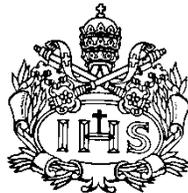


**Estandarización de una PCR para la identificación molecular de *Listeria innocua***

**Elizabeth Díaz Hernández**



**Pontificia Universidad Javeriana**  
**Facultad de ciencias**  
**Carrera de Microbiología Industrial**  
**Bogotá D.C.**  
**Noviembre 2013**

**Estandarización de una PCR para la identificación molecular de *Listeria innocua***

**Elizabeth Díaz Hernández**

---

**Ingrid Achuler García, Ph.D.**

**Decana académica Facultad de Ciencias**

---

**Janeth Arias Palacios, M.Sc., M.Ed.**

**Directora Carrera Microbiología**

**Estandarización de una PCR para la identificación molecular de *Listeria innocua***

**Elizabeth Díaz Hernández**

---

**Raul A. Poutou-Piñales BQ., M.Sc., Ph.D.**

**Director**

---

**Ana Karina Carrascal Bact., M.Sc.**

**Jurado**

### **NOTA DE ADVERTENCIA**

Artículo 23 de la resolución Nº 13 de julio de 1946 *“La Universidad no se hace responsable por los conceptos emitidos por sus alumnos en sus trabajos de tesis. Solo velara porque no se publique nada contrario al dogma y a la moral católica y porque las tesis no contengan ataques personales contra persona alguna, antes bien se vea en ellas el anhelo de buscar la verdad y la justicia”*

## Tabla de contenido

<b>Resumen .....</b>	<b>7</b>
1.0 Introducción .....	8
2.0 Justificación .....	9
3.0 Planteamiento del problema .....	10
4.0 Marco Teórico .....	12
5.0 Objetivos .....	17
5.1 Objetivo general.....	17
5.2 Objetivos específicos.....	17
6.0 Materiales y métodos .....	18
6.1 Microorganismos empleados .....	18
6.2 Extracción de ADN.....	18
6.3 PCR para la identificación de <i>L. monocytogenes</i> .....	18
6.4 PCR para la identificación de <i>L. innocua</i> .....	19
6.5 Demostración de la especificidad de los “ <i>primers</i> ” empleados en la identificación de <i>L. innocua</i> por PCR .....	20
6.6 Determinación del límite de detección de la PCR para la identificación de <i>L. innocua</i> .....	20
6.7 Electroforesis.....	20
6.8 Determinación de la proporción de <i>L. innocua</i> .....	20
7.0 Resultados .....	21
7.1 Selección de los “ <i>primers</i> ” .....	21
7.2 Extracción de ADN.....	22

7.3 PCR para la identificación de <i>L. monocytogenes</i> .....	23
7.4 Estandarización de la PCR para la identificación de <i>L. innocua</i> .....	24
7.5 Especificidad de los “primers” .....	24
7.6 Determinación del límite de detección .....	25
7.7 Determinación de la proporción inicial de <i>L. innocua</i> .....	26
8.0 Discusión .....	27
8.1 Selección de los “primers” .....	27
8.2 Estandarización de la PCR para la identificación de <i>L. innocua</i> .....	28
8.3 Especificidad de los “primers” .....	28
8.4 Determinación del límite de detección .....	29
8.5 Determinación de la proporción inicial de <i>L. innocua</i> .....	29
9.0 Conclusiones .....	30
10.0 Recomendaciones .....	30
11.0 Referencias .....	32

## Resumen

En este trabajo de grado se estandarizó la técnica de PCR para la identificación de *L. innocua* sin interferencia con *L. monocytogenes*. Para la extracción de ADN de los microorganismos utilizados en este trabajo y de los 110 aislamientos diferentes provenientes del proyecto “Diseño de un plan integral para reducir la prevalencia de *Salmonella* spp., y |*L. monocytogenes* en plantas de beneficio, desposte y puntos de venta en la cadena cárnica porcina” se utilizó el kit de extracción de ADN PROMEGA (A1125). La PCR para la identificación de *L. monocytogenes* se basó en la especificidad de los “primers” LI1/U1 que amplificaron una banda de 938pb para la identificación de género y los “primers” LF/LR que amplificaron una banda de 750pb para la identificación de la especie. La PCR para la identificación de *L. innocua* se basó en los “primers” lin0464F/lin0464R que amplificaron una banda de 749pb. Los resultados de la estandarización de la PCR para identificación de *L. innocua* mostraron una alta especificidad de los “primers” (100%) valorando las cepas interferentes que fueron empleadas en este estudio, y un límite de detección de la PCR de (70fg/ $\mu$ L), los aislamientos pertenecientes al proyecto de investigación, permitieron calcular la proporción de *L. innocua* de 56.4%. Este trabajo de grado muestra que la técnica de PCR estandarizada, sirve para detectar la presencia de *L. innocua* y discriminar esta especie de *L. monocytogenes*.

**Palabras clave:** estandarización, PCR, *L. innocua*, *L. monocytogenes*.

## 1.0 Introducción

El género listeria se compone de 10 especies de las cuales sólo dos son patógenas *L. monocytogenes* y *L. ivanovii*. Las especies no patógenas son *L. innocua*, *L. welshimeri*, *L.*

*seeligeri*, *L. grayi*, *L. rocourtiae*, *L. fleischmannii*, *L. marthii*, *L. weihenstephanensis*, (1, 2, 3, 4). El género *Listeria* está formado por bacilos, asporógenos, que no presentan cápsula (5). *L. monocytogenes* es causante de listeriosis en humanos y/o animales, y suele afectar el Sistema Nervioso Central (SNC), provocando la muerte o dejando secuelas neurológicas, ataca principalmente a personas inmunosuprimidas, neonatos, mujeres embarazadas, y puede llegar a ocasionar meningitis, meningoencefalitis, septicemia, abortos, infección prenatal y gastroenteritis (6), siendo de esta manera un problema de salud pública al generar una tasa de mortalidad del 30% dentro del grupo de riesgo (1, 7, 8, 9, 10).

*L. innocua* en contraste no es patógena pues no es hemolítica y se encuentra en los mismos nichos ecológicos que *L. monocytogenes* como: medio ambiente, alimentos listos para consumo quesos, verduras, productos de mar, carne de res, carne de cerdo, carne de pollo (7, 8, 11, 12); esto se debe principalmente a que estas dos especies están estrechamente relacionadas genéticamente (11, 13, 14).

La mayoría de las especies de *Listeria* pueden sobrevivir bajo condiciones extremas tales como pH ácido, bajas temperaturas, altas concentraciones de sal (7, 15). Entre las especies es *L. innocua* la que se detecta con mayor frecuencia y facilidad que *L. monocytogenes* o *L. ivanovii* (16), es por ello que detectar la presencia de *L. innocua* en la industria de alimentos genera una alerta, sobre el mal funcionamiento de las condiciones higiénicas del sitio de producción o expendio.

*L. innocua* es importante en la industria de alimentos debido a que se utiliza como modelo e indicador de la posible presencia del patógeno *L. monocytogenes* (14), usualmente se utiliza como sustituto de *L. monocytogenes* en estudios diseñados para evaluar la letalidad de procesos encaminados a la eliminación del patógeno en la industria de alimentos (14). Por otro lado se ha demostrado en diferentes estudios que la presencia de *L. innocua* puede enmascarar la presencia de *L. monocytogenes*; haciendo más difícil su detección

(17, 18, 19); de aquí que la presencia de *L. innocua* en la industria de alimentos no debe ser ignorada (19).

Los métodos microbiológicos utilizados rutinariamente para el aislamiento de *L. innocua* y *L. monocytogenes* en alimentos requieren de dos etapas de enriquecimiento en medios líquidos y un aislamiento en medio sólido. Además, de consumir mucho tiempo, estas pruebas microbiológicas no permiten discriminar fácilmente entre las dos especies por lo cual se generan resultados falsos negativos y falsos positivos (7, 18). Esta es la razón por la cual se requiere de métodos alternativos que reemplacen las técnicas tradicionales para la detección e identificación resuelta de ambos microorganismos; como lo es la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).

La PCR es una técnica molecular que permite la amplificación rápida, sensible y sencilla de secuencias específicas en el ADN de los individuos; lo que permite detectar la presencia de los mismos. El objetivo de este trabajo fue estandarizar una PCR para la identificación de *L. innocua* sin interferencia con *L. monocytogenes* (7).

## **2.0 Justificación**

*L. innocua* desempeña un papel importante en la industria de alimentos debido a que se utiliza como indicador biológico de la posible presencia de *L. monocytogenes*, debido a que presentan requerimientos ecológicos similares (20, 21). También se emplea como modelo no patógeno del género (11,13, 21) debido a su cercanía taxonómica y bioquímica con *L. monocytogenes*.

