

**Utilidad de la Electroforesis en Gel de Campo Pulsado (PFGE) para la
tipificación molecular de *Listeria monocytogenes***

ÁNGELA MARÍA CARDOZO BERNAL

TRABAJO DE GRADO

**Presentado como requisito parcial
Para optar al título de**

MICROBIÓLOGA INDUSTRIAL

**PONTIFICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA
FACULTAD DE CIENCIAS
CARRERA DE MICROBIOLOGÍA INDUSTRIAL**

**Bogotá, D.C., Colombia
Noviembre de 2012**

Utilidad de la Electroforesis en Gel de Campo Pulsado (PFGE) para la tipificación molecular de *Listeria monocytogenes*

ÁNGELA MARÍA CARDOZO BERNAL

APROBADO

Raúl A. Poutou-Piñales, BQ., M.Sc., Ph.D.

Director

Ana Karina Carrascal Bact., M.Sc.

Jurado

Utilidad de la Electroforesis en Gel de Campo Pulsado (PFGE) para la tipificación molecular de *Listeria monocytogenes*

ÁNGELA MARÍA CARDOZO BERNAL

APROBADO

Ingrid Schuler García, Ph.D.

Decana Académica Facultad Ciencias

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

Directora Carrera Microbiología

NOTA DE ADVERTENCIA

“La universidad no se hace responsable por los conceptos emitidos por sus alumnos en sus trabajos de tesis. Sólo velará porque no se publique nada contrario al dogma y 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 justicia”

Artículo 23 de la Resolución No. 13 de Julio de 1946

Tabla de contenido

Tabla de Abreviaturas y Composición de Buffers	6
Resumen	7
Abstract	8
1.0. Introducción.....	9
2.0. Justificación.....	11
3.0. Marco teórico.....	12
3.1. Género <i>Listeria</i>	12
3.2. Miembros del género <i>Listeria</i>	12
3.3. Listeriosis en humanos y animales.....	13
3.4. <i>Listeria monocytogenes</i> como microorganismo zoonótico y emergente en la industria de alimentos.....	14
3.5. Orígenes de la Electroforesis en Gel de Campo Pulsado.....	16
3.6. Tipos y variantes de la Electroforesis en Gel de Campo Pulsado.....	16
3.6.2. "Orthogonal Field-Alternating Gel Electrophoresis" (OFAGE).....	17
3.6.3. "Transverse Alternating-Field Electrophoresis" (TAFE).....	17
3.6.4. "Field Inversion Gel Electrophoresis" (FIGE).....	17
3.6.5. "Contour-clamped Homogeneous Electric Field" (CHEF).....	18
3.6.6. "Rotating Gel Electrophoresis" (RGE).....	18
3.7. Usos generales de la Electroforesis en Gel de Campo Pulsado.....	20
4.0. Objetivos.....	21
4.1. Objetivo general.....	21
4.2. Objetivos específicos.....	21
5.0. Metodología.....	22
5.1. Tipo de estudio: Monografía.....	22
5.2. Procedimiento:.....	22
5.3. Obtención de datos.....	22
6.0. Resultados y discusión.....	23
6.1. Obtención de datos.....	23
Tabla 2. Número de artículos encontrados y seleccionados en las diferentes bases de datos empleadas.....	23
Tabla 3. Tipo de PFGE y enzimas utilizadas y resultados relevantes en los artículos revisados.....	24
Tabla 4. Protocolos para PFGE de <i>L. monocytogenes</i> y métodos de análisis de patrones de restricción en los artículos revisados.....	38
6.1.1. Técnicas empleadas en estudios de epidemiología molecular de <i>L. monocytogenes</i> ..	57
6.1.2. La Electroforesis en Gel de Campo Pulsado (PFGE) en el estudio de la epidemiología molecular de <i>L. monocytogenes</i>	58
Tabla 5. Características de las enzimas endonucleasas de restricción utilizadas en la PFGE para <i>L. monocytogenes</i>	59
Tabla 6. Nomenclatura de los linajes genéticos de <i>L. monocytogenes</i> en los artículos revisados.....	64
7.0. Conclusiones.....	66
Financiación	66
Conflicto de intereses	66
8.0. Referencias.....	67

Tabla de Abreviaturas

Abreviatura	Descripción
AFLP	<i>Amplified fragment length polymorphism</i>
<i>Apa</i> I	Enzima de restricción obtenida de <i>Acetobacter pasteurianus</i> sub. <i>Pasteurianus</i>
AP-PCR	<i>Arbitrary primer PCR</i>
<i>Asc</i> I	Enzima de restricción obtenida de <i>Arthrobacter</i> sp.
CDC	<i>Centers for Disease Control and Prevention</i>
CFGE	<i>Continuous field gel electrophoresis</i>
CHEF	<i>Contour-clamped Homogeneous Electric Field</i>
ETA	Enfermedad transmitida por alimentos
FIGE	<i>Field Inversion Gel Electrophoresis</i>
GBAI	Grupo de Biotecnología Ambiental e Industrial
MEE	<i>Multilocus enzyme electrophoresis</i>
MLGT	<i>Multilocus genotyping</i>
MLST	<i>Multilocus sequence typing</i>
MLVA	<i>Multiple-Locus Variable number of tandem repeat Analysis</i>
<i>Not</i> I	Enzima de restricción obtenida de <i>Nocardia otitidis-caviarum</i>
OFAGE	<i>Orthogonal Field-Alternating Gel Electrophoresis</i>
PACE	<i>Programmable autonomously controlled electrodes</i>
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
PFGE	<i>Pulsed Field Gel Electrophoresis</i>
RAPD	<i>Random Amplification of Polymorphic DNA</i>
RFLP	<i>Restriction fragment length polymorphism</i>
RGE	<i>Rotating Gel Electrophoresis</i>
SDI o DI	<i>Simpson's diversity index</i> ó <i>Diversity index</i>
<i>Sma</i> I	Enzima de restricción obtenida de <i>Serratia marcescens</i>
SNC	Sistema Nervioso Central
<i>Sse</i> 8387I	Enzima de restricción obtenida de <i>Streptomyces</i> sp. 8387
TAFE	<i>Transverse Alternating-Field Electrophoresis</i>
TR	<i>Tandem repeat</i>
UPGMA	<i>Unweighted Pair Group Method using Arithmetic averages</i>
ZIFE	<i>Zero-integrated field electrophoresis</i>

Tabla de Composición de Buffers

TBE	89mM Tris, 89mM ácido bórico [pH 8,4], 2mM EDTA
TE	10mM Tris-HCl [pH 7,6], 1mM EDTA [pH 8]
TEEN	10 mM Tris-HCl, 10 mM EDTA, 10mM EGTA, 1 M NaCl [pH 8]
TN	10mM Tris-HCl [pH 7,6], 1M NaCl

Resumen

El objetivo principal de este trabajo fue determinar mediante una revisión bibliográfica si la Electroforesis en Gel de Campo Pulsado (PFGE) es la herramienta molecular más adecuada para la tipificación y diferenciación de aislamientos de *Listeria monocytogenes*. Para cumplir este objetivo se seleccionaron 70 artículos científicos, los cuales fueron organizados y tabulados por año de publicación, desde 1992 hasta el 2012; lo que permitió obtener información como, el tipo de PFGE y las enzimas de restricción utilizadas, el protocolo empleado y la metodología de análisis de los patrones de bandeo. Se encontró que la PFGE permite la separación de moléculas de ADN de alto peso molecular (hasta 10Mpb) a través del uso de enzimas de restricción que cortan el ADN de *L. monocytogenes* con una baja frecuencia; generando patrones de restricción simples (10-20 bandas) lo que simplifica el análisis, el cual se realiza a través de un software que permite la comparación rápida y fácil de los aislamientos. La PFGE ha demostrado tener mayor poder discriminativo que la mayoría de técnicas moleculares utilizadas para la tipificación de *L. monocytogenes*. En el protocolo de PFGE estandarizado (variante CHEF) para la subtipificación de *L. monocytogenes* se requiere la combinación de las enzimas de restricción *ApaI* y *AscI*; lo que permite reducir el tiempo de la corrida a 30h. Mediante el análisis y agrupación de los datos obtenidos en PFGE ha sido posible la agrupación de los aislamientos de *L. monocytogenes* en 3 linajes genéticos. La nomenclatura de los linajes varía entre investigadores; sin embargo, por lo general se sabe que en el linaje I están incluidos los serotipos 1/2b, 3b, 4b, 4d, 4e y 7, en el linaje II los serotipos 1/2a, 3a, 1/2c y 3c y en el linaje III, los serotipos 4a y 4c; así como algunas cepas del serotipo 4b. Sin embargo, se ha reportado la existencia de un linaje IV el cual fue identificado por primera vez mediante la técnica MLGT (*Multilocus genotyping*) y se compone de los serotipos 4a, 4b y 4c, los cuales difieren considerablemente de los miembros del linaje III. Ninguno de los artículos científicos revisados menciona la agrupación de cepas del linaje IV a través de la PFGE; lo que sugiere que esta técnica, podría no ser la que mejor para discriminar entre los linajes III y IV.

Palabras clave: Electroforesis en Gel de Campo Pulsado, PFGE, *Listeria monocytogenes*, tipificación molecular.

Abstract

The main objective of this study was to determine through literature review if Pulse Field Gel Electrophoresis (PFGE) is the most appropriate tool for the molecular characterization and differentiation of *Listeria monocytogenes* isolates. To meet this goal we selected 70 scientific papers, which were organized and tabulated by year of publication, since 1992 to 2012, which allowed getting information such as the type of PFGE and restriction enzymes used; the most relevant results, the protocol used and the methodology of analysis of banding patterns. PFGE was found allowing the separation of DNA molecules of high molecular weight (up 10Mpb) through the use of restriction enzymes that cut the DNA of *L. monocytogenes* with a low frequency; generating simple restriction patterns (10-20 bands) thereby simplifying the analysis, which is performed through a software that allows fast and easy comparison of isolates. The PFGE has shown more discriminative power than most used molecular techniques for *L. monocytogenes* typing. The standardized PFGE protocol (CHEF variant) for subtyping of *L. monocytogenes* requires the combination of the restriction enzymes *ApaI* and *AscI*, thus reducing the running time at 30h. By analyzing and clustering data from PFGE was possible grouping *L. monocytogenes* isolates in three genetic lineages. The nomenclature of the lineages varies between researchers; however, generally it is known that lineage I include serotypes 1/2b, 3b, 4b, 4d, 4e, and 7, lineage II serotypes 1/2a, 3a, 3c and 1/2c, and lineage III serotypes 4a and 4c, as well as some strains of serotype 4b. However, it has been reported the existence of a lineage IV which was first identified using the technique MLGT (Multilocus genotyping) and consists of serotype 4a, 4b and 4c, which differ considerably from lineage III members. None of the papers reviewed mentioned the clustering of strains from lineage IV through PFGE; suggesting that this technique may not be the best for discriminating between lineages III and IV.

Key words: Pulsed Field Gel Electrophoresis, PFGE, *Listeria monocytogenes*, molecular typing.

1.0. Introducción

Listeria monocytogenes es un microorganismo Gram-positivo, móvil, no forma esporas y aeróbico facultativo. El género *Listeria* incluye 8 especies, *Listeria monocytogenes*, *Listeria ivanovii* (únicos miembros patógenos del género), *Listeria innocua*, *Listeria seeligeri*, *Listeria welshimeri* y *Listeria grayi* que está lejanamente relacionado con las otras *Listeria* spp., (89), así como 2 nuevas especies que fueron identificadas por primera vez en el 2009 y en el 2010 respectivamente, *Listeria rocourtiae* (64), y *Listeria marthii* (40).

El género *Listeria* está distribuido en el medio ambiente incluyendo el suelo, agua, drenajes, la vegetación (por ejemplo, hierba, prados, bosques), las heces de animales silvestres, granjas, en el ensilaje y en las instalaciones de procesamiento de alimentos. *L. monocytogenes* puede sobrevivir con baja actividad de agua (0,92), por ejemplo, a altas concentraciones de sal y multiplicarse en un rango de temperatura de -1 a 45°C y pH de 4,3 a 9,6 ± 0,2 (115). Debido a que *L. monocytogenes* es un patógeno intracelular transmitido por alimentos, potencialmente letal para humanos y animales, ha sido ampliamente estudiado desde mediados de la década de los 80 (102).

La infección causada por *L. monocytogenes* se conoce como listeriosis y se manifiesta de dos formas: la listeriosis invasiva y la no invasiva. La listeriosis invasiva se presenta principalmente en personas de edades extremas (recién nacidos y ancianos), mujeres embarazadas, personas con enfermedades que causan inmunosupresión y personas que reciben terapia inmunosupresora (29); generando en ésta población de riesgo, meningitis, abortos, septicemia, con una alta tasa de mortalidad (20-30% de los casos) (98). La listeriosis no invasiva por el contrario se ha observado principalmente en algunas epidemias en las que la mayoría de los casos presentaban síntomas de gastroenteritis, como diarrea, fiebre, cefalea y mialgia, tras un período de incubación corto. La listeriosis no invasiva puede afectar a personas sanas, después de la ingestión de un gran número de organismos y por lo general la enfermedad se soluciona espontáneamente (29).

Los brotes de *L. monocytogenes* no son comunes en comparación con los causados por patógenos como *Salmonella* spp. Sin embargo, estos brotes reciben una atención considerable, debido a que suelen tener casos graves e incluso muertes. A menudo son causados por fallas en las plantas de fabricación que no cumplen las regulaciones. Los brotes además, de las consecuencias en salud pública tienen consecuencias económicas importantes, sobre todo si los productos afectan el comercio internacional (115).

La presencia de *L. monocytogenes* en las fábricas de alimentos es de gran preocupación para la industria; de ahí que la detección del microorganismo en la cadena alimentaria y el entorno de la planta sea de primordial importancia. Durante mucho tiempo, numerosos métodos discriminatorios se han descrito para la subtipificación de *L. monocytogenes* (58). La tipificación por Electroforesis en Gel de Campo Pulsado (PFGE) se ha convertido rápidamente en el método estándar de subtipificación para la investigación de brotes de listeriosis (31, 51, 56, 58, (1, 4), debido a que la PFGE utiliza enzimas de restricción que cortan el ADN genómico con una baja frecuencia y por tanto producen perfiles simples (10-20 bandas), el análisis de los patrones resultantes se simplifica mediante el uso de software, lo que permite la comparación rápida y fácil de los

aislamientos (41). La PFGE es una técnica para el fraccionamiento de ADN de alto peso molecular entre 10 Kb a 10 Mb por electroforesis en gel de agarosa con un campo eléctrico alterno en dos direcciones (81). La PFGE tiene varias utilidades en el rastreo, investigación y seguimiento de los brotes, también como la detección temprana por el aumento de alguno de los subtipos usualmente implicados en brotes (111). Por otro lado, en la industria de alimentos la PFGE ha sido empleada en la detección de cepas persistentes en el entorno de procesamiento o de una fuente de contaminación externa (104).

2.0. Justificación

Al ser *L. monocytogenes* un patógeno causante de brotes alimentarios reportados mundialmente, con una tasa de mortalidad alta (20-30%) entre la población de riesgo (115), es importante su identificación, serotipificación así como caracterizar los aislamientos de humanos, animales y alimentos para poder hacer el seguimiento de los brotes y conocer el panorama general de este patógeno en el país. Actualmente, se buscan técnicas rápidas y sensibles que permitan diferenciar los aislamientos y serotipos (119).

La caracterización molecular de bacterias mediante Electroforesis en Gel de Campo Pulsado (PFGE) ha sido aplicada con éxito en la tipificación de *L. monocytogenes* aisladas de diversas fuentes (4); la PFGE se ha convertido rápidamente en el método estándar de subtipificación para la investigación de brotes de listeriosis, debido a que utiliza enzimas de restricción que cortan el ADN genómico con una baja frecuencia y por tanto producen perfiles simples de bandeo (10-20 bandas), el análisis de los patrones resultantes se simplifica, lo que permite la comparación rápida y fácil de los aislamientos (41).

En Colombia existen pocos datos sobre la epidemiología de la listeriosis, debido a que no se diagnostica con frecuencia (bien sea por desconocimiento o por manifestarse de manera no invasiva) y por lo tanto, existe un subregistro epidemiológico (100). Lo anterior ha despertado interés en la búsqueda de técnicas moleculares rápidas y específicas como la PCR y sus variantes (RCR múltiple, qPCR, RAPD), (50, 64, 82) para la identificación y serotipificación de *L. monocytogenes* en el país.

Con éste trabajo de grado se pretende esclarecer si la PFGE es la técnica más adecuada para la tipificación, diferenciación y clasificación de aislamientos de *Listeria monocytogenes*, cuales son las condiciones de funcionamiento y cómo deben interpretarse los patrones de bandeo obtenidos, con el fin de establecerla como técnica molecular para la caracterización de los aislamientos de *L. monocytogenes* independientemente de su procedencia.

El laboratorio de Microbiología de Alimentos del Grupo de Biotecnología Ambiental e Industrial (GBAI) del Departamento de Microbiología en la Pontificia Universidad Javeriana a través de tres de sus líneas de investigación (Microorganismos Emergentes en la Industria de Alimentos, Biología Molecular y Biotecnología, y Control de Calidad en la Industria) ha venido desarrollando diversos trabajos encaminados a levantar la línea base relacionada con la información, evaluación de riesgo, inocuidad de alimentos, epidemiología, caracterización molecular, epidemiología y control de *L. monocytogenes* (2, 5, 11, 12, 25, 26, 64, 68-70, 72, 80-82); por lo cual la implementación de la PFGE como técnica de rutina en la caracterización de estos aislamientos es una necesidad inmediata.

3.0. Marco teórico

3.1. Género *Listeria*

La primera cepa de *L. monocytogenes* fue aislada en 1924 después de un brote en conejos y conejillos de indias que presentaron mononucleosis como consecuencia de la infección. La listeriosis se describió por primera vez a finales de la década de 1920 y se propuso que la contaminación ocurría por vía oral. Esta hipótesis se confirmó en la década de 1960, y posteriormente, una serie de brotes en los países industrializados durante la década de 1980 permitieron confirmar definitivamente que *L. monocytogenes* era el agente causante de la listeriosis transmitida por los alimentos (60).

El género *Listeria* incluye 8 especies, *Listeria monocytogenes*, *Listeria ivanovii* (únicos miembros patógenos del género), *Listeria innocua*, *Listeria seeligeri*, *Listeria welshimeri* y *Listeria grayi* que está lejanamente relacionado con las otras *Listeria* spp., (89), así como 2 nuevas especies que fueron identificadas por primera vez en el 2009 y en el 2010; respectivamente, *Listeria rocourtiae* (64) y *Listeria marthii* (40).

Listeria spp., se caracteriza por ser un bacilo Gram-positivo, aerobio o anaerobio facultativo, corto, no ramificado, no formador de esporas, no encapsulado, con extremos redondeados; algo más pequeño que la mayoría de los bacilos Gram-positivos. Las células más viejas son Gram-variables. Pueden aparecer con forma cocoide. Dispuestos en forma aislada y en cadenas cortas; rara vez aparecen como filamentos largos excepto en cultivos viejos. *Listeria* spp., es catalasa positivo, oxidasa negativo y su temperatura óptima de crecimiento es de 30-37°C (72). Es resistente a condiciones extremas, tales como temperaturas bajas o alta concentración de sal; lo que permite a la bacteria tener una gran capacidad de adaptación a su entorno, por lo que se encuentra de nichos, incluyendo humanos, animales y alimentos procesados (60).

3.2. Miembros del género *Listeria*

L. monocytogenes es un patógeno intracelular, transmitido por los alimentos, potencialmente letal para los seres humanos y animales, y por esto sus características y mecanismos de virulencia han sido estudiados desde mediados de 1980. *L. ivanovii* es también de gran importancia económica, ya que es patógeno en rumiantes (102). Se reconocen 13 serotipos de *L. monocytogenes* (1/2a, 1/2b, 1/2c, 3a, 3b, 3c, 4a, 4ab, 4b, 4c, 4d, 4e, 7), basados en los antígenos somáticos (O) y flagelares (H), pero hasta el 2002 el 95% de los casos humanos de listeriosis han sido causados por los serotipos 1/2a, 1/2b, y 4b (23).

Listeria ivanovii, antiguamente conocida como *Listeria monocytogenes* serotipo 5, es la otra especie que se considera patógena. Ha sido reportada como patógeno al infectar animales, causando abortos, sepsis neonatal y enteritis. Este organismo también ha sido aislado de animales sanos, portadores humanos y del medio ambiente. Las infecciones humanas por *Listeria ivanovii* son muy raras; sin embargo, se ha reportado recientemente que es un patógeno humano entérico oportunista (110). *L. ivanovii* presenta únicamente el serotipo 5 (60).

Listeria innocua es de particular importancia, ya que es la especie que está genéticamente más relacionada con *L. monocytogenes*, y por lo general coexisten en diferentes nichos. A pesar de que estas dos especies se parecen ecológica, bioquímica y genéticamente, *L. innocua* no es patógena (25). *L. innocua* presenta los serotipos 4ab, 6a y 6b (60).

Listeria seeligeri es una bacteria no patógena que muestra similitudes morfológicas, bioquímicas y moleculares con otras *Listeria* spp., relacionadas (*L. monocytogenes*, *L. ivanovii*, *L. innocua*, *L. grayi* y *L. welshimeri*). Al igual que otras *Listeria* spp., *L. seeligeri* se encuentra en una variedad de entornos incluyendo los alimentos (68). A pesar de no ser patógena, *L. seeligeri* presenta un grupo de genes asociados a virulencia que están presentes también en *L. monocytogenes* y *L. ivanovii* (39), entre estos el gen *hly* que codifica para una listeriolisina-hemolisina, implicada en la patogenicidad de *L. monocytogenes* (65). *L. seeligeri* presenta los serotipos 1/2a, 1/2b, 1/2c, 4b, 4d y 6b (60).

Listeria welshimeri serotipo 6b fue aislado de plantas en descomposición; otros serotipos (1/2a, 1/2b, 6a, 4c y 4f) también han sido reportados para esta especie. Los principales genes determinantes de virulencia en la patogénesis de *L. monocytogenes* no están presentes en *L. welshimeri* (44).

Las cepas de *Listeria grayi* son aisladas en muy baja frecuencia y no son patógenas. En 1992, Rocourt *et al.*, (99) asignaron las especies *L. murrayi* y *L. grayi* a una sola especie, *Listeria grayi*, debido a su semejanza molecular.

