



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE  
MÉXICO

---

---

---

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES  
CUAUTITLÁN

**“Determinación de la virulencia de *Listeria monocytogenes*  
por biología molecular en cepas aisladas de leche de cabra”**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:  
**INGENIERA EN ALIMENTOS**

P R E S E N T A N

**GUADALUPE VIRIDIANA MARTÍNEZ GARCÍA**  
**AMEYARI MONSERRAT PÉREZ JIMÉNEZ**

Asesora: M. en C. María Guadalupe Amaya León

Coasesora: Dra. Guicela Ramírez Bernal

Cuautitlán Izcalli, Estado de México 2018



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**

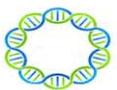


**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

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

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

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





UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTÓNOMA DE  
MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN  
SECRETARIA GENERAL  
DEPARTAMENTO DE EXÁMENES PROFESIONALES

FACULTAD DE ESTUDIOS  
ASUNTO: VOTO APROBATORIO

M. en C. JORGE ALFREDO CUÉLLAR ORDAZ  
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLAN  
PRESENTE

ATN: I.A. LAURA MARGARITA CORTAZAR FIGUEROA  
Jefa del Departamento de Exámenes Profesionales  
de la FES Cuautitlán.

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

Determinación de la virulencia de *Listeria monocytogenes* por biología molecular en cepas aisladas de leche de cabra.

Que presenta la pasante: **Guadalupe Viridiana Martínez García**  
Con número de cuenta: 412011397 para obtener el Título de la carrera: Ingeniería en Alimentos

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

ATENTAMENTE  
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"  
Cuautitlán Izcalli, Méx. a 05 de Junio de 2018.

PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO

	NOMBRE	FIRMA
<b>PRESIDENTE</b>	Q.F.B. Martha Patricia Zúñiga Cruz	
<b>VOCAL</b>	M. en C. María Guadalupe Amaya León	
<b>SECRETARIO</b>	M. en C. y M.I. Ana María Soto Bautista	
<b>1er. SUPLENTE</b>	M. en C. Ana María Sabina de la Cruz Javier	
<b>2do. SUPLENTE</b>	I.A. Dulce María Oliver Hernández	

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

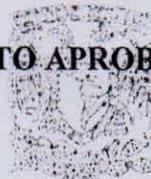


UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTÓNOMA DE  
MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN  
SECRETARIA GENERAL  
DEPARTAMENTO DE EXÁMENES PROFESIONALES

SUPERIORES CUAUTITLÁN

ASUNTO: VOTO APROBATORIO



DEPARTAMENTO DE

M. en C. JORGE ALFREDO CUÉLLAR ORDAZ  
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLAN  
PRESENTE

ATN: I.A. LAURA MARGARITA CORTAZAR FIGUEROA  
Jefa del Departamento de Exámenes Profesionales  
de la FES Cuautitlán.

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

Determinación de la virulencia de *Listeria monocytogenes* por biología molecular en cepas aisladas de leche de cabra.

Que presenta la pasante: Ameyari Monserrat Pérez Jiménez  
Con número de cuenta: 309142755 para obtener el Título de la carrera: Ingeniería en Alimentos

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

ATENTAMENTE  
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"  
Cuautitlán Izcalli, Méx. a 05 de Junio de 2018.

PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO

	NOMBRE	FIRMA
PRESIDENTE	Q.F.B. Martha Patricia Zúñiga Cruz	
VOCAL	M. en C. María Guadalupe Amaya León	
SECRETARIO	M. en C. y M.I. Ana María Soto Bautista	
1er. SUPLENTE	M. en C. Ana María Sabina de la Cruz Javier	
2do. SUPLENTE	I.A. Dulce María Oliver Hernández	

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

## *Dedicatorias*



A mis padres, **Irma García** y **Francisco Martínez** porque gracias a ustedes soy todo lo que ahora soy, gracias por sus consejos, su amor, por darme siempre su protección porque gracias a ustedes he aprendido a ser valiente y a no rendirme pase lo que pase, por alentarme a perseguir mis sueños, porque no hay nadie que crea tanto en mi como ustedes lo hacen.

Por acompañarme en cada momento, ser mi guía y mi ejemplo a seguir.

Una de las mejores formas que he encontrado para agradecerles tanto, ha sido dedicarles uno de los proyectos más importantes de mi vida.

A ustedes por siempre mi corazón.



## *Agradecimientos*



A Dios.

A mi hermano **Daniel**, quien fue mi primer equipo en este mundo, por crecer a mi lado y aprender día a día el uno del otro, por mostrarme lo bueno que es tener siempre alguien con quien jugar a ser amigos y que nos una algo tan grande como la familia.

A **Ameyari** mi compañera en este camino, por ser incondicional, gracias por tu amistad, por tu apoyo, por todas esas risas y momentos que hemos vivido juntas, por no rendirte nunca aunque las cosas a veces no salieran como esperábamos, por tu empeño, esfuerzo tenacidad y dedicación para que este proyecto pudiera realizarse, gracias por todo.

A mis amigos, porque siempre hay un poquito de cada uno de ustedes que nos quedamos y conservamos en nosotros mismos, porque nos formamos profesionalmente juntos y aprendimos el uno del otro, a **Karina** por la experiencia temprana de conocernos en este camino, por tú amistad incondicional, a **Aarón** ¿Qué habría sido de los días de universidad sin ti?, a **Alejandra** y todos aquellos que crecieron a mi lado, gracias.

A nuestra asesora de tesis, **M. en C. Guadalupe Amaya**, por su dedicación, apoyo y conocimientos, gracias por todo.

A la **Dra. Clarita** por ser más que una excelente profesora, por brindarnos el tiempo, el compromiso, el conocimiento, y el cariño, sin usted nada de esto sería posible, mi admiración y agradecimiento a usted siempre.

A la **Dra. Guicela** por su colaboración en este proyecto, por cada una de sus enseñanzas, por transmitir sus conocimientos muchas gracias.

A cada uno de mis sinodales por dedicarme su tiempo, tanto en, por sus observaciones, aportes, y sobre todo sus enseñanzas.



A la **Universidad Nacional Autónoma de México** y en particular a la **Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán** por abrirme las puertas de esta gran institución, por brindarme la oportunidad de ser mejor cada día, por darme una de las mejores etapas de mi vida, y el orgullo de pertenecer a la máxima casa de estudios.

Gracias.

*Guadalupe Viridiana Martínez García.*



# ~~DEDICATORIAS~~

## A mis padres, Juan y Patricia ♡

Gracias infinitas por ser los pilares fundamentales de esto, por creer siempre en mí, guiarme con su amor y paciencia, apoyarme en todo momento, gracias por cada desvelo, sacrificio y por hacerme la persona que ahora soy.

No existe regalo que pueda darles para expresarles lo agradecida que estoy con ustedes y lo mucho que los amo, gracias por enseñarme a luchar por lo que quiero y a nunca rendirme, gracias por enseñarme a ser responsable y nunca dejarme sola en este camino.

Sé que este momento tardo en llegar, y ustedes lo anhelaban con la misma emoción que yo, sin ustedes nunca lo hubiera logrado, este logro no sólo es mío, también es de ustedes y al fin puedo decir:

**¡LO LOGRAMOS! ¡LOS AMO!**

## A mi hermana ♡

Adrianita, gracias por ser mi amiga, cómplice, confidente y por todo tu amor; no te imaginas cuanto te amo, gracias por cada momento maravilloso que me has regalado, por cada desvelo, por tu apoyo, por escucharme y darme siempre ánimos para seguir adelante cuando creía que ya no podía, no te imaginas lo orgullosa que estoy de ti, sé que aún te falta, pero estoy segura que serás una excelente profesionalista, espero ser un ejemplo para ti. ¡Gracias infinitas por siempre estar en todo momento, **te amo hermanita!**



# ~~AGRADECIMIENTOS~~

## **A mis tíos y abuelita:**

Esperanza y Humberto: Gracias por su apoyo incondicional a lo largo de este camino, por sus consejos y cariño, por motivarme siempre y sobre todo por creer en mí.

Paquita♥: Gracias por siempre impulsarme a seguir adelante, por todo tu amor y consejos, nunca voy a cansarme de agradecerle a la vida por el enorme ángel que me puso en mí camino, abuelita te amo con toda el alma.

## **A Viri**♥:

¡Amiguita, al fin lo logramos! Sé que el camino para llegar hasta este punto no fue fácil, pero al fin concluimos esta etapa. Quiero agradecerte por tu amistad, sin duda alguna es algo invaluable, por todos los buenos y malos momentos que vivimos juntas, gracias por siempre tener las palabras adecuadas para darme ánimos, por todas las sonrisas, lagrimas, por tu apoyo incondicional, por esas largas pláticas, en fin, ¡gracias por todo!

Aquí está el resultado de un gran esfuerzo, de nuestra paciencia, dedicación y compromiso.

## **A Ale**♥:

¡Ale bebé! Amiguita, gracias por tu amistad durante todo este tiempo, siempre voy a estar agradecida por esa ocasión que nos pusieron a trabajar en equipo y desde ahí comenzó nuestra amistad, gracias por siempre tener las palabras correctas en todo momento, escucharme y aconsejarme cuando lo necesito, por todos los buenos y malos momentos que hemos compartido. Sabes que eres mi mejor amiga y te agradezco por todas las experiencias que hemos vivido juntas, porque sé que cuando te necesito estas ahí, sin importar la hora, ni el momento.

¡GRACIAS! ¡Te adoro amiguita, no sé qué haría sin ti!

## **A mis amigos Áaron, Karina, Alfredo y Frida**

Amiguitos no me queda más que agradecerles por hacer de esta etapa algo único, por todos los buenos momentos que compartimos y seguimos compartiendo, por todas las risas y esas pláticas tan amenas, por su apoyo incondicional a lo largo de este tiempo, gracias por siempre darme ánimos para llegar hasta este momento.

Alfredo y Áaron gracias por su hermosa amistad desde la preparatoria, no se imaginan cuanto la valoro y quiero.



¡Los adoro!

**A Juan♥:**

Por tu apoyo incondicional durante todo este tiempo e impulsarme de una u otra forma a seguir adelante y no darme por vencida, por ayudarme a encontrarle el lado bueno a todo.

Eres alguien muy importante para mí y te agradezco el estar siempre pendiente, gracias por todo, por hacer más amena esta etapa y por hacer de mí una mejor persona, las palabras no bastan para expresarte todo lo que siento.

**A la Doctora Clara Inés:**

Por su apoyo incondicional, tiempo y dedicación, por compartirnos parte de sus conocimientos, gracias a usted por su apoyo para llegar hasta este punto, agradezco infinitamente el que nos haya brindado todo su tiempo, paciencia y dedicación, pero sobre todo por creer y confiar en nosotras para la realización de este proyecto.

**A la M. en C. María Guadalupe**

Por su apoyo, ayuda y sabiduría para guiarnos hasta este punto, por ayudar a culminar esta meta tan importante para nosotras, de igual manera por guiarnos e impulsarnos a mejorar nuestro trabajo, y por el tiempo que nos dedicó.

**A la Doctora Guicela:**

Por su tiempo invertido en los largos días de trabajo, por su paciencia cuando las cosas parecían difíciles para nosotras, por sus conocimientos y sobre todo por compartirlos con nosotras.

**A mis sinodales:**

A la QFB Martha Patricia Zuñiga, M. en C. Ana María Soto, M. en C. Ana María de la Cruz, I.A. Dulce Oliver; por el tiempo que invirtieron en la revisión de este proyecto, gracias por sus observaciones e ideas para mejorar este trabajo.



**A mis profesores durante la carrera:**

Por su apoyo, paciencia, y el tiempo que nos dieron para transmitirnos sus conocimientos, gracias por ser parte de nuestra formación académica y hacer de nosotras las profesionistas de hoy.

**A la Universidad Nacional Autónoma de México:**

Por permitirme ser parte de la máxima casa de estudios, es un orgullo para mí el haber pertenecido a esta gran institución, pero sobre todo quiero agradecerle a la **Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán**, por darme la oportunidad de lograr formarme académicamente y de cumplir uno de mis más grandes sueños.

Con cariño **Ameyari Monserrat Pérez Jiménez**



# CONTENIDO

ÍNDICE DE TABLAS .....	I
ÍNDICE DE FIGURAS .....	II
RESUMEN .....	IV
INTRODUCCIÓN .....	1
1. ANTECEDENTES .....	3
1.1. Cabras .....	3
1.1.1. Leche de cabra y su producción en México .....	3
1.2. Género <i>Listeria</i> .....	5
1.3. <i>Listeria monocytogenes</i> .....	7
1.3.1. Características generales .....	7
1.3.2. Reservorio .....	10
1.3.3. Importancia en los alimentos y salud pública .....	11
1.3.4. Patogenicidad .....	14
1.3.5. Virulencia .....	17
1.3.6. Listeriosis en humanos .....	23
1.4. Reacción en Cadena de la Polimerasa .....	25
1.4.1. Fundamento .....	25
1.4.2. Etapas de la PCR .....	25
1.4.3. Componentes .....	27
1.4.4. Electroforesis .....	28
2. METODOLOGÍA .....	30
2.1. Objetivos .....	30
2.2. Cuadro metodológico .....	31
2.3. Materiales y métodos .....	32
2.3.1. Preparación de las muestras .....	32
2.3.2. Aislamiento de <i>Listeria</i> .....	32
2.3.3. Purificación de las colonias sospechosas de <i>Listeria</i> .....	33
2.3.4. Identificación del género <i>Listeria spp</i> por pruebas bioquímicas .....	35
2.3.5. Identificación de las especies de <i>Listeria</i> .....	38
2.3.6. Confirmación molecular de la especie <i>Listeria monocytogenes</i> .....	40

2.3.7. Extracción de ADN.....	41
2.3.8. Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) .....	47
2.3.9. Determinación de la virulencia de <i>Listeria monocytogenes</i> por PCR. ....	49
3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	52
3.1. Aislamiento de <i>Listeria</i> .....	52
3.1.2. Identificación del género <i>Listeria spp.</i> por pruebas bioquímicas tradicionales...	53
3.1.3. Identificación de las especies de <i>Listeria</i> mediante un medio cromogénico. ....	54
3.2. Extracción de ADN de cepas de <i>L. monocytogenes</i> .....	57
3.3. Confirmación de <i>L. monocytogenes</i> por PCR.....	59
3.4. Virulencia potencial de <i>L. monocytogenes</i> .....	62
CONCLUSIONES.....	67
RECOMENDACIONES .....	68
REFERENCIAS .....	70
Anexo 2.....	94



# ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Diferenciación de especies de <i>Listeria</i> .....	6
<b>Tabla 2.</b> Serología de las diferentes especies de <i>Listeria</i> .....	9
<b>Tabla 3.</b> Brotes de listeriosis asociados con el consumo de alimentos contaminados. ....	12
<b>Tabla 4.</b> Estudios realizados sobre la frecuencia de aislamiento de <i>L. monocytogenes</i> en alimentos.....	13
<b>Tabla 5.</b> Principales factores de virulencia de <i>Listeria monocytogenes</i> involucrados en el ciclo intracelular .....	19
<b>Tabla 6.</b> Muestras donadas de trabajos previos. ....	41
<b>Tabla 7.</b> Cebadores específicos para la detección del gen <i>iap</i> que codifica la proteína <i>p60</i> común en todas <i>Listeria monocytogenes</i> . ....	47
<b>Tabla 8.</b> Cantidad de los componentes utilizados en la PCR. ....	47
<b>Tabla 9.</b> Condiciones del programa de PCR, detección del gen <i>iap</i> .....	48
<b>Tabla 10.</b> Cebadores específicos para los genes internos de <i>Listeria monocytogenes</i> ( <i>inlC</i> e <i>inlJ</i> ).....	49
<b>Tabla 11.</b> Componentes y cantidad para llevar a cabo la PCR. ....	50
<b>Tabla 12.</b> Condiciones del programa de PCR, detección de los genes <i>inlC</i> e <i>inlJ</i> .....	51
<b>Tabla 13.</b> Muestras de leche de cabra provenientes del Estado de Chiapas. ....	86
<b>Tabla 14.</b> Diferenciación de especies de <i>Listeria</i> y <i>Corynebacterium</i> . ....	94
<b>Tabla 15.</b> Resultados de la pruebas bioquímicas realizadas. ....	95
<b>Tabla 16.</b> Resultados de prueba de fermentación de hidratos de carbono y ureasa. ....	99



# ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Gráfica de la ubicación de México como país productor de leche de cabra en el 2009 (Ducoin, 2015). .....	4
<b>Figura 2.</b> Morfología de <i>Listeria monocytogenes</i> (Uta Gasanov, 2005).....	8
<b>Figura 3.</b> Esquema del ciclo intracelular de <i>Listeria monocytogenes</i> 1. Entrada en la célula hospedera; 2. Sobrevivencia dentro de la vacuola fagocítica; 3. Disrupción de las membranas del fagosoma y escape al citosol; 4. Replicación en el citosol; 5. Movimiento a través de la polimerización de actina; 6. Propagación célula-célula; 7. Sobrevivencia en fagosomas secundarios; 8. Escape del fagosoma secundario y reinicio del ciclo (Vera et al., 2014). .....	15
<b>Figura 4.</b> Organización física y transcripcional de genes de virulencia de <i>Listeria monocytogenes</i> (Vázquez-Boland et al., 2001). .....	18
<b>Figura 5.</b> Diagrama de la patogenia asociada a la infección por <i>Listeria monocytogenes</i> (Garza-Velasco et al., 2010). .....	24
<b>Figura 6.</b> Etapas de la PCR (Khanacademic, 2017).....	27
<b>Figura 7.</b> Cámara de electroforesis (Khanacademic, 2017).....	29
<b>Figura 8.</b> Diagrama de identificación y confirmación de <i>L. monocytogenes</i> .....	34
<b>Figura 9.</b> Principio de la prueba de oxidación/fermentación.....	37
<b>Figura 10.</b> Mecanismo de reacción medio cromogénico CHROMagar™ identificación <i>Listeria</i> (CHROMagar™, 2017).....	39
<b>Figura 11.</b> Método de detección en CHROMAGAR™ identificación de <i>Listeria</i> .....	40
<b>Figura 12.</b> Kit Wizard® Genomic DNA. ....	42
<b>Figura 13.</b> Preparación de la muestra para la extracción de ADN. ....	43
<b>Figura 14.</b> Purificación del ADN. ....	43
<b>Figura 15.</b> Precipitación de ADN.....	44
<b>Figura 16.</b> Lavado del ADN.....	44
<b>Figura 17.</b> Disolución del ADN.....	45
<b>Figura 18.</b> Electroforesis en gel de agarosa. ....	46
<b>Figura 19.</b> Programa de PCR para la detección del gen <i>iap</i> y con este la identificación de <i>Listeria monocytogenes</i> . .....	49
<b>Figura 20.</b> Programa de PCR para la detección de los genes <i>inlC</i> e <i>inlJ</i> para evidenciar la virulencia potencial de <i>Listeria monocytogenes</i> . ....	51
<b>Figura 21.</b> Aislamiento de <i>Listeria spp</i> de muestras de leche de cabra.....	52
<b>Figura 22.</b> Purificación en agar BHI de las posibles <i>Listerias</i> .....	52
<b>Figura 23.</b> Pruebas bioquímicas para la identificación de cepas sospechosas de <i>Listerias</i> . 53	
<b>Figura 24.</b> Prueba de fermentación de hidratos de carbono (salicina, ramnosa, lactosa, manitol y xilosa), tubo izquierdo sin reacción, tubo izquierdo reacción positiva. ....	54
<b>Figura 25.</b> Aspecto típico de las colonias de <i>Listeria monocytogenes</i> , <i>L. innocua</i> y <i>L. ivanovii</i> . .....	54
<b>Figura 26.</b> Resultados en CHROMagar™ <i>Listeria</i> . ....	56
<b>Figura 27.</b> Identificación de <i>Listeria monocytogenes</i> en medios de CHROMagar™ <i>Listeria</i> . .....	56



**Figura 28.**Electroforesis para verificar la integridad del ADN, gel de agarosa al 1%, 4 $\mu$ l BRET, 5 $\mu$ l ADN, 2 $\mu$ l colorante, control positivo (*L. monocytogenes* 4524) muestras 1-5. 57

**Figura 29.** Marcador de peso molecular (Promega) de 10 kbp en un gel de agarosa al 1 %.  
..... 58

**Figura 30.**Productos de PCR empleando los cebadores LIM2 y LIMRE para la detección del gen *iap* con un amplificado de 175 pb, gel de electroforesis de agarosa al 1.5%, marcador de peso molecular de 1000 pb, control positivo de *L. monocytogenes* EDCP60, control negativo y las 15 cepas sospechosas de *L. monocytogenes* ..... 60

**Figura 31.** Productos de PCR para la detección del gen *inlC* con un amplificado de 517 pb, gel de electroforesis de agarosa al 1.5% marcador de peso molecular de 1000 pb, control negativo y positivo de *L. monocytogenes* ATCC 43249, y 15 cepas sospechosas de *L. monocytogenes*. ..... 63

**Figura 32.**Productos de PCR para la detección del gen *inlJ* con un amplificado de 238 pb, gel de electroforesis de agarosa al 1.5% marcador de peso molecular de 1000 pb, control negativo y positivo de *L. monocytogenes* ATCC 43249, y 15 cepas sospechosas de *L. monocytogenes*. ..... 64



# RESUMEN

*Listeria monocytogenes* es considerado un agente patógeno causal de brotes severos de listeriosis en humanos y animales, una de las vías de transmisión es por la ingesta de alimentos contaminados con dicha bacteria. Algunos alimentos de primera necesidad como la leche y la carne, que se han aprovechado para la alimentación ya sea empleándola directamente o transformándola para la obtención de productos como queso, yogurt, mantequilla o de la carne. La leche y la carne son materia muy perecedera, susceptible a contaminación y aunque proceda de animales sanos y haya sido obtenida mediante los procedimientos adecuados, su mala manipulación también puede implicar una contaminación con este microorganismo.

La oportuna detección de *Listeria monocytogenes* es imprescindible para que se puedan tomar las medidas y decisiones adecuadas, en menor tiempo para dar solución al problema. Para llevar a cabo esto, existen técnicas moleculares en las que se puede extraer ADN del microorganismo a partir de cantidades pequeñas de muestra y ser amplificados los genes que permitan conocer otras características de interés, mediante la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa, (PCR) que en corto tiempo ofrece grandes ventajas sobre las técnicas morfológicas tradicionales, además de rapidez y alta especificidad.

Por lo cual el objetivo de este trabajo fue aislarla inicialmente y luego confirmar su especie y su virulencia potencial mediante la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa utilizando genes específicos (internalinas *inlC* e *inlJ*).



# INTRODUCCIÓN

Los alimentos son la fuente principal de exposición a agentes patógenos, tanto químicos como biológicos (virus, parásitos y bacterias), a los cuales nadie es inmune. Cuando estos se contaminan en niveles inadmisibles de agentes patógenos y contaminantes químicos, conllevan riesgos sustanciales para la salud de los consumidores ya que en el intestino pueden multiplicarse o invadir la pared intestinal y desde allí pueden afectar otros aparatos o sistemas. Los alimentos pueden ser alterados por diferentes géneros bacterianos, y a su vez pueden servir como vehículo de patógenos o sus toxinas, lo que se representa en grandes pérdidas económicas para las naciones (Downes & Ito, 2001).

Las enfermedades transmitidas por alimentos (ETA) pueden generarse a partir de un alimento o de agua contaminada y son llamadas así porque el alimento actúa como vehículo de transmisión de organismos dañinos y sustancias tóxicas (Ruiz, 2016), estas tienen un gran impacto económico y en la salud pública en todo el mundo (Mead *et al.*, 1999). Generalmente los microorganismos contaminan los alimentos en pequeñas cantidades, y deben encontrar en ellos las condiciones adecuadas para sobrevivir y multiplicarse hasta alcanzar los niveles necesarios para ser infectantes o producir la suficiente toxina para causar la enfermedad (ICMSF, 1980).

Las manifestaciones de las toxiinfecciones alimentarias son generalmente de tipo gastrointestinal, aunque en muchos casos el cuadro clínico puede ser principalmente de tipo extra-intestinal; por ejemplo: brucelosis, tifoidea, botulismos, etcétera. Cada vez más, se acepta la transmisión de patógenos por alimentos en síndromes tóxicos, respiratorios y enfermedades crónicas (Parrilla-Cerrillo *et al.*, 1993).

La listeriosis es una enfermedad transmitida por alimentos (ETA) ocasionada por *Listeria monocytogenes*. La importancia de ésta se debe a su impacto clínico, a la alta tasa de mortalidad entre 20-30% (Roche *et al.*, 2001) y al efecto económico derivado de los brotes asociados con el consumo de alimentos contaminados. En México, las fallas en los sistemas de vigilancia epidemiológicos son causa de información imprecisa sobre la incidencia de la listeriosis y sobre su caracterización como ETA. Además de que los estudios epidemiológicos sobre la incidencia, formas clínicas de la listeriosis, y sobre su presencia en los alimentos son escasos (Castañeda *et al.*, 2014).

La contaminación de los alimentos con *L. monocytogenes* y su consecuente participación como agente responsable de enfermedades transmitidas por los alimentos son, por lo general, el resultado de eventos simultáneos que se presentan en varios puntos de la cadena alimentaria, entre los que se incluyen:

- a) Alimentos y fuentes de contaminación del medio ambiente
- b) Condiciones que favorecen el crecimiento del patógeno (Lianou & Sofos, 2007).
- c) Falta de buenas prácticas de higiene y de programas de monitoreo en la cadena alimentaria (Castañeda *et al.*, 2014)



La leche y los productos lácteos han sido involucrados frecuentemente en brotes de listeriosis en humanos (Eilertz *et al.*, 1993; McDonough& Wiedmann, 2004). Las granjas posiblemente sirvan como fuentes directas o indirectas de cepas de *L. monocytogenes* que son introducidas en la cadena de alimentación humana, éstas también representan ecosistemas que podrían facilitar el surgimiento de subtipos nuevos y más virulentos de este patógeno en un ambiente de alta frecuencia de transmisión (Ramírez *et al.*, 2014). La importancia de las cabras como proveedoras de alimentos, como la carne y la leche se ha reflejado en el incremento de la población caprina y la producción de sus derivados (FAO, 2007).

Nuestro país ocupa el segundo lugar en América Latina como productor de cabras, después de Brasil, y el 16avo en el mundo. Se estima que en todo el país existen alrededor de un millón 200 mil productores, que generan alrededor de 200 millones de litros de leche de cabra (SAGARPA, 2016a).

En México, la leche cruda es ampliamente consumida y la incidencia de enfermedades causadas por leche contaminada es desconocida. *L. monocytogenes* ha sido detectada en leche sin pasteurizar y en quesos elaborados con leche de cabra y vaca (Vázquez *et al.*, 2001).



# 1. ANTECEDENTES

## 1.1. Cabras

### 1.1.1. Leche de cabra y su producción en México

La leche es el producto que segrega la ubre de las hembras, cuyo color es blanco cremoso, líquida, de olor y sabor característicos. Es rica en nutrientes y muy fácil de contaminarse si no se obtiene de forma adecuada. Por regla general puede decirse que la leche de cabra es un líquido de color blanco mate y ligeramente viscoso, cuya composición y características físicoquímicas varían sensiblemente. Entre los factores que contribuyen a estas variaciones se tiene: la raza, alimentación, estación del año, condiciones ambientales, localidad, estado de lactación y salud de la ubre (Park, 2007a; Park *et al.*, 2007).

La leche de cabra es más blanca que la de vaca, a causa de no contener carotenos, que amarillean a esta última. Esta posee un olor fuerte, como consecuencia de la absorción de compuestos aromáticos durante su manejo, generalmente inadecuado, con la presencia de machos en los lugares de ordeño, mala higiene de los establos al que queda expuesta la leche, tardanza en el filtrado y enfriamiento tras el ordeño; sabor y olor que, por otro lado, se pueden eliminar en gran parte por un sencillo tratamiento de desodorización al vacío (Borras, 1968).

Se diferencia también de la leche de vaca en que ésta es ligeramente ácida, mientras que la de cabra es casi alcalina (pH 6.7), debido a su mayor contenido proteico y a las diferentes combinaciones de sus fosfatos (Saini & Gilí, 1991), por lo que esta leche se utiliza en personas con problemas digestivos (Jandall, 1996).

De igual manera a leche de cabra se parece en su composición a la leche materna, es sana y nutritiva y es una alternativa válida como sustituto de la humana pues sus valores nutritivos son en gran medida aproximados. Muchas personas a quienes la leche de vaca les provoca reacciones alérgicas, pueden beber leche de cabra sin inconvenientes pues contiene una proteína de diferente tipo. Es un producto que poco a poco se hace más popular en los mercados mundiales, más allá de las fronteras de aquellos países donde en la actualidad es ya uno de los componentes principales de la dieta de millones de personas (Bidof, 2017).

La leche de cabra es un alimento saludable y nutritivo; rico en vitaminas, minerales, grasa y lactosa, posee grandes beneficios como una alta digestibilidad, así mismo, cuenta con propiedades terapéuticas, entre otras, se consume como leche fluida y transformada en quesos, cajeta, yogurt, dulces y en productos como jabones, cremas, cosméticos (SAGARPA, 2016b). Desde el punto de vista tecnológico, la composición de la leche determina su calidad nutritiva, sus propiedades y su valor como materia prima para fabricar productos alimenticios. La leche de cabra posee los mejores valores nutricionales y terapéuticos; sólo la supera la leche materna humana con alta calidad nutricional y de sabor agradable; las propiedades terapéuticas de la leche de cabra se reconocen desde los inicios de la civilización, al mostrar poder contra los malestares gastrointestinales (Flores-Córdova *et al.*, 2009).

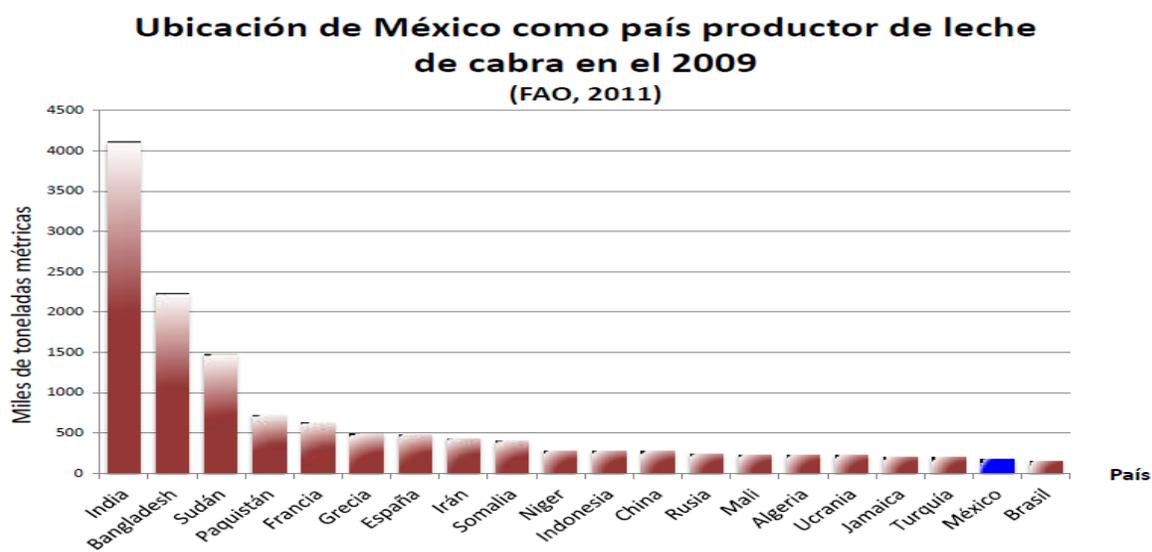


La demanda de leche de cabra se ha incrementado debido fundamentalmente a la respuesta de consumo por el crecimiento poblacional y por especial interés en los países desarrollados hacia los productos de la leche de cabra, especialmente quesos y yogurt, ya que estos pueden ser consumidos por grupos de personas que presentan intolerancia a los lácteos de origen bovino. Por su composición, la leche de cabra se encuentra asociada con ciertos beneficios nutrimentales en niños, así como en el desarrollo de alimentos funcionales y productos derivados con características sensoriales demandadas por consumidores. Este alimento y sus derivados, son también una opción para dinamizar las economías regionales (Arbiza, 1996; Haenlein, 2004; Vega & León *et al.*, 2010).

En la producción de leche de cabra, las buenas prácticas son muy importantes para asegurar la salud del animal y la calidad e inocuidad de los productos (leche), que podrán ser consumidos por las personas con entera confianza. Estas prácticas abordan desde las instalaciones y la infraestructura adecuada; un buen manejo en la alimentación de los animales (garantizándole al ganado el equilibrio nutricional que cubra sus necesidades de proteínas, vitaminas, minerales, entre otros); sanidad y salud animal (cuadro de vacunas, desparasitaciones, detección de enfermedades, manejo de desechos, etc.); buen manejo del ganado en todas las etapas fisiológicas (SAGARPA, 2016b).

En México el 60% de leche de cabra es transformada en quesos, crema, mantequilla o yogurt, un 35% sirve para la preparación de dulces regionales, natilla y cajeta y solo el 5% es consumida como leche fresca. La producción de leche caprina representa poco menos del 2% del total de la leche producida, en la figura 1 se muestra una gráfica de la producción de leche en el mundo, ubicando en el lugar correspondiente a México (Ducoing, 2015).

En México el inventario caprino en 2012 de acuerdo con SIAP (2014) fue de 8,743,639 cabezas. La producción de carne en toneladas para el año 2012 (SIAP, 2014) fue de 80,877 toneladas en pye y de 155,636 miles de litros de leche.