*L. innocua*, además, presenta una capacidad de supervivencia igual o superior a *L. monocytogenes* lo cual le permite sobrevivir a diferentes procesos de producción y almacenamiento de alimentos, indicando así deficiencias en procesos los de sanitización en las plantas de procesamiento (2).

Se ha demostrado que la presencia de *L. innocua* además, enmascara la presencia de *L. monocytogenes* debido a que presenta un crecimiento más acelerado, lo que conduce a resultados no confiables, falsos negativos o falsos positivos (17, 18, 19), que ponen en riesgo la salud de los consumidores.

Por esta razón el presente trabajo pretende estandarizar una técnica rápida sensible y sencilla, como la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), (7) para la identificación de *L. innocua*, que permita diferenciar estas dos especies, así como determinar la proporción de *L. innocua* en el primer muestreo realizado dentro del marco del proyecto “Diseño de un plan integral para reducir la prevalencia de *Salmonella* spp., y *Listeria monocytogenes* en plantas de beneficio, desposte y puntos de venta en la cadena cárnica porcina”. Financiado por Colciencias y Asoporicultores.

### **3.0 Planteamiento del problema**

*L. monocytogenes* es el responsable de causar listeriosis en humanos, lo cual se ha convertido en un problema de salud pública (7, 8, 9, 10), este microorganismo usualmente se transmite por el consumo de alimentos contaminados (7, 9, 13). Durante las últimas tres décadas los casos de infección por *L. monocytogenes* se han incrementado, y se considera un problema de salud grave, debido a la severidad de los síntomas y su alta tasa de mortalidad (~30%) dentro del grupo de riesgo (7, 6, 22). La listeriosis causa meningitis, encefalitis, septicemias y abortos (23, 24). *L. monocytogenes* afecta con mayor frecuencia a grupos poblacionales inmunosuprimidos, niños, mujeres embarazadas, ancianos, personas adictas al alcohol, etc., (6, 20).

Dentro del género *Listeria* las especies *L. innocua* y *L. monocytogenes* comparten similitudes genéticas, bioquímicas y nichos ecológicos similares; están presentes en el medio ambiente y puede llegar a proliferar en condiciones extremas tales como pH ácido, bajas temperaturas y alta concentración de sal; por otra parte la capacidad de crecimiento

a temperaturas entre -1°C y 45°C aumenta el riesgo de contaminación en productos lácteos, carnes, mariscos y alimentos que necesitan refrigeración. *Listeria* además, puede sobrevivir a largos períodos de secado y congelación; caracterizándose por su capacidad de resistencia y por la distribución tanto en suelo, como en aguas, drenajes, vegetación, heces de animales, y en instalaciones de procesamiento de alimentos (7, 15).

Debido a que *L. innocua* es más resistente a los procesos de desinfección que *L. monocytogenes* (2) es más fácilmente detectable en alimentos procesados; y debido a su mayor velocidad de crecimiento puede encontrarse en mayores concentraciones, por lo cual la presencia de *L. innocua* termina enmascarando la presencia de *L. monocytogenes*; lo que impide en ocasiones la diferenciación de las dos especies por métodos microbiológicos (19).

*L. innocua* juega un papel importante ya que su presencia indica procesos deficientes en limpieza y desinfección causados por fallas en las plantas de fabricación que usualmente no cumplen con las regulaciones existentes (2), su presencia también funciona como indicador biológico de la posible contaminación de alimentos con *L. monocytogenes* los brotes con *L. monocytogenes*, además, de tener consecuencias en salud pública tienen también consecuencias económicas importantes (2), por esto es primordial que la industria alimentaria tenga un control sobre estos patógenos en la cadena alimentaria y en el entorno de la planta.

#### **4.0 Marco teórico**

*L. innocua*, es una especie del género *Listeria* no patógena, no hemolítica, bacilo Gram, positivo, asporógeno, psicrótrofo, que ha sido aislado a partir de diversas fuentes,

ambientales, alimentos y plantas de procesamiento de alimentos. *L. innocua* es utilizado en la industria como organismo modelo para el patógeno *L. monocytogenes* (26, 27); siendo de particular importancia debido a que es la especie que está genéticamente más relacionada con *L. monocytogenes*. El genoma de estas dos especies presentan un alto grado de homología (99,2%) en la secuencia RNA ribosomal 16S (rRNA 16S), siendo las de mayor cercanía taxonómica (28,29). *L. monocytogenes* presenta un cromosoma circular de 2.944.528pb con un promedio de G+C de 39%, mientras que *L. innocua* posee un cromosoma circular de 3.011.209pb con un promedio de G+C de 37% (6). Tanto *L. monocytogenes* como *L. innocua* suelen compartir los mismos nichos ecológicos. Usualmente la presencia de *L. innocua* funciona como indicador y modelo del patógeno *L. monocytogenes*, en diferentes artículos *L. innocua* ha sido utilizada para evaluar procesos de desinfección, lo que ha permitido extrapolar los resultados a *L. monocytogenes* en la industria de alimentos (14,18, 30,31).

Se sabe que *L. innocua* no presenta los genes de virulencia descritos en especies como *L. monocytogenes* o *L. ivanovii*. En el caso de *L. monocytogenes* estas posee seis factores de virulencia responsables de su patogenicidad, localizados en la isla de patogenicidad LIPI-1; dentro de estos se encuentra el gen *prfA* que codifica para el regulador de la mayoría de genes de virulencia, *hly* el cual codifica listerioisina O que le permite escapar de la vesícula fagocítica y pasar de una célula a otra; siendo este el factor de virulencia esencial, también se encuentran los genes *plcA* y *plcB* que codifican para dos fosfolipasas, las cuales facilitan la lisis de las membranas de la célula del hospedero. La enzima codificada por *plcB* es secretada como un pro-péptido inactivo es procesada extracelularmente por la metaloproteasa codificada por el gen *mpl*; y ActA factor responsable de la movilidad y la propagación célula-célula, siendo de esta manera igual de indispensable que *hly* para la patogenicidad; sin embargo, un grupo de genes necesarios para la virulencia no se localizan dentro del cluster de patogenicidad; estos genes incluyen las internalinas inIA y inIB que facilitan la entrada de la bacteria a las células eucariotas, existen también otras

islas de patogenicidad presentes en *Listeria* que codifican para varias internalinas y hemolisinas para la especie *ivanovii* (Lipi-2) y para un subconjunto de las cepas del linaje I (Lipi-3). En este linaje se encuentra la listeriolisina S (factor hemolítico y citotóxico) que resulta ser responsable del aumento de virulencia de las cepas de este linaje (28,32). Este cluster de patogenicidad está completamente ausente en especies como *L. innocua*, *L. welshimeri* y *L. seeligeri*, (Figura 1), (33). En el caso de *L. innocua* es de particular importancia debido a la similitud de las dos especies, según se reporta, la ausencia de este grupo de genes en *L. innocua* es debido a la evolución del género; para las especies patogénicas este grupo de genes de virulencia confiere funciones altamente especializadas en parasitismo intracelular que pareciese ser innecesarias fuera del hospedero tal como se muestra por la frecuencia de aislamiento de *L. innocua* en el medio ambiente (13). Según los reportes la ausencia de los genes de virulencia puede ser ventajosa debido a que disminuye la carga fisiológica que representa la expresión de esta isla de patogenicidad; de hecho muchos estudios muestran el predominio de *L. innocua* sobre *L. monocytogenes* en muestras de alimentos crudos y en el medio ambiente; indicando así que las especies no patógenas pueden adaptarse mejor y sobrevivir exitosamente en el medio ambiente (13).

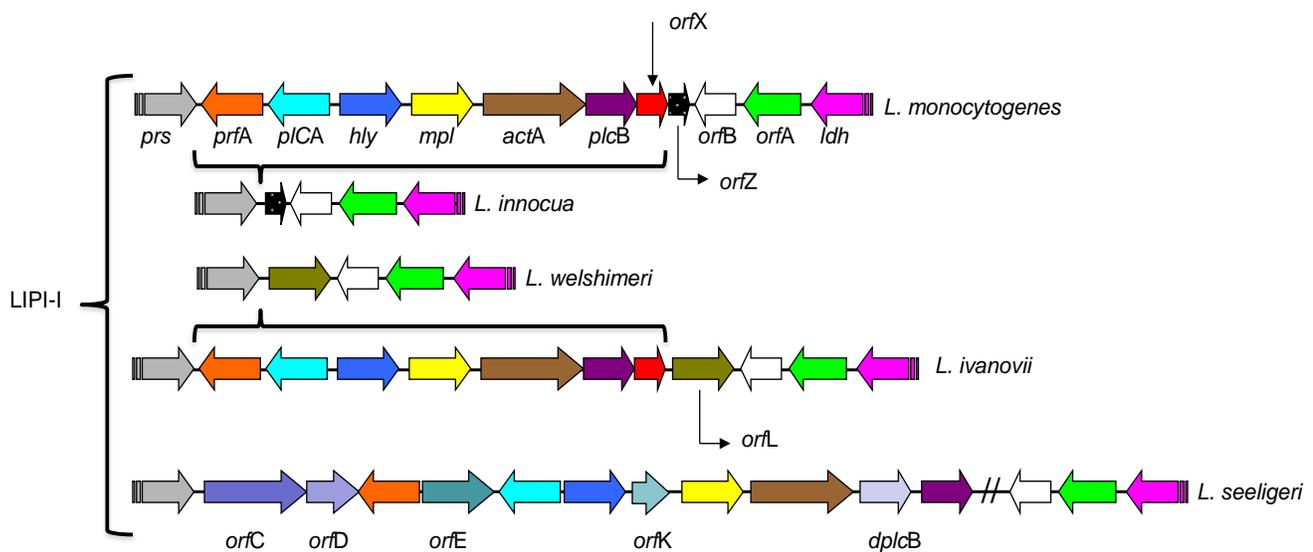


Figura 1. Estructura genética de la región cromosómica de la agrupación de genes de virulencia (LIPI 1) en algunas especies de *Listeria*. Tomado y modificado de (34).

