

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE NICARAGUA, MANAGUA
INSTITUTO POLITÉCNICO DE LA SALUD
LUIS FELIPE MONCADA
UNAN – MANAGUA**



Monografía para optar al Título de Licenciatura en Bioanálisis clínico

Tema:

Aislamiento y Detección de *Listeria monocytogenes* en Queso Fresco Artesanal que se
Expende en el Mercado Iván Montenegro de la Ciudad de Managua
Noviembre-Diciembre 2014

Autoras:

Bra: Zoila Deyanira Alemán Umaña

Bra: Rosileyda Natalia Díaz García

Bra: Jennifer Jerónima Fonseca Acuña

Tutor:

Lic. Isaac Abraham Martínez Marcia

Esp. en laboratorio Clínico

Asesor Metodológico:

MSc. Francisco Enrique Romero Oviedo

MSc. Microbiología Médica.

Managua, Febrero 2015

DEDICATORIA

Dedicamos esta tesis a nuestro Dios padre celestial por habernos dado la sabiduría y la fuerza para la realización de dicha investigación ayudándonos en cada uno de los momentos difíciles a salir siempre adelante.

A nuestros padres quienes con su sacrificio hicieron posible la culminación de etapa en nuestra vida, siendo siempre los pilares sobre quienes sostenemos nuestros esfuerzos y a quienes confiamos nuestros sueños y futuros éxitos.

"Nunca consideres el estudio como una obligación sino como una oportunidad para penetrar en el bello y maravilloso mundo del Saber".

Albert Einstein

AGRADECIMIENTOS

Le agradecemos a *Nuestro señor Jesucristo* por habernos dado la fuerza, paciencia, sabiduría y entendimiento iluminando nuestro camino para poder realizar con éxito este trabajo.

Agradecemos a nuestro tutor a *Lic. Isaac Martínez* (Especialista en Laboratorio de Salud CNDR) por habernos brindado la oportunidad de trabajar a su lado depositando en nosotras la fe y confianza en que podíamos llegar a alcanzar con éxito la meta establecida, de igual manera le damos gracias por su asesoría a *MSc. Francisco Enrique Romero Oviedo* en la elaboración de este documento transmitiéndonos sus conocimientos, virtudes y habilidades siendo una fuente de inspiración para enfrentar cada uno de los retos que se nos presenten de hoy en adelante a nivel profesional.

También agradecemos a cada una de las personas que nos brindaron su apoyo en la realización de este estudio en especial a *TM. Yolanda Solórzano* y a su equipo así mismo al *Dr. Ángel Balmaceda* (Director General CNDR).

OPINIÓN DEL TUTOR

El presente trabajo investigativo ha sido elaborado con el propósito de Aislar y detectar *Listeria monocytogenes* en queso fresco artesanal mediante el empleo del método estándar de aislamiento convencional FDA-BAM y PCR en Tiempo Real.

Es importante mencionar que el aislamiento de *Listeria monocytogenes* es tedioso y requiere de muchos días para su aislamiento ante esta necesidad de reducir este tiempo se utilizó la PCR-Tiempo Real como prueba de tamizaje ahorrándonos tiempo en lo que se refiere a la detección, sin embargo reconocemos la importancia de utilizar siempre la prueba de oro como es el método convencional FDA-BAM.

Como tutor apruebo esta investigación para que sea defendida por sus autoras con el tema monográfico.

“Aislamiento y detección de *Listeria monocytogenes* en queso fresco artesanal que se expende en el Mercado Iván Montenegro de la ciudad de Managua Noviembre-Diciembre 2014”.

Autoras:

Bra. Zoila Deyanira Alemán Umaña

Bra. Rosileyda Natalia Díaz García

Bra. Jennifer Jerónima Fonseca Acuña

Tutor

Lic. Isaac Abraham Martínez Marcia

Bioanálista Clínico

Especialista en Laboratorio Clínico

Dado en la ciudad de Managua a los 20 días del mes de Febrero del año 2015

RESUMEN

El presente estudio es de tipo descriptivo aleatorio simple de corte transversal, cuyo principal objetivo fue determinar la presencia de *Listeria monocytogenes* en queso artesanal que se expenden en el Mercado Iván Montenegro de la Ciudad de Managua Noviembre-Diciembre 2014.

El universo estuvo conformado por 117 expendios que distribuyen queso fresco artesanal, con el objetivo que todos los tramos tengan la misma posibilidad de ser seleccionados se utilizó el Software Epidata versión 3.5.1. Para calcular la muestra se utilizaron los siguientes parámetros: proporción esperada 1.5%, intervalo de confianza 95%, efecto de diseño 1% y una precisión absoluta del 3%, resultando 20 expendios seleccionados aleatoriamente.

Los resultados encontrados fueron 0% positivo y esto puede deberse a la influencia de varios factores entre los cuales podemos mencionar: quesos expuestos al aire libre, al viento y al contacto directo con los rayos solares; lo cual disminuye la humedad haciendo que los quesos se vuelvan más duros y creando un medio desfavorable para el desarrollo de *Listeria monocytogenes* y otro factor que es importante señalar es la curva de crecimiento de las bacterias esto se puede deber a que en las muestras analizadas hayan estados presentes una alta carga de microorganismos productores de ácidos orgánicos, peróxido de hidrógeno y bacteriocinas que tienen efectos antagónicos contra *Listeria monocytogenes* y que compiten por nutrientes cabe mencionar que con la realización del presente estudio se comprobó que la prevalencia de este microorganismo en este tipo de alimento es nula para el mercado en estudio.

Recomendamos principalmente al CNDR-MINSA a realizar nuevos estudios de *Listeria monocytogenes* en quesos frescos artesanales expendidos en los diferentes Mercados del País para determinar la frecuencia de este microorganismo y de esta forma evaluar la Sensibilidad y el Valor Predictivo Positivo de esta prueba.

ÍNDICE

Contenido	Pág.
Dedicatoria.....	i
Agradecimientos.....	ii
Opinión del tutor.....	iii
Resumen.....	iv
Capítulos	
I Introducción.....	1
II Antecedentes.....	2
III Justificación.....	4
IV Planteamiento del Problema.....	5
V Objetivos.....	6
VI Marco Teórico.....	7
6.1. Generalidades de <i>Listeria monocytogenes</i>	7
6.2. Taxonomía y Nomenclatura.....	8
6.3. Epidemiología.....	9
6.4. Ciclo infeccioso de <i>Listeria monocytogenes</i>	10
6.5. Patogenia e Inmunidad.....	16
6.6. Cuadro Clínico.....	17
6.7. Vías de Transmisión.....	19
6.8. Incidencias.....	20
6.9. Prevención.....	21
6.10. Métodos para la detección de <i>Listeria monocytogenes</i>	22
VII Diseño Metodológico.....	32
7.1 Aislamiento de <i>Listeria monocytogenes</i> según FDA-BAM.....	34
7.2 Extracción del ADN bacteriano.....	36
VIII Operacionalización de las variables.....	40
IX Análisis y discusión de resultados.....	41
X Conclusiones.....	45
XI Recomendaciones.....	46
XII Bibliografía.....	47
XIII Anexos.....	52

I-INTRODUCCION

Listeria monocytogenes es un bacilo gram-positivo, corto, anaeróbico facultativo, no formador de esporas y móvil debido a que posee flagelos peritricos, que se proyectan en todas las direcciones. En la tinción de Gram se puede presentar como diplococo (ESFSA, 2009-2010) . El hábitat primario de *Listeria* es el suelo, el material vegetal en descomposición, así como también se ha aislado de alimentos, principalmente lácteos, carnes, embutidos, ensaladas y mariscos. Esta bacteria es capaz de crecer a temperaturas entre -1.5 y 45°C (Cordano AM, Rocourt J, 2006), por lo que la convierte en una bacteria capaz de multiplicarse en los alimentos que están en refrigeración (Jawets E, Melnick J, Aldelberg E, 2011).

La infección producida por este microorganismo es conocida como Listeriosis, se puede manifestar con diferentes procesos patológicos: meningoencefalitis, septicemia, formas prenatales, granulomatosis, presentaciones locales (Posfay-Barbe KM, 2009).

Para la determinación de este agente existen diversas metodologías internacionales, entre ellas la técnica de aislamiento de *Listeria monocytogenes* norma FDA-BAM que consta de 3 etapas: enriquecimiento, aislamiento e identificación (A Roberts, K Nightingale, 2006). Otro método de detección son las técnicas moleculares entre estas la Reacción en Cadena de la Polimerasa Convencional (PCR convencional). Técnica muy sensible que permite la amplificación de fragmentos pequeños de ADN específicos. Hoy en día podemos utilizar la técnica PCR en Tiempo Real, esta es una variante de la Reacción en Cadena de la Polimerasa Convencional (**PCR**), utilizada para amplificar y simultáneamente cuantificar de forma absoluta el producto de la amplificación de ADN, para ello emplea, un molde de ADN con la diferencia que esta a través de una sonda que es excitada por un haz de luz puede medir la fluorescencia emitida, superando las principales desventajas de la PCR Convencional las cuales son el tiempo de ejecución y el proceso laborioso. Este método es de ayuda para la detección de *Listeria monocytogenes* sirviendo como una prueba de tamizaje permitiendo de esta forma obtener un resultado en menos tiempo a diferencia de la metodología convencional que requiere al menos 12 días para dar un resultado definitivo (Rivera Jose Luis , 2004).

II- ANTECEDENTES

El 28 de Julio del 2014 la División de Virginia de Servicios de Laboratorio Consolidados (DCLS) por sus siglas en inglés identifica *Listeria monocytogenes* en queso fresco casero de tipo hispano, fabricado por la compañía Oasis Brands de Miami-Florida. Investigadores de Salud pública por medio de campo pulsado encuentran la misma secuencia del genoma de las cepas de *Listerias* aisladas de las 5 personas muy relacionadas con las cepas de *Listeria* aisladas de queso casero producido por Oasis Brands , reportado de cuatro estados: Georgia, Tennessee, New York y Texas. Las fechas de inicio oscilaron desde Septiembre de 2013 hasta Octubre de 2014. Cuatro de los cinco enfermos fueron hospitalizados registrándose una muerte en Tennessee, tres de los casos estuvieron relacionados con un embarazo, uno de ellos fue diagnosticado en un recién nacido. Todas las personas eran de origen hispano y reportaron consumir queso fresco de tipo hispano, dos personas que fueron capaces de responder a preguntas sobre variedades específicas de quesos blandos estilo hispano reportaron consumir quesito casero, aunque ninguno podía recordar la marca. (<http://www.cdc.gov/listeria/outbreaks/cheese>).

En marzo del 2003, en Perú se realizó una investigación de queso fresco artesanal para la determinación de *Listeria monocytogenes* en un total de 74 muestras evaluadas según la Norma Técnica Peruana ISO 28329-1; resultando 3 muestras positivas para *Listeria monocytogenes* lo que equivale al 4% (Espada Angelica María , 2007).

En La Paz, Bolivia en el año 2005 un total de 35 muestras de queso fresco elaborado artesanalmente fueron analizadas por medio de los métodos: PCR en Tiempo Real y la metodología FDA-BAM, obteniendo como resultado 6 muestras positivas para *Listeria monocytogenes* equivalente a un 17 % (Barquero Deissy , 2008).

En la Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca Colombia, en el año 2006, se estudiaron 30 muestras de queso fresco artesanal por medio del método convencional, con el objetivo de determinar la presencia de *Listeria monocytogenes* en este producto, en el cual se detectó la presencia de esta bacteria en 11 muestras, lo que correspondió al 13% (S Renato et al , 2013).

En el año 2013 investigadores de la ciudad de Valdivia, Chile procesaron 50 muestras de queso fresco artesanal por PCR Convencional resultando 11 muestras positivas a la presencia de *Listeria monocytogenes*, equivalente a un 22% de las muestras analizadas (www.saludymedicinas.com.mx, 2006).

En San José, Costa Rica.2010. Se evaluaron 76 muestras de queso fresco artesanal para la identificación y detección de *Listeria monocytogenes* por medio del método convencional según la metodología descrita en el Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods y PCR convencional dando como resultado la ausencia de *Listeria monocytogenes* en las muestras, sin embargo se logro identificar *Listeria innocua* (44%) y *Listeria welshimeri* (20%) del total de muestras evaluadas. (Arias María Laura, Chávez Carolina, Solano Gabriela , 2010).

A nivel nacional no se encontraron estudios publicados que demuestren la presencia de *Listeria monocytogenes* en quesos artesanales.

III- JUSTIFICACIÓN

En la actualidad el consumo de queso en nuestro país es muy elevado debido a su importante valor nutricional básico para el desarrollo de los seres humanos (Espinoza Ana, De la Torre Magali, 2004). No obstante, el queso elaborado artesanalmente es uno de los productos lácteos que ofrece condiciones favorables para el crecimiento de *Listeria monocytogenes*, siendo la consecuencia más frecuente el aborto en mujeres embarazadas; cabe mencionar que uno de sus principales ingredientes es la leche cruda sin pasteurización, hecho que nos recuerda lo ocurrido en Estados Unidos en el 2013 con la aparición de brotes de *Listeria monocytogenes* en queso fresco casero tipo hispano en cuatro estados del país, cuyo fabricante era Oasis Brands, Miami. Florida. Que tenía sus centros de acopio en toda la región Centroamericana, hecho que convirtió al queso fresco en un vehículo potencial de transmisión de *L. monocytogenes* y otros microorganismos patógenos (M Gelfand , 2006).

Debido a la importancia clínica de este microorganismo y a la falta de investigaciones publicadas en Nicaragua, decidimos realizar un estudio de aislamiento y detección de *Listeria monocytogenes* en quesos frescos artesanales expendidos en el Mercado Iván Montenegro sitio con mayor venta de este producto e importador directo de productos lácteos de las zonas más productivas de nuestro país.

La determinación se realizó por diferentes metodología: 1). Aislamiento FDA-BAM la cual tiene una duración de 12 días y 2) La detección por PCR en Tiempo Real, técnica molecular que sirvió como antecedente para una posterior validación de esta prueba utilizándose como prueba de tamizaje para la detección de *Listeria monocytogenes* en muestras de alimentos. Beneficiando al Centro Nacional de Diagnóstico y Referencia - Ministerio de Salud y al Sector de las Mipymes (Micro, Pequeña y Mediana Empresas) obteniendo resultados en menor tiempo.

IV- PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

¿Estarán los quesos artesanales que se expenden en el Mercado Iván Montenegro de la Ciudad de Managua contaminados con *Listeria monocytogenes*?

¿Será el PCR Tiempo Real una herramienta adecuada para el tamizaje de *Listeria monocytogenes* en quesos frescos artesanales?

V- OBJETIVOS

Objetivo General

- ✚ Determinar la presencia de *Listeria monocytogenes* en queso fresco artesanal que se expenden en el Mercado Iván Montenegro de la Ciudad de Managua Noviembre-Diciembre 2014.

Objetivos específicos

- 1) Aislar *Listeria monocytogenes* a través del método convencional FDA-BAM en queso fresco artesanal que se expende en el Mercado Iván Montenegro.
- 2) Detectar por PCR en Tiempo Real la presencia de *Listeria monocytogenes* en queso fresco artesanal.

VI- MARCO TEORICO

6.1 Generalidades de *Listeria monocytogenes*



Fig.1:www.foodylife.com

Listeria monocytogenes es una bacteria que pertenece a la familia *Listeriaceae* y es de amplia distribución en la naturaleza. Resistente a las condiciones adversas del ambiente. Es un patógeno poco frecuente en la población general y puede causar enfermedad tanto en forma esporádica como en brotes. Afecta principalmente a personas en edades extremas de la vida, es decir, recién nacidos y ancianos, mujeres embarazadas e inmunosuprimidos. Puede ser aislada de diversos ambientes como suelo, agua fresca, aguas residuales y vegetación; y puede llegar a infectar numerosos animales domésticos contaminando la vegetación y el suelo donde habitan. Es también un contaminante frecuente de los productos alimentarios, ya que es capaz de generar biopelículas en alimentos que se encuentren en refrigeración, porque tiene la capacidad de crecer hasta a 4°C (Del potro Juan jose , 2004).

Se encuentra en el intestino de animales y personas que actúan en general como portadores subclínicos de la misma. También se encuentran en el suelo, paredes, techos y equipos de plantas procesadoras de alimentos, por lo que es muy difícil de erradicar en establecimientos de fabricación de productos alimentarios (R. Murray Patrick, S. Rosenthal Ken, A. Faller Michael, 2009)

Morfológicamente *Listeria monocytogenes* es un bacilo Gram positivo, pequeño (0,4 a 0,5 micrones de ancho x 0,5 a 1,2 de largo) no ramificado y anaerobio facultativo, capaz de proliferar en un amplio rango de temperaturas (-1.5°C a 45°C) y una elevada concentración de sal. Es catalasa positiva y no presenta cápsula ni espora. Tiene flagelos peritricos, gracias a los cuales presenta movