RCP 1-1969* , 4(3):1.

Conlan J W, N. R. (1992). Early Pathogenesis of Infection in the Liver with the Facultative Intracellular Bacteria *Listeria monocytogenes*, *Francisella tularensis* and *Salmonella Typhimurium* Involves Lysis of Infected Hepatocytes by Leukocytes. . *Infec Immun* , 60: 5164-5171. .

Córdoba, M. (2004). Validación de PCR para detección de *Listeria monocytogenes* en carnes crudas de res y pollo. *Revista Argentina* , 9:(2)414-427.

Córdoba, M. (2004). Validación de PCR para detección de *Listeria monocytogenes* en carnes crudas de res y pollo. *Revista Argentina* , 9:(2)414-427.

Correa, W. &. (1992). Listeriosis. *Enfermedades Infecciosas de Mamíferos Domésticos* , 367-373.

Cousens L P, W. E. (2000). Innate Defenses in the Liver During *Listeria* Infection. *Inmunol Rev* , 174: 150-159.

Dalton C B, C. C. (1997). An outbreak of gastroenteritis and fever due to *Listeria monocytogenes* in milk. *N Engl J Med.* , 336:100–105.

Doyle, E. M. (2001). Virulence Characteristics of *Listeria monocytogenes*. *FRI Brief* , 10-13.

Duffy G, C. O. (1999). The Development of a Combined Surface Adhesion and Polymerase Chain Reaction Technique in the Rapid Detection of *Listeria monocytogenes* in Meat and Poultry. *International Journal of Food Microbiology* , 19: 151- 159.

Dussurget O, P.-C. J. (2004). Molecular determinants of *Listeria monocytogenes* virulence. . *Annu Rev Microbiol* , 58: 587-610. .

Dussurget, O., Pizarro-Cerda, J., & Cossart, P. (2004). Molecular determinants of *Listeria monocytogenes* virulence. *Annu Rev Microbio* , 58: 587-610.

Dworkin, M. (2006). *The Prokaryotes A Handbook on the Biology of Bacteria* (Third edition ed.). New York: Springer.

Ebe Y, H. G. (1999). The Role of Kupffer Cells and Regulation of Neutrophil Migration Into the Liver by Macrophage Inflammatory Protein-2 in Primary Listeriosis in Mice. *Pathol Int* , 49: 51.

Edelson B, C. P. (1999). Paradigm Revisited: Antibody Provides Resistance to *Listeria* Infection. *J Immunol* , 163: 4087-4090. .

Farber J M, P. I. (1991). Neonatal listeriosis due to cross-infection confirmed by isoenzyme typing and DNA fingerprinting. *J Infect Dis.* , 163:927–928.

Farber, & Peterking. (1991). *Listeria monocytogenes*, a food-borne pathogen. *Microbiology Rev* , 55: 476-511.

Franco, & Landgraft. (1996). Microorganismos Patogenicos de Importancia en Alimentos. *Microbiologia de Alimentos* , 33-82.

Galiana, J. (1968). Neurolisteriosis. *Primer caso pediátrico nacional* , 39: 194-202.

Garrity, G., & Holt, J. (2000). An overview of the road map to the manual. *Bergey's Manual Trust*.

Gener-Smidt, P., Ethelberg, S., Schiellerup, P., Christensen, J., Enberg, J., Fussing, V., y otros. (2005). Invasive listeriosis in Denmark 1994-2003: a review of 299 cases with special emphasis on risk factors and mortality. *Clin Microbiol Infect* , 11: 618-24.

Gerner-Smidt P, E. S. (2005). Invasive listeriosis in Denmark 1994-2003: a review of 299 cases with special emphasis on risk factors and mortality. *Clinical Microbiology Infect* , 11: 618-24.

Gilot P, A. P. (1999). *Listeria monocytogenes* Possesses Adhesins for Fibronectin. *Infect Immun* , 67(12): 6698-6701.

Golsteyn, K. R. (1991). Sensitive and Specific Detection of *Listeria monocytogenes* in Milk and Ground Beef with Polymerase Chain Reaction. *Applied and Environmental Microbiology* , 57(9): 2576-2580.

Gonzalez-Zorn B, D.-B. G. (1999). The smcL gene of *Listeria ivanovii* encodes a sphingomyelinase C that mediates bacterial escape from the phagocytic vacuole. *Mol Microbiol* , 33: 510-23.

Goulet, V., Lepoutre, A., Rocourt, J., Courtieu, A., Dehaumont, P., Veit, P., y otros. (1993). L'épidémie de Listériose en France. *Résultats de L'enquête Épidémiologique. Bulletin Epidémiologie Hebdomadaire* , 4: 13 - 14.

Gray MJ, F. N. (2006). How the bacterial pathogen *Listeria monocytogenes* mediates the switch from environmental Dr. Jekyll to pathogenic Mr. Hyde. *Infect Immun* , 74: 2505-12.

Gudiño, M. (2010). Estudio comparativo entre métodos moleculares y convencionales para la identificación y evaluación de la prevalencia de *Listeria monocytogenes* en embutidos y productos lácteos. PUCE .

Guerra, E. M. (Mayo de 2005). Investigación preliminar de la presencia de *Listeria monocytogenes* en pescado fresco en el mercado de abastos en Piura-Peru. *Libro de resúmenes del IV Congreso Latinoamericano de Microbiología e Higiene de los Alimentos.* , 27 - 30.

Guilbaud, M. d. (2005). "Quatitative Detection of *Listeria monocytogenes* in Biofilms by Real-Time PCR". *Applied and Environmental Microbiology* , Vol 71 (4), 2190-2194.

Guleria I, P. J. (2000). The Trophoblast is a Component of the Innate Immune System During Pregnancy. *Nature Medicine* . *Nature Medicine* , 6: 589-593. .

Henry, B. J. (2007). *El Laboratorio en el Diagnóstico Clínico*. Madrid: Marbán.

HITCHINS. (1998). *Listeria monocytogenes*. *Bacteriological Analytical Manual, US Food and Drug Administration, AOAC INTERNATIONAL, Gaithersburg, MD, EE.UU.* , , 10.01–10.11.

Hofer, E. M. (2006). Serovares de *Listeria monocytogenes* e espécies relacionadas, isoladas de material clínico humano. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* , 39 (1).

Hough, A. H. (2002.). "Rapid Enumeration of *Listeria monocytogenes* in Artificially Contaminated Cabbage Using Real-Time Polymerase Chain Reaction". *Journal of Food Protocols* (65).

Institut Pasteur. (s.f.). *Identification of the role of internalin in the crossing of the intestinal barrier : generation of a transgenic model for orally acquired listeriosis*. Obtenido de Institut Pasteur: <http://www.pasteur.fr/ip/easysite/go/03b-00000k-0h9/unites-et-groupes/unite-des-interactions-bacteries-cellules>

INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION. (1996). Microbiology of food and animal feeding stuffs – Horizontal method for the detection and enumeration of *Listeria monocytogenes* - Part 1: Detection method. *International Standard ISO 11290-1*

ISO 11290. (2004). Microbiology of Food and Animal Feeding Stuff-Horizontal Method for the detection and Enumeration of *Listeria monocytogenes* Part 1: Detection Method-Amendment 1: Modification of the Isolation Media and the Haemolys. *Brussels: European Committee for Stand .*

James, J. (1978). *Microbiologia Moderna de los Alimentos* (Segunda ed.). Zaragoza, España: Acribia.

Jay, J. (2005). Listerioses de origem animal. In: Microbiologia de alimentos. *Revista da FZVA Uruguaiana* , 517-542.

Kaclíková E, P. D. (2003). Detection of *Listeria monocytogenes* in Food, Equivalent to ISO 11290-1 or ISO 10560, by a Three Days Polymerase Chain Reaction Based Method. *Food Control* , 14: 175 - 179.

Kathariou, S. (2002). *J Food Prot. Listeria monocytogenes virulence and pathogenicity, a food safety perspective.* , 65:1811–1829. .

Kayal S, C. A. (2006). Listeriolysin O: a key protein of *Listeria monocytogenes* with multiple functions. *FEMS Microbiol Rev* , 30: 514-29.

Klatt E C, Z. P. (1986). Epidemic neonatal listeriosis at autopsy. *Human Pathology* , 17:1278-1281.

Knabel, J., & Chen, Y. (October 2007). Multiplex PCR for simultaneous detection of bacteria of the genus *Listeria*, *Listeria monocytogenes*, and major serotypes and epidemic clones of *L. monocytogenes*. *Appl Environ Microbiol*.

Koneman, E. (2006). *Diagnostico Microbiologico* (Sexta edicion ed.). Buenos Aires: Panamericana.

Kreft J, V.-B. J. (2001). Regulation of virulence genes in Listeria. . *J Med Microbiol* , 291: 145-57. .

Lecuit M, C. P. (2002). Genetically-modified-animal Models for Human Infections; the Listeria Paradigm. . *TRENDS Mol Med* , 8(11): 537-542.

Lecuit, M., Vandormael-Pournin, S., Lefort, J., Huerre, M., Gounon, P., Dupuy, C., y otros. (2001). A transgenic model for listeriosis: role of internalin in crossing the intestinal barrier. *Science* , 292: 1722-5.

Ledermann, D. W. (2008). En memoria de Lister. *Revista Chilena de Infectología* , 25 (5): 351-356.

Linnan M J, L. M. (1988.). Epidemic listeriosis associated with Mexican-style cheese. . *N Engl J Med.* , 319:823–828.

López, V., & Suárez, M. C.-C.-S. (2006). Listeria monocytogenes en alimentos: son todos los aislamientos igual de virulentos? *Rev. argent. microbiol v.38 n.4 Ciudad Autonoma de Buenos Aires* , 25-36.

Lorber, B. (1996). Listeriosis. *Clin Infect Dis.* , 24:1–11.

Lovett, & Twedt. (1988). Bacteria associated with foodborne diseases Listeria. *Food Technology* , 188-191.

Makino S, O. Y. (1995). A New Method for Direct Detection of L.monocytogenes From Food by PCR. *Applied and Environmental Microbiology* , 61(10):3745 - 3747.

Mantilla, S. P. (2007). Revista da FZVA. Uruguaiana. *Importance of Listeria monocytogenes on foods from animal origin* , 180-192.

Marth, E., & Steele, J. (2001). *Applied Dairy Microbiology* (Segunda edicion ed.).

McLauchlin, J. (1990). Distribution of Serovars of *Listeria monocytogenes* Isolated From Different Categories of Patients With Listeriosis. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* , 9: 210-213.

McLauchlin, J. (1990). Human listeriosis in Britain, 1967–1985, a summary of 722 cases. 2. Listeriosis in nonpregnant individuals, a changing pattern of infection and seasonal incidence. *Epidemiol Infect.* , 104:191–201.

Mead, P. S. (2006). Nationwide outbreak of listeriosis due to contaminated meat. *Epidemiol Infect* , 134: 744-751.

Meinersmann, R. P. (2004). Multilocus sequence typing of *Listeria monocytogenes* by use of hypervariable genes reveals clonal and recombination histories of three lineages. *Appl Environ Microbiol* , 70: 2193-2203.

Mengaud J, V. M. (1989). Transcriptional mapping and nucleotide sequence of the *Listeria monocytogenes* hlyA region reveal structural features that may be involved in regulation. . *Infect Immun* , 57: 3695-701.

Miettinen, M., Siitonen, A., Heiskanen, P., Haajanen, H., Bjorkroth, K., Korkeala, H., y otros. (1999). Molecular epidemiology of an outbreak of febrile gastroenteritis caused by *Listeria monocytogenes* in cold-smoked rainbow trout. *J Clin Microbio* , 37: 2358–60.

Mullis, K., & Faloona, F. (1987). Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol* , 155: 335-350.

Murray E G D, W. R. (1926). A disease of rabbits characterized by large mononuclear leucocytosis, caused by a hitherto undescribed bacillus *Bacterium monocytogenes* (novas sp) . *J. Pathology Bacteriology* , 29: 407-39.

Nadon, C. W.-m. (2001). Correlations between molecular subtyping and serotyping of *Listeria monocytogenes*. *J Clin Microbiol* , 39:2704–7.

Nature Publishing Group. (2006). *Listeria monocytogenes*: a multifaceted model. *Nature Reviews Microbiology* 4 , 423-434.

NCCLS. (Enero 2006). *Clinical and Laboratory Standards Institute* (Vol. 26). USA.

Olivares, R. (Junio de 2009). *Medwave*. Obtenido de <http://www.mednet.cl/link.cgi/Medwave/Reuniones/3994>

Oravcová, K. T. (2008.). "Limitation in the detection of *Listeria monocytogenes* in food in the presence of competing *Listeria innocua*". *Journal of Applied Microbiology* (104).

Organización Panamericana de la Salud, O. (s.f.). *Perfiles de Países: Ecuador*. Internet. Obtenido de www.paho.org/spanish/dd/ais/be_v25n2-perfil-ecuador.htm

Parkash V, M. R. (1998). Immunohistochemical Detection of *Listeria* Antigen in the Placenta in Perinatal Listeriosis. . *Int J Gyn Pathol* , 17: 343-350.

Pizarro-Cerda, J., & Cossart, P. (2006). Subversion of cellular functions by *Listeria monocytogenes* . *J Pathol* , 215-23.

Pohl, M., Wiedmann, M., & Nightingale, K. (2006). Associations among *Listeria monocytogenes* genotypes and distinct clinical manifestations of listeriosis in cattle. . *Am J Vet Res* , 67: 616-26.

Pron B, B. C. (1998). Comprehensive Study of the Intestinal Stage of Listeriosis in a Rat Ligated Ileal Loop System. . *Infect Immun* , 66: 747-755.

Qvist, S., Sehested, K., & Zeuthen, P. (1994). Growth Suppression of *Listeria monocytogenes* in a meat product. *International Journal of Food Microbiology* , 24: 283-293.

Ragon, M. e. (2008). A New Perspective on *Listeria monocytogenes* Evolution. *Vol 4*.

Rasmussen, O. F., Skouboe, P., Dons, I., Rossen, L., & Olsen, J. E. (1995). *Listeria monocytogenes* Exists in at Least Three Evolutionary Lines: Evidence From Flagellin, Invasive Associated Protein and Listeriolysin O Genes. *Microbiology* , 141: 2053-2061.