*L. innocua* a pesar de no ser patógena puede aislarse de alimentos y plantas de procesamiento de alimentos junto con *L. monocytogenes*; *L. innocua* se distingue fenotípicamente de *L. monocytogenes*, por su resultado negativo frente al test de CAMP, por la incapacidad para realizar  $\beta$ -hemólisis o por no tener la actividad fosfatidilinositol fosfolipasa C (E.C 3.1.4.11); esto último puede ser detectado “en teoría” a través del uso de medios cromógenos como el Ottaviani-Agosti (35).

La detección de *L. monocytogenes* por lo general, implica procedimientos de enriquecimiento selectivo debido a la microbiota acompañante presente en los alimentos, y a las bajas concentraciones de *Listeria* en las muestras de alimentos (12). Según las recomendaciones de la norma ISO11290 (2004) se utiliza el medio Ottaviani-Agosti ya que permite la detección y enumeración de *L. monocytogenes* en alimentos. Inicialmente se le da lugar a un primer enriquecimiento en caldo Fraser durante 24h a 30°C, seguidamente se toma una alícuota y se aislar en agar Ottaviani-Agosti (medio selectivo para *Listeria* Chromocult, Merck), posteriormente se realiza un segundo enriquecimiento en 10 ml de caldo Fraser al cual se inoculan 0,1 ml del primer enriquecimiento y se incuba a 35°C por 48h, luego se toma una muestra y se extiende en agar Ottaviani-Agosti colonias aisladas. Con estos resultados se puede realizar la interpretación. El medio selectivo Ottaviani-Agosti debido a la adición de antibióticos permite la reducción en el crecimiento de la mayoría de los contaminantes Gram positivos y Gram negativos así como de levaduras y hongos; en este medio *L. innocua* y *L. monocytogenes* muestran un crecimiento sin inhibiciones, la adición del 5-bromo-4-chloro-3-indolyl- $\beta$ -D-glucopiranosido hace que sea posible diferenciar entre  $\beta$ -D glucosidasa (E.C. 3.2.1.21) positivo y  $\beta$ -D glucosidasa negativo. El género *Listeria* es  $\beta$ -D glucosidasa positivo y crece en forma de colonias verde-azules, para la detección de *L.*

*monocytogenes* se añade al medio L- $\alpha$ -fosfatidilinositol, *L. monocytogenes* tiene la enzima fosfatidilinositol fosfolipasa C (PI-PLC) (factor de virulencia), la actividad de esta fosfolipasa resulta en la formación de halos opacos alrededor de las colonias de *L. monocytogenes*, por lo que todas las colonias de color azul-verde y con halo opaco se consideran sospechosas para *L. monocytogenes*; debido a que *L. innocua* no presenta la actividad fosfatidilinositol fosfolipasa C (PI-PLC) las colonias representativas de esta especie deben ser azul-verdosa sin halo alrededor (36); sin embargo, después de utilizar este medio para detectar *L. monocytogenes* muchos de los resultados dan falsos negativos y falsos positivos posiblemente debido a la presencia de *L. innocua* y *L. monocytogenes* co-existiendo en una misma colonia.

Según diferentes reportes *L. innocua* puede enmascarar la presencia de *L. monocytogenes* inicialmente por la rápida ventaja en el crecimiento de esta, también debido a las interacciones inhibitorias entre especies que se han atribuido a la producción de bacteriocinas, por otro lado otros autores han sugerido que *L. innocua* puede constituir una reserva de resistencia a antibióticos y desinfectantes transferibles a *L. monocytogenes* (17, 19).

Debido a las estrechas semejanzas morfológicas y bioquímicas de *L. monocytogenes* con *L. innocua* la disponibilidad de pruebas de diagnóstico rápidas y específicas para distinguir *L. monocytogenes* de otras especies como *L. innocua* son imprescindibles (7). Los métodos microbiológicos para la identificación de *L. monocytogenes* toman aproximadamente 15 días y se requieren etapas de enriquecimiento que consumen mucho tiempo por lo cual se hace indispensable el desarrollo de métodos más rápidos que sustituyan las técnicas tradicionales y logren discriminar entre especies, como lo son las técnicas moleculares como la Reacción en Cadena de la Polimerasa PCR (*Polymerase Chain Reaction*), (7) desarrollada por Kary Mullis en 1983 y que permite la identificación y detección rápida y sensible de microorganismos en diferentes matrices, mediante la amplificación de fragmentos de genes específicos. El objetivo de la técnica es obtener

muchas copias de un fragmento de ADN molde, el ciclo de reacción consta de tres pasos: (i) desnaturalización del ADN de doble hebra (ii) alineación de los “*primers*” con las hebras sencillas de ADN; (iii) extensión de los “*primers*” con la DNA-polimerasa (DNA-polimerasa termoestable). Estos tres pasos constituyen un ciclo de la PCR (37).

La técnica de PCR ha demostrado ser rápida y precisa en comparación a los métodos tradicionales, la disponibilidad de un ensayo de PCR basado en un gen presente únicamente en *L. innocua* es útil como método de confirmación ya que las técnicas tradicionales no permiten la diferenciación rápida y clara entre especies. Según se reporta los resultados de los ensayos de PCR basados en un gen común entre especies pueden llegar a ser confusos en estudios ambientales y epidemiológicos, en los cuales múltiples especies de *Listeria* están presentes por lo cual la competencia se produciría entre género-especies-“*primers*” específicos, de esta manera múltiples productos se generarían (35).

El genoma de *L. innocua* y *L. monocytogenes* contienen una proporción relativamente alta de reguladores transcripcionales, esta alta proporción de reguladores transcripcionales refleja la habilidad del género *Listeria* a sobrevivir y crecer en un amplio rango de ambientes y condiciones, según se ha documentado existe un gen regulador transcripcional el cual se presenta solamente en la especie *L. innocua*; este gen se denomina *lin0464* y se encuentra localizado entre las secuencias de nucleótidos 28.719 a 29.715 del genoma de *L. innocua*, codificando para una proteína similar a un regulador transcripcional; estos “*primers*” de oligonucleótidos (*lin0464F*: 5P-CGC ATT TAT CGC CAA AAC TC-3P ) y (*lin0464R*: 5P-TCG TGA CAT AGA CGC GAT TG-3P) son complementarios a *lin0464* en las posiciones de nucleótidos 28847-28866 y 29595-29576 respectivamente, están diseñados para amplificar un fragmento de 749pb, el gen *lin0464* está altamente conservado en *L. innocua* y tiene una gran especificidad-especie lo que sugiere que regula una función conservada en esta especie (35).

## 5.0 Objetivos

### 5.1 Objetivo general

Estandarizar la PCR para la identificación de aislamientos de *L. innocua* a partir de cultivo microbiano, diferenciándolos de *L. monocytogenes*.

### 5.2 Objetivos específicos

1. Seleccionar los “primers” para la identificación de *L. innocua* sin interferencia de *L. monocytogenes*
2. Estandarizar la técnica de PCR para *L. innocua*
3. Determinar la proporción de *L. innocua* en la primera etapa de muestreo realizado dentro del marco del proyecto “Diseño de un plan integral para reducir la prevalencia de *Salmonella* spp., y *L. monocytogenes* en plantas de beneficio, desposte y puntos de venta en la cadena cárnica porcina”.

## 6.0 Materiales y métodos

### 6.1 Microorganismos empleados

Se utilizaron varias cepas de *Listeria* spp., como control de las amplificaciones, *L. innocua* ATCC 33090 (1 aislamiento), *L. monocytogenes* ATCC 19115 (1 aislamiento), *Salmonella* Thyphimurium (1 aislamiento), *Staphylococcus aureus* (1 aislamiento), previamente conservadas a -70°C en la Colección de Microorganismos del Departamento de Microbiología de la Facultad de Ciencias de la Pontificia Universidad Javeriana (Bogotá).