Listeria marthii fue incluida al género *Listeria* en el año 2010 por Graves *et al.*, (40) y fue aislada de un ambiente natural en el Finger Lakes National Forest, New York, USA. *L. marthii* exhibe las características típicas del género *Listeria* y al momento no ha sido asociada a enfermedades en humanos o animales.

También, *Listeria rocourtiae* fue incluida en el género *Listeria* en el año 2010 por Leclercq *et al.*, y fue aislada de lechugas en Salzburg (Austria), en el año 2002. *L. rocourtiae* exhibe las características típicas del género *Listeria* y la cepa es avirulenta, evaluada por ensayos de cultivo celular y la inoculación de ratones (64).

3.3. Listeriosis en humanos y animales

La infección causada por *L. monocytogenes* se conoce como listeriosis y se divide formas de manifestación: la listeriosis invasiva y la no invasiva. La listeriosis invasiva incluye a los casos en los que una infección inicial del tejido intestinal por *L. monocytogenes* deriva en la invasión de zonas del organismo que habitualmente son estériles. Los órganos más afectados son el útero grávido, el Sistema Nervioso Central (SNC) y la sangre (98). La listeriosis invasiva se presenta principalmente en personas de edades extremas (recién nacidos y ancianos), mujeres embarazadas, personas con enfermedades de inmunodepresión, y personas que reciben terapia inmunosupresora (29); generando meningitis, abortos, septicemia, con una alta tasa de letalidad (20-30% de los casos) (98).

La patogenicidad de *L. monocytogenes* se debe a la capacidad para adherirse, invadir y multiplicarse dentro de una gran variedad de células como enterocitos, hepatocitos, fibroblastos, células

endoteliales y células dendríticas. La entrada de la bacteria y la colonización de los tejidos del hospedero se lleva a cabo en cuatro etapas: cruce de la barrera intestinal, multiplicación en el hígado, colonización de útero grávido y feto, y por último invasión del cerebro (116).

La listeriosis no invasiva se ha observado principalmente en algunos brotes en los que en la mayoría de los casos presentaron síntomas de gastroenteritis, como diarrea, fiebre, cefalea y mialgia, tras un período de incubación corto. La gastroenteritis febril puede afectar a personas sanas, después de la ingestión de un alimento con una dosis alta del organismo y por lo general la enfermedad se soluciona espontáneamente (29).

La listeriosis humana y animal fue reconocida por primera vez como una infección causada por una bacteria en la década de 1920, posteriormente llamada *Listeria monocytogenes*. Es una de las 8 especies en el género y la única que se considera un patógeno humano importante (115). *Listeria ivanovii* es la otra especie patógena del género y se considera que es específica para rumiantes, a excepción de casos extremadamente raros de infección en humanos (108). El primer vínculo del organismo a un brote de origen alimentario en 1981 estimuló la investigación y el estudio para determinar la ubicuidad del organismo y su método de transmisión. *L. monocytogenes* fue reconocido como un patógeno importante de transmisión alimentaria cuando la tasa de mortalidad no disminuía con los años, a pesar de que el número de casos parecía ser pequeño en comparación con enfermedades como la salmonelosis y la campilobacteriosis (115).

3.4. *Listeria monocytogenes* como microorganismo zoonótico y emergente en la industria de alimentos

Como se nombró anteriormente, el microorganismo *L. monocytogenes* fue aislado de un conejo enfermo, y fue reconocido como un patógeno veterinario durante al menos 10 años antes de que se sospechara una conexión con la enfermedad humana. Además, las infecciones de *Listeria* transmitidas por los animales eran comunes para los veterinarios desde finales de la década de 1930 (88).

Mientras que los animales infectados y los ambientes agrícolas contaminados rara vez aparecen como la causa directa de infecciones en humanos, los productos alimenticios derivados de animales que no se cocinan antes de su consumo y los alimentos crudos de origen vegetal que han sido contaminados con estiércol de los animales infectados, han presentado vínculos directos entre las infecciones humanas y *L. monocytogenes* (83).

Desde 1981, cuando se reportó el primer brote de listeriosis por alimentos en Canadá, se han notificado brotes ocasionados por diversos alimentos (**Tabla 1**) en donde se ha visto que en la gran mayoría estuvieron involucrados los serotipos 1/2a, 1/2b y 4b (103).

Tabla 1. Brotes de listeriosis. Adaptado de (24, 49, 112, 117, 123)

Año	Locación	No. De casos	No. De muertes	Vehículo implicado / sospechoso	Serotipo
1967-1985	Reino Unido	248	89	ND	ND
1971-1989	Finlandia	58	15	ND	ND
1981	Nueva Escocia, Canadá	41	18	Ensalada de col	4b
1983	Massachusetts, USA	49	14	Leche pasteurizada	4b
1983-1987	Suiza	122	34	Queso Vacherin Mont d'Or	4b
1983-1992	Australia	71	27	ND	ND
1983-1992	Reino Unido	16	6	ND	ND
1985	California, USA	142	48	Queso estilo mexicano	4b
1986	Estados Unidos	179	63	ND	ND
1986	Estados Unidos	36	16	Helados, salami y ortalizas	ND
1986	Estados Unidos	20	0	Vegetales crudos	4b
1987-1989	Reino Unido	366	?	Paté	4b
1989-1990	Dinamarca	26	7	Queso azul	4b
1992	Francia	279	85	Lengua de cerdo en gelatina	4b
1993	Norte de Italia	18	0	Ensalada de arroz	1/2b
1993	Francia	38	10	Rillettes	4b
1994	Illinois, USA	44	0	Leche chocolatada	1/2b
1994-1995	Suiza	9	2	Salmón ahumado	4b
1994-1998	Colombia	19	0	Quesos, leches, legumbres, jugo de hígado crudo	ND
1995	Francia	33	4	Queso Brie de Meaux	4b
1997	Norte de Italia	1566	0	Ensalada de maíz y atún	4b
1997	Suecia	6	0	Trucha arcoíris	ND
1997	Francia	228	14	Queso Livarot	4b
1998	Finlandia		0	Pescado ahumado frío	1/2a
1998-1999	Varios estados, USA	108	14	Perros calientes	4b
1999	Finlandia	25	6	Mantequilla	3a
1999-2000	Francia	10	3	Rillettes	4b
1999-2000	Francia	32	10	Lengua de cerdo en gelatina	4b
2000	Estados Unidos	29	4	Pavo	ND
2000	Varios estados, USA	30	7	Pavo delicatessen - comidas listas para consumo	1/2a
2000	Nueva Zelanda	32	0	Comidas listas para consumo	1/2
2000	Carolina del Norte, USA	13	5	Queso estilo mexicano hecho en casa	4b
2001	California, USA	16	0	Pavo delicatessen - comidas listas para consumo	1/2a
2001	Suecia	48	0	Queso hecho con leche cruda	1/2a
2001	Japón	38	0	Queso	1/2b
2001	Francia	185	-	Lengua de cerdo en gelatina	ND
2002	Varios estados, USA	54	8	Pavo delicatessen - comidas listas para consumo	4b
2002	Quebec, Canadá	17	0	Queso hecho con leche cruda	ND
2003	Texas, USA	12	?	Queso estilo mexicano	4b
2004-2007	USA	135	22	Queso estilo mexicano	ND
2006	Suiza	8	3	Queso Tomme	1/2a
2007	USA	5	3	Leche pasteurizada saborizada	ND
2008	5 provincias, Canadá	65	20	Embutidos	ND
2008	Quebec, Canadá	23	1	Queso blando	ND
2009-2010	Austria y Alemania	14	4	Queso Quargel	1/2a
2011	28 estados, USA	146	31	Melón	1/2a-1/2b

3.5. Orígenes de la electroforesis en gel de campo pulsado

La electroforesis en gel convencional para moléculas de ADN es llevada a cabo mediante la separación de las muestras de ADN en una matriz sólida (comúnmente agarosa o poliacrilamida). Los geles de poliacrilamida son aplicables para moléculas de ADN cuyo tamaño sea de unos pocos pares de kilobases (Kb), mientras que los geles de agarosa trabajan mejor en el rango de tamaño de 0.2-20Kb (19). Utilizando condiciones especiales, la electroforesis en gel de campo estático puede separar moléculas de ADN tan grande como 50 pares de Kilobases (Kb). Sin embargo, en situaciones ordinarias, las moléculas más grandes que 20Kb tendrán la misma área de sección transversal después de que se alinean con el campo eléctrico (11).

Schwartz y Cantor idearon en 1984 una manera de separar las moléculas grandes de ADN (hasta 10Mb) que ha tenido una amplia gama de aplicaciones (81). Este método utiliza una nueva forma de electroforesis en gel en el que el ADN viaja a través de un gel de agarosa concentrado bajo la influencia de dos campos eléctricos. Los dos ángulos de los campos se encuentran cerca a la perpendicularidad, no son uniformes en la intensidad de campo, y son alternadamente cambiantes o pulsados. En general se supone que en concentraciones altas de gel y con tensiones elevadas, las moléculas grandes de ADN deben ser elongadas a lo largo de la dirección del campo con el fin de penetrar en los poros del gel. Cuanto más grande sea la molécula de ADN, mayor será el tiempo necesario para encontrar la nueva orientación y mayor será el tiempo de retención en el gel (109).

3.6. Tipos y variantes de la Electroforesis en Gel de Campo Pulsado

El término original electroforesis en gel de campo pulsado (PFGE por sus siglas en inglés) se aplicó por Schwartz y Cantor (1984) a cualquier ejecución en gel utilizando múltiples campos eléctricos alternos. Otros nombres (OFAGE, FIGE, TAFE, CHEF, PACE, RGE, CFGE, ZIFE, ST/RIDE) se han dado a los sistemas de electroforesis en campo pulsado que implican variaciones en la geometría del electrodo original, homogeneidad y método de la reorientación de los campos eléctricos (**Figura 1**) (11).

3.6.1. Electroforesis en Gel de Campo Pulsado (PFGE)

En el dispositivo diseñado por Schwartz y Cantor (1984), el campo cambiaba a intervalos determinados en un ángulo de 90°. Un campo era homogéneo y generado por dos filas de electrodos de puntos, el otro campo no era homogéneo y generado por un número de electrodos de puntos como cátodo y un electrodo de punto como ánodo. Este sistema se conoce como "electroforesis en gradiente de campo pulsado" (PFGE). En este sistema, el ángulo entre los vectores de fuerza del campo varía en regiones diferentes de gel (110°-150°), por lo tanto, las moléculas de igual tamaño migran con diferentes velocidades dependiendo de su posición inicial en gel; esto complicaba la comparación de las movilidades electroforéticas de los ADN que se encontraban en los carriles vecinos por lo que es imposible calcular con precisión el tamaño. Otros experimentos demostraron

que un campo no homogéneo no es un requisito obligatorio para la separación exitosa de ADN. Debido a que la mayoría de sistemas actuales se basan en campos homogéneos, la abreviatura de "PFGE" tiene una nueva interpretación (electroforesis en gel de campo pulsado) (81).

3.6.2. "Orthogonal Field-Alternating Gel Electrophoresis" (OFAGE)

Carle y Olson (1984) reportaron otra variante de la técnica, que se denominó Electroforesis en Gel de Campo Alternado Ortogonal (OFAGE). Con esta técnica, consiguieron la separación de moléculas hasta de 750Kb. Los electrodos se encuentran desplegados en ángulos relativos de 45° y el ángulo de reorientación varía de 120° a 150° en las diferentes regiones de gel. A pesar que la mayoría de los carriles de corrido en la OFAGE no son rectos, los carriles centrales rectilíneos sirven de comparación para los carriles vecinos (21).

3.6.3. "Transverse Alternating-Field Electrophoresis" (TAFE)

Gardiner y colaboradores (1986) propusieron un sistema con el gel colocado verticalmente en la cámara y orientando los campos eléctricos alternantes no a lo largo, sino a través del gel. Los autores llaman el sistema "electroforesis de campo alternante transversal" (TAFE). La palabra "transversal" se refiere a la orientación del vector de intensidad de campo con respecto al plano de gel. El campo en este sistema es no homogéneo, como el ángulo de reorientación aumenta desde la parte superior de gel a la parte inferior de 115° a 165° , lo que resulta en la reducción de la intensidad del campo y la velocidad limitada de migración del ADN en la parte inferior del gel que se ve reflejado en el adelgazamiento de las bandas. A pesar de que el campo eléctrico no es homogéneo, esta variante vertical de la electroforesis en gel de campo pulsado asegura la migración estrictamente rectilínea de la molécula y, en consecuencia, todos los carriles (incluidos los marginales) son rectos y paralelos. Esto permite la comparación de la movilidad electroforética de la migración de las moléculas en distintas filas (81).

3.6.4. "Field Inversion Gel Electrophoresis" (FIGE)

Carle y col. (20) encontraron que las moléculas grandes de ADN también se pueden separar simplemente invirtiendo periódicamente un campo eléctrico uniforme en una dimensión (utilizando un ángulo de reorientación de 180°). Este proceso se conoce como electroforesis en gel de campo invertido. Para lograr migración neta hacia adelante, FIGE emplea una diferencia en la duración o ya sea el voltaje de los campos de avance y retroceso. Esta técnica demostró que campos eléctricos no homogéneos no son necesarios para separaciones de PFGE. Debido a un sólo campo eléctrico homogéneo se utiliza, los carriles de ADN en FIGE son perfectamente rectos, lo que simplifica la determinación del tamaño de las moléculas (11).

3.6.5. "Contour-clamped Homogeneous Electric Field" (CHEF)

En 1989 Chu y colaboradores, al encontrar dificultad en la comparación de las muestras mediante los otros métodos de PFGE, realizaron una nueva técnica en la cual se alternan los campos en dos orientaciones. El campo eléctrico es generado por un método en el cual varios electrodos están organizados a lo largo de un contorno hexagonal, y restringidos a potenciales eléctricos predeterminados.

Esta técnica presenta varias ventajas en comparación a las mencionadas anteriormente, como son un mayor poder de separación (separa moléculas de menos de 50Kb sin distorsión, hasta moléculas de 2Mb), los carriles electroforéticos son perfectamente rectilíneos y el patrón de separación es independiente de la posición del gel (28).

3.6.6. "Rotating Gel Electrophoresis" (RGE)

Southern y colaboradores emplearon en 1987 una técnica de PFGE en la que en lugar de cambiar la dirección del campo eléctrico, se rota el gel sobre una placa giratoria impulsada por un motor, generando así un ángulo de rotación de aproximadamente de 120°. El aparato rota el gel entre dos orientaciones predefinidas en un campo eléctrico uniforme a intervalos de tiempo pre-establecidos. Este método de separación tiene la ventaja práctica sobre algunos otros que las moléculas de ADN siguen carriles rectos (109).

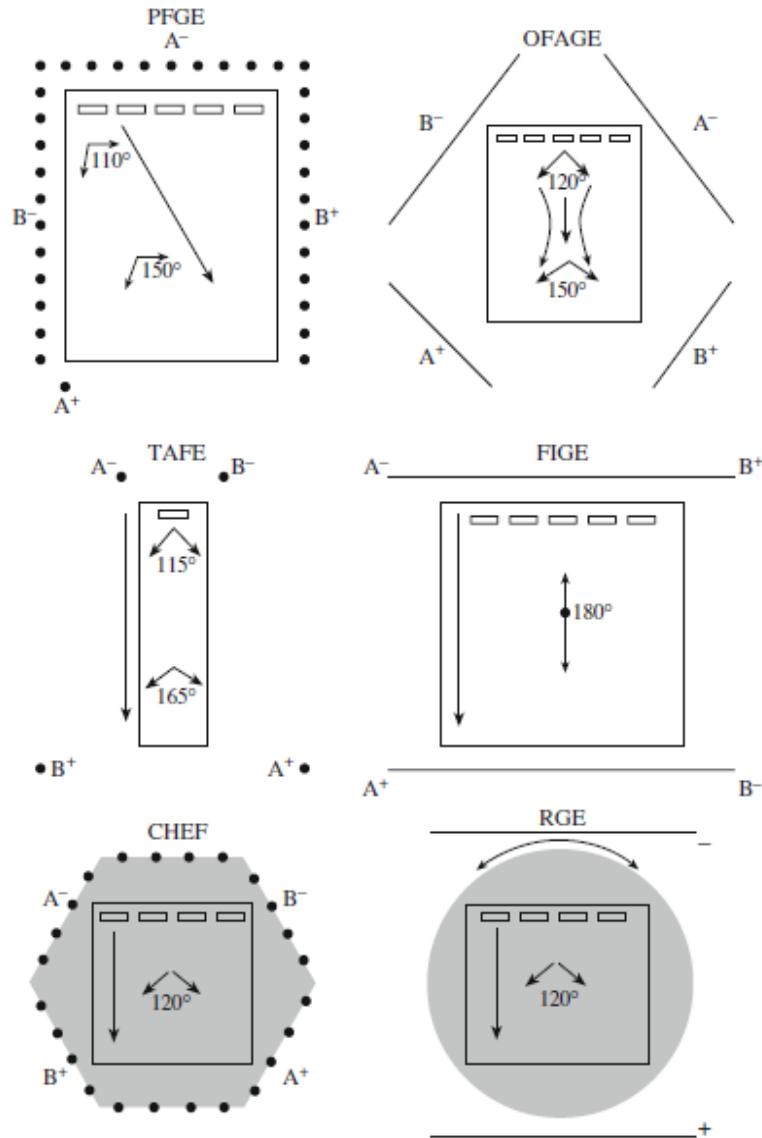


Figura 1. Esquema comparativo que muestra las geometrías de los electrodos en los instrumentos comúnmente usados para Electroforesis en Gel de Campo Pulsado. Sistemas con campos eléctricos no homogéneos: (PFGE) "Pulsed Field Gradient Electrophoresis"; (OFAGE) "Orthogonal Field-Alternating Gel Electrophoresis"; (TAFE) "Transverse Alternating-Field Electrophoresis". Sistemas con campos eléctricos homogéneos: (FIGE) "Field Inversion Gel Electrophoresis"; (CHEF) "Contour-clamped Homogeneous Electric Field"; (RGE) "Rotating Gel Electrophoresis". Las flechas cortas muestran los vectores de fuerza de campo de los campos eléctricos alternantes; el ángulo de reorientación está indicado en el interior. Las flechas largas apuntan a la dirección neta de migración. Los símbolos A+ y A-, B+ y B- indican las posiciones de los pares de electrodos de los campos eléctricos alternantes. Los electrodos están indicados por puntos en los esquemas de PFGE, TAFE, y CHEF, y por líneas rectas en los esquemas de OFAGE, FIGE, y RGE. Tomado de (81).

3.7. Usos generales de la Electroforesis en Gel de Campo Pulsado

La PFGE ha demostrado ser una técnica altamente discriminatoria, por lo que es ampliamente utilizada en estudios epidemiológicos. El proceso de subtipificación de microorganismos es importante epidemiológicamente para reconocer los brotes de infección, detectar la transmisión cruzada de patógenos nosocomiales, determinar la fuente de la infección, reconocer las cepas particularmente virulentas y para el seguimiento de los programas de vacunación (86). Mediante el análisis de patrones ya sea de manera visual (113) o automatizado, se pueden determinar las similitudes genéticas entre los aislamientos, lo que permite realizar los seguimientos previamente mencionados. Por otro lado, en la industria de alimentos la PFGE ha sido empleada en la detección de cepas persistentes en el entorno de procesamiento o de una fuente de contaminación externa (104).

Otras aplicaciones incluyen la identificación de polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción (RFLP) y la construcción de mapas físicos; detectar *in vivo* la ruptura y degradación de cromosomas y la determinación del número y tamaño de los cromosomas ("cariotipo electroforético") de levaduras, hongos, y parásitos tales como *Leishmania*, *Plasmodium*, y *Trypanosoma* (57).

4.0. Objetivos

4.1. Objetivo general

Determinar mediante revisión bibliográfica si es la Electroforesis en Gel de Campo Pulsado (PFGE) la herramienta molecular más adecuada para la tipificación y diferenciación de los aislamientos de *Listeria monocytogenes*.

4.2. Objetivos específicos

1. Determinar qué variante de la PFGE es la más adecuada para tipificar molecularmente los aislamientos de *L. monocytogenes* y ¿por qué?
2. Determinar cuál(es) enzima(s) de restricción o combinación de estas son las más frecuentemente utilizadas para discriminar entre aislamientos de *L. monocytogenes* de diversos orígenes.
3. Determinar si la PFGE permite clasificar en serotipos los aislamientos de *L. monocytogenes*.
4. Proponer el protocolo de PFGE más adecuado para tipificar cepas de *L. monocytogenes* en las condiciones del laboratorio de Biotecnología Molecular de la Pontificia Universidad Javeriana.

5.0. Metodología

5.1. Tipo de estudio: Monografía

5.2. Procedimiento:

5.1.1. Búsqueda de artículos en las bases de datos: Se utilizaron bases de datos como ISI web of Knowledge, SCOPUS, ScienceDirect, SpringerLink, EBSCO y ProQuest.

5.1.2. Selección y clasificación de artículos mediante:

5.1.2.1.1. Palabras claves: Se utilizaron palabras claves en inglés y español

Listeria monocytogenes + Pulsed Field Gel Electrophoresis

Listeria monocytogenes + Electroforesis en Gel de Campo Pulsado

5.1.2.1.2. Criterios de inclusión: Se incluyeron artículos de revistas indexadas en los que se utilizó la PFGE como método de tipificación molecular de *L. monocytogenes*

5.1.2.1.3. Criterios de exclusión: Se excluyeron artículos en los que el tipo de electroforesis no fue la PFGE, en los que el microorganismo *L. monocytogenes* no fue el tipificado y estudios donde no se evaluaron las características operativas de la técnica de interés.

5.1.2.1.4. Año de publicación: Se eligió un rango de 20 años, desde 1992 hasta 2012.

5.3. Obtención de datos

A partir de los artículos revisados y seleccionados se realizaron 2 tablas con los principales resultados de cada estudio, como el tipo de PFGE y enzimas de restricción utilizadas, y el protocolo de PFGE y método de análisis de patrones utilizados.

6.0. Resultados y discusión

6.1. Obtención de datos

La búsqueda de artículos se realizó en bases de datos mediante la ecuación de búsqueda “*Listeria monocytogenes* + Pulsed Field Gel Electrophoresis” y “*Listeria monocytogenes* + Electroforesis en gel de campo pulsado”.

De esta manera se encontraron un total de 8220 artículos en las diferentes bases de datos, de estos se preseleccionaron 103 (1,3%) que cumplían con las ecuaciones de búsqueda (**Tabla 2**). De estos se seleccionaron 70 (0,9%) artículos, 69 (98,6%) de ellos en inglés y 1(1,4%) en portugués, los cuales se organizaron por año de publicación y de estos se extrajeron las enzimas de restricción utilizadas y los resultados más relevantes de los estudios (**Tabla 3**) y también se extrajo de estos el protocolo utilizado y la metodología de análisis de patrones (**Tabla 4**).

Se incluyeron artículos de revistas indexadas en los que se utilizó la PFGE como método de tipificación molecular de *L. monocytogenes* y se excluyeron artículos en los que el tipo de electroforesis no fue la PFGE, en los que el microorganismo *L. monocytogenes* no fue el tipificado y estudios donde no se evaluaron las características operativas de la técnica de interés.

EL principal factor de exclusión fueron los artículos que se repetían en las diferentes bases de datos, debido a la indexación múltiple a la que se someten las revistas de alto impacto, también en los que el tipo de electroforesis no fue la PFGE, en los que el microorganismo *L. monocytogenes* no fue el tipificado y los estudios donde no se evaluaron las características operativas de la técnica de interés.

Tabla 2. Número de artículos encontrados y seleccionados en las diferentes bases de datos empleadas.

Fuente	Artículos encontrados	Artículos Pre-seleccionados	Artículos Seleccionados	% de inclusión
Science Direct	1069	41	35	3,27
Ebsco	736	15	13	1,77
SCOPUS	328	20	10	3,05
ISI Web of Knowledge	219	7	4	1,83
Springer Link	98	2	1	1,02
Google Scholar	5770	18	7	0,12
Total	8220	103	70	0,85

Tabla 3. Tipo de PFGE y enzimas utilizadas y resultados relevantes en los artículos revisados.

	Primer Autor	Año	Referencias	Tipo de PFGE utilizada	Enzimas de restricción	Resultados
1.	Howard, P.J.	1992	(50)	(Bio-Rad CHEF Mapper system)	<i>ApaI</i> , <i>AscI</i> , <i>NotI</i> , <i>SmaI</i>	La enzima <i>AscI</i> , que no había sido utilizada previamente para PFGE de <i>Listeria</i> , era particularmente útil ya que genera fragmentos más resueltos que <i>NotI</i> (los fragmentos grandes de <i>NotI</i> son difíciles de determinar su talla exacta) o <i>ApaI</i> y <i>SmaI</i> (algunos fragmentos <i>ApaI</i> y <i>SmaI</i> son productos de digestión parcial).
2.	Brosch, R.	1994	(17)	CHEF-DRII pulsed-field electrophoresis system (Bio-Rad, Hercules, Calif.)	<i>ApaI</i> , <i>AscI</i>	Las enzimas de <i>AscI</i> y <i>ApaI</i> generaron 63 y 72 perfiles de digestión con endonucleasas de restricción (REDP) únicos respectivamente a partir de 176 aislamientos de <i>L. monocytogenes</i> . Un aislamiento de serovar 4c no pudo ser digerido con la enzima <i>ApaI</i> . Se encontró que las enzimas <i>AscI</i> y <i>ApaI</i> fueron las más útiles para la generación de un número conveniente de fragmentos de macrorrestricción fácilmente diferenciables de <i>Listeria</i> . <i>AscI</i> fue generalmente menos discriminatoria que <i>ApaI</i> , aunque los resultados de <i>AscI</i> fueron más fáciles de interpretar.
3.	Proctor, M.E.	1995	(95)	CHEF	<i>AscI</i>	Los resultados de este estudio subrayan la utilidad de la PFGE para vincular casos esporádicos de enfermedad con los productos retirados.
4.	Brosch, R.	1996	(16)	CHEF equipment (Bio-Rad Laboratories, Richmond, CA) y FIGE apparatus (Hoefer Instruments, San Francisco, CA).	<i>ApaI</i> , <i>SmaI</i> o <i>AscI</i>	Se demostró que la PFGE presenta una potencia discriminatoria alta y tiene excelente reproducibilidad. Logró la tipificación de todas las cepas y permite adicionalmente la predicción y confirmación de serotipo. Se obtuvieron resultados correlacionados entre los dos tipos de PFGE utilizados (CHEF Y FIGE).

	Primer Autor	Año	Referencias	Tipo de PFGE utilizada	Enzimas de restricción	Resultados
5.	Destro, MT.	1996	(31)	CHEF CHEF-DRII pulsed-field electrophoresis system (Bio-Rad, Hercules, Calif.)	<i>ApaI</i> , <i>SmaI</i>	Por medio de comparación visual de los patrones de macrorrestricción se revelaron 13 patrones distintos con <i>SmaI</i> y 15 con <i>ApaI</i> a partir de 115 cepas aisladas. La elección de las enzimas de restricción y geometría del campo eléctrico utilizado para la PFGE pueden hacer difícil la comparación de resultados entre diferentes estudios.
6.	Louie, M.	1996	(70)	CHEF CHEF DR-II system (Bio-Rad, Hercules, Calif.)	<i>ApaI</i> , <i>SmaI</i>	La PFGE generó 22 y 26 perfiles únicos de ADN con las digestiones con las endonucleasas de restricción <i>ApaI</i> y <i>SmaI</i> , respectivamente. La PFGE con la enzima <i>SmaI</i> obtuvo un índice de discriminación de 0,930, mientras que con <i>ApaI</i> fue de 0,922. Sin embargo, los patrones de <i>ApaI</i> fueron más fáciles de interpretar.
7.	Boerlin, P.	1997	(13)	Switchback pulse controller (model PC500; Hoefer Scientific Instruments, San Francisco, Calif.)	<i>ApaI</i> , <i>SmaI</i>	A partir de 75 aislamientos de <i>L. monocytogenes</i> se identificaron 25 subtipos con la PFGE. La PFGE fue el método de tipificación más discriminatorio, seguido de REA, MEE, y serotipificación.
8.	Nakama, A.	1998	(79)	CHEF (Bio-Rad CHEF Mapper system)	<i>SmaI</i> , <i>ApaI</i> , <i>AscI</i> , <i>Sse8387I</i>	De los 120 cultivos de <i>L. monocytogenes</i> serovar 4b se generaron 18 patrones con <i>SmaI</i> , 22 con <i>ApaI</i> , 22 con <i>AscI</i> , y 15 con <i>Sse8387I</i> con resultados reproducibles. De estos, 82 aislados de pacientes con listeriosis en Japón, se encontró que tenían los mismos tipos electroforéticos de aquellos asociados a los brotes en California (1985) y Suiza (1983-1987).

	Primer Autor	Año	Referencias	Tipo de PFGE utilizada	Enzimas de restricción	Resultados
9.	Neves, E.	1998	(82)	CHEF DR II System (BioRad, Hercules, USA)	<i>ApaI</i> , <i>AscI</i>	Dos cepas del serovar 4a y una del 4c no presentaron digestión con la enzima <i>ApaI</i> . De los 80 aislamientos se generaron 33 patrones diferentes con la enzima de restricción <i>AscI</i> , y de los 77 tipificables con <i>ApaI</i> se generaron 44 patrones diferentes. La combinación de las dos enzimas generó 62 pulsotipos. Con la enzima <i>ApaI</i> se logró un mayor valor SID (Simpson's index of discrimination) (0,91) comparado a la enzima <i>AscI</i> (0,85), y la combinación de las dos enzimas aumentó el poder discriminatorio a 0,97.
10.	Autio, T.	1999	(4)	Gene Navigator system con un electrodo hexagonal (Pharmacia, Uppsala, Sweden).	<i>AscI</i> , <i>SmaI</i>	La PFGE con <i>SmaI</i> produjo siete patrones de restricción, y con <i>AscI</i> nueve patrones de restricción, de las cepas de <i>L. monocytogenes</i> aisladas, dividiendo los aislamientos en nueve pulsotipos diferentes.
11.	Giovannacci, I	1999	(38)	CHEF CHEF-DRII Bio-Rad Laboratories, Richmond, USA	<i>ApaI</i>	Con la enzima de restricción <i>ApaI</i> se obtuvieron 17 PFGE tipos. Se encontró que por lo general los aislamientos con los mismos patrones de restricción pertenecen al mismo serotipo con excepción de algunos casos. La técnica PFGE se considera una herramienta valiosa con un alto poder discriminatorio para la tipificación de cepas de <i>L. monocytogenes</i> relacionadas epidemiológicamente.
12.	Johansson, T.	1999	(56)	CHEF-DR III Variable Angle Pulsed-field Electrophoresis System (Bio-Rad Laboratories, Richmond, CA, USA)	<i>ApaI</i> , <i>AscI</i>	Con la enzima <i>ApaI</i> se obtuvieron 8 patrones, mientras que con <i>AscI</i> fueron 13. La acción de las dos enzimas generó 13 PFGE tipos. Las cepas de <i>L. monocytogenes</i> serovar 1/2a y 4b encontrados en la planta no pertenecen al mismo PFGE tipo. La PFGE demostró ser una herramienta poderosa para el estudio de los puntos y las rutas de contaminación en una planta de producción para la realización del plan HACCP.

	Primer Autor	Año	Referencias	Tipo de PFGE utilizada	Enzimas de restricción	Resultados
13.	Miettinen, MK.	1999	(75)	Gene Navigator system con un electrodo hexagonal (Pharmacia, Uppsala, Sweden).	<i>ApaI</i> , <i>AscI</i> , <i>SmaI</i>	La enzima de restricción <i>ApaI</i> generó 6 patrones diferentes, mientras que <i>AscI</i> y <i>SmaI</i> generaron 8 y 7, respectivamente. La enzima de restricción <i>AscI</i> creó el mejor patrón para comparación visual, siendo más discriminatoria que los patrones obtenidos con las enzimas <i>ApaI</i> y <i>SmaI</i> .
14.	Senczek, D.	2000	(104)	ND	<i>SmaI</i> , <i>ApaI</i>	A partir de 89 aislamientos se obtuvieron 12 y 14 perfiles de digestión con las enzimas <i>SmaI</i> y <i>ApaI</i> respectivamente. En general la enzima <i>SmaI</i> era menos discriminatoria que <i>ApaI</i> aunque los perfiles creados por las dos enzimas se podían interpretar fácilmente.
15.	Tkáciková, L'.	2000	(114)	CHEF CHEF-DRII (Bio-Rad Laboratories, Richmond, USA)	<i>ApaI</i>	De 19 aislamientos de <i>L. monocytogenes</i> serovar 1/2a revelaron 8 patrones de restricción <i>ApaI</i>
16.	Dauphin, G.	2001	(30)	CHEF (CHEF-DRIII Bio-Rad Laboratories, Richmond, USA).	<i>SmaI</i> , <i>ApaI</i>	La macrorrestricción con las enzimas <i>SmaI</i> y <i>ApaI</i> de 155 aislamientos de <i>L. monocytogenes</i> generaron 17 patrones únicos cada una, dividiendo los aislamientos en 20 pulsotipos diferentes.
17.	Graves, LM. (standardized protocol)	2001	(41)	CHEF CHEF-Mapper PFGE apparatus (Bio-Rad)	<i>ApaI</i> , <i>AscI</i>	La combinación de las enzimas <i>ApaI</i> y <i>AscI</i> presentan excelente discriminación para cepas de <i>L. monocytogenes</i> . Los patrones de bandeado para ambas enzimas caen dentro del mismo rango de tamaño (Kb), por lo que requiere sólo un estándar o referencia.
18.	Harvey, J.	2001	(45)	CHEF CHEF-DR III System (Bio-Rad).	<i>ApaI</i> , <i>AscI</i>	Los patrones de banda de la enzima <i>AscI</i> fueron más simples y claros que los de <i>ApaI</i> y por eso en este estudio se basaron sólo en los resultados obtenidos a partir de la primera enzima. Se obtuvieron 32 PFGE tipos a partir de 45 cepas. La PFGE fue más discriminatoria que el otro método utilizado (MEE). La PFGE detecta cambios genéticos en las cepas durante el período en que se llevó a cabo la inspección de los alimentos.

	Primer Autor	Año	Referencias	Tipo de PFGE utilizada	Enzimas de restricción	Resultados
19.	Vela, AI.	2001	(121)	CHEF CHEF-DR III System (Bio-Rad).	<i>ApaI</i> , <i>SmaI</i>	A partir de 153 aislamientos de <i>L. monocytogenes</i> se revelaron 30 perfiles diferentes por comparación visual de los patrones generados por <i>ApaI</i> y 28 mediante la enzima <i>SmaI</i> , generando 55 pulsotipos. Aunque la enzima <i>SmaI</i> fue menos discriminativa que <i>ApaI</i> , algunas cepas con perfil idéntico con <i>ApaI</i> presentaron perfiles diferentes con <i>SmaI</i> .
20.	Autio, T.	2002	(6)	CHEF Gene Navigator system con un electrodo hexagonal (Pharmacia, Uppsala, Sweden).	<i>ApaI</i> , <i>AscI</i>	De 295 aislamientos de <i>L. monocytogenes</i> se generaron 66 pulsotipos diferentes con la combinación de las enzimas <i>ApaI</i> y <i>AscI</i> . La enzima <i>AscI</i> era más discriminativa que <i>ApaI</i> , produciendo 61 patrones de macrorrestricción en comparación con los 47 obtenidos por <i>ApaI</i> . En algunos casos, diferentes serotipos presentaban el mismo patrón de restricción con <i>ApaI</i> o <i>AscI</i> .
21.	Larsen, CN.	2002	(61)	ND	<i>ApaI</i>	Se obtuvieron 7 pulsotipos diferentes a partir de 26 aislamientos de <i>L. monocytogenes</i> . El estudio muestra que diferentes pulsotipos difieren significativamente en su virulencia.
22.	Aarnisalo, K.	2003	(1)	CHEF Gene Navigator system con un electrodo hexagonal (Pharmacia, Uppsala, Sweden).	<i>AscI</i> y <i>ApaI</i> o <i>SmaI</i>	De la digestión con <i>AscI</i> resultaron 42 patrones de macrorrestricción, y con <i>SmaI</i> resultaron 24 patrones de los 121 aislamientos analizados. Cuando los patrones se combinaron, 46 pulsotipos finales fueron generados. El índice de discriminación de la técnica PFGE fue de 0,966ID, y fue mayor al obtenido con ribotipificación (0,906ID).
23.	Autio, T.	2003	(5)	Gene Navigator system con un electrodo hexagonal (Pharmacia, Uppsala, Sweden).	<i>AscI</i> , <i>SmaI</i>	Con la técnica PFGE se obtuvo un poder discriminatorio de 0,993 SID (Simpson's index of discrimination), mayor a la obtenida con AFLP 0,982 y a la combinación de las dos técnicas (0,994).

	Primer Autor	Año	Referencias	Tipo de PFGE utilizada	Enzimas de restricción	Resultados
24.	Keto-Timonen, RI.	2003	(59)	CHEF Gene Navigator system con un electrodo hexagonal (Pharmacia, Uppsala, Sweden).	<i>AscI</i>	La técnica mostró una alta capacidad discriminatoria (ID>0,999). Se encontró que la técnica AFLP presenta la misma capacidad discriminatoria y además es más rápido y menos laboriosa que la PFGE.
25.	Levin, RE. (Revisión bibliográfica)	2003	(66)	CHEF	NA	La técnica PFGE recomendada para la tipificación de <i>L. monocytogenes</i> es la "Contour-clamped homogeneous electric field" (CHEF) y el uso de por lo menos dos endonucleasas de restricción se recomienda para mayor discriminación.
26.	Peccio, A.	2003	(92)	Gene Navigator system con un electrodo hexagonal (Pharmacia, Uppsala, Sweden).	<i>AscI</i>	El análisis con PFGE mostró 11 pulsotipos con la enzima <i>AscI</i> .
27.	Borucki, MK	2004	(14)	CHEF CHEF-Mapper PFGE apparatus (Bio-Rad)	<i>ApaI, AscI</i>	La técnica PFGE diferenció 10 subtipos diferentes a partir de 28 aislamientos de <i>L. monocytogenes</i> . El análisis de microarreglos y la tipificación por PFGE mostraron las resoluciones más altas, la MLST tuvo una resolución moderada de subtipificación, y la ribotipificación tuvo la menor resolución.
28.	Gudmundsdóttir, S.	2004	(42)	ND	<i>ApaI, AscI</i>	Se generaron 23 patrones con la enzima de restricción <i>ApaI</i> , y por otro lado, 13 con la enzima <i>AscI</i> . En este estudio la enzima <i>ApaI</i> fue la más discriminatoria y además los resultados obtenidos a partir de <i>AscI</i> no arrojaron mayor información de la ya obtenida con <i>ApaI</i>

	Primer Autor	Año	Referencias	Tipo de PFGE utilizada	Enzimas de restricción	Resultados
29.	Harvey, J.	2004	(46)	CHEF CHEF-DR III System (Bio-Rad).	<i>ApaI</i> o <i>AscI</i>	El uso de la enzima <i>ApaI</i> generó 28 patrones únicos de restricción mientras que la enzima <i>AscI</i> generó 32. Se encontró que la enzima <i>AscI</i> tiene un mayor poder discriminatorio (0,997 SID) que la <i>ApaI</i> (0,970 SID). Encontraron también que los subtipos PFGE tienen baja estabilidad a largos períodos de tiempo.
30.	Lukinmaa, S.	2004	(71)	CHEF CHEF Mapper or CHEF DR systems (Bio-Rad Laboratories, Richmond, CA, USA).	<i>AscI</i>	Se generaron 57 perfiles de restricción con la enzima <i>AscI</i> a partir de 188 aislamientos de <i>L. monocytogenes</i> . El índice discriminatorio de la técnica fue de 0,946 ID, mayor que el de ribotipificación (ID=0,873) y serotipificación (DI=0,562). Se encontró que entre patrones PFGE idénticos no se encontraban diferentes serotipos.
31.	Revazishvili, T.	2004	(97)	CHEF CHEF DR II apparatus (Bio-Rad Laboratories, Hercules, Calif.).	<i>AscI</i>	57 PFGE tipos fueron identificados entre las 175 cepas analizadas. En la mayoría de los casos, los pulsotipos idénticos pertenecían al mismo serotipo. La técnica MLST (multilocus sequence typing) tuvo una mayor habilidad discriminatoria que la PFGE.
32.	Zhang, Y.	2004	(126)	CHEF-DR III apparatus (Bio-Rad)	<i>ApaI</i> , <i>AscI</i>	A partir de 167 aislamientos se identificaron 120 perfiles PFGE y se encontró que patrones idénticos pertenecían al mismo serogrupo. Sin embargo, se encontró también que algunos aislamientos que presentaban patrones idénticos y pertenecían a un mismo serogrupo, exhibían perfiles de resistencia antimicrobiana diferentes.
33.	Gilbreth, SE.	2005	(34)	Chef Mapper XA (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA)	<i>AscI</i>	Con la enzima <i>AscI</i> se generaron 139 pulsotipos a partir de 544 aislamientos. Por medio de la PFGE se demostró que los aislamientos a partir de muestras de alimentos difieren por lo general de los aislamientos clínicos.

	Primer Autor	Año	Referencias	Tipo de PFGE utilizada	Enzimas de restricción	Resultados
34.	Gudmundsdóttir, S.	2005	(43)	CHEF CHEF DRIII system (BioRad Laboratories, Richmond, CA, USA).	<i>ApaI</i> , <i>AscI</i>	Con la enzima <i>AscI</i> se generaron 16 patrones y con la enzima <i>ApaI</i> 22 patrones. Y se generaron 24 pulsotipos a partir de 201 aislamientos de <i>L. monocytogenes</i> con la combinación de las enzimas <i>ApaI</i> y <i>AscI</i> .
35.	Hunter, SB.	2005	(52)	Bio-Rad CHEFMapper XA system (Bio-Rad, Hercules, Calif.)	<i>ApaI</i> , <i>AscI</i>	La cepa de <i>Salmonella</i> serotipo Braenderup (H9812) fue elegida como la cepa referencia de talla universal para todos los protocolos de PulseNet.
36.	Olsen, SJ.	2005	(87)	CHEF CHEF-Mapper PFGE apparatus (Bio-Rad)	<i>ApaI</i> , <i>AscI</i>	Entre mayo y diciembre de 2000, se encontraron 30 aislamientos clínicos de <i>L. monocytogenes</i> con patrones de PFGE idénticos identificados en 11 estados de EE.UU. Se logró identificar la planta procesadora fuente del brote, y esta voluntariamente recogió 16 millones de libras de carne procesada.
37.	Chiu, S.	2006	(26)	CHEF CHEF DR III system (Bio-Rad, Hercules, CA, USA).	<i>ApaI</i> , <i>SmaI</i>	La PFGE fue utilizada para determinar la similitud genética entre los aislamientos analizados mediante el método UPGMA.
38.	Chou, CH.	2006	(27)	CHEF CHEF-Mapper PFGE apparatus (Bio-Rad, Hercules, CA).	<i>ApaI</i> , <i>AscI</i>	Con la enzima <i>ApaI</i> se generaron, dependiendo del origen de la cepa, 48, 29 y 21 pulsotipos con índices de discriminación de 0.992, 0.988 y 0.957, respectivamente, y para todos los aislamientos 0.994 ID. Mientras que con la enzima <i>AscI</i> se generaron 41, 28 y 21 pulsotipos con ID de 0.984, 0.984 y 0.939 respectivamente, y para todos los aislamientos 0.990 ID.
39.	Shen, Y.	2006	(106)	CHEF CHEF-Mapper PFGE apparatus (Bio-Rad)	<i>ApaI</i> , <i>AscI</i>	En este estudio encontraron que para algunas cepas la enzima <i>AscI</i> era más discriminatoria que la enzima <i>ApaI</i> y viceversa.