Reij, M., & Den Aantrekker, E. (2004). Recontamination as a source of pathogens in processed foods. *International Journal of Food Microbiology* , 91(1):1-11.

Ripio MT, D.-B. G.-B. (1997). A Gly145Ser substitution in the transcriptional activator PrfA causes constitutive overexpression of virulence factors in *Listeria monocytogenes*. *J Bacteriol* , 179: 1533-40.

Ripio, M. D.-B.-B. (1996). Transcriptional activation of virulence genes in wild-type strains of *Listeria monocytogenes* in response to a change in the extracellular medium composition. *Res Microbiol* .

Roche Applied Science. (s.f.). LightCycler 1.5 Instrument Operator's Manual.

Rocourt, J. &. (1997). Foodborne listeriosis. *World Health Stat.* , 50, 67–73.

Rogers H W, U. E. (1993). Neutrophils Are Involved in Acute, Non-specific Resistance to *Listeria monocytogenes* in Mice. . *Infect Immun* , 61: 5090-5096. .

Salvat, G., Toquin, M., Michel, Y., & Collin, P. (1995). Control of *Listeria monocytogenes* in the Delicatessen Industries: The lessons of a Listeriosis outbreak in France. *International Journal of Food Microbiology* , 25: 75-81.

Sauders, B. D. (2006). Molecular characterization of *Listeria monocytogenes* from natural and urban environments. *J Food Prot* , 69: 93-105.

Schlech, W., Lavigne, P., & Bortolussi, R. (1985). Epidemic listeriosis evidence for transmission by food. *N Engl J Med* , 312:404.

Schuchat A, D. K. (1993). Gastrointestinal carriage of *Listeria monocytogenes* in household contacts of patients with listeriosis. *J Infect Dis* , 167: 1261 - 1262.

Schuchat, A., Swaminathan, B., & Broome, C. (1991). Epidemiology of human listeriosis. *Clin Microbiol Rev* , 4: 169 - 183.

Schwartz, B., Hexter, D., & Broome, C. (1989). Investigation of an outbreak of listeriosis: New hypotheses for the etiology of epidemic *Listeria monocytogenes* infections.. *J Infect Dis* , 159:680.

Seeliger, & Jones. (1996). Genus *Listeria*. *Bergey's Manual of Sistematic Bacteriology*. , 1235-1245.

Seeliger, H., & Jones, D. (1986). Genus *Listeria* Pirie 1940, 383. En P. Sneath, N. Mair, & M. Sharpe, *Bergey's Manual of Sistematic Bacteriology* (págs. 1235-1245). Baltimore.

Sislema, F. (2008). Extracción y Amplificación por PCR de ADN de *Shigella*. *Laboratorio de Biología Celular y Diagnostico Molecular* .

Sokolovic Z, R. J. (1993). Surface-associated, PrfA-regulated proteins of *Listeria monocytogenes* synthesized under stress conditions. . *Mol Microbiol* , 8: 219-27. .

Surzycki, S. (2000). *Basic Techniques in Molecular Biology*. New York: Springer.

Swaminathan, & Gerner-Smidt. (2007). Epidemiology of human listeriosis. *Microbes Infect* , 9: 1236-43.

Tappero, J. S. (1995). Reduction in the incidence of human listeriosis in the United States: effectiveness of prevention efforts? *JAMA* , 273:1118-1122.

Tilney, L. a. (1989.). Actin filaments and the growth, movement, and spread of the intracellular bacterial parasite, *Listeria monocytogenes*. *J Cell Biol.* , 109:1597–1608.

Torres K, P. R. (2004). Validación de PCR para detección de *Listeria monocytogenes* en carnes crudas de res y pollo. *MVZ-Córdoba* , 9:(2) 414-427.

Vázquez-Boland JA, K. C. (1992). Nucleotide sequence of the lecithinase operon of *Listeria monocytogenes* and possible role of lecithinase in cell-to-cell spread. . *Infect Immun* , 60: 219-30.

Vázquez-Boland, J. A., Gamallo, J. A., Ripio, M. T., Domínguez-Bernal, G., Lara, M., Vega, Y., y otros. (1996). Listeriosis Animal: Aspectos Epidemiológicos y Diagnósticos, Implicaciones en Salud Pública y Situación en España. *Med Vet* , 13: 333-344.

Vázquez-Boland, J., Kuhn, M., Berche, P., Chakraborty, T., Domínguez-Bernal, G., Goebel, W., y otros. (2001b). Listeria Pathogenesis and Molecular Virulence Determinants. *Clin Microbiol Rev* , 14(3): 584-640.

Vera, H. F. (2001). Prevalencia de Listeria monocytogenes en derivados cárnicos cocidos para consumo directo analizados en el Laboratorio de Salud Pública BOGOTÁ 1 de SEPTIEMBRE 2001 – 31 AGOSTO 2004. *Informe de Salud Pública* .

Von-Both, O. S. (1999). Physical and Genetic Map of the Listeria monocytogenes EGD Serotype 1/2a Chromosome. *FEMS Microbiol Lett* , 175: 281-289.

Way, S. S. (2004). Characterization of flagellin expression and its role in Listeria monocytogenes infection and immunity. En D. Martin, *The Prokaryotes a handbook on the Biology of Bacteria* (tercera edición ed., págs. 452-453). New York.

Wiedmann, M., Bruce, J. L., Keating, C., Johnson, A. E., McDonough, P. L., Batt, C. A., y otros. (1997). Ribotypes and Virulence Gene Polymorphisms Suggest Three Distinct Listeria monocytogenes Lineages with Differences in Pathogenic Potential. *Infect Immunology* , 65(7): 2707-2716 .

ANEXOS

ANEXO 1
Manejo de Muestras

Semana	Fechas de la semana	Número de muestras de salchichas	Total relativo de las muestras de salchichas	Número de muestras de yogures	Total relativo de las muestras de yogures
1					
2					
3					
4					
5					
6					
7					
8					
9					
10					
11					
12					
13					
14					

ANEXO 2

Registro de Muestreo

Registro de Muestreo

Semana: _____

*Código: _____

Datos de Muestreo:

Hora: _____

Fecha: _____

Responsable: _____

Datos Informativos:

Mercado: Mayorista San Roque Iñaquito

Tipo de Alimento: Yogurt Salchichas

Local: _____

SI NO

Limpieza: _____

Cantidad de muestra: _____

Conservación: Refrigeración Tº Ambiente Congelación

Manipulador: Empleo de:

SI NO

Guantes _____

Mascarilla _____

Depende quien cobra _____

Observaciones:

Características Organolépticas del alimento:

Olor _____

Color _____

Apariencia _____

Textura _____

Observaciones:

* Orden de código: Iniciales de alimento; iniciales de mercado; número de alimento por cada uno; no una sola enumeración para ambos. Ej. Y SR 001 (Yogurt, San Roque muestra de yogurt 1), S M 100 (Salchicha, Mayorista, muestra de salchicha 100).