Se emplearon 110 aislamientos sospechosos de *Listeria monocytogenes* o de *Listeria* spp., después de haber sido caracterizados bioquímicamente y crecidos en agar Ottaviani-

Agosti. Estos aislamientos provenían de las muestras tomadas en la primera etapa de muestreo del proyecto en ejecución “Diseño de un plan integral para reducir la prevalencia de *Salmonella* spp., y *Listeria monocytogenes* en plantas de beneficio, desposte y puntos de venta en la cadena cárnica porcina”.

## **6.2 Extracción del ADN**

Todos los aislamientos se cultivaron en caldo BHI durante 12 horas a 37°C y 250 rpm, 1ml del cultivo se centrifugó por 2 minutos a 15000 gravedades, se eliminó el sobrenadante; una vez obtenidas las células se utilizó el Kit de extracción de PROMEGA (A1125) para la extracción de DNAG; siguiendo el protocolo para bacterias Gram positivas y bacterias Gram negativas según el tipo de microorganismo. (38)

## **6.3 PCR para la identificación de *L. monocytogenes***

El DNAG de todos los aislamientos presuntivos del género *Listeria* (110 aislamientos, 100%) se sometieron a la amplificación para la identificación de género *Listeria* y la especie *monocytogenes*. Para la reacción de PCR-Múltiple se emplearon los iniciadores L1 (CTC CAT AAA GGT GAC CCT), U1 (CAG CMG CCG CGG TAA TWC), LF(CAA ACG TTA ACA ACG CAG TA) y LR (TCC AGA GTG ATC GAT GTT AA), (39) que permite obtener dos fragmentos de talla de 938pb y 750pb como productos de la amplificación para género y especie respectivamente, el volumen final de la reacción fue 35µl conteniendo tampón de PCR 1X, 2.5 mM de MgCl<sub>2</sub>, 0.2mM de cada dNTP, 20 pmol de cada iniciador y 2U de TaqADNpol (Invitrogen), más ~120 ng ADN. Se empleó un termociclador BIORAD Gene Cycler™ programado de la siguiente manera: 1 minuto a 95°C, seguidos de 40 ciclos compuestos por 30s a 94°C, 20s a 51°C, 30s a 72°C y un paso final de extensión de 8 min., a 72°C (40).

## **6.4 PCR para la identificación de *L. innocua***

El DNAg de todos los aislamientos que sólo generaron la banda de 938pb en la PCR-Múltiple para la amplificación de *L. monocytogenes* y el DNAg de las cepas control fueron enfrentados a los “primers” para la identificación de *L. innocua*. Para la reacción de PCR se emplearon los iniciadores *Lin0464-F* (CGC ATT TAT CGC CAA AAC TC) *Lin0464-R* (TCG TGA CAT AGA CCG CGA TTG), que generan un producto de la amplificación una talla de 749pb, los “primers” fueron previamente seleccionados después de una revisión bibliográfica y se les realizó un BLAST para observar si no presentaban interferentes con otros microorganismos, posteriormente se enviaron a sintetizar. Para esta PCR se realizaron 6 réplicas. El volumen final de la reacción fue de 25µl conteniendo 10 mM Tris-HCl, 50 mM KCl, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub> 0.1 mM de cada dNTP, 1.2µM de cada iniciador, 1 U de TaqADNpol (invitrogen), y 2.5 ~ng de DNA. Se empleó un termociclador BIORAD Gene Cycler™ programado de la siguiente manera: Desnaturalización: 94°C por 5min, seguidos de 35 ciclos compuestos por 94°C por 30seg, 60°C por 30 seg, 72°C por 30seg. Extensión final: 72°C por 5 min (7).

#### **6.5 Demostración de la especificidad de los “primers” empleados en la identificación de *L. innocua* por PCR.**

Para la especificidad de los “primers” empleados en la identificación de *L. innocua*, se utilizó el DNAg de cepas *L. monocytogenes*; *L. ivanovii*, *L. welshimeri*, *S. Thyphimurium* y *S. aureus* y se enfrentaron a los “primers” para la identificación de *L. innocua*.

#### **6.6 Determinación del límite de detección de la PCR para la identificación de *L. innocua***

El límite de detección de la PCR se determinó usando el DNA de la cepa de *L. innocua* ATCC 33090 el cual fue diluido a diferentes concentraciones (70ng/µL, 30 ng/µL, 70pg/µL, 66x10<sup>-3</sup>ng/µL, 70fg/µL, 1fg/µL) y sometido a la PCR para la identificación de *L. innocua*.

## 6.7 Electroforesis

Los ADN obtenidos en las extracciones y los productos de PCR se visualizaron en geles de agarosa al 1% (p/v) en tampón TAE 1X (40 mM Tris-acetato, 1 mM EDTA pH 8 ± 0.2), teñidos con 0.3 µg/ml de bromuro de etidio, separado entre 80 y 120V durante 1 h y fotografiados bajo luz ultravioleta. Como marcador de talla molecular se empleó el 100 bp Ladder (invitrogen).

## 6.8 Determinación de la proporción inicial de *L. innocua*

Para determinar la proporción de *L. innocua* en la primera etapa de muestreo realizado dentro del marco del proyecto “Diseño de un plan integral para reducir la prevalencia de *Salmonella* spp., y *Listeria monocytogenes* en plantas de beneficio, desposte y puntos de venta en la cadena cárnica porcina” se empleó la ecuación I para la proporción.

$$(P = \frac{a}{a+b} * 100) \quad (I),(42)$$

*P*: proporción

*a*: números de casos

*a+b*: número de muestra

## 7.0 Resultados

### 7.1 Selección de los “primers”

En la revisión bibliográfica se analizaron diferentes artículos, los iniciadores seleccionados fueron *lin0464F* y *lin0464R* del artículo “*Simultaneous detection of Listeria isolated from meat processed food using multiplex PCR (7)*” que permiten la obtención de un producto de PCR de 749pb, correspondiente a la amplificación de un fragmento del gen *lin0464*. Las secuencias de los “primers” fueron sometidas a un análisis por BLAST (Basic Local

Alignment Search Tool) (Figura 2) el cual demostró y confirmó una especificidad del 100% para *L. innocua* sin interferencia con otra especie del género *Listeria*.

Listeria innocua Clip11262, complete genome  
 Sequence ID: [ref|NC\\_003212.1|](#) Length: 3011208 Number of Matches: 2

Range 1: 484847 to 484866 [GenBank](#) [Graphics](#) ▼ Next Match ▲ Previous Match

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
40.1 bits(20)	0.100	20/20(100%)	0/20(0%)	Plus/Plus

Features: [hypothetical protein](#)

```

Query 1      CGCATTATCGCCAAAAC TC 20
            |||
Sbjct 484847 CGCATTATCGCCAAAAC TC 484866
  
```

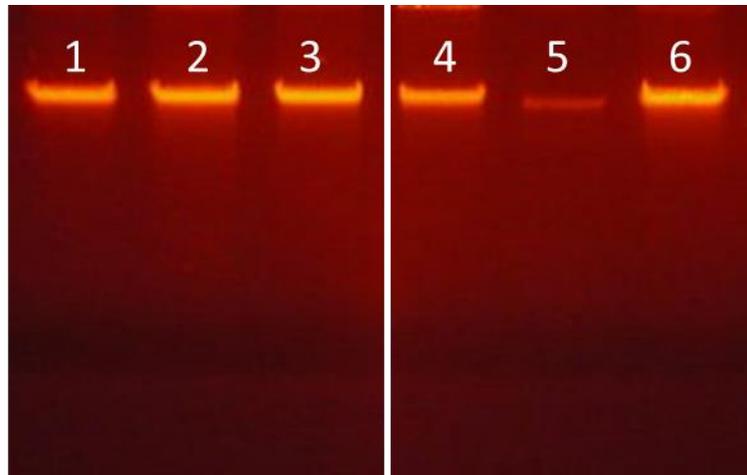
Range 2: 1737558 to 1737571 [GenBank](#) [Graphics](#) ▼ Next Match ▲ Previous Match ▲ First Match