**Figura 1.** Gráfica de la ubicación de México como país productor de leche de cabra en el 2009 (Ducoing, 2015).



## 1.2. Género *Listeria*

El género *Listeria* consiste en un grupo de bacterias Gram positivas de bajo contenido de G+C estrechamente relacionadas con el bacilo, *Clostridium*, *Enterococcus*, *Streptococcus* y *Staphylococcus* (Vazquez-Boland *et al.*, 2001), está compuesto por pequeños bacilos de extremos redondeados de 0.4-0.5 µm de diámetro y 0.5-2 µm de longitud. No forman cápsulas ni esporas y son anaerobios facultativos. Gracias a unos pocos flagelos peritricos, son móviles a 20-25°C aunque no a 37°C (Sun *et al.*, 1990; Swanson & Baer, 1995). Este microorganismo crece a temperaturas que oscilan entre menos 0 y 45 °C, tolera diferentes rangos de pH (4.5-9.2) y sobrevive a altas concentraciones de NaCl (10% w/v) (Rocourt & Buchrieser, 2007), aún cuando sus límites de crecimiento son de -4 a 45°C, incluso puede sobrevivir por varias semanas a -18°C (ICMSF, 1996). 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 (Torres *et al.*, 2005).

En medios sólidos forma pequeñas colonias tras 24-48 horas, de 1 mm de diámetro, redondeadas, convexas y translúcidas con una coloración gris azulada que se torna en iridiscencia azul-verdosa si se ilumina oblicuamente (Gregory *et al.*, 1996; Sánchez-Campillo *et al.*, 1990).

Este género está constituido por seis especies: *Listeria innocua*, *Listeria weishimeri*, *Listeria seeligeri*, *Listeria ivanovii*, *Listeria grayi*, *Listeria monocytogenes* (Seeliger & Jones, 1986; Torres *et al.*, 2005), así como dos nuevas especies identificadas recientemente, en el año 2009, *Listeria marthii* y *Listeria rocourtiae* (Graves *et al.*, 2010; Leclercq *et al.*, 2010). Únicamente dos especies de este género son patogénicas: *L. monocytogenes* asociada con infección en humanos y animales y *Listeria ivanovii* asociada únicamente en animales (Seeliger & Jones, 1986; Torres *et al.*, 2005). Las otras cuatro especies de *Listeria* (*innocua*, *weishimeri*, *seeligeri*, *grayi*) son esencialmente saprófitas y se han adaptado para su supervivencia en el suelo y la vegetación en decadencia (Sleator *et al.*, 2003). Se han aislado tanto del suelo como de aguas residuales, de vegetales en descomposición, de heces animales, de salas de mataderos, así como de alimentos frescos, ahumados y congelados (Stuart & Welshimer, 1973). En los rumiantes, la infección por *Listeria* se transmite por el consumo de ensilado, en el cual estas bacterias se multiplican fácilmente (Vázquez-Boland *et al.*, 1996). También es frecuente identificar portadores humanos y animales. Es decir, son microorganismos extraordinariamente ubicuos y resistentes, con un estilo de vida esencialmente saprofita (Swanson & Baer, 1995). Al menos el 90% de los casos reportados de infección por *Listeria* han sido relacionados con el consumo de productos alimenticios contaminados (Liu *et al.*, 2005).

Se puede distinguir a *Listeria spp.*, de bacterias similares por medio de reacciones bioquímicas, como son la fermentación de azúcares, actividad lipolítica y hemolítica, prueba de CAMP (tabla 1). Las proteínas responsables de la hemólisis de *Listeria* en agar



sangre han sido identificadas en *L. monocytogenes* (listeriolisina o LLO), *L. ivanovii* (ivanolisina o ILO) y *L. seeligeri* (seeligeriolisina o SLO) (Wagner & McLauchlin, 2008).

**Tabla 1.** Diferenciación de especies de *Listeria*

<b>Prueba</b>	<i>Listeria grayi</i>	<i>Listeria innocua</i>	<i>Listeria ivanovii</i>	<i>Listeria monocytogenes</i>	<i>Listeria seeligeri</i>	<i>Listeria welshimeri</i>
<b>Catalasa</b>	+	+	+	+	+	+
<b>Glucosa</b>	A	A	A	A	A	A
<b>Lactosa</b>	A	A	A	V	NR	NR
<b>Manitol</b>	A	-	-	-	-	-
<b>Maltosa</b>	+	+	+	+	+	+
<b>Ribosa</b>	V	-	A	-	-	-
<b>Ramnosa</b>	-	V	-	A	-	V
<b>Xilosa</b>	-	-	A	-	A	A
<b>Hidrólisis de la esculina</b>	+	+	+	+	+	+
<b>Indol</b>	-	-	-	-	-	-
<b>Rojo de metilo (MR)</b>	+	+	+	+	+	+
<b>Ureasa</b>	-	-	-	-	-	-
<b>Voges-Proskauer (VP)</b>	+	+	+	+	+	+
<b>Hemólisis</b>	-	-	+	+	+	-
<b>Prueba de CAMP (<i>S. aureus</i>)</b>	-	-	-	+	+	-
<b>Prueba de CAMP (<i>R. equi</i>)</b>	-	-	+	-	-	-

Fuente: Mac Faddin, 2003; NOM-143-SSA1-1995



### 1.3. *Listeria monocytogenes*

*Listeria monocytogenes* fue aislada e identificada en 1924 como el agente etiológico de la listeriosis, una enfermedad septicémica que afectaba a los conejos y a los conejillos de Indias en un laboratorio en Cambridge en Inglaterra (Hof, 2003; Murray *et al.*, 1926), el proceso se caracterizaba por la presencia de lesiones necróticas en hígado, acompañadas de leucocitosis monocitocitaria (monocitosis) (González & Suárez, 2001) más tarde se hizo evidente que la enfermedad también afectaba a los seres humanos, (McLauchlin, 1996).

Los primeros casos de listeriosis humanos fueron divulgados en 1929 en Dinamarca (Nyfelt, 1929). Sin embargo, la primera cultura registrada de *L. monocytogenes* data de 1921, con la bacteria aislada en Francia por Dumont y Cotoni de un paciente con meningitis (Dumont & Cotoni, 1921; Seeliger, 1988).

Aunque *L. monocytogenes* es un importante patógeno transmitido por los alimentos, la especie engloba un espectro de cepas con variada virulencia y patogenicidad. Mientras que muchas cepas de *L. monocytogenes* son naturalmente virulentas y capaces de producir morbilidad y mortalidad significativas, otras son avirulentas e incapaces de establecer una infección en los mamíferos de los hospedadores (Roche *et al.*, 2001; Liu *et al.*, 2003). Es un patógeno facultativo intracelular que puede ingresar y multiplicarse tanto en fagocitos (Mackness, 1962) como en células no fagocíticas (Gaillard *et al.*, 1987; Khelef *et al.*, 2005). Después de la ingestión de alimentos contaminados (figura 1), algunas bacterias cruzan la barrera intestinal y obtienen acceso al hígado y al bazo a través del torrente sanguíneo. En estos dos órganos, la mayoría de las bacterias son eliminadas por el sistema inmunitario. En personas inmunocomprometidas y mujeres embarazadas, las bacterias pueden cruzar la estrecha barrera hemato-encefálica y la barrera materno-fetal, respectivamente, y alcanzar el sistema nervioso central y la placenta (Cabanés *et al.*, 2002).

#### 1.3.1. Características generales

*Listeria monocytogenes* es un patógeno intracelular facultativo extensamente difundido en la naturaleza y que se encuentra adaptado para vivir, tanto en suelo como en el citosol de la célula eucariota. Comprende bacilos gram positivos que pueden estar solos o formando cadenas cortas, no producen cápsulas ni esporas (Vera *et al.*, 2013), anaerobio facultativo, con capacidad de formar biopelículas (Zunabovic *et al.*, 2011).

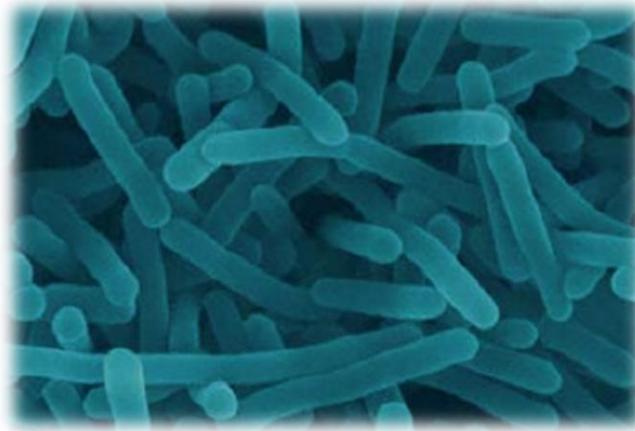
**Crecimiento:** La *Listeria monocytogenes* es organismo no exigente esto se debe a que se puede reproducir en medios sintéticos simples. El carbohidrato ideal para el crecimiento de *L. monocytogenes* es la glucosa, no puede ser sustituido como fuente de energía o de carbono por gluconato, xilosa, arabinosa, o ribosa. La sangre y el suero no son requisitos estrictos para el crecimiento, sin embargo, mejorarán el crecimiento del organismo en medios con factores de crecimiento limitados. Las cepas de *L. monocytogenes* difieren en sus necesidades de vitaminas del grupo B, algunas cepas requieren piridoxina y riboflavina. Un



medio óptimo para el crecimiento de *L. monocytogenes* debe incluir glucosa, riboflavina y biotina, junto con cuatro aminoácidos (isoleucina, leucina, valina, y cisteína), y presencia de  $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Ca}^{2+}$  (Ryser & Marth, 1991). Uno de los medios más utilizados para la detección de *L. monocytogenes* el medio Fraser ya que es un medio de enriquecimiento que contiene peptonas, extracto de carne y extracto de levadura las cuales proporcionan nitrógeno, vitaminas y minerales (Uta Gasanov, 2005).

**Temperatura:** Es capaz de crecer en un amplio rango de temperaturas, entre 0 y 45°C, aunque su temperatura óptima de crecimiento está comprendida entre 30 y 37°C.

**Morfología:** Es un bacilo gram positivo regular (0.5  $\mu\text{m}$  de diámetro y 1 a 2  $\mu\text{m}$  de longitud) con extremos redondeados, se encuentra como unidades únicas o en cadenas cortas, o pueden estar en forma de V, Y o en empalizadas (Figura 2).



**Figura 2.** Morfología de *Listeria monocytogenes* (Uta Gasanov, 2005)

**Movilidad:** Su movilidad depende de la temperatura, con un rango óptimo entre 5 y 20°C expresando de 1 a 5 flagelos peritricos en toda su superficie entre 20 y 22°C y siendo inmóvil a 37°C (González & Suárez, 2001).

**pH:** El rango de pH permisivo para *Listeria* se encuentra definido entre 5 y 9, pudiendo tolerar medios con una concentración de 10% de cloruro sódico (González & Suárez, 2001), características que le permiten crecer en suelo, cuerpos de agua, agua residual y alimentos (Zunabovic *et al.*, 2011). Aunque su crecimiento óptimo se produce a pH neutro o ligeramente alcalino (Gregory *et al.*, 1996).

**Ecología:** El microorganismo está distribuido abundantemente en la naturaleza; se ha aislado de ríos, aguas negras, tierra, fango, silos y vegetación. *Listeria monocytogenes* infecta diversas especies de aves y mamíferos, y algunos crustáceos y garrapatas (Hernández, 2016).



**Oxígeno:** *Listeria monocytogenes* crece sin problemas en condiciones aerobias y microaerófilas. El crecimiento óptimo se produce en una atmósfera constituida por 5% de oxígeno y 5.10% de dióxido de carbono.

El crecimiento de esta bacteria en agar sangre demuestra su actividad  $\beta$ -hemolítica, aunque a veces sólo se aprecie una estrecha zona de hemólisis. Este microorganismo es homofermentativo, rindiendo lactato, acetato y acetoína al metabolizar la glucosa en aerobiosis (Escobedo, 2014).

**Serotipos:** Considerando los antígenos somático (O) y flagelar (H), las cepas de *L. monocytogenes* pueden ser clasificadas en 13 serotipos (1/2a, 1/2b, 1/2c, 3a, 3b, 3c, 4a, 4ab, 4b, 4c, 4d, 4e, 7); sin embargo, se ha determinado que sólo 3 (1/2a, 1/2b y 4b), son responsables de más de 98% de los casos de listeriosis en humanos (Vázquez-Boland *et al.*, 2001; Velge & Roche, 2010; Buchrieser, 2007), llegando a ocasionar cuadros clínicos muy graves en el hombre, como septicemia, gastroenteritis, meningitis y encefalitis. El grupo de mayor riesgo comprende a los recién nacidos, individuos inmunocomprometidos, mujeres embarazadas y adultos mayores (Vera *et al.*, 2013).

En la tabla 2 se muestran las relaciones serológicas del género *Listeria*.

**Tabla 2.** Serología de las diferentes especies de *Listeria*

Especie	Serotipo
<i>L. monocytogenes</i>	1/2 a, 1/2 b, 1/2 c, 3a, 3b, 3c, 4a, 4ab, 4c, 4d, 4e, 7
<i>L. ivanovii</i>	5
<i>L. innocua</i>	4ab, 6a, 6b
<i>L. welshimeri</i>	6a, 6b
<i>L. seeligeri</i>	1/2 b, 4c, 4d, 6b

**Fuente:** Torres *et al.*, 2005

Entre las serovariedades asociadas a listeriosis, las cepas 4b causan más del 50% de los casos en todo el mundo, pero las cepas del grupo antigénico 1/2 (1/2a, 1/2b y 1/2c) predominan en los aislamientos a partir de alimentos; esto sugiere que las cepas serotipo 4b están más adaptadas a tejidos del hospedero mamífero que las cepas del serogrupo 1/2 (Torres *et al.*, 2005).

Los estudios filogenéticos y de subtipificación han mostrado que *L. monocytogenes* forma una población estructurada, compuesta de cuatro linajes divergentes, designados como I, II, III y IV (Orsi *et al.*, 2011). Los linajes I y II incluyen a la mayoría de los aislados vinculados a los casos clínicos de listeriosis. El linaje I agrupa a los serotipos 1/2b, 3b y 4b



y se le ha identificado un mayor potencial patogénico que el linaje II, el que está compuesto por los serotipos 1/2a, 1/2c, 3a y 3c (Orsi *et al.*, 2011; Ward *et al.*, 2008). Los linajes III y IV agrupan a cepas de los serotipos 4a, 4c y un 4b atípico (Orsi *et al.*, 2011).

### 1.3.2. Reservorio

*Listeria monocytogenes* es un microorganismo ubicuo. Se encuentra en el intestino de animales y personas que actúan como portadores, también, ampliamente distribuido en ambientes naturales como suelo, agua, efluentes, pastos y ensilados dónde sobreviven durante períodos extensos de tiempo. También se encuentra en el suelo, paredes, techos y equipos de plantas de procesamiento de alimentos y se ha aislado de una gran variedad de alimentos listos para consumo (RTE) de origen vegetal, lácteo, marino o cárnico y en ensaladas y frutas. Los alimentos listos para consumo (RTE) se consideran como aquéllos preparados para su consumo directo sin necesidad de cocción u otros tratamientos culinarios que reduzcan a un nivel aceptable la presencia de microorganismos preocupantes (Schöbitz *et al.*, 2009).

Los alimentos más frecuentemente implicados son los quesos blandos y los productos lácteos, patés y embutidos, pescados ahumados, ensaladas, "delicatessen", y en general producidos industrialmente, refrigerados productos listos para consumir que se comen sin cocinar (Farber & Peterkin, 1991). En los rumiantes, la infección por *Listeria* se transmite por el consumo de ensilado, en el cual estas bacterias se multiplican fácilmente, resultando en brotes de hatos (Fenlon, 1990). *Listeriamonocytogenes* se difunde ampliamente en el medio rural y, en consecuencia, contaminan las materias primas utilizadas en la preparación de alimentos procesados industrialmente y en las plantas de producción. Estas bacterias están bien equipadas para sobrevivir a las tecnologías de procesamiento de alimentos. Por ejemplo, toleran altas concentraciones de sal y pH relativamente bajo, y lo peor de todo, son capaces de multiplicarse a temperaturas de refrigeración. Esto hace que los microorganismos de la *Listeriamonocytogenes* sean una grave amenaza para la inocuidad de los alimentos y los sitúa entre los microorganismos que más afectan a la industria alimentaria (Vazquez-Boland *et al.*, 2001).

Por ello, alimentos potencialmente contaminados con *Listeria* son:

**Carne de rumiantes, otros animales de abasto y aves:** Aunque la prevalencia de *L. monocytogenes* en carnes difiere significativamente, algunos estudios han citado tasas de prevalencia de hasta el 92% de los productos analizados. La presencia de *L. monocytogenes* en las canales se atribuye a su contaminación durante el desollado. Un número elevado de animales de abasto (11-52%) se consideran portadores sanos. En mataderos, la presencia de *L. monocytogenes* puede ser endémica, particularmente en efluentes y suelos (Pascual & Calderon, 2000).



**Leche y derivados lácteos:** *Listeria monocytogenes* se ha descrito en leches y derivados lácteos y en plantas de procesamiento de dichos alimentos, así como en productos pasteurizados y en derivados frescos, probablemente, debido a una recontaminación tras su pasteurización. En el caso de quesos elaborados con leche pasteurizada o no pasteurizada, la ausencia de *L. monocytogenes* depende de parámetros intrínsecos ( $a_w$ , acidez, péptidos antimicrobianos, etc.) y extrínsecos ( $T^a$ , humedad, recontaminación, etc.), mientras su presencia es siempre problemática debido a su capacidad extraordinaria de supervivencia en condiciones hostiles (Neiker, 2005).

*Listeria monocytogenes* es una bacteria considerada como "transeúnte" porque se encuentra presente entre el 1 y 10% de los seres humanos sanos en su materia fecal a los cuales se les considera en un estado de portador asintomático (Romero, 2007).

**Pescado fresco, congelado y ahumado:** La presencia y supervivencia de *Listeria monocytogenes* en pescado fresco y congelado es poco probable, mientras en el pescado ahumado es variable dependiendo del método de ahumado (en frío o caliente) (Pascual & Anderson, 2000).

**Frutas y verduras:** Se conoce que hasta el 10-20% de productos vegetales listos para su consumo pueden estar contaminados con *Listeria monocytogenes* incluyendo semillas germinadas (brotes), lechugas, rábanos, tomates, cebollas, pepinos, coliflores y setas cultivadas y que algunos brotes de listeriosis se han debido al consumo de este tipo de productos.

*L. monocytogenes* es un patógeno transmitido por los alimentos que puede contaminar productos alimenticios durante o después del procesamiento (Guenther *et al.*, 2009) y se ha aislado en varios tipos de productos alimenticios como carnes, pescado y mariscos (Fenlon, 1999), productos lácteos frescos (Vitas *et al.*, 2004) y vegetales (Lunden *et al.*, 2004). Los alimentos 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 & Peterkin, 1991). La naturaleza ubicua de *L. monocytogenes*, su resistencia y su capacidad de crecer a temperaturas de refrigeración y condiciones de microaerofilia, la hacen de difícil control (Touré *et al.*, 2003).

### 1.3.3. Importancia en los alimentos y salud pública

A principios de la década de 1980, la bacteria se manifestó como un patógeno emergente de ETAs. A partir de esta fecha, se han reportado importantes brotes de ETA relacionados con *L. monocytogenes* en Europa y Estados Unidos (tabla 3). Lo anterior ha promovido la realización de estudios epidemiológicos para determinar la prevalencia del patógeno y su forma de transmisión. El estudio de estos brotes ha revelado que las cepas de *L.*



*monocytogenes* aisladas de alimentos y pacientes presentan la misma identidad (Cratwrigth *et al.*, 2013).

*Listeria* afecta en mayor medida a los extremos de edad de la vida, embarazadas y personas con algún tipo de inmunodepresión, fundamentalmente celular, o enfermedad debilitante. En realidad, suele considerársele un patógeno oportunista. En el resto de la población las infecciones invasivas son poco frecuentes, aunque en algunos casos la proporción de pacientes con meningitis sin factores de riesgo ha sido superior al 30% (Mylonakis *et al.*, 1998).

**Tabla 3.** Brotes de listeriosis asociados con el consumo de alimentos contaminados.

País	Año	Alimento	C/M	Serotipo
EUA	1983	Leche pasteurizada	49/14	4b
EUA	1985	Queso	142/48	4b
Londres	1990	Paté	300/0	4b
Francia	1992	Lengua de cerdo	279/88	4b
EUA	1998	Salchichas	108/14	4b
EUA	1999	Salchichas	101/21	½ a
EUA	2000	Queso fresco	13/0	4b
EUA	2001	Carnes frías	28/0	½ a
EUA	2002	Carnes frías	54/8	4b
EUA	2003	Queso fresco	13/1	4b
EUA	2005	Pollo a la parrilla	3/0	1/2b
EUA	2006	Queso	3/1	4b
EUA	2007	Leche	5/3	4b
EUA	2008	Ensalada de atún	5/3	½ a
EUA	2011	Melón	147/33	NR
EUA	2012	Queso ricota	22/4	NR
EUA	2013	Queso madurado	6/1	NR

NR: No Reportado **Fuente:** Castañeda *et al.*, 2014



En años recientes se han presentado brotes de enfermedades alimentarias causadas por *L. monocytogenes* en varias partes del mundo. Este microorganismo sobrevive a procesos tradicionales que normalmente se utilizan en la conservación de alimentos y además puede persistir en diferentes entornos de procesamiento de alimentos (Zhang *et al.*, 2010).

Los brotes de listeriosis asociados con ETA reciben especial atención, principalmente por la elevada tasa de mortalidad y por el efecto económico que representan. En relación con este último aspecto, en Estados Unidos el costo por la morbi-mortalidad de los individuos afectados se calcula en 2.3 billones de dólares; a su vez, el costo por retirar del mercado los alimentos contaminados se calcula, en este mismo país, en 2.4 billones de dólares (Orsi *et al.*, 2011).

En México, los estudios epidemiológicos sobre la incidencia y formas clínicas de la listeriosis, y sobre la presencia de *L. monocytogenes* en los alimentos son escasos (tabla 4).

**Tabla 4.** Estudios realizados sobre la frecuencia de aislamiento de *L. monocytogenes* en alimentos

<b>Alimento</b>	<b>Muestras/Total</b>	<b>%</b>	<b>País</b>
<b>Carne de res cruda</b>	3/17	18	Portugal
	4/157	3	China
<b>Carne de pollo cruda</b>	9/15	60	Portugal
	57/158	36	España
<b>Carne de puerco cruda</b>	20/185	11	China
<b>Pescado crudo</b>	3/25	12	Portugal
<b>Mariscos</b>	31/268	12	Chile
	2/204	1	China
<b>Salmón ahumado</b>	28/100	28	España
<b>Leche cruda</b>	1/6	17	Portugal
<b>Leche pasteurizada</b>	0/28	28	Portugal
<b>Queso fresco</b>	2/50	4	Portugal
	2/256	1	Chile
<b>Helado</b>	21/603	4	Chile
<b>Delicatesen</b>	35/396	9	España
	23/634	4	Chile



Salchichas	7/93	8	EUA
	17/24	71	EUA
Vegetales frescos	31/1750	2	España
Vegetales crudos	35/271	13	Portugal

Fuente: Mena *et al.*, 2004; Yan *et al.*, 2010; Vitas *et al.*, 2004

Al respecto, una revisión de la información existente sobre la listeriosis en México refirió el reporte de 14 casos esporádicos de listeriosis con una letalidad de hasta 50%. Sin embargo, la información específica de la fuente de infección y la caracterización del microorganismo responsable no fue determinada. En estudios recientes, aunque se ha realizado la caracterización mediante perfiles genéticos y serotipificación de cepas de *L. monocytogenes* de origen alimentario, no se ha logrado establecer su participación como agente responsable de ETA. Los datos de estos estudios sugieren la necesidad de que el sector salud y la industria alimentaria implementen un marco legal para la búsqueda obligatoria del patógeno, lo cual conlleve al control de éste en México (Castañeda *et al.*, 2014).

*Listeria monocytogenes* se transmite principalmente a través de alimentos, llegando a ocasionar cuadros clínicos muy graves en el hombre, como septicemia, gastroenteritis, meningitis y encefalitis. El grupo de mayor riesgo comprende a los recién nacidos, individuos inmunocomprometidos, mujeres embarazadas y adultos de la tercera edad (Vera *et al.*, 2013). Las tasas reportadas de morbi-mortalidad de la listeriosis aluden a países desarrollados, en donde los alimentos (la principal fuente de transmisión) son elaborados, procesados, transportados, almacenados y expendidos al público, en condiciones de mayor higiene y cuidado que las acostumbradas en nuestro medio (Garza-Velasco *et al.*, 2010).

#### 1.3.4. Patogenicidad

La patogenicidad es la capacidad de un agente infeccioso de producir enfermedad en un huésped susceptible. La virulencia es un término cuantitativo que define el grado en que un patógeno puede causar enfermedad, esto a menudo está relacionado con el número de microorganismos que se requieren para causar la infección o la frecuencia de infección de una población dada y los determinantes de virulencia de la cepa (Madigan *et al.*, 2004).

La patogenicidad de *L. monocytogenes* se debe a la capacidad para adherirse, invadir y multiplicarse dentro de una gran variedad de células no fagocíticas (enterocitos, hepatocitos, fibroblastos, células endoteliales y células dendríticas). Esta propiedad, ha sido estudiada detalladamente en cultivos celulares, y es el punto de partida para el análisis fisiopatológico de la listeriosis humana (Gilot *et al.*, 1999).

La patogenia de la infección por *L. monocytogenes* aún es poco comprendida y los datos disponibles han derivado de observaciones hechas en animales de experimentación. Los alimentos son la principal ruta de adquisición del patógeno y, por lo tanto, el tracto



gastrointestinal es el primer sitio de entrada de *L. monocytogenes* al hospedero (Vázquez-Boland *et al.*, 2001). Esta bacteria es capaz de atravesar las tres barreras fisiológicas presentes en los seres humanos: intestinal, hemato-encefálica y placentaria. Al cruzar la barrera intestinal, la bacteria se absorbe desde el lumen intestinal, atravesando las células epiteliales y si el sistema inmune no es capaz de controlar eficientemente la infección, la bacteria seguirá multiplicándose y la infección puede diseminarse al torrente sanguíneo y a los ganglios linfáticos. Tras el ingreso al torrente sanguíneo, la mayoría de las bacterias alcanza el hígado y el bazo, donde puede replicarse en el interior de macrófagos o células epiteliales (Vera *et al.*, 2013).

Esencialmente, *L. monocytogenes* debe su patogenicidad a la producción de una proteína con actividad hemolítica, la hemolisina beta, además, se caracteriza por su presencia intracelular en monocitos, lo que dió origen a su nombre actual (Vázquez-Boland *et al.*, 2001).

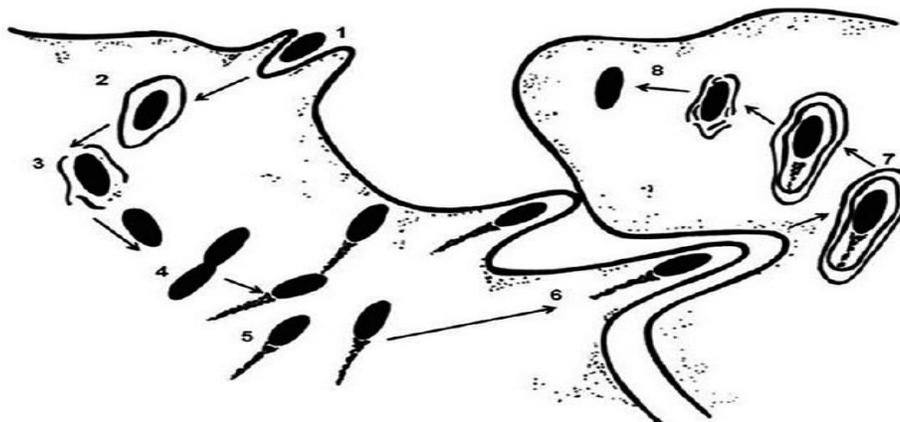
En concreto, los eventos implicados en el proceso infeccioso global, son:

- 1) Entrada a las células del hospedero
- 2) Escape del fagosoma y desarrollo intracelular
- 3) Desplazamiento intracitoplásmico
- 4) Diseminación célula-célula.

#### **Ciclo infeccioso intracelular de *L. monocytogenes*:**

El proceso de infección comprende varias etapas: adhesión e invasión de la célula hospedera, escape de la vacuola, multiplicación intracelular y proliferación extracelular (Figura 3) (Vera *et al.*, 2013).

Para comenzar, antes de llegar al intestino, los organismos de *Listeria* ingeridos deben resistir el ambiente adverso del estómago (Vera *et al.*, 2013). Al menos 13 proteínas de estrés oxidativo y 14 proteínas de “shock” tóxico, son inducidas bajo condiciones de estrés en *L. monocytogenes* (Vázquez-Boland *et al.*, 2001)



**Figura 3.** Esquema del ciclo intracelular de *Listeria monocytogenes*. 1. Entrada en la célula hospedera; 2. Supervivencia dentro de la vacuola fagocítica; 3. Disrupción de las membranas del fagosoma y escape al citosol; 4. Replicación en el citosol; 5. Movimiento a través de la polimerización de actina; 6. Propagación



célula-célula; 7. Supervivencia en fagosomas secundarios; 8. Escape del fagosoma secundario y reinicio del ciclo (Vera *et al.*, 2014).

La razón por la que *L. monocytogenes* causa infección está explicada en la capacidad para inducir fagocitosis en células del sistema mononuclear fagocítico, seguida de la replicación dentro de estas y la transferencia directa a células vecinas. El ciclo de infección se divide en cuatro etapas: internalización, evasión de la vacuola intracelular, nucleación de filamentos de actina y expansión de célula a célula (Torres *et al.*, 2005).

**Internalización:** El ciclo comienza con la adhesión a la superficie de la célula eucariota y la subsecuente penetración de la bacteria dentro de la célula hospedero, *L. monocytogenes* es tomada por las células del hospedero a través de fagocitosis (Torres *et al.*, 2005). La forma en que el microorganismo ingresa a las células no fagocíticas es semejante a la clásica fagocitosis, ya que implica la interacción del ligando del primero con el receptor de las segundas y toda una serie de reestructuraciones en la membrana de la célula “blanco”, las cuales se revierten mediante un mecanismo similar al cierre de los zipper (Garza-Velasco *et al.*, 2010).

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 hospedero requiere de una secuencia motivoconservada LPXTG (Leu-Pro-X-Thr-Gly, donde X es cualquier aminoácido) seguida de un dominio hidrofóbico de 20 aminoácidos y una cola de aminoácidos cargados positivamente (Torres *et al.*, 2005).

La internalina A y la proteína de adhesión a *Listeria* (LAP) de 104KDa son proteínas de superficie de *Listeria* requeridas para la penetración al interior de las células no fagocíticas. Esta proteína de superficie de 800 aminoácidos, está unida covalentemente al peptidoglicano y contiene un dominio amino terminal repetitivo rico en leucina (LRR) seguido de una región inter-repetitiva conservada (IR), el carbono terminal comprende dos y medio repeticiones de 75 aminoácidos, seguida de una región que contiene un motivo LPXTG que permite la unión covalente de la proteína al péptidoglicano (Torres *et al.*, 2005)

La internalina A forma parte de la familia multigénica de internalinas junto con las internalinas E, F, G y H las cuales no están involucradas en el proceso invasivo de *L.monocytogenes* pero son importantes para la colonización del tejido del hospedero “*in vivo*”(Torres *et al.*, 2005).

La entrada de *L. monocytogenes* a las células epiteliales se ha estudiado ampliamente, lo que ha permitido identificar a la internalina A (InIA), proteína de 80 kDa que media la entrada bacilar a las células del epitelio interinal humano (línea Caco-2) y a algunas otras células epiteliales. La InIA está codificada por el gen *inIA* que, a su vez, forma parte de una familia de multigenes llamada *InI*, a la cual también pertenece el gen InIB, molécula proteica de 67 kDa que promueve el ingreso bacteriano a los hepatocitos, tanto *in vitro* como *in vivo*, y a otras líneas celulares, epiteliales o de fibroblastos (Garza-Velasco, 2010). El receptor en la célula epitelial, para la internalina A es la proteína transmembranal E-cadherina, glicoproteína transmembranal que contiene cinco dominios extracelulares de



caderina (Ectodominios, EC1-EC5) y un dominio intracitoplasmático que regula la adhesión célula a célula y es dependiente de calcio (Kussel-Andermann 2000).

**Evasión de la vacuola intracelular:** Una vez que *L. monocytogenes* ha sido fagocitada por un macrófago, en pocas horas se cubre de filamentos de actina. La cubierta de actina se organiza para formar apéndices de actina F, facilitando el desplazamiento de *L.monocytogenes* en el interior del macrófago y la posterior diseminación a macrófagos contiguos. Las condiciones que existen en el fagolisosoma, pH de  $5.5 \pm 0.2$  y bajas concentraciones de hierro no le permiten multiplicarse, pero inducen la secreción de Listeriolisina O (LLO) (Torres *et al.*, 2005).

El principal factor de virulencia de *L. monocytogenes* es la listeriolisina O (LLO), la cual es una hemolisina codificada en el gen *hly*. La LLO pertenece a la familia de las toxinas formadoras de poro dependientes de colesterol (CDTX) y se ha demostrado, que es requerida para sobrevivir y proliferar dentro de macrófagos y células fagocíticas no profesionales. La función principal de la LLO es perforar la membrana del fagosoma por medio de anillos formados de LLO que se insertan en la membrana permitiendo que se generen poros, los cuales permiten la liberación de la bacteria al citoplasma. La actividad de la LLO se lleva a cabo a pH bajo (5.5) aunque puede actuar en un rango de pH de 4.5 a 6.5 (Geoffroy *et al.*, 1987).

Dos tipos de fosfolipasas C sintetizadas por *L. monocytogenes*, las fosfolipasas C fosfatidilinositol específicas (PI-PLC) de 33 kDa, codificadas por el gen *plcA* y las fosfolipasas C fosfatidilcolina específicas (PC-PLC) de 29 kDa, codificadas por el gen *plcB*, juegan un papel importante en el poder invasivo; se ha demostrado que las bacterias con mutaciones en los genes que codifican para estas enzimas son menos virulentas en ratones que las cepas silvestres (Bubert *et al.*, 1999).

**Nucleación de filamentos de actina y expansión de célula a célula:** Las ATPasa ClpC y ClpE son proteínas de “stress” que ayudan en la disrupción de la membrana vacuolar y la supervivencia intracelular de *Listeria*. La ClpC modula la expresión de la proteína ActA y de las internalinas a nivel transcripcional (Torres *et al.*, 2005).