ANEXO 3

Técnica de extracción por ebullición

Ensayos previos

Ensayo # 1 Primera extracción por ebullición:

- Se realizó el ensayo con la cepa R250
- Para la recuperación de la bacteria, se sembró 200uL del vial que contiene la cepa en 4mL de BHI y 4mL de Solución Salina (SS) 0,85% respectivamente
- Se sembró en agar sangre de cordero, durante 24h a 37 °C
- Se realizó la tinción Gram de las colonias, al microscopio se observaron bacilos gram positivos cortos.
- Se realizó extracción por ebullición, técnica que se describirá más adelante
- Posteriormente se evaluó la cantidad y calidad de DNA extraído utilizando el Qubit™ (Invitrogen) y espectrofotometría.

Al realizar la comparación tanto de la concentración (Tabla 17) como de la calidad (Tabla 18) de ADN extraído por ebullición de la cepa R250 sembrada tanto a partir del caldo BHI y Solución Salina (SS), se obtuvieron los siguientes datos.

Medio	Concentración
BHI	3,75 µg/mL
SS	3,56 µg/mL

Fuente: Mena C.

Medio	λ 260 nm	λ 280 nm	λ 260/ λ 280
Caldo BHI	0.0112	0.0073	1,53
SS	0.0126	0.0085	1,48

Fuente: Mena C.

De los resultados obtenidos podemos observar que el ADN extraído del caldo BHI presenta mayor concentración que el extraído con Solución Salina, sin embargo no se evidencia una diferencia significativa. Lo mismo ocurre con la Calidad de ADN.

Ensayo # 2: Evaluación de extracción por ebullición vs extracción con lisozima:

- A las mismas diluciones utilizadas en el ensayo anterior se les realizó la técnica de extracción de ADN por ebullición y otra utilizando lisozima. Posteriormente se analizó la relación de absorbancia a 260 y 280 para evaluar la calidad de ADN extraído. (Tabla 19)

Tabla 19: Calidad de ADN de muestras extraídas con Lisozima vs Ebullición			
Lisozima		Ebullición	
Con calentamiento	Sin calentamiento	Con calentamiento	Sin calentamiento
De 0,95 a 1,26	De 0,90 a 1	1 a 1,10	De 1 a 1,10

Fuente: Mena C.

Aunque varios métodos para extracción de ADN han sido reportados, el método de extracción por ebullición usado en este estudio fue igual de efectivo que los métodos de lisozima y proteinasa K (Torres K, 2004) y Ioduro de Sodio (Makino S, 1995). En este ensayo la calidad de ADN es buena ya que presenta valores cercanos a 1,5

Ensayo # 3: Evaluación Final de Técnica Extracción:

- En esta ocasión se probó otra técnica de extracción como fue con DNAzol® siguiendo las especificaciones del fabricante (ver mas adelante) y la misma extracción por ebullición.
- Se analizó la concentración de ADN a partir del caldo, para ello se utilizó el Qubit™ (Invitrogen)
- Finalmente se realizó la comparación de la extracción de ADN por ebullición, frente a la extraída con DNAzol, se midió la concentración a partir del caldo de cultivo en Tabla 20.

Tabla 20: Concentración de ADN extraído por ebullición y DNAzol

Técnica	Concentración
Ebullición	5,11 µg/mL
DNAzol	0,219 µg/mL

Fuente: Mena C.

La concentración de ADN extraída por ebullición es superior a la técnica de extracción con DNAzol.

Ensayo # 4: PCR convencional de muestras extraídas por ebullición (a partir del caldo BHI):

Muestras: Cepa *Listeria monocytogenes* ATCC 19112. Diluciones a partir del Caldo: 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3}

Se realizó el coctel de amplificación con Mix PCR GoTaq® Green (Promega) del Gen: *hly* que codifica para listeriolosina O.

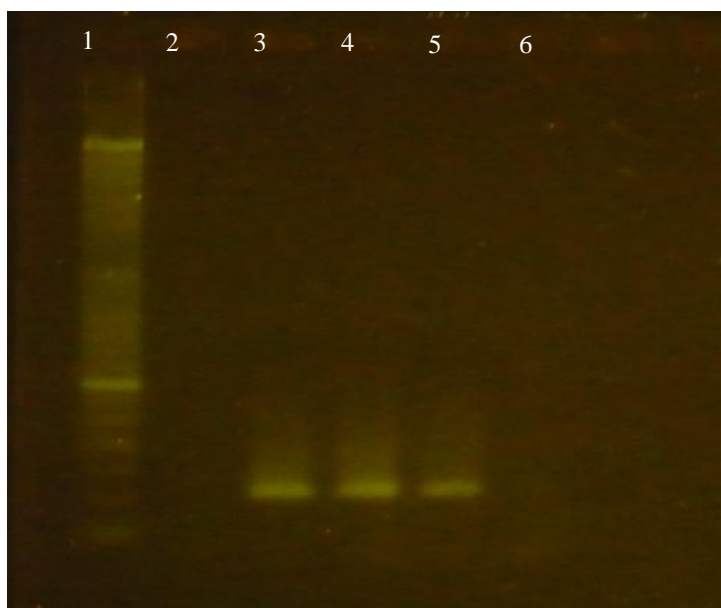
Reactivo	Concentración Inicial	Volumen 1X (µL)	Concentración final	Volumen X 5
GoTaq Green	Taq, 3mM MgCl ₂ , 400 µM c/u dNTPs	12.5	1U Taq, 1.5Mm, 200µM	62.5 µL
Agua BM		5.5		27.5 µL
Primer 1	10µM	1	0,4 µM	5 µL
Primer 2	10µM	1	0,4 µM	5 µL
ADN		5		25 µL
		Final: 25 µL		

Para la electroforesis se utilizó: gel de Agarosa al 2%, ladder 50pb, 95min, 70 voltios

Muestras: Diluciones a partir del Caldo: 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3}

1. Ladder 50pb	2. C(-)	3. C(+)	4. Lm 10^{-1}	5. Lm 10^{-3}	6. Lm 10^{-6}
✓	✓	106pb	106pb	106pb	-

Figura 26: Electroforesis N° 1



Fuente: Mena, C.

En la figura 26 se puede observar que con la cepa ATCC se amplificó con éxito el gen *hly* de 106pb que codifica para listeriolosina O, demostrando por tanto que la extracción de ADN fue efectiva.