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident
<a href="#">Listeria innocua Clip11262, complete genome</a>	40.1	68.4	68%	0.100	100%
<a href="#">Dactylococcopsis salina PCC 8305 chromosome, complete genome</a>	38.2	128	51%	0.39	100%
<a href="#">Burkholderia xenovorans LB400 chromosome 1, complete sequence</a>	38.2	98.6	56%	0.39	96%
<a href="#">Gluconacetobacter hansenii ATCC 23769 chromosome, whole genome shotgun sequence</a>	36.2	36.2	43%	1.6	100%
<a href="#">Campylobacter sp. 03-427, complete genome</a>	34.2	62.4	43%	6.1	100%
<a href="#">Desulfocapsa sulfexigens DSM 10523, complete genome</a>	34.2	92.7	46%	6.1	100%
<a href="#">Campylobacter curvus 525.92 chromosome, complete genome</a>	34.2	62.4	41%	6.1	100%
<a href="#">Shewanella loihica PV-4 chromosome, complete genome</a>	34.2	34.2	41%	6.1	100%
<a href="#">Actinobacillus pleuropneumoniae serovar 5b str. L20 chromosome, complete genome</a>	34.2	94.6	60%	6.1	100%
<a href="#">Helicobacter acinonychis str. Sheeba chromosome, complete genome</a>	34.2	90.7	46%	6.1	100%
<a href="#">Burkholderia xenovorans LB400 chromosome 2, complete sequence</a>	34.2	64.4	97%	6.1	100%
<a href="#">Frankia sp. Ccl3 chromosome, complete genome</a>	34.2	34.2	41%	6.1	100%

**Figura 2.** Blast de las secuencias correspondientes a los “primers” *lin0464F/lin0464R*

## 7.2 Extracción de ADN

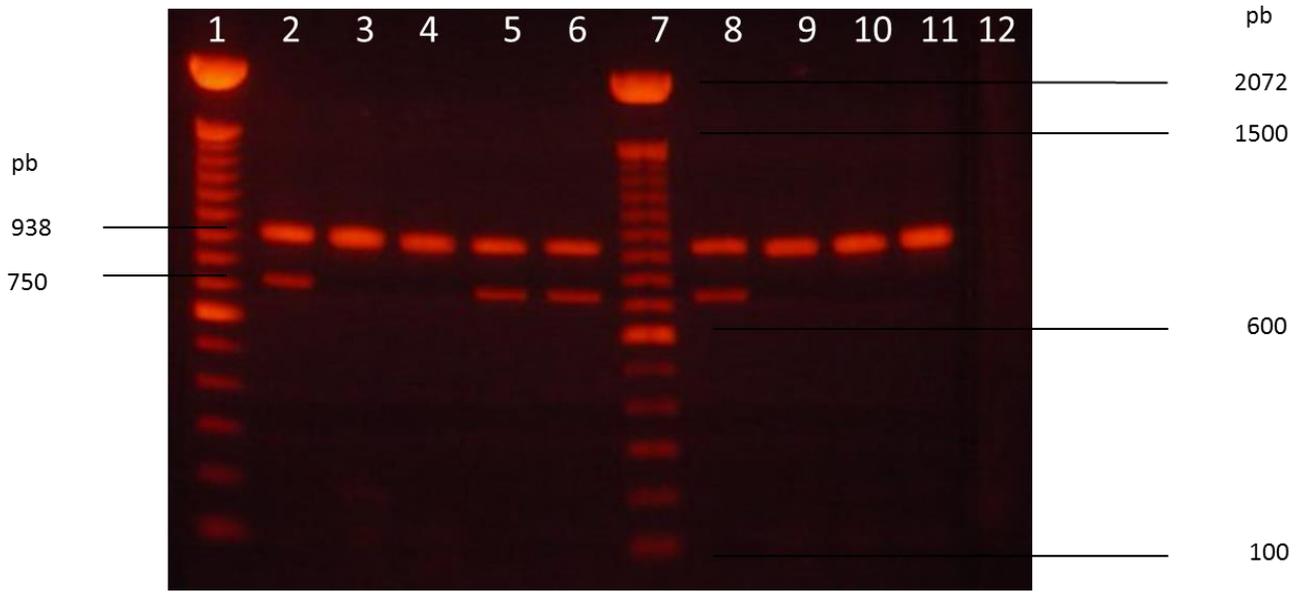
La figura 3 muestra los resultados de la extracción de ADN de los aislamientos, la concentración del ADN extraído se determinó a través de un NanoDrop (Thermo scientific). Las concentraciones de los aislamientos oscilaron entre 1.78 y 336.38 ng/μl.



**Figura 3.** Gel de electroforesis de ADN (agarosa al 1.5% (p/v) en tampón TAE IX). Carril 1: resultado de la extracción de DNA de *L. innocua* ATCC 33090. Carril 2: resultado de la extracción de DNA de *L. monocytogenes* ATCC 19115. Carril 3: resultado de la extracción de DNA de *L. ivanovii* ATCC 19119. Carril 4: resultado de la extracción de DNA de *Salmonella* Thyphimurium. Carril 5: resultado de la extracción de DNA de *Staphylococcus aureus*. Carril 6: resultado de la extracción de DNA aislamiento 1.

### 7.3 PCR para identificación de *L. monocytogenes*

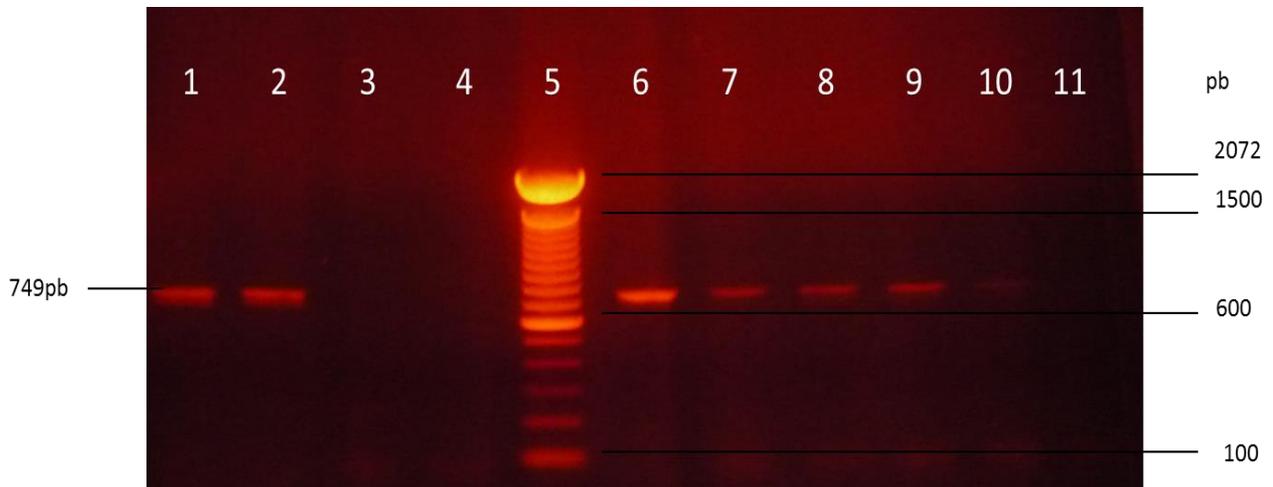
La PCR-Múltiple para la identificación del género *Listeria* y la especie *monocytogenes* permitió diferenciar entre los aislamientos de *L. monocytogenes* y los de *Listeria* spp., en función de las bandas que amplificaron. *L. innocua* ATCC 33090 amplificó únicamente la banda de 938pb; por otro lado *L. monocytogenes* ATCC 19115 amplificó ambas bandas de 938pb y 750pb específicas para género y especie. De los 110 (100%) aislamientos presuntivos para *L. monocytogenes* sólo 35(31.81%) amplificaron las dos bandas (938 y 7590pb), lo cual los identificó molecularmente como aislamientos de *L. monocytogenes*, Los 75(68.18%) aislamientos restantes identificados como *Listeria* spp., se sometieron posteriormente a la PCR para para identificación de *L. innocua*, (**Figura 4**).



**Figura 4.** Gel de electroforesis de ADN (agarosa al 1.5% (p/v) en tampón TAE IX). Carril 1: Marcador de taller molecular (Invitrogen). Carril 2: resultado de la extracción de DNA de *L. monocytogenes*. ATCC 19115. Carril 3: resultado de la extracción de DNA de *L. innocua* ATCC33090. Carril 4: resultado de la extracción de DNA de *L. ivanovii* ATCC 19119. Carril 5: resultado de la extracción de DNA aislamiento 1. Carril 6: resultado de la extracción de DNA aislamiento 2. Carril 7: Marcador de taller molecular (Invitrogen). Carril 8: resultado de la extracción de DNA aislamiento 3. Carril 9: resultado de la extracción de DNA aislamiento 4. Carril 10: resultado de la extracción de DNA aislamiento 5. Carril 11: resultado de la extracción de DNA aislamiento 6. Carril 12: Blanco de PCR.