Para que *Listeria monocytogenes* pueda moverse directamente a otras células, una proteína de superficie es activada ActA, que está polarmente distribuida sobre la superficie bacteriana e imita la proteína eucariótica WASP (proteína del síndrome de Wiscott-Aldrich) al inducir su propia motilidad dentro del citosol celular (Torres *et al.*, 2005).

### 1.3.5. Virulencia

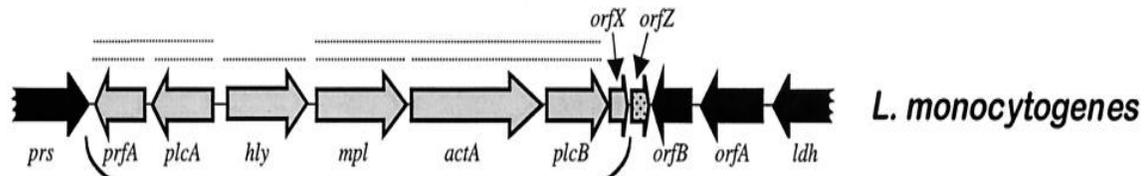
*Listeria monocytogenes* posee un gran número de factores de virulencia que son esenciales para la patogénesis (Ray & Arun, 2010), es una bacteria intracelular facultativo que entra en el hospedador de forma primaria a través del intestino. En los últimos años se han identificado un gran número de factores de virulencia involucrados en los pasos clave de



este ciclo de vida intracelular (Dussurget *et al.*, 2004). Un contribuyente principal a la virulencia de *L. monocytogenes* es su habilidad para invadir y replicarse dentro de una amplia variedad de células eucariotas (Donaldson *et al.*, 2011; Kuhn *et al.*, 2008).

Los genes de virulencia de *Listeria spp.*, se organizan dentro de unidades genéticas conocidas como islas de patogenicidad (PAIs). Las PAIs son adquiridas por la bacteria por mecanismos de transferencia de información genética horizontal, algunas veces como parte de un elemento móvil genético, por lo cual son importantes en la evolución de la virulencia bacteriana (Hacker & Kaper, 2000).

Seis de los factores de virulencia responsables de la infección intracelular de *L. monocytogenes* son *prfA*, *plcA*, *hly*, *mpl*, *actA* y *plcB* (tabla 5), los cuales están organizados en una isla cromosomal de 9 Kb conocida como grupo de genes de virulencia dependiente de PrfA la cuál es conocida como isla 1 de patogenicidad de *Listeria* (LIPI-1) (Figura 4) (Vázquez-Boland *et al.*, 2001).



**Figura 4.** Organización física y transcripcional de genes de virulencia de *Listeria monocytogenes* (Vázquez-Boland *et al.*, 2001).

El locus de virulencia está formado en tres unidades transcripcionales (Figura 3). La posición central está ocupada por el monocistrón *hly*, que codifica para una citolisina sulfidriilo-activada (listeriolisina O) requerida para la ruptura de la vacuola fagocítica y la liberación de la bacteria dentro del citoplasma; requisito para la proliferación intracelular de *L. monocytogenes* (Vázquez-Boland *et al.*, 2001). 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 factor responsable de la motilidad basado en actina y la diseminación célula a célula de *L. monocytogenes*.

El gen *plcB* codifica para la fosfolipasa C fosfatidilcolina específica (PC-PLC), que media la disolución de la doble membrana de los fagosomas secundarios, formados después de la diseminación célula a célula. El gen *mpl* codifica para la proteasa *mpl*, la cual procesa extracelularmente el propéptido inactivo de la PC-PLC (Vázquez-Boland *et al.*, 2001).



**Tabla 5.** Principales factores de virulencia de *Listeria monocytogenes* involucrados en el ciclo intracelular

Locación cromosoma	Gen	Producto del gen	Función
<b>LIPI-1</b>	<i>hly</i>	Listeriolisina O (LLO)	Lisis del fagosoma
	<i>plcA</i>	Fosfatidilinositol fosfolipasa C (PI-PLC)	Lisis del fagosoma
	<i>plcB</i>	Fosfatidilcolina fosfolipasa C (PC-PLC)	Lisis del fagosoma
	<i>mpl</i>	Precursor zinc metaloproteasa (Mpl)	Procesa al precursor PC-PLC a su forma madura
	<i>prfA</i>	Factor regulador positivo A (PrfA)	Requerida para la expresión de los factores de virulencia de <i>L. monocytogenes</i>
	<i>actA</i>	Proteína inductora de ensamblaje actina	Participa en la movilidad intra-celular
<b>Exterior LIPI-1</b>	<i>hpt</i>	Proteína transportadora de hexosa fosfato	Requerido para el crecimiento intracelular
	<i>inlA</i>	Internalina A (InlA)	Participa en la invasión celular
	<i>inlB</i>	Internalina B (InlB)	Molécula señalizadora y participa en la invasión celular
	<i>inlC</i>	Internalina C (InlC)	Proteína secretada, contribuye a la virulencia de <i>Listeria</i> .
	<i>InlJ</i>	Internalina J (InlJ)	Adhesión celular, contribuye a la virulencia de <i>Listeria</i> .

**Fuente:** Vera *et al.*, 2013

Los tres productos del operón (*mpl*, *ActA* y *plcB*), están involucrados en una función que es esencial en la patogénesis de *L. monocytogenes*: La diseminación de la bacteria de una célula a otra. Esta función le permite a la bacteria evadir el compartimiento extracelular y, por tanto, los efectores humorales del sistema inmune durante su diseminación en tejidos del hospedero (Portnoy *et al.*, 1992).

### 1.3.5.1. *PrfA*

El gen *prfA* es el activador transcripcional de los principales genes de virulencia de *L. monocytogenes*. La expresión del regulador de virulencia vía *PrfA* depende de diversas



señales ambientales como: temperatura (37°C), condiciones de estrés, contacto con células del hospedero y del ambiente citoplásmico del hospedero (Renzoni *et al.*, 1999).

La expresión del regulador de virulencia de PrfA depende de un mecanismo que involucra la activación alostérica de PrfA por un cofactor de bajo peso molecular, cuyos niveles dependen de las condiciones ambientales (Vega *et al.*, 1998).

La síntesis de PrfA es autorregulada por un promotor dependiente de PrfA en forma de operón que comprende los genes *plcA* y *prfA*. Una pequeña cantidad de PrfA es esencial para iniciar la transcripción con autorregulación del promotor *plcA* (Vega *et al.*, 1998).

Se ha descrito que PrfA puede regular directamente 10 genes de virulencia, además de 145 genes no relacionados con virulencia. Esta proteína está estructuralmente relacionada con la proteína Crp (proteína receptora de AMPc) de enterobacterias, también conocida como Cap (proteína activadora de catabolitos). PrfA es un homodímero simétrico con dos promotores organizados en dos dominios (Vera *et al.*, 2013).

### 1.3.5.2. *Listeriolisina*

Es una exoproteína antigénica (60 kDa) codificada por el gen *hly* (por *hemolysin*) y perteneciente a una gran familia de citolisinas formadoras de poros activadas por grupos sulfhidrilo, cuyo prototipo es la estreptolisina O de *Streptococcus pyogenes*. La LLO se enlaza al colesterol de la membrana celular e inserta y oligomeriza 20 a 80 monómeros que inducen aparición de poros.

Dado que LLO presenta una actividad máxima de pH=5 y es inactiva a pH=7, origina escasos efectos dañinos sobre la membrana celular cuando la bacteria se encuentra libre en el citosol; su vida media es muy corta en dicho ambiente, ya que se degrada rápidamente al ser fosforilada en tres sitios de su secuencia conocida como PEST (por prolina, ácido glutámico, serina y treonina).

LLO induce la apoptosis, estimula a diversas cinasas y promueve la expresión de moléculas de adhesión y la generación de mediadores lipídicos en las células endoteliales infectadas (Garza-Velasco *et al.*, 2010).

### 1.3.5.3. Fosfolipasas

*L. monocytogenes* presenta dos enzimas principales con actividad de fosfolipasa C (PLC): la fosfolipasa C fosfatidilcolina específica (PC-PLC) codificada por el gen *plcB* y la fosfolipasa C fosfatidilinositol específica (PI-PLC) codificada por el gen *plcA*.

El producto del gen *plcB* es un péptido de 264 aminoácidos con un peso molecular de 2.9 kDa llamado PlcB el cual es el precursor de la PC-PLC y es secretado como proenzima inactiva, el gen *mpl* codifica para una metaloenzima dependiente de zinc (Mpl) la cual es responsable de la activación de PC-PLC.

La PC-PLC es una enzima dependiente de zinc, que actúa en un rango de pH de 5.5 a 8.0. Se ha observado que la fosfolipasa PlcB es requerida para la lisis de fagosomas secundarios formados después de la diseminación célula-célula (Raveneau *et al.*, 1992).



El gen PICA codifica para la PI-PLC, el producto de este gen es PlcA, un polipéptido de 33 kDa, el cual tiene una actividad óptima en un rango de pH de 5.5 a 6.5. Se ha demostrado que la PI-PLC es requerida para que la bacteria escape del fagosoma primario, pero esta enzima no ayuda en el escape del fagosoma secundario (Camilli *et al.*, 1991).

#### 1.3.5.4. ActA

El gen actA codifica para una proteína de 699 aminoácidos (ActA). Una vez que la bacteria ha escapado al citoplasma puede polimerizar actina y diseminarse a células vecinas, la polimerización de actina es mediada por ActA, la cual es la primera proteína identificada con actividad de promover la nucleación de actina. Una vez que la bacteria escapa al citoplasma polimeriza actina asimétricamente a lo largo de la superficie de la bacteria, produciendo una cola de actina que propulsa la bacteria a través del citoplasma (Dabiri *et al.*, 1990; Tilney & Portnoy, 1989).

#### 1.3.5.5. Internalinas

Las internalinas son los productos proteicos de una familia de genes asociados con la virulencia, encontrados en el patógeno *Listeria spp.* Los primeros miembros de esta familia que se caracterizaron fueron InlA y InlB, codificados por el operón de inlAB, fueron identificados en *L. monocytogenes* (Vázquez-Boland *et al.*, 2001). Se demostró que InlA participaba para funcionar en la invasión, mediando la internalización bacteriana por estas células epiteliales normalmente no fagocíticas, y por lo tanto fue nombrado como internalina (Gaillard *et al.*, 1991). Desde entonces se han identificado un gran número de homólogos internos en *L. monocytogenes* y *L. ivanovii* (Vázquez-Boland *et al.*, 2001). Un elemento común a todas las internalinas es un dominio rico en leucina (LRR) que consiste en un arreglo en tándem de la repetición de una secuencia del aminoácido con los residuos de la leucina en las posiciones fijas (Kajava, 1998). La unidad LRR típica de internalinas consiste en 22 aminoácidos, con residuos de leucina o isoleucina (Heffron, *et al.*, 1998).

Varias proteínas de la superficie listerial desempeñan un papel clave en las interacciones con células hospedadoras de mamíferos (Cabanés *et al.*, 2002). Una de estas proteínas, es la internalina A (InlA), promueve la internalización de *Listeria* en células epiteliales mediante la interacción con la proteína de adhesión del huésped E-cadherina (Mengaud *et al.*, 1996) y es necesaria para la invasión de vellosidades intestinales y placentarias *in vivo* (Lecuit *et al.*, 2004; Lecuit *et al.*, 2001). InlA posee un dominio N-terminal de repetición rica en leucina (LRR) (Schubert *et al.*, 2002) y una señal de clasificación C-terminal.

La InlC es una proteína secretora de 30 kDa, es mucho más pequeña que InlA o InlB, tiene cinco repeticiones ricas en leucina, esta juega un papel en una etapa tardía en la infección por *L. monocytogenes* en la absorción por células fagocíticas, dado que es un marcador de virulencia que contribuye a las etapas post-intestinales de la infección de (Engelbrecht *et al.*, 1996).



*InlJ* codifica proteínas estructuralmente relacionadas que consisten de 851 aminoácidos, es una proteína LRR (repetición rica en leucina) que contiene cisteína, lo que sugiere que el producto del gen tiene un papel en la virulencia de listeriosis (Cabanes *et al.*, 2002).

Pertenece a la familia de las internalinas cuya expresión es inducida *in vivo* y actúa como una adhesina que se encuentra unida covalentemente al peptidoglicano; esta unión se realiza mediante la enzima sortasa A (SrtA). La importancia de esta proteína en la virulencia queda demostrada al realizar estudios con cepas de *L. monocytogenes* que presentan mutaciones en el gen *srtA21* como así también, al emplear cepas donde la proteína InlJ está ausente, debido a una delección del gen *inlJ13*; en ambos casos se produce una reducción significativa en la virulencia (Vera *et al.* 2013).

Un gran número de otras internalinas están presentes en *L. monocytogenes* como se deduce de la secuencia del genoma; algunas, son InlC, InlE, InlF, InlG e InlH. Ninguna de estas proteínas parece ser capaz de inducir fagocitosis en células de mamíferos y sus funciones en el proceso de infección son en gran parte desconocidas. Se pudo demostrar recientemente que, en contraste con InlB-InlA, desencadena la captación de células epiteliales Caco-2 y necesita ayuda de las otras internalinas (Ryser & Marth, 2007)

### **1.3.5.6. Proteína p60**

La proteína p60 es una proteína extracelular de 60 KDa con actividad hidrolasa de la mureína, involucrada en la formación del septum durante la división celular y responsable de la invasión listerial en fagocitos no profesionales (Villegas, 2010).

*L. monocytogenes* secreta una autolisina de 60 KDa, codificada en el gen *iap*, denominada p60 o *iap*, esta proteína interviene en la división celular, en la formación filamentos largos de bacterias y está asociada con la invasión de ciertas líneas celulares (como en células Caco-2). La proteína es caracterizada como una murein hidrolasa y se ha observado que la sobreexpresión de p60 induce autólisis en *L. monocytogenes*. La expresión es regulada a nivel postranscripcional (Machata *et al.*, 2005)

Esta proteína se localiza en la superficie bacteriana y, Además de resultar transcendental para el crecimiento celular, también participa en la invasión intestinal por *L. monocytogenes*; se trata de una mureín-hidrolasa ajena al regulador central de virulencia *prfA*, presente en todas las cepas virulentas. Cuando el gen que codifica para la p60 es afectado, las mutantes con bajos niveles de proteína son filamentos y manifiestan una pequeña o nula capacidad para invadir a las células hospederas (Garza-Velasco *et al.*, 2010).

### **1.3.5.7. ClpC ATPasa**

Ésta pertenece a la familia de proteínas Clp (100 kDa) de shock térmico, implicadas en la tolerancia al estrés de varios microorganismos procarióticos y eucarióticos. Su papel en la invasión es el de promover el escape bacteriano del comportamiento fagosómico de los



macrófagos pero, además, favorece la invasión *in vivo* de los hepatocitos, junto con la InlA, InlB y ActA (Garza-Velasco *et al.*, 2010).

### 1.3.6. Listeriosis en humanos

La *Listeria monocytogenes* causa esta infección en animales y humanos causada por *Listeriamonocytogenes* (Posfay-Barbe & Wald, 2009), con una tasa de mortalidad alta (20 a 30%), que incluye padecimientos severos como la meningitis, septicemias y abortos; afecta principalmente a personas inmunocomprometidas e inmunodeficientes, así como a embarazadas, ancianos y niños (Zunabovic *et al.*, 2011), situándose entre las enfermedades transmitidas por alimentos de mayor relevancia social y económica (Gahan & Gill, 2005).

La listeriosis es también un problema emergente para la industria alimentaria como consecuencia del aumento de la incidencia, en los países desarrollados, de epidemias asociadas al consumo de alimentos contaminados con *L. monocytogenes*. Este microorganismo supone un problema grave para las empresas alimentarias, ya que su control en las plantas de procesado conlleva una gran dificultad. Su ubicuidad y la alta tasa de mortalidad hacen que *L. monocytogenes* cobre una especial importancia desde el punto de vista de la higiene y la salud alimentaria (González & Suarez, 2008).

Aunque *L. monocytogenes* se transmite por diferentes vías (fecal-oral, animal-hombre y madre-feto), la principal fuente de transmisión son los alimentos contaminados (Posfay-Barbe & Wald, 2009). La dosis infectiva se estima entre  $10^4$  -  $10^6$  UFCg<sup>-1</sup> de alimento ingerido, pero puede ser menor (0.3 UFCg<sup>-1</sup>) en personas susceptibles (Jacquet *et al.*, 1995). En cualquiera de los casos, la dosis dependerá del alimento, la virulencia de la cepa y la susceptibilidad del hospedero (Posfay-Barbe & Wald, 2009; Lianou & Sofos, 2007).

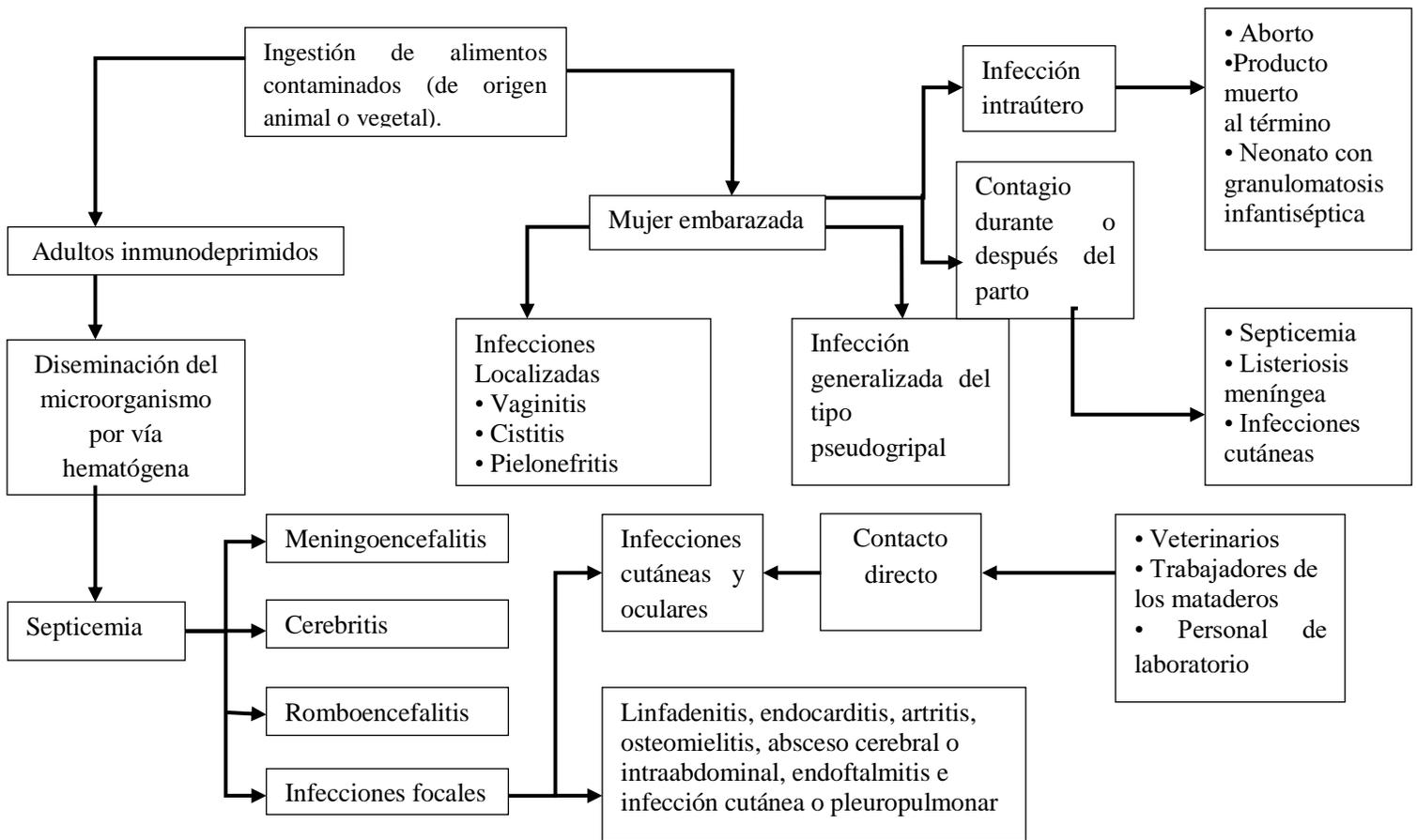
Durante la infección, la bacteria obtiene acceso al citoplasma de las células hospederas, se multiplica dentro del nicho intracelular y se propaga de célula a célula a través de la polimerización de la actina del huésped (Vázquez-Boland *et al.*, 2001; Freitag *et al.*, 2009). Las diversas manifestaciones clínicas asociadas a la listeriosis pueden agruparse en dos categorías: listeriosis invasiva y listeriosis no invasiva. La listeriosis invasiva se produce cuando el patógeno atraviesa la barrera intestinal y alcanza sistemas y órganos que son blanco de infección, como el sistema nervioso central, el útero o la sangre, ocasionando meningitis, septicemias, meningoencefalitis. La listeriosis invasiva se caracteriza por una tasa de letalidad alta y las infecciones puede producir secuelas (FAO/OMS, 2004).

Los casos de listeriosis no invasiva (conocida como gastroenteritis febril) se manifiestan por síntomas de gastroenteritis, como diarrea, fiebre, cefalea y mialgias, tras un período de incubación corto (Wilson & Salyers, 2002).

Aunque su incidencia es baja, tiene un impacto sanitario y económico considerable debido a su letalidad; ya que aproximadamente el 93% de los casos requiere hospitalización (CDC, 2012; Centers for Disease Prevention and Control, 2013).

La tasa de mortalidad en listeriosis sistémica se ha estimado entre el 20% y el 30% (Farber & Peterkin, 1991), y los sobrevivientes, particularmente aquellos donde el organismo ha invadido el sistema nervioso central, pueden desarrollar serias secuelas a largo plazo (McLauchlin *et al.*, 2004).





**Figura 5.**Diagrama de la patogenia asociada a la infección por *Listeria monocytogenes* (Garza-Velasco *et al.*, 2010).

La listeriosis invasiva engloba a los casos en los que una infección inicial del tejido intestinal por *L. monocytogenes* deriva en la invasión de partes del organismo que habitualmente son estériles. Los órganos que se infectan más a menudo son el útero grávido, el sistema nervioso central y la sangre. Un resumen de 782 casos de listeriosis notificados de 20 países reflejó que el 43% de las infecciones estaban relacionadas con el embarazo, mientras que el 57% de los casos no tenían relación con el embarazo, los cuales podían descomponerse a su vez en las siguientes categorías: infecciones septicémicas, 29%; infecciones del sistema nervioso central, 24%; y formas atípicas, 4% (Rocourt, 1991).



## 1.4. Reacción en Cadena de la Polimerasa

La Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) es una reacción enzimática *in vitro* que amplifica millones de veces una secuencia específica de ADN durante varios ciclos repetidos en los que la secuencia blanco es copiada fielmente. Para ello, la reacción aprovecha la actividad de la enzima ADN polimerasa que tiene la capacidad de sintetizar naturalmente el ADN en las células (De Dios *et al.*, 2013).

### 1.4.1. Fundamento

La reacción en Cadena de la Polimerasa permite generar una gran cantidad de copias de un fragmento de ADN (ácido desoxirribonucleico). El requisito fundamental para poder llevar a cabo la reacción es disponer de fragmentos cortos de ADN de cadena sencilla complementarios a los extremos del fragmento a amplificar. Estos fragmentos servirán como cebadores (oligonucleótidos o primer) para que una enzima polimerasa sea capaz de incorporar nucleótidos complementarios a la cadena molde. Una vez complementada la reacción la cantidad fragmento amplificado se puede visualizar mediante técnicas sencillas de separación de fragmentos de ADN (Pérez de Castro, 2008). En las últimas dos décadas, la PCR se ha convertido en un recurso integral para la mayoría de los laboratorios de biotecnología en todo el mundo. Es una herramienta de gran alcance, ya que es sensible y específica en la amplificación de ADN (Rakshit, 2010).

La PCR es una herramienta poderosa, pero los errores y equivocaciones pueden ocurrir fácilmente. La reacción de la polimerasa es muy sensible a diferentes variables. Los cationes divalentes, especialmente  $Mg^{2+}$ , juegan un papel importante en la estabilidad de los nucleótidos y afectan a la actividad de polimerización de las ADN polimerasas (Drouin *et al.*, 2007).

Actualmente la identificación de *L. monocytogenes* se realiza por métodos convencionales, los cuales requieren, mínimo de cinco días para declarar si un alimento está libre de *Listeria* y diez días adicionales para reconocer la especie *monocytogenes* (Allaert, 2002); sin embargo, en la industria de alimentos estos métodos no permiten tomar decisiones rápidas, lo que causa un incremento en el costo del producto final por los períodos largos de cuarentena antes de su liberación. Por este motivo son importantes las técnicas rápidas y sensibles como la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) (Wan *et al.*, 2003; Weon & Chong-Hae, 2003), que permitan detectar este patógeno en alimentos crudos y productos procesados (Torres *et al.*, 2004).

### 1.4.2. Etapas de la PCR

La técnica de PCR por lo general consiste de tres etapas principales: desnaturalización, hibridación o alineamiento del cebador y extensión, los cuales se repiten de 20 a 30 ciclos (Pelt-Verkuil *et al.*, 2008). La PCR consiste en una serie de ciclos, y cambios de temperatura. Los pasos de ciclos están precedidos por un choque térmico a una alta



temperatura (90-94°C), existiendo otro choque térmico al final del proceso. Las temperaturas y el tiempo aplicados en cada uno de los ciclos dependen de ciertos parámetros (enzima utilizada, desoxirribonucleósido - trifosfatos "dNTPs", longitud de ADN a amplificar)(Sambrook & Russell, 2001).

Los métodos tradicionales para la detección de *L. monocytogenes* en diversos ambientes y de alimentos son intensivos en mano de obra y requieren mucho tiempo. Las metodologías basadas en PCR se han aplicado en la detección de *L. monocytogenes*.

**Desnaturalización:** La muestra de ADN se desnaturaliza inicialmente con el fin de desenrollar y separar la doble hélice de ADN en cadenas sencillas. Esto se consigue normalmente mediante el calentamiento de la muestra de ADN en un entorno acuoso. La desnaturalización se debe a la ruptura de los puentes de hidrógeno entre los pares de bases sin existir un rompimiento de enlaces covalentes. Las dos hebras del ADN se separan y pasan a una conformación al azar sin que afecte a la estructura primaria. En ella, el ADN se incuba a elevada temperatura ( $\pm 94^\circ\text{C}$ ) de tal manera que se logra la separación de las hebras quedando accesibles a la hibridación de los cebadores (Pelt-Verkuil *et al.*, 2008).

**Hibridación o alineamiento:** Los puentes de hidrógeno estables entre las cadenas de ADN sólo se forman cuando la secuencia del primer es muy similar a la secuencia del ADN molde. En ella, la mezcla de reacción se enfría ( $\pm 55-65^\circ\text{C}$ ) para permitir el alineamiento. La polimerasa une el híbrido de la cadena molde y el cebador. Los cebadores actúan como límites de la región de la molécula que se va a amplificar (Sambrook & Russell, 2001).

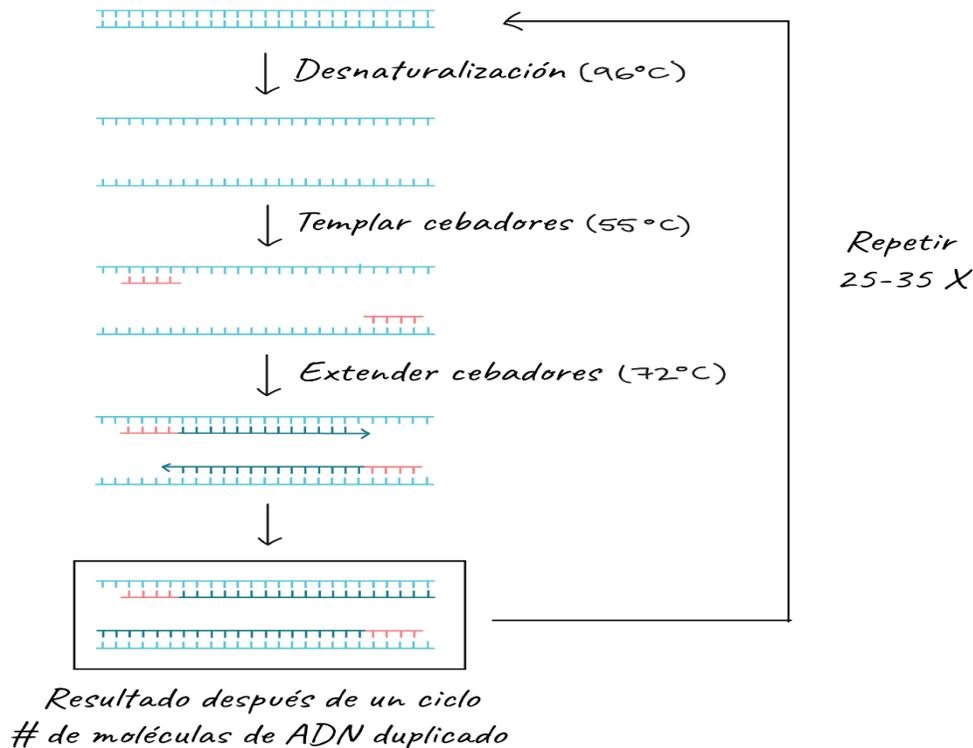
En esta etapa, los cebadores se alinean a la cadena sencilla en sitios específicos e hibridan con su secuencia complementaria para que se formen pequeñas regiones de doble cadena, es importante que la temperatura de hibridación ( $T_m$ ) sea la óptima. Si el diseño de los cebadores es el correcto y la temperatura es la adecuada la estabilidad y especificidad del complejo será eficiente (Tamay de Dios *et al.*, 2013).

**Extensión:** En esta etapa, la *Taq polimerasa* actúa sobre el complejo templado cebadores y empieza su función catalítica a una velocidad muy rápida; agrega dNTP's complementarios para crear las cadenas completas de ADN. La extensión de las cadenas es en dirección de la síntesis del ADN, es decir de 5' a 3'. La temperatura óptima para la reacción es de  $72^\circ\text{C}$ , ya que a esa temperatura la enzima es funcional. Al final del ciclo, se habrán formado las ampliaciones con un tamaño dictado por el número total de pares de bases (pb) que deberá ser conocido por el investigador (Tamay de Dios, 2013).

El tiempo de extensión depende de la longitud y concentración de la secuencia blanco y de la temperatura. Las estimaciones para la tasa de incorporación de nucleótidos a  $2^\circ\text{C}$  varía de 35 a 100 nucleótidos por segundo dependiendo del buffer, pH, concentración de sales y la naturaleza del templado (Cortázar & Silva, 2004).



Los tres pasos anteriores constituyen un ciclo. La repetición de este ciclo unas 40 veces, por ejemplo, permite obtener, como resultado de un experimento de amplificación, millones de copias del fragmento de interés (figura 6). El número óptimo de ciclos dependerá principalmente de la concentración inicial del templado cuando los otros parámetros son optimizados (Cortázar&Silva, 2004).



**Figura 6.** Etapas de la PCR (Khanacademic, 2017)

### 1.4.3. Componentes

La Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), es un procedimiento efectivo para generar grandes cantidades de una secuencia específica de ADN *in vitro*. Requiere de componentes esenciales para llevarse a cabo (Balbás, 2002).

**Secuencia blanco o secuencia a amplificar (ADN molde):** El ADN portador de la secuencia a amplificar puede incorporarse a la reacción en forma mono o bicatenaria. Aunque su tamaño no es un factor crítico, la amplificación de secuencias presentes en un ADN muy grande produce mejor rendimiento si se fragmenta previamente (Perera, 2002).

El criterio esencial es que la nuestra contenga al menos una cadena de ADN intacta que abarque la región que va a ser amplificada y que las impurezas sean suficientemente diluidas como para no inhibir la polimerización (Walter, 2006).



**Cebadores:** Son fragmentos complementarios que se van a unir a cada una de las dos cadenas separadas de ADN.

La selección de oligonucleótidos indicadores es muy importante en la reacción en cadena de la polimerasa. De este paso depende el éxito en el laboratorio (Somma & Querci, 2007). El tipo de cebador que se utilice en la PCR dependerá del tipo de identificación que se requiera, para ello se utilizan cebadores específicos. Si un cebador es demasiado corto puede ser complementario a múltiples genes y puede unirse específicamente a una región inapropiada del ADN. Un cebador debe de ser de por lo menos de 17 bases de longitud para evitar que se una a una región no deseada. Para una mayor estabilidad para la PCR generalmente son de 20 nucleótidos de longitud. El incremento en la longitud puede afectar la movilidad y el tiempo para unirse al ADN blanco (Reyna, 2000).

**ADN polimerasa termoestable:** La actividad más utilizada hoy en día para la amplificación por PCR es la ADN polimerasa *Taq* (Perera, 2002). Procedente de la bacteria *Thermus aquaticus*, enzimáticamente activa a temperaturas relativamente altas. La estabilidad de la polimerasa a temperaturas de hasta 95°C permite que se recupere su actividad al enfriarse de nuevo evitando así reponer la enzima en sucesivos ciclos (Herráez, 2012).

La enzima polimerasa se encarga de unir los nucleótidos (dNTPs), a la cadena complementaria a partir del primer, formando una nueva cadena doble de ADN a partir de una cadena sencilla. Solo pueden utilizarse polimerasas que sean capaces de actuar a temperaturas altas empleadas en la reacción (Saiki *et al.*, 1998).

**dNTPs:** Los dNTP's son los ladrillos o bases nitrogenadas con los que la *Taq polimerasa* construye las nuevas cadenas de ADN. Son factores importantes que contribuyen a la especificidad de la reacción, por ello es importante que su concentración sea la adecuada ya que de lo contrario pueden afectar la función de la *Taqpolimerasa*. Normalmente se utilizan a una concentración que oscila entre 0.2 a 1.0 mM (Tamay de Dios, 2013).

