

**Construcción de un banco de ADN genómico (ADNg) de *Listeria*
spp.**

ALFONSO RAFAEL ESCOBAR PEÑALVER

TRABAJO DE GRADO
Presentado como requisito parcial
Para obtener el título de
MICROBIOLOGO INDUSTRIAL

PONTIFICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA
FACULTAD DE CIENCIAS
CARRERA DE MICROBIOLOGIA INDUSTRIAL
Bogotá D.C. 2010

**Construcción de un banco de ADN genómico (ADNg) de *Listeria*
spp.**

ALFONSO RAFAEL ESCOBAR PEÑALVER

TRABAJO DE GRADO

Ingrid Schuler Garcia, Ph.D.

Decana Académica
Facultada de Ciencias

Bact. Janeth Arias M.Sc., M.Ed.

Directora Carrera
Microbiología Industrial

PONTIFICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA
FACULTAD DE CIENCIAS
CARRERA DE MICROBIOLOGÍA INDUSTRIAL
Bogotá D.C. 2010

Construcción de un banco de ADN genómico (ADNg) de *Listeria* spp.

ALFONSO RAFAEL ESCOBAR PEÑALVER

TRABAJO DE GRADO

Raúl A. Poutou, BQ, M.Sc., Ph.D

Director

Zulema Ruiz Bolivar, Bact, Cand. M.Sc.

Codirector

M^a Ximena Rodríguez, Ph.D.

Par Evaluador

PONTIFICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA
FACULTAD DE CIENCIAS
CARRERA DE MICROBIOLOGÍA INDUSTRIAL

Bogotá D.C. 2010

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. Sólo velará por que no se publique nada contrario al dogma y a la moral católica y por que 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

1. RESUMEN	6
2. INTRODUCCIÓN	7
3. JUSTIFICACIÓN Y PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	8
3.1 Planteamiento del problema	8
3.2. Justificación de la investigación	10
4. MARCO TEÓRICO Y REFERENCIAS CONCEPTUALES	10
4.1. El género <i>Listeria</i> y su clasificación.	10
4.2. Listeriosis, aspectos de la enfermedad	11
4.2.1. Listeriosis humana	11
4.2.2. Listeriosis animal	11
4.3. Diagnóstico de <i>Listeria monocytogenes</i> en alimentos	12
4.4. Caracterización molecular de <i>Listeria</i> spp.	13
5. OBJETIVOS	14
5.1. Objetivo general	14
5.2. Objetivos específicos	14
6. METODOLOGIA	15
6.1 Diseño de la investigación.	15
6.1.1 Población de estudio y muestra	15
6.1.2 Variables del estudio.	15
6.2 Métodos.	15
6.2.1 Cultivo líquido del aislamiento.	15
6.2.2 Extracción de ADNg.	15
6.2.3 Cuantificación de Proteínas y pureza de DNA.	16
6.2.4 Electroforesis de DNAg.	16
6.3 Recolección de la información.	16
6.3.1 Determinación espectrofotométrica de la concentración y pureza del DNAg extraído	16
6.4 Análisis de información.	17
6.4.1 Calculo del rendimiento total de DNAg extraídos	17
6.4.2 Análisis de la calidad del DNAg extraído en la electroforesis	17
6.4.2 Conservación de los DNAg extraídos.	17
7. RESULTADOS Y DISCUSION	17
8. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	23
9. AGRADECIMIENTOS	23
10. BIBLIOGRAFIA	24

1. RESUMEN

En la Pontificia Universidad Javeriana a través del grupo de Biotecnología Ambiental e Industrial (GBAI), se realizan estudios encaminados a esclarecer la alta prevalencia de *L. monocytogenes* en alimentos listos para consumo, sin embargo, la información sobre serovariedades, aspectos moleculares y linajes es escasa, de tal manera que el primer paso es el establecimiento de un banco genómico de *L. monocytogenes*. En consecuencia para la realización de estudios epidemiológicos retrospectivos y prospectivos requerirán ADNg de alta calidad y concentración lo cual justifica la realización de este trabajo de grado.

El objetivo fue construir un banco de ADN genómico (ADNg) conformado por 73 aislamientos de *Listeria spp.*, provenientes de investigaciones anteriormente realizadas por los laboratorios de Microbiología de Alimentos y Biotecnología Aplicada del Grupo de Biotecnología Ambiental e Industrial (GBAI), aisladas entre el período de 2002 – 2010.

En la metodología experimental se realizó un cultivo líquido para cada cepa en caldo BHI suplementado con 3gL^{-1} de glucosa y se incubó a 37°C , 250r.p.m. durante toda la noche; posteriormente se empleó el protocolo para la extracción de ADN cromosomal de *Listeria spp.*, estandarizado por el grupo (GBAI), de los $200\mu\text{L}$ de la extracción de ADNg se tomó $165\mu\text{L}$ para ser conservados a -20°C y los $35\mu\text{L}$ restantes fueron empleados para la determinación espectrofotométrica de la concentración y pureza del DNAg extraído a $\text{DO}_{260\text{nm}}$ y radio de $\text{DO}_{260\text{nm}}/\text{DO}_{280\text{nm}}$ respectivamente, además del cálculo del rendimiento total, se cuantificó la concentración de proteínas en las muestras.

Para la cuantificación de ADN de doble cadena para *Listeria spp.*, se halló un promedio de $243,7958\ \mu\text{g/mL}$ con un máximo de $613,5300\ \mu\text{g/mL}$. Para la cuantificación de la pureza se obtuvo un promedio de 2,1167; el 8,21% de las muestras se encontraron dentro del radio de 1,8-2,0; y el 89,04% entre el radio de 1,8-2,2. Se discute que la gran mayoría de las extracciones obtuvieron valores aceptables de pureza (89,04%), sin embargo, el 10,95% de las muestras se encuentran desviadas de la medida que caracterizan a una preparación pura. Para la concentración proteínas contaminantes el 72,60% de las muestras presentaron $0,0000\ \mu\text{g/mL}$; se obtiene un promedio de $22,6747\ \mu\text{g/mL}$. Es posible señalar que la pureza posee un valor promedio aceptable, lo suficientemente adecuada para ser empleados en estudios moleculares epidemiológicos retrospectivos y prospectivos. En cuanto a los resultados de la electroforesis en gel de agarosa al 1% (p/v), se empleó un muestreo aleatorio del 10% (8 aislamientos) del banco por la limitante de los reactivos en el presupuesto, se observaron bandas fuertes que corroboran la presencia de ADNg de alta calidad para la muestras, las cuales estiman la calidad total de banco.

2. INTRODUCCIÓN

En el género *Listeria* se incluyen un grupo de bacterias Gram-positivas que son bacilos anaeróbicos facultativos, no esporulados. Este género está evolutivamente relacionado con los géneros: *Bacillus*, *Clostridium*, *Enterococcus*, *Streptococcus* y *Staphylococcus* (1). Se ha aislado *Listeria* spp., de diversas fuentes como suelo, agua, plantas, heces, vegetales, carnes, lácteos, peces, humanos asintomáticos y animales portadores (2).

Listeria spp., habita en la materia vegetal muerta de forma saprófita. La distribución de este microorganismo en la naturaleza es muy amplia lo cual se debe a la capacidad de adaptación a diferentes condiciones ambientales; *Listeria* spp., puede multiplicarse en concentraciones altas de sal (10% (p/v) NaCl), a pH que oscilan entre 4,5 y $9 \pm 0,2$ y a temperaturas entre 0 y $45^{\circ}\text{C} \pm 1$ (3).

Perteneciendo al género *Listeria* se encuentran ocho especies: *L. monocytogenes*, *L. innocua*, *L. welshimeri*, *L. ivanovii*, *L. seeligeri*, *L. grayi*, *L. rocourtiae* y *L. marthii*. Sólo dos *L. monocytogenes* y *L. ivanovii*, son patógenos y aunque presentan diferencias en la patogenicidad su ciclo de vida como parásito intracelular es muy parecido. *L. monocytogenes* es patógeno en humanos y en animales, a diferencia de *L. ivanovii* rara vez infecta a humanos y se ha visto más asociada con infecciones en animales (4-6).

L. monocytogenes produce una enfermedad invasiva y puede afectar al Sistema Nervioso Central (SNC) lo que conduce a la muerte. De otro lado, puede dejar secuelas neurológicas y la forma no invasiva de la enfermedad produce el síndrome gastrointestinal. Aunque la listeriosis puede presentarse en personas aparentemente saludables, existen grupos muy sensibles como los neonatos, las mujeres embarazadas, los ancianos y las personas inmunosuprimidas, con una tasa de mortalidad que oscila entre 20 y 30% (7). Es importante destacar que las formas clínicas de la enfermedad varían de acuerdo al grupo infectado y se manifiestan como gastroenteritis, meningitis, meningoencefalitis, septicemia, aborto o infección prenatal.

Por lo general mayor del 90% de los casos de listeriosis han sido por Enfermedades de Transmisión Alimentaria (ETA); aproximadamente el 10% restante obedece a infecciones en recién nacidos (a través de la madre infectada o por contagio en las salas de neonatos). En los brotes esporádicos y en las epidemias reportadas se ha logrado relacionar una gran variedad de alimentos (actuando como vehículos); entre estos la leche, el queso, la mantequilla, el paté, la carne de res, la carne de cerdo, las aves, los vegetales, los productos del mar y particularmente los productos listos para ingerir (8).