Ensayo # 6: PCR convencional de muestras extraídas por ebullición (a partir de ADN extraído):

Muestras: Cepa *Listeria monocytogenes* ATCC 19112. Se realizó diluciones de ADN de *Listeria monocytogenes* extraído por ebullición: desde 10^{-1} a 10^{-10} (5µL de ADN + 45µL de Buffer TE1x)

Se realizó el coctel de amplificación con Mix PCR GoTaq® Green (Promega) gen *hly*

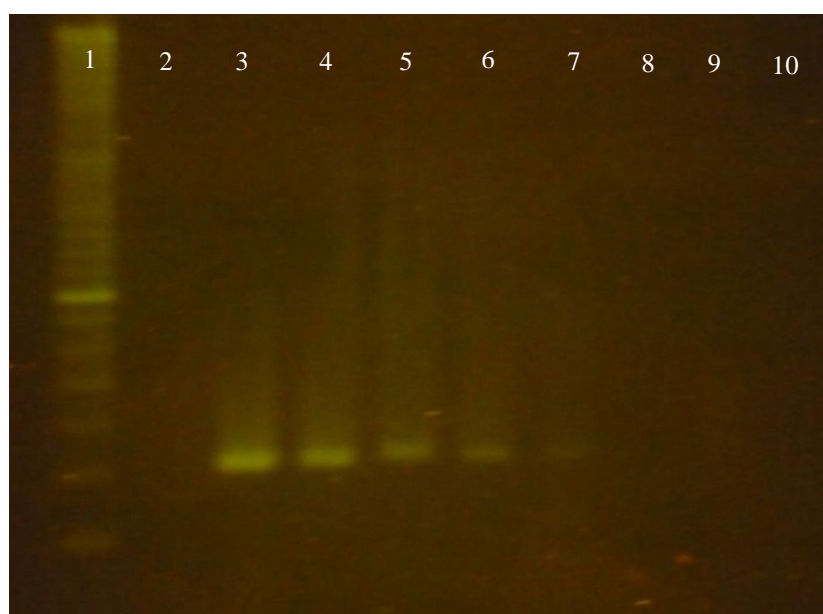
Reactivo	Concentración Inicial	Volumen 1X (µL)	Concentración final	Volumen X 12
GoTaq Green	Taq, 3mM MgCl ₂ , 400 µM c/u dNTPs	12.5	1U Taq, 1.5Mm, 200µM	150 µL
Agua BM		5.5		66 µL
Primer 1	10µM	1	0,4 µM	12 µL
Primer 2	10µM	1	0,4 µM	12 µL
ADN		5		5 µL
		Final: 25 µL		

Para la electroforesis se utilizó: gel de agarosa al 2%, ladder 50pb, 95min, 70 voltios

Muestras: Se realizó diluciones de ADN ya extraído a partir del Caldo: desde 10^{-1} a 10^{-10} (5 μ L de ADN + 45 μ L de Buffer TE1x) (Figura 27)

1 Ladder 50pb	2 C(-)	3 C(+)	4 Lm 10^{-1}	5 Lm 10^{-2}	6 Lm 10^{-3}	7 Lm 10^{-4}	8 Lm 10^{-5}	9 Lm 10^{-6}	10 Lm 10^{-7}
✓	✓	106pb	106pb	106pb	106pb	106pb	-	-	-

Figura 27: Electroforesis N° 2



Fuente: Mena, C

Se amplificó con éxito el gen *hly* de 106pb que codifica para listeriolosina O, a partir de diluciones de ADN extraído (véase la intensidad de las bandas) dichas muestras sirvieron de Control Positivo para futuros procedimientos.

Los cebadores *hly-F* y *hly-R* utilizados en el ensayo de PCR demostraron su alta afinidad por la secuencia blanco correcta al permitir la detección de *Listeria monocytogenes*. Este hallazgo es importante en los casos de que existiera asociación con otras especies de *Listeria* y con otros géneros bacterianos.

ANEXO 4

Extracción de DNA de *Listeria monocytogenes* por medio enzimático

Procedimiento:

- Centrifugar 1 mL de cultivo a 6000 rpm por 10 minutos
- Lavar el sedimento con buffer TE 1X (tres veces)
- Resuspender el pellet resultante en 200uL de tampón TE1X más 2 mg/mL de lisozima
- Incubar 30 minutos a 37°C
- Añadir 300 uL de buffer TE 1X mas 1% (p/v) de SDS (dodecil sulfato de sodio) con proteinzasa K a concentración final de 100 ug/mL
- Incubar a 65 °C por una hora
- Añadir 84uL de una solución 5M de cloruro de sodio más 60 uL de CTAB – Bromuro de hexadeciltrimetilamonio – (10% p/v disuelto en 0.7 M de cloruro de sodio)
- Incubar 20 minutos a 65 °C
- Añadir 80 uL de mezcla fenol – cloroformo (24:1)
- Centrifugar a 3000 rpm por 10 minutos
- Tomar la fase acuosa y precipitarla con 2 – propanol
- Lavar el DNA precipitado con etanol al 70% (v/v)
- Secar a 5 a 10 minutos a 37°C
- Resuspender en tampón 1x para su conservación

ANEXO 5

Extracción de DNA de *Listeria monocytogenes* con DNAzol®

Procedimiento:

- Centrifugar 1 mL de cultivo a 6000 rpm por 10 minutos
- Adicionar 1ml de DNAzol y mezclar pipeteando con la misma punta con la que se colocó el DNAzol y dar ligeros golpes para homogenizar.
- Centrifugar por 10 minutos a 10000rpm a 4°C o T° ambiente.
- Recoger el sobrenadante (viscoso) en un tubo eppendorf nuevo de 1.5ml estéril, para remover fragmentos insolubles o RNA, polisacáridos en exceso y así minimizar la contaminación. Tratar de que no pase el pellet.
- Precipitar el lisado adicionando 500µl de etanol al 100% e invertir la muestra para mezclar y precipitar, dejar por 1-3 minutos. Son 500µl por cada 1ml de DNAzol utilizado.
- Centrifugar por 4 minutos a 4000rpm, a temperatura ambiente o a 4°C. Eliminar el sobrenadante y tener cuidado de no eliminar el pellet
- Lavar y re suspender el ADN adicionando 1ml de etanol al 75% e invertir el tubo de 3-6 veces.
- Mantener los tubos verticalmente por 0.5-1minuto para permitir que el ADN se quede en el fondo del tubo y remueva el etanol con la pipeta o decantando. Si el ADN (pellet esta suelto) centrifugar por 2 minutos a 1000rpm y T° ambiente y elimine el sobrenadante.
- El lavado y re suspensión se realiza 2 veces
- Eliminar el sobrenadante (todo el etanol) y seque el ADN por 5 a 15 segundos.
- Re suspender el ADN adicionando 250µl de Buffer TE o 200µl NaOH 8mM o agua grado biología molecular.
- Agitar los tubos en el vortex.
- Se puede conservar el ADN congelado a -20°C.

ANEXO 6

Programa de Amplificación

Report

User Developed or Modified Test Method

curva listeria caro

Experiment

Creation Date	6/29/2009 3:35:10 PM	Last Modified Date	6/29/2009 4:32:28 PM
Operator	System Admin	Owner	System Admin
Start Time	6/29/2009 3:38:46 PM	End Time	6/29/2009 4:24:37 PM
Run State	Completed	Software Version	LCS4 4.0.5.415
Macro	Macro Listeria	Macro Owner	System Admin
Templates			
Run Notes			

Programs

Program Name	Pre incubation		
Cycles	1	Analysis Mode	None

Target (°C)	Hold (hh:mm:ss)	Slope (°C/s)	Sec Target (°C)	Step size (°C)	Step Delay (cycles)	Acquisition Mode
95	00:10:00	20	0	0	0	None

Program Name	Amplification		
Cycles	45	Analysis Mode	Quantification

Target (°C)	Hold (hh:mm:ss)	Slope (°C/s)	Sec Target (°C)	Step size (°C)	Step Delay (cycles)	Acquisition Mode
95	00:00:10	20	0	0	0	None
63	00:00:05	20	0	0	0	None
72	00:00:05	20	0	0	0	Single