#### 1.4.4. Electroforesis

La electroforesis en gel es una técnica utilizada para separar fragmentos de ADN según su tamaño, con mayor resolución que cualquier método alternativo y es el método de fraccionamiento utilizado rutinariamente en el laboratorio de biología molecular. Las separaciones electroforéticas pueden ser analíticas o preparativas y permiten la resolución de fragmentos en un rango de <1,000 Da a >10<sup>8</sup> Da.

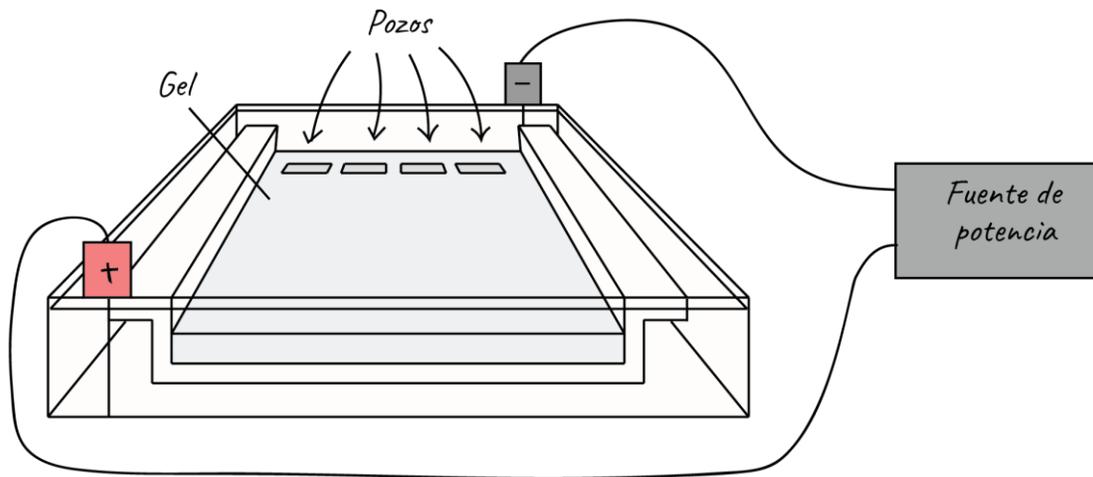
Las muestras de ADN se cargan en pozos (ranuras) en un extremo de un gel y se aplica una corriente eléctrica para arrastrarlas a través del gel. Además de que el DNA de doble cadena se encuentra razonablemente libre de complicaciones estructurales que puedan



afectar su movilidad. Sin embargo, existen ciertas variables que afectan la migración de los ácidos nucleicos en un gel.

Los fragmentos tienen carga negativa, por lo que se mueven hacia el electrodo positivo. Puesto que todos los fragmentos de ADN tienen la misma cantidad de carga por masa, los fragmentos pequeños atraviesan el gel más rápido que los grandes.

Cuando un gel se tiñe con un pigmento llamado BRET (Bromuro de Etidio) que se une al ADN, ya que cuenta con dos propiedades importantes: se intercala en las bases del ADN y brillan con luz UV; los fragmentos de ADN pueden verse como bandas, las cuales representan un grupo de fragmentos de ADN del mismo tamaño (Cortázar & Silva, 2004).



**Figura 7.** Cámara de electroforesis (Khanacademic, 2017).



## 2. METODOLOGÍA

### 2.1. Objetivos

#### Objetivo general

Detectar la presencia de los genes *inlC* e *inlJ* en *Listeria monocytogenes* mediante la técnica de PCR punto final para determinar su virulencia potencial en cepas aisladas de leche de cabra.

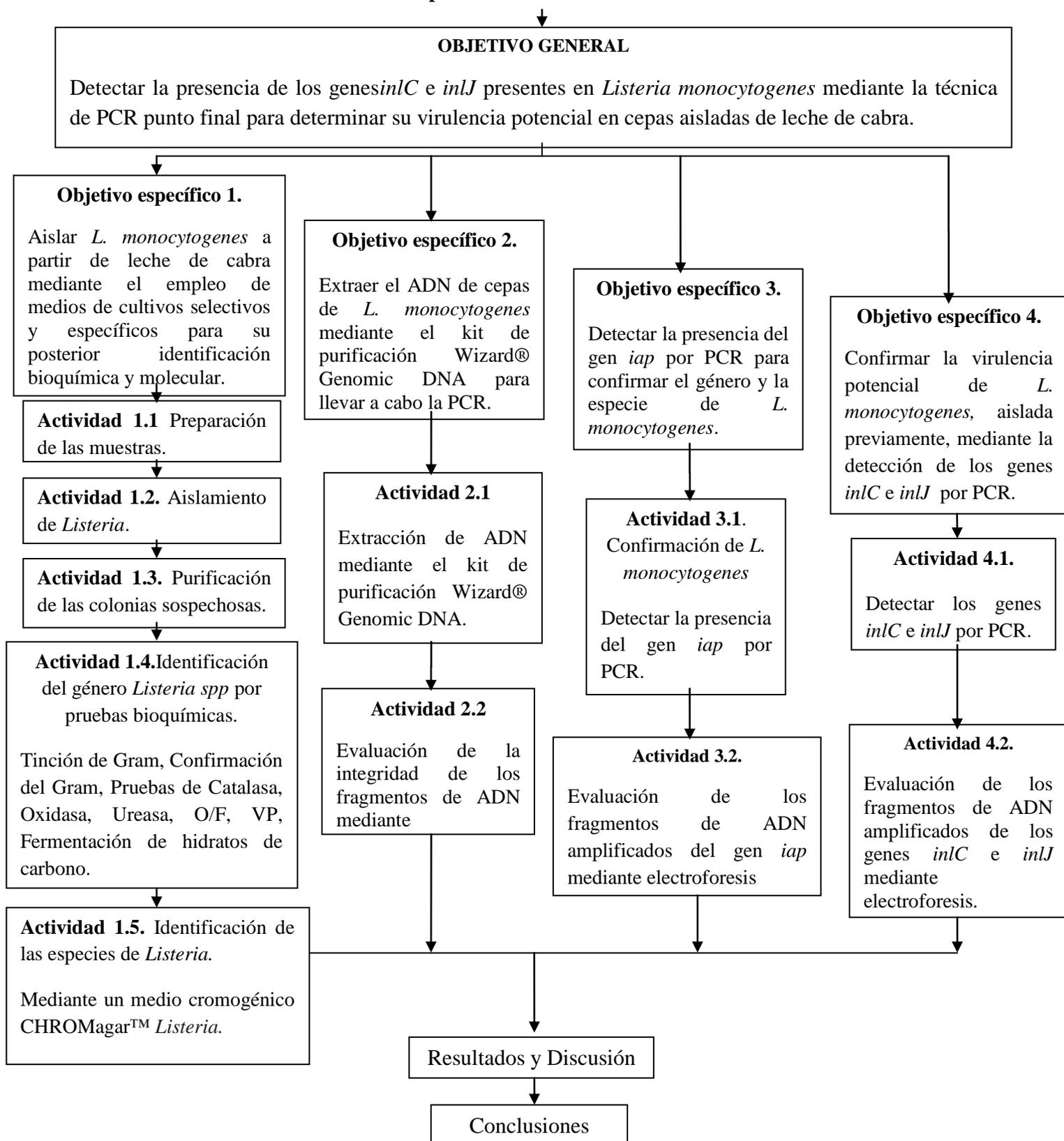
#### Objetivos específicos

1. Aislar *L. monocytogenes* a partir de leche de cabra mediante el empleo de medios de cultivos selectivos y específicos para su posterior identificación bioquímica y molecular.
2. Extraer el ADN de cepas de *L. monocytogenes* mediante el kit de purificación Wizard® Genomic DNA para llevar a cabo la PCR.
3. Detectar la presencia del gen *iap* por PCR para confirmar el género y la especie de *L. monocytogenes*.
4. Confirmar la virulencia potencial de *L. monocytogenes*, aislada previamente, mediante la detección de los genes *inlC* e *inlJ* por PCR.



## 2.2. Cuadro metodológico

### Determinación de la virulencia de *Listeria monocytogenes* por biología molecular en cepas aisladas de leche de cabra.



## 2.3. Materiales y métodos

### *Cepas control*

Las cepas que fungieron como control para *Listeria monocytogenes*, (*Listeria monocytogenes* 4524, *Listeria monocytogenes* ECDP60 y *Listeria monocytogenes* ATCC 43249) fueron proporcionadas por el laboratorio de Bacteriología de la Unidad de Posgrado, Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, Universidad Nacional Autónoma de México.

### *Muestras de leche*

Se realizó el estudio de 195 muestras de leche de cabra, pertenecientes a 30 granjas localizadas en el Estado de Chiapas debido a que las muestras fueron donadas por el Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias INIFAP, por lo que este estudio se concentró en muestras de dicho Estado. Las muestras se dividieron en 60 grupos, en el anexo 1 en la tabla 10 se enlistan las muestras analizadas en este trabajo.

Las muestras se conservaron en congelación hasta su análisis. Se siguió el método descrito en la NOM-210-SSA1-2014, este método permite determinar la presencia o ausencia de *L. monocytogenes* en los productos de consumo, se efectúa por medio de un pre-enriquecimiento selectivo y después se realiza su aislamiento en placas de medio de cultivo selectivo y diferencial, con su confirmación mediante pruebas bioquímicas y fisiológicas (NOM-210-SSA1-2014).

### 2.3.1. Preparación de las muestras

Para obtener una muestra homogénea, se descongelaron en baño María a temperatura de 37°C, se realizó un pre-enriquecimiento donde se adicionaron 50 mL de cada uno de los grupos seleccionados de leche de cabra a 225 mL de agua peptonada estéril previamente preparada, hasta que se obtuvo una mezcla homogénea, se incubaron a 30°C durante 6h; esto con la finalidad de reactivar y fomentar el crecimiento de las posibles *Listerias* que se encontraban estresadas por los cambios de temperatura.

### 2.3.2. Aislamiento de *Listeria*

- ☉ Se realizó un enriquecimiento primario, con 25 mL de la mezcla anterior en 225 mL de caldo Demi-Fraser suplementado con 2.25 mL de citrato férrico. Incubándose a  $30 \pm 1^\circ\text{C}$  durante  $24\text{h} \pm 2\text{h}$ .



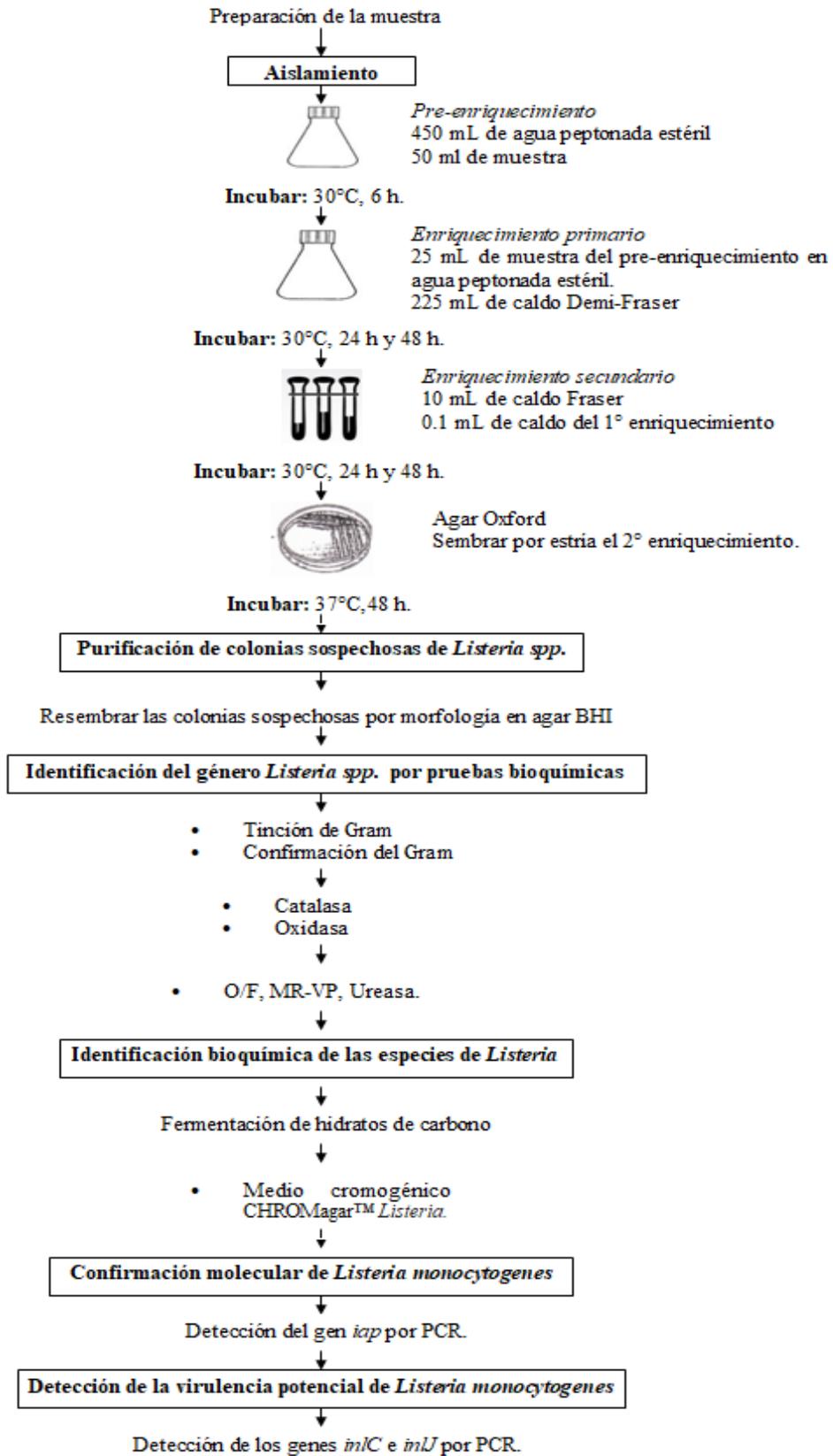
- ☉ Posteriormente se realizó un enriquecimiento secundario, transfiriendo 0.1 mL de caldo Demi-Fraser a 10 mL de caldo Fraser, incubándose a  $36 \pm 1^\circ\text{C}$  durante un período de 24h a 48h (NOM-210-SSA1-2014).

### 2.3.3. Purificación de las colonias sospechosas de *Listeria*

#### *Siembra en medios selectivos*

- ☉ Del enriquecimiento primario y secundario transcurrido el tiempo de la incubación, se inocularon por estría cruzada dos placas de agar Oxford el cual contiene además de esculina, esta modificado con el suplemento selectivo para *Listeria* (Oxoid SR140E) constituido por antibióticos a los que es resistente *Listeria* (ciclohexamida, sulfato de colistina, acriflavina, cefocetan y fosfomicina), se incubaron a  $37^\circ\text{C}$  durante 24h a 48 h (NOM-210-SSA1-2014).
- ☉ Después de la incubación por 24h; si se observaba un crecimiento pobre o si no se observaban colonias; se volvían a incubar por 18h a 24h. Las placas se observaron para detectar la presencia de colonias presuntivas de *Listeria spp*(NOM-210-SSA1-2014).
- ☉ Las colonias típicas de *Listeria spp*, en agar Oxford; por lo general crecen a las 24h son pequeñas (1mm), grisáceas, rodeadas por un halo oscuro por la degradación de la esculina y las sales férricas. Después de las 48h de incubación, las colonias se tornan oscuras con posible brillo verdoso de aproximadamente 2mm de diámetro, con halos negros y centros hundidos (NOM-210-SSA1-2014).
- ☉ Aquellas colonias con morfología característica de *Listeria spp*, fueron sembradas en agar infusión cerebro corazón BHI para su posterior purificación e identificación, ver figura 8.
- ☉ Se corroboró el género *Listeria* mediante la prueba de tinción de Gram y su confirmación, así como las pruebas de oxidasa, catalasa, movilidad y posteriormente a las muestras positivas se les realizo pruebas de confirmación de la especie *L. monocytogenes*, en la figura 8 se muestra un diagrama del procedimiento seguido para el aislamiento, identificación y confirmación de *L. monocytogenes*.





**Figura 8.** Diagrama de identificación y confirmación de *L. monocytogenes*



### **2.3.4. Identificación del género *Listeria spp* por pruebas bioquímicas**

#### ***Selección de Colonias para su confirmación***

De cada placa de agar selectivo se tomaron 5 colonias sospechosas de *Listeria spp*. Las colonias típicas se observaron de 1mm a 2 mm de diámetro, convexas, incoloras y opacas con borde entero (NOM-210-SSA1-2014).

#### ***Tinción de Gram***

Permite clasificar bacterias de acuerdo con su morfología y tinción, se realizó un frotis fino con las colonias sospechosas, una vez seco se fijó al calor, haciéndolo pasar tres veces a través de la llama del mechero Fisher, se realizó una tinción inicial donde las células se tiñeron con cristal violeta. Las células se tiñeron de morado, luego de un minuto, se lavó el frotis con agua destilada, se adicionó yoduro (lugol) que reacciona con el cristal violeta y forma un complejo cristal violeta-yoduro. En este punto todas las células continúan de color morado, luego de un minuto se decoloró adicionando alcohol-acetona, el cual actúa lavando el complejo cristal violeta-yoduro de las células Gram negativas. De esta manera las bacterias Gram positivas continúan moradas y las Gram negativas quedan incoloras, se lavó el frotis con agua destilada y se tiñó con safranina por 1 min, las bacterias gram negativas, se tiñeron de rosado, en tanto las bacterias Gram positivas permanecieron moradas (Rodríguez *et al.*, 2005).

Posteriormente se examinó el frotis, con el microscopio bajo el objetivo de inmersión de 100x. Se deberán observar bacilos cortos Gram Positivos que se tiñen de color morado o azul oscuro.

#### ***Confirmación del Gram***

Consiste en la determinación de bacterias Gram positivas o negativas en virtud de la pared celular al reaccionar con una solución alcalina diluida (KOH al 3%). En un portaobjeto se colocó una gota de KOH y se añadió una asada del cultivo puro y joven, se mezcló durante unos segundos, se levantó ligeramente el asa. Si se observaba la formación de un hilo, la reacción se consideraba positiva, lo cual significaba que la bacteria pertenecía al grupo de bacterias Gram negativas, debido a la destrucción de la pared celular provocando la salida del contenido celular por acción del hidróxido de potasio, mientras que las bacterias que no producían viscosidad se consideraban como Gram positivas (Koneman & Allen, 2008).

#### ***Prueba de la Catalasa***

La enzima catalasa cataliza la liberación de agua y oxígeno a partir del peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2 + \text{catalasa} = H_2O + O_2$ ); su presencia se determina por análisis directo de un cultivo bacteriano. La producción rápida de burbujas (efervescencia) cuando el cultivo bacteriano se mezcla con una solución de peróxido de hidrógeno se interpreta como una prueba positiva (es decir, presencia de catalasa). Si no se produce efervescencia o ésta débil



la prueba se interpreta como negativa. La reacción de catalasa diferencia *Listeria monocytogenes* y corinebacterias (catalasa positivas) de otros bacilos grampositivos no formadores de esporas (Forbes *et al.*, 2004).

Se transfirió con un palillo de madera estéril, una colonia aislada y se suspendió en una gota de solución de peróxido de hidrógeno al 3% en un portaobjetos. La inmediata formación de burbujas indica una reacción positiva. Precaución: la agitación del reactivo con la suspensión del microorganismo debe hacerse con un asa de plástico o palillo de madera estéril (NOM-210-SSA1-2014).

### ***Prueba de la oxidasa***

La citocromo oxidasa participa en el transporte de electrones y en la vía metabólica del nitrato de ciertas bacterias. La prueba para detectar la presencia de oxidasa puede realizarse cubriendo las colonias bacterianas en la superficie del agar con el reactivo clorhidrato de tetrametil-*p*-fenilendiamina al 1%. Una alternativa es frotar una muestra de la colonia bacteriana sobre un papel filtro impregnado con el reactivo (método de Kovac), (Forbes *et al.*, 2004).

Se humedeció un papel filtro con el reactivo clorhidrato de tetrametil-*p*-fenilendiamina al 1%. Con un palillo estéril se tomó una muestra de la colonia bacteriana y se frotó la superficie. Se observó en el área inoculada un cambio de color azul o violeta oscuro dentro de 10 segundos máximo.

### ***Prueba de la Ureasa***

La ureasa hidroliza el sustrato urea en amoníaco, agua y dióxido de carbono. Para determinar la presencia de la enzima se inoculó una colonia de la bacteria en un caldo que contenía urea como fuente principal de carbono y se detectó la presencia de amoníaco, mediante el cambio de color 24 a 48h. El amoníaco aumenta el pH del medio, por lo que su presencia se detecta con facilidad con un indicador de pH que posee el medio de cultivo (Forbes *et al.*, 2004).

### ***Prueba de oxidación y fermentación (O/F)***

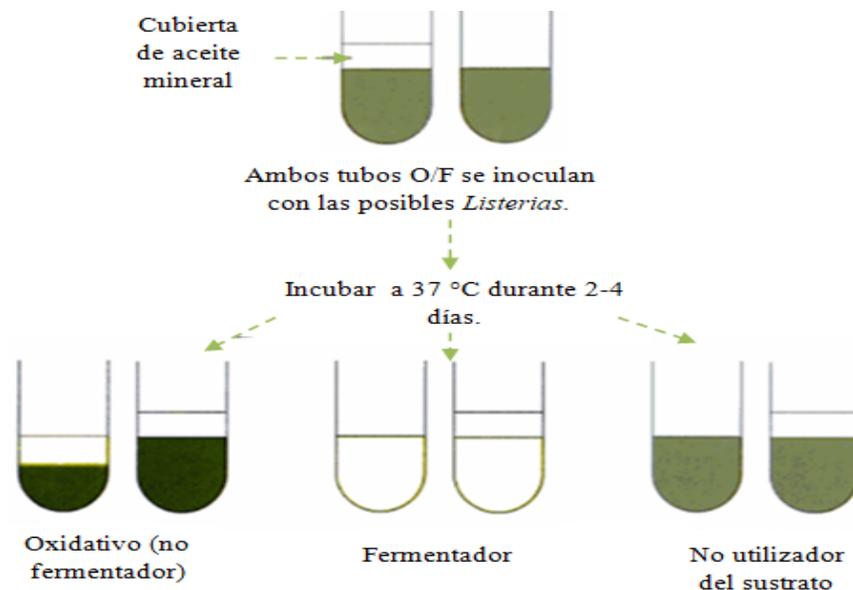
Se determina la forma en que un microorganismo utiliza un sustrato mediante la observación de los subproductos ácidos que produce en presencia o en su ausencia de oxígeno que se detecta por un cambio en el pH. Los cambios de color que aparecen en presencia de ácido, se logran con un medio especial (medio para oxidación-fermentación [O-F]) que contiene concentraciones bajas de peptona y un sustrato con un único hidrato de carbono, generalmente glucosa. El microorganismo se siembra en dos tubos de O-F con glucosa, uno de los cuales se cubre con aceite mineral para impedir el ingreso de oxígeno.



El indicador de pH presente en el medio de cultivo que cambia de color en condiciones ácidas es el azul de bromotimol (que cambia del verde al amarillo) (Forbes *et al.*, 2004).

Cuando se determina la producción de ácido en ambos tubos el microorganismo se identifica como fermentador de la glucosa porque la fermentación puede producirse con oxígeno o sin él. Si el ácido sólo se detecta en el tubo en aerobiosis (abierto) se considera que el microorganismo oxida la glucosa. Algunos microorganismos no utilizan la glucosa como sustrato y no se observa la presencia de ácido en ninguno de los tubos (no utilizadores de glucosa) como de muestra en la figura 9 (Forbes *et al.*, 2004).

Se inocularon dos tubos por cada muestra a probar por punción ambos tubos, a uno de ellos se le adicionó glicerol estéril alrededor de 1-2 mL para crear una condición anaerobia al crecer el microorganismo. Se incubó a 37°C durante 2-4 días ya que pueden ser microorganismos de desarrollo lento. *Listeria monocytogenes* es O/F (+).



**Figura 9.** Principio de la prueba de oxidación/fermentación.

### ***Prueba del rojo de metilo***

El rojo de metilo es un indicador de pH con un intervalo entre 6 (amarillo) y 4.4 (rojo). La prueba requiere organismos que produzcan ácidos fuertes (láctico, acético, fórmico) a partir de glucosa, por la vía de la fermentación ácida mixta, sólo se consideran rojo de metilo positivo aquellos organismos que son capaces de mantener ese pH bajo durante una incubación prolongada (48 ó 72 h). Se inoculó un tubo con caldo MR/VP con una muestra de cultivo puro, se incubó el caldo a 35°C durante 48 h, transcurrido este tiempo se añadió directamente al tubo 5 gotas del reactivo rojo de metilo, al visualizarse un color rojo estable en la superficie del medio, indicó que la producción de ácido es suficiente como para bajar el pH a 4.4 por lo que se consideró como una prueba positiva (Álvarez & Mendoza, 2005).



### ***Prueba de Voges-Proskauer (VP)***

Determina la capacidad de algunos microorganismos para producir un producto final neutro, acetilmetilcarbinol (AMC, acetoína), a partir de la glucosa. Voges y Proskauer fueron los primeros en observar una coloración roja en los medios de cultivo después del tratamiento con hidróxido de potasio. La glucosa es metabolizada a ácido pirúvico, el principal intermediario en la glucólisis. A partir del ácido pirúvico, las bacterias pueden seguir muchos caminos metabólicos; la producción de acetoína es una de las vías metabólicas de la degradación de la glucosa en bacterias (MacFaddin, 2003).

En presencia de oxígeno atmosférico y de hidróxido de potasio al 40%, la acetoína se convierte en diacetilo y el  $\alpha$ -naftol actúa como catalizador para revelar un complejo de color rojo (Álvarez & Mendoza, 2005).

Se inoculó un tubo de caldo MR/VP con un cultivo puro de 18 a 24h, se adicionaron 0.6 mL de  $\alpha$ -naftol al 5% y 0.2 mL de KOH al 40%, se mezclaron suavemente y se dejó en reposo durante 15 min; una prueba positiva está indicada por el desarrollo de un color rosado-rojo en la superficie del medio (acetoína presente), (MacFaddin, 2003).

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

#### ***Pruebas de fermentación de hidratos de carbono***

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

Se inocularon tubos con caldo rojo fenol que contenía cada uno de los hidratos de carbono al 0.5 %, (salicina, lactosa, ramnosa, manitol y xilosa), se incubaron durante 7 días a 35°C con un cultivo de 24h. Una coloración amarilla indicaba una prueba positiva. *L. monocytogenes* es manitol negativo, ramnosa positiva y xilosa negativa (NOM-143-SSA1-1995).

#### ***Medio cromogénico CHROMagar™ identificación *Listeria****

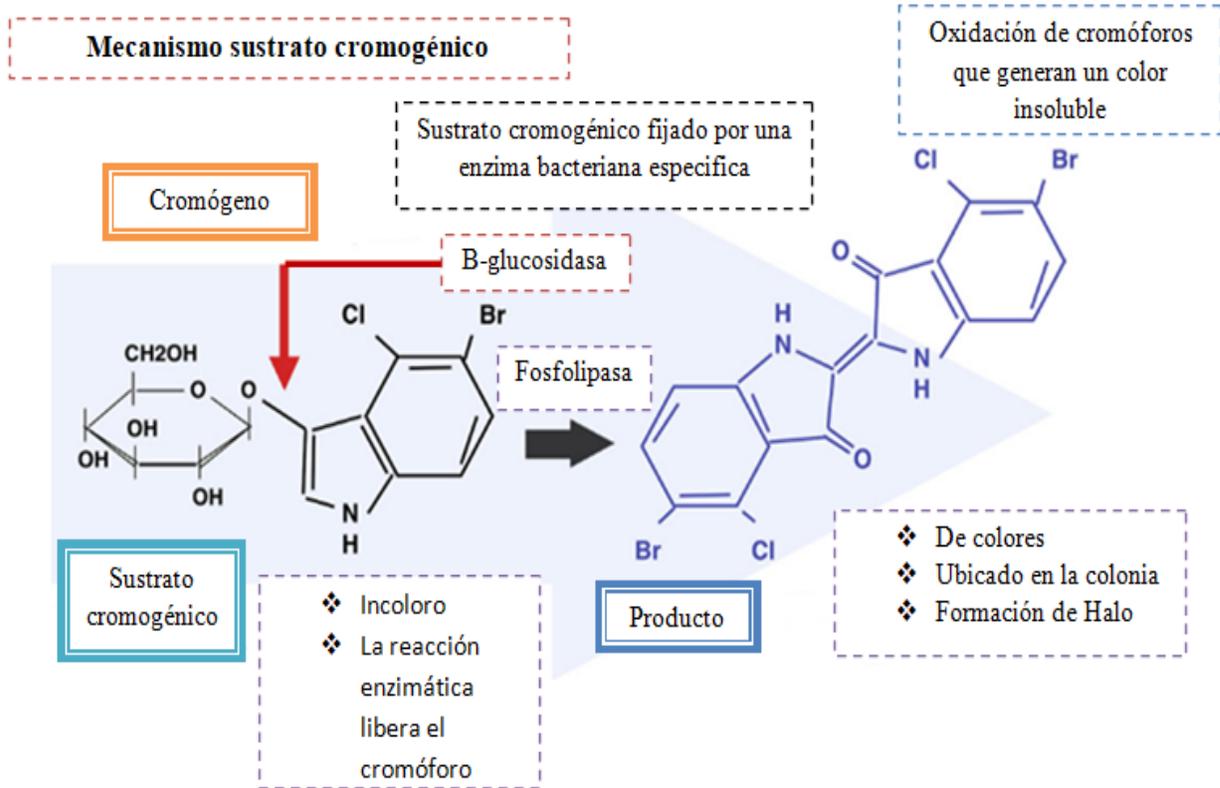
La finalidad del medio cromogénico es para la confirmación de las especies de *L. monocytogenes* aisladas previamente, en el medio cromogénico CHROMagar *Listeria*. (CHROMagar™, 2017).

Es un medio selectivo para aislamiento, diferenciación e identificación presunta de *Listeria monocytogenes* de muestras de alimentos y ambientales. La detección y diferenciación de *L. monocytogenes* de otras especies y organismos de *Listeria* se ven facilitados por la adición de un sustrato cromogénico y fosfolípidos en el medio (Dick *et al.*, 2005).



Esta tecnología se basa en moléculas incoloras solubles (llamadas cromógenos), compuestas por un sustrato (dirigido a una actividad enzimática específica) y un cromóforo. Cuando la enzima del organismo objetivo escinde el conjugado cromogénico incoloro, se libera el cromóforo. En su forma no conjugada, el cromóforo exhibe su color distintivo y, debido a la solubilidad reducida, forma un precipitado (CHROMagar™, 2017).

Reacciona de dos formas, la primera es expresada por medio de una coloración rosa de las colonias generadas por una reacción enzimática producida solo por dos especies: *L. monocytogenes* y *L. innocua* y el cromógeno contenido en el medio de cultivo; la segunda reacción se lleva a cabo por sustratos fosfolípidicos como la fosfolipasa C fosfatidil-inositol (PI-PLC) y C-fosfaridil-colina fosfolipasa (PC-PLC), producidas por *L. monocytogenes* y *L. ivanovii* las cuales intervienen en el proceso de virulencia, generando la formación de un “halo” blanco alrededor de la colonia (AFNOR CHROMagar™ *Listeria*, 2009), es por ello que este método permite diferenciar y comprobar de manera efectiva las especies de *Listeria*, el mecanismo de reacción se muestra en la figura 10.



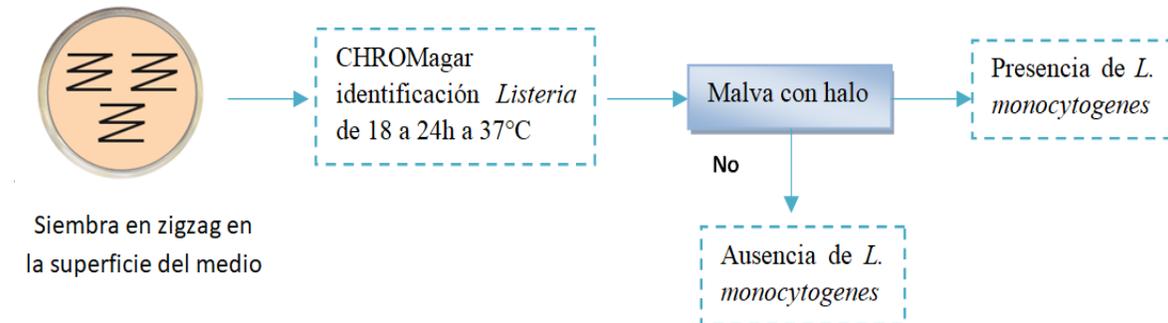
**Figura 10.** Mecanismo de reacción medio cromogénico CHROMagar™ identificación *Listeria* (CHROMagar™, 2017).

Se inoculó el agar mediante siembra dibujando un zigzag en la superficie del medio cada una de las cepas en las placas para efectuar su identificación. Se incubaron las placas aeróbicamente a 35 + 2°C en posición invertida por 18 a 24h como se muestra en la figura



11. Posteriormente las placas fueron leídas sobre un fondo blanco con una buena iluminación.

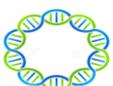
Las colonia color malva rodeada de un halo blanco opaco en la placa indicaron la presencia de *Listeria monocytogenes*.



**Figura 11.** Método de detección en CHROMAGAR™ identificación de *Listeria*

### 2.3.6. Confirmación molecular de la especie *Listeria monocytogenes*

Para esta etapa experimental las muestras fueron proporcionadas por el laboratorio de Bacteriología de la Unidad de Posgrado, Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, Universidad Nacional Autónoma de México, provenientes de trabajos previos realizados en las granjas de San Bartolo ubicada en la Región norte en el municipio de Reforma, El Potrero y Lulú ambas de la Región Centro en el municipio de Ocozocuatla, las cuales fueron identificadas como *L. monocytogenes* mediante métodos convencionales, en la tabla 6 se enlistan las muestras utilizadas en este trabajo. Se usaron estas porque las 195 muestras analizadas en esta tesis fueron negativas y las proporcionadas por el laboratorio corresponden al mismo grupo de muestras.