Se conoce que varias especies animales han sido infectadas por *L. monocytogenes*, sin embargo, la mayoría de casos han correspondido a rumiantes, con menor frecuencia los cerdos y aves, estos últimos considerados grandes portadores sanos. Las infecciones en animales por lo general son subclínicas, sin embargo la listeriosis puede aparecer de forma esporádica o epidémica, lo que tiene un gran impacto económico. La listeriosis en animales, ha permitido evidenciar el papel en la transmisión zoonótica, lo que puede ocurrir a través del contacto con el humano o al consumo de alimentos contaminados de origen animal (9).

L. ivanovii presenta tropismo diferencial por el útero grávido en rumiantes, pero en especial por las especies menores; en estos produce abortos, septicemia o enteritis, pero nunca encefalitis, forma clínica típica de la infección *L. monocytogenes* en rumiantes (10-12).

Listeria spp. puede encontrarse en el ambiente de las fábricas, en los locales de expendio, en las viviendas de los consumidores, incluso en individuos sanos (13). Dentro de las especies del género se destaca *L. monocytogenes*, como patógeno re-emergente en alimentos por las características antes mencionadas y el alto potencial patogénico, resultando de gran interés para la seguridad alimentaria y la salud pública.

3. JUSTIFICACIÓN Y PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

3.1 Planteamiento del problema

La listeriosis fue descrita en 1926 como una enfermedad en conejos causada por *Listeria monocytogenes* (14). En mamíferos, *L. monocytogenes* causa abortos y encefalitis o meningoencefalitis; no obstante esta enfermedad se produce al mismo tiempo en muchos animales de una zona geográfica y ha sido observada en rebaños de vacunos y ovinos mucho antes que en el hombre (15-17). *L. monocytogenes* puede infectar una amplia gama de animales como cabras, cerdos, aves, pavos, patos y peces, entre otros (18). La forma septicémica de la enfermedad no es común en bovinos y por lo general se produce en animales recién nacidos; esta variante se caracteriza por depresión, inapetencia, fiebre y muerte. En rumiantes es común la forma encefálica, denominada también enfermedad en círculo, debido a la tendencia de los animales a dar vueltas en un sólo sentido. Los síntomas comprenden depresión, anorexia, caída o torcimiento de la cabeza hacia un lado (opistótono), parálisis facial y conjuntivitis. En un estudio realizado en 1972, la incidencia más alta de *L. monocytogenes* (24%) fue encontrada en vacas que experimentaron aborto, mientras que las vacas sanas provenientes de rebaños afectados o no, presentaron incidencias más bajas [rebaños afectados 6,7%, rebaños no afectados 1,7%] (19). El cultivo sistemático de deposiciones diarreicas de vacas con síntomas y/o abortos relacionados con *L. monocytogenes*, el cultivo de heces diarreicas de vacas sanas provenientes de rebaños con listeriosis y el cultivo de muestras diarreicas de vacas provenientes de rebaños no afectados por la enfermedad, han revelado diferencias en la presencia del microorganismo en este tipo de muestras; sugiriendo que podría existir una relación entre la utilización de ensilaje de baja calidad y el desarrollo de un brote de listeriosis en rumiantes domésticos (17). En Colombia, Gallego y colaboradores, determinaron la prevalencia y la función de *Listeria* spp., en el comportamiento reproductivo de los animales y su importancia desde el punto de vista de salud pública. Este estudio encontró prevalencias del 24,6% en leches, del 2,7% en hisopados vaginales y del 9,5% en materia fecal. La presencia *L. monocytogenes* estuvo asociada a mayor número de servicios por concepción, mayor intervalo entre partos, menor producción de leche, presencia de vacas vacías (a la palpación) y problemas de salud de los animales. No se encontró asociación con la presencia de mastitis o vaginitis, el suministro de aguas residuales, el suministro de ensilajes y la presencia de animales de otras especies (20).

El aislamiento de cepas de *L. monocytogenes* en humanos, animales y en alimentos ha permitido considerar la listeriosis una zoonosis emergente transmitido principalmente por

alimentos. Este microorganismo ha sido causante de brotes epidemiológicos de listeriosis; siendo las mujeres embarazadas, los niños recién nacidos y los pacientes inmunocomprometidos especialmente susceptibles a la infección. En Colombia entre 1988 y 1994 se realizaron estudios de búsqueda de *L. monocytogenes* en leches crudas, pasteurizadas, quesos frescos y madurados; reportando incidencia de 34,2, 26,6, 22,8% respectivamente (16). Durante ese mismo período se observaron 19 casos de listeriosis: diez en adultos inmunosuprimidos, dos en mujeres embarazadas, seis en neonatos y uno en un adolescente de 12 años, todos identificados como pacientes con listeriosis, según información documentada en FCVL (fundación clínica del valle de Lili) en Cali (16).

Estudios realizados en Antioquia en 172 muestras procesadas mostraron una prevalencia de *L. monocytogenes* de 33,1% en una amplia variedad de quesos blandos. El nivel de contaminación descubierto en los alimentos, fue considerablemente mayor al encontrado en otros países como Holanda (4,4%), Francia (4,6%) o Estados Unidos (12%) con prevalencia entre 5% y 12% en lácteos y en Brasil 10,7% en quesos (21).

Un estudio preliminar del Laboratorio de Salud Pública de la Secretaría Distrital de Salud, Bogotá, determinó una incidencia del 5,3% de *L. monocytogenes* en productos cárnicos listos para el consumo humano ^(Información personal Dr. Herbert Vera referente de ambiente). En Colombia, a pesar de haberse detectado casos clínicos de listeriosis humana, la identificación de *L. monocytogenes* aún no ha sido regularizada.

De otro lado, *L. ivanovii* posee un tropismo diferencial específico hacia los rumiantes, en especial especies menores, en los que provoca abortos septicemia enteritis, pero nunca encefalitis que es la forma clínica típica de rumiantes infectados por *L. monocytogenes*. Este microorganismo puede invadir activamente el SNC, mientras que *L. ivanovii* tiene como órgano blanco el útero grávido (14).

A nivel mundial se ha despertado el interés en el estudio de la genética y las ciencias biológicas, desarrollando mega proyectos para el almacenamiento de material biológico y/o genético de diversas especies, entre los más importantes encontramos al proyecto del genoma humano y la cámara global de semillas. Generalmente enfocados a la producción de grandes bancos biológicos y de material genético, generadores de importantes desarrollos en los campos de la medicina, agricultura, genética económica y forense. Implicando optimizaciones, estandarizaciones y validaciones de técnicas moleculares que permitan extraer DNA de alta calidad y suficiente cantidad para su posterior preservación, recuperación o investigación. Sin embargo, continúa siendo dos los problema durante la fase de la extracción. El primero es tratar de maximizar el rendimiento de DNA; y el segundo consiste en los factores que causan la contaminación del DNA y varios reactivos empleados en la extracción (Ej. detergentes, lisozima, NaOH, alcohol, EDTA y EGTA), que dificultan la amplificación por PCR, y finalmente causan múltiples inconvenientes en métodos de diagnóstico y estudio molecular. Consecuentemente, los aislamientos recuperados de alimentos u otras fuentes requieren protocolos de extracción de DNA robustos que provean alto rendimiento de DNA con la menor cantidad de inhibidores que restrinjan la calidad de la PCR (22-25).

En Colombia diversos estudios realizados por el INVIMA, han demostrado una alta prevalencia de *L. monocytogenes* en alimentos listos para consumo, sin embargo la información sobre serovariedades, aspectos moleculares y linajes es escasa, por lo que no puede establecerse la dinámica del microorganismo dentro de la cadena de producción, por esta razón es importante que la Universidad Javeriana a través del grupo de Biotecnología Ambiental e Industrial, realice estudios encaminados a esclarecer estos aspectos, de tal manera que una primer paso es el establecimiento de un banco genómico de *L. monocytogenes*.

3.2. Justificación de la investigación

Actualmente la identificación de *L. monocytogenes* y *Listeria spp.*, se realiza por métodos convencionales (catalasa, Gram, movilidad, nitratos, hemólisis, CAMP, carbohidratos, invasividad y serología), estas técnicas abarcan aproximadamente 15 días de estudio, existen otros estuches comerciales como MicroScan, Vitek, Api-Listeria de alta especificidad pero en todos se requiere partir de un cultivo puro del microorganismo; por otra parte en el país no está normada la técnica y no todas las empresas productoras de alimentos la realizan.

Este trabajo se encuentra justificado en la necesidad de generar un banco de DNA genómico para *Listeria spp.*, a partir de los aislamientos obtenidos por el Grupo de Biotecnología Ambiental e Industrial GBAI.

Este trabajo de grado pertenece a un proyecto de investigación encaminado a la búsqueda de patrones de susceptibilidad antimicrobiana y de tolerancia a desinfectantes en aislamientos de *Listeria spp.*, a partir de diferentes fuentes (humano, animales, alimentos y ambientes) y se enmarca dentro de las líneas de investigación *i.* Microorganismos emergentes en la industria de alimentos y *ii.* Biotecnología y biología molecular, del Grupo de Biotecnología Ambiental e Industrial GBAI.

4. MARCO TEÓRICO Y REFERENCIAS CONCEPTUALES

4.1. El género *Listeria* y su clasificación.

Joseph Lister nombró el género que durante muchos años estuvo formado por una única especie, *Bacterium monocytogenes*, en la actualidad (*L. monocytogenes*). El adjetivo “monocytogenes” se aplicó debido a la amplia leucocitosis mononuclear observada en conejos infectados (26, 27).

En los comienzos de las investigaciones el género *Listeria* fue incluido dentro de la familia *Corynebacteriaceae*, sin embargo, en la actualidad pertenece al grupo de bacilos Gram-positivos no esporulados muy relacionados a *Bacillus spp.*, *Clostridium spp.*, *Enterococcus spp.* y *Streptococcus spp.*, (28).