	Primer Autor	Año	Referencias	Tipo de PFGE utilizada	Enzimas de restricción	Resultados
40.	Berzins, A.	2007	(8)	Gene Navigator system with a hexagonal electrode (Pharmacia, Uppsala, Sweden)	AscI	120 aislamientos de <i>L. monocytogenes</i> se tipificaron mediante PFGE. Con base en la similitud genética, se detectaron 27 PFGE tipos diferentes posteriormente agrupados en dos linajes genéticos. El linaje genético I que contenía 95% de todos los aislamientos pertenecientes a los serotipos 1/2a y 1/2c, mientras que el 5% restante del linaje genético II, pertenecía a los serotipos 1/2b, 3b y 4b.
41.	Fugett, EB.	2007	(36)	CHEF CHEF Mapper XA (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA)	ApaI, AscI	Un total de 266 PFGE tipos <i>ApaI</i> y 244 <i>AscI</i> se diferenciaron a partir de 495 aislamientos de <i>L. monocytogenes</i> . La combinación de los resultados de las dos enzimas arrojó un total de 310 PFGE tipos. Con un índice discriminatorio de 0,995 la PFGE realizada con las dos enzimas, demostró tener mayor habilidad discriminatoria que la realizada con una sola enzima (0,992ID) o la ribotipificación (0,950ID).
42.	Hellström, S.	2008	(47)	CHEF Gene Navigator (Pharmacia, Uppsala, Sweden).	AscI	A partir de los 77 aislamientos de <i>L. monocytogenes</i> se generaron 48 patrones PFGE. En este estudio con aves silvestres, gracias a la técnica, encontraron que en una misma ave se pueden encontrar más de un patrón PFGE que además coinciden con los serotipos más comunes causantes de listeriosis en humanos.
43.	Lindstedt, BA.	2008	(67)	CHEF CHEF DR III system (Bio-Rad, Hercules, CA, USA).	AscI	Los 79 aislamientos procedentes de Noruega exhibieron 24 patrones PFGE mientras que los 61 aislamientos procedentes de Suecia exhibieron 43 patrones PFGE con la enzima <i>AscI</i> . Se encontró que la técnica "Multiple-locus variable-number tandem-repeats analysis" (MLVA) posee el mismo poder discriminatorio que la PFGE, pero la obtención de resultados es más rápido y sencillo con la primera técnica.

	Primer Autor	Año	Referencias	Tipo de PFGE utilizada	Enzimas de restricción	Resultados
44.	Miya, S.	2008	(76)	CHEF CHEF bacterial plug kit (Bio-Rad, Hercules, California).	<i>ApaI</i>	Para 60 aislamientos de <i>L. monocytogenes</i> serovar 4b, la técnica PFGE con la enzima <i>ApaI</i> generó 27 subtipos. Encontraron que la técnica MLVA es más discriminadora (DI = 0,980) que la PFGE (DI = 0,932), MLST (DI = 0,874), y la ribotipificación (DI = 0,760).
45.	Berzins, A.	2009	(9)	CHEF Gene Navigator system (Pharmacia, Uppsala, Sweden)	<i>AscI</i>	A partir de 34 aislamientos de <i>L. monocytogenes</i> se generaron 7 patrones PFGE
46.	Latorre, AA.	2009	(62)	CHEF CHEF mapper XA system (Bio-Rad Laboratories).	<i>ApaI, AscI</i>	13 PFGE tipos se distinguieron con la enzima de restricción <i>AscI</i> y 14 con la enzima <i>ApaI</i> , generando 23 PFGE tipos con la combinación de las dos enzimas. Encontraron que pueden generarse discrepancias en el análisis de los patrones de manera visual y mediante análisis computacional.
47.	Lomonaco, S	2009	(69)	CHEF Chef DR III system (Bio-Rad, Hercules, CA, USA).	<i>ApaI, AscI</i>	La combinación de las dos enzimas generó 29 perfiles a partir de 95 aislamientos de <i>L. monocytogenes</i> . La técnica permitió la identificación de las rutas de dispersión de <i>L. monocytogenes</i> en la planta de procesamiento permitiendo la planeación de medidas preventivas.
48.	Mammaia, C.	2009	(73)	CHEF Chef Mapper XA (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA)	<i>ApaI, AscI</i>	26 pulsotipos fueron reconocidos a partir de 44 aislamientos humanos de <i>L. monocytogenes</i> . Los valores SID de PFGE, ribotipificación, y PCR-RFLP de los aislamientos clínicos de este estudio fueron 0,972, 0,941, y 0,852, respectivamente.
49.	Marcus, R.	2009	(74)	CHEF CHEF-Mapper PFGE apparatus (Bio-Rad)	<i>ApaI, AscI</i>	La tipificación con PFGE se utilizó para revelar las correlaciones entre las enfermedades humanas y productos alimenticios contaminados y para identificar rápidamente las fuentes de infección por <i>Listeria</i> para permitir la implementación de acciones correctivas a nivel estatal y nacional.

	Primer Autor	Año	Referencias	Tipo de PFGE utilizada	Enzimas de restricción	Resultados
50.	Sauders, BD.	2009	(101)	CHEF CHEF-Mapper PFGE apparatus (Bio-Rad)	<i>ApaI, AscI</i>	Los subtipos idénticos obtenidos mediante ribotipificación, en ocasiones presentaban múltiples PFGE tipos con <i>ApaI</i> o <i>AscI</i> . Se encontró que las cepas obtenidas de establecimientos de venta al por menor coincidían con aquellas comúnmente implicadas en casos de listeriosis humana.
51.	Almeida, G.	2010	(3)	CHEF CHEF-Mapper PFGE apparatus (Bio-Rad)	<i>ApaI, AscI</i>	La tipificación con PFGE reveló un total de 39 patrones de macrorrestricción <i>AscI</i> y 50 <i>ApaI</i> . La combinación de los patrones de <i>AscI</i> y <i>ApaI</i> logró un total de 58 pulsotipos PFGE, con ID=0,966 para <i>AscI</i> , ID=0,979 para <i>ApaI</i> , y ID=0,986 para el combinado <i>AscI</i> y <i>ApaI</i> .
52.	Berzins, A.	2010	(7)	CHEF Gene Navigator system (Pharmacia, Uppsala, Sweden)	<i>AscI</i>	A partir de 66 aislamientos de <i>L. monocytogenes</i> se generaron 17 patrones PFGE
53.	Chen, BY.	2010	(25)	CHEFF-Mapper XA PFGE (Bio-Rad).	<i>ApaI</i>	Mediante la PFGE se pudo determinar que en los aislamientos de <i>L. monocytogenes</i> procedentes de diferentes etapas en la planta de procesamiento existía una similitud en los patrones PFGE obtenidos, demostrando que existía contaminación cruzada.
54.	Hellström, S.	2010	(48)	CHEF Gene Navigator system (Pharmacia, Uppsala, Sweden).	<i>ApaI, AscI</i>	Los 424 aislamientos de <i>L. monocytogenes</i> generaron 34 patrones de restricción con la enzima <i>AscI</i> y 30 patrones con la enzima <i>ApaI</i> , resultando 36 PFGE tipos.

	Primer Autor	Año	Referencias	Tipo de PFGE utilizada	Enzimas de restricción	Resultados
55.	Kerouanton, A.	2010	(58)	CHEF CHEF-DRIII (Bio-Rad SA)	<i>ApaI</i> , <i>AscI</i>	Un total de 39 patrones moleculares diferentes (ID = 0,97) fueron generados por <i>ApaI</i> , mientras que con <i>AscI</i> fueron 28 (ID=0,92) La combinación de las enzimas <i>ApaI</i> y <i>AscI</i> generó 44 patrones diferentes PFGE a partir de 60 aislamientos de <i>L. monocytogenes</i> , de los cuales 23 parecen ser únicos del lodo y los otros 11 ya habían sido encontrados en diferentes ambientes y muestras. Los patrones de restricción del 64,5% de los aislamientos de serotipo 4b están estrechamente relacionados con los patrones de las cepas que han estado implicadas en listeriosis humana.
56.	Latorre, AA.	2010	(63)	CHEF CHEF mapper XA system (Bio-Rad Laboratories).	<i>ApaI</i> , <i>AscI</i>	Para 15 aislamientos de <i>L. monocytogenes</i> el análisis de patrones de restricción con <i>AscI</i> y <i>ApaI</i> generaron 6 pulsotipos.
57.	Nucera, D.	2010	(84)	CHEF CHEF-Mapper PFGE apparatus (Bio-Rad)	<i>ApaI</i> , <i>AscI</i>	Se llevó a cabo la subtipificación de 300 aislamientos con PFGE generándose 164 perfiles con la combinación de los resultados de las dos enzimas de restricción.
58.	O'Connor, L.	2010	(85)	CHEF CHEF-DR II apparatus (Bio-Rad Laboratories).	<i>ApaI</i> , <i>AscI</i>	A partir de 112 aislamientos de <i>L. monocytogenes</i> se generaron 103 pulsotipos. No se encontró una relación clara entre los pulsotipos y los serotipos.
59.	Vázquez, J.	2010	(120)	CHEF (CHEF DR II, Bio-Rad Laboratories, Madrid, Spain).	<i>ApaI</i> , <i>AscI</i> , <i>Sma</i>	Se encontró que entre las tres enzimas utilizadas, <i>ApaI</i> era la más adecuada para tipificación de <i>L. monocytogenes</i> y <i>L. ivanovii</i> .
60.	Ward, TJ.	2010	(122)	CHEF CHEF-Mapper PFGE apparatus (Bio-Rad)	<i>ApaI</i> , <i>AscI</i>	Se observaron 114 patrones únicos <i>AscI</i> , 151 patrones únicos <i>ApaI</i> , y 193 patrones únicos de la combinación <i>AscI-ApaI</i> a partir de 312 aislamientos. La PFGE fue la técnica más discriminatoria (ID=0,99) en comparación a la MLGT (multilocus genotyping) (ID=0,95).

	Primer Autor	Año	Referencias	Tipo de PFGE utilizada	Enzimas de restricción	Resultados
61.	Smith, B.	2011	(107)	ND	<i>ApaI, AscI</i>	En un brote de listeriosis en Dinamarca en Mayo de 2009 se realizó la tipificación de los aislamientos de 8 pacientes por MLVA y PFGE que mostraron ser idénticos entre estos y distinguibles de otros pacientes daneses. Se rastreó la fuente de contaminación.
62.	Williams, SK.	2011	(124)	CHEF CHEF Mapper XA(Bio-Rad)	<i>ApaI, AscI</i>	La tipificación molecular con PFGE mostró que sólo una o unas pocas cepas de <i>L. monocytogenes</i> pueden colonizar el ambiente de industrias de carnes listas para consumo, subrayando la necesidad de planes de limpieza y desinfección más rigurosos para prevenir la contaminación cruzada de productos cárnicos listos para consumo.
63.	Boscher, E.	2012	(15)	CHEF CHEF-DRIII (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA)	<i>ApaI, AscI</i>	La digestión con las dos enzimas generó 75 patrones diferentes a partir de 124 aislamientos. La combinación de las enzimas logró un poder discriminatorio de 0,970.
64.	Di Ciccio, P.	2012	(32)	CHEF CHEF Mapper XA system (Bio-Rad)	<i>ApaI, AscI</i>	La macrorrestricción con las dos enzimas generó 15 pulsotipos a partir de 28 aislamientos de <i>L. monocytogenes</i> . La técnica permitió la agrupación por similitud de los patrones de restricción de estos en 3 grupos.
65.	Ferronato, AI.	2012	(35)	CHEF (CHEF-DRII, BioRad).	<i>ApaI, AscI</i>	Los 9 aislamientos de <i>L. monocytogenes</i> encontrados en las diferentes etapas de la línea de sacrificio y el ambiente de un frigorífico de cerdos, revelaron 2 pulsotipos con la combinación de las dos enzimas.
66.	Galvão, NN.	2012	(80)	CHEF CHEF-Mapper PFGE apparatus (Bio-Rad)	<i>ApaI, AscI</i>	Los perfiles PFGE de <i>L. monocytogenes</i> presentaron una asociación evidente con los serotipos identificados, pero no se asociaron con la capacidad de adherencia de las cepas.

	Primer Autor	Año	Referencias	Tipo de PFGE utilizada	Enzimas de restricción	Resultados
67.	Mendonça, KS.	2012	(105)	CHEF CHEF DR II apparatus (Bio-Rad).	<i>ApaI</i> , <i>AscI</i>	El análisis de la macrorrestricción de las dos enzimas generó 29 pulsotipos a partir de 44 aislamientos de <i>L. monocytogenes</i> logrando un índice de discriminación de 0,98, mayor al obtenido con cada enzima (<i>ApaI</i> = 0,95 y <i>AscI</i> = 0,94). Se identificaron 8 grupos dentro de los 44 aislamientos.
68.	Pagadala, S.	2012	(91)	CHEF CHEF-Mapper PFGE apparatus (Bio-Rad)	<i>ApaI</i> , <i>AscI</i>	Un total de 92 pulsotipos <i>ApaI</i> y 88 pulsotipos <i>AscI</i> se diferenciaron entre los 106 aislamientos de <i>L. monocytogenes</i> . Se encontró que unos pocos aislamientos poseían el mismo pulsotipo y serotipo pero se diferenciaban por su ribotipo.
69.	Prencipe, VA.	2012	(94)	ND	<i>ApaI</i> , <i>AscI</i>	Se encontró que la enzima <i>ApaI</i> era más discriminatoria que <i>AscI</i> , produciendo 40 patrones de macrorrestricción, mientras que con <i>AscI</i> se produjeron 28. La combinación de los patrones de macrorrestricción con <i>ApaI</i> y <i>AscI</i> resultó en 56 pulsotipos.
70.	Zunabovic, M.	2012	(127)	CHEF	<i>ApaI</i> , <i>AscI</i> , <i>SmaI</i>	El poder discriminatorio de la técnica con las tres enzimas fue alto (0,990 ID), similar al obtenido con solo <i>AscI</i> y <i>SmaI</i> (0,989 ID) y mayor al de <i>ApaI</i> y <i>AscI</i> . Sin embargo, el poder discriminatorio de los métodos es variable entre las distintas fuentes de los aislamientos.

Tabla 4. Protocolos para PFGE de *L. monocytogenes* y métodos de análisis de patrones de restricción en los artículos revisados.

	Primer Autor	Año	Referencia	Protocolo	Método o Software de análisis
1.	Howard, P.J.	1992	(50)	El cultivo de <i>Listeria</i> se pasó 2 veces en caldo BHI a 37°C previo a su uso. El cultivo se centrifugó (12,400 x g, 10 min, 4°C), y se lavó 2 veces en buffer NT y posteriormente se resuspendió con buffer NT. Volúmenes iguales de suspensión celular se mezclaron con solución de agarosa de bajo punto de fusión preparada en buffer TBE y esta suspensión se agregó a los moldes acrílicos para formar los bloques de agarosa. Cada bloque se colocó en tubos de microcentrifuga para la macrorrestricción con las endonucleasas por al menos 16h con mezclado suave y se agregó EDTA para parar la reacción. La PFGE se llevó a cabo en gel de agarosa para electroforesis (1% p/v) con tiempos de pulso de 50 a 76,6s, 200V por 16h.	Visual
2.	Brosch, R.	1994	(18)	Se realizó como en Howard PJ, 1992 con las siguientes excepciones: La lisis se llevó a cabo con una solución que contenía 0.5M EDTA, 0,5% N-lauroilsarcosina, 2 mg de ácido deoxicólico y 2,5mg de lisozima. Se utilizaron 2U de <i>AscI</i> y 20U de <i>ApaI</i> para la digestión total de los bloques de agarosa. La PFGE se llevó a cabo a 18°C con tiempos de pulso de 1 a 40s por 23h y 200V.	La presencia o ausencia de fragmentos de macrorrestricción para cada cepa se transcribieron en valores binarios para ser manejados y diagramados mediante el programa ELBAMAP, el cual determina las bandas más pequeñas y las más grandes y grafica de acuerdo a estos valores. Adicionalmente, la similitud entre perfiles de restricción se calculó usando el Índice de Coincidencia de Dice el cual se calcula mediante la siguiente ecuación: $S_{xy} = 2n_{xy} / (n_x + n_y)$. Donde: S_{xy} es la similitud entre las cepas x y y , n_{xy} es el número de bandas en común en los dos perfiles de DNA, y n_x y n_y son los números de bandas exhibidas por las cepas x y y respectivamente. SAS/ETS system (SAS Institute, Cary, N.C.)

	Primer Autor	Año	Referencia	Protocolo	Método o Software de análisis
3.	Proctor, ME.	1995	(95)	Como en Brosch, 1994	Utilizando el coeficiente de Simpson, calculado mediante: C/N , donde C es el número de bandas compartidas y N es el número de bandas del patrón de restricción con el mayor número de bandas entre cada uno de los pares emparejados.
4.	Brosch, R.	1996	(16)	Como en Brosch R, 1994.	Como en Brosch R, 1994.
5.	Destro, MT.	1996	(31)	El cultivo en agar triptona se resuspendió en buffer TE y se mezclaron 200 µl de la suspensión en agarosa (1% p/v) de bajo punto de fusión preparada en buffer TE. Aproximadamente 100µL de esa mezcla se agregaron en los moldes para formar los bloques. Los bloques de agarosa se incubaron con una solución de lisis que contenía EDTA, N-laurilsarcosina, y proteinasa K por 24 a 48h a 50°C. Posteriormente se inactivó la proteinasa K con fluoruro de fenilmetilsulfonilo en buffer TE y finalmente los bloques se lavaron con buffer TE y se colocaron a digerir con 50U de <i>ApaI</i> y <i>SmaI</i> en 100µl de su respectivo buffer y a la temperatura recomendada por el fabricante. La electroforesis se llevó a cabo en gel de agarosa en buffer TBE con tiempos de pulso iniciales y finales de 5,0 y 40,0s para <i>ApaI</i> y 1,5 y 18,0s para <i>SmaI</i> respectivamente. El período de migración fue de 21h a 200V.	Las tallas moleculares E5 se estimaron con el DNA Tool Kit (RamSoft). La comparación de los patrones de restricción se realizó de manera visual

	Primer Autor	Año	Referencia	Protocolo	Método o Software de análisis
6.	Louie, M.	1996	(70)	El cultivo en caldo BHI se centrifugó y el pellet se suspendió en buffer NT. Los bloques de agarosa se realizaron con agarosa (1,6% p/v) de bajo punto de fusión y la suspensión celular. Cada bloque se lisó en buffer de lisis que contenía Tris-HCl, NaCl, EDTA, Brij-58, ácido deoxicólico, Sarkosil, RNAsa y lisozima por 18h a 37°C. Los bloques fueron tratados con proteinasa K, Sarkosil y EDTA por 16h a 50°C y luego fueron lavados 3 veces con buffer TE durante una hora. Finalmente se incubaron los bloques de agarosa por 20h con una de las enzimas de restricción <i>ApaI</i> o <i>SmaI</i> de acuerdo con las recomendaciones del fabricante. La electroforesis se llevó a cabo en gel de agarosa en buffer TBE a 6V/cm y 12°C, con tiempos de pulso de 0,2 a 25s por 20h con <i>SmaI</i> y de 1 a 35s por 22h con <i>ApaI</i> .	Visual
7.	Boerlin, P.	1997	(13)	Como en Brosch., 1994. Para las muestras tratadas con <i>ApaI</i> la electroforesis se llevó a cabo por 20h con tiempos de pulso de 1 a 15s y luego por 5h con tiempos de 0,5 a 5s. Para las muestras tratadas con <i>SmaI</i> la electroforesis se llevó a cabo por 25h con tiempos de pulso de 0,9 a 7s.	Visual

	Primer Autor	Año	Referencia	Protocolo	Método o Software de análisis
8.	Nakama, A.	1998	(79)	El cultivo en caldo BHI se recolectó por cetrifugación, se lavó dos veces con Pett IV, se resuspendió en Pett IV para lograr una concentración de 10^9 cel /ml y se mezcló con agarosa de bajo punto de fusión. La mezcla se dispensó en los moldes para formar los bloques de agarosa, los cuales luego fueron incubados a 37°C por 24h en solución de lisis que contenía EDTA, ácido deoxicólico, N-laurilsarcosina y lisozima. Los moldes fueron luego desproteinizados con EDTA, N-laurilsarcosina y proteinasa K a 50°C por 48h, y posteriormente se inactivó la proteinasa K lavando dos veces con fluoruro de fenilmetilsulfonilo y buffer TE. La digestión de las muestras tratadas con 20U de <i>SmaI</i> o <i>ApaI</i> se realizó por 4h, o con <i>AscI</i> o <i>Sse8387I</i> por 6h. La electroforesis se llevó a cabo en gel de agarosa (1% p/v) a 200V con tiempos de pulso de 0,2–45s por 15h para <i>SmaI</i> , 0,5–45s por 20h para <i>ApaI</i> , y 0,5–63s por 20h para <i>AscI</i> y <i>Sse8387I</i> .	Visual
9.	Autio, T.	1999	(4)	Se recolectaron las células a partir del cultivo en BHI y se formaron los bloques de agarosa con agarosa de bajo punto de fusión. Los bloques se incubaron por 3h con la solución de lisis y adicionalmente se le agregó mutanolisina, y finalmente se lavaron con ESP a 50°C. La electroforesis se llevó a cabo en gel de agarosa (1% p/v) en buffer TE a 200V con tiempos de pulso de 1 a 15s por 18h y 1 a 35s por 18h para <i>SmaI</i> y <i>AscI</i> respectivamente.	Los patrones de macrorestricción se analizaron con el software GelCompar (version 4.0; Applied Maths, Kortrijk, Belgium). Las similitudes entre los patrones de macrorestricción fueron expresados por el coeficiente de correlación de Dice y se agruparon por el método de agrupamiento de pares no ponderado con promedios aritméticos (UPGMA method) se utilizó para la construcción de un dendrograma.