Program Name	Melting Curves		
Cycles	1	Analysis Mode	Melting Curves

Target (°C)	Hold (hh:mm:ss)	Slope (°C/s)	Sec Target (°C)	Step size (°C)	Step Delay (cycles)	Acquisition Mode
95	00:00:00	20	0	0	0	None
63	00:01:00	20	0	0	0	None
95	00:00:00	0.1	0	0	0	Continuous

Program Name	Cooling		
Cycles	1	Analysis Mode	None

Target (°C)	Hold (hh:mm:ss)	Slope (°C/s)	Sec Target (°C)	Step size (°C)	Step Delay (cycles)	Acquisition Mode
40	00:00:30	20	0	0	0	None

User Developed or Modified Test Method

Change History

Version 4 of 4

Revision	Date	User	Reason
1	6/29/2009 3:36:33 PM	admin	Created
2	6/29/2009 3:38:24 PM	admin	Kit Wizard: User changes during preview
3	6/29/2009 4:24:40 PM	admin	Run finished
4	6/29/2009 4:34:36 PM	admin	Análisis

Absolute Quantification

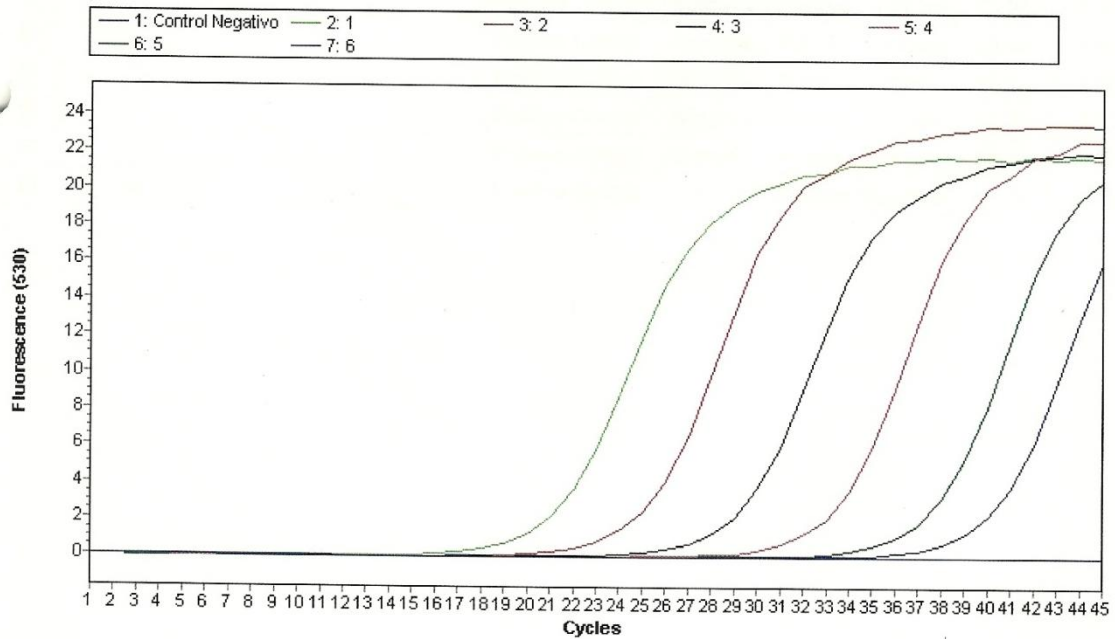
Settings

Channel	530		
Color Compensation	Off		
Program	Amplification	Method	Automated (F" max) Units

Results

Inc	Pos	Name	Type	CP	Conc	Std	Comb	Calls Target	Control
<input checked="" type="checkbox"/>	1	Control Negativo	Negative Control				Success	Negative	Success
<input checked="" type="checkbox"/>	2	1	Standard	20.06	9.66E-2	1.00E-1	Success	Positive	Success
<input checked="" type="checkbox"/>	3	2	Standard	23.99	1.03E-2	1.00E-2	Success	Positive	Success
<input checked="" type="checkbox"/>	4	3	Standard	28.02	1.04E-3	1.00E-3	Success	Positive	Success
<input checked="" type="checkbox"/>	5	4	Standard	32.20	9.65E-5	1.00E-4	Success	Positive	Success
<input checked="" type="checkbox"/>	6	5	Standard	36.26	1.00E-5	1.00E-5	Success	Positive	Success
<input checked="" type="checkbox"/>	7	6	Standard	>40.00	1.34E-6	1.00E-6	Success	Positive	Success