En general las especies del género *Listeria* son bacilos anaeróbicos facultativos de 0,4 y 1,5µm, asporógenos, sin cápsula y móviles a temperaturas entre 10 y 25°C. Han sido aislados de diversas fuentes ambientales, incluyendo suelos, agua, efluentes y una gran variedad de alimentos, así como, heces fecales de humanos y animales (10, 11, 29). En

este género se incluyen ocho especies: *L. monocytogenes*, *L. ivannovi*, *L. seeligerii*, *L. innocua*, *L. welshimeri*, *L. grayi*, *L. rocourtiae* y *L. marthii*; sólo dos de estas (*L. monocytogenes*, y *L. ivannovi*) son patógenas (4-6, 27).

4.2. Listeriosis, aspectos de la enfermedad

La enfermedad causada por *L. monocytogenes*, se conoce como Listeriosis (30). Esta enfermedad se define clínicamente cuando el microorganismo es detectado en sangre, líquido cefalorraquídeo (LCR) o en muestras de estériles como la placenta (30). En la mayoría de los casos de listeriosis neonatal precoz, el lactante se infecta *in utero*, casi siempre de forma transplacentaria, debido a que la madre ha adquirido la infección por transmisión alimentaria (31-33).

Dos formas básicas de presentación de listeriosis pueden distinguirse: la listeriosis perinatal y la listeriosis en adulto; en ambas las formas clínicas corresponden a infección diseminada o infección local en el sistema nervioso central (SNC), (11).

4.2.1. Listeriosis humana

Por lo general *L. monocytogenes* entra al organismo a través del intestino después haber consumido alimentos contaminados (aún no se sabe si produce diarrea), invadiendo la mucosa intestinal y de allí se disemina por vía hematológica para infectar órganos como hígado, bazo, corazón, SNC y útero (34). La alcalinización del estómago, ya sea por bloqueadores H₂ o por consumo de alcalinizantes, en una mucosa lesionada, permite el paso del microorganismo hacia el intestino.

Por lo general la infección por *L. monocytogenes* comienza unas 20h después del consumo del alimento contaminado. Síntomas como náuseas, vómito y diarrea preceden las manifestaciones serias de la listeriosis. El período de incubación en adultos oscila entre 3 y 70 días, en neonatos infectados la incubación oscila entre 1 y 4 semanas postnatales (35, 36).

L. monocytogenes se disemina por la sangre y llega al SNC, ocasionando meningitis supurativa aguda, cerebritis focal o multifocal, meningoencefalitis, absceso cerebral o espinal, listeriosis bulbar o romboencefalitis (37-39). La formación de masas de tejido inflamado formadas por muchas lesiones pequeñas (listeromas) y necrosis focal es característica de la enfermedad, lo cual depende del modo de infección, la dosis del microorganismo, la edad y la susceptibilidad del paciente (31, 40-42). La dosis infectiva de *L. monocytogenes* varía con el estado inmunológico del paciente, la concentración de patógeno en el alimento, la virulencia de la cepa, y la cantidad consumida (43, 44).

4.2.2. Listeriosis animal

En rumiantes, la listeriosis se manifiesta de cuatro formas, la infección del SNC lo que causa meningoencefalitis en animales adultos y meningitis en animales jóvenes,

infecciones uterinas las que se caracterizan por generar abortos o septicemia en neonatos, la septicemia generalizada y la mastitis (45). Se ha propuesto que la infección se favorece con las lesiones en la mucosas de la cavidad nasal o en la conjuntiva (46).

De otro lado, es posible que los bovinos sean infectados vía tracto gastrointestinal con la consiguiente propagación vía hemática hacia el pedúnculo cerebral (47), donde *L. monocytogenes* se multiplica y se dispersa en el organismo. La forma encefáltica de la infección presenta signos neurológicos, como opistótono, andar en círculos, salivación excesiva y parálisis facial unilateral. En la etapa terminal, el animal experimenta temblores, cae y es incapaz de levantarse (17).

L. monocytogenes produce infecciones oculares y queratitis en rumiantes, debido a la entrada directa de la bacteria en el ojo, la fuente de contaminación es el alimento, especialmente los ensilados (9). Por otro lado, *L. monocytogenes* puede invadir la unidad fetoplacentaria de una gran variedad de especies animales, lo cual puede o no desencadenar una septicemia. En rumiantes, el aborto ocurre generalmente en el tercer trimestre de embarazo y la bacteria se puede visualizar microscópicamente o recuperarse mediante cultivo del feto o de la placenta (17, 48).

La mastitis en el ganado vacuno se presenta de dos formas, como infección subclínica o como infección supurativa; se ha detectado *L. monocytogenes* dentro de los neutrófilos en la leche (49) y la infección de las ubres puede ser crónica (45).

4.3. Diagnóstico de *Listeria monocytogenes* en alimentos

En la industria de alimentos se utilizan métodos convencionales para la detección e identificación de *L. monocytogenes*. La ausencia o presencia detectada en 25g de alimento son las más frecuentemente empleadas, pero también se realizan recuentos UFC/g, cuando se necesita investigar sobre un riesgo en particular para la salud (50).

Para la detección de microorganismos en alimentos, se requiere de una fase de pre-enriquecimiento antes del aislamiento en agares selectivos. La concentración de *L. monocytogenes* puede ser aproximadamente del 10^2 UFC/g; por tal motivo el éxito de la detección depende del pre-enriquecimiento (51, 52).

El enriquecimiento en caldos selectivos es el método más utilizado para el diagnóstico de *L. monocytogenes* en alimentos. En las distintas formas de caldos de enriquecimiento se integran sustancias que, como los antibióticos, suprimen o inhiben el crecimiento de la mayor parte de la carga microbiana permitiendo, el desarrollo de *L. monocytogenes* (52). Sin embargo, estas técnicas consumen mucho tiempo; la técnica “Gold Standard” para la detección de *L. monocytogenes* consume ~15 días (53).

En los últimos años, el número de casos de listeriosis reportados mundialmente ha aumentado, debido al incremento del número de personas con el riesgo de adquirir esta enfermedad y a la tendencia de ingerir este tipo de alimentos (carne de res, pollo y derivados lácteos) que por sus características se prestan con más facilidad para ser los

vehículos de transmisión; por otra parte el perfeccionamiento de las técnicas microbiológicas ha mejorado la capacidad de detección del patógeno (54, 55). En Colombia actualmente se continúan realizando estudios moleculares enfocados a técnicas de detección rápida y sensible como la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) para *L. monocytogenes* en quesos, leche, carne de res y pollo; con el fin de minimizar el tiempo de detección y efectuar decisiones en el menor período de tiempo para la industria alimentaria; que en consecuencia permiten un control más detallado del proceso y las prácticas de limpieza e higiene en la manufactura y expendio de los productos alimenticios (16, 27, 56).

Las técnicas de mayor especificidad disponibles actualmente para uso rutinario en la detección e identificación de las especies del género *Listeria* se basan en el uso de sondas moleculares. Consisten en secuencias de ADN producidas sintéticamente que son complementarias a secuencias de ADN o ARN específicas para género y especie (27, 57, 58). Las sondas de ADN deben marcarse con isótopos como C^{14} , H^3 , P^{32} , I^{125} , para determinar si se ha dado la hibridación (59). Las sondas genéticas se aplican normalmente a las colonias cultivadas en medios selectivos o agar nutritivo (60, 61). Un ensayo de sondas de ADN con quimioluminiscencia llamado AccuPROBE® “*Listeria monocytogenes* Culture Identification Test” (Gen-Probe, San Diego, CA, USA) se utiliza para la confirmación rápida de *L. monocytogenes* de colonias necesariamente sobre medios de aislamiento primario o caldos de cultivo a través medida con un luminómetro GEN-PROBE (62). GENE-TRAK® *L. monocytogenes* Assay (Gen-Trak system, Framingham, MA, USA) es otro ensayo de este tipo disponible comercialmente (63).

El método de hibridación de colonias se ha utilizado con buenos resultados para detectar *L. monocytogenes* (72). Basados en las secuencias del fragmento, cuatro oligonucleótidos han sido sintetizados y evaluados como sondas específicas para *L. monocytogenes* (73). Sin embargo, otras técnicas moleculares son necesarias para identificar serotipos y discriminar entre las especies y lograr su caracterización molecular.

4.4. Caracterización molecular de *Listeria* spp.

En la actualidad se conocen varios métodos para la tipificación de cepas de *L. monocytogenes*, pero aún no se conoce si todas las cepas de *L. monocytogenes* son o no capaces de causar enfermedad. La virulencia de un microorganismo es un factor determinante de los eventos complejos que desencadenan la enfermedad; en este sentido el riesgo de listeriosis parece ser más alto en la medida en que la cepa es más virulenta. La virulencia de *L. monocytogenes* aún no es comprendida totalmente pero se ha observado que de las 13 serovariedades descritas, sólo 3 (4b, 1/2a y 1/2b) son responsables de todos los casos esporádicos de listeriosis y de las epidemias humanas que han aparecido en el mundo; mientras que el serotipo 1/2 ha sido encontrado en alimentos y ambientes de plantas de producción (70). Tampoco es claro si la distribución de los serotipos de *L. monocytogenes* se relaciona con la patogenicidad o con las características ecológicas y fisiológicas de la bacteria. Los serotipos varían en virulencia y podría ocurrir que sólo unas pocas cepas virulentas colonicen los ambientes donde se procesan los alimentos, los contaminen y produzcan listeriosis.

Discriminar entre cepas de *L. monocytogenes* permitiría reconocer posibles fuentes de infección en casos humanos y establecer el origen o las rutas de contaminación en la industria de los alimentos, a fin de desarrollar estrategias de intervención que prevengan la enfermedad y la pérdida de los productos (74). Debido a la distribución de esta bacteria en el ambiente, para el sector salud y para la seguridad alimentaria la meta ha sido conocer las fuentes de contaminación del patógeno, e identificar el serotipo de las cepas. La serotipificación facilita posibilidad de distinguir cepas o grupos de cepas en estudios epidemiológicos y conocer la relación entre los aislamientos, identificar los brotes de enfermedad, identificar la fuente de infecciones aún en los casos esporádicos y determinar los modos de transmisión de listeria (70, 75).

La serotipificación con antisueros es una herramienta útil, sin embargo no es accesible para laboratorios comunes de control de calidad de alimentos, por dificultades técnicas, costos de las pruebas y la dificultad para la consecución de los antisueros (70); por estos motivos se ha visto limitado el desarrollo de estudios al respecto en Colombia. De otro lado la serotipificación clásica por si sola no aporta información directa sobre las variaciones moleculares de los diferentes aislamientos y no permite encontrar relaciones clonales entre los aislamientos. A diferencia, los estudios de tipificación molecular permiten establecer una relación clonal que sumada a la serotipificación previa, permiten encontrar cambios ligados o no a variaciones intraserotípicas; este tipo de estudio contribuye a establecer o determinar la dinámica poblacional en relación al ambiente de aislamiento o tipo de muestra entre otros (70).

El presente trabajo de grado tiene como objetivo la elaboración de un banco de DNAg de los aislamientos de *Listeria* spp., del laboratorio de microbiología de alimentos con la concentración, pureza y calidad necesaria que permita hacer estudios moleculares retrospectivos y prospectivos de las mismas. Estos estudios permitirán la futura elaboración de estudios epidemiológicos regionales que aclaren el panorama nacional al respecto.

5. OBJETIVOS

5.1. Objetivo general

Construir un banco de ADN genómico (ADNg) de los aislamientos de *Listeria* spp., aislados de diferentes fuentes (humanos, animales y alimentos), provenientes de investigaciones anteriormente realizadas por los laboratorios de Microbiología de Alimentos y Biotecnología Aplicada del Grupo de Biotecnología Ambiental e Industrial (GBAI), aisladas entre el periodo de 2002 – 2010.

5.2. Objetivos específicos

4.2.1. Extraer el ADN genómico (ADNg) de 73 aislamientos de *Listeria* spp. del laboratorio de Microbiología de Alimentos del Grupo de Biotecnología Ambiental e Industrial (GBAI), aisladas entre el período de 2002 – 2010.

6. METODOLOGIA

6.1 Diseño de la investigación.

El presente trabajo de grado fue un estudio Mixto (retrospectivo y prospectivo) de carácter descriptivo y de corte transversal el cual se realizó en los laboratorios de Microbiología de Alimentos y Biotecnología Aplicada del Grupo de Biotecnología Ambiental e Industrial (GBAI), Departamento de Microbiología de la Facultad de Ciencias. Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá. D.C.

6.1.1 Población de estudio y muestra.

Se tomó la población universo para su estudio en su totalidad, la cual estuvo conformada por un banco de 73 aislamientos.

6.1.2 Variables del estudio.

Tabla 1. Clasificación de las Variables del Estudio

Variables	Tipo de Variable			Unidad de Medición
	Según las interrupciones entre sucesivos valores	Según la orientación descriptiva	Según los niveles de medición	
Banco de Aislamientos de <i>Listeria</i> spp.	Discreta	Independiente	Cuantitativa Nominal	Adimensional
Concentración DNAg Extraído	Continua	Dependiente	Cuantitativa de Razón	$\mu\text{g/mL}$
Pureza DNAg Extraído	Continua	Dependiente	Cuantitativa de Razón	Adimensional

6.2 Métodos.

6.2.1 Cultivo líquido del aislamiento.

A partir del Banco de Células de Trabajo (BCT), previamente conservado a -80°C , se tomó un vial (1mL) del aislamiento conservado en Caldo BHI suplementado con 20% (v/v) de glicerol (27, 53, 76-78); con este se inoculó en 5 mL de BHI suplementado con 3gL^{-1} de glucosa y se incubó a 37°C , 250r.p.m. durante toda la noche.

6.2.2 Extracción de ADNg.

Se cultivaron las bacterias durante 12 horas a 37°C y 250 r.p.m. (5mL de caldo BHI.). Luego se centrifugó 1mL del cultivo durante 10' a 3000 r.p.m., a temperatura ambiente. Posteriormente se resuspendieron las células en 1mL de tampón TE IX (10mM Tris-HCl (pH $8,0 \pm 0,2$), 1mM EDTA (pH $8,0 \pm 0,2$)), aplicando vortex por 1 minuto y centrifugando nuevamente, inmediatamente se repitió el procedimiento de centrifugación durante 10' a 3000 r.p.m.; decantando el sobrenadante por inversión del tubo eppendorff. Luego se

resuspendió el “*pellet*” resultante en 200µl de (tampón TE 1x, 2mg/mL de lisozima), incubando durante 30´ a 37°C.

Transcurrido el período la incubación con lisozima, se añadió 300µl de (tampón TE 1x, 1% (v/v) de SDS, 100µg/mL proteinasa K), mezclando por inversión varias veces.

Se incubó a 65°C durante 1h. Posteriormente se añadió 84µl de una solución 5M de NaCl y 60µl de una solución de CTAB (10% p/v CTAB disuelto en 0.7M de NaCl), mezclando por inversión. Se incubó nuevamente a 65°C durante 20´, transcurrido el tiempo se añadió 600µl de una mezcla de fenol y cloroformo (24:1), aplicando vortex por un minuto.

Se centrifugaron las muestras a 12000 r.p.m., 4°C, 10´; para luego separar la fase acuosa en otro tubo eppendorff. Luego se añadió a la fase acuosa 600µl de 2-propanol, incubando 30´ a temperatura ambiente (14°C). Se centrifugó a 12000 r.p.m., 10´. Consecutivamente se decantó el isopropanol e invirtieron los tubos eppendorff destapados por 24 horas. Para finalizar añadiendo 200µl de TE 1X, aplicando vortex durante 1 minuto y congelando a -20°C las muestras hasta su empleo. Posteriormente fueron resuspendidas en 20µl de agua estéril para PCR (64).

6.2.3 Cuantificación de Proteínas y pureza de DNA.

La pureza y concentración de los DNA obtenidos se determinó según la relación entre la absorbancia a 260nm, 280nm y 320nm de longitud de onda en un espectrofotómetro Biospect 1601 Shimatsu DNA/Protein/Enzyme Analyzer. Las unidades de medición para la cuantificación de las proteínas y el DNA fueron dadas en µg/mL. (79).

6.2.4 Electroforesis de DNAg.

El material de alta calidad en la extracción se verificó a través de un muestreo aleatorio del 10% (8 aislamientos) del banco (73 aislamientos) por la limitante de los reactivos en el presupuesto, empleando la técnica de electroforesis en gel de agarosa al 1% (p/v) preparado en tampón TAE 1X (40mM Tris-Acetato, 1mM EDTA pH 8,0 ± 0,2), y se tiñó en una solución con 5µg/mL de bromuro de etidio, corrido a 80 voltios con una fuente de poder Pharmacia Biotech EPS-300 durante una hora y fotografiados bajo luz ultravioleta.

6.3 Recolección de la información.

6.3.1 Determinación espectrofotométrica de la concentración y pureza del DNAg extraído

Se cuantificó la presencia de DNA, leyendo las muestras a 260 nm y 280 nm de longitud de onda; la DO_{260nm} permitiendo el cálculo de la concentración de ácido nucleico de las muestras. Una DO_{260nm} igual a 1 corresponde aproximadamente a 50µg/mL de DNA de doble cadena. El radio entre las lecturas a 260nm y 280nm (DO_{260nm}/DO_{280nm}) permitió estimar la pureza del ácido nucleico. Una preparación pura de DNA tiene un radio DO_{260nm}/DO_{280nm} de 1,8-2,0. Si se encuentra contaminación con proteína o fenol, el radio será significativamente menor a 1,8 (79).

6.4 Análisis de información.

6.4.1 Cálculo del rendimiento total de DNAg extraídos.

El rendimiento total fue obtenido multiplicando la concentración de DNAg por el volumen total de la muestra purificada. $\text{Rendimiento total } (\mu\text{g}) = \text{Concentración de DNAg} \times \text{Volumen total de la muestra (mL)}$, (80).

6.4.2 Análisis de la calidad del DNAg extraído en la electroforesis

En la electroforesis en gel de agarosa al 1% (p/v) del muestreo aleatorio, se evaluó cualitativamente su calidad de la siguiente manera: [--] Sin bandas, [+-] barrido, [++] bandas fuertes; indicando ausencia de DNAg, degradación parcial de las moléculas del DNAg, y alta calidad de DNAg, respectivamente (81, 82).

6.4.2 Conservación de los DNAg extraídos.

Los DNAg obtenidos fueron conservados a -20°C , en tubos debidamente rotulados, para su posterior utilización.

7. RESULTADOS Y DISCUSION

Se realizó la determinación espectrofotométrica de la concentración de DNAg, pureza y concentración de proteínas; calculando el rendimiento total para cada una de la 73 muestras de *Listeria spp.*; las cuales fueron procesadas a través de los protocolos anteriormente descritos en la metodología del presente trabajo.

Para la cuantificación de ADN de doble cadena para *Listeria spp.*, se halló un promedio de 243,7958 $\mu\text{g/mL}$ con un máximo de 613,5300 $\mu\text{g/mL}$. **Figura 1. A.** En la figura se observa una relación directamente proporcional entre la concentración y el rendimiento total, en razón de ser calculado a través de la multiplicación de la concentración de ADN por el volumen total de la muestra (80, 81).