	Primer Autor	Año	Referencia	Protocolo	Método o Software de análisis
10.	Giovannacci, I	1999	(38)	Las colonias recolectadas del cultivo se lavaron dos veces con buffer TN y se centrifugaron por 10min. Se resuspendió en buffer TN y se mezcló con agarosa (1% p/v) para formar los bloques. Estos se incubaron en solución de lisis que contenía Tris-HCl, EDTA, laurilsarcosina y lisozima por 16h a 37°C. Después de remover la solución de lisis, los bloques se incubaron en EDTA, laurilsarcosina y proteinasa K por 40h a 50°C. La inactivación de la proteinasa K se realizó lavando los bloques dos veces con buffer TE por 30min a temperatura ambiente y luego incubándolos en aminoetil-bencenosulfonil a 37°C por 2h con agitación suave. Finalmente, se removió esta solución y se lavó dos veces con buffer TE por 30min a temperatura ambiente. Los bloques fueron incubados con 60U de <i>ApaI</i> por 5h a 25°C de acuerdo a las instrucciones del fabricante. La electroforesis se llevó a cabo en gel de agarosa (1,2% p/v) en buffer TBE a 200V con tiempos de pulso de 5 a 40s por 15h y 4 a 12s por 9h.	Los patrones fueron comparados por medio del software Molecular Analyst (Bio-Rad Laboratories, Richmond, USA). Las similitudes entre los perfiles, basándose en las posiciones de las bandas, se obtuvieron a partir del coeficiente de correlación de Dice. El agrupamiento por el método UPGMA se utilizó para la construcción de un dendrograma.
11.	Johansson, T.	1999	(56)	Las células recolectadas a partir de caldo tripticasa de soya se agregaron a la agarosa (1,2% p/v) de bajo punto de fusión para formar los bloques de agarosa. Después de la lisis celular y la posterior incubación en solución de proteinasa K, los bloques de agarosa con buffer TE. Los bloques fueron tratados con 2U de <i>AscI</i> y 20U de <i>ApaI</i> de acuerdo a las instrucciones del fabricante. La electroforesis se llevó a cabo en gel de agarosa (1,2% p/v) en buffer TBE a 200V con tiempos de pulso de 1-35s para <i>AscI</i> y 1-15s para <i>ApaI</i> , por 18h.	ND

	Primer Autor	Año	Referencia	Protocolo	Método o Software de análisis
12.	Miettinen, MK.	1999	(75)	Se recolectaron las células a partir del cultivo en caldo BHI y se formaron los bloques de agarosa con agarosa de bajo punto de fusión. Los bloques se incubaron por 3h con la solución de lisis y adicionalmente se le agregó mutanolisina, y finalmente se lavaron con ESP a 50°C. La electroforesis se llevó a cabo en gel de agarosa (1% p/v) en buffer TBE a 200V con tiempos de pulso de 0,5 a 29,5 por 20h para las enzimas <i>AscI</i> y <i>ApaI</i> , y 0,5 a 18s por 20h para <i>SmaI</i> .	Visual
13.	Senczek, D.	2000	(104)	Se recolectaron las células a partir del cultivo en caldo BHI por centrifugación y se resuspendieron en buffer TE y se ajustó la DO a 1,3 a 610nm. Se le adicionó solución de lisozima a la suspensión celular y se incubó por 10min a 37°C. Se mezcló la suspensión celular con agarosa (1.2%) que contenía SDS y proteinasa K para la formación de los bloques. Se incubaron los bloques en buffer de lisis que contenía EDTA, sarcosina y proteinasa K a 53°C por 2h con agitación suave. Se lavaron los bloques dos veces con buffer A y dos veces con buffer TE a 53°C por 15min. Los bloques se incubaron por 4 horas con 20U <i>SmaI</i> y 20U de <i>ApaI</i> siguiendo las instrucciones del fabricante. La electroforesis se llevó a cabo en gel de agarosa (1% p/v) en buffer TBE a 6V/cm con tiempos de pulso de 1 a 40s para la enzima <i>ApaI</i> , y 3 a 33s por 20h para <i>SmaI</i> por 24h.	Visual
14.	Tkáciková, L'.	2000	(114)	Los bloques de agarosa se incubaron por 12h a 25°C con la enzima de restricción <i>ApaI</i> (10U/ml). La electroforesis se llevó a cabo en gel de agarosa (1% p/v) en buffer TBE a 200V po 20h con tiempos de pulso de 10 a 30s.	Visual

	Primer Autor	Año	Referencia	Protocolo	Método o Software de análisis
15.	Dauphin, G.	2001	(30)	Se recolectaron las células por centrifugación a partir del cultivo en agar tripticasa de soya y se lavaron dos veces en buffer TN. Se ajustó la DO a 4 en 600nm en buffer TN y esta suspensión se mezcló con agarosa (1% p/v) en buffer TN para formar los bloques. Se incubaron los bloques de agarosa en solución de lisis que contenía Tris-HCl, EDTA, laurilsarcosina, NaCl y lisozima por 4h a 37°C. Después de remover la solución de lisis, los bloques se incubaron en EDTA, laurilsarcosina y proteinasa K por 40h a 50°C con agitación suave, y posteriormente se lavaron dos veces con buffer TE por 30min a temperatura ambiente y luego se incubaron con fluoruro de aminoetil-bencenosulfonil a 37°C por 2 horas, para inactivar la proteinasa K. Finalmente, se retiró la solución y se lavó con buffer TE dos veces por 30min a temperatura ambiente. Los bloques se trataron con 60U de <i>ApaI</i> y 40U de <i>SmaI</i> por 5h a 25°C de acuerdo con las indicaciones del fabricante. La electroforesis se llevó a cabo en gel de agarosa (1,2% p/v) en buffer TBE a 250V con tiempos de pulso de 15 a 35s por 7h y de 2 a 20s por 13h para <i>ApaI</i> , y para <i>SmaI</i> de 2 a 20s por 21h	Los patrones fueron comparados por medio del software Molecular Analyst (Bio-Rad Laboratories). Las similitudes entre los perfiles, basándose en las posiciones de las bandas, se obtuvieron a partir del coeficiente de correlación de Dice. El agrupamiento por el método UPGMA se utilizó para la construcción de un dendrograma.

	Primer Autor	Año	Referencia	Protocolo	Método o Software de análisis
16.	Graves, LM.	2001	(41)	<p>Las células del cultivo en agar BHI se removieron con un escobillón estéril y se agregaron a una solución buffer TE y se ajustó la densidad celular. A esta suspensión se le agregó solución de lisozima, se mezcló con pipeta y se incubó en baño de agua a 37°C por 10min. Se mezclaron volúmenes iguales de agarosa (1,2% p/v) fundida, dodecilsulfato sódico (SDS) y proteinasa K con la suspensión celular y se mezcló suavemente con pipeta. La mezcla se adicionó en moldes reusables para la formación de los bloques de agarosa y se dejaron enfriar por 5min. Los moldes se colocaron en una solución de lisis que contenía Tris, EDTA, lauril sarcosina de sodio y proteinasa K, y se incubaron a 54°C por 2h en baño termostatado con agitación a 200rpm. Se removió la solución de lisis y los bloques se lavaron dos veces con agua destilada precalentada (50-54°C) por 10min cada vez y cuatro veces con buffer TE precalentado (50-54°C) por 15min cada vez en baño termostatado (50-54°C) con agitación a 200rpm. Los bloques de agarosa con DNA intacto se incubaron con 25U de <i>AscI</i> por 3h a 37°C, y con 160–200U <i>ApaI</i> por 5h a 30°C. La electroforesis se llevó a cabo en gel de agarosa (1% p/v) en buffer TBE a 14°C con tiempos de pulso de 4 a 40s por 22h con ángulo de 120° y con gradiente de 6V/cm. El gel se tiñó con agua destilada que contenía bromuro de etidio y se destiñó con 3 lavados de 20-30min cada vez con agua deionizada.</p>	Los patrones fueron comparados por medio del software Molecular Analyst (Bio-Rad Laboratories).

	Primer Autor	Año	Referencia	Protocolo	Método o Software de análisis
17.	Harvey, J.	2001	(45)	Como en Brosch, 1996	<p>Las imágenes de los patrones de restricción se analizaron con los software 1D Advanced y 1D Database (Nonlinear Dynamics, Newcastle, United Kingdom).</p> <p>La correlación de los patrones de bandas se realizó con el coeficiente de Dice. Se realizó un dendrograma utilizando el método "neighbor-joining" para la comparación de patrones en un mismo gel o con el método UPGMA para comparación entre geles.</p>
18.	Vela, AI.	2001	(121)	<p>Las células se recolectaron por centrifugación a partir del cultivo en caldo BHI y se lavaron dos veces con buffer TEEN. Se formaron los bloques de agarosa por la mezcla de volúmenes iguales de suspensión celular y agarosa (2% p/v) de bajo punto de fusión. Los bloques se incubaron por 24h a 37°C con solución de lisis que contenía Tris-HCl, EDTA, NaCl, Brij 58, deoxicolato de sodio, lauril sarcosina, y lisozima. Posteriormente, los bloques fueron tratados con solución de EDTA, NaCl, lauril sarcosina y proteinasa K por 50h a 56°C y se lavaron tres veces buffer TE por 1h a 4°C. Se utilizó la endonucleasa de restricción <i>ApaI</i> de acuerdo a las instrucciones del fabricante. La electroforesis se llevó a cabo en gel de agarosa (1% p/v) con tiempos de pulso de 0,1 a 40s durante 21h a 200V y 14°C.</p>	Visual

	Primer Autor	Año	Referencia	Protocolo	Método o Software de análisis
19.	Autio, T.	2002	(6)	Como en Autio, 1999 con las siguientes modificaciones: Las células se recolectaron del cultivo en caldo BHI por centrifugación en buffer TN y se resuspendieron nuevamente en este. La suspensión celular se mezcló en volúmenes iguales con agarosa (2% p/v) de bajo punto de fusión para la formación de los moldes. Estos se colocaron en solución de lisis (Tris, NaCl, EDTA, Brij 58, deoxicolato, lauril sarcosina de sodio, RNasa y mutanolisina) a 37°C por 3h y posteriormente se lavaron con ESP (EDTA, lauril sarcosina de sodio y proteinasa K) por una hora a 50°C y finalmente con buffer TE por una hora. La proteinasa K se inactivó con Pefabloc a 37°C durante la noche. La restricción del DNA se llevó a cabo con las enzimas <i>ApaI</i> y <i>AscI</i> según las instrucciones del fabricante. La electroforesis se llevó a cabo en gel de agarosa (1% p/v) a 200V con tiempos de pulso de 1 a 35s por 18h para las dos enzimas.	Los patrones de macrorestricción se analizaron con el software GelComparII (Applied Maths, Kortrijk, Belgium). Las similitudes entre los patrones de macrorestricción fueron expresados por el coeficiente de correlación de Dice y se agruparon por el método de agrupamiento de pares no ponderado con promedios aritméticos (UPGMA method) se utilizó para la construcción de un dendrograma.
20.	Larsen, CN.	2002	(61)	ND	ND
21.	Aarnisalo, K.	2003	(1)	Como en Autio, 1999.	Visual
22.	Autio, T.	2003	(5)	Como en Autio, 1999 y Miettinen, 1999 utilizando las enzimas de restricción <i>SmaI</i> , <i>ApaI</i> y <i>AscI</i> .	Los patrones de restricción se analizaron mediante el software BioNumerics 2.5 (Applied Maths, Sint-Martens-Platen, Belgium). Las similitudes entre patrones PFGE se expresó mediante el coeficiente de Dice. El agrupamiento y la elaboración del dendrograma se realizó por el método UPGMA
23.	Keto-Timonen, RI.	2003	(59)	Como en Autio, 1999 y Autio, 2002, utilizando a enzima <i>AscI</i> .	Los patrones de restricción se analizaron mediante el software BioNumerics 2.5 (Applied Maths, Sint-Martens-Platen, Belgium). Las similitudes entre patrones PFGE se expresó mediante el coeficiente de Dice. El agrupamiento y la elaboración del dendrograma se realizó por el método UPGMA
24.	Levin, RE.	2003	(66)	NA	NA

ND: No hay datos.
NA: No aplica.

	Primer Autor	Año	Referencia	Protocolo	Método o Software de análisis
25.	Peccio, A.	2003	(92)	Como en Autio, 1999.	Visual
26.	Borucki, MK	2004	(14)	Como en Graves, 2001	La elaboración del dendrograma se realizó por el método UPGMA.
27.	Gudmundsdóttir, S.	2004	(42)	Las células se recolectaron por centrifugación a partir del cultivo en caldo BHI. Se formaron los bloques de agarosa por la mezcla de volúmenes iguales de suspensión celular y agarosa. Los bloques se digirieron con 20U de la enzima <i>ApaI</i> a 37°C y 10U de la enzima <i>AscI</i> como se recomienda por el fabricante. Los tiempos de pulso para las dos enzimas fue de 1 a 15s por 20h	Los patrones de bandas se analizaron visualmente y mediante el NTSYS system (NTSYS-pc numerical taxonomy and multivariate analysis system version 1.80, Exeter Software, Setauket, New York, USA). Las similitudes entre patrones PFGE se expresó mediante el coeficiente de Dice. El agrupamiento y la elaboración del dendrograma se realizó por el método UPGMA.
28.	Harvey, J.	2004	(46)	Harvey, 2001, empleando las enzimas <i>ApaI</i> (100U) y <i>AscI</i> (25U) y la electroforesis se llevó a cabo a 200V con tiempos de pulso de 4 a 40s por 22h.	Las imágenes de las electroforesis se analizaron mediante los software 1D Advanced y 1D Database (Nonlinear Dynamics, Newcastle, UK). Las similitudes entre patrones PFGE se expresó mediante el coeficiente de Dice. El agrupamiento y la elaboración del dendrograma se realizó por el método UPGMA.
29.	Lukinmaa, S.	2004	(71)	Las células se recolectaron del cultivo en caldo BHI por centrifugación en buffer TN y se resuspendieron nuevamente en este. La suspensión celular se mezcló en volúmenes iguales con agarosa (2% p/v) de bajo punto de fusión para la formación de los moldes. Estos se colocaron en solución de lisis (Tris, NaCl, EDTA, Brij 58, deoxicolato, lauril sarcosina de sodio, RNasa y mutanolisina) a 37°C durante toda la noche y posteriormente se incubaron con ESP (EDTA, lauril sarcosina de sodio y proteinasa K) durante la noche a 55-57°C, y finalmente se lavaron con buffer TE por 30 min, con buffer TE y fluoruro de metilsulfonilo por media hora para inactivar la proteasa K, y con buffer TE tres veces por media hora cada vez. La restricción del DNA se llevó a cabo con la enzima <i>AscI</i> (5U) y la electroforesis se realizó en gel de agarosa (1% p/v) a	Las imágenes fueron analizadas mediante el software BioNumerics (Applied Maths, Kortrijk, Belgium). Los valores de similaridad se calcularon mediante el método UPGMA y el coeficiente de Dice mediante el software BioNumerics.

	Primer Autor	Año	Referencia	Protocolo	Método o Software de análisis
				210V con tiempos de pulso de 1 a 28s por 10h y 28 a 30s por 10h.	
30.	Revazishvili, T.	2004	(97)	Como en Graves, 2001	Los patrones PFGE fueron comparados por medio de el coeficiente de Dice utilizando el software DST Molecular Analyst (Bio-Rad Laboratories). La construcción del dendrograma se elaboró usando el método UPGMA.
31.	Zhang, Y.	2004	(125)	Como en Graves, 2001	ND
32.	Gilbreth, SE.	2005	(34)	Como en Graves, 2001	Las imágenes de los patrones fueron comparados mediante el paquete de software Applied Maths BioNumerics (version 4.0; Applied Maths, Saint-Martins-Latem, Belgium). La agrupación de los patrones se realizó utilizando algoritmos con BioNumerics, específicamente con el método UPGMA y el coeficiente de correlación Dice.
33.	Gudmundsdóttir, S.	2005	(43)	Como en Gudmundsdóttir, 2004 con las siguientes excepciones: Los bloques se lisaron sólo por 4h y sólo se lavaron una vez con una solución de EDTA, lauril sarcosina de sodio y proteinasa K a 50°C durante la noche. Se utilizaron 5U de <i>ApaI</i> y 10U de <i>AscI</i> para la restricción del DNA. La electroforesis se llevó a cabo en gel de agarosa (1% p/v) en buffer TBE con tiempos de pulso de 1s a 28s por 10h y 28s a 30s por 10h para <i>AscI</i> y de 1s a 18s por 20h para <i>ApaI</i> .	El análisis de los geles se realizó visualmente con ayuda del GelComparII (Applied Maths, Kortrijk, Belgium)
34.	Hunter, SB.	2005	(52)	Como en Graves, 2001	Las imágenes de los geles se analizaron con el software Molecular Analyst Fingerprinting Plus (Bio-Rad, Hercules, Calif.) o BioNumerics software (Applied Maths, Sint-Martens-Latem, Belgium).
35.	Olsen, SJ.	2005	(87)	Como en Graves, 2001	Como en Graves, 2001

	Primer Autor	Año	Referencia	Protocolo	Método o Software de análisis
36.	Chiu, S.	2006	(26)	Se recolectaron las células por centrifugación y se lavaron con buffer TN y se resuspendieron en este mismo. La suspensión celular se mezcló con agarosa (2% p/v) para la formación de los bloques. La lisis celular se llevó a cabo a 56°C con Tris-50, EDTA, lauril sarcosina y proteinasa K durante la noche, y finalmente se lavaron con buffer TE. La digestión del DNA se realizó con las enzimas <i>ApaI</i> y <i>SmaI</i> y la electroforesis se llevó a cabo en gel de agarosa (1,2% p/v) en buffer TBE a 6V/cm con tiempos de pulso de 1 a 40s para <i>ApaI</i> y 3 a 33s para <i>SmaI</i> .	Se realizaron dendrogramas por medio del software Molecular Analyst Fingerprinting v1.6 (BioRad) con el coeficiente de Dice y el método UPGMA.
37.	Chou, CH.	2006	(27)	Como en Graves, 2001	Las imágenes de los geles se digitalizaron y analizaron usando el software Bionumerics (version 4.0, Applied Maths, Kortrijk, Belgium). El análisis de los patrones y las similitudes genéticas se calcularon usando el coeficiente de Dice y el método UPGMA.
38.	Shen, Y.	2006	(106)	Como en Graves, 2001	Los patrones PFGE fueron comparados por medio del software BioNumerics (version 3.5; Applied-Maths, Kortrijk, Belgium). La relación entre aislamientos se determinó por el método UPGMA.
39.	Berzins,A.	2007	(8)	El cultivo en caldo tripticasa de soya se centrifugó en buffer TN. Los bloques se formaron mezclando suspensión celular en buffer TN y agarosa (2% p/v) de bajo punto de fusión. Los bloques se lisaron en una solución que contenía RNasa, lisozima, mutanolisina, Tris, NaCl, EDTA, Brij-58, deoxicolato de sodio y lauril sarcosina de sodio, a 37°C por 3h. Se lavaron los bloques dos veces con solución ESP (EDTA, lauril sarcosina de sodio+, proteinasa K) a 50°C y se lavaron también con buffer TE a 50°C. Se utilizó la enzima <i>AscI</i> para la restricción del ADN a 37°C por 16h. La electroforesis se llevó a cabo en gel de agarosa (1% p/v) en buffer TBE a 200V con tiempos de pulso de 1 a	Los patrones de macrorrestricción se analizaron mediante el software BioNumerics version 4.01 (Applied Maths, Kortrijk, Belgium). Se aplicó el coeficiente de correlación de Dice para identificar las similitudes entre PFGE tipos. Se construyó un dendrograma con el método UPGMA.

	Primer Autor	Año	Referencia	Protocolo	Método o Software de análisis
				35s por 18h	
40.	Fugett, EB.	2007	(36)	Como en Graves, 2001	Los patrones PFGE fueron comparados por medio del software BioNumerics version 3.5 (Applied Maths, Saint-Matins-Latem, Belgium). El agrupamiento por similitudes se realizó con BioNumerics utilizando el método UPGMA y el coeficiente de correlación de Dice.
41.	Hellström, S.	2008	(47)	Como en Autio, 1999 y Autio, 2002, utilizando Pronasa en lugar de proteinasa K.	Los patrones de macrorrestricción se analizaron mediante el software BioNumerics version 4.50 (Applied Maths, Sint-Martens-Platen, Kortrijk, Belgium). Se aplicó el coeficiente de correlación de Dice para identificar las similitudes entre PFGE tipos. Se construyó un dendrograma con el método UPGMA
42.	Lindstedt, BA.	2008	(67)	Como en Graves, 2001	Las imágenes se analizaron con el software GelComparII (Applied Maths, Sint-Martens-Latem, Belgium). Las similitudes entre patrones se determinó utilizando el coeficiente de Dice y el dendrograma se realizó con el método UPGMA.
43.	Miya, S.	2008	(76)	Como en Graves, 2001	Se procesaron las imágenes con el software BioNumerics; y el análisis de agrupamiento se realizó mediante UPGMA usando el coeficiente de Dice.
44.	Neves, E.	2008	(82)	Como en Graves, 2001	Los patrones PFGE se analizaron y compararon usando el software GelComparII version 4.5 (Applied Maths, Kortrijk, Belgium). Los niveles de similitud se basaron en el coeficiente de correlación de Dice. Para el análisis agrupamiento de los patrones se utilizó el método UPGMA
45.	Berzins, A.	2009	(9)	Como en Berzins, 2007	Como en Berzins, 2007

	Primer Autor	Año	Referencia	Protocolo	Método o Software de análisis
46.	Latorre, AA.	2009	(62)	Como en Graves, 2001	El análisis de los patrones se realizó de manera visual y también con ayuda del software BioNumerics 3.5 (Applied Maths, Saint-Matins-Latem, Belgium).
47.	Lomonaco, S	2009	(69)	Como en Graves, 2001	Los patrones se analizaron con Bionumerics software (v 2.0, Applied Maths, Kortrijk, Belgium). La similitud entre patrones se determinó mediante el coeficiente de Dice. Se realizó un dendrograma mediante el método "Complete Linkage algorithm"
48.	Mamina, C.	2009	(73)	Como en Graves, 2001	Los patrones PFGE se compararon mediante el coeficiente de Dice utilizando el software Molecular Analyst software (Bio-Rad Laboratories). Los resultados del agrupamiento se confirmaron de manera visual
49.	Marcus, R.	2009	(74)	Como en Graves, 2001	Los patrones PFGE se analizaron y compararon usando el software BioNumerics (Applied Maths, Saint-Martins-Latem, Belgium).
50.	Sauders, BD.	2009	(101)	Como en Graves, 2001	ND
51.	Almeida, G.	2010	(3)	Como en Graves, 2001	Las imágenes de los patrones se analizaron mediante el software BioNumerics version 5.1 (Applied Maths, Kortrijk, Belgium). El análisis de agrupamiento se realizó con el método UPGMA usando el coeficiente de Dice
52.	Berzins, A.	2010	(7)	Como en Berzins, 2007	Los resultados de la PFGE se analizaron con el software BioNumerics version 5.1 (Applied Maths, Kortrijk, Belgium). El coeficiente de Dice se utilizó para identificar las similitudes entre los PFGE tipos. Se elaboró un dendrograma mediante el método UPGMA.