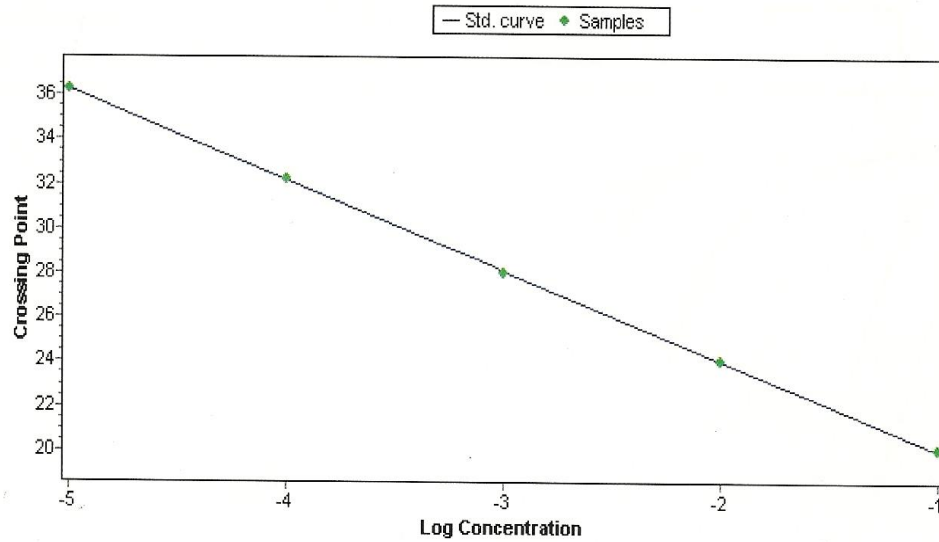
Amplification Curves



User Developed or Modified Test Method

Standard Curve

Error: 0.00615
Efficiency: 1.767



Qualitative Detection

Settings

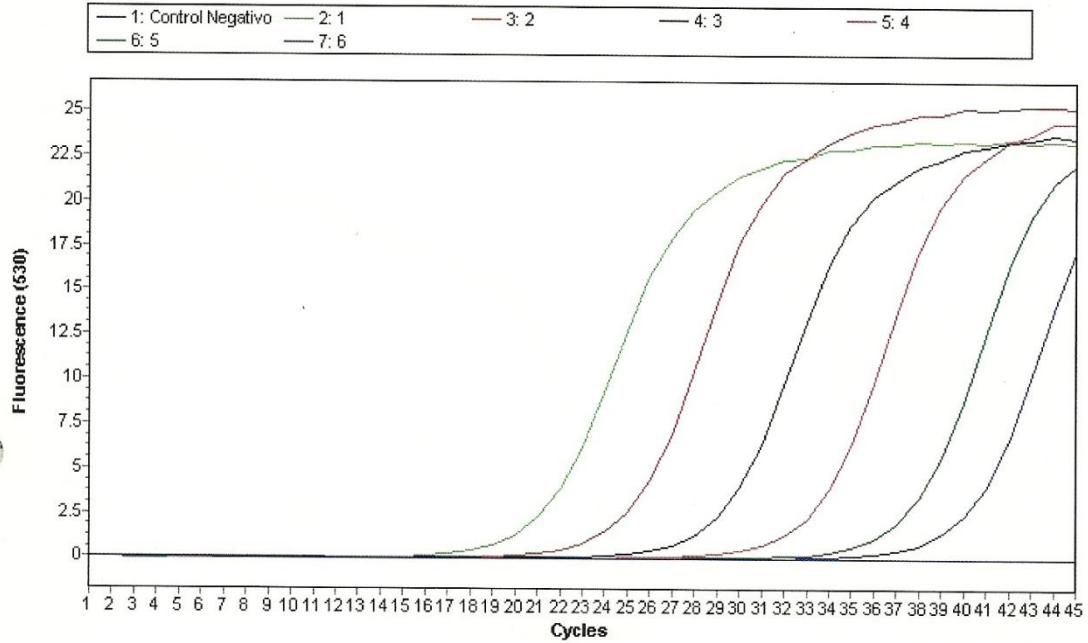
Channel	530	Color Compensation	ColorCompensation 2009-04-15 [530, 640, 705]
Program Name	Amplification		

Results

Inc	Pos	Name	Type	Combined	Calls		Results	
					Target	Control	CP	Score
<input checked="" type="checkbox"/>	1	Control Negativo	Negative Control	Success	Negative	Success		-5.00
<input checked="" type="checkbox"/>	2	1	Positive Control	Success	Positive	Success	20.06	5.00
<input checked="" type="checkbox"/>	3	2	Positive Control	Success	Positive	Success	23.99	5.00
<input checked="" type="checkbox"/>	4	3	Positive Control	Success	Positive	Success	28.02	5.00
<input checked="" type="checkbox"/>	5	4	Positive Control	Success	Positive	Success	32.20	5.00
<input checked="" type="checkbox"/>	6	5	Positive Control	Success	Positive	Success	36.26	5.00
<input checked="" type="checkbox"/>	7	6	Positive Control	Success	Positive	Success	>40.00	5.00

User Developed or Modified Test Method

Amplification Curves



Tm Calling

Settings

Channel	530	Color Compensation	ColorCompensation 2009-04-15 [530, 640, 705]		
Program	Melting Curves				
Show Shoulders	Off	High Sensitivity	Off	Max Peaks	2

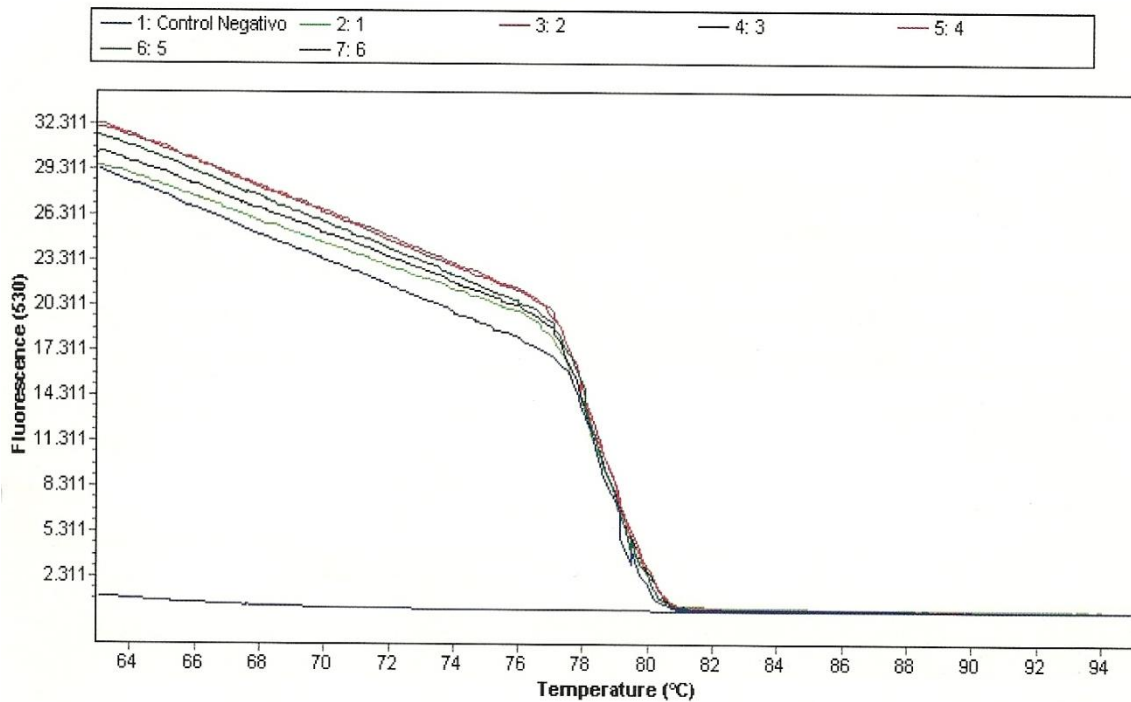
Calibrators

Channel	Tm Calibrator	Expected TM
530	(None)	
640	(None)	
705	(None)	