Para la cuantificación de la pureza se obtuvo un promedio de 2,1167. La literatura sugiere que una preparación completamente pura tiene un radio $\text{DO}_{260\text{nm}}/\text{DO}_{280\text{nm}}$ de 1,8-2,0. (81, 82). El 8,21% de las muestras se encontraron dentro del radio de 1,8-2,0; y el 89,04% entre el radio de 1,8-2,2. Se discute que la gran mayoría de las extracciones obtuvieron valores aceptables de pureza (89,04%), sin embargo, el 10,95% de las muestras se encuentran desviadas de la medida que caracterizan a una preparación pura.

Para la concentración proteínas contaminantes el 72,60% de las muestras presentaron 0,0000 $\mu\text{g/mL}$. Sin embargo se obtiene un promedio de 22,6747 $\mu\text{g/mL}$, esta desviación en la media se debe principalmente a tres datos extremos de 232,4100; 302,2700 y 500,2300

($\mu\text{g}/\text{mL}$). La causa se atribuye a un posible error de manipulación en el operario, es probable que en la extracción de la fase acuosa se tomara parte de la interfase y la fase orgánica en donde se concentran contaminantes tales como proteína y fenol. La suposición se corrobora al correlacionar en la **Figura 1. B**. Los datos extremos de pureza y concentración de proteínas. En dicha grafica se observa una relación directamente proporcional la pureza y concentración de proteínas con respecto cada cepa del banco, se deduce que un banco altamente puro no deberá contener proteínas dentro de su composición, lo cual es posible detectar una vez se realiza la lectura por espectrofotometría y se obtiene un radio $\text{DO}_{260\text{nm}}/\text{DO}_{280\text{nm}}$ de 1,8-2,0; debido a que dentro de la molécula de ADN, mas exactamente en las bases purinas y pirimidinas se absorbe la luz UV a una longitud de 260 nm (83); razón por la cual, las lecturas contaminadas con valores menores de 1,8 son intensamente absorbidas a 280 nm por los polipéptidos de las proteínas. Por lo tanto, es posible detectar contaminantes en las muestras, una vez se realiza el proceso de espectrofotometría. (84).

Entre las posibles causas que generan desviaciones entre los valores que sugieren los autores, se fundamentan principalmente al factor humano (manipulación y experiencia); la posible contaminación del DNA; y varios reactivos empleados en la extracción como son los detergentes, la lisozima, el NaOH, los alcoholes, y el EDTA los cuales producen interferencias con los resultados esperados, sin embargo, es posible señalar que los resultados experimentales que se derivaron de este ensayo para cuantificar la pureza, poseen valores aceptables de pureza lo suficientemente adecuados para ser empleados en estudios moleculares epidemiológicos retrospectivos y prospectivos (20, 21, 23). Para posteriores construcciones de bancos genómicos se sugiere una validación del operario, especial para el método a emplear, con una desviación estándar < 0.365 debido a que es frecuente encontrar desviaciones y variaciones entre operarios. (**Tabla 2**).

En el mercado existen diversos métodos y Kits comerciales para la extracción de ADN, en un estudio en Alemania que realizó Weiss A. (2007), comparó diferentes estrategias y Kits para la extracción de ADN genómico; el encontró rendimientos de DNA para los Kits comerciales desde 1,58 hasta 13,08 μg ; con concentraciones de 63,1 y 87,72 $\mu\text{g}/\text{mL}$ en Ultra CleanTM Soil DNA Isolation Kit y Quantum Prep[®] AquaPure Genomic DNA Isolation Kit respectivamente (83). En nuestro estudio se empleo una estandarización de la técnica de extracción de ADN genómico realizada por el grupo de investigación (GBAI) con base en el protocolo descrito por Sambrook 2001 (54, 56, 79), en el cual se obtuvo en promedio un rendimiento total de 8,5329 μg con un máximo de 21,4736 μg ; con concentraciones en promedio de 243,7958 $\mu\text{g}/\text{mL}$ con un máximo de 613,5300 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

En cuanto a los resultados de la electroforesis en gel de agarosa al 1% (p/v), se empleo un muestreo aleatorio del 10% (8 aislamientos) del banco de ADNg (**Figura 2**). En la figura se observa la migración de las moléculas de ADN genómico de alto tamaño molecular, mostrando bandas fuertes que corroboran la presencia de ADNg de alta calidad para la muestras, las cuales estiman la calidad total de banco. (84)

La concentración y rendimiento total promedio de 243,7958 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y 8,5329 μg respectivamente. Fueron obtenidos con amplia variación entre las muestras del ensayo experimental, se sugiere que estos factores están asociados a la falta de experiencia del operario en momentos “claves” del protocolo, generando amplios rangos de desviación estándar y coeficientes de variación. Es importante destacar que todo proceso, protocolo o estandarización son factibles de mejorar continuamente, sugiriendo adicionalmente la validación del operario para el método en futuros estudios.

Tabla 1. Cuantificación de la concentración del ADN, concentración de proteínas y pureza del banco de ADN genómico (ADNg) de *Listeria spp.*

Muestra ^a	ADNg Concentrado			
Código ^b	Concentración Proteínas (µg/mL)	Concentración ADN (µg/mL)	Pureza DO (260/280 nm)	Rendimiento Total (µg)
LMA-PUJ 30	20,5800	116,0100	2,0279	4,0604
LMA-PUJ 37	0,0000	251,8600	2,0566	8,8151
LMA-PUJ 39	0,0000	85,8040	2,1574	3,0031
LMA-PUJ 40	0,0000	82,6770	2,0783	2,8937
LMA-PUJ 46	12,2610	153,4500	2,0396	5,3708
LMA-PUJ 47	0,0000	87,0300	2,0897	3,0461
LMA-PUJ 48	0,0000	99,8020	2,1087	3,4931
LMA-PUJ 54	41,8650	100,5200	2,0000	3,5182
LMA-PUJ 55	0,0000	92,9840	2,1370	3,2544
LMA-PUJ 57	0,0000	443,1130	2,1283	15,5090
LMA-PUJ 58	0,0000	60,0650	2,1786	2,1023
LMA-PUJ 61	0,0000	423,2900	2,1054	14,8152
LMA-PUJ 62	0,0000	89,7410	2,2070	3,1409
LMA-PUJ 63	302,2700	163,1060	1,8524	5,7087
LMA-PUJ 67	0,0000	42,9900	2,0888	1,5047
LMA-PUJ 68	0,0000	339,1000	2,1263	11,8685
LMA-PUJ 70	0,0000	296,3000	2,1487	10,3705
LMA-PUJ 72	0,0000	351,4800	2,1315	12,3018
LMA-PUJ 73	8,0350	453,3200	2,0472	15,8662
LMA-PUJ 74	232,4100	257,1900	1,9463	9,0017
LMA-PUJ 76	1,0110	213,7000	2,0488	7,4795
LMA-PUJ 77	0,0000	150,3000	2,1185	5,2605
LMA-PUJ 79	11,4970	158,5000	2,0405	5,5475
LMA-PUJ 80	0,0000	196,1900	2,0527	6,8667
LMA-PUJ 82*	0,0000	142,4200	2,1311	4,9847
LMA-PUJ 84	107,8500	229,0900	1,9938	8,0182
LMA-PUJ 86	0,0000	286,6100	2,1135	10,0314
LMA-PUJ 105	130,1900	11,7560	1,3417	0,4115
LMA-PUJ 107	17,2800	18,5253	1,9432	0,6484
LMA-PUJ 108	0,0000	32,8010	2,2609	1,1480
LMA-PUJ 109*	0,3430	14,6620	2,0465	0,5132
LMA-PUJ 110*	31,0770	382,3400	2,0395	13,3819
LMA-PUJ 116*	60,9450	8,5470	1,5000	0,2991
LMA-PUJ 117	0,0000	385,4700	2,1100	13,4915
LMA-PUJ 118*	0,0000	261,2400	2,0953	9,1434
LMA-PUJ 120	0,0000	467,1600	2,1018	16,3506
LMA-PUJ 121	0,0000	9,7570	2,1220	0,3415
LMA-PUJ 122	0,0000	245,0900	2,0823	8,5782

LMA-PUJ 125	106,6600	12,6890	1,4421	0,4441
LMA-PUJ 128	36,1710	130,4800	2,0161	4,5668
LMA-PUJ 129	0,0000	161,1600	2,0588	5,6406
LMA-PUJ 130	0,0000	308,7000	2,0906	10,8045
LMA-PUJ 133	0,0000	187,7700	2,1046	6,5720
LMA-PUJ 134	0,0000	272,2400	2,1524	9,5284
LMA-PUJ 136	0,0000	132,9800	2,1453	4,6543
LMA-PUJ 142	0,0000	22,8800	2,2278	0,8008
LMA-PUJ 143	0,0000	128,6700	2,1622	4,5035
LMA-PUJ 144	0,0000	246,9300	2,1442	8,6426
LMA-PUJ 146	0,0000	234,5500	2,1261	8,2093
LMA-PUJ 147	0,0000	340,8500	2,1119	11,9298
LMA-PUJ 149	0,0000	339,0600	2,1142	11,8671
LMA-PUJ 150	0,0000	147,1200	2,1757	5,1492
LMA-PUJ 151*	0,0000	176,2000	2,1896	6,1670
LMA-PUJ 152*	0,0000	333,9400	2,1390	11,6879
LMA-PUJ 154	0,0000	453,7900	2,1078	15,8827
LMA-PUJ 155	0,0000	533,4200	2,0935	18,6697
LMA-PUJ 160	0,0000	423,6300	2,0885	14,8271
LMA-PUJ 161*	0,0000	362,8000	2,1195	12,6980
LMA-PUJ 163	0,0000	597,1300	2,0925	20,8996
LMA-PUJ 164	0,0000	483,8500	2,1074	16,9348
LMA-PUJ 169	0,0000	337,9900	2,1029	11,8297
LMA-PUJ 170	0,0000	552,2700	2,0658	19,3295
LMA-PUJ 171	500,2300	500,6700	1,9362	17,5235
LMA-PUJ 172	0,0000	493,1000	2,1083	17,2585
LMA-PUJ 176	0,0000	581,1400	2,0937	20,3399
LMA-PUJ 177	0,0000	4,3750	2,6071	0,1531
LMA-PUJ 178	0,7880	8,7810	2,0385	0,3073
LMA-PUJ 179	0,0000	458,3900	2,1178	16,0437
LMA-PUJ 181	0,0000	486,5600	2,1000	17,0296
LMA-PUJ 185	0,0000	4,6930	3,7895	0,1643
LMA-PUJ 186	0,0000	500,2600	2,1295	17,5091
LMA-PUJ 194	33,7882	20,5053	3,5293	0,7177
LMA-PUJ 195	0,0000	613,5300	2,0914	21,4736

^a Volumen final de extracción de ADNg = 165 µL por muestra.