	Primer Autor	Año	Referencia	Protocolo	Método o Software de análisis
53.	Chen, BY.	2010	(25)	Como en Graves, 2001 con las siguientes modificaciones: el cultivo se realizó en caldo tripticasa de soya; los bloques se realizaron con agarosa (1,6% p/v) de bajo punto de fusión y la suspección celular; cada bloque se lisó en buffer de lisis (Tris, EDTA, lauril sarcosina de sodio, proteasa K) por 2h a 54°C; se lavaron los bloques 4 veces con buffer TE; la digestión de los bloques se realizó con 200U de <i>ApaI</i> a 30°C durante la noche.	El análisis de las imágenes se realizó con BioNumerics 6.0 (Applied Maths, Sint-Martens-Latem, Belgium). La similitud entre patrones se determinó mediante el coeficiente de correlación de Dice y los dendrogramas se generaron por el método UPGMA.
54.	Hellström, S.	2010	(48)	Como en Autio, 2002 utilizando Pronasa en lugar de proteinasa K.	Los patrones de macrorrestricción se analizaron con BioNumerics versión 4.61 (Applied Maths, Sint-Martens-Platen, Kortrijk, Belgium). Las similitudes entre los patrones de restricción se expresaron con el coeficiente de correlación de Dice.
55.	Kerouanton, A.	2010	(58)	Como en Graves, 2001	Los patrones fueron categorizados y analizados por el análisis del dendrograma realizado mediante el coeficiente de Dice y el agrupamiento de los datos por el método UPGMA con el software BioNumerics
56.	Latorre, AA.	2010	(63)	Como en Graves, 2001	El análisis de los patrones se realizó de manera visual y también con ayuda del software BioNumerics 3.5 (Applied Maths, Saint-Matins-Latem, Belgium).
57.	Nucera, D.	2010	(84)	Como en Graves, 2001	Inicialmente los patrones se analizaron visualmente y luego con el software BioNumerics (v2.0, Applied Maths, Kortrijk, Belgium). La similitud fue determinada por el coeficiente de Dice. Los perfiles de restricción se combinaron y analizaron usando el algoritmo UPGMA.

	Primer Autor	Año	Referencia	Protocolo	Método o Software de análisis
58.	O'Connor, L.	2010	(85)	Como en Graves, 2001 con la siguiente modificación: el gel se preparó en buffer TBE que contenía tioúrea 50µmol/L.	Los patrones PFGE se analizaron con BioNumerics Version 5.0 software (Applied Maths; NV Keistraat, Sint-Martens-Latem, Belgium). La similitud entre patrones se determinó por el coeficiente de Dice y los dendrogramas fueron generados usando el método UPGMA.
59.	Vázquez, J.	2010	(120)	Como en Graves, 2001	ND
60.	Ward, TJ.	2010	(122)	Como en Graves, 2001	Los patrones resultantes se manejaron con Bionumerics (Applied Maths, Austin, TX).
61.	Smith, B.	2011	(107)	ND	ND
62.	Williams, SK.	2011	(124)	Como en Graves, 2001	Los patrones PFGE fueron comparados y analizados usando Applied Maths BioNumerics (Applied Maths, Saint-Matens-Latem, Belgium). El análisis de agrupamiento por similaridad se realizó por medio del software BioNumerics usando el método UPGMA y el coeficiente de Dice.
63.	Boscher, E.	2012	(15)	Como en Graves, 2001	Los patrones PFGE fueron comparados y analizados usando BioNumerics (Applied Maths, Saint-Matens-Latem, Belgium). El análisis de agrupamiento por similaridad se realizó por medio del software BioNumerics usando el método UPGMA y el coeficiente de Dice.
64.	Di Ciccio, P.	2012	(32)	Como en Graves, 2001	Los patrones se analizaron inicialmente de manera visual y luego se analizaron con el software GelCompar (Applied Maths, Sint-Martens-Platen, Belgium). La similitud entre patrones se expresó por el coeficiente de correlación de Dice y la agrupación de datos y elaboración del dendrograma se realizaron mediante el método UPGMA
65.	Ferronato, AI.	2012	(35)	Como en Graves, 2001	Visual

	Primer Autor	Año	Referencia	Protocolo	Método o Software de análisis
66.	Galvão, NN.	2012	(80)	Como en Graves, 2001	Los perfiles obtenidos se analizaron con el software BioNumerics v. 3.0 (Applied Maths, Gand, Belgium), basándose en el coeficiente de Dice. El método UPGMA se usó para el agrupamiento de los perfiles y la elaboración del dendrograma.
67.	Mendonça, KS.	2012	(105)	Como en Graves, 2001	Los patrones de macrorestricción obtenidos se analizaron con Bionumerics software (version 5.10, Applied Maths, Sint-Martens-Latem, Belgium). Las similitudes entre patrones se expresaron como un coeficiente de Dice y la elaboración del dendrograma y agrupación de los datos se realizaron con el método UPGMA.
68.	Pagadala, S.	2012	(91)	Como en Graves, 2001	Se generaron dendrogramas usando el software BioNumerics (Applied Maths, Austin, TX). Se establecieron los pulsotipos basándose en el coeficiente de correlación de Dice y el método UPGMA.
69.	Prencipe, VA.	2012	(94)	Como en Graves, 2001	Los patrones de macrorrestricción se analizaron con BioNumerics versión 4.0 (Applied Maths, Kortrijk, Belgium). Las similitudes entre los patrones de restricción se determinaron con el coeficiente de correlación de Dice.

	Primer Autor	Año	Referencia	Protocolo	Método o Software de análisis
70.	Zunabovic, M.	2012	(127)	<p>El cultivo en caldo BHI se recolectó por cetrifugación, se resuspendió en soución PIV (buffer TN) y se volvió a cetrifugar. El pellet se resuspendió nuevamete en solución PIV que contenía lisozima y mutanolisina y se incubó por 15min a 37°C. La suspensión celular se mezcló con agarosa (1% p/v) de bajo punto de fusión. Los bloques resultantes se incubaron con una solución que cotenía Tris-HCl, NaCl, EDTA, Brij 58, deoxicolato de sodio y lauril sarcosina de sodio, a 37°C durante la noche. Después de removerse la solución de lisis, se lavaron los bloques con buffer ES incubándose a 50°C por 30min. Se retiró la solución ES y los bloques se incubaron con solución ES que contenía proteinasa K, a 50°C por 17h. Se removió la solución proteolítica y se lavaron los bloques con buffer TE y luego se incubaron con buffer TE a 4°C por 30min. La digestión del ADN se realizó con las enzimas <i>AscI</i> (20U), <i>ApaI</i> (40U) y <i>SmaI</i> (50U) bajo las instrucciones del fabricante. La electroforesis se llevó a cabo en gel de agarosa (1,1% p/v) en buffer TBE a 200V</p>	<p>Los patrones PFGE se analizaron con el software Bionumerics, version 6.0 (Applied Maths, Sint-Martens-Latem, Belgium). El coeficiente de Jaccard se utilizó para describir las similitudes entre los aislamientos. Para el análisis de agrupamiento de los patrones se utilizó el método UPGMA.</p>

6.1.1. Técnicas empleadas en estudios de epidemiología molecular de *L. monocytogenes*

L. monocytogenes ha sido tipificada por diversos métodos, entre estos, el más comúnmente usado es la serotipificación. Esta técnica clasifica *L. monocytogenes* en 13 serotipos con base en los antígenos somáticos y flagelares y depende de sueros específicos de alta calidad preparados con cepas estandarizadas (78). No es una técnica muy discriminatoria pero es de uso frecuente como complemento a otros métodos de tipificación.

La electroforesis de multilocus enzimáticos (MEE por sus siglas en inglés) es una técnica que se utiliza para elucidar la epidemiología de una variedad de especies bacterianas, diferenciando los aislamientos de acuerdo con la movilidad electroforética de un gran número de sus enzimas metabólicas (22). La MEE es considerada una técnica moderadamente discriminatoria con resultados reproducibles a partir de condiciones estandarizadas (10).

La técnica de análisis con endonucleasas de restricción (REA por sus siglas en inglés) consiste en la digestión del DNA de los organismos con enzimas de restricción que cortan el ADN con alta frecuencia, generando así más de 100 fragmentos que son separados de acuerdo a su tamaño por electroforesis en gel. Este método es simple, rápido, de bajo costo y discriminatorio, aunque la gran cantidad de fragmentos en los patrones generados puede hacer difícil la interpretación (37).

La ribotipificación es una técnica ampliamente utilizada basada en el polimorfismo observado en el gen del RNAr. En esta, el DNA es digerido con enzimas de restricción de corte frecuente y posteriormente se realiza Southern blot para detectar los digeridos, que se hibridan con sondas específicas para los genes que codifican para el ARN ribosomal. Se sabe que tiene un poder discriminatorio similar a MEE y tiene la ventaja de ser reproducible, aunque no puede diferenciar eficientemente cepas pertenecientes a los serotipos 1/2b y 4b (54).

Otra técnica de tipificación es la amplificación aleatoria de ADN polimórfico (RAPD por sus siglas en inglés) también conocida como PCR con cebador arbitrario (AP-PCR), en la cual cebadores cortos son usados para la PCR bajo condiciones flexibles. Los patrones variables pero relativamente simples obtenidos después de la electroforesis se utilizan para diferenciar las cepas. La ventaja de esta técnica es que puede ser utilizada aun cuando no se tiene DNA puro (12).

El método de tipificación AFLP (“amplified fragment length polymorphism”) consiste en la digestión del DNA puro con dos enzimas de restricción, una de corte poco frecuente y otra de mayor frecuencia, seguido de la unión de los fragmentos resultantes con un adaptador oligonucleótido de doble hebra complementaria a la secuencia del sitio de restricción, y finalmente la amplificación por PCR con cebadores específicos bajo condiciones altamente rigurosas y los patrones resultantes serían analizados por electroforesis. Es una técnica discriminatoria y reproducible (2).

Una técnica más reciente es la MLVA (“Multiple-Locus Variable number of tandem repeat Analysis”), desarrollada en el 2003 para subtipificar *Salmonella*. MLVA es un método basado en

PCR que puede ser utilizado para discriminar entre diferentes cepas de una bacteria, detectando el número de repeticiones en tándem (TR) en un locus específico en el genoma de un microorganismo. Es una técnica de alto poder discriminatorio y reproducible (77).

6.1.2. La Electroforesis en Gel de Campo Pulsado (PFGE) en el estudio de la epidemiología molecular de *L. monocytogenes*

La caracterización de las cepas bacterianas mediante la Electroforesis en Gel de Campo Pulsado (PFGE) ha sido aplicada con éxito en la tipificación de *L. monocytogenes* en las investigaciones epidemiológicas y de contaminación (1, 3, 31, 52, 56). Se ha convertido rápidamente en el método más utilizado de subtipificación para la investigación de brotes de listeriosis, debido a que la PFGE utiliza enzimas de restricción que cortan el ADN genómico con baja frecuencia y por tanto producen perfiles simples (10-20 bandas); esto ayuda a simplificar el análisis de los patrones resultantes y mediante el uso de software logra comparar rápida y fácilmente los aislamientos (41).

La PFGE ha sido comparada en muchos estudios con otros métodos de tipificación fenotípica y molecular de *L. monocytogenes* en donde en la mayoría de los casos resulta como la técnica más discriminatoria y reproducible. En estos, se emplea el índice de diversidad de Simpson (SDI o DI) (51) el cual se basa en la probabilidad de que dos cepas no relacionadas sean ubicadas en diferentes grupos de tipificación. Este índice es utilizado para comparar métodos de tipificación y seleccionar el más discriminatorio.

Así, Boerlin y colaboradores en su estudio (13) encontraron que la PFGE era el método más discriminatorio, seguido de REA, MEE y por último la serotipificación; Giovannacci y colaboradores (38) hallaron que la técnica RAPD mostraba un poder discriminatorio mucho menor al de la PFGE; Aarnisalo y colaboradores (1) encontraron que la PFGE tenía mayor poder de discriminación que la ribotipificación; Autio y colaboradores (5) utilizaron PFGE, AFLP y la combinación de las dos técnicas y encontraron que incluso la PFGE por sí sola tenía mayor índice de discriminación que la combinación de las dos técnicas; Borucki y colaboradores (14) encontraron que el poder discriminatorio de la PFGE era mayor que el de la técnica MLST y este a la vez era mayor al de la ribotipificación; Lukinmaa y colaboradores (71), encontraron que la discriminación de la PFGE era mayor a la de la ribotipificación y la serotipificación; Fugett y colaboradores (36) encontraron que la PFGE presentaba un mayor ID que la ribotipificación; Mammina y colaboradores (73) hallaron que la PFGE es más discriminatoria que la ribotipificación y esta a su vez más discriminatoria que la PCR-RFLP; y finalmente, Ward y colaboradores (122) encontraron que la PFGE tenía mayor poder de discriminación que la MLGT.

En algunos casos, se ha encontrado que la PFGE posee igual poder discriminatorio que otros métodos: Keto-Timonen y colaboradores (59) encontraron que los métodos PFGE y AFLP presentaban excelente discriminación y no había mayor diferencia entre las dos; y Lindstedt y colaboradores (67) determinaron que la MLVA presentaba mayor discriminación que PFGE.

Finalmente, en algunos estudios se ha encontrado que la PFGE es menos discriminatoria que otros métodos. Revazishvili y colaboradores (97) hallaron que la MLST presentaba mayor poder

discriminatorio que PFGE; y Miya y colaboradores (76) encontraron que la técnica MLVA es más discriminatoria que la PFGE, MLST y la ribotipificación.

De la misma manera se ha determinado el poder discriminatorio de la técnica al utilizar diferentes enzimas de restricción (Tabla 3). Para *L. monocytogenes* se han utilizado las endonucleasas de restricción *ApaI*, *AscI*, *SmaI*, *NotI* y *Sse8387I*; dentro de estas, Howard y colaboradores (50) encontraron que *NotI* genera grandes fragmentos lo que dificulta la determinación del tamaño, y Nakama y colaboradores (79) encontraron que *Sse8387I* presentaba menor poder de discriminación que *ApaI*, *AscI* y *SmaI*. Los resultados en cuanto a discriminación entre las enzimas *ApaI*, *AscI* y *SmaI* han variado considerablemente (Tabla 3) dependiendo en la mayoría de los casos, del origen de los aislamientos y su diversidad genética; sin embargo, se ha determinado que el uso de dos o más enzimas aumenta el poder discriminatorio de la técnica (66), y la combinación de las enzimas *ApaI* y *AscI* ha sido reportada por diversos autores como la que presenta excelente discriminación para *L. monocytogenes* (41).

En la tabla 5 se puede evidenciar que las enzimas que se han utilizado para la digestión del ADN de *L. monocytogenes* tienen secuencias de reconocimiento ricas en GC. El genoma de *L. monocytogenes* tiene un tamaño de 2.9Mpb y un contenido bajo de G-C (37.8%), es por esto que se utilizan enzimas de restricción con secuencias de cortes ricas en GC y que la digestión con estas enzimas generan patrones de PFGE con pocas bandas (de 10 a 20) facilitando el análisis.

Tabla 5. Características de las enzimas endonucleasas de restricción utilizadas en la PFGE para *L. monocytogenes*.

Enzima	Secuencia de Reconocimiento	%AT	%GC	Longitud de secuencia
<i>ApaI</i>	5'---GGGCC C---3' 3'---C CCGGG---5'	0	100	6pb
<i>AscI</i>	5'---GG CGCGCC---3' 3'---CCGCGC GG---5'	0	100	8pb
<i>SmaI</i>	5'---CCC GGG---3' 3'---GGG CCC---5'	0	100	6pb
<i>NotI</i>	5'---GC GGCCGC---3' 3'---CGCCGG CG---5'	0	100	8pb
<i>Sse8387I</i>	5'---CCTGCA GG---3' 3'---GG ACGTCC---5'	25	75	8pb

Anteriormente el protocolo para la PFGE tomaba alrededor de 7 días, por lo que muchos investigadores preferían emplear técnicas más rápidas aunque su poder discriminatorio fuese menor,

además, existían muchas discrepancias en cuanto a tiempos, temperaturas, soluciones tampón, reactivos, concentraciones, enzimas de restricción y voltajes empleados en el procedimiento.

En el 2001 Graves y Swaminathan (41) estandarizaron el protocolo para la subtipificación de *L. monocytogenes* por PFGE, realizando ajustes que incluían el uso células bacterianas obtenidas directamente de cultivo en placa, tratamiento de pre-lisis con lisozima, 2h de lisis, reducción del tiempo de los lavados utilizando agua precalentada y tampón TE (0,01 M Tris-EDTA, pH $8 \pm 0,2$), usando tiempos mínimos de digestión con las enzimas de restricción, y utilizando agarosa SeaKem Gold para electroforesis, con lo que lograron la reducción del tiempo a 30h a partir de la obtención del cultivo puro.

A partir de esta estandarización, los resultados de las investigaciones fueron más fácilmente comparables, pudiendo así crear una base de datos internacional. PulseNet es una red nacional de laboratorios de salud pública y agencia de reglamentación de alimentos, coordinado por los Centros para el Control y Prevención de Enfermedades del CDC. Fue creado en Atlanta, USA en 1995 y la red en América Latina y el Caribe en el 2004 con el fin de reducir las enfermedades de transmisión por alimentos (ETA), promoviendo la utilización de PFGE para el diagnóstico y tipificación de patógenos a fin de fortalecer la vigilancia como el sistema de respuesta en cada uno de los países y regiones en los que se está implementando. Los patrones son sometidos vía electrónica a una base de datos dinámica en el CDC, disponible para los participantes bajo demanda, la cual permite rápidamente la comparación de los patrones.

El protocolo estandarizado por PulseNet es el siguiente:

La bacteria se cultiva en placas de agar BHI a 37°C por 16–18h. Las células se transfieren de las placas a tubos plásticos de 15ml que contengan 3ml de tampón TE usando un hisopo estéril de algodón y se ajusta la densidad celular con turbidímetro a un rango entre 0,79 y 0,81. Se transfiere la suspensión celular estandarizada a tubos de microcentrífuga de 1.5 ml y se añaden 60µl de solución de lisozima 10mg/ml (Sigma, St. Louis, MO) mezclando con la pipeta. Se incuba la mezcla en baño termostatado a 37°C por 10min. Se prepara en agua destilada estéril y se mantiene entre 53 y 56°C agarosa SeaKem Gold fundida 1,2% (p/v), dodecilsulfato de sodio (SDS) 1% (p/v), proteinasa K 0,2mg/ml (Roche Molecular Biochemicals, Indianapolis, IN) y se mezcla en volúmenes iguales con la suspensión celular mezclando suavemente con la pipeta repetidas veces. La mezcla (600µl) se divide para ser agregada a moldes reusables (300µl a cada uno) (Bio-Rad, Hercules, CA) y se dejan enfriar por 5min. Los bloques de agarosa se transfieren a tubos plásticos de 50ml que contengan 4ml de buffer de lisis (50mM Tris pH $8,0 \pm 0,2$; 50mM EDTA, pH $8,0 \pm 0,2$; 1% (p/v) lauril sarcosinato de sodio, 0,15mg/ml Proteínasa K), se incuba por 2h entre 50 y 54°C en baño termostatado con agitador orbital a 200rpm. Luego de la proteólisis se decanta la solución de lisis y se lavan los bloques 2 veces con 15ml de agua destilada precalentada (50-54°C) por 10min cada uno y 4 veces con tampón TE por 15min cada uno en baño termostatado (50-54°C) con agitador orbital a 200rpm. Se cortan los bloques (2-2,5mm) utilizando el accesorio para corte de gel (S&S Service Company, Stockbridge, GA). Los bloques se pueden almacenar hasta el momento de la digestión en 1,5ml de buffer TE a 4°C. El ADN de alto peso molecular intacto en los bloques de 2-2,5mm se colocan en digestión con *AscI* (New England BioLabs, Beverly, MA) o *ApaI* (Roche Molecular Biochemicals) en soluciones de tampón de acuerdo a las instrucciones del fabricante. La

restricción con *AscI* se realiza a una concentración de 25U por bloque por 3h a 37°C o con *ApaI* a una concentración de 160–200U por bloque por 5h a 30°C. Los fragmentos de restricción del ADN en los bloques se separan por electroforesis en gel de agarosa 1% (p/v) SeaKem Gold en solución tampón 0,5X de Tris–borato–EDTA (preparado diluyendo una solución 10X de TBE) a 14°C en un aparato PFGE CHEF-Mapper (BioRad). La electroforesis se lleva a cabo con tiempos de pulso de 4 a 40s, por 22h, con ángulo de 120°, con gradiente de 6V/cm, a 14°C. Luego de la electroforesis los geles se tiñen por 15-20min en 250ml de agua deionizada que contenga 25µl de bromuro de etidio (10mg/ml) y se destiñen con tres lavados de 20-30min cada uno usando 500ml de agua deionizada. El análisis de los patrones se realiza con el software Molecular Analyst Fingerprinting Plus (BioRad) (41).

Diversos estudios han analizado los patrones resultantes de la electroforesis de manera visual (10, 26, 29, 43, 58, 63, 67, 79, 88, 96, 101, (1); (Tabla 4) basándose en el criterio de tipificación de cepas bacterianas de Tenover (113) en cual si dos patrones no difieren en sus bandas, se consideran indistinguibles y por lo tanto las cepas pertenecen al brote; si dos patrones difieren de 2 a 3 bandas, se consideran estrechamente relacionados y las cepas posiblemente hacen parte del brote; si dos patrones difieren de 4 a 6 bandas, se consideran posiblemente relacionados y las cepas posiblemente hacen parte del brote; y si dos patrones difieren en 7 o más bandas, se consideran diferentes y por lo tanto no hacen parte del brote.

Sin embargo, el análisis visual se presta para la obtención de resultados subjetivos y la falta de concordancia entre estudios. Es por esto que se emplean software para el análisis computacional de los patrones, logrando así resultados más reproducibles, confiables y comparables. Estos por lo general, se basan en el índice de coincidencia de Dice (33) el cual se calcula mediante la siguiente ecuación:

Sin embargo, en los estudios analizados de PFGE para *L. monocytogenes* (Tabla 4) el 67% utiliza el índice de coincidencia de Dice (33), y el índice de Jaccard (53) y el coeficiente de Simpson lo utilizan en tan sólo el 1,4%, por lo que se sugiere el primer método como el más adecuado para hallar la similitud entre los patrones de las cepas estudiadas.

El análisis computacional también permite la agrupación de los datos, basándose en el método agrupamiento de pares no ponderado con promedios aritméticos (UPGMA) (55) el cual es un algoritmo de agrupación jerárquica que consiste en la búsqueda de la distancia más pequeña en la matriz de distancias genéticas y el agrupamiento de las unidades que la conforman como una sola unidad taxonómica independiente. Así, se calculan los promedios de la nueva unidad contra las restantes creando una nueva matriz y se repite el proceso hasta que todas las unidades queden unidas a un único elemento (ancestro hipotético) (55). De esta manera se logra la elaboración un diagrama en forma de árbol basado en la similitud de los aislamientos, llamado dendrograma (Figura 2).