**Tabla 6.**Muestras donadas de trabajos previos.

<b>Muestra</b>	<b>Cepa</b>
M1	Cepa 1
M2	Cepa 4
M3	Cepa 12
M4	Cepa 13
M5	Cepa 16
M6	Cepa 18
M7	Cepa 19A
M8	Cepa19B
M9	Cepa 31
M10	Cepa 42
M11	Cepa 43
M12	Cepa 46
M13	Cepa 2
M14	Cepa 6
M15	Cepa 7

### **2.3.7. Extracción de ADN**

Para la extracción de ADN genómico se utilizó el kit de purificación Wizard® Genomic DNA que se muestra en la figura 12. El kit se basa en un proceso, de purificación lisa las células. En este momento puede incluirse un paso de digestión con RNAsa. Las proteínas celulares se eliminan entonces mediante una etapa de precipitación de la sal, que precipita las proteínas,y deja el ADN genómico de alto peso molecular en solución. Finalmente, el ADN genómico se concentra y se desalifica mediante precipitación con isopropanol (Promega Corporation, 2017). A continuación se describen las etapas que conlleva este procedimiento.



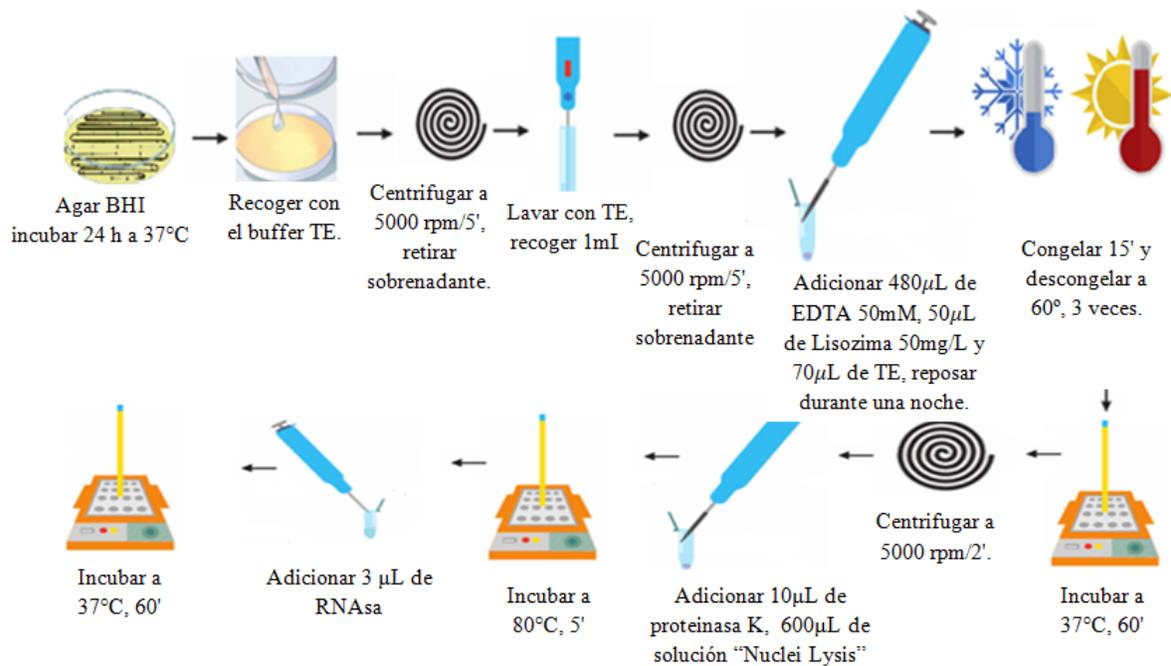


**Figura 12.** Kit Wizard® Genomic DNA.

### *Lisis de las células y liberación del ADN*

Se recogió el cultivo de cada una de las cepas de *Listeria monocytogenes* con el buffer Tris EDTA (TE) pH 8.0, a partir de un cultivo de 24h en agar infusión cerebro corazón (BHI) incubados a 37°C, se centrifugaron a 5000 rpm y se lavaron con el mismo buffer, se recogió 1mL en un tubo eppendorf para centrifugarse a 5000 rpm durante 5 min, posteriormente se retiró el sobrenadante. Se resuspendió completamente el pellet celular en 480µL de ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) 50 mM, se adicionaron 50µL de Lisozima y 70µL de TE mezclando suavemente por pipeteo, el propósito de este pretratamiento es debilitar la pared celular de manera que permitiera una lisis celular eficaz, las muestras se incubaron a 37°C durante 60 min se centrifugaron a 5000 rpm durante 2 min y se agregaron 10µL de proteinasa K pura, se adicionaron 600µL de solución “Nuclei Lysis” mezclando suavemente por pipeteo hasta que las células se resuspendieron y se incubó a 80°C durante 5 min para lisar las células; posteriormente se enfrió a temperatura ambiente. Se adicionaron 3µL de RNasa al lisado celular, mezclando invirtiendo el microtubo 2-5 veces. Las muestras se incubaron a 37°C durante 60 min, dicho procedimiento se muestra en la figura 13.

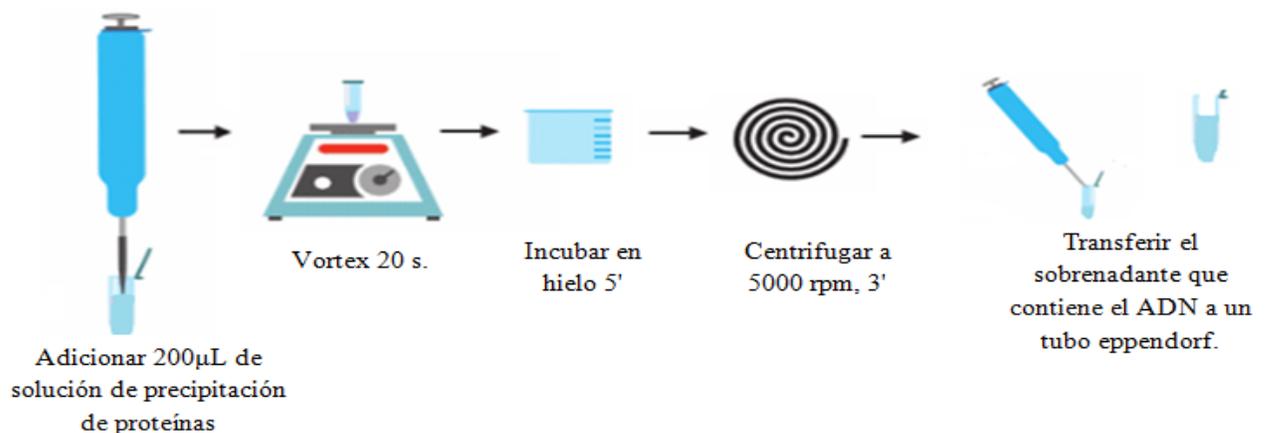




**Figura 13.** Preparación de la muestra para la extracción de ADN.

### *Purificación de ADN*

Al concluir la lisis celular y la inactivación de nucleasas, se retiran los restos celulares, proceso conocido como purificación (Salazar, M., *et al.*, 2013). Se añadieron 200µL de solución de precipitación de proteínas al lisado celular tratado con RNAsa, mezclando con el vortex a alta velocidad durante 20 segundos. Las muestras se incubaron en hielo durante 5 min, posteriormente se centrifugaron a 5000 rpm durante 3 min, se transfirió el sobrenadante que contenía el ADN a un tubo eppendorf de 1.5mL de capacidad limpio como se muestra en la figura 14.



**Figura 14.** Purificación del ADN.



### Precipitación de ADN

El ADN disuelto en la solución acuosa se precipita añadiendo alcohol absoluto (isopropanol o etílico), ya que los ácidos nucleicos son insolubles en soluciones alcohólicas (Salazar, M., *et al.*, 2013). El tubo al que fue transferido el ADN contenía 600µL de isopropanol, se mezcló suavemente por inversión hasta que las hebras de hilo de ADN formaran una masa visible, se centrifugó a 7000 rpm durante 5 min, se eliminó cuidadosamente el sobrenadante y se escurrió el tubo sobre papel absorbente limpio a temperatura ambiente como se muestran en la figura 15.

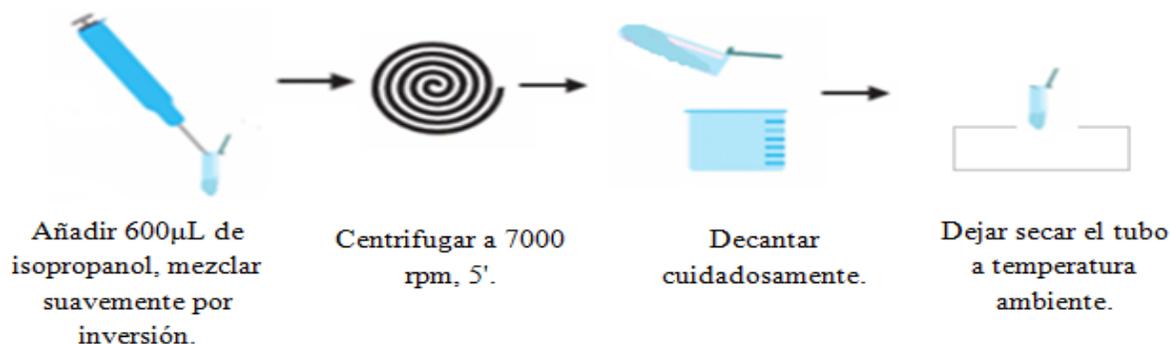


Figura 15. Precipitación de ADN.

### Lavado de ADN

El botón de ADN obtenido en la precipitación se lavó con 600µL etanol al 70%, se invirtió el tubo suavemente varias veces para lavar el sedimento de ADN. El contenido de alcohol de esta solución (70%) mantiene al ADN precipitado, y el H<sub>2</sub>O (30%) permite la disolución de las sales presentes. Se centrifugó a 14000 rpm durante 3 min, se aspiró cuidadosamente el etanol, Después de los lavados, se secó el botón, lo que permitió la evaporación del alcohol (Salazar, M., *et al.*, 2013). Se drenó el tubo sobre papel absorbente limpio y se dejó secar al aire durante 10 a 15 min, como se muestran en la figura 16.

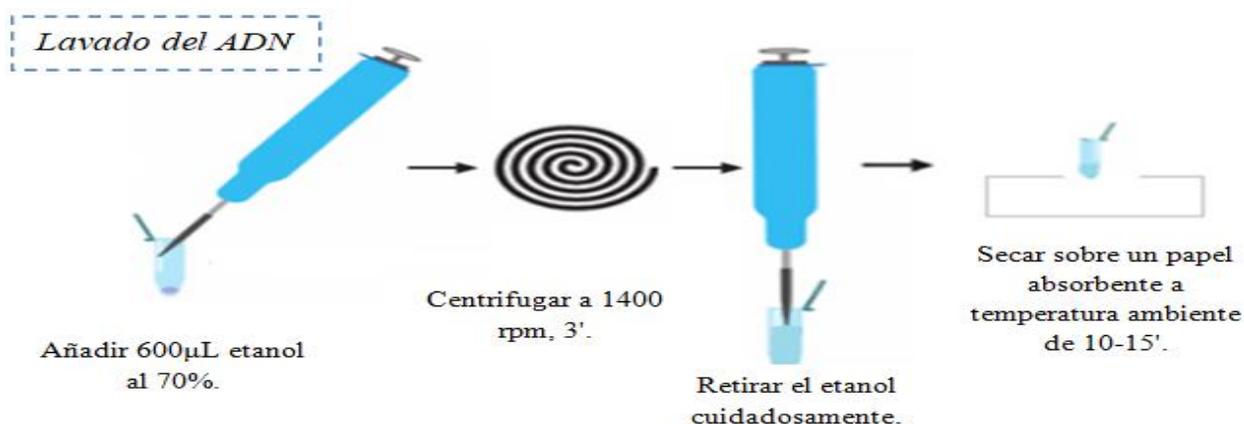
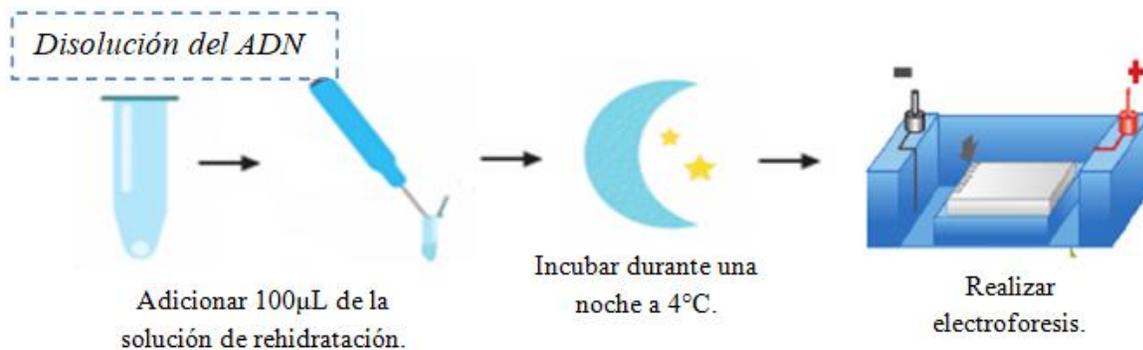


Figura 16. Lavado del ADN.



## Disolución del ADN

Inmediatamente después de la evaporación del alcohol, el botón de ADN se disolvió en soluciones que aseguren su preservación (Salazar, M., *et al.*, 2013). Se añadieron 100µL de solución de rehidratación del kit, al tubo y se incubó durante una noche a 4°C, se puede almacenar el ADN a una temperatura entre 2 y 8°C ó en congelación por periodos largos. Por último se realizó la electroforesis utilizando agarosa al 1.5%, como se muestra en la figura 17.



**Figura 17.**Disolución del ADN.

## Electroforesis

El principio de la electroforesis consiste en la migración proporcional de las moléculas a través de un gel u otro tipo de matriz porosa, según su peso molecular o tamaño; movimiento generado por un campo eléctrico (Salazar, *et al.*, 2013). Debido a que la mayoría de las moléculas poseen una carga eléctrica cuya magnitud depende del pH del medio en el que se encuentran; como consecuencia, pueden desplazarse cuando se ven sometidas a un campo eléctrico hacia el polo de carga opuesta al de la molécula. El ADN posee carga negativa, debido a su esqueleto de grupos fosfato. Por lo tanto, en una electroforesis, migrará hacia el polo positivo; es decir, al ánodo.

Se realizó la técnica de electroforesis con un gel de agarosa al 1% para visualizar la integridad del ADN obtenido de las *Listerias* aisladas y agarosa al 1.5 % para visualizar los productos de PCR.

*Preparación del gel de agarosa al 1% para visualizar la integridad del DNA.*

1. El gel de agarosa se preparó al 1% disuelto en el buffer Tris-borato, EDTA (TBE) 1X, calentando la disolución en un horno de microondas hasta la hidratación del gel, se dejó a temperatura ambiente y se añadieron 4µL de Bromuro de Etidio (BRET), se mezcló cuidadosamente ya que es altamente tóxico.



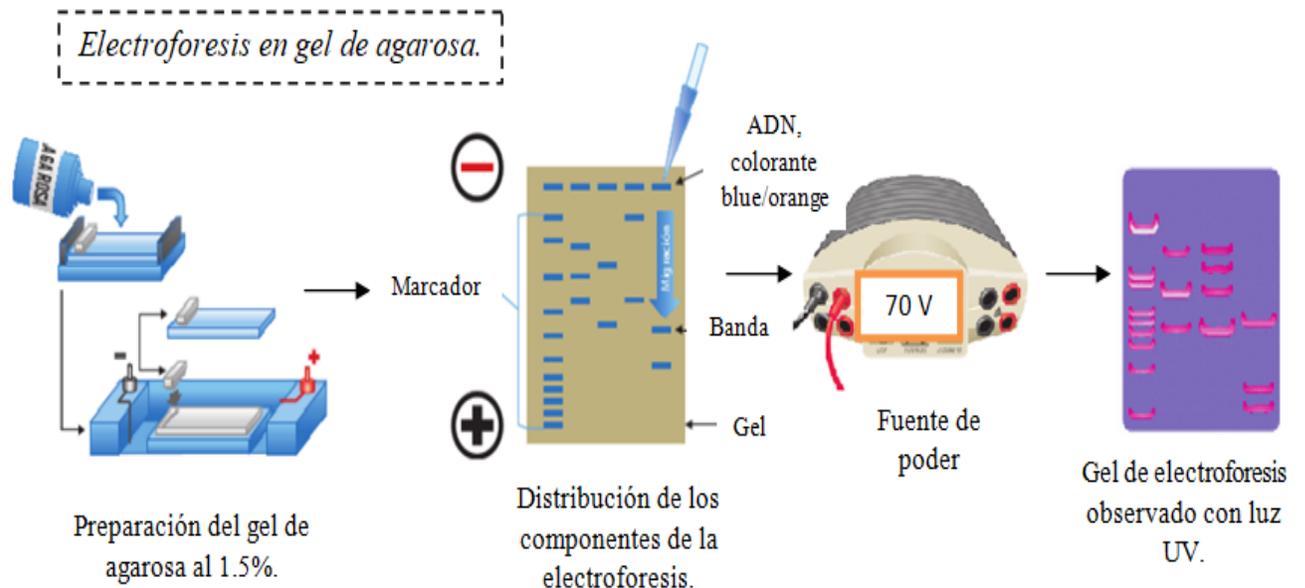
2. Se cerraron las puertas laterales del soporte del gel para verter la mezcla en el soporte cuidando que no se formen burbujas y se colocaron los peines y se dejó gelificar la solución.
3. Se retiraron los peines y se adicionaron 300mL de TBE al 1X a la cámara hasta quedar cubierto.

*Carga y corrida del gel.*

4. Se colocó en un trozo de parafilm 2 $\mu$ L de colorante blue/orange y 5 $\mu$ L de las muestras del amplificado obtenido por PCR, se colocaron en un pozo, y así se continuo con las demás muestras. Al inicio en el primer pozo se colocó 1 $\mu$ L de marcador de peso molecular de 1000 pares de bases y 2 $\mu$ L de colorante blue/orange se mezclaron con la micropipeta y se vertieron cuidadosamente.
5. Una vez cerrada la cámara de electroforesis se activó el campo eléctrico proporcionado por la fuente de poder, a 70 V, cuando las muestras ya han salido de los pozos, se aumentó el voltaje a 90 V.
6. La corrida dura hasta que el colorante se visualice cerca del extremo opuesto.

*Visualización de fragmentos.*

7. Al final de la corrida del gel, se colocó dentro del trasluminador y se observó con luz UV.
8. Se capturó la imagen del gel con el analizador de imágenes KODAK 1D, para posteriormente analizarla. El procedimiento se observa en la figura 18.



**Figura 18.** Electroforesis en gel de agarosa.



### 2.3.8. Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

*Confirmación de la especie Listeria monocytogenes.*

Se realizó la PCR punto final utilizando el kit para PCR Master Mix 2X Promega®, para la identificación de *L. monocytogenes* mediante la detección del gen *iap*, obteniendo un amplificado de 175 pb, por medio de los cebadores LIM2 y LIMRE cuyas secuencias correspondientes se muestran en la tabla 7. Posteriormente se visualizaron los productos en un gel de electroforesis usando 1.5% de agarosa con bromuro de etidio (Hein et al., 2001).

**Tabla 7.** Cebadores específicos para la detección del gen *iap* que codifica la proteína p60 común en todas *Listeria monocytogenes*.

Cebadores		Secuencias de los cebadores (5'→3')	Producto de PCR esperado (pb)
Frontal	LIM2	CTA AAG CGG GAA TCT CCC TT	175
Reverso	LIMRE	CCA TTG TCT TGC GCG TTA AT	

☉ Se utilizó el kit de PCR Master Mix, 2X (Promega®), el cual contenía: 50 unidades/mL de Taq ADN polimerasa resuspendida en un buffer de reacción con pH 8.5, 400µM dATP, 400µM dGTP, 400µM dCTP, 400µM dTTP, 3mM MgCl<sub>2</sub> (Promega Corporation., 2017). Se conservaron a -4°C, y fueron descongelados al momento de emplearlos.

☉ Se adicionaron en un microtubo las cantidades mostradas en la tabla 8.

**Tabla 8.** Cantidad de los componentes utilizados en la PCR.

Gen <i>iap</i>	
Componente	Cantidad
Kit master mix	12.5µL
Cebador LIM2	2.5µL
Cebador LIMRE	2.5µL
Agua libre de nucleasas	3.5µL
ADN	4µL
Volumen total de reacción	25µL



- ☞ Para el control positivo y negativo se adicionaron las mismas cantidades tanto del master mix, cebadores, H<sub>2</sub>O y por último el ADN control de *Listeria monocytogenes*, para el control negativo en lugar de ADN se adicionaron 4.0µL de H<sub>2</sub>O libre de nucleasas respectivamente (Promega Corporation., 2017).
- ☞ Se centrifugaron los microtubos por 5 segundos para asegurar que el líquido no se quedara en las paredes.

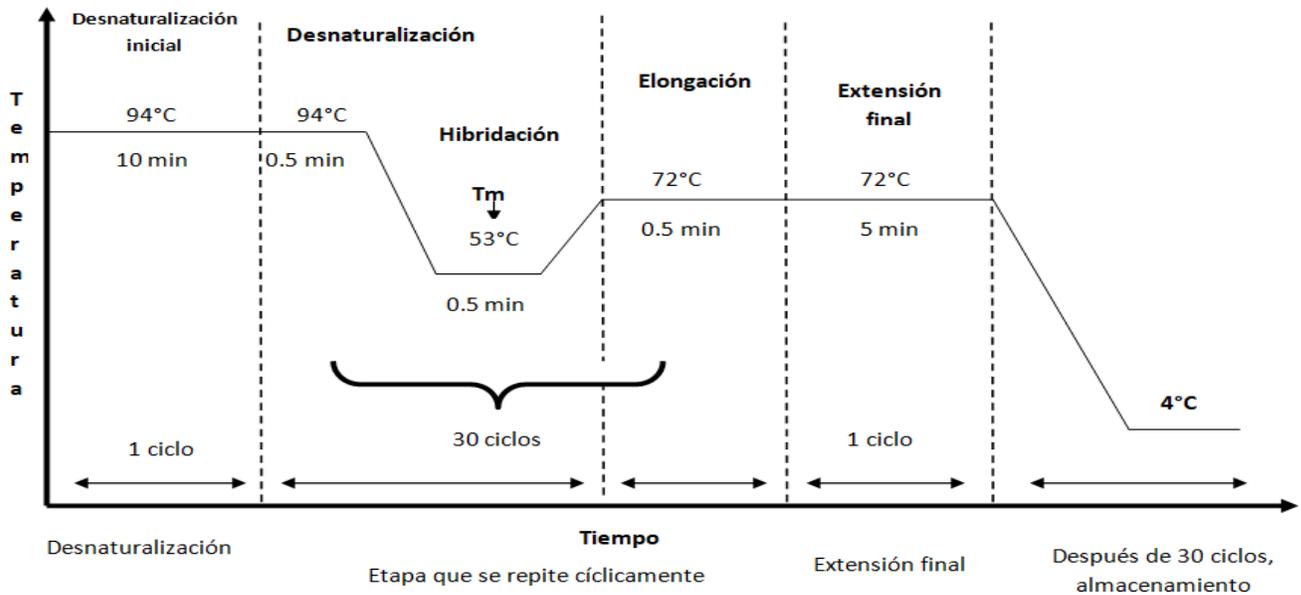
#### Reacción de PCR

- ☞ En el termociclador se colocaron los microtubos que contenían la mezcla de control positivo, el control negativo y el ADN problema de cada muestra.
- ☞ Se inició con el programa correspondiente para la amplificación del gen *iap*, las condiciones el programa de PCR se muestran en la tabla 9, así como en la figura 19(Hein *et al*, 2001).

**Tabla 9.** Condiciones del programa de PCR, detección del gen *iap*.

<b>Etapa</b>	<b>Temperatura</b>	<b>Tiempo</b>	<b>Ciclos</b>
<b>Desnaturalización inicial</b>	94°C	10 minutos	1
<b>Desnaturalización</b>	94°C	0.5 minutos	35
<b>Hibridación</b>	53°C	0.5 minutos	
<b>Elongación</b>	72°C	0.5 minutos	
<b>Extensión final</b>	72°C	5 minutos	1





**Figura 19.** Programa de PCR para la detección del gen *iap* y con este la identificación de *Listeria monocytogenes*.

Se realizó la electroforesis en gel de agarosa al 1.5%, a los amplificados obtenidos para detectar la presencia del gen *iap* de 175 pb (Liu *et al.*, 2003), observando el gel en un transiluminador de luz UV.

### 2.3.9. Determinación de la virulencia de *Listeria monocytogenes* por PCR.

Los genes internos de *L. monocytogenes* (*inlC* e *inlJ*) tienen una amplificación de 517 y 238 pb respectivamente, se evaluaron con la técnica de PCR punto final, las secuencias de los cebadores se muestran en la tabla 10. Empleando el ADN purificado de las cepas aisladas y la cepa control positiva. Posteriormente se visualizaron los productos en un gel de electroforesis usando agarosa al 1.5% con bromuro de etidio (Liu *et al.*, 2003).

**Tabla 10.** Cebadores específicos para los genes internos de *Listeria monocytogenes* (*inlC* e *inlJ*).

Gen	Secuencias de codificación	Secuencias de los cebadores (5'→3')	Producto de PCR esperado (pb)
<i>inlC</i>	107200-108090	F: AATTCCCACAGGACACAACC	517
		R: CGGGAATGCAATTTTCTACTA	
<i>inlJ</i>	188153-190708	F: TGTAACCCCGCTTACACAGTT	238
		R: AGCGGCTTGGCAGTCTAATA	



Para llevar a cabo la PCR se prepararon las muestras de acuerdo al Kit para PCR Master Mix Promega®, con los cebadores frontal y reverso correspondientes. A continuación se describe el procedimiento, y en la tabla 11, se muestran los componentes utilizados para llevar a cabo la reacción.

**Tabla 11.**Componentes y cantidad para llevar a cabo la PCR.

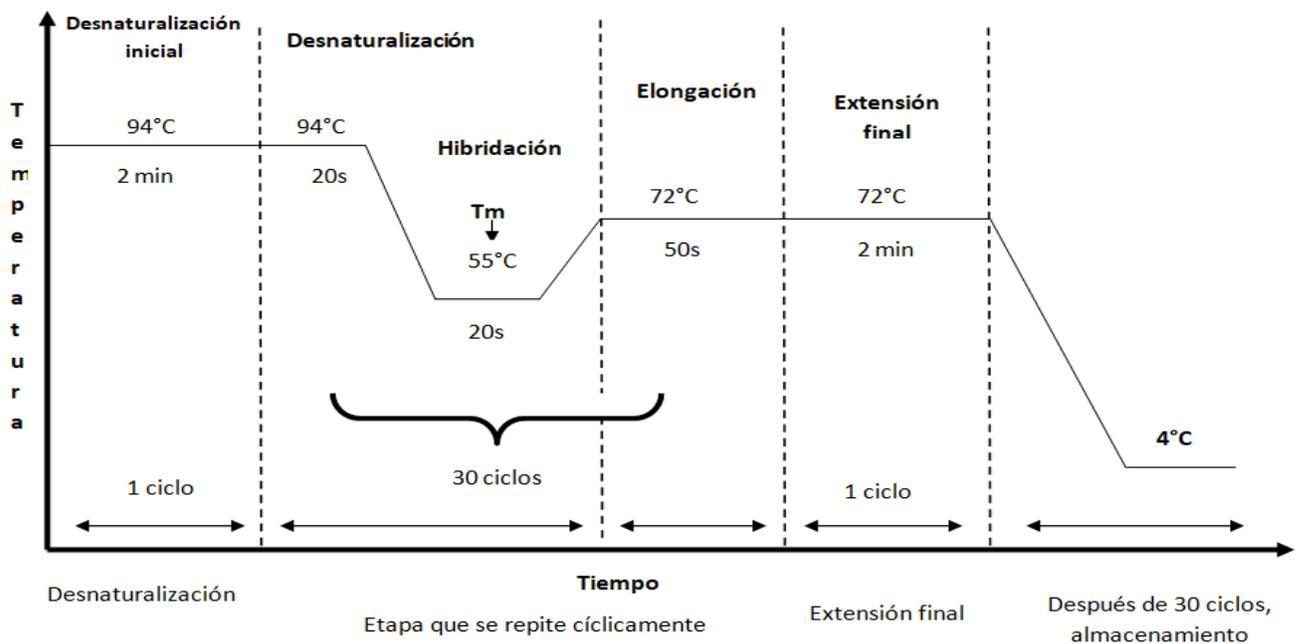
<i>inIC</i>		<i>inIJ</i>	
Componente	Cantidad	Componente	Cantidad
Kit master mix	12.5µL	Kit master mix	12.5µL
Primer F	1.6µL	Primer F	1.5µL
Primer R	1.6µL	Primer R	1.5µL
Agua libre de nucleasas	6.3µL	Agua libre de nucleasas	6.5µL
ADN	3.0µL	ADN	3.0µL
Volumen total de reacción	25µL	Volumen total de reacción	25µL

- ☉ Se adicionaron 12.5µL de los componentes del kit master mix de PCR, 6.3 y 6.5µL de agua libre de nucleasas según corresponda y la cantidad indicada de los cebadores F y R respectivamente, se añadió a cada tubo 3µL de ADN de la muestra que le corresponda y centrifugar 5s, ver tabla 11.
- ☉ Se metieron los tubos al termociclador y se programaron las condiciones y ciclos, según el programa de la PCR, el cual consiste en un paso inicial de un ciclo de 2 min a 94°C, 30 ciclos de 20s a 94°C para la desnaturalización, de 20s a 55°C para la hibridación, 50s a 72°C para la elongación, y 2 min a 72°C para una extensión final, ver tabla 12 y figura 20 (Liu *et al.*, 2007).



**Tabla 12.** Condiciones del programa de PCR, detección de los genes *inlC* e *inlJ*.

Etapa	Temperatura	Tiempo	Ciclos
Desnaturalización inicial	94°C	2 minutos	1
Desnaturalización	94°C	20 segundos	35
Hibridación	55°C	20 segundos	
Elongación	72°C	50 segundos	
Extensión final	72°C	2 minutos	1



**Figura 20.** Programa de PCR para la detección de los genes *inlC* e *inlJ* para evidenciar la virulencia potencial de *Listeria monocytogenes*.

Por último se realizó la electroforesis en gel de agarosa al 1.5%, ya que los cebadores de oligonucleótidos se diseñaron para los genes internos de *L. monocytogenes* (*InlC* e *InlJ*), con un amplificado esperado de 517 y 238 pb respectivamente.



### 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

#### 3.1. Aislamiento de *Listeria*

El aislamiento se llevó a cabo de acuerdo a la metodología propuesta desde el pre-enriquecimiento en agua peptonada, continuando en caldo Demi-Fraser así como en caldo Fraser. Se sembró por estría el segundo enriquecimiento en agar Oxford con cada uno de los 60 grupos como se muestra en la figura 21.



**Figura 21.** Aislamiento de *Listeria* spp de muestras de leche de cabra.

Los medios Demi-Fraser así como el agar Oxford con presuntas *Listeria*s se oscurecieron debido a la utilización de la esculina y las sales férricas, mientras que las muestras negativas mantuvieron el tono amarillento del medio (Yousef & Carlstrom, 2006). Después de 24h y a las 48h, los medios Oxford que presentaron colonias pequeñas, grisáceas, redondas y con halo oscuro características de *Listeria* fueron purificados, resembrando las colonias sospechosas en agar BHI como se muestra en la figura 22 este procedimiento se repitió hasta que las colonias se encontraron puras.



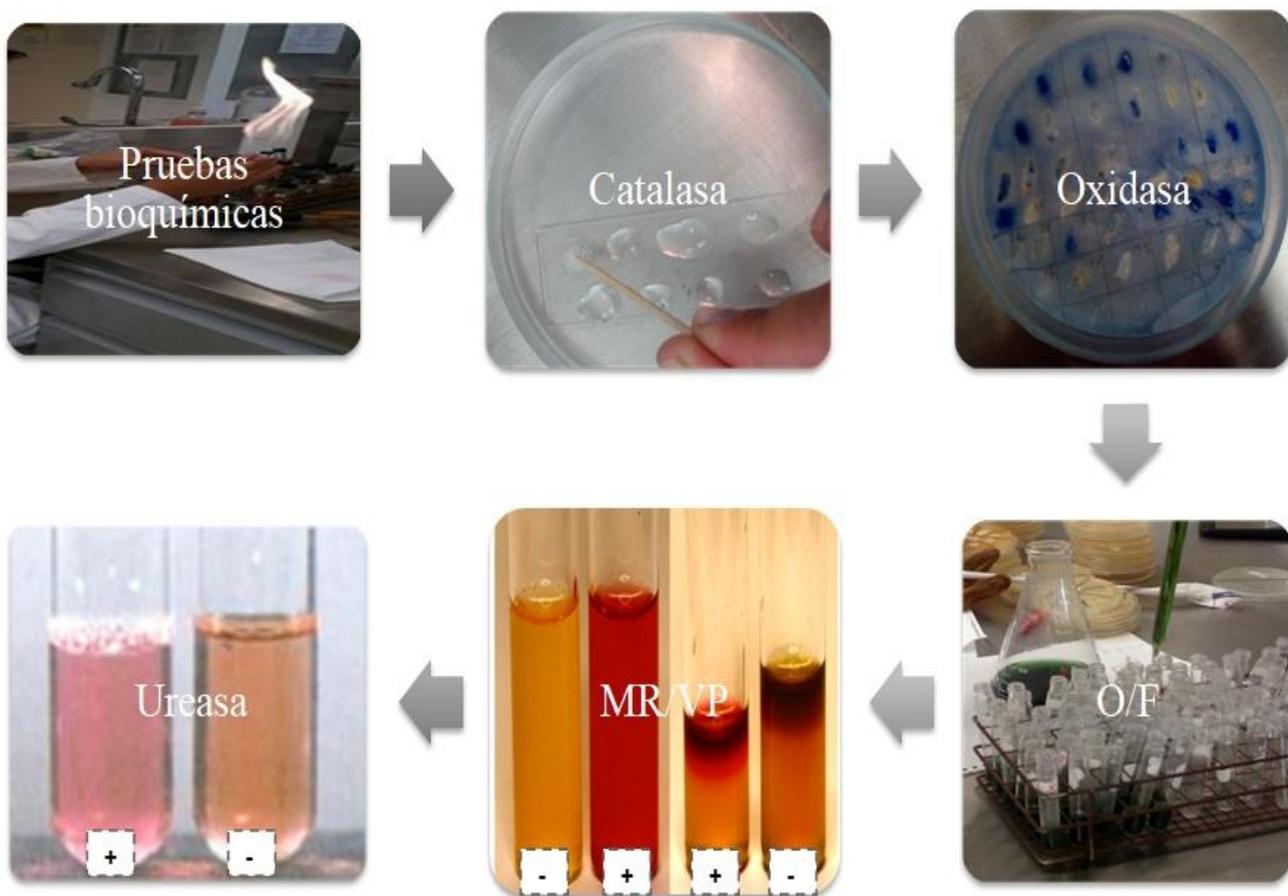
**Figura 22.** Purificación en agar BHI de las posibles *Listeria*s.