#### 7.4 Estandarización de la PCR para identificación de *L. innocua*

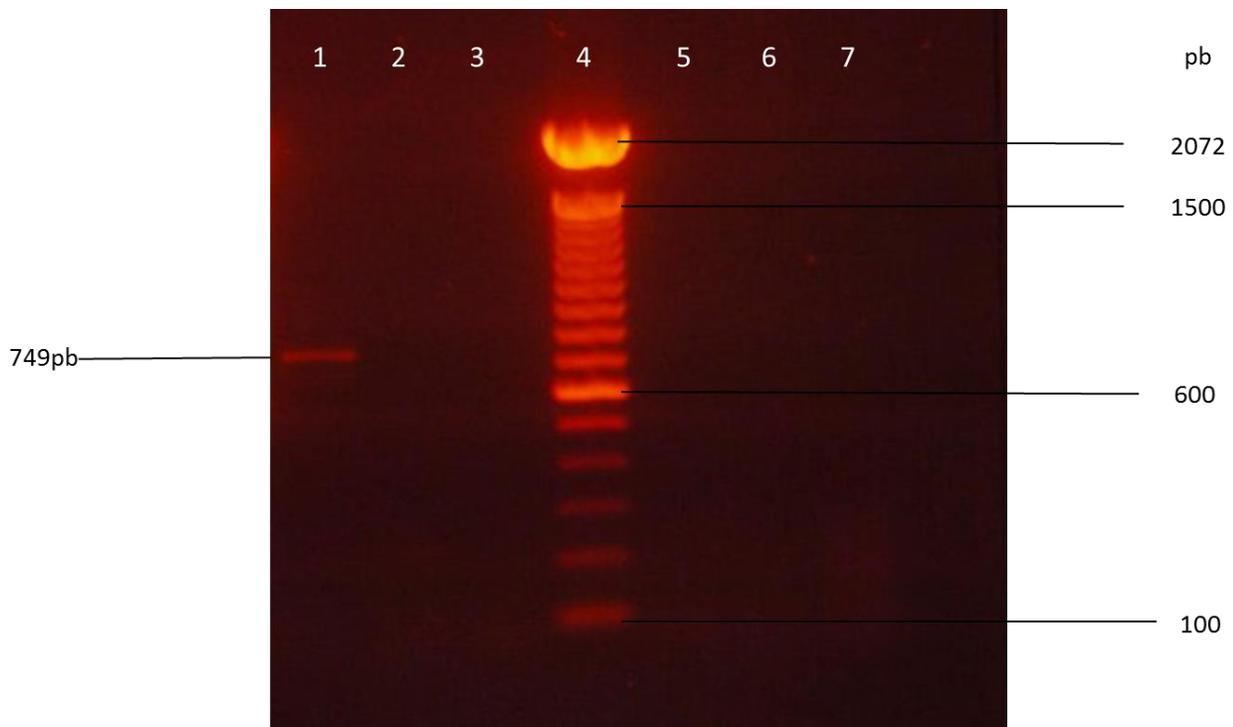
La PCR correspondiente a la identificación de *L. innocua* generó una banda de 749pb al enfrenar los “primers” al DNA de la cepa *L. innocua* ATCC 33090 sin amplificaciones inespecíficas y sin interferencia con *L. monocytogenes* ATCC 19115 (**Figura 5**).



**Figura 5.** Gel de electroforesis de ADN (agarosa al 1.5% (p/v) en tampón TAE IX). Carril1: resultado de la extracción de DNA de *L. innocua* ATCC 33090. Carril 2: resultado de la extracción de DNA de *L. innocua* ATCC 33090. Carril 3: resultado de la extracción de DNA de *L. monocytogenes* ATCC 19115. Carril 4: resultado de la extracción de DNA de *L. ivanovii* ATCC 19119. Carril 5: Marcador de talla molecular (Invitrogen). Carril 6: resultado de la extracción de DNA aislamiento 1. Carril 7: resultado de la extracción de DNA aislamiento 2. Carril 8: resultado de la extracción de DNA aislamiento 3. Carril 9: resultado de la extracción de DNA aislamiento 4. Carril 10: resultado de la extracción de DNA aislamiento 5. Carril 11: Blanco de la PCR.

### 7.5 Especificidad de los “primers”

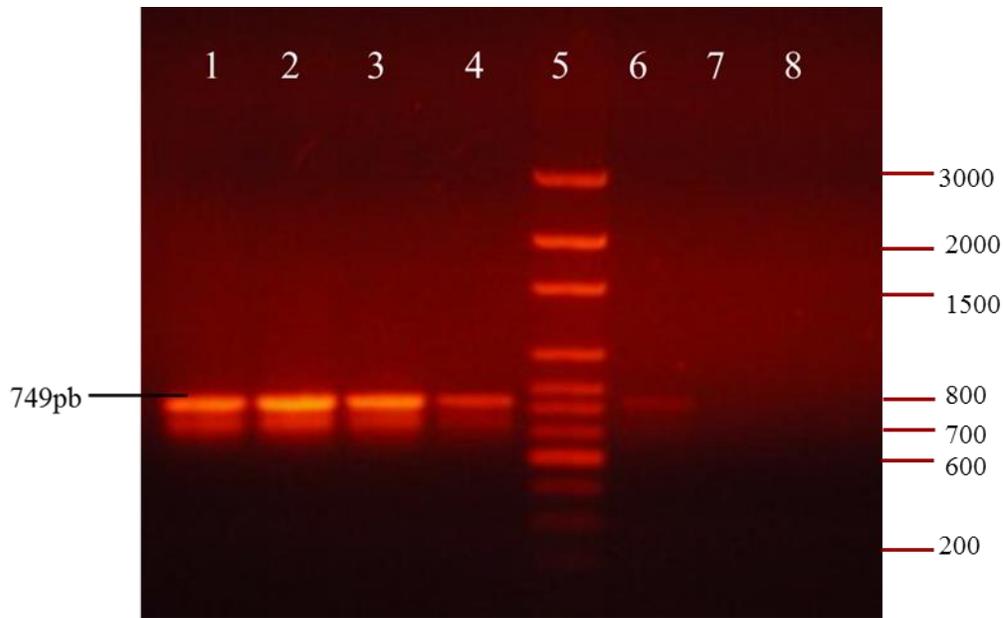
De las diferentes cepas control empleadas sólo *L. innocua* generó la banda esperada de 749pb (**Figura 6**).



**Figura 6.** Gel de electroforesis de ADN (agarosa al 1.5% (p/v) en tampón TAE IX). Carril 1 : resultado de la extracción de DNA de *L. innocua* ATCC 33090. Carril 2: resultado de la extracción de DNA de *L. monocytogenes* ATCC 19115. Carril 3: resultado de la extracción de DNA de *L. ivanovii* ATCC 19119. Carril 4: Marcador de talla molecular (Invitrogen). Carril 5: resultado de la extracción de DNA de *Salmonella* Thyphimurium. Carril 6: resultado de la extracción de DNA de *Staphyococcus aureus*. Carril 7: Blanco de la PCR.

### 7.6 Determinación del límite de detección

El límite de detección de la PCR para identificación de *L. innocua* ATCC 33090 fue de 70fg/ $\mu$ L (**Figura 7**).



**Figura 7.** Gel de electroforesis de ADN (agarosa al 1.5% (p/v) en tampón TAE IX). Carril 1: DNA de *L. innocua* ATCC 33090 (70ng/μL). Carril 2 DNA de *L. innocua* ATCC 33090 (30 ng/μL). Carril 3: DNA de *L. innocua* ATCC 33090 (70pg/μL). Carril 4: DNA de *L. innocua* ATCC 33090 (66x10<sup>-3</sup>ng/μL). Carril 5: Marcador de talla molecular Axigen 100pb Ladder. Carril 6: DNA de *L. innocua* ATCC 33090 (70fg/μL). Carril 7: DNA de *L. innocua* ATCC 33090 (1fg/μL). Carril 8: Blanco de la PCR.

### 7.7 Determinación de la proporción inicial de *L. innocua*

De los 110 aislamientos provenientes del proyecto se encontró que 62 (56.4%) aislamientos pertenecían a la especie *L. innocua*, 35 (31.81%) a *L. monocytogenes* y 13(11.81%) a *Listeria* spp.

## 8.0 Discusión

### 8.1 Selección de los “primers”

La selección de los “primers” se basó en la revisión bibliográfica de varios artículos con el fin de escoger los que tuvieran el mejor perfil para la finalidad del trabajo. Se escogieron los “primers” *lin0464F/lin0464R* que amplifican para el *gen lin 0464* en una banda de 749pb, según Jio *et al.*, 2013 y Liu *et al.*, 2003 para la confirmación de la especificidad de estos “primers” se utilizó ADN de varias bacterias que pueden coexistir con especies del género *Listeria* en muestras de alimentos, factor importante para la selección de los “primers”, ya que presentaron una especificidad del 100% (7,30) en comparación con otros “primers” analizados en diferentes artículos (43, 44). Los cuales utilizaron menos géneros bacterianos o ningún género bacteriano como control.