Fuente: Propia del grupo de investigación GBAI.

^b Laboratorio de Microbiología de Alimentos - Pontificia Universidad Javeriana (LMA-PUJ)

* Muestras aleatorias tomadas para el análisis de la calidad del DNAg extraído en la electroforesis

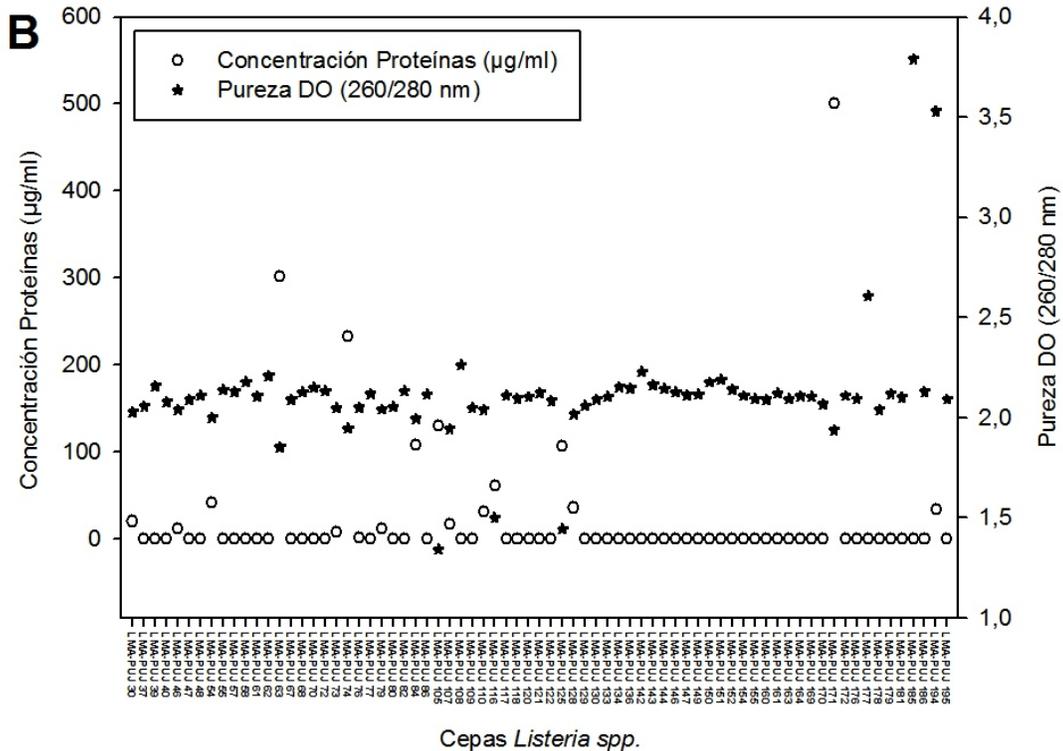
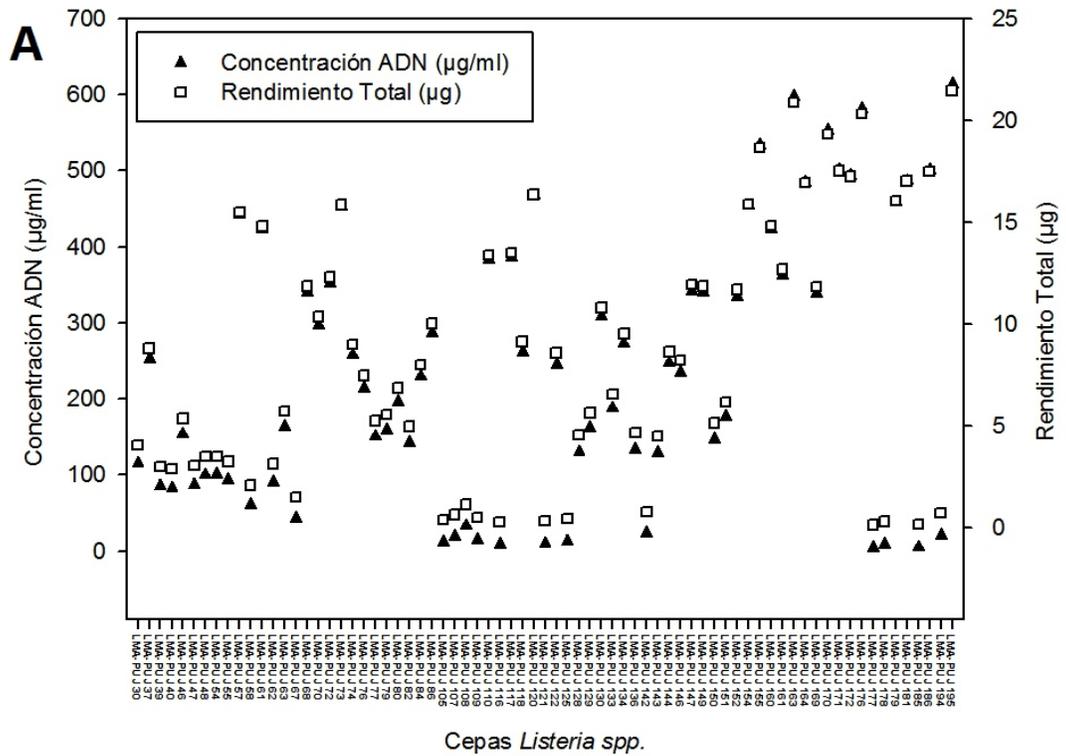


Figura 1. A: Relación entre la concentración del ADN y el rendimiento total del banco de ADN genómico (ADNg) de *Listeria spp.*

B: Relación entre la concentración de proteínas y pureza del banco de ADN genómico (ADNg) de *Listeria spp.*

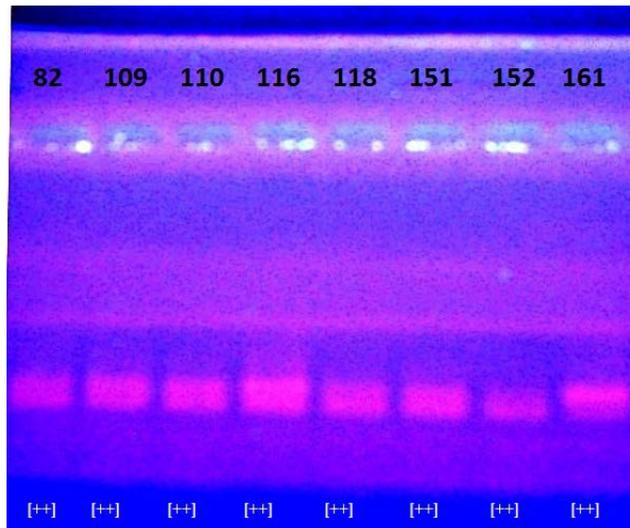


Figura 2. Resultados de la electroforesis en gel de agarosa al 1% (p/v) del muestreo aleatorio del banco de ADNg. [++] Bandas fuertes indicando alta concentración de ADNg extraído.

8. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

Se extrajo el ADN genómico (ADNg) de los 73 aislamientos de *Listeria spp.* (100%) del laboratorio de Microbiología de Alimentos del Grupo de Biotecnología Ambiental e Industrial (GBAI).

Se concluye que factores como la variabilidad en los datos, amplios rangos de desviación estándar y oscilantes coeficientes de variación son atribuidos a la experticia del personal en momentos “claves” de la extracción de ADNg. Las posibles causas que generaron estas desviaciones se fundamentaron al factor humano (manipulación y experiencia); la posible contaminación del DNA; y varios reactivos empleados en la extracción como son los detergentes, la lisozima, el NaOH, los alcoholes, y el EDTA los cuales producen interferencias con los resultados esperados.

Para posteriores construcciones de bancos genómicos se recomienda realizar una validación del operario.

9. AGRADECIMIENTOS

A mis adorados hermanos, mis mejores amigos; mi cariñosa Mama Olga; mi Tía María Trinidad Infante Noguera por abrirnos las puertas su hogar y compartir con su familia todos esos momentos de felicidad; a mi Padre Alfonso Rafael Escobar Nieves por haberme

apoyado indefinidamente a lo largo de mi carrera profesional; y a mi Madre Ada Isabel Peñalver Noguera por ser la fuente inspiradora de mi espíritu y sueños. ¡Los Amo Papi y Mami!

También le agradezco al Doctor Raúl Alberto Poutou Piñales por confiar y creer en mí persona cuando más lo necesite y abrirme generosamente las puertas del Grupo de Biotecnología Ambiental e Industrial (GBAI).

10. BIBLIOGRAFIA

1. Rocourt J. The Genus *Listeria* and *Listeria monocytogenes*: Phylogenetic Position, Taxonomy, and Identification, in Ryser ET, Marth, E.H., (Eds). *Listeria, Listeriosis and Food Safety*. Marcel Dekker Inc, 2nd, New York, 1999, p. 1-20.
2. Seeliger HPR, Jones D. Genus *Listeria* Pirie., in Sneath PHA, Mair, N.S., Sharpe, M.E., Holt, J.G., (Eds). *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Williams and Wilkins, 7th edn, Baltimore, 1986, p. 1235-1245.
3. Grau F, Vanderlinde P. Growth of *Listeria monocytogenes* on Vacuum Packaged Beef, *Journal of Food Protection* 1990; **53**: 739-741.
4. Snapir YM, Vaisbein E, Nassar F. Low Virulence but Potentially Fatal Outcome *Listeria ivanovii*, *European Journal of Internal Medicine* 2006; **17**: 286-287.
5. Leclercq A, Clermont D, Bizet C, Grimont PAD, Le Fleche-Mateos A, Roche SM, Buchrieser C, Cadet-Daniel V, Le Monnier A, Lecuit M, Allerberger F. *Listeria rocourtiae* sp. nov., *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 2009; **60**: 2210-2214.
6. Graves LM, Helsel LO, Steigerwalt AG, Morey RE, Daneshvar MI, Roof SE, Orsi RH, Fortes ED, Milillo SR, den Bakker HC, Wiedmann M, Swaminathan B, Saunders BD. *Listeria marthii* sp. nov., isolated from the natural environment, Finger Lakes National Forest, *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 2010; **60**: 1280-1288.
7. Korkeala H, Siitonen A. *Listeria monocytogenes*. Isolates from Invasive Infections: Variation of Sero-and Genotypes During an 11 Year Period in Finland, *Journal of Clinical Microbiology* 2003; **41** (4): 1694-1700.
8. Kells J, Gilmour A. Incidence of *Listeria monocytogenes* in Two Milk Processing Environments, and Assessment of *Listeria monocytogenes* Blood Agar for Isolation, *International Journal of Food Microbiology* 2004; **91**: 167-174.
9. Wesley IV. Listeriosis in Animals, in Ryser ET, Marth, E.H., (Eds). *Listeria, Listeriosis and Food Safety*. Marcel Dekker, Inc, 2nd, New York, 1999, p. 39-73.
10. Vázquez J, Domínguez G, González B, Kreft J, Goebel W. Pathogenicity Islands and Virulence Evolution in *Listeria*, *Microbes and Infection* 2001; **3**: 571-584.
11. Vázquez J, Kuhn M, Berche P, Chakraborty T, Domínguez G, Goebel W, González B, Wehland J, Kreft J. *Listeria* Pathogenesis and Molecular Virulence Determinants, *Clinical Microbiology Reviews* 2001; **14** (3): 584-640.

12. Vázquez JA, Gamallo JA, Ripio MT, Domínguez G, Lara M, Vega Y, Mainar RC, Suárez M. Listeria Pathogenesis and Molecular Virulence Determinants, *Clinical Microbiology Reviews* 2001; **14** (3): 584-640.
13. Chen Y, Ross WH, Scott VN, Gombas DE. *Listeria monocytogenes*: Low Levels Equal Low Risk, *Journal of Food Protection* 2003; **66** (4): 570-577.
14. Murray EGD, Webb RA, Swann MBR. A Disease of Rabbits Characterised by a Large Mononuclear Leucocytosis, Caused by a Hitherto Undescribed Bacillus *Bacterium monocytogenes* (n.s.p.). *Journal of Pathology and Bacteriology* 1926; **29**: 407-439.
15. Schuchat A, Swaminathan B, Broome CV. Epidemiology of Human Listeriosis, *Clinical Microbiology Review* 1991; **4**: 169-183.
16. Torres KJ, Sierra SC, Poutou RA, Vera H, Carrascal AK, Mercado M. Incidencia y Diagnóstico De *Listeria monocytogenes*; Microorganismo Zoonótico Emergente En La Industria De Alimentos, *Revista UDCA Actualidad & Divulgación Científica* 2004; **7** (1): 25-57.
17. Belalcazar ME, Poutou RA, Torres KJ, Gallegos JM, Torres O, Carrascal AK. *Listeria monocytogenes* y Listeriosis Animal, *Revista UDCA Actualidad y Divulgación Científica* 2005; **8** (2): 95-101.
18. Ababouch L. Potential of Listeria Hazard in African Fishery Products and Possible Control Measures, *International Journal of Food Microbiology* 2000; **62**: 211-215.
19. Bojsen-Moller J. Human Listeriosis: Diagnostic, Epidemiologic and Clinical Studies, *Acta Pathology Microbiology Scandinavian* 1972; **229**: 72-92.
20. Gallego MI, Torres O, Soto Y, Duque DC, Benítez C. Determinación de Portadores de *Listeria sp.* en un Conglomerado Lechero de la Vereda Puente de Piedra del Municipio de Madrid (Cundinamarca, Colombia), *Revista Universidad de Ciencias Aplicadas y Ambientales (UDCA)* 2003; **6** (1): 49-56.
21. Crespo MP, Vélez JD, Castañeda C, Hoyos F, López ML, Salazar JC. Aislamiento de *Listeria monocytogenes* en un Hospital de Tercer Nivel, *Colombia Médica* 1999; **30** (2): 89-98.
22. Mohammad Ali S, Mahnaz S, Mahmood T. Rapid genomic DNA extraction (RGDE), *Forensic Science International: Genetics Supplement Series 1* 2008: 63-65.
23. Liu L, Conner PO, Cotter PD, Hill C, Ross RP. Controlling *Listeria monocytogenes* in Cottage cheese through heterologous production of enterocin A by *Lactococcus lactis*, *Journal of Applied Microbiology* 2008; **104** (4): 1059-1066.
24. Rossen L, Norskov P, Holmstrom K, Rasmussen OF. Inhibition of PCR by Components of Food Samples, Microbial Diagnostic Assays and DNA-extraction Solutions, *International Journal of Food Microbiology* 1992; **17**: 37-45.
25. Spaniolas S, Tsachaki M, Bennett MJ, Tucker GA. Evaluation of DNA extraction methods from green and roasted Coffee beans, *Food Control* 2008; **19**: 257-262.
26. Bell C, Kyriakides A, *Listeria: Una Aproximación Práctica al Microorganismo y su Control*, ed., Acibia S.A., Zaragoza 2000, 1-230p.
27. Sierra SC, Poutou RA, Carrascal AK, Torres KJ, Mercado M. Validación de PCR para Detección de *Listeria monocytogenes* en Quesos Frescos, *Revista UDCA Actualidad y Divulgación Científica* 2004; **7** (2): 53-65.
28. Frazier WC, Westhoff DC, *Microbiología de los Alimentos*, ed., Acibia S.A., Zaragoza 1993, 3-319p.

29. Torres KJ, Sierra SC, Poutou RA, Carrascal AK, Mercado M. Patogénesis de *Listeria monocytogenes*, Microorganismo Zoonótico Emergente, *Revista MVZ-Córdoba* 2005; **10** (1): 511-543.
30. Low JC, Donachie W. A Review of *Listeria monocytogenes* and Listeriosis, *Veterinary Journal* 1997; **153**: 9-29.
31. Marth EH. Disease Characteristics of *Listeria monocytogenes*, *Food Technology* 1988; **42**: 165-168.
32. Pinner RW, Schuchat A, Swaminathan B, Hayes P, Deaver K, Weaver R, Plikaytis B, Reeves M, Broome C, Wenger J. Role of Foods in Sporadic Listeriosis II. Microbiologic and Epidemiologic Investigation, *Journal of the American Medical Association*. 1992; **267**: 2046-2050.
33. Schuchat A. Listeriosis and Pregnancy: Food for Thought, *Obstetric Gynecology Surveillance* 1997; **52**: 721-722.
34. Dalton CB, Austin C, Sobel J, Hayes P, Bibb W, Graves L, Swaminathan B, Proctor M, Griffin PM. An Outbreak of Gastroenteritis and Fever Due to *Listeria monocytogenes* in Milk, *The New England Journal of Medicine* 1997; **336** (2): 100-105.
35. Hof H. *Listeria monocytogenes*: A Causative Agent of Gastroenteritis?, *European Journal Clinical Microbiology Infection Disease* 2001; **20**: 369-373.
36. Graham J, Lanser S, Bignardi G, Pedler S, Hollyoak V. Hospital Acquired Listeriosis, *Journal of Hospital Infection* 2002; **51**: 136-139.
37. King MA, Jeffree SJ. MRI of an Abscess of the Cervical Spine in a Case of *Listeria meningoenzephalitis*, *Neuroradiology* 1993; **35**: 495-496.
38. Pfadenhauer K, Rossmannith T. Spinal Manifestation of Neurolisteriosis, *Journal of Neurology* 1995; **242**: 153-156.
39. Mylonakis E, Hohmann EL, Canderwood SB. Central Nervous System Infection with *Listeria monocytogenes*. 33 Years Experience at a General Hospital and Review of 776 Episodes From The Literature, *Medicine* 1998; **77** (5): 313-336.
40. Ireton K, Payrastra B, Chap H, Ogawa W, Sakave H, Kasuga M, Cassart P. A Role for Phosphoinositide 3 - kinase in Bacterial Invasion, *Science* 1996; **274**: 780-781.
41. Polnau U, Braun MG, Van den Boom H, Becker-Capeller D. Listerienarthritis bei Chronischer Polyarthritis unter Low Dose Prednisolon und Methotrexat Therapie, *Zeitschrift fur Rheumatologie* 2001; **60**: 41-46.
42. Rohde H, Horstkotte MA, Sobottka I, Klose H, Mack D. Spontaneous Bacterial Peritonitis due to in a Patient with Primary Pulmonary Hypertension, *European Journal Clinical Microbiology Infection Disease* 2002; **21**: 323-325.
43. McLauchlin J. The Relationship Between *Listeria* and Listeriosis, *Food Control* 1996; **7** (4): 187-193.
44. McLauchlin J. The Role of the Public Health Laboratory Service in England and Wales in the Investigation of Human Listeriosis During the 1980`s -1990`s, *Food Current* 1996; **7**: 235-239.
45. Czuprynski CJ. *Listeria*, in Gyles CL, Thoen, C.O., (Eds). *Pathogenesis of bacterial infections in animals*. Iowa State University Press, 2, Iowa, 1993, p. 70-79.
46. Charlton KM. Spontaneous Listeric Encephalitis in Sheep (Electron Microscopic Studies), *Veterinary Pathology* 1997; **14**: 429-434.
47. Rebhun WC, Guard C, Richards CM, *Enfermedades del Ganado Vacuno Lechero*, ed., Acribia, S.A Zaragoza, España 1995, 531-535p.