De los 60 grupos de leche de cabra, analizados se aislaron y purificaron 214 cepas sospechosas de *Listeria*, las cuales se identificaron posteriormente mediante pruebas bioquímicas.



### 3.1.2. Identificación del género *Listeria spp.* por pruebas bioquímicas tradicionales

Las muestras sospechosas de *Listeria* fueron analizadas mediante pruebas bioquímicas tradicionales tales como la Tinción de Gram, Confirmación del Gram, Catalasa, Oxidasa, Ureasa, Oxidación-Fermentación (O/F), Rojo de Metilo (MR) y Voges Proskauer (VP), en la figura 23 se muestran algunas imágenes de estas pruebas.



**Figura 23.** Pruebas bioquímicas para la identificación de cepas sospechosas de *Listeria*s.

En cuanto a los resultados obtenidos, se muestran en el anexo 2. De las 214 cepas aisladas provenientes de los 60 grupos de leche de cabra, se obtuvieron 100 cepas a partir de las pruebas de Tinción y Confirmación del Gram, Catalasa y Oxidasa, lo que representa el 47.72% de las cepas aisladas, las cuales de los 60 grupos analizados, pertenecen a 26 grupos sospechosos de *Listeria*, por lo que se realizaron las pruebas de Rojo de Metilo (MR), Voges Proskauer (VP) y Oxidación-Fermentación (O/F), de las cuales se obtuvieron 32 cepas que representan el 14.95% de las cepas analizadas, provenientes de 18 grupos. Por tal motivo se realizaron las pruebas de fermentación de hidratos de carbono como salicina, ramnosa, lactosa, manitol y xilosa para la identificación de las especies de *Listeria*, para cada una de las cepas sospechosas como se muestra en la figura 24.



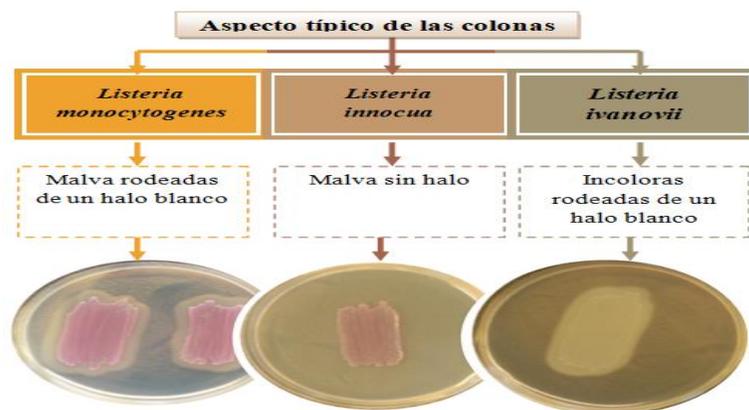


**Figura 24.** Prueba de fermentación de hidratos de carbono (salicina, ramnosa, lactosa, manitol y xilosa), tubo izquierdo sin reacción, tubo izquierdo reacción positiva.

Las pruebas convencionales para la identificación de *Listeria* son la tinción de Gram, reacción de Catalasa (+), Oxidasa (-), pruebas bioquímicas como la fermentación de hidratos de carbono, son capaces de identificar el género pero presentan dificultad para diferenciarla de *L. innocua* (Benadof, 2008). Por lo que después de comparar las reacciones se decidió sembrar una muestra de los 18 grupos sospechosos que cumplieron con las pruebas bioquímicas realizadas en este trabajo, en un medio cromogénico para la identificación de *Listeria monocytogenes*

### 3.1.3. Identificación de las especies de *Listeria* mediante un medio cromogénico.

Se realizó la identificación de *Listeria monocytogenes* para cada una de las cepas sospechosas pertenecientes a los 18 grupos analizados, mediante un medio cromogénico CHROMagar™ *Listeria*, por medio de las características únicas que permiten identificar las colonias sembradas en el medio como se muestra en la figura 25.



**Figura 25.** Aspecto típico de las colonias de *Listeria monocytogenes*, *L. innocua* y *L. ivanovii*.

Se revisaron las cajas de medio cromogénico, y se observaron las características de cada una de las colonias sembradas como se muestra en la figura 25, las cajas con el medio cromogénico fueron divididas en 18 apartados en total, en el espacio número dos se sembró un control positivo de *L. monocytogenes* 4524 dicha colonia presentó una coloración rosa



malva rodeada de un halo blanco confirmando que se trataba de la especie de *L. monocytogenes*, por el contrario, dado que las demás cepas sembradas presentaron una coloración blanca se descartaron como *L. monocytogenes*.

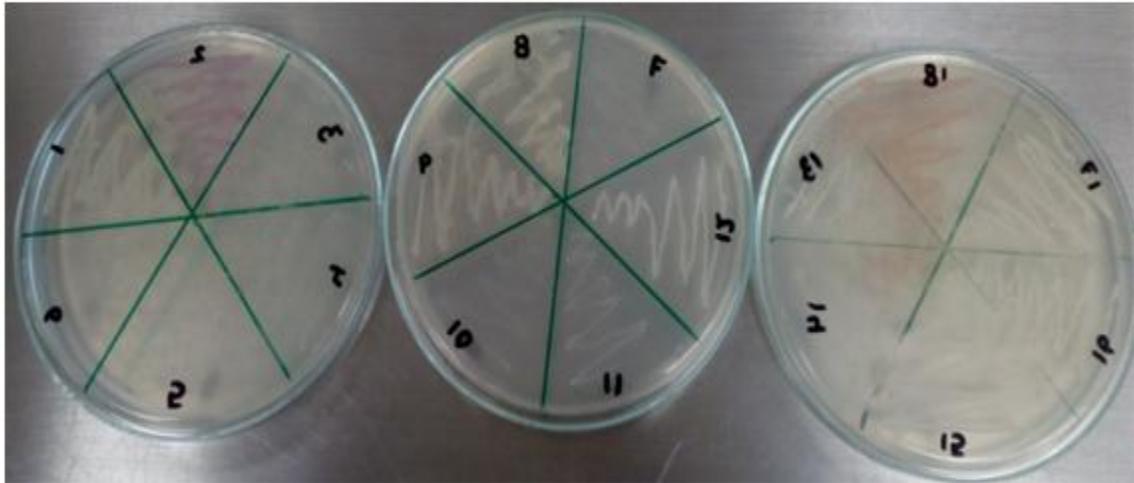
Uno de los principales objetivos de este trabajo ha sido la identificación y diferenciación de especies del género *Listeria* de otros muy parecidos como lo es el género *Corynebacterium* el cual no se descartó con las pruebas anteriores debido a la similitud que comparte con *Listeria* ya que tienen las mismas características morfológicas (Ray, 2004). Es un microorganismo Gram (+) en forma de bacilos, en la prueba de catalasa da resultado positivo y negativo en la prueba de oxidasa (Koneman & Allen, 2008) al igual que *L. monocytogenes*.

Debido a la serie de pruebas bioquímicas realizadas y la identificación mediante un medio cromogénico en los que fueron sembradas cepas sospechosas de *L. monocytogenes* y al no resultar positivas, se atribuyó a que había la posible presencia del género *Corynebacterium*, del cual algunas especies son miembros de la microflora normal de la piel y las mucosas del ser humano y, como tales, a menudo son contaminantes (Brook, *et al.*, 2002). Existe la posibilidad de que pertenezcan a diferentes especies como *C. aquiatium*, *C. matruchotii* las cuales podrían provenir de animales o el medio ambiente.

En los últimos años, se han descrito varias especies de *Corynebacterium* nuevas halladas en animales. Algunas fueron descritas por primera vez como causas de mastitis. Varias especies de *Corynebacterium* nuevas y descritas recientemente se encuentran en distintos productos alimenticios y en el medio ambiente, pero no han sido aisladas en muestras clínicas humanas. *C. flavescens* ha sido aislado en el queso y otros productos lácteos (Koneman & Allen, 2008). Al ser ubicua, puede contaminar a las cabras, lo que conlleva a graves enfermedades como la mastitis, puede propagarse entre las cabras productoras de leche y ya que muchas veces esta leche no lleva un proceso de pasteurización, los productos lácteos generados con esta leche son una fuente de riesgo para los consumidores algunas han sido descritas como agentes causantes de infecciones graves a nivel del tracto urinario, neumonía, endocarditis, septicemia, difteria, etc., afectando principalmente a pacientes inmunocomprometidos y de edad avanzada (Belmares, J., *et al.*, 2007).

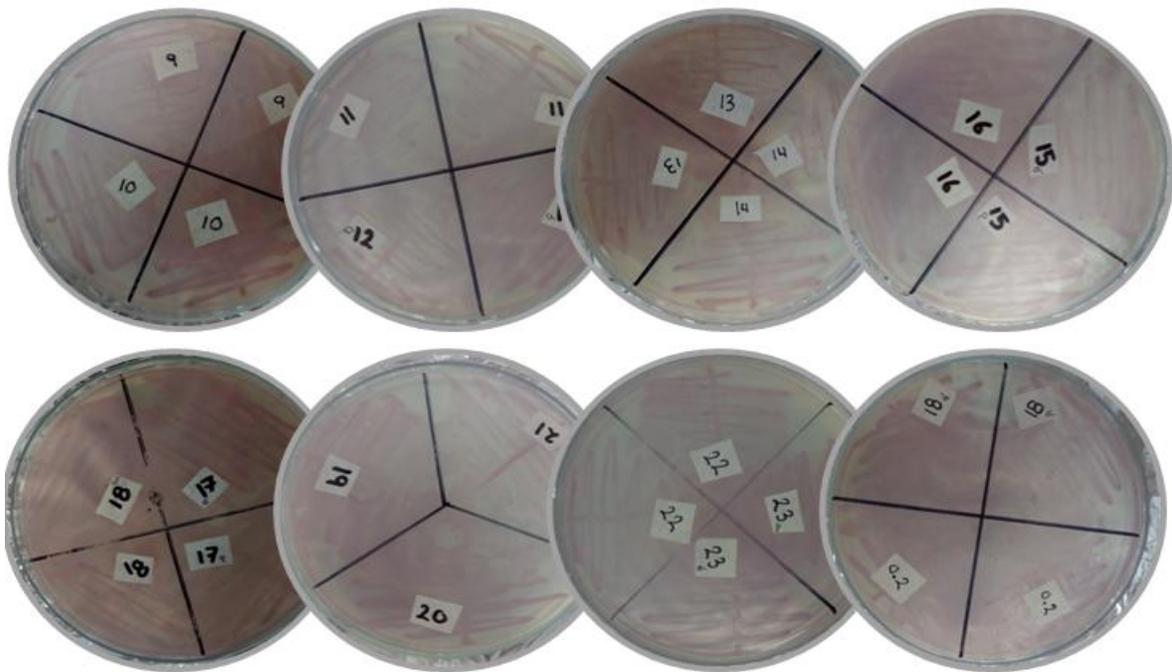
No conseguimos identificar estos aislamientos a nivel de especie porque aunque las pruebas fenotípicas aplicadas son similares a las del género *Corynebacterium*, no fueron específicas de las diferentes especies dentro del género, por tal motivo las cepas encontradas se manejaron como sospechosas. Debido a que no estaba contemplado dentro del alcance de este trabajo, se recomienda darles seguimiento en posteriores investigaciones.





**Figura 26.** Resultados en CHROMagar™ *Listeria*.

Para continuar con la investigación de *L. monocytogenes* presente en leche de cabra, el laboratorio de Bacteriología de la Unidad de Posgrado, FES-Cuautitlán, UNAM, analizó 61 muestras de leche de cabra diferentes de granjas de la misma región del estado de Chiapas de donde provenían las muestras analizadas en este trabajo, de las cuales se aislaron 15 cepas que fueron identificadas sólo por pruebas bioquímicas por lo tanto se procedió a continuar con su caracterización, por lo que se sembraron en el medio cromogénico, los resultados se muestran en la figura 27.



**Figura 27.** Identificación de *Listeria monocytogenes* en medios de CHROMagar™ *Listeria*.

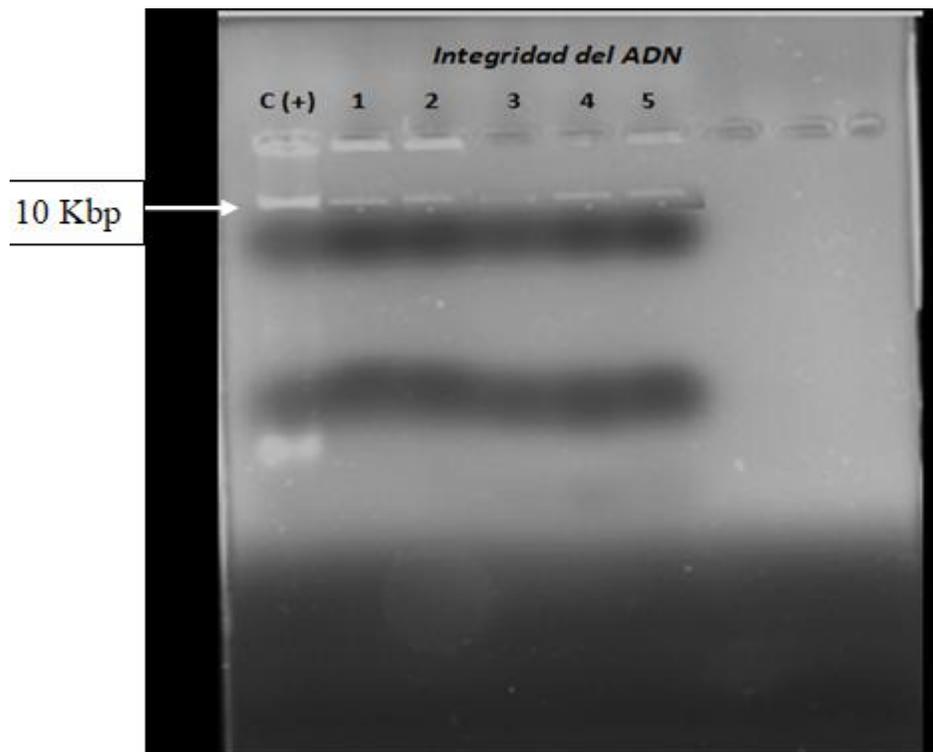


En esta prueba se observó la presencia de la especie *Listeria monocytogenes* mediante una coloración malva, y se efectuó la reacción del sustrato L- $\alpha$ -fosfatidil-inositol por el factor fosfatidilinositol fosfolipasa C (PI-PLC) y C-fosfatidilcolina fosfolipasa (PC-PLC) producido por *L. monocytogenes* dando como resultado la formación de una zona de precipitado blanco (halo) alrededor de la colonia, en combinación con el sustrato cromogénico 5-bromo-4-cloro-3-indoxi- $\beta$ -D-glucopiranosido para la detección de  $\beta$ -D-glucosidasa producida por *Listeria* (Reissbrodt, 2004).

Por lo que se identificó la especie de *L. monocytogenes* en las 15 cepas analizadas confirmadas mediante un medio cromogénico específico de la especie. La experimentación continuó con la identificación molecular de las cepas así como la detección de la virulencia potencial de estas.

### 3.2. Extracción de ADN de cepas de *L. monocytogenes*

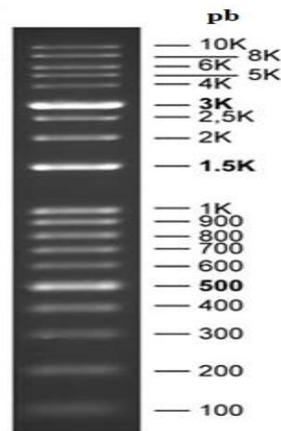
Se extrajo el ADN de las 15 cepas analizadas, se utilizó el kit de purificación Wizard® Genomic DNA. Se evaluó la integridad del ADN extraído mediante electroforesis tanto de las cepas control como el de las cepas de estudio como se muestra en la figura 28.



**Figura 28.** Electroforesis para verificar la integridad del ADN, gel de agarosa al 1%, 4 $\mu$ L BRET, 5 $\mu$ L ADN, 2 $\mu$ L colorante, control positivo (*L. monocytogenes* 4524) muestras 1-5.



Al analizar el gel de electroforesis, se comprueba la correcta extracción de ADN de las cepas analizadas, al haber utilizado el kit comercial Wizard® Genomic DNA, se observa una banda íntegra, lo que indica que el ADN no se encuentra degradado y que presenta el tamaño reportado ya que todas las bandas se encuentran por encima de 10 Kbp, según la bibliografía (Madigan *et al.*, 2004). Para realizar dicha cuantificación de ADN obtenido, se comparo la intensidad de la banda obtenida con la de los patrones de concentración conocida (Fonseca *et al.*, 2010), como se muestra en la figura 29.



**Figura 29.** Marcador de peso molecular (Promega) de 10 kbp en un gel de agarosa al 1 %.

Es importante tener una concentración adecuada para lograr la amplificación de ADN, ya que con una baja concentración de ADN es probable que no se visualice una banda clara en el gel de agarosa y por el contrario con una alta concentración de ADN la Taq polimerasa probablemente no podrá actuar sobre las cadenas desnaturalizadas de ADN.

En cuanto a la banda del carril número uno, la cual corresponde al control positivo de *L. monocytogenes* 4524, muestra una banda más fuerte, la intensidad del barrido desde la banda del ADN hacia la porción inferior del gel determinó el grado de degradación del ADN durante el aislamiento (Fonseca *et al.*, 2010), pero también puede atribuirse a que posiblemente la muestra paso por varias congelaciones y descongelaciones durante la experimentación o debido al tiempo que llevaba almacenado de 1 a 2 meses.

Los métodos que se han utilizado en la extracción de ADN de *L. monocytogenes* han sido tanto por kits comerciales como convencionales un ejemplo es la extracción de ADN mediante la técnica de Fenol-Cloroformo; los kits comerciales tienen la ventaja de ser rápidos, aunque su costo es elevado, mientras que los convencionales son de bajo costo, pero de ejecución larga, con riesgo de contaminación, lo que disminuye su utilidad en técnicas sensibles como lo es la PCR, por tal motivo en este estudio se optó por utilizar un kit de extracción de ADN.

La extracción de ADN por medio del kit de purificación Wizard® Genomic DNA de acuerdo a un estudio realizado por Queipo, M., *et al.*, (2008) en el que era comparado con otros seis kits comerciales comprobaron que el kit arroja concentraciones altas de ADN, una de las ventajas del uso de este kit reside en el mayor rendimiento obtenido que puede deberse a la digestión con proteinasa K, que aumenta la cantidad de lisis celular y



ADN disponible para la recuperación, mejorando la eficiencia si es utilizado en una técnica sensible como la PCR (Queipo *et al.*, 2008).

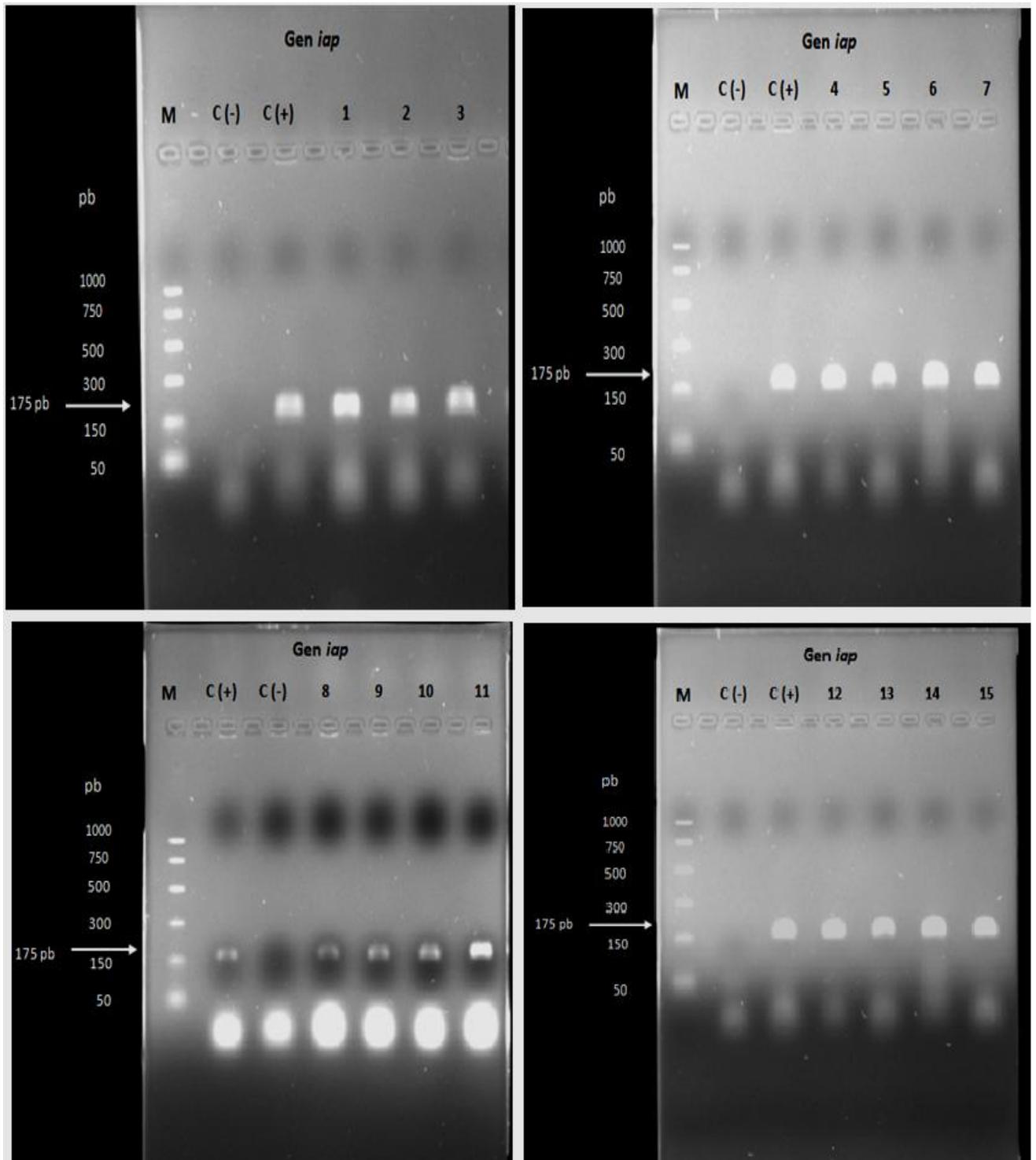
Después de verificar mediante electroforesis que se había logrado la extracción de ADN de las 15 cepas analizadas en este trabajo, fueron utilizadas para llevar a cabo la amplificación del gen *iap* y posteriormente, la amplificación de los genes *inlC* e *inlJ* mediante PCR.

### 3.3. Confirmación de *L. monocytogenes* por PCR

#### 3.3.1. Detección del gen *iap*.

- ☉ Una vez confirmada la integridad del ADN extraído, se realizó la técnica de PCR, para la detección del gen *iap* con un amplificado de 175 pb, en cada una de las 15 cepas presuntivas de *Listeria monocytogenes*.
- ☉ La proteína p60 es una proteína extracelular de 60 KDa con actividad hidrolasa de la mureína, involucrada en la formación del septum durante la división celular y responsable de la invasión listerial en fagocitos no profesionales. El gen *iap* codifica la proteína asociada a la invasión p60 que es común en todas las especies de *Listeria*. Una comparación anterior de secuencias de ADN indicó que es conservado y que ciertas porciones del gen son específicas para cada especie; por lo tanto, basándose en esto, una combinación de cebadores permite la detección específica y la diferenciación de especies de *Listeria*. Así, la técnica de PCR puede ser útil para la identificación y diferenciación de especies de *Listeria* aisladas de diferentes fuentes (Mercado *et al.*, 2014).
- ☉ Debido a que el gen *iap* está presente en cada especie de *Listeria*, aunque con secuencias de nucleótidos que son conservadas y especificadas de cada especie, fue posible identificar a la especie *L. monocytogenes* al obtener un amplificado de 175 pb mediante la técnica de PCR.
- ☉ Al finalizar la PCR se realizó la electroforesis cuyos resultados se muestran en la figura 30.





**Figura 30.** Productos de PCR empleando los cebadores LIM2 y LIMRE para la detección del gen *iap* con un amplificado de 175 pb, gel de electroforesis de agarosa al 1.5%, marcador de peso molecular de 1000 pb, control positivo de *L. monocytogenes* EDCP60, control negativo y las 15 cepas sospechosas de *L. monocytogenes*



La identificación de la de la especie de *Listeria monocytogenes* por amplificación gen *iap* nos garantizó la confiabilidad de los resultados obtenidos al no amplificar la muestra del control negativo, lo que indica que no existió contaminación, la escalera de peso molecular que se utilizó fue de 1000 pb y se desplegó correctamente, en cuanto al amplificado esperado era de 175 pb, por lo que los cebadores seleccionados para la identificación de *L. monocytogenes* fueron específicos para la especie, lo cual evidencia la presencia significativa de este patógeno en las 15 cepas analizadas procedentes de granjas productoras de leche de cabra en el estado de Chiapas, pudiendo llegar a ser un foco de contaminación para el consumidor en caso de no ser pasteurizada o de no mejorar las condiciones de producción en la granja, corriendo el riesgo de contraer Listeriosis, debido a que la leche cruda es un medio propicio para el crecimiento de microorganismos, la frecuencia de brotes asociados al consumo de leche cruda o sus derivados ha puesto de manifiesto la importancia de evaluar las condiciones de ordeño, transporte y procesamiento de la leche. También se han reportado casos de Listeriosis relacionados con el consumo de productos lácteos, entre los cuales se encuentran quesos especialmente los denominados frescos (Albarracín *et al*, 2008).

Por otra parte *L. monocytogenes* es reconocida como un microorganismo zoonótico siendo sus principales reservorios los mamíferos y rumiantes. Las cabras pueden ser portadoras asintomáticas y excretan el microorganismo durante el proceso de mastitis, por lo que el microorganismo se disemina en la leche de cabra. Existen factores predisponentes para padecer Listeriosis como son: el cambio de clima, cambio en el régimen alimenticio, el estrés, así como una pobre nutrición, en etapas avanzadas de gestación, la mala calidad del ensilado (Martínez, 2015)

Teniendo en cuenta lo anterior, hay diversos puntos que deben vigilarse para evitar la presencia de *L. monocytogenes*, causante de una enfermedad que hoy en día ocupa el segundo lugar después de la Salmonelosis, como causa más frecuente las enfermedades que son transmitidas por alimentos (Mercado *et al.*, 2014). Lo cual sugiere que en las granjas de dónde se aislaron estos cultivos no cuentan con adecuadas prácticas de limpieza y prevención en la granja para este patógeno, esto comienza desde el personal que trabaja en la granja, dentro de las recomendaciones para los productores se encuentra el uso de equipos para el ordeño, así como evitar la contaminación cruzada, es decir, evitar que el personal que se encarga del ordeño de las cabras, entre dentro del área del proceso donde ese elaboran productos como queso y demás derivados lácteos.

La alimentación de las cabras también juega un papel importante, debido a que el consumo de ensilado en mal estado, que es destinado para el consumo de las cabras puede encontrarse contaminado, y de esta manera contagiar a los animales, esto debido a que *L. monocytogenes* es un organismo transeúnte, y en el caso de las granjas lo podemos encontrar en las heces, agua y ensilados de los animales.

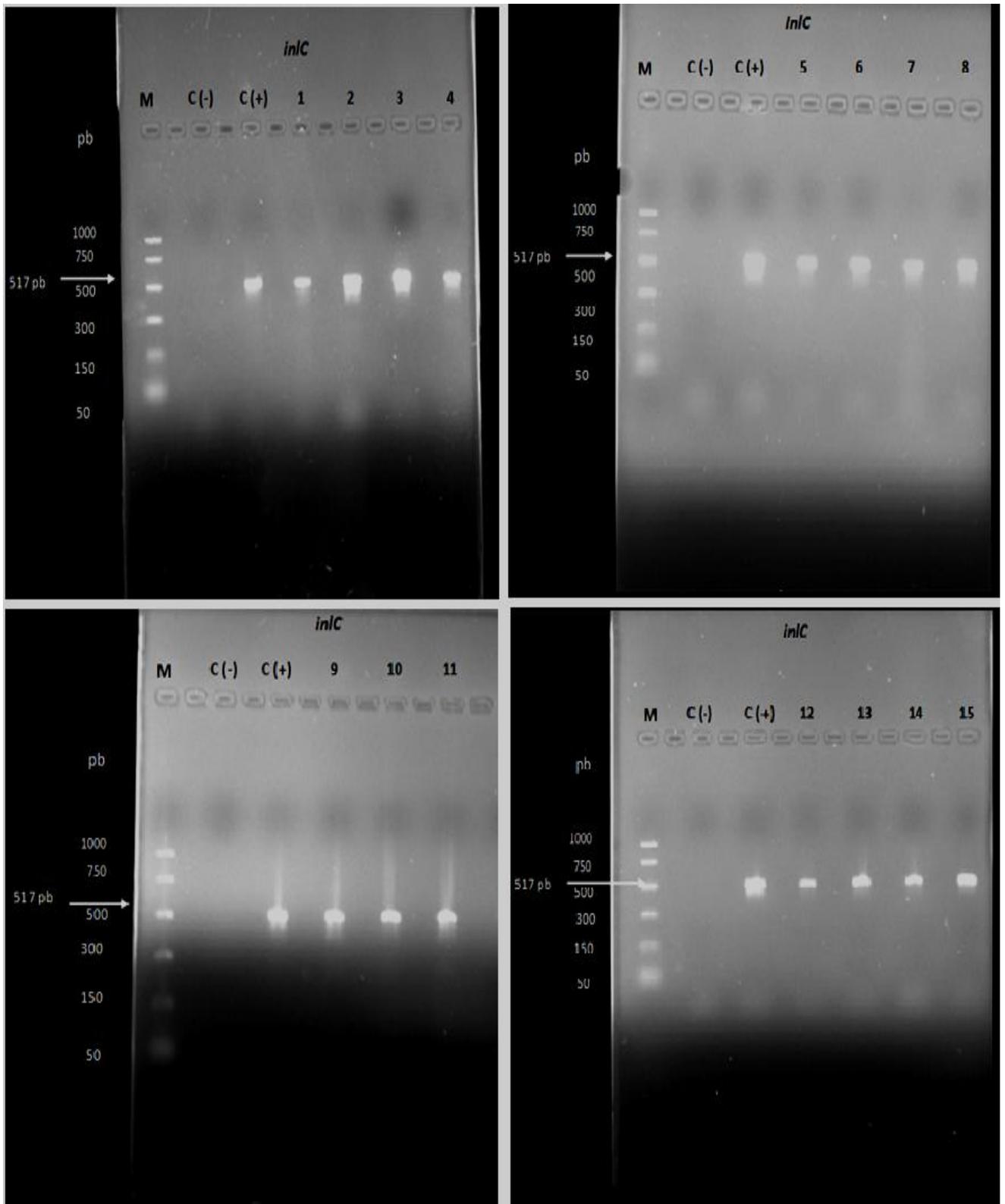


### 3.4. Virulencia potencial de *L. monocytogenes*

#### 3.4.1. Detección de los genes *inlC* e *inlJ* por PCR

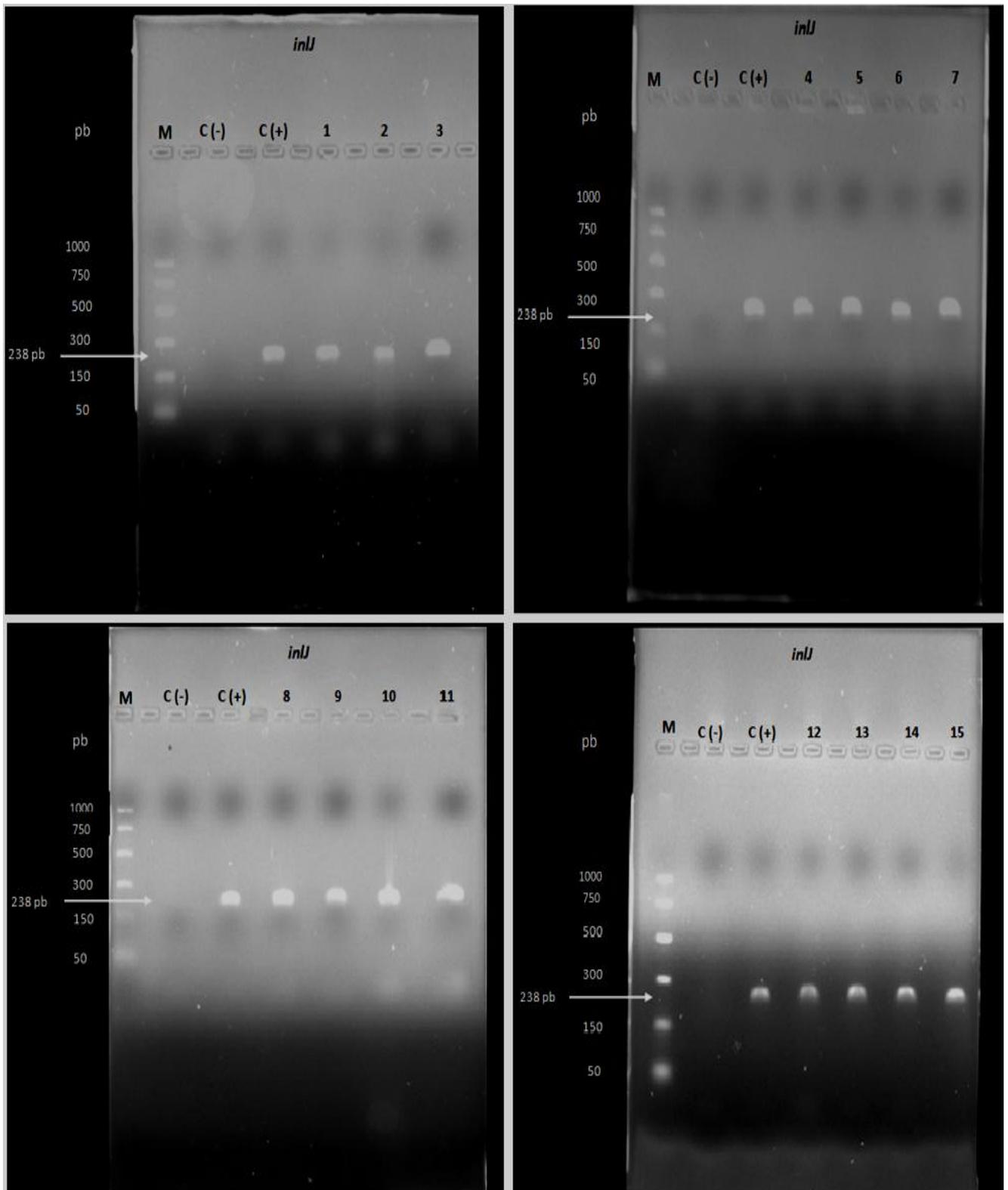
- ☉ En múltiples estudios se han identificado diferentes genes que son específicos de *L. monocytogenes* como *hly*, *actA*, *inlA*, *inlB*, etc., y algunos otros que son utilizados para identificar a los serotipos que se han detectado como patógenos entre ellos *inlJ*, *inlC*, *flaA*, etc., una investigación realizada en 2007 por Liu *et al.*, en donde lograron la identificación de *L. monocytogenes* en diferentes muestras tanto ambientales, como en sangre y alimentos mediante la técnica de PCR Múltiple amplificando los genes *inlA*, *inlB*, para la identificación del género y especie y los genes *inlC* e *inlJ* para la determinación de la virulencia de las cepas de *L.monocytogenes* halladas.
- ☉ Es sabido que entre el grupo de genes específicos de virulencia se ha identificado al gen interno *inlJ* implicado directamente en el paso de *L. monocytogenes* a través de la barrera intestinal, así como su aparición en las etapas subsiguientes de infección y virulencia saber esto, dio mayor validez del uso de este gen para la detección de la virulencia, sin embargo se sabe que su presencia o ausencia proporciona un indicador valiosos para la virulencia potencial o avirulencia de cepas de *L. monocytogenes* algunos estudios indican que existen algunas cepas que no contienen el gen *inlJ* y sin embargo tienen la capacidad de causar mortalidad. Por lo que se decidió evaluar un gen adicional a la virulencia como el gen *inlC* que es un marcador de virulencia al contribuir a los estados post-intestinales de la infección por *L. monocytogenes*, por lo que en base a esto, en este trabajo se decidió analizar los genes *inlC* e *inlJ* a partir de las colonias aisladas de leche de cabra mediante métodos tradicionales se realizó la identificación de los genes anteriores, teniendo como principal propósito detectar su presencia mediante la técnica de PCR punto final y así evidenciar la virulencia potencial de las muestras provenientes de granjas productoras del Estado de Chiapas.
- ☉ Se detectaron mediante la técnica de PCR los genes *inlC* e *inlJ*, con fragmentos de 517 pb y 238 pb respectivamente, los cuales han sido empleados previamente para la diferenciación de cepas virulentas de cepas avirulentas (Liu *et al.*, 2007).
- ☉ Los fragmentos de ADN se visualizaron mediante la técnica de electroforesis en gel de agarosa al 1.5% como se muestra en las figuras 31 y 32 respectivamente.