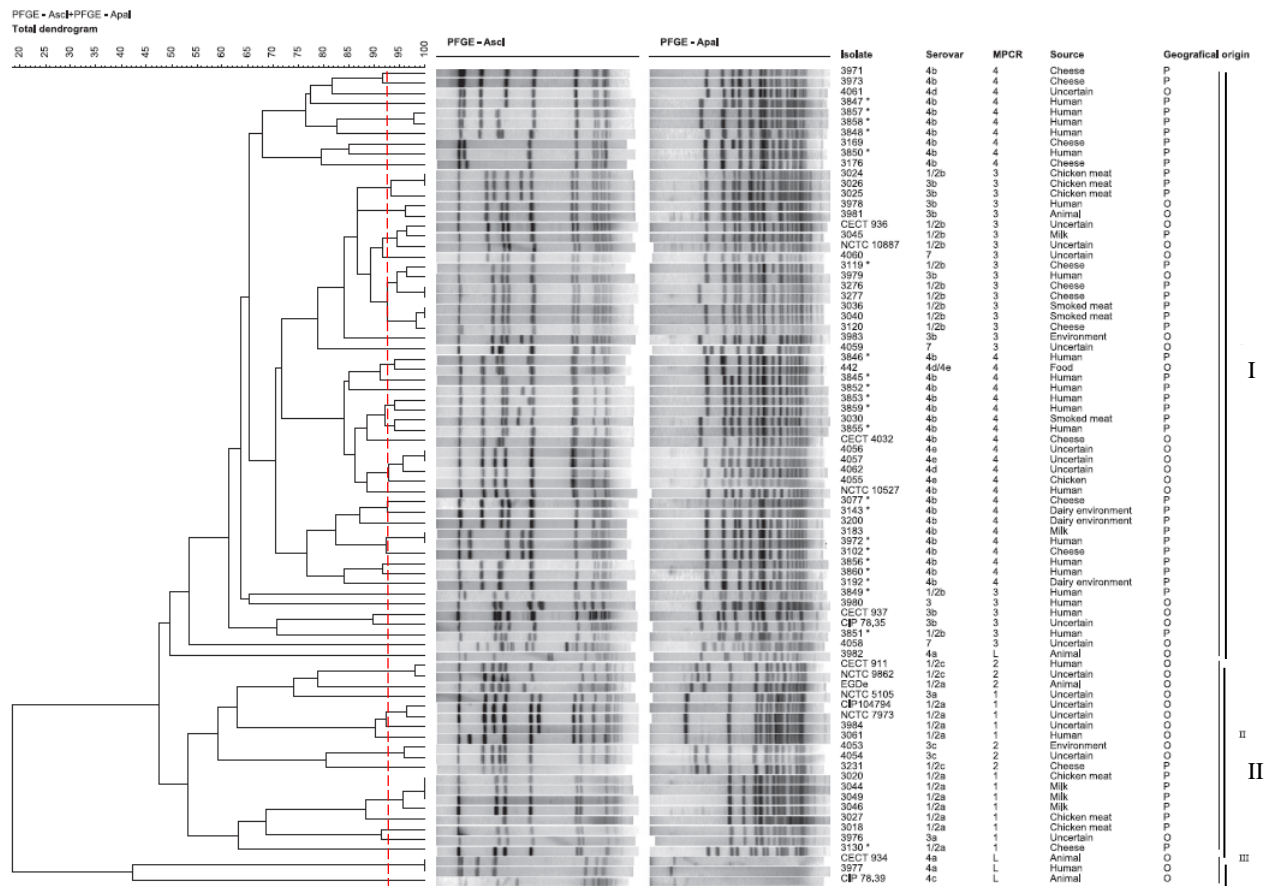


Figura 2. Dendrograma obtenido por PFGE con las enzimas *ApaI* y *AscI* y la agrupación por linajes (I, II y III) según su serotipo. La línea punteada corresponde al coeficiente de correlación cofenética utilizada en el estudio (Tomado de (82)).

A partir de la agrupación de los patrones mediante dendrogramas, basados en PGFE u otras técnicas moleculares, ha sido posible la clasificación de los aislamientos de *L. monocytogenes* en 3 grupos o linajes genéticos, como se puede observar en el dendrograma de la figura 2. La nomenclatura de los linajes varía entre investigadores (**Tabla 4**), sin embargo por lo general se tiene que el linaje I corresponde a los serotipos 1/2b, 3b, 4b, 4d, 4e y 7; el linaje II los serotipos 1/2a, 3a, 1/2c y 3c; y el linaje III incluye serotipos 4a y 4c así como algunas cepas de serotipo 4b (10, 23, 32, 33, 35, 41, 58)(6, 30, 41, 61, 64, 71, 72, 78, 86, 102, 103). Sin embargo, Orsi y colaboradores (90) reportaron la existencia de un linaje IV el cual fue identificado por primera vez mediante la técnica MLGT (Multilocus genotyping) y se compone de los serotipos 4a, 4b y 4c que difieren considerablemente del linaje III. Ninguno de los artículos revisados de la PFGE (**Tabla 6**) menciona el linaje IV por lo que es posible que mediante esta técnica, no sea posible la discriminación entre los linajes III y IV.

Tabla 6. Nomenclatura de los linajes genéticos de *L. monocytogenes* en los artículos revisados

Primer Autor	Año	Ref	Linaje I (1/2b, 3b, 4b, 4d, 4e y 7)	Linaje II (1/2a, 3a, 1/2c y 3c)	Linaje III (4a y 4c algunos 4b)
Brosch, R.	1994	(18)	División IIA: 1/2b, 3b División IIB: 4b, 4d, 4e	División I	No reportado
Neves, E.	1998	(82)	Linaje I: 1/2b, 3b, 4b, 4d	Linaje II	Linaje III
Keto-Timonen, R.O.	2003	(59)	Grupo Genómico II: 1/2b, 4b, 4c, 7	Grupo Genómico I: 1/2a, 1/2c, 3a	Grupo Genómico III: 4a
Gudmundsdóttir, S.	2004	(42)	Grupo I: 1/2b, 4b	Grupo II: 1/2a, 1/2c	No reportado
Harvey, J.	2004	(46)	Grupo I: 1/2b, 4b	Grupo II: 1/2a, 1/2c	No reportado
Evans, S.	2005	(34)	Linaje I: 1/2b, 3b, 4b	Linaje II: 1/2a, 1/2c, 3a	No reportado
Chiu, S.	2006	(26)	División II: 1/2b, 3b, 4b, 4d, 4e	División I	No reportado
Chou, C.H.	2006	(27)	Grupo II: 1/2b, 3b, 4b, 4c, 4d	Grupo I: 1/2a, 3a	No reportado
Shen, Y.	2006	(106)	Linaje I: 1/2b, 3b, 4b, 4d, 4e	Linaje II: 1/2a, 3a	No reportado
Berzins, A.	2007	(8)	Linaje II: 1/2b, 3b, 4b	Linaje I: 1/2a, 1/2c	No reportado
Fugett, E.B.	2007	(36)	Linaje I: 1/2b, 3b, 4b	Linaje II: 1/2a, 1/2c, 3a	Linaje III
Hellström, S.	2008	(47)	Linaje II: 1/2b, 3b, 4b, 4d, 4e	Linaje I	No reportado
Miya, S.	2008	(76)	Linaje I: 1/2b, 4b	Linaje II: 1/2a, 1/2c	Linaje III
Mamma, C.	2009	(59, 60)	Linaje I: 1/2b, 4b	Linaje II: 1/2a	No reportado
Sauders, B.D.	2009	(101)	Linaje I: 1/2b, 3b, 7	Linaje II	Linaje III: 4a, 4c
Nucera, D.	2010	(84)	Linaje I: 1/2b, 4b	Linaje II: 1/2a, 1/2c	Linaje III: 4a, 4c
O'Connor, L.	2010	(85)	Linaje I: 1/2b, 3b, 4b, 4d, 4e	Linaje II	Linaje III
Ward, T.J.	2010	(122)	Linaje I: 1/2b, 4b	Linaje II: 1/2a, 1/2c	Linaje III
Williams, S.K.	2011	(124)	Linaje I: no especificado	Linaje II: no especificado	Linaje III: no especificado
Pagadala, S.	2012	(91)	Linaje I: 1/2b, 4b, 7	Linaje II: 1/2a	Linaje III: no especificado

Aparentemente no existe un patrón característico estándar en cada linaje puesto que el número y la talla de las bandas difieren considerablemente dentro de un mismo linaje. La enzima *AscI* genera un menor número de bandas (entre 5 y 13 aproximadamente) que la enzima *ApaI* (entre 12 y 20) (datos no mostrados).

Para lograr la agrupación de los linajes es necesaria la serotipificación y la realización del dendrograma. Sin embargo, el origen de los aislamientos puede dar una idea anticipada de a qué linaje corresponde, ya que por lo general se concibe que los linajes I y II son los que albergan los serotipos más comúnmente asociados con casos clínicos humanos, incluidos los serotipos 1/2a (linaje II) y los serotipos 1/2b y 4b (linaje I), las cepas del linaje II son comunes en alimentos, ambientes naturales y agrícolas, y también son comúnmente aislados de casos de listeriosis animal y casos clínicos esporádicos humanos (90). Las cepas de los linajes III y IV por otra parte son raros y aislados predominantemente de fuentes animales, principalmente de rumiantes y otros mamíferos no primates, pero ocasionalmente también se ha aislado de casos clínicos humanos (118).

De esta manera, si una cepa de serotipo 4a, 4c o 4b quedase sin clasificación establecida dentro del dendrograma realizado por PFGE podría ser, dependiendo de su origen, potencialmente clasificada dentro del linaje IV aún no establecido por la técnica.

Queda claro por qué la Electroforesis en Gel de Campo Pulsado (PFGE) mediante la variante CHEF con las enzimas *ApaI* y *AscI*, es la técnica molecular Gold Standard para la tipificación y diferenciación de los aislamientos de *L. monocytogenes*, siendo el protocolo estandarizado por Graves y Swaminathan (41) para Pulsenet el más adecuado, presentando alto poder discriminatorio entre los aislamientos, con resultados reproducibles, comparables y de rápida ejecución, que permiten la agrupación por linajes y serotipos.

7.0. Conclusiones

- La Electroforesis en Gel de Campo Pulsado (PFGE) es la técnica molecular Gold Standard para la tipificación y diferenciación de los aislamientos de *L. monocytogenes*, al tratarse de una técnica con alto poder discriminatorio entre los aislamientos, con resultados reproducibles, de rápida ejecución y comparación.
- La PFGE permite el agrupamiento de los aislamientos en tres linajes de serotipos, aunque posiblemente no sea pueda discriminar entre el linaje III y el IV reportado por otros autores.
- La variante CHEF (*Contour-clamped Homogeneous Electric Field*) es la única utilizada para la tipificación de *L. monocytogenes*.
- La combinación de las enzimas de restricción *AscI* y *ApaI* son las más frecuentemente utilizadas ya que generan mayor poder de discriminación en la técnica.
- El protocolo de PFGE más adecuado para la tipificación molecular de *L. monocytogenes* es el estandarizado por Graves y Swaminathan (2001) para Pulsenet. Sin embargo, se deben estandarizar las condiciones de este en el laboratorio.

Financiación

Este trabajo pertenece al 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 (Proyecto. No. 120358635758) y Registrado en la Vicerrectoría de Investigaciones de la Pontificia Universidad Javeriana (código No. 0005386). En este proyecto se ha planeado entre otros, identificar molecularmente (PCR múltiple), serotipificar molecularmente (PCR múltiple, PCR y PCR-REA) y caracterizar molecularmente (PFGE), los aislamientos de *L. monocytogenes* para su agrupación en linajes.

Conflicto de intereses

La autora y los directores no tienen conflictos de intereses en relación a este trabajo.

8.0. Referencias

1. Aarnisalo K, Autio T, Sjöberg A-M, Lundén J, Korkeala H, Suihko M-L. Typing of *Listeria monocytogenes* Isolates Originating from the Food Processing Industry with Automated Ribotyping and Pulsed-Field Gel Electrophoresis *Journal of Food Protection* 2003; **66** (2): 249-255.
2. Aarts HJ, Hakemulder L, Van Hoef MA. Genomic Typing of *Listeria monocytogenes* Strains by Automated Laser Fluorescence Analysis of Amplified Fragment Length Polymorphism Fingerprint Patterns, *International Journal of Food Microbiology* 1999; **49** (1-2): 95-102.
3. Almeida G, Morvan A, Magalhães R, Santos I, Hogg T, Leclercq A, Teixeira P, Research Team. Distribution and characterization of *Listeria monocytogenes* clinical isolates in Portugal, 1994–2007, *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases* 2010; **29**: 1219-1227.
4. Autio T, Hielm S, Miettinen M, Sjöberg A-M, Aarnisalo K, Björkroth J, Mattila-Sandholm T, Korkeala H. Sources of *Listeria monocytogenes* Contamination in a Cold-Smoked Rainbow Trout Processing Plant Detected by Pulsed-Field Gel Electrophoresis Typing, *Applied and Environmental Microbiology* 1999; **65** (1): 150-155.
5. Autio T, Keto-Timonen R, Lundén J, Björkroth J, Korkeala H. Characterisation of Persistent and Sporadic *Listeria monocytogenes* Strains by Pulsed-Field Gel Electrophoresis (PFGE) and Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP), *Systematic Applied Microbiology* 2003; **26**: 539-545.
6. Autio T, Lundén J, Fredriksson-Ahomaa M, Björkroth J, Sjöberg A-M, Korkeala H. Similar *Listeria monocytogenes* pulsotypes detected in several foods originating from different sources, *International Journal of Food Microbiology* 2002; **77**: 83-90.
7. Bērziņš A, Hellstrom S, Silins I, Korkeala H. Contamination Patterns of *Listeria monocytogenes* in Cold-Smoked Pork Processing, *Journal of Food Protection* 2010; **73** (11): 2103-2109.
8. Bērziņš A, Hörman A, Lundén J, Korkeala H. Factors associated with *Listeria monocytogenes* contamination of cold-smoked pork products produced in Latvia and Lithuania, *International Journal of Food Microbiology* 2007; **115**: 173-179.
9. Bērziņš A, Terentjeva M, Korkeala H. Prevalence and Genetic Diversity of *Listeria monocytogenes* in Vacuum-Packaged Ready-to-Eat Meat Products at Retail Markets in Latvia, *Journal of Food Protection* 2009; **72** (6): 1283-1287.
10. Bille J, Rocourt J. WHO International Multicenter *Listeria monocytogenes* Subtyping Study: Rationale And Set-Up Of The Study, *International Journal of Food Microbiology* 1996; **32**: 251-262.
11. Birren B, Lai E, *Pulsed Field Gel Electrophoresis: A Practical Guide.*, ed., Academic Press Inc., San Diego, California, USA. 1993,
12. Boerlin P, Bannemmn E, Ischer F, Rocourt J, Bille J. Typing *Listeria monocytogenes*: a comparison of random amplification of polymorphic DNA with 5 other methods, *Research in Microbiology* 1995; **146**: 35-49.
13. 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.
14. Borucki MK, Hyun Kim S, Call DR, Smole SC, Pagotto F. Selective Discrimination of *Listeria monocytogenes* Epidemic Strains by a Mixed-Genome DNA Microarray Compared to Discrimination by Pulsed-Field Gel Electrophoresis, Ribotyping, and Multilocus Sequence Typing, *Journal of Clinical Microbiology* 2004; **42** (11): 5270-5276.

15. Boscher E, Houard E, Denis M. Prevalence and Distribution of *Listeria monocytogenes* Serotypes and Pulsotypes in Sows and Fattening Pigs in Farrow-to-Finish Farms (France, 2008), *Journal of Food Protection* 2012; **75** (5): 889-895.
16. Brosch R, Brett M, Catimel B, Luchansky JB, Ojeniyid B, Rocourt J. Genomic fingerprinting of 80 strains from the WHO multicenter international typing study of *Listeria monocytogenes* via pulsed-field gel electrophoresis (PFGE), *International Journal of Food Microbiology* 1996; **32**: 343-355.
17. Brosch R, Chen J, Luchansky JB. Pulsed-Field Fingerprinting of Listeriae: Identification of Genomic Divisions for *Listeria monocytogenes* and Their Correlation with Serovar, *Applied and Environmental Microbiology* 1994; **60** (7): 2584-2592.
18. Brosch R, Chen, J., Luchansky, J.B. Pulsed-field Fingerprinting of Listeriae: Identification of Genomic Divisions for *Listeria monocytogenes* and Their Correlation with Serovar, *Applied and Environmental Microbiology* 1994; **60**: 2584-2592.
19. Cantor CR, Smith CL, Mathew MK. Pulsed-Field Gel Electrophoresis of very large DNA molecules, *Ann. Rev. Biophys. Biophys. Chem.* 1988; **17**: 287-304.
20. Carle GF, Frank M, Olson MV. Electrophoretic Separations of Large DNA Molecules by Periodic Inversion of the Electric Field, *Science* 1986; **232** (4746): 65-68.
21. Carle GF, Olson MV. Separation of chromosomal DNA molecules from yeast by orthogonal-field-alternation gel electrophoresis, *Nucleic Acid Research* 1984; **12** (14): 5647-5664.
22. Caugant DA, Ashton FE, Bib WF, Boerlin P, Donachi W, Low C, Gilmour A, Harvey J, Nizrrung B. Multilocus enzyme electrophoresis for characterization of *Listeria monocytogenes* isolates: results of an international comparative study, *International Journal of Food Microbiology* 1996; **32**: 301-311.
23. Crum NF. Update on *Listeria monocytogenes* Infection, *Current Gastroenterology Reports* 2002; **4**: 287-296.
24. Fretz R, Pichler J, Sagel U, Much P, Ruppitsch W, Pietzka AT, Stöger A, Huhulescu S, Heuberger S, Appl G, Werber D, Stark K, Prager R, Flieger A, Karpiškova R, Pfaff G, Allerberger F. Update: Multinational listeriosis outbreak due to 'Quargel', a sour milk curd cheese, caused by two different *L. monocytogenes* serotype 1/2a strains, 2009-2010, *Eurosurveillance* 2010; **15** (16): 33-34.
25. Chen B-Y, Pyla R, Kim T-J, Silva JL, Jung Y-S. Antibiotic resistance in *Listeria* species isolated from catfish fillets and processing environment, *Letters in Applied Microbiology* 2010; **50**: 626-632.
26. Chiu S, Vanderlinde PB, Dykes GA. A comparison of selected methods for measuring the virulence properties of *Listeria* spp., *Canadian Journal of Microbiology* 2006; **52**: 301-307.
27. Chou C-H, Wang C. Genetic relatedness between *Listeria monocytogenes* isolates from seafood and humans using PFGE and REP-PCR, *International Journal of Food Microbiology* 2006; **10**: 135-148.
28. Chu G, Vollrath D, Davis RW. Separation of Large DNA Molecules by Contour-Clamped Homogeneous Electric Fields, *Science* 1986; **234** (4783): 1582-1585.
29. 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.
30. Dauphin G, Ragimbeau C, Malle P. Use of PFGE typing for tracing contamination with *Listeria monocytogenes* in three cold-smoked salmon processing plants, *International Journal of Food Microbiology* 2001; **64**: 51-61.

31. Destro MT, Leitao MFF, Farber JM. Use of Molecular Typing Methods To Trace the Dissemination of *Listeria monocytogenes* in a Shrimp Processing Plant, *Applied and Environmental Microbiology* 1996; **62** (2): 705-711.
32. Di Ciccio P, Meloni D, Festino AR, Conter M, Zanardi E, Ghidini S, Vergara A, Mazzette R, Ianieri A. Longitudinal study on the sources of *Listeria monocytogenes* contamination in cold-smoked salmon and its processing environment in Italy, *International Journal of Food Microbiology* 2012; **158**: 79-84.
33. Dice LR. Measures of the Amount of Ecologic Association Between Species, *Ecology* 1945; **26** (3): 297-302.
34. Evans Gilbreth S, Call JE, Wallace FM, Scott VN, Chen Y, Luchansky JB. Relatedness of *Listeria monocytogenes* Isolates Recovered from Selected Ready-To-Eat Foods and Listeriosis Patients in the United States, *Applied and Environmental Microbiology* 2005; **71** (12): 8115-8122.
35. Ferronato AI, Payão Pellegrini DdC, Guerra P, de Itapema Cardoso MR. Distribuição de grupos clonais de *Listeria monocytogenes* em carcaças e no ambiente de matadouros frigoríficos de suínos, *Archives of Veterinary Science* 2012; **17** (3): 42-49.
36. Fugett EB, Schoonmaker-Bopp D, Dumas NB, Corby J, Wiedmann M. Pulsed-Field Gel Electrophoresis (PFGE) Analysis of Temporally Matched *Listeria monocytogenes* Isolates from Human Clinical Cases, Foods, Ruminant Farms, and Urban and Natural Environments Reveals Source-Associated as Well as Widely Distributed PFGE Types_, *Journal of Clinical Microbiology* 2007; **45** (3): 865-873.
37. Gerner-Smidt P, Boerlin P, Ischer F, Schmidt J. High-frequency endonuclease (REA) typing: results from the WHO collaborative study group on subtyping of *Listeria monocytogenes*, *International Journal of Food Microbiology* 1996; **32**: 313-324.
38. Giovannacci I, Ragimbeau C, Queguiner S, Salvat G, Vendevre J-L, Carlier V, Ermel G. *Listeria monocytogenes* in pork slaughtering and cutting plants use of RAPD, PFGE and PCR-REA for tracing and molecular epidemiology, *International Journal of Food Microbiology* 1999; **53**: 127-140.
39. Gouin E, Mengaud J, Cossart P. The Virulence Gene Cluster of *Listeria monocytogenes* is Also Present in *Listeria ivanovii*, an Animal Pathogen, and *Listeria seeligeri*, a Nonpathogenic Species, *Infection and Immunity* 1994; **62**: 3550-3553.
40. Graves LM, Helsen LO, Steigerwalt AG, Morey RE, Daneshvar MI, Roof SE, Orsi RH, Fortes ED, Milillo SR, den Bakker HC, Wiedmann M, Swaminathan B, Sauders 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.
41. Graves LM, Swaminathan B. PulseNet standardized protocol for subtyping *Listeria monocytogenes* by macrorestriction and pulsed-field gel electrophoresis, *International Journal of Food Microbiology* 2001; **65**: 55-62.
42. Gudmundsdottir KB, Aalbæk B, Sigurdarson S, Gunnarsson E. The diversity of *Listeria monocytogenes* strains from 10 Icelandic sheep farms, *Journal of Applied Microbiology* 2004; **96**: 913-921.
43. Gudmundsdóttir S, Gudbjörnsdóttir B, Lauzón HL, Einarsson H, Kristinsson KG, Kristjánsson M. Tracing *Listeria monocytogenes* isolates from cold-smoked salmon and its processing environment in Iceland using pulsed-field gel electrophoresis, *International Journal of Food Microbiology* 2005; **101**: 41-51.
44. Hain T, Steinweg C, Kuenne CT, Billion A, Ghai R, Chatterjee SS, Domann E, Kärst U, Goesmann A, Bekel T, Bartels D, Kaiser O, Meyer F, Pühler A, Weisshaar B, Wehland J, Liang C, Dandekar T, Lampidis R, Kreft J, Goebel W, Chakraborty T. Whole-Genome Sequence of *Listeria welshimeri* Reveals Common Steps in Genome Reduction with