Tras realizar el análisis de las secuencias en la base de datos BLASTn (Figura 2) se corroboró la especificidad (100%) de las secuencias con *L. innocua* sin interferencia con otras especies del género *Listeria* y sin interferencia con microorganismos comúnmente presentes en alimentos tales como *Escherichia coli*, *Bacillus cereus*, *Salmonella* spp, *Shigella* spp, *Staphylococcus aureus*, *Vibrio cholerae*, *Yersinia enterocolitica*, *Clostridium perfringens*, *Aeromonas hydrophila*, *Enterococcus faecalis*, *Klebsiella pneumoniae* (7,35).

Por otra parte según Liu *et al.*, 2003 el gen *lin0464* que codifica para un regulador transcripcional en *Listeria innocua* resultó altamente específico para la especie por lo que sugiere que el gen regula una función conservada en *L. innocua*, estas características propias del gen serían útiles debido a que realizar una PCR basada en un gen presente únicamente en *L. innocua* permitiría una confirmación de la especie y una clara diferenciación con *L. monocytogenes* y otras especies del género *Listeria*. Estos resultados son importante porque los ensayos de PCR basados en un gen común entre especies como el *iap*, utilizado en varios de los artículos consultados (43,44) pueden resultar

confusos en estudios ambientales y epidemiológicos en donde múltiples especies de *Listeria* están presentes y la competencia se produciría entre género, especies y “primers” arrojando varios productos de amplificación y ocasionando resultados no confiables.

Razón por la cual se seleccionaron los “primers” *lin0464F/lin0464R* para la estandarización de la técnica con el fin de identificar sin interferencia a *L. innocua*.

### **8.2 Estandarización de la PCR para identificación de *L. innocua***

*L. innocua* ATCC33090 y *L. ivanovii* ATCC19119 fueron identificadas como *Listeria* spp., en la PCR-Múltiple para la identificación del género *Listeria* y la especie *monocytogenes*, ya que amplificaron únicamente la banda de 938pb típica del género y producida por la hibridación de los iniciadores LU1/U1 con una secuencia específica de la región codificante del rDNA 16S del género *Listeria* (39); mientras que *L. monocytogenes* amplificó también la banda de 750pb (identificación de la especie), (Figura 4), coincidiendo con lo reportado por Poutou *et al.*, 2005. Con estos resultados se procedió a realizar la PCR para identificación de *L. innocua*.

La PCR se realizó, siguiendo exactamente las condiciones descritas por Jio *et al.*, 2013. No fue necesario hacer ajustes en la concentración de “primers”, magnesio, tiempo de duración de cada paso o en el número de ciclos, debido a que la PCR reprodujo los resultados esperados y descritos por los autores (7); revelando una banda nítida de 749pb que permitió la identificación de la cepa utilizada como control (*L. innocua* ATCC 33090), sin interferencia con *L. monocytogenes* ATCC 19115 (Figura 4). El límite de detección fue de 70fg/ $\mu$ L indicando que la técnica es altamente sensible.

### **8.3 Especificidad de los “primers”**

Al realizar la PCR para determinar la especificidad del par de “primers” escogidos la electroforesis reveló solamente una banda de 749pb para *L. innocua* ATCC 33090

producida por la hibridación de los “primers” *lin0464F/lin0464R* con una secuencia del gen *lin0464* revelando así la especificidad de la técnica para detectar *L. innocua* (positivo) como se esperaba y como se reportaba (7,35), coincidiendo con los resultados del BLAST (Figura 4).

*L. monocytogenes* ATCC 19115 y *L. ivanovii* ATCC 19119 no amplificaron la banda de 749pb y tampoco presentaron amplificaciones inespecíficas de esta manera comprobando la especificidad de los “primers” respecto a las dos especies patógenas del género *Listeria*, y coincidiendo con lo anteriormente dicho en los artículos que reportan (7, 35). Los otros dos microorganismos *S. Thiphymurium* y *S. aures* tampoco presentaron amplificación, lo cual demuestra nuevamente la especificidad – especie de los “primers” *lin0464F/lin0464R*. Esto es importante para la industria de alimentos y para los laboratorios de microbiología de alimentos debido a que otros microorganismos usualmente presentes en las muestras no van a interferir en la detección de *L. innocua*, la especificidad de los “primers” también ayudó a discriminar entre especies como *L. monocytogenes* y *L. innocua* quien son tan estrechamente similares bioquímicamente y molecularmente (17,18).

#### **8.4 Determinación del límite de detección**

El límite de detección de la técnica fue de 70fg/μL (Figura 6) (mínima cantidad de ADN que detectó la PCR). Según lo reportado por Liu *et al.*, 2003 el límite de detección de esta PCR usando los mismos “primers” *lin 0464F/ lin0464R* fue de 10 pg/μL. La técnica de PCR estandarizada en este trabajo de grado para la identificación de *L. innocua* demostró ser más sensible.

#### **8.5 Determinación de la proporción inicial de *L. innocua***

Dentro de marco del proyecto “Diseño de un plan integral para reducir la prevalencia de *Salmonella* spp., y *Listeria monocytogenes* en plantas de beneficio, desposte y puntos de venta en la cadena cárnica porcina” financiado por Colciencias y Asoporcultores, se obtuvo en el primer muestreo 110 aislamientos los cuales fueron presuntivos para *Listeria*

spp, 35 (31.81%) de estos aislamientos se identificaron como *L. monocytogenes*, 75(68.18%) como *Listeria* spp., a estos 75 aislamientos se les realizó la PCR para identificación de *L. innocua*, la proporción para *L. innocua* fue de 62/110 (56.4 %) y la proporción de *L. monocytogenes* fue de 35/110 (31.81%) estos resultados respaldan los reportes realizados por Carvalheira *et al.*, 2010 y Cornu *et al.*, 2002 quienes reporta la capacidad de *L. innocua* para enmascarar la presencia de *L. monocytogenes*, ya que en este estudio la proporción de *L. innocua* en el primer muestreo casi duplicó la proporción de *L. monocytogenes*, estos resultados se compararán con los resultados obtenidos del segundo muestreo del Proyecto “Diseño de un plan integral para reducir la prevalencia de *Salmonella* spp., y *Listeria monocytogenes* en plantas de beneficio, desposte y puntos de venta en la cadena cárnica porcina” después de realizadas las medidas de intervención como limpieza y desinfección.

## 9.0 Conclusiones

Para la técnica de PCR se seleccionaron los “*primers*”*lin0464F/lin0464R* que resultaron altamente específicos para la identificación de *L. innocua* sin interferencia con *L. monocytogenes*, debido a que el diseño está basado en un gen único para la especie.

Se estandarizó la PCR para la identificación de *L. innocua* logrando así discriminar entre especies y obteniendo resultados confiables ya que *L. monocytogenes* no amplificó la banda de 749pb, el límite de detección de la técnica fue de 70fg/ $\mu$ L; demostrando su sensibilidad. Esta PCR puede ser útil para la industria alimentaria como reemplazo de técnicas tradicionales para la identificación de *L. innocua*.

La proporción *L. innocua* fue de 56.4 %, adicionalmente la proporción *L. monocytogenes* fue de 31.81%, confirmando que *L. innocua* puede enmascarar la presencia del patógeno.

## 10.0 Recomendaciones

Validar la técnica de PCR para la identificación de *L. innocua*, realizando los ajustes necesarios, observando la reproducibilidad, determinando el índice de Kappa, comparar

contra un Gold Standard, adicionalmente evaluar otros microorganismos que puedan ser flora acompañante de *Listeria* spp., en los alimentos.

Estandarizar y validar la técnica nuevamente para hacer la detección a partir de los alimentos.