48. Nightingale KK, Schukken YH, Nightingale CR, Fortes ED, Ho AJ, Her Z, Grohn YT, McDonough PL, Wiedmann M. Ecology and Transmission of *Listeria monocytogenes* Infecting Ruminants and in the Farm Environment, *Applied and Environmental Microbiology* 2004; **70** (8): 4458-4467.
49. Doyle MP, Class KA, Beery JT, García GA, Pollard DJ, Schultz RD. Survival of *Listeria monocytogenes* in Milk During High-temperature, Short-time Pasteurization, *Applied and Environmental Microbiology* 1987; **53**: 1433-1438.
50. Donnelly CW, Brackett RE, Doores S, Lee WH, Lovett J. "Listeria", in, (Eds). *Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods*. American Public Health Association, Third, Washington, 1992, p. 637-663.
51. Donnelly CW. Conventional Methods to Detect and Isolate *Listeria monocytogenes*, in Ryser ET, Marth, E.H., (Eds). *Listeria, Listeriosis and Food Safety*. Marcel Dékker, 2nd, New York, 1999, p. 225-260.
52. Pascual M, Calderón V, *Microbiología Alimentaria*, ed., Díaz de Santos, Madrid 1999, 171-208p.
53. Burbano EM. *Validación De PCR Para La Detección De Listeria monocytogenes En Leches*, **Tesis de Maestría**. Departamento de Microbiología. Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá, D.C., 2002, 125p.
54. Blais BW, Phillippe LM. A Simple RNA Probe System for Analysis of *L. monocytogenes* Polymerase Chain Reaction Products., *Applied and Environmental Microbiology* 1993; **59** (9): 2795 - 2800.
55. Crandall D, Montville J. Nisin Resistance in *Listeria monocytogenes* ATCC 700302 is a Complex Phenotype, *Applied and Environmental Microbiology* 1998; **64** (1): 231 - 237.
56. Poutou RA, Burbano ME, Sierra SC, Torres KJ, Carrascal AK, Mercado M. 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* 2005; **10** (2): 61-78.
57. Swaminathan B, Feng P. Rapid Detection of Food-borne Pathogenic Bacteria, *Annual Reviews of Microbiology* 1994; **48**: 401-426.
58. Torres KJ. *Validación De PCR Para Detección de Listeria monocytogenes En Carnes Crudas de Res y Pollo*, **Tesis de Maestría**. Departamento de Microbiología. Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá D.C., 2004, 251p.
59. Loessner MJ, Rudolf M, Scherer S. Evaluation of Luciferase Reporter Bacteriophage A511: luxAB for Detection of *L. monocytogenes* in Contaminated Foods, *Applied and Environmental Microbiology* 1997; **63** (8): 2961-2965.
60. Klinger JD, Johnson A, Croan D, Flynn P, Whippie K, Kimball M, Lawrie J, Curiale M. Comparative Studies of Nucleic Acid Hybridization Assay for Listeria in Foods, *Journal of the Association of Official Analytical Chemistry* 1988; **71** (3): 669-673.
61. Bobbitt JA, Betts RP. Confirmation of *Listeria monocytogenes* Using a Commercially Available Nucleic Acid Probe, *Food Microbiology* 1992; **9**: 311-317.
62. Ninet B, Bannerman E, Bille J. Assessment of the Accuprobe *Listeria monocytogenes* Culture Identification Reagent Kit for Rapid Colony Confirmation and its Application in Various Enrichment Broths, *Applied and Environmental Microbiology* 1992; **58**: 4055-4059.

63. Allerberger F. Listeria: Growth, Phenotypic Differentiation and Molecular Microbiology, *FEMS Immunology and Medical Microbiology* 2003; **35**: 183-189.
64. Makino S, Okada Y, Maruyama T. A New Method for Direct Detection of *Listeria monocytogenes* From Food by PCR, *Applied and Environmental Microbiology* 1995; **61** (10): 3745-3747.
65. Boerlin P, Piffaretti JC. Typing of Human, Animal, Food and Environmental Isolates of *Listeria monocytogenes* by Multilocus Enzyme Electrophoresis, *Applied and Environmental Microbiology* 1991; **57**: 1624-1629.
66. Boerlin P, Bannerman E, Bille J, Jemmi T. Typing *Listeria monocytogenes* Isolates from Fish Products and Human Listeriosis Cases, *Applied and Environmental Microbiology* 1997; **63** (4): 1338-1343.
67. De Boer E, Beumer RR. Methodology for Detection and Typing of Foodborne Microorganisms, *International Journal of Food Microbiology* 1999; **50**: 119-130.
68. Jersek B, Gilot P, Gubina M, Klun N, Mehle J, Tcherneva E, Rijpens N, Herman L. Typing of *Listeria monocytogenes* Strains by Repetitive Element Sequence-Based PCR, *Journal of Clinical Microbiology* 1999; **37** (1): 103-109.
69. Cai S, Kabuki DY. Rational design of DNA sequence- based strategies for subtyping *Listeria monocytogenes*, *Journal of Clinical Microbiology* 2002; **40**: 3319-3325.
70. Medrano MV, Restrepo S, Vanegas MC. Tipificación Molecular de *Listeria monocytogenes* aisladas de muestras clínicas y alimentos, *Biomédica* 2006; **26**: 442-450.
71. Mossel DAA. *Listeria monocytogenes* in foods. Isolation, characterization and control, *International Journal of Food Microbiology* 1998; **8**: 183-195.
72. Curiale MS, Sons T, Fanning L, Lepper W, McIver D, Garramone S, Mozola M. Desoxyribonucleic Acid Hybridization Method for the Detection of *Listeria* in Dairy Products, Seafoods, and Meats: Collaborative Study, *Journal AOAC International* 1994; **77**: 602-617.
73. Olsen JE, Aabo S, Hill W, Notermans S, Wernars K, Granum PE, Popovic T, Rasmussen HN, Olsvik O. Probes and Polymerase Chain Reaction for Detection of Food-borne Bacterial Pathogens, *International Journal of Food Microbiology* 1995; **28**: 1-78.
74. Zhang W, Jayarao B, Knabel S. Multi-Virulence-Locus Sequence Typing of *Listeria monocytogenes*, *Applied and Environmental Microbiology* 2004; **70** (2): 913-920.
75. Graves L, Swaminathan B, Hunter S, *Subtyping Listeria monocytogenes in Listeria, Listeriosis and Food Safety*, ed., Marcel Dekker Inc, New York 1999, 299-358p.
76. Meza RA, Monroy AF, Mercado M, Poutou RA, Rodríguez P, Pedroza AM. Study of the Stability in Real Time of Cryopreserved Strain Banks, *Universitas Scientiarum* 2004; **9** (2): 35-42.
77. Torres KJ, Poutou RA, Carrascal AK, Sierra SC, Mercado M. Validación de PCR para Detección de *Listeria monocytogenes* en Carnes Crudas de Res y Pollo, *Revista MVZ-Córdoba* 2004; **9** (2): 414-427.
78. Gallegos JM. *Ocurrencia de Listeria spp. en diferentes alimentos y regiones de Colombia. Susceptibilidad antimicrobiana de L. ivanovii.*, **Tesis de Maestría**. Departamento de Microbiología. Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá, D.C., Colombia, 2007, 170pp.

79. Sambrook J, Russell DW, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3th Edition ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York 2001, 2100p.p.
81. Promega Corporate. <<http://www.promega.com/enotes/faqspeak/fq0059.htm>>. Consultado: 29-10-2010. .
82. Valdés J, Mantilla E, Márquez G, Bonilla RM, Lugo VM, Pérez M, García Y, Narciandi E. Improving the expression of Human Epidermal Growth Factor in *Saccharomyces cerevisiae* by manipulating culture conditions, *Biotecnología Aplicada* 2009; **26**: 34-38.
83. Weiss A, Jerome V, Freitag V. Comparison of strategies for the isolation of PCR-compatible, genomic DNA from a municipal biogas plants, *Journal of Chromatography B* 2007; **853**: 190-197.
84. Mantilla JR. Manual de tecnicas basicas en biologia molecular. Editorial Universidad Nacional de Colombia, 2006: Capítulos 5-2 - 7-4 p.p.