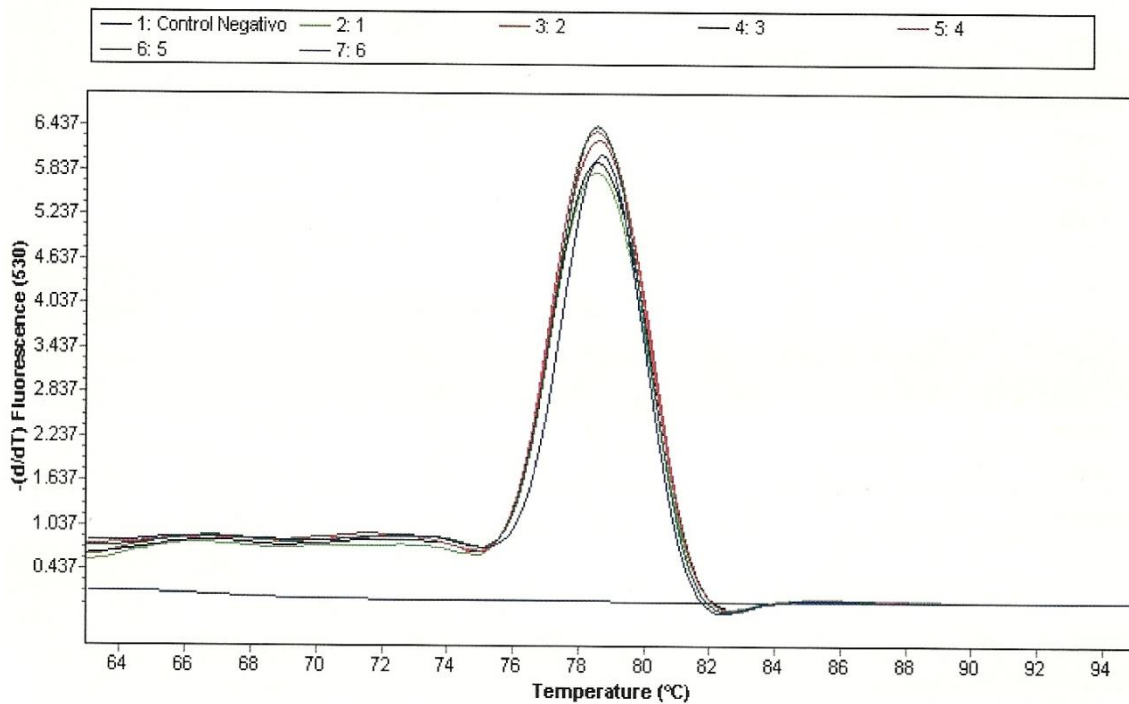
Results

Inc	Pos	Sample Name	Peak 1				Peak 2				
			Tm	Area	Wide	High	Tm	Area	Wide	High	
<input checked="" type="checkbox"/>	1	Control Negativo									
<input checked="" type="checkbox"/>	2	1	78.47	18.95	2.90	6.10					
<input checked="" type="checkbox"/>	3	2	78.68	21.06	2.85	6.66					
<input checked="" type="checkbox"/>	4	3	78.67	20.01	2.85	6.32					
<input checked="" type="checkbox"/>	5	4	78.64	21.32	2.90	6.75					
<input checked="" type="checkbox"/>	6	5	78.66	20.09	3.04	6.77					
<input checked="" type="checkbox"/>	7	6	78.80	16.61	3.52	6.46					

Melting Curves



Melting Peaks



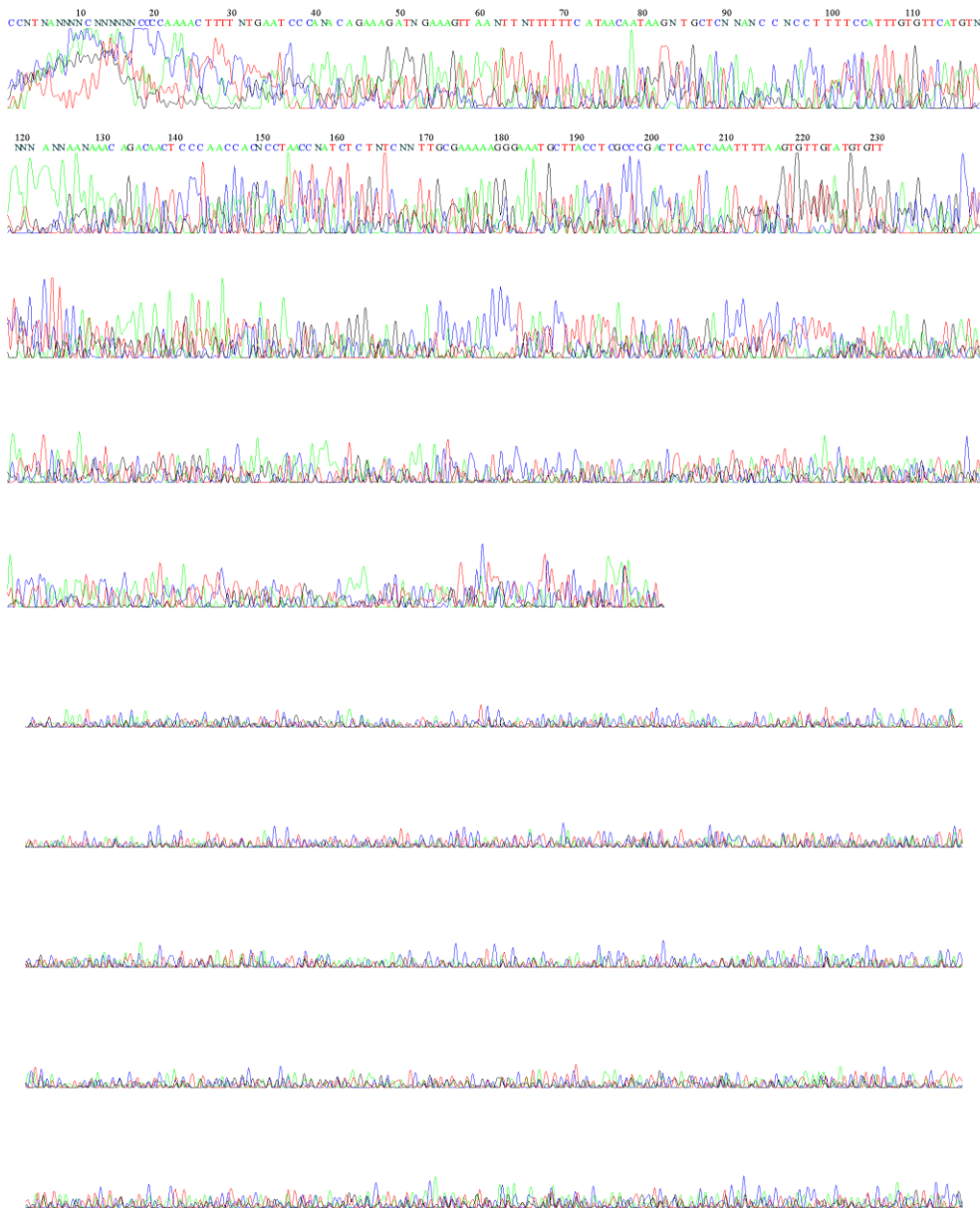
Anexo 7

Resultados de Secuenciación



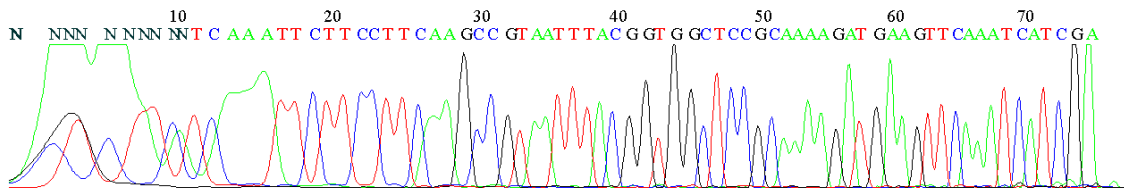
File: 100415-02_A23_89_LISSSR12-LisMF.ab1 Run Ended: 2010/4/15 20:34:46 Signal G:37 A:37 C:37 T:41

Sample: 89_LISSSR12_LisMF Lane: 96 Base spacing: -16.163063 231 bases in 7013 scans Page 1 of 2



File: 100415-02_C23_90_LISSSR41-LisMF.ab1 Run Ended: 2010/4/15 20:34:46 Signal G:3952 A:3654
C:2525 T:2953

Sample: 90_LISSSR41_LisMF Lane: 94 Base spacing: -16.163063 75 bases in 965 scans Page 1 of 1



File: 100415-02_E23_91_LISSM9-LisMF.ab1 Run Ended: 2010/4/15 20:34:46 Signal G:2009 A:1976
C:1297 T:1775

Sample: 91_LISSM9_LisMF Lane: 92 Base spacing: -16.163063 75 bases in 963 scans Page 1 of 1