- Listeria innocua* as Compared to *Listeria monocytogenes*, *Journal of Bacteriology* 2006; **188** (21): 7405-7415.
45. Harvey J, Gilmour A. Characterization of Recurrent and Sporadic *Listeria monocytogenes* Isolates from Raw Milk and Nondairy Foods by Pulsed-Field Gel Electrophoresis, Monocin Typing, Plasmid Profiling, and Cadmium Antibiotic Resistance Determination, *Applied and Environmental Microbiology* 2001; **67** (2): 840-847.
 46. Harvey J, Norwood DE, Gilmour A. Comparison of repetitive element sequence-based PCR with multilocus enzyme electrophoresis and pulsed field gel electrophoresis for typing *Listeria monocytogenes* food isolates, *Food Microbiology* 2004; **21**: 305-312.
 47. Hellstrom S, Kiviniemi K, Autio T, Korkeala H. *Listeria monocytogenes* is common in wild birds in Helsinki region and genotypes are frequently similar with those found along the food chain, *Journal of Applied Microbiology* 2008; **104**: 883-888.
 48. Hellstrom S, Laukkanen R, Siekkinen KM, Ranta J, Majjala R, Korkeala H. *Listeria monocytogenes* contamination in pork can originate from farms, *Journal of Food Protection* 2010; **73** (4): 641-648.
 49. Laksanalamai P, Joseph LA, Silk BJ, Burall LS, Tarr CL, Gerner-Smidt P, Datta AR. Genomic Characterization of *Listeria monocytogenes* Strains Involved in a Multistate Listeriosis Outbreak Associated with Cantaloupe in US, *PLoS ONE* 2012; **7** (7): e42448.
 50. Howard PJ, Harsono KD, Luchansky JB. Differentiation of *Listeria monocytogenes*, *Listeria innocua*, *Listeria ivanovii*, and *Listeria seeligeri* by Pulsed-Field Gel Electrophoresis, *Applied and Environmental Microbiology* 1992; **58** (2): 709-712.
 51. Hunter PR, Gaston MA. Numerical Index of the Discriminatory Ability of Typing Systems: an Application of Simpson's Index of Diversity, *Journal of Clinical Microbiology* 1988; **26** (11): 2465-2466.
 52. Hunter SB, Vauterin P, Lambert-Fair MA, Van Duyne MS, Kubota K, Graves L, Wrigley D, Barrett T, Ribot E. Establishment of a Universal Size Standard Strain for Use with the PulseNet Standardized Pulsed-Field Gel Electrophoresis Protocols: Converting the National Databases to the New Size Standard, *Journal of Clinical Microbiology* 2005; **43** (3): 1045-1050.
 53. Jaccard P. Étude Comparative de la Distribution Floral dans une Portion des Alpes et des Jura, *Bull Soc Vaudoise Sci Nat* 1901; **37**: 547-555.
 54. Jadhav S, Bhave M, Palombo EA. Methods used for the detection and subtyping of *Listeria monocytogenes*, *Journal of Microbiological Methods* 2012; **88**: 327-341.
 55. Jain AK, Murty MN, Flynn PJ. Data Clustering: A Review, 2000.
 56. Johansson T, Rantala L, Palmu L, Honkanen-Buzalski T. Occurrence and Typing of *Listeria monocytogenes* Strains in Retail Vacuum-packed Fish Products and in a Production Plant, *International Journal of Food Microbiology* 1999; **47**: 111-119.
 57. Joppa B, Li S, Cole S, Gallagher S. Pulsed Field Electrophoresis for Separation of Large DNA. , <http://www.nal.usda.gov/pgdic/Probe/v2n3/puls.html>. Consultado el 25 de octubre de 2012.
 58. Kérouanton A, Marault M, Petit L, Grout J, Dao TT, Brisabois A. Evaluation of a multiplex PCR assay as an alternative method for *Listeria monocytogenes* serotyping, *Journal of Microbiological Methods* 2010; **80**: 134-137.
 59. Keto-Timonen RO, Autio TJ, Korkeala HJ. An Improved Amplified Fragment length Polymorphism (AFIP) Protocol for Discrimination of *Listeria* Isolates, *Systematic Applied Microbiology* 2003; **26**: 236-244.
 60. Khelef N, Lecuit M, Buchrieser C, Cabanes D, Dussurget O, Cossart P, *Listeria monocytogenes and the genus Listeria*, 3rd ed., Springer, New York, USA 2006,

61. Larsen CN, Nørrung B, Sommer HM, Jakobsen M. In Vitro and In Vivo Invasiveness of Different Pulsed-Field Gel Electrophoresis Types of *Listeria monocytogenes*, *Applied and Environmental Microbiology* 2002; **68** (11): 5698-5703.
62. Latorre AA, Van Kessel JAS, Karns JS, Zurakowski MJ, Pradhan AK, Zadoks RN, Boor KJ, Schukken YH. Molecular Ecology of *Listeria monocytogenes*: Evidence for a Reservoir in Milking Equipment on a Dairy Farm, *Applied and Environmental Microbiology* 2009; **75** (5): 1315-1323.
63. Latorre AA, van Kessel JS, Karns JS, Zurakowski MJ, Pradhan AK, Boor KJ, Jayarao BM, Houser BA, Daugherty CS, Schukken YH. Biofilm in milking equipment on a dairy farm as a potential source of bulk tank milk contamination with *Listeria monocytogenes*, *Journal of Dairy Science* 2010; **93**: 2792-2802.
64. 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.
65. Leimeister-Wachter M, Chakraborty T. Detection of Listeriolysin, the Thiol-Dependent Hemolysin in *Listeria monocytogenes*, *Listeria ivanovii*, and *Listeria seeligeri*, *Infection and Immunity* 1989; **57** (8): 2350-2357.
66. Levin RE. Application of Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) and Pulsed-Field Gel Electrophoresis (PFGE) Analysis to *Listeria monocytogenes*: A Review of Methodology and Results, *Food Biotechnology* 2003; **17** (3): 217-236.
67. Lindstedt B-A, Tham W, Danielsson-Tham M-L, Vardund T, Helmersson S, Kapperud G. Multiple-locus variable-number tandem-repeats analysis of *Listeria monocytogenes* using multicolour capillary electrophoresis and comparison with pulsed-field gel electrophoresis typing, *Journal of Microbiological Methods* 2008; **72**: 141-148.
68. Liu D, Lawrence ML, Ainsworth AJ, Austin FW. Species-specific PCR determination of *Listeria seeligeri*, *Research in Microbiology* 2004; **155**: 741-746.
69. Lomonaco S, Decastelli L, Nucera D, Gallina S, Bianchi DM, Civera T. *Listeria monocytogenes* in Gorgonzola: Subtypes, diversity and persistence over time, *International Journal of Food Microbiology* 2009; **128**: 516-520.
70. Louie M, Jayaratne P, Luchsinger I, Devenish J, Yao J, Schlech W, Simor A. Comparison of Ribotyping, Arbitrarily Primed PCR, and Pulsed-Field Gel Electrophoresis for Molecular Typing of *Listeria monocytogenes*, *Journal of Clinical Microbiology* 1996; **34** (1): 15-19.
71. Lukinmaa S, Aarnisalo K, Suihko M-L, Siitonen A. Diversity of *Listeria monocytogenes* isolates of human and food origin studied by serotyping, automated ribotyping and pulsed-field gel electrophoresis, *Clinical Microbiology and Infection* 2004; **10**: 562-568.
72. MacFaddin JF, *Pruebas bioquímicas para la identificación de bacterias de importancia clínica.*, 3^{ra} ed., Editorial Médica Panamericana, Buenos Aires, Argentina. 2003,
73. Mammina C, Manfreda G, Aleo A, De Cesare A, Pellissier N, Romani C, Nicoletti P, Pecile P, Nastasi A, Pontello MM. Molecular Typing Reveals Frequent Clustering among Human Isolates of *Listeria monocytogenes* in Italy, *Journal of Food Protection* 2009; **72** (4): 876-880.
74. Marcus R, Hurd S, Mank L, Mshar P, Phan Q, Jackson K, Watarida K, Salfinger Y, Kim S, Ishida ML, Kissler B. Chicken Salad as the Source of a Case of *Listeria monocytogenes* Infection in Connecticut, *Journal of Food Protection* 2009; **72** (12): 2602-2606.
75. Miettinen MK, Bjorkroth J, Korkeala HJ. Characterization of *Listeria monocytogenes* From an Ice Cream Plant by Serotyping and Pulsed-field Gel Electrophoresis, *International Journal of Food Microbiology* 1999; **46**: 187-192.

76. Miya S, Kimura B, Sato M, Takahashi H, Ishikawa T, Suda T, Takakura C, Fujii T, Wiedmann M. Development of a multilocus variable-number of tandem repeat typing method for *Listeria monocytogenes* serotype 4b strains, *International Journal of Food Microbiology* 2008; **124**: 239-249.
77. Murphy M, Corcoran D, Buckley JF, O'Mahony M, Whyte P, Fanning S. Development and application of Multiple-Locus Variable Number of tandem repeat Analysis (MLVA) to subtype a collection of *Listeria monocytogenes*, *International Journal of Food Microbiology* 2007; **115**: 187-194.
78. Nadon CA, Woodward DL, Young C, Rodgers FG, Wiedmann M. Correlations Between Molecular Subtyping and Serotyping of *Listeria monocytogenes*, *Journal of Clinical Microbiology* 2001; **39** (7): 2704-2707.
79. Nakama A, Terao M, Kokubo Y, Itoh T, Maruyama T, Kaneuchi C, McLaughlin J. A comparison of *Listeria monocytogenes* serovar 4b isolates of clinical and food origin in Japan by pulsed-field gel electrophoresis, *International Journal of Food Microbiology* 1998; **42**: 201-206.
80. Nascentes Galvão N, Chiarini E, Destro MT, de Aguiar Ferreira M, Nero LA. PFGE characterisation and adhesion ability of *Listeria monocytogenes* isolates obtained from bovine carcasses and beef processing facilities, *Meat Science* 2012; **92**: 635-643.
81. Nasonova ES. Pulsed Field Gel Electrophoresis: Theory, Instruments and Application, *Cell and Tissue Biology* 2008; **2** (6): 557-565.
82. Neves E, Lourenço A, Silva AC, Coutinho R, Brito L. Pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) analysis of *Listeria monocytogenes* isolates from different sources and geographical origins and representative of the twelve serovars, *Systematic and Applied Microbiology* 1998; **31**: 387-392.
83. 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.
84. Nucera D, Lomonaco S, Bianchi DM, Decastelli L, Grassi MA, Bottero MT, Civera T. A five year surveillance report on PFGE types of *Listeria monocytogenes* isolated in Italy from food and food related environments, *International Journal of Food Microbiology* 2010; **140**: 271-276.
85. O'Connor L, O'Leary M, Leonard N, Godinho M, O'Reilly C, Coffey L, Egan J, O'Mahony R. The characterization of *Listeria* spp. isolated from food products and the food-processing environment, *Letters in Applied Microbiology* 2010; **51**: 490-498.
86. Olive DM, Bean P. Principles and Applications of Methods for DNA-Based Typing of Microbial Organisms, *Journal of Clinical Microbiology* 1999; **37** (6): 1661-1669.
87. Olsen SJ, Patrick M, Hunter SB, Reddy V, Kornstein L, MacKetizie WR, Lane K, Bidol S, Stoltman GA, Frye DM, Lee I, Hurd S, Jones TF, LaPorte TN, Dewitt W, Graves L, Wiedmann M, Schoonmaker-Bopp DJ, Huang AJ, Vincent C, Bugenhagen A, Corby J, Carloni ER, Holcomb ME, Woron RF, Zansky SM, Dowdle G, Smith F, Ahrahi-Fard S, Rae Ong A, Tucker N, Hynes NA, Mead P. Multistate Outbreak of *Listeria monocytogenes* Infection Linked to Delicatessen Turkey Meat, *Clinical Infectious Disease* 2005; **40**: 962-967.
88. Orndorff PE, Hamrick TS, Washington Smoak I, Havell EA. Host and bacterial factors in listeriosis pathogenesis, *Veterinary Microbiology* 2006; **114**: 1-15.
89. Orsi RH, den Bakker HC, Wiedmann M. *Listeria monocytogenes* lineages: Genomics, evolution, ecology, and phenotypic characteristics, *International Journal of Medical Microbiology* 2011; **301** (2): 79-96.

90. Orsi RH, den Bakker HC, Wiedmann M. *Listeria monocytogenes* lineages: Genomics, evolution, ecology, and phenotypic characteristics, *International Journal of Medical Microbiology* 2011; **301**: 79-96.
91. Pagadala S, Parveen S, Rippen T, Luchansky JB, Call JE, Tamplin ML, Porto-Fett ACS. Prevalence, characterization and sources of *Listeria monocytogenes* in blue crab (*Callinectes sapidus*) meat and blue crab processing plants, *Food Microbiology* 2012; **31**: 263-270.
92. Peccio A, Autio T, Korkeala H, Rosmini R, Trevisani M. *Listeria monocytogenes* occurrence and characterization in meat-producing plants, *Letters in Applied Microbiology* 2003; **37** (3): 234-238.
93. Poros-Gluchowska J, Markiewicz Z. Antimicrobial Resistance of *Listeria monocytogenes*, *Acta Microbiologica Polonica* 2003; **52** (2): 113-129.
94. Prencipe VA, Rizzi V, Acciari V, Lannetti L, Giovannini A, Serraino A, Calderone D, Rossi A, Morelli D, Marino L, Migliorati G, Caporale V. *Listeria monocytogenes* prevalence, contamination levels and strains characterization throughout the Parma ham processing chain, *Food Control* 2012; **25**: 150-158.
95. Proctor ME, Brosch R, Mellen JW, Garrett LA, Kaspar CW, Luchansky JB. Use of Pulsed-field Gel Electrophoresis to Link Sporadic Cases of Invasive Listeriosis with Recalled Chocolate Milk, *Applied and Environmental Microbiology* 1995; **61**: 3177-3179.
96. Real C, Alcalá MD, Muñoz-Páez A, Criado JM. XAFS analysis of the potassium-silica interaction in rice husks, *Nuuclear Instruments and Methods in Physics Research B* 1997; **133**: 68-72.
97. Revazishvili T, Kotetishvili M, Colin Stine O, Kreger AS, Glenn Morris J, Sulakvelidze A. Comparative Analysis of Multilocus Sequence Typing and Pulsed-Field Gel Electrophoresis for Characterizing *Listeria monocytogenes* Strains Isolated from Environmental and Clinical Sources, *Journal of Clinical Microbiology* 2004; **42** (1): 276-285.
98. Rocourt J. Risk Factors for Listeriosis, *Food Control* 1996; **7** (4): 195-202.
99. Rocourt J, Boerlin P, Grimont F, Jacquet C, Piffaretti J-C. Assignment of *Listeria grayi* and *Listeria murrayi* to a Single Species? *Listeria grayi*, with a Revised Description of *Listeria grayi*, *International Journal of Systematic Bacteriology* 1992; **42** (1): 171-174.
100. Ruiz-Bolivar Z, Neuque-Rico MC, Poutou-Piñales RA, Carrascal-Camacho AK, Máttar-Velilla S. Antimicrobial susceptibility of *L. monocytogenes* food-isolates from different cities of Colombia, *Foodborne Pathogens and Disease* 2011; **8** (8): 913-919.
101. Sauders BD, Sanchez MD, Rice DH, Corby J, Stich S, Fortes ED, Roof SE, Wiedmann M. Prevalence and Molecular Diversity of *Listeria monocytogenes* in Retail Establishments, *Journal of Food Protection* 2009; **72** (11): 2337-2349.
102. Schmid MW, Y.W. Ng E, Lampidisc R, Emmerthc M, Walchera M, Kreftc J, Goebelc W, Wagnerd M, Schleifera K-H. Evolutionary History of the Genus *Listeria* and Its Virulence Genes, *Systematic and Applied Microbiology* 2005; **28**: 1-18.
103. Schuchat A, Swaminathan B, Broome CV. Epidemiology of Human Listeriosis, *Clinical Microbiology Review* 1991; **4**: 169-183.
104. Senczek D, Stephan R, Untermann F. Pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) typing of *Listeria* strains isolated from a meat processing plant over a 2-year period, *International Journal of Food Microbiology* 2000; **62**: 155-159.
105. Sequeira Mendonça K, Brenner Michael G, Eucares von Laer A, Blum Menezes D, Ribeiro Itapema Cardoso M, Padilha da Silva W. Genetic relatedness among *Listeria monocytogenes* isolated in foods and food production chain in southern Rio Grande do Sul, Brazil, *Food Control* 2012; **28** (1): 171-177.

106. Shen Y, Liu Y, Zhang Y, Cripe J, Conway W, Meng J, Hall G, Bhagwa AA. Isolation and Characterization of *Listeria monocytogenes* Isolates from Ready-To-Eat Foods in Florida†, *Applied and Environmental Microbiology* 2006; **72** (7): 5073-5076.
107. Smith B, Larsson JT, Lisby M, Muller L, Madsen SB, Engberg J, Bangsborg J, Ethelberg S, Kemp M. Outbreak of listeriosis caused by infected beef meat from a meals-on-wheels delivery in Denmark 2009, *Clinical Microbiology and Infection* 2011; **17**: 50-52.
108. Snapir YM, Vaisbein E, Nassar F. Low Virulence but Potentially Fatal Outcome *Listeria ivanovii*, *European Journal of Internal Medicine* 2006; **17**: 286-287.
109. Southern EM, Anand R, Brown WRA, Fletcher DS. A model for the separation of large DNA molecules by crossed field gel electrophoresis, *Nucleic Acids Research* 1987; **15** (15): 5925-5943.
110. Surve N, Bagde U. Toxicity of Oxazolidinone Linezolid on Pathogenic Microorganism *Listeria ivanovii*, *International Journal of Biology* 2011; **3** (4): 72-78.
111. Swaminathan B. *Listeria monocytogenes*, in Doyle MP, Beuchat, L.R., Montville, T.J., (Eds). *Food Microbiology; Fundamentals and Frontiers*. American Society for Microbiology, Washington, D.C., 2001, p. 383-409.
112. Swaminathan B, Gerner-Smidt P. The epidemiology of human listeriosis, *Microbes and Infection* 2007; **9**: 1236-1243.
113. Tenover FC, Arbeit RD, Goering RV, Mickelsen PA, Murray BE, Persing DH, Swaminathan B. Interpreting Chromosomal DNA Restriction Patterns Produced by Pulsed-Field Gel Electrophoresis: Criteria for Bacterial Strain Typing, *Journal of Clinical Microbiology* 1995; **33**: 2233-2239.
114. Tkacikova L, Kantikova M, Dmitriev A, Mikula I. Use of the Molecular Typing Methods to Evaluate the Control of *Listeria monocytogenes* Contamination in a Raw Milk and Dairy Products, *Folia Microbiologica* 2000; **45** (2): 157-160.
115. Todd ECD, Notermans S. Surveillance of listeriosis and its causative pathogen, *Listeria monocytogenes*, *Food Control* 2010; (Article in Press).
116. 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.
117. 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.
118. Tsai Y-HL, Maron SB, McGann P, Nightingale KK, Wiedmann M, Orsi RH. Recombination and positive selection contributed to the evolution of *Listeria monocytogenes* lineages III and IV, two distinct and well supported uncommon *L. monocytogenes* lineages, *Infection, Genetics and Evolution* 2011; **11**: 1881-1890.
119. Vanegas MC, Vasquez E, Martinez AJ, Rueda AM. Detection of *Listeria monocytogenes* in raw whole milk for human consumption in Colombia by real-time PCR, *Food Control* 2009; **20**: 430-432.
120. Vázquez-Villanueva J, Orgaz B, Ortiz S, López V, Martínez-Suárez JV, SanJose C. Predominance and Persistence of a Single Clone of *Listeria ivanovii* in a Manchego Cheese Factory Over 6 Months, *Zoonoses and Public Health* 2010; **57**: 402-410.
121. Vela AI, Fernandez-Garayzabal JF, Vazquez JA, Latre MV, Blanco MM, Moreno MA, De La Fuente L, Marco J, Franco C, Cepeda A, Rodriguez Moure AA, Suarez G, Dominguez L. Molecular Typing by Pulsed-Field Gel Electrophoresis of Spanish Animal and Human *Listeria monocytogenes* Isolates, *Applied and Environmental Microbiology* 2001; **67** (12): 5840-5843.

122. Ward TJ, Evans P, Wiedmann M, Usgaard T, Roof SE, Stroika SG, Hise K. Molecular and Phenotypic Characterization of *Listeria monocytogenes* from U.S. Department of Agriculture Food Safety and Inspection Service surveillance of Ready-to-Eat Foods and Processing Facilities, *Journal of Food Protection* 2010; **73** (5): 861-869.
123. Warriner K, Namvar A. What is the hysteria with Listeria?, *Trends in Food Science & Technology* 2009; **20**: 245-254.
124. Williams SK, Roof S, Boyle EA, Burson D, Thippareddi H, Geornaras I, Sofos JN, Wiedmann M, Nightingale K. Molecular Ecology of *Listeria monocytogenes* and Other Listeria Species in Small and Very Small Ready-to-Eat Meat Processing Plants, *Journal of Food Protection* 2011; **74** (1): 63-77.
125. Zhang W, Jayarao B, Knabel S. Multi-Virulence-Locus Sequence Typing of *Listeria monocytogenes*, *Applied and Environmental Microbiology* 2004; **70** (2): 913-920.
126. Zhang Y, Yeh E, Hall G, Cripe J, Bhagwat AA, Meng J. Characterization of *Listeria monocytogenes* isolated from retail foods, *International Journal of Food Microbiology* 2004; **113**: 47-53.
127. Zunabovic M, Domig KJ, Pichler I, Kneifel W. Monitoring Transmission Routes of *Listeria* spp., in Smoked Salmon Production with Repetitive Element Sequence-Based PCR Techniques, *Journal of Food Protection* 2012; **75** (3): 504-511.