**Figura 31.** Productos de PCR para la detección del gen *inlC* con un amplificado de 517 pb, gel de electroforesis de agarosa al 1.5% marcador de peso molecular de 1000 pb, control negativo y positivo de *L. monocytogenes* ATCC 43249, y 15 cepas sospechosas de *L. monocytogenes*.





**Figura 32.** Productos de PCR para la detección del gen *inlJ* con un amplificado de 238 pb, gel de electroforesis de agarosa al 1.5% marcador de peso molecular de 1000 pb, control negativo y positivo de *L. monocytogenes* ATCC 43249, y 15 cepas sospechosas de *L. monocytogenes*.



De acuerdo con los resultados obtenidos se encontró que las 15 cepas estudiadas fueron potencialmente virulentas al ser encontrados fragmentos de 517 pb y 238 pb como se muestra en las figuras 31 y 32, correspondientes a los genes *inlC* (proteína secretada relacionada con la diseminación celular en el hígado) e *inlJ* (involucrada en la adhesión celular) (Vera *et al.*, 2013), comprobando que los resultados son confiables al no amplificar la muestra empleada como control negativo, y contrastando las muestras, con un control positivo correspondiente a *L. monocytogenes* ATCC 43249.

Se demostró la presencia de *L. monocytogenes* en leches crudas de cabra, que no son sometidas a procesos de pasteurización y donde un porcentaje de la leche es consumida de manera directa. Teniendo en cuenta que el consumo de leche de cabra se ha incrementado en los últimos años debido a sus propiedades nutricionales, siendo los infantes y las personas mayores quienes más consumen estas leches (Albarracín, *et al.*, 2008), se genera un riesgo importante para los consumidores debido a que los síntomas de Listeriosis no son específicos y pueden confundirse con otras enfermedades infecciosas, por lo que se requiere optimizar los métodos de identificación de *Listeria*, buscando que estos sean más rápidos y específicos para así poder asegurar la inocuidad de los alimentos.

Con respecto a este creciente interés se ha implementado la técnica de PCR la cual es ampliamente utilizada debido a su protocolo rápido y de fácil adaptación. Por lo general de 2 a 3 h son necesarias para completar una PCR punto final aunque existen algunas limitaciones, muchas de ellas visualizadas durante el periodo de experimentación de este trabajo, es sabido que preexiste una dificultad para distinguir entre células vivas y muertas por lo que se pueden generar falsos positivos y este hecho puede dar lugar a la obtención de resultados erróneos debido a que se identifica su presencia pero no si aun esta activa (Gilbello *et al.*, 2001).

Hoy en día se están desarrollando sistemas de PCR más avanzados para obtener un resultado en cuestión de minutos, variaciones como la PCR en tiempo real, han sumado ventajas adicionales a esta técnica, entre las que se destaca una mayor velocidad en la obtención de resultados, por otra parte otra variación que también podría ser implementada es la PCR Múltiple que sirve para la identificación de varios patógenos en una misma reacción o para la identificación de especies y serotipos patógenos de *Listeria*. Sin embargo, los equipos y reactivos resultan ser más costosos que aquellos empleados en los métodos tradicionales de cultivo, esta desventaja es característica en la mayoría de las técnicas moleculares descritas (Palomino & González, 2014).

Debe observarse que aunque la presencia de los genes *inlC* e *inlJ* en una cepa de *L. monocytogenes* implica su virulencia potencial, no indica con certeza que las cepas que albergan estos genes puedan producir una enfermedad en los seres humanos a través de la ingestión oral convencional, ya que se han encontrado serotipos que son potencialmente



virulentos para el humano pero que pueden encontrar dificultad para atravesar la barrera intestinal durante la infección (Liu *et al.*, 2007).

Cabe mencionar que diversos reportes han descrito cepas de *L. monocytogenes* con patogenicidad baja o nula, pero poco es conocido acerca de que determina esta condición en la virulencia. Por lo que ya que no solo es suficiente identificar las cepas como *L. monocytogenes* debido a que no todas son patógenas algunos estudios sugieren que la virulencia varía de una cepa a otra, lo cual probablemente es causado por mutaciones puntuales atenuantes en uno o más genes importantes en la virulencia del patógeno.

Por otra parte, con base en los resultados obtenidos en este estudio indicaron que la aplicación de la PCR punto final para la identificación de los genes *iap*, *inlC* e *inlJ*, permitió la confirmación simultánea de la identidad y la virulencia de *L. monocytogenes* se recomienda detección de estos genes en futuras investigaciones debido a que son una herramienta útil y son específicos de la especie.

El porcentaje hallado de este microorganismo en leche de cabra proveniente de granjas no deja de ser un riesgo para la salud, de la misma manera que en el mercado del sector de alimentos en donde existe un riesgo potencial para la salud de la población consumidora (Espinoza *et al.*, 2004), debido a que la existencia de una sola bacteria en condiciones favorables por su naturaleza ubicua, su resistencia y su capacidad de crecer a temperaturas de refrigeración así como en condiciones de anaerobiosis la hacen de difícil control (Touré *et al.*, 2003).

La leche y los productos lácteos han sido relacionados con diversos brotes de listeriosis, en México, la información sobre la listeriosis es escasa y los pocos estudios realizados sugieren que representa un riesgo potencial para la ocurrencia de brotes. Ante estos hechos, es necesario implementar programas preventivos, que permitan garantizar la inocuidad alimentaria y hacer obligatorio el reporte de brotes o casos de listeriosis (Castañeda *et al.*, 2014). Representa un problema de interés público, por lo que existe la necesidad de concientizar tanto a las instancias correspondientes, a la industria alimentaria así como a los pequeños productores.



## CONCLUSIONES

- ☉ En este estudio se comprobó la presencia de *Listeria monocytogenes* en muestras de leche de cabra provenientes de granjas localizadas en el Estado de Chiapas.
- ☉ El medio cromogénico CHROMagar<sup>TM</sup> *Listeria* empleado para la identificación de *L. monocytogenes* presentó alta sensibilidad y especificidad en la identificación de este microorganismo, siendo una alternativa para su diagnóstico en forma rápida en el caso de no contar con la técnica de PCR, sin embargo en este trabajo la técnica de PCR fue de gran utilidad para determinar la virulencia potencial lo cual no se habría logrado utilizando solo el medio cromogénico.
- ☉ Las 15 cepas aisladas a partir de leche de cabra fueron confirmadas para *L. monocytogenes* mediante pruebas moleculares al lograr la amplificación del gen *iap* mediante la técnica de PCR punto final, el cual fue eficiente para la confirmación del género y especie de éste microorganismo.
- ☉ La detección de la virulencia potencial de las cepas analizadas, representa un riesgo para el personal susceptible en las granjas, así como para sus animales, por lo tanto también para los consumidores de sus productos ya sean lácteos o cárnicos.
- ☉ Los cebadores que se emplearon para el desarrollo de este proyecto permitieron la identificación del microorganismo y su virulencia potencial de forma clara, nítida y específica.
- ☉ Finalmente durante este estudio se encontró alta correlación entre el método de aislamiento e identificación por métodos convencionales y el molecular.



## RECOMENDACIONES

- ☉ Es importante indicar que se conocen más de 17 serotipos de *L. monocytogenes*, y que más del 95% de las infecciones en humanos y animales se producen por los serotipos 1/2<sup>a</sup>, 1/2 b y 4b, se ha reportado que este último causa la mayoría de los brotes atribuibles a alimentos contaminados, y es el de mayor mortalidad. En nuestro estudio no estaba contemplada la identificación de serotipos de este patógeno sin embargo para futuras investigaciones se recomienda determinar si las cepas analizadas pertenecen a los serotipos comunes causantes de Listeriosis en el hombre y en los animales, para fines epidemiológicos de la enfermedad.
- ☉ Conociendo la variación en la virulencia entre cepas de este patógeno aisladas de rumiantes y sus subproductos, es necesario combinar los métodos convencionales con pruebas moleculares para corroborar el potencial patogénico de los aislamientos de esta bacteria. Por esta razón en este trabajo se desarrolló una metodología en la cual se aplicó la técnica de PCR punto final, que es un método sensible, confiable y eficaz, sin embargo han surgido numerosas modificaciones derivadas del método básico inicial, con el propósito de mejorar el rendimiento, la especificidad o adaptarse a diferentes tipos de muestras, lo que se ve reflejado como una oportunidad de mejora al emplear técnicas como la PCR múltiple o la PCR en tiempo real disminuyendo el tiempo de detección lo cual en la industria de alimentos así como en las granjas productoras tanto en el Estado de Chiapas como en cualquier otro Estado, es de suma importancia ya que al disminuir el tiempo de detección de este patógeno, permite la toma de decisiones y con esto evitar pérdidas económicas que se ven reflejadas en la disminución de producción de leche, así como el problema de salud que puede generar si es empleada como materia prima.
- ☉ Debido a que los rumiantes de granja y la leche han sido frecuentemente implicados en casos de Listeriosis y la importancia de las cabras como fuente de alimento, es necesario incrementar la investigación en esta especie animal, por lo que se recomienda llevar a cabo esta metodología ya que la técnica de PCR en cualquiera de sus variantes puede ser útil para la identificación y diferenciación entre especies del género *Listeria* aisladas de diferentes fuentes, si el objetivo es identificar que especie es la causante de la enfermedad o donde es la fuente de contaminación (agua, ensilados, trabajadores, etc. ) es completamente viable ya que identificando la causa se pueden emplear los planes de acción que se tomaran con respecto a mitigar o evitar reincidir en la presencia de *L. monocytogenes* en las granjas.



- ☉ Se recomienda la detección de los genes empleados en este trabajo para futuras investigaciones en cuanto a la identificación del microorganismo y de su virulencia potencial mediante la PCR.
  
- ☉ Es una realidad que en México la información sobre *L. monocytogenes* y la Listeriosis es escasa y no existe un registro o un adecuado diagnóstico acerca de su incidencia debido a que puede confundirse con otras enfermedades infecciosas, los pocos estudios realizados sugieren que representa un riesgo potencial para la ocurrencia de brotes, se recomienda hacer estudios con muestreos periódicos, implementar sistemas de calidad e inocuidad enfocados a la prevención de este patógeno en las granjas localizadas no solo en el Estado de Chiapas sino en donde sea necesario, es posible que la investigación y la evolución en este campo crezcan y conduzcan a ensayos de detección; rápidos, específicos y sensibles, que se puedan realizar directamente en muestras de alimentos en un futuro próximo, así mismo algunos de los actuales métodos de detección molecular pueden ser empleados, en laboratorios o establecimientos clínicos, en sitios de observación, tales como la granja o el campo, en forma de kit todo en uno, representando una gran ventaja para los pequeños y grandes productores de cualquier alimento.
  
- ☉ Para prevenir la aparición de *Listeria monocytogenes* a nivel granja se recomienda implementar un programa de buenas prácticas, para garantizar la inocuidad de la leche que posteriormente se utilice en la producción de quesos frescos de buena calidad.



## REFERENCIAS

AFNOR, CHROMagar™ *Listeria* (2009). Certificado de validación como método alternativo de acuerdo al Standard en ISO 11290-1A1-2004. Estudio colaborativo inter laboratorios, Provincia de Tandil, Argentina.

Allaert, C. & Escolá, M. (2002). Métodos de Análisis Microbiológicos de Alimentos, Díaz de Santos S.A. España

Albarracín, C. Y., Poutou, P. R. & Carrascal, C. A. (2008). *Listeria spp.*, y *L. monocytogenes* en leche cruda de cabra. Revista MVZ Córdoba, 13 (2), 1326-1332.

Álvarez, C. & Mendoza, S. (2005). “Manual básico de bacteriología”. Universidad Nacional Autónoma de México, Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán. 2ª Edición. México, 128-131.

Arbiza, S. I. (1987). Producción de caprinos. México: A.G.T.

Balbás, P. (2002). De la Biología Molecular a la Biotecnología. Editorial Trillas, México, 195.

Barrow, G. I., & Feltham, K.A. (2003). Cowan and Steel’s Manual for the Identification of Medical Bacteria, 3ra Edición, Cambridge University Press, U.K.

Belmares, J., Detterline, S., Pak, J. B. & Parada, J. P. (2007). *Corynebacterium endocarditis* species-specific risk factors and outcomes. BMC Infectious Diseases 7, 1-8.

Benadof, D. (2008). “*Listeria monocytogenes*”. Revista chilena de infectología, 25(5), 350.

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

Bidof, F. A. (2017). Composición, cualidades y beneficios de la leche de cabra: revisión bibliográfica. México. Rev. Prod. Anim. 29(2), 32-41.

Borras, A. (1968). Cómo comer y beber leche. La Habana, Cuba: Comité Nacional Lechero.

Brook, G. F., Bute, J. S., & Ornston, N. L. (2002). Microbiología médica de Jawetz Melnick y Adelberg, Manual Moderno, 17ª edición, México.



Bubert A., Sokolovic, Z., Chun, S. K., Papatheodorou, L., Simm, A. & Goebel, W. (1999). Differential Expression of *Listeria monocytogenes* Virulence Genes in Mammalian Host Cells. *Mol Gen Genet*; 261: 323-336.

Buchrieser C. (2007). Biodiversity of the species *Listeria monocytogenes* and the genus *Listeria*. *Microbes Infect*; 9: 1147-55.

Cabanes, D., Dehoux, P., Dussurget, O., Frangeul, L. & Cossart, P. (2002). Surface proteins and the pathogenic potential of *Listeria monocytogenes*. *Trends Microbiol*. 10:238-245.

Camilli, A., Goldfine, H. & Portnoy, D.A. (1991). *Listeria monocytogenes* mutants lacking phosphatidylinositol-specific phospholipase C are avirulent. *J Exp Med* 173:751-754.

Castañeda, R. G., Eslava, C. C., Castro, C. N., León, F. J. & Chaidez, Q. C. (2014). Listeriosis en México: importancia clínica y microbiológica. *Salud Pública. México*. 4;56:654-659.

CDC. (2012). Foodborne Diseases Active Surveillance Network (FoodNet): FoodNet Surveillance Report for 2011 (Final Report). Atlanta, Georgia: U.S. Department of Health and Human Services, CDC.

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

Cohen, D., Malave, D., Guidoni, J., Lakovidis, P., Everett, M., & Boyan B. (2004). Role of oral bacterial flora in calcific aortic stenosis an animal model. *Ann Thorac Surg; Rev*. 77: 537-43.

Cortázar, A. & Silva, E.P. (2004). Métodos Físico-Químicos en Biotecnología. México. Instituto de Biotecnología. Universidad Nacional Autónoma de México; pp. 140.

Cratwright, E. J., Jackson, K. A., Johnson, S. D., Graves, L. M., Silk, B. J. & Mahon, B. E. (2013). Listeriosis outbreaks and associated food vehicles, United States, 1998-2008. *Emerg Infect Dis*;19:1-9.

CHROMagar™, (2017). “Manual identificación *Listeria*” Recuperado de: [www.CHROMagar.com](http://www.CHROMagar.com) , Consultado el 03 de febrero de 2017.

CHROMagar™, (2017). “Tecnología cromogénica” Recuperado de [www.chromagar.com/p-Chromogenic\\_agar\\_Technology.html#.WkQ0zWjibIU](http://www.chromagar.com/p-Chromogenic_agar_Technology.html#.WkQ0zWjibIU), consultado el 07 de febrero de 2017.



Dabiri, G.A., Sanger, J.M., Portnoy, D.A. & Southwick, F.S. (1990). *Listeria monocytogenes* moves rapidly through the host-cell cytoplasm by inducing directional actin assembly. *Proc Natl Acad Sci USA* 87:6068—6072.

De Dios, T., Ibarra, C., & Velasquillo, C. (2013). Fundamentos de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) y de la PCR en tiempo real. *Investigación en discapacidad*. 2:2: 70-78.

Dick, N., Mcnamara, A., Kircher, S., Ritter V., Schultz, A., S., Sturm, K., & Warns, P., (2005). “*Evaluation of BBL™ CHROMagar™ Listeria: AOAC Performance Tested Method SM BD Diagnostics*”, 7 Loveton Circle, Sparks, MD 21152, USA AOAC Meeting.

Donaldson, J. R., Nanduri, B., Pittman, J. R., Givaruangswat, S., Burgess, S.C. & Lawrence, M.L. (2011). Proteomic expression profiles of virulent and avirulent strains of *Listeria monocytogenes* isolated from macrophages. *J. Proteomics*. 74:1906-1917.

Downes, F. & Ito, K. (2001). *Compendium of methods for the microbiological examination of foods*. 4<sup>a</sup> ed. Washington: APHA.

Drouin, R., Dridi, W. & Samassekou, O. (2007). DNA polymerases for PCR applications. En J. Polaina y A. P. MacCabe (eds.), *Industrial Enzymes*. Canada: Springer. pp. 379-401.

Ducoing, W. A. (2015). *Introducción a la caprinocultura*. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Universidad Nacional Autónoma de México. México. Recuperado el día 1 de Enero de 2018, desde: [http://amaltea.fmvz.unam.mx/textos/Introduccion%20a%20la%20caprinocultura%20PAPI ME.pdf](http://amaltea.fmvz.unam.mx/textos/Introduccion%20a%20la%20caprinocultura%20PAPI%20ME.pdf)

Dumont, J., & L. Cotoni. (1921). Bacille semblable a` celui du rouget du porc rencontré dans le L.C.R. d'un méningitique. *Ann. Inst. Pasteur* 35:625–633.

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

Eilertz, I., Danielsson-Tham, M. L., Hammarberg, K. E., Reeves, M. W., Rocourt, J., & Seeliger, H. P. R. (1993). Isolation of *Listeria monocytogenes* from goat cheese associated with a case of listeriosis in goat. *Acta Vet. Scand.* 34:145-149.

Engelbrecht, F., Chun, S. K., Ochs, C., Hess, J., Lottspeich, F., Goebel, W. & Sokolovic, Z., (1996). A new PrfA-regulated gene of *Listeria monocytogenes* encoding a small, secreted protein which belongs to the family of internalins. *Mol. Microbiol.* 21, 823–837.



Escobedo, P. D. (2014). Aislamiento e identificación de *Listeria monocytogenes* en frutas y hortalizas minimamente procesadas. Tesis para obtener el título de Ingeniera en Alimentos. Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán. Universidad Nacional Autónoma de México.

Espinoza, A., De la Torre, M., & Salinas, M., (2004). “Determinación de *Listeria monocytogenes* en quesos frescos de producción artesanal que se expenden en los mercados del distrito de Ica, Enero-Marzo 2003” Rev. Peru: 21(2):71-75.

FAO/OMS. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación. Organización Mundial de la Salud. (2004). Evaluación de riesgos de *Listeria monocytogenes* en alimentos listos para el consumo: resumen interpretativo. Capítulo 4. Serie de evaluación de riesgos microbiológicos No. 4.

FAO Official statistics (FAOSTAT). (2007). The Statistics Division, Economic and Social Department. GLIPHA Global Livestock Production and Health Atlas, Animal Production and Health Division. Recuperado el día 3 de Diciembre del 2017, desde: <http://kids.fao.org/glipha/>.

Farber, J. M., & Peterkin, P. I. (1991). *Listeria monocytogenes*, a food-borne pathogen. Microbiol. Rev.

Fenlon, D.R. (1999). *Listeria monocytogenes* in the natural environment, p. 21-37. In E. T. Ryser and E. H. Marth (ed.), *Listeria*, listeriosis, and food safety, 2<sup>nd</sup> ed. Marcel Dekker Inc, New York, NY.

Flores-Córdova, M. A.; Pérez-Leal, R., Basurto -Sotelo, M. y Jurado-Guerra, M. R. (2009). La leche de cabra y su importancia en la nutrición. TECNOCIENCIA Chihuahua, 3 (2), 107-113.

Fonseca, D., Mateus, H., & Contreras, N. (2010). Prácticas de Laboratorio de Biología Molecular: su aplicación en genética básica. Bogotá, Editorial Universidad del Rosario.

Forbes, B., Sahm, D., & Weissfeld, A. (2004). Diagnóstico microbiológico. 12<sup>a</sup> ed., Médica Panamericana, 1134 páginas.

Freitag, N. E., Port, G. C. & Miner, M.D. (2009). *Listeria monocytogenes* – from saprophyte to intracellular pathogen. Nat Rev Microbiol.7:623-8.

Gahan, C. G. & Hill, C. (2005). Gastrointestinal phase of *Listeria monocytogenes* infection. Journal of Applied Microbiology, 98, 1345-1353.



Garza-Velasco. R., Silva, M. T., & Hernández, G. L. (2010). La listeriosis humana y el ciclo infeccioso asociado a su agente etiológico. Departamento de Biología. Facultad de Química. Universidad Nacional Autónoma de México.

Gaillard, J. L., Berche, P., Mounier, J., Richard, S. & Sansonetti, P. (1987). In vitro model of penetration and intracellular growth of *Listeria monocytogenes* in the human enterocyte-like cell line Caco-2. *Infect. Immun.* 55:2822-2829.

Gaillard, J. L., Berche, P., Frehel, C., Gouin, E. & Cossart, P. (1991). Entry of *Listeria monocytogenes* into cells is mediated by internalin, a repeat protein reminiscent of surface antigens from gram-positive cocci. *Cell* 65:1127–1141.

Geoffroy C., Gaillard J. L., Alouf, J.E. & Berche P. (1987). Purification, characterization, and toxicity of the sulfhydryl-activated hemolysin listeriolysin O from *Listeria monocytogenes*. *Infect Immun* 55: 1641—1646.

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

Gilbello, A., Blanco, M., Dominguez, L & Fernández, J. (2001). Utilización de la PCR para el diagnóstico en ictiopatología. España. *Rev. AquaTIC* 15: 130-143.

González, Z. B. & Suárez, R. M. (2001). *Listeria* y listeriosis. Departamento de Sanidad Animal. Facultad de Veterinaria. Universidad Complutense de Madrid. Centro de Vigilancia Sanitaria Veterinaria.

Graves, L. M., Hesel, L. O., Steigerwalt, A. G., Morey, R. E., Daneshvar, M. I. & Roof, S. E. (2010). *Listeria marthii* sp. nov., isolated from the natural environment. Finger Lakes National Forest. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 60: 1280-8.

Gregory, S. H., Sagnimeni, A. J. & Wing, E. J. (1996). Expression of the *inlAB* operon by *Listeria monocytogenes* is not required for entry into hepatic cells *in vivo*. *Infect. Immun.* 64: 3983-3986.

Guenther, S., Huwyler, D., Richard, S. & Loessner, M. J. (2009). Virulent bacteriophage for efficient biocontrol of *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat foods, *Appl. Environ. Microbiol.* 75(1)93-100.

Hacker, J. & Kaper, J. (2000). The Concept of Pathogenicity Islands. Pathogenicity Islands of Virulent Bacteria: Structure, Function, and Impact on Microbial Evolution. Kaper J, Hacker, J. Washington, American Society for Microbiology: 1-12.



Haenlein, W. (2004). Goat Milk in Human Nutrition. *Small Ruminant Research*, 51, 155-163.

Heffron, S., Moe, G. R., Sieber, V., Mengaud, J., Cossart, P., Vitali, J. & Jurnak, F. (1998). Sequence profile of the parallel beta helix in the pectate lyasesuperfamily. *J. Struct. Biol.* 122:223–235.

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

Hernández, U. M. (2016). *Microbiología de los alimentos: fundamentos y aplicaciones en Ciencias de la Salud*. México. Editorial Panamericana.

Herráez, A. (2012). *Biología Molecular e Ingeniería Genética: Conceptos, Técnicas y Aplicaciones en Ciencias de la Salud*. 2ª ed. España: Elsevier.

Hof, H. (2003). History and epidemiology of listeriosis. *FEMS. Immunology and Medical Microbiological* 35:199-202.

ICMSF. International Commission on Microbiological Specifications for Foods. (1980). *Microorganismos en los alimentos*. Zaragoza: Editorial Acribia.

ICMSF. International Commission on Microbiological Specifications for Foods (1996). *Microorganismos in Food 5. Microbiological Specifications of Food Pathogens*. Blackie Academic & Professional.

Jacquet, C., Gouin, E., Jeannel, D., Cossart, P. & Rocourt, J. (1995). Expression of ActA, Ami, InlB, and listeriolysin O in *Listeria monocytogenes* of human and food origin. *Appl. Environ. Microbiol.* 68(2):616-22.

Jandal, J. M. (1996). Comparative Aspects of Goat and Sheep Milk. *Small Rumin Res.*, 22, 177-185.

Kajava, A. V. (1998). Structural diversity of leucine-rich repeat proteins. *J. Mol. Biol.* 277:519–527.

Khanacademic. (2017). Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR). [En línea]. Consultado el día 22 de Noviembre de 2017, desde: <https://es.khanacademy.org/science/biology/biotech-dna-technology/dna-sequencing-pcr-electrophoresis/a/polymerase-chain-reaction-pcr>



Khelef, N., Lecuit, M., Buchrieser, C., Cabanes, D., Dussurget, O. & Cossart, P. (2005). *Listeria monocytogenes* and the genus *Listeria*, 3rd ed. Springer, New York, N.Y.

Koneman, E. & Allen, S. (2008). Diagnóstico microbiológico: Texto y Atlas en color, 6<sup>a</sup> ed. Washington: Panamericana.

Kuhn, M., Scortti, M. & Vázquez-Boland, J. A. (2008). Pathogenesis. In Liu D (ed.) Handbook of *Listeria monocytogenes*, CRC Press, New York. pp. 99-102

Kussel-Andermann P. (2000). Vezatin, a Novel Transmembrane Protein, Bridges Myosin VIIA to the Cadherin-catenins Complex. *Eur Mol Biol Org J*; 19: 6020-6029.

Leclercq, A., Clermont, D., Bizet, C., Grimont, P. A., Le Fleche-Mateos, A., & Roche, S. M. (2010). *Listeria rocourtiae* sp. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol*; 60: 2010-14.

Lecuit, M., Vandormael-Pournin, S., Lefort, J., Huerre, M., Gounon, P., Dupuy, C., Babinet, C. & Cossart, P. (2001). A transgenic model for listeriosis: Role of internalin in crossing the intestinal barrier. *Science* 292:1722–1725

Lecuit, M., Nelson, D. M., Smith, S. D., Khun, H., Huerre, M., Vacher-Lavenu, M. C., Gordon, J. I. & Cossart P. (2004). Targeting and crossing of the human maternofetal barrier by *Listeria monocytogenes*: role of internalin interaction with trophoblast E-cadherin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*101:6152-6157.

Lianou, A. & Sofos, J. N. (2007). A review of the incidence and transmission of *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat products in retail and food service environments. *J. Food Prot*;70(9):2172-2198.

Liu, D., Ainsworth, A. J., Austin, F.W. & Lawrence, M. L. (2003). Characterization of virulent and avirulent *Listeria monocytogenes* strains by PCR amplification of putative transcriptional regulator and internalin genes. *J. Med. Microbiol.* 52, 1066–1070.

Liu, D., Lawrence, M. L., Ainsworth, A. J., & Austin, F. W. (2005). Comparative assessment of acid, alkali and salt tolerance in *Listeria monocytogenes* virulent and avirulent strains. *FEMS Microbiology Letters*, 243, 373-378.

Liu, D., Mark, L., Frank, W., Austin, A., & Ainsworth, J., (2007). “A multiplex PCR for species- and virulence-specific determination of *Listeria monocytogenes*. College of Veterinary Medicine, Mississippi State University, Mississippi State, Mississippi 39762-6100, USA.



- Lunden, J., Tolvanen, R. & Korkeala, H. (2004). Human listeriosis outbreaks linked to dairy products in Europe. *J Dairy Sci* 87:6-11.
- Machata, S., Hain, T., Rohde, M. & Chakraborty, T. (2005). Simultaneous deficiency of both MurA and p60 proteins generates a rough phenotype in *Listeria monocytogenes*. *J Bacteriol* 187:8385-8394.
- MacFaddin. (2003). Pruebas bioquímicas para la identificación de bacterias de importancia clínica, 3a ed., España: Medica Panamericana.
- Mackaness, G. B. (1962). Cellular resistance to infection. *J. Exp. Med.* 116:381-406.
- Madigan, M., Martinko, J. & Parker. (2004). Brock. Biología de los microorganismos. Madrid. Pearson Educación. S. A. 10 ed. pp. 303-619.
- Martínez, R. H. (2015). Listeriosis caprina. Agroentrono. Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán. Universidad Nacional Autónoma de México.
- McDonough, P. L. & Wiedmann, M. (2004). Ecology and transmission of *Listeria monocytogenes* infecting ruminants and in the farm environment. *Appl. Environ. Microbiol.* 70:4458-4467.
- McLauchlin, J. (1996). The relationship between *Listeria* and listeriosis. *Food Control* 7, 187-193.
- McLauchlin, J., Mitchell, R. T., Smerdon, W. J. & Jewell, K. (2004). *Listeria monocytogenes* and listeriosis: a review of hazard characterisation for use in microbiological risk assessment of foods. *International Journal of Food Microbiology.* 92:15-33
- Mead, P. S, S utsker, L., Dietz, V., McCaig, L. F., Bresee, J. S, Shaplo, C., Gnffin, P. M. & Tauxe, R. V. (1999). Food-related illness and death.in the United States. *Emerg. Infect Dis.*
- Mena, C., Almeida, G., Carneiro, L., Teixeira, P., Hogg, T. & Gibss, P.(2004). Incidence of *Listeria monocytogenes* in different food products commercialized in Portugal. *Food Microbiol*;21:213-216.
- Mengaud, J., Ohayon, H., Gounon, P., Mege, R. M. & Cossart, P.(1996). E-cadherin is the receptor for internalin, a surface protein required for entry of *L. monocytogenes* into epithelial cells. *Cell* 84:923-932.



Mercado, P., Zavaleta, D., & Arroyo, V. (2014). Identificación de *Listeria monocytogenes* por amplificación del gen *iap* a partir de cultivos de *Listeria spp.* procedente de lugares de expendio de carne de res, pescado y verduras en Trujillo (Perú). REBIOL: Revista Científica de la Facultad de Ciencias Biológicas. Universidad Nacional de Trujillo. Trujillo. Perú, 34(2): 21-28.

Murray, E. G. D., Webb, R. A & Swann., M. B. R. (1926). A disease of rabbits characterised by a large mononuclear leukocytosis, caused by a hitherto undescribed bacillus *Bacterium monocytogenes* (n. sp.). J. Pathol. Bacteriol. 29:407–439.

Mylonakis, E., Hohmann, E. & Calderwood, S. (1998). Central nervous system infection with *Listeria monocytogenes*: 33 years experience at a general hospital and review of 776 episodes from the literature. Medicine (Baltimore). 77:313-36.

Neiker. (2005). Estudio sobre la prevalencia y caracterización de patógenos bacterianos en la base de la cadena alimentaria. SEGALDAP.

Norma Oficial Mexicana. NOM-143-SSA1-1995, Bienes y servicios. Método de prueba microbiológico para alimentos. Determinación de *Listeria monocytogenes*.

Norma Oficial Mexicana. NOM-210-SSA1-2014, Productos y servicios. Métodos de prueba microbiológicos. Determinación de microorganismos indicadores. Determinación de microorganismos patógenos.

Nyfelt, A. (1929). Etiologie de la mononucléose infectieuse. C. R. Soc. Biol. 101:590–591.

Orsi, R. H., Den Bakker, H. C. & Wiedmann, M. (2011). *Listeria monocytogenes* lineages: Genomics, evolution, ecology, and phenotypic characteristics. Int. J. Med. Microbiol.301:79-96.

Palomino, C. & González, Y. (2014). Técnicas moleculares para la detección e identificación de patógenos en alimentos: ventajas y limitaciones. Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Publica, 31(3), 535-546.

Park, Y. M. (2007a). Rheological Characteristic of Goat and Sheep Milk. Small Ruminant Research, 68, 73-87.

Park, Y. W.; Juárez, M.; Ramos, M. y Haenlein, G. (2007). Physico-Chemical Characteristics of Goat and Sheep Milk. Small Ruminant Research, 68, 88- 113.



Parrilla-Cerrillo, M. C., Vázquez, C. J., Saldate, C. O. & Nava, F. L. (1993). Brotes de toxiinfecciones alimentarias de origen microbiano y parasitario. Laboratorio Nacional de Salud Pública. Salud Pública de México: Vol. 35(5): 2-8.

Pascual, A. M. & Calderon, P. V. (2000). Investigación de *Listeria monocytogenes*. p. 1717-201. En: Microbiología Alimentaria, 2a. Editorial Díaz de Santos, Madrid, España.

Pelt-Verkuil, E. Belkum A. & Hays, J. P. (2008). Principles and Technical Aspects of PCR Amplification. Berlín, Alemania: Springer.

Perera, J. (2002). Ingeniería Genética: Preparación, Análisis, Manipulación y Clonaje de DNA. España: Editorial Síntesis.

Pérez de Castro A. M. (2008). Reacción en Cadena de la Polimerasa (Polymerase Chain Reaction, PCR), Valencia España, Universidad Politécnica de Valencia.

Portnoy. D.A., Chakraborty, T., Goebel, W. & Cossart, P. (1992). Molecular Determinants of *Listeria monocytogenes* Pathogenesis. Infect Immun; 60: 1263-1267.

Posfay-Barbe, K. M. & Wald, E. R. (2009) Listeriosis. Semin. Fetal Neonatal Med. 14:228-233.

Promega Corporation, (2017). “Manual técnico kit de purificación Wizard® Genomic DNA”. Recuperado de: <https://www.promega.com/-/media/files/resources/protocols/technical-manuals/0/wizard-genomic-dna-purification-kit-protocol.pdf>, Consultado 19 marzo de 2017.

Promega Corporation (2017). “Protocolo Kit para PCR Master Mix Promega®”. Recuperado de: <https://worldwide.promega.com/resources/protocols/product-information-sheets/g/pcr-master-mix-protocol/>, consultado 07 marzo de 2017.

Queipo, M., Tena, F., Colmenero & Morata., P. (2008). Comparison of seven commercial DNA extraction kits for the recovery of Brucella DNA from spiked human serum samples using real-time PCR. Eur J. Clin Microbiol Infect Dis, 27: 109-114.

Ramírez, B. G., Lara, S. A.V., García, T. C G., Díaz, A. E. & Tenorio, G. V. R. (2014). Virulencia de cepas de *Listeria monocytogenes* procedentes de cabras y sus derivados. Rev. Mex. Cien. Pecu. 5(3):341-355.



Rakshit, S. K. (2010). Thermostable enzymes used in Polymerase Chain Reaction. En Bustin, S. A. (ed). The PCR Revolution: Basic technologies and applications. Nueva York: Cambridge University Press. pp. 12-18.

Raveneau, J., Geoffroy, C., Beretti, J.L., Gaillard, J.L., Alouf, J.E. & Berche, P. (1992). Reduced virulence of a *Listeria monocytogenes* phospholipase-deficient mutant obtained by transposon insertion into the zinc metalloprotease gene. *Infect Immun.* 60:916—921.

Ray, B., (2004). “Microbiología fundamental de los alimentos”. Tercera edición, CRC Press, L. C U. U: 0-8493-1610-3.

Ray, B. & Arun, B. (2010). Fundamentos de Microbiología de Alimentos. 4ta ed. Mc Graw Hill. pp. 202-331.

Renzoni, A., Cossart, P. & Dramsi, S. (1999). PrfA, the Transcriptional Activator of Virulence Genes, is Upregulated During Interaction of *Listeria monocytogenes* with Mammalian Cells and in Eukaryotic Cell Extracts. *Mol Microbiol* 34: 552-561.

Reissbrodt, R., (2004). New chromogenic plating media for detection and enumeration of pathogenic *Listeria* spp. *International Journal of Food Microbiology*, 95: 1-9.

Reyna, C. N. (2000). PCR en Odontología. Tesis para obtener el título de Cirujano Dentista, Facultad de Odontología. Universidad Nacional Autónoma de México. Ciudad de México, México.

Roche, S.M., Velge, P., Bottreau, E., Durier, C., Marquet-van der Mee, N., & Pardon, P. (2001). Assessment of the virulence of *Listeria monocytogenes*: agreement between a plaque forming assay with HT-29 cells and infection of immunocompetent mice. *Int. J. Food.*

Rocourt, J. (1991). Human Listeriosis: 1989. WHO/HPP/FOS 91.3.

Rocourt, J. & Buchrieser, C., (2007). Chapter 1: The Genus *Listeria* and *Listeria monocytogenes*: Phylogenetic Position, Taxonomy, and Identification. Rysr E. & Marth E, editors. *Listeria*, Listeriosis, and Food Safety, 3rd ed. CRS Press, Taylor & Francis Group; p. 1-20.

Rodríguez, E., Gamboa, M., Hernández, F., & García, J., (2005). *Bacteriología general: principios y prácticas de laboratorio*. San José, Costa Rica: Editorial de la Universidad de Costa Rica.



Romero, C. R. (2007). Microbiología y parasitología humana; Bases etiológicas de las enfermedades infecciosas y parasitarias. 3a ed. México: Médica- Panamericana

Ruiz, M. C. (2016). Enfermedades Transmitidas por Alimentos. Recuperado el día 28 de Noviembre del 2017, desde: [https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/225246/3\\_Enfermedades\\_Transmitidas\\_por\\_Alimentos\\_-DGE.pdf](https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/225246/3_Enfermedades_Transmitidas_por_Alimentos_-DGE.pdf)

Ryser, E. T. & Marth, E. H. (2007). Listeria, Listeriosis, and Food safety. New York: Marcel Dekker, Inc. pp.11-16,27,28, 67-76, 97-99

SAGARPA. (2016a). Destina SAGARPA recursos para sectores que van hacia adelante en la producción. Crianza de cabras y producción de leche, quesos y dulces, son alternativa real de ingresos. Recuperado el día 17 de Agosto del 2017, desde: <https://www.gob.mx/sagarpa/prensa/destina-sagarpa-recursos-para-sectores-que-van-hacia-adelante-en-la-produccion>

SAGARPA. (2016b). Las buenas prácticas de producción y manejo aseguran una buena leche de cabra. Recuperado el día 28 de Diciembre del 2017, desde: <https://www.gob.mx/sagarpa/articulos/las-buenas-practicas-de-produccion-y-manejo-aseguran-una-buena-leche-de-cabra/>

Saiki, R. K., Gelfand, D. H., Stofeel, S., Scharf, S. J., Higuchi, R., Horn, G. T., Mullis, K. B & Erlich, H. A. (1988). Primer-Direct enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. Science. pp. 491.

Saini, A. L. & Gili, R. S. (1991). Goat Milk: an Attractive Alternative. Indian Dairyman, 42, 562-564.

Salazar, M. A. M., Sandoval, R. A. S., & Armendáriz, B. J. S. (2013). Biología molecular: fundamentos y aplicaciones en las ciencias de la salud. México, D.F., MX: McGraw-Hill Interamericana.

Sambrook J. & Russell D. (2001). Molecular cloning, a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory. New York, E. U.A

Sánchez-Campillo, M., Dramsi, S., Gómez-Gómez, J. M., Michel, E., Dehoux, P., Cossart, P., Baquero, F. & Pérez-Díaz, J. C. (1996). Modulation of DNA topology by *flaR*, a new gene from *Listeria monocytogenes*. Mol. Microbiol. 18:801-811.



Schöbitz, R., Luigi, C., & Nahuelquin, Y. (2009). *Listeria monocytogenes*. Un peligro latente para la industria alimentaria. *Agro Sur* 37 (1): 1-8.

Schubert, W., Urbanke, C., Ziehm, T., Beier, V., Machner, M., Domman, E., Wehland, J., Chakraborty, T. & Heinz, D. (2002). Structure of internalin, a major invasion protein of *Listeria monocytogenes*, in complex with its human receptor E-cadherin. *Cell*. Dec 13; 111(6): 825-36.

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

Seeliger, H. P. R. (1988). Listeriosis—history and actual developments. *Infection* 16:S80–S84.

Sleator, R. D., Gahan, C. G.M. & Hill, C. (2003). A postgenomic appraisal of osmotolerance in *Listeria monocytogenes*. *Appl. Environ. Microbiol.* 69, 1–9.

Somma, M. & Querci, M. (2007). Reacción en Cadena de la Polimerasa. Análisis de la presencia de organismos genéticamente modificados en muestras de alimentos; Sección No. 4. Organización Mundial de la Salud Oficina Regional para Europa; pp. 3-18.

Stuart, S. E. & Welshimer, H. J. (1973). Intrageneric relatedness of *Listeria* Pirie. *J. Syst. Bacteriol.* 23:8-14.

Sun, A.N., Camilli, A., & Portnoy, D.A. (1990). Isolation of *Listeria monocytogenes* small plaque mutants defective for intracellular growth and cell-to-cell spread. *Infect. Immun.* 58: 3770-3778.

Swanson, J. A., & Baer, S.C. (1995). Phagocytosis by zippers and triggers. *Trends Cell Biol.* 5: 89-93.

Tamay de Dios L. I. (2013). Fundamentos de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en tiempo real. *Medigraphic*. pp. 70-78

Tilney, C.G. & Portnoy, D.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., Poutou, R., Carrascal, A., Sierra, S. & Mercado, M. (2004). Validación de PCR para la detección de *Listeria monocytogenes* en carnes crudas de res y pollo. *Red de*



Revistas Científicas de América Latina, el Caribe, España y Portugal. MVZ-Córdoba. 9:(2), 414-427

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

Touré, R., Kheadr, E., Lacroix, C., Moroni, O. & Fliss, I. (2003). Production of antibacterial substances by bifidobacterial isolates from infant stool active against *Listeria monocytogenes*. J. Appl. Microbiol. 95:1058-1069.

Uta Gasanov, D. H. (2005). Methods for the isolation and identification of *Listeria spp.* FEMS Microbiology Reviews (29), 851-875.

Vázquez-Boland, J. A., Gamallo, M. T., Ripio, G., Domínguez-Bernal, M., Lara, Y., Vega, R. C., Mainar, & Suárez, M. (1996). Listeriosis animal: aspectos epidemiológicos y diagnósticos, implicaciones en salud pública, y situación en España. Med. Vet. 13:333-344.

Vázquez-Boland, J. A., Kuhn, M., Berche, M., Chakraborty, T., Domínguez-Bernal, G., Goebel, W., González-Zorn, B., Wehland, J. & Kreft, J. (2001). *Listeria* pathogenesis and molecular virulence determinants. Clinical Microbiological Reviews. 14(3): 584-640.

Vázquez, C., Rodas, O. & Quiñones, E. I., (2001). Occurrence of *Listeria* species in raw milk in farms on the outskirts of México city. Food Microbiol. 18(2):177-181.

Vega, Y., León, S., Gutiérrez, R., Díaz, G., González, M. & Ramírez, A. (2010). Leche de cabra: producción, composición y aptitud industrial. Recuperado el 1 de Noviembre de 2017, desde: <http://www.alfaeditores.com/carnilac/TECNOLOGIA%20Leche%20de%20cabra.html>

Vega, Y., Dickneite, C., Ripio, M. T., Bockmann, R., González-Zorn, B., Novella, S., Domínguez-Bernal, G., Goebel, W. & Vázquez-Boland, J. A. (1998). Functional Similarities Between the *Listeria monocytogenes* Virulence Regulator PrfA and Cyclic AMP Receptor Protein: The PrfA\* (Gly145Ser) Mutation Increases Binding Affinity for Target DNA. J Bacteria/ 180:6655-6660.

Velge, P. & Roche, S. (2010). Variability of *Listeria monocytogenes* virulence: a result of the evolutionary between saprophytism and virulence?. Future Microbiol; 5: 1799-821.

Vera, A., González, G., Domínguez, M. & Bello, H. (2013). Principales factores de virulencia de *Listeria monocytogenes* y su regulación. Universidad de Concepción,



Concepción, Chile. Facultad de Ciencias Biológicas. Rev. Chilena Infectol. 30 (4): 407-416.

Villegas, M. (2010). Caracterización molecular de cepas clínicas de *Listeria monocytogenes* aisladas en el Hospital Madre-Niño, San Bartolomé de Lima durante el período 2001-2005. Universidad Nacional Mayor de San Marcos.

Vitas, A. I., Aguado, V. & García-Jalón, I. (2004). Occurrence of *Listeria monocytogenes* in fresh and processed foods in Navarra (Spain). Int. J. Food Microbiol 90:349-356.

Wagner, M. & McLauchin, J. (2008). Handbook of *Listeria monocytogenes*. Biology. USA: Taylor and Francis Group. pp. 3-26.

Walter, J.C. (2006). Replication-dependent destruction of Cdt1 limits DNA replication to a single round per cell cycle in *Xenopus* egg extracts. Genes Dev. 19, 114–126.

Wan, J., King, K., Forsyth, S. & Coventry, M. J. (2003). Detection of *Listeria monocytogenes* in salmon using the probelias Polymerase Chain Reaction system. Journal of Food Protection. 66(3): 436-440.

Ward, T. J., Ducey, T. F., Usgaard, T., Dunn, K. A. & Bielawski, J. P. (2008). Multilocus genotyping assays for single nucleotide polymorphism-based subtyping of *Listeria monocytogenes* isolates. Appl Environ Microbiol. 74: 7629-42.

Weon, S. C. & Chong-Hae H. (2003). Rapid Enumeration of *Listeria monocytogenes* in milk using Competitive PCR. International Journal of Food Microbiology. In press.

Wilson, B. A. & Salyers, A. A. (2002). Bacterial pathogenesis. A molecular Approach. *Listeria monocytogenes*. 2<sup>a</sup> ed. pp. 183-189.

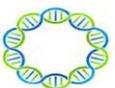
Yan, H., Neogi, S. B., Mo, Z., Guan, W., Shen, Z., Zhang, S. (2010). Prevalence and characterization of antimicrobial resistance of foodborne *Listeria monocytogenes* isolates in Hebei province of Northern China, 2005-2007. Int J Food Microbiol;144: 310-316.

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

Zhang, D. L., Ross, T. & Bowman, J. P. (2010). Physiological aspects of *Listeria monocytogenes* during inactivation accelerated by mild temperatures and otherwise non-growth permissive acidic and hyperosmotic conditions. International Journal of Food Microbiology. 141, 177-185.



Zunabovic, M., Domig, K. J., & Kneifel, W. (2011). Practical relevance of methodologies for detecting and tracing of *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat foods and manufacture environments – A review. *LWT Food Sci Technol*;44:351-362.



## Anexo 1

En la tabla 13 de enlistan de las muestras de leche de cabra analizadas en este trabajo así como la distribución realizada para la formación de grupos.

**Tabla 13.** Muestras de leche de cabra provenientes del Estado de Chiapas.

<i>Grupo</i>	<i>Identificación</i>	<i>Muestra</i>	<i>Quesería</i>	<i>Región</i>	<i>Municipio</i>
1	L-14	N3	Isis Azucena	Frailesca	Villa Corzo
	14	Leche 3			
	14	Leche 3			
	14	Leche 3			
2	22	Rancho 1	Valle Buena		
3	38-1	Leche 1	El Mapache		
	39-2	Leche 2			
	40-3	Leche 3			
	41-4	Leche 4			
4	42-5	Leche 5	Pegra/Clarita		
	43-6	Leche 6			
	44-7	Leche 7			
5	45-1	Leche 1			
	46-2	Leche 2			
	47-3	Leche 3			
	48-4	Leche 4			
6	49-5	Leche 5		Pegra/Clarita	
	50-6	Leche 6			
	51-7	Leche 7			
	52-8	Leche 8			
7	53-1	Leche 1			



	54-2	Leche 2	Ciénega	Frailesca	Villa Corzo
	55-3	Leche 3			
	56-4	Leche 4			
8	57-5	Leche 5			
	58-6	Leche 6			
	59-7	Leche 7			
9	60-8	Leche 8			
	61-9	Leche 9			
	62-10	Leche 10			
10	63	Leche 1			
11	64-1	Leche 1	Junior		
	65-2	Leche 2			
	66-3	Leche 3			
12	67-4	Leche 4			
	68-5	Leche 5			
	69-6	Leche 6			
13	70-1	Leche 1		Zenteno	
	71-2	Leche 2			
	342	Leche 1			
	343	Leche 2			
14	72-1	Leche 1	San Francisco		
	73-2	Leche 2			
	74-3	Leche 3			
	75-4	Leche 4			
15	76-5	Leche 5			
	77-6	Leche 6			



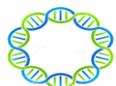
	78-7	Leche 7			
16	79-8	Leche 8		Costa	Pijijiapan
	80-9	Leche 9			
	81-10	Leche 10			
17	82-1	Leche 1	Juan de Dios		
	83-2	Leche 2			
	83-2	Leche 2			
	83-2	Leche 2			
	83-2	Leche 2			
	83-2	Leche 2			
	84-3	Leche 3			
85-4	Leche 4				
18	86-5	Leche 5			
	87-6	Leche 6			
	88-7	Leche 7			
19	89-8	Leche 8			
	90-9	Leche 9			
	91-10	Leche 10			
20	92-1	Leche 1	Alonso Junior		
	93-2	Leche 2			
	94-3	Leche 3			
	95-4	Leche 4			
21	96-5	Leche 5	Alonso Junior		
	97-6	Leche 6			
	98-7	Leche 7			
22	99-8	Leche 8			



	100-9	Leche 9			
	101-10	Leche 10			
23	102-1	Leche 1	San Juan	Costa	Pijijiapan
	103-2	Leche 2			
	104-3	Leche 3			
	105-4	Leche 4			
24	106-5	Leche 5			
	107-6	Leche 6			
	108-7	Leche 7			
25	109-8	Leche 8			
	110-9	Leche 9			
	111-10	Leche 10			
26	112-1	Leche 1	Alonso Original		
	113-2	Leche 2			
	114-3	Leche 3			
	115-4	Leche 4			
27	116-5	Leche 5			
	117-6	Leche 6			
	118-7	Leche 7			
28	119-8	Leche 8			
	120-9	Leche 9			
	121-10	Leche 10			
29	122-1	Leche 1			
	123-2	Leche 2			
	124-3	Leche 3			
	125-4	Leche 4			



30	126-5	Leche 5	Buen Villa	Frailesca	Villa Corzo
	127-6	Leche 6			
	128-7	Leche 7			
31	129-8	Leche 8	Los Albertos	Costa	Tonalá
	130-9	Leche 9			
	131-10	Leche 10			
32	132-1	El 57-01	San José/Tres Picos	Costa	Tonalá
	133-2	Alemania-02			
	134-3	Tierra Blanca-03			
33	135-1	Leche 1	San José/Tres Picos	Costa	Tonalá
	136-2	Leche 2			
	137-3	Leche 3			
	138-4	Leche 4			
34	139-5	Leche 5	Mary	Costa	Tonalá
	140-6	Leche 6			
	141-7	Leche 7			
35	142-8	Leche 8	Mary	Costa	Tonalá
	143-9	Leche 9			
	144-10	Leche 10			
36	145-1	Leche 1	Mary	Costa	Tonalá
	146-2	Leche 2			
	147-3	Leche 3			
	148-4	Leche 4			
37	149-5	Leche 5	Mary	Costa	Tonalá
	150-6	Leche 6			
	151-7	Leche 7			



38	152-8	Leche 8	Camperlac	Mapastepec		
	153-9	Leche 9				
	154-10	Leche 10				
39	155-1	Leche 1				
	156-2	Leche 2				
	157-3	Leche 3				
40	158-4	Leche 4				
	159-5	Leche 5				
	160-6	Leche 6				
41	161-7	Leche 7				
	162-8	Leche 8				
	164-10	Leche 10				
42	215-6	Leche R6	La Neblina	Rayón		
	216-7	Leche R7				
	217-8	Leche R8				
43	218-9	Leche R9				
	219-10	Leche R10				
	219	Leche R10				
44	220-1	Leche 1			La Orquídea	Norte
	221-2	Leche 2				
	222-3	Leche 3				
	223-4	Leche 4				
45	224-5	Leche 5				
	225-6	Leche 6				
	226-7	Leche 7				
46	307-11	Leche 11				



	308-12	Leche 12	Santa Elena		Villaflora
	309-13	Leche 13			
47	310-14	Leche 14			
	311-15	Leche 15			
48	312-1	Leche 1	Sra. Mari	Costa	Tonalá
	313-2	Leche 2			
	314-3	Leche 3			
49	315-4	Leche 4			
	316-5	Leche 5			
	317-6	Leche 6			
50	318-7	Leche 7			
	319-8	Leche 8			
	320-9	Leche 9			
51	321-10	Leche 10			
	322-11	Leche 11			
	323-12	Leche 12			
52	324-13	Leche 13			
	325-14	Leche 14			
	326-15	Leche 15			
53	327-1	Leche 1			
	328-2	Leche 2			
	329-3	Leche 3			
54	330-4	Leche 4			
	331-5	Leche 5			
	332-6	Leche 6			
55	333-7	Leche 7			



	334-8	Leche 8	Camperlac	Costa	Mapastepec
	335-9	Leche 9			
56	336-10	Leche 10			
	337-11	Leche 11			
	338-12	Leche 12			
57	339-13	Leche 13			
	340-14	Leche 14			
	341-15	Leche 15			
58	344	Leche 1			
	345	Leche 2			
	346	Leche 3			
	347	Leche 4			
59	348	Leche 5			
	349	Leche 6			
	350	Leche 7			
	351	Leche 8			
60	352	Leche 1	Los Leones		Villaflores
	353	Leche 1	Lic. Adriana Ovantes		La Concordia



## Anexo 2

Se realizó la diferenciación de especies de *Listeria* del género *Corynebacterium* en base a la tabla 13, los resultados obtenidos se observan en la tabla 14.

**Tabla 14.** Diferenciación de especies de *Listeria* y *Corynebacterium*.

Pruebas de identificación	<i>Listeria</i>						<i>Corynebacterium</i>					
	<i>L. monocytogenes</i>	<i>L. ivanovii</i>	<i>L. innocua</i>	<i>L. seeligeri</i>	<i>L. grayi</i>	<i>L. welshimeri</i>	<i>C. aquaticum</i>	<i>C. vitarumen</i>	<i>C. renale</i>	<i>C. jeikeium</i>	<i>C. bovis</i>	<i>C. matruchotii</i>
<b>Catalasa</b>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<b>Oxidasa</b>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>O/F</b>	F	F	F	F	F	F	O	F	F	NF	NF	NF
<b>VP</b>	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
<b>MR</b>	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-	-	-
<b>Ureasa</b>	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	V-	V
<b>Glucosa</b>	A	A	A	A	A	A	A <sup>V</sup>	A	A	A	A	A
<b>Manitol</b>	-	-	-	-	A	-	NR	NR	NR	NR	NR	NR
<b>Salicina</b>	+	+	+	-	+	-	NR	A	-	-	-	A
<b>Xilosa</b>	-	A	-	A	-	A	V	NR	-	-	-	-
<b>Lactosa</b>	V	A	A	NR	A	NR	V	V	-	-	V	-
<b>Ramnosa</b>	+	-	V	-	-	V	NR	NR	NR	NR	NR	NR
<b>Hidrólisis de esculina</b>	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-

(Mac Faddin, 2003; Barrow & Feltham, 2003).

+, Positivo; -, Negativo; F, Fermenta; NF, No fermenta; O, Oxida; A, Producción de ácido; V, Resultados variables; NR, no se dispone de resultados; A<sup>V</sup>, Producción de ácido con resultados variables.



**Tabla 15.** Resultados de la pruebas bioquímicas realizadas.

Grupo	Gram	Confirmación del gram	Oxidasa	Catalasa	MR/VP	O/F		Especie
<b>9 a 24 h</b>								
11	+	+	-	+	-			
13	+	+	-	+	-			
2,1	+	+	-	+	-			
2,2	+	+	-	+	-			
5,1	+	+	-	+	-			
5,2	+	+	-	+	***	+	-	Sospechosa de <i>Corynebacterium</i>
10	+	+	-	+	-			
9	+	+	-	+	-			
12,1	+	+	-	+	**	-	+	Sospechosa de <i>Corynebacterium</i>
<b>11 a 24 h</b>								
6	+	+	-	+	-			
7,2	+	+	-	+	-			
<b>11 a 48 h</b>								
1	+	+	-	+	-			
2,7	+	+	-	+	-			
<b>12 a 48 h</b>								
1	+	+	-	+	***	+	+	Sospechosa de <i>L. monocytogenes</i>
<b>22 a 48 h</b>								
1F	+	+	-	+	***	-	+	Sospechosa de <i>Corynebacterium</i>
<b>24 a 24 h</b>								
F	+	+	-	+	**	-	+	Sospechosa de <i>Corynebacterium</i>
<b>24 a 48 h</b>								
1F	+	+	-	+	***	-	+	Sospechosa de <i>Corynebacterium</i>
2F	+	+	-	+	***	-	+	Sospechosa de <i>Corynebacterium</i>
<b>29 a 48 h</b>								
1F	+	+	-	+	**	-	+	Sospechosa de <i>Corynebacterium</i>
<b>30 a 24 h</b>								
1F	+	+	-	+	**	-	+	Sospechosa de <i>Corynebacterium</i>



1F	+	+	-	+	-			
1D	+	+	-	+	-			
<b>32 a 24 h</b>								
1D	+	+	-	+	**	+	+	Sospechosa de <i>L. monocytogenes</i>
2F	+	+	-	+	-			
<b>32 a 48 h</b>								
2F	+	+	-	+	-			
1D	+	+	-	+	-			
2D	+	+	-	+	-			
<b>33 a 24 h</b>								
1D	+	+	-	+	-			
2D	+	+	-	+	-			
4D,1	+	+	-	+	-			
3F,1	+	+	-	+	-			
2F	+	+	-	+	-			
3F	+	+	-	+	-			
<b>33 a 48 h</b>								
1D	+	+	-	+	-			
2D	+	+	-	+	-			
<b>34 a 24 h</b>								
1D	+	+	-	+	-			
<b>34 a 48 h</b>								
4D	+	+	-	+	**	-	+	Sospechosa de <i>Corynebacterium</i>
1F	+	+	-	+	-			
3F	+	+	-	+	**	-	+	Sospechosa de <i>Corynebacterium</i>
<b>35 a 24 h</b>								
3F	+	+	-	+	-			
<b>35 a 48 h</b>								
1s	+	+	-	+	-			
<b>37 a 24 h</b>								
F	+	+	-	+	-			
<b>38 a 24 h</b>								
3F	+	+	-	+	-			
4D	+	+	-	+	-			
1D								Sospechosa de



	+	+	-	+	**	-	+	<i>Corynebacterium</i>
<b>38 a 48 h</b>								
1F	+	+	-	+	**	-	+	Sospechosa de <i>Corynebacterium</i>
<b>39 a 24 h</b>								
1F	+	+	-	+	**	-	+	Sospechosa de <i>Corynebacterium</i>
2D	+	+	-	+	-			
3F	+	+	-	+	-			
<b>40 a 24 h</b>								
1F	+	+	-	+	-			
2F	+	+	-	+	-			
<b>41 a 24 h</b>								
1D	+	+	-	+	***	-	+	Sospechosa de <i>Corynebacterium</i>
2D	+	+	-	+	***	-	+	Sospechosa de <i>Corynebacterium</i>
<b>43 a 24 h</b>								
2D	+	+	-	+	**	-	+	Sospechosa de <i>Corynebacterium</i>
<b>47 a 24 h</b>								
2F	+	+	-	+	***	+	+	Sospechosa de <i>L. monocytogenes</i>
3F	+	+	-	+	***	+	+	Sospechosa de <i>L. monocytogenes</i>
4F	+	+	-	+	**	-	+	Sospechosa de <i>Corynebacterium</i>
5D	+	+	-	+	-			
6F	+	+	-	+	-			
7F	+	+	-	+	-			
<b>48 a 24 h</b>								
1D	+	+	-	+	***	-	+	Sospechosa de <i>Corynebacterium</i>
2D	+	+	-	+	-			
3F	+	+	-	+	**	-	+	Sospechosa de <i>Corynebacterium</i>
4F	+	+	-	+	-			
5D	+	+	-	+	-			
6D	+	+	-	+	-			
<b>48 a 48 h</b>								
1D	+	+	-	+	-			



2F	+	+	-	+	-			
3F	+	+	-	+	-			
4F	+	+	-	+	-			
5D	+	+	-	+	**	-	+	Sospechosa de <i>Corynebacterium</i>
6F	+	+	-	+	-			
<b>49 a 24 h</b>								
1F	+	+	-	+	-			
2F	+	+	-	+	-			
3F	+	+	-	+	**	-	+	Sospechosa de <i>Corynebacterium</i>
4D	+	+	-	+	-			
5F	+	+	-	+	**	-	+	Sospechosa de <i>Corynebacterium</i>
6D	+	+	-	+	-			
7D	+	+	-	+	****	-	+	Sospechosa de <i>Corynebacterium</i>
<b>50 a 24 h</b>								
2D	+	+	-	+	-			
<b>51 a 24 h</b>								
2D	+	+	-	+	**	-	+	Sospechosa de <i>Corynebacterium</i>
<b>51 a 48 h</b>								
1F	+	+	-	+	-			
4D	+	+	-	+	**	-	+	Sospechosa de <i>Corynebacterium</i>
6F	+	+	-	+	****	-	+	Sospechosa de <i>Corynebacterium</i>
<b>52 a 24 h</b>								
2D	+	+	-	+	-			
1D	+	+	-	+	**	-	+	Sospechosa de <i>Corynebacterium</i>
<b>54 a 24 h</b>								
1F	+	+	-	+	-			
2F	+	+	-	+	-			
3D	+	+	-	+	-			
<b>54 a 48 h</b>								
1D	+	+	-	+	-			
2D	+	+	-	+	-			
4D	+	+	-	+	-			



55 a 24 h							
1F	+	+	-	+	-		
56 a 48 h							
4D	+	+	-	+	-		
5F	+	+	-	+	**	-	+
Sospechosa de <i>Corynebacterium</i>							

De acuerdo con los resultados obtenidos mostrados en la tabla 14, se realizaron las pruebas de fermentación de hidratos de carbono (Salicina, Ramnosa, Lactosa, Manitol, Xilosa) y Ureasa a los grupos sospechosos de *L. monocytogenes*, en la tabla 16 se muestran los resultados obtenidos.

**Tabla 16.** Resultados de prueba de fermentación de hidratos de carbono y ureasa.

Grupo	Salicina	Ramnosa	Lactosa	Manitol	Xilosa	Ureasa	Especie
12 a 48 h							
<b>1</b>	+	+	-	-	-	+	Sospechosa de <i>C. matruchotii</i>
32 a 24 h							
<b>1D</b>	+	+	-	-	-	+	Sospechosa de <i>C. matruchotti</i>
47 a 24 h							
<b>2F</b>	-	-	+	-	+	-	Sospechosa de <i>C. aquaticum</i>
<b>3F</b>	-	-	+	-	+	-	Sospechosa de <i>C. aquaticum</i>

En base a los resultados las cepas del grupo 12 que pertenece a la Quesería Junior, Región Frailesca del Municipio de La Concordia, se atribuyen a la posible presencia de *C. matruchotii* que es un patógeno humano infrecuente el cual se tiene reporte de ser aislado en otros casos a partir de muestras de cavidad oral como flora no habitual, principalmente de cálculos y placas de depósito. Por su capacidad calcificante se ha relacionado con estenosis aórtica, reproducida en modelo animal (Cohen, *et al.*, 2004).

Del grupo 32 perteneciente a la Quesería Albertos, Región Frailesca del Municipio Villa Corzo y en el grupo 47 perteneciente a la Quesería Santa Elena ubicada en la Región Norte



del Municipio Villaflores se encontró la posible presencia de *C. aquaticum* que rara vez se ha descrito como una causa de enfermedad en humanos, encontrada en agua natural y destilada.

Como se mencionó anteriormente las especies de *Corynebacterium* están ampliamente distribuidas en el medio ambiente encontrándose en el suelo, el agua, productos alimenticios y también en la mucosa y piel del hombre y animales, debido a que algunas resultan ser patógenas para el ser humano y para los animales, es recomendable realizar una identificación específica de las diferentes especies así como prevenir su incidencia anulando cualquier riesgo que se pueda producir.