## 11.0 Referencias

1. Carvalheira A, Eusébio C, Silva J, Gibbs P, Teixeira P (2010) Influence of *Listeria innocua* on the growth of *Listeria monocytogenes*. *Food Control* 21(11): 1492-1496
2. Gebretsadik S, Kassa T, Alemayehu H, Huruy K, Kebede N (2011) Isolation and characterization of *Listeria monocytogenes* and other *Listeria* species in foods of animal origin in Addis Abeba, Ethiopia. *Journal of Infection and Public Health* 4(1): 22-29
3. Vitullo M, Grant KA, Sammarco ML, Tamburro M, Ripabelli G, Amar CFL (2013) Real-time PCRs assay for serogrouping *Listeria monocytogenes* and differentiation from other *Listeria* spp. *Molecular and Cellular Probes* 27(1): 68-70
4. Rocha PRD, Dalmaso A, Grattarola C, Casalone C, Del Piero F, Bottero MT, Capucchio MT (2013) Atypical cerebral listeriosis associated with *Listeria innocua* in a beef bull. *Research in Veterinary Science* 94(1): 111-114
5. Ruiz Bolivar Z, Poutou R, Carrascal AK (2008) Resistencia antimicrobiana y a desinfectantes de *Listeria* spp. *Nova* 6: 114-131
6. Torres K, Sierra S, Poutou RA, Carrascal AK, Mercado M (2005) Patogénesis de *Listeria monocytogenes*, microorganismo zoonótico emergente. *Revista MVZ Córdoba* 10 (1): 511-543
7. Ryu J, Park SH, Yeom YS, Shrivastav A, Lee S, Kim Y, Kim H (2013) Simultaneous detection of *Listeria* sp. isolated from meat processed foods using multiplex PCR. *Food Control* 32(2): 659-664
8. Zamora A, Ossa H, Carrascal A, Poutou RA, Jiménez D (2000) Identificación Preliminar de *L. monocytogenes* por PCR. *Laboratorio Actual* 17:38-41
9. Gallegos JM, Vanegas MC, Albarracin Y, Mattar S, Poutou RA, Carrascal AK (2008) Frequency of isolation of *Listeria* spp, in different retail foods in Colombia. *Animal Production Research Advances* 4:9-18.
10. 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 Science and Technology* 44(2): 351-362
11. Oliveira M, Usall J, Viñas I, Solsona C, Abadias M (2011) Transfer of *Listeria innocua* from contaminated compost and irrigation water to lettuce leaves. *Food Microbiology* 28(3): 590-596
  12. Zitz U, Zunabovic M, Doming KJ, Wilrich PT, Kneifel W (2011) Reduced detectability of *Listeria monocytogenes* in the presence of *Listeria innocua*. *Journal Food Protection* 74: 1282-1287
  13. Vázquez JA, Domínguez G, González B, Kreft J, Goebel W (2001) Pathogenicity islands and virulence evolution in listeria. *Microbes and Infection* 3(7): 571-584
  14. Öztürkoğlu SO, Gürakan GC, Alpas H (2006) Behavior and control of *Listeria innocua* during manufacture and storage of Turkish white cheese. *European Food Research and Technology* 222: 614-621
  15. Todd ECD, Notermans S (2010) Surveillance of listeriosis and its causative pathogen *Listeria monocytogenes*. *Food Control* 22(9): 1484-1490
  16. Choi H, HanSang Y, Lee H, Lim Y, Kim Y, Yoon B (2001) Expression and purification of *Listeria innocua* Sv6b p60 invasion associated protein. *Biotechnology letters* 23: 1669-1673
  17. Carvalheira A, Eusébio C, Silva J, Gibbs P, Teixeira P (2010) Influence of *Listeria innocua* on the growth of *Listeria monocytogenes*. *Food Control* 21(11): 1492-1496
  18. Cornu M, Kalmokoff M, Flandrois J (2002) Modelling the competitive growth of *Listeria monocytogenes* and *Listeria innocua* in enrichment broths. *International Journal of Food Microbiology* 73(2–3):261-274.
  19. Bertsch D, Anderegg J, Lacroix C, Meile L, Stevens MJA (2013) pDB2011, a 7.6 kb multidrug resistance plasmid from *Listeria innocua* replicating in gram-positive and gram-negative hosts. *Plasmid* 70(2): 284-287

20. Belalcazar ME, Poutou RA, Torres KJ, Gallegos JM, Torres O, Carrascal AK (2005) *Listeria monocytogenes* y listeriosis animal. *Rev UDCA Actualidad y Divulgación Científica* 8(2): 95-101.
21. Miller FA, Gil MM, Brandão, TRS, Teixeira P, Silva CLM (2009). Sigmoidal thermal inactivation kinetics of *Listeria innocua* in broth: Influence of strain and growth phase. *Food Control* 20(12): 1151-1157
22. Kells J, Gilmour A (2004) Incidence of *Listeria monocytogenes* in two milk processing environments, and assessment of *Listeria monocytogenes* blood agar for isolation. *International Journal of Food Microbiology* 91(2): 167-174
23. Snapir YM, Vaisbein E, Nassar F (2006) Low virulence but potentially fatal outcome *Listeria ivanovii*. *European Journal of Internal Medicine* 17 (4): 286-287
24. Elischerova K, Cupkova E, Urgeova E, Lysy J, Sesevickova A (1990) Isolation of *Listeria ivanovii* in Slovakia. *Cesk Epidemiol Mikrobiol Imunology* 39: 228-236.
25. Khelef N, Lecuit M, Buchrieser C, Cabanes D, Dussurget O, Cossart P (2006) *Listeria monocytogenes* and the genus *Listeria*. *Springer* (4):404-476
26. Lehrke G, Hernaez L, Mugliaroli S L, von Staszewsk M, Jagus R J (2011) Sensitization of *Listeria innocua* to inorganic and organic acids by natural antimicrobials. *LWT - Food Science and Technology* 44(4): 984-991.
27. Picart L, Dumay E, Cheftel J C (2002) Inactivation of *Listeria innocua* in dairy fluids by pulsed electric fields Influence of electric parameters and food composition. *Innovative Food Science & Emerging Technologies* 3(4): 357-369
28. Schmid MW, Lampidis R, Emmerth M, Walcher M, Kreft J, Schleifer K (2005) Evolutionary history of the genus *Listeria* and its virulence genes. *Systematic and Applied Microbiology* 28(1): 1-18
29. Collins MD, Wallbanks S, Lane DJ, Shah J, Nietupski R, Smida J, Dorsch M, Stackebrandt E (1991) Phylogenetic analysis of the genus *Listeria* based on reverse transcriptase sequencing of 16S rRNA. *International Journal of Systematic Bacteriology* 41 (2): 240–246

30. Bakker H, Cummings CA, Ferreira V, Vatta P, Orsi RH, Degoricija L, Barker M, Petrauskene O, Furtado MR, Wiedmann M (2010) *BMC Genomics*. 11 (688): 1471-2164
31. Buchrieser C, Rusniok C, Kunst F, Cossart P, Glaser P (2003) Comparison of the genome sequences of *Listeria monocytogenes* and *Listeria innocua*: clues for evolution and pathogenicity . *FEMS Immunology and Medical Microbiology* 35(3):207-13
32. Hain T, Ghai R, Billion A, Kuenne CT, Steinweg C, Izar B, Mohamed W, Mraheil MA, Domann E, Schaffrath S, Kärst U, Goesmann A, Oehm S, Pühler A, Merkl R, Vorwerk S, Glaser P, Garrido P, Rusniok C, Buchrieser C, Goebel W, Chakraborty T (2012) Comparative genomics and transcriptomics of lineages I, II, and III strains of *Listeria monocytogenes*. *BMC Genomics* 13:144
33. Vázquez JA, Domínguez G, González B, Kreft J, Goebel W (2001) Pathogenicity islands and virulence evolution in listeria. *Microbes and Infection* 3(7): 571-584
34. Vazquez JA, Kuhn M, Berche P, Chakraborty T, Dominguez G, Goebel W, Gonzalez B, Wehland J, Kreft J (2001) *Listeria* pathogenesis and molecular virulence determinants. *Clinical Microbiology* 14(3): 584–640
35. Liu D, Ainsworth A J, Austin F W, Lawrence M L (2003) Identification of *Listeria innocua* by PCR targeting a putative transcriptional regulator gene. *FEMS Microbiology Letters* 223(2): 205-210
36. Merck, Chromocult® Listeria Selective Agar base <http://www.biodiag.com.mx/pdf/merckmillipore/flyer%20chromocult%20listeria%20merck.pdf?v=wfyngEbVG0> Consultado Septiembre 5 2013
37. Kubista M, Andrade J M, Bengtsson M, Forootan A, Jonák J, Lind K, Zoric N (2006) The real-time polymerase chain reaction. *Molecular Aspects of Medicine* 27(2–3): 95-125
38. Promega, Wizard Genomic DNA Purification kit(A1120) <http://www.promega.es/resources/protocols/technical-manuals/0/wizard-genomic-dna-purification-kit-protocol/> Consultado Septiembre 10 2013

39. Bansal NS (1996) Development of a Polymerase Chain Reaction Assay for the Detection of *Listeria monocytogenes* in Foods. *Applied Microbiology* 22: 353-356
40. Poutou R, Burbano M, Sierra S, Torres K, Carrascal A, Mercado M (2005) Estandarización de la extracción de ADN y validación de la PCR múltiple para detectar *Listeria monocytogenes* en queso, leche, carne de res y pollo. *Universitas Scientiarum*. 10(2): 61-78
41. Martínez WL.(2003) Estadística descriptiva con énfasis en salud pública. *La hoguera*
42. Ruiz M, Morillo LE (2009) *Epidemiología clínica. Panamericana. Bogotá*
43. Cocolin L, Rantsiou K, Lacumin L, C, Comi G (2002) Direct Identification in Food Samples of *Listeria* spp. and *Listeria monocytogenes* by Molecular Methods. *Applied and Environmental Microbiology* 68(12): 6273-6282
44. Buber A, Hein I, Rauch M, Lehner A, Yoon B, Goebel W, Wagner M (1999) Detection and differentiation of *Listeria* spp. by a single reaction based on multiplex PCR. *Applied and Environmental Microbiology* 65:4688-4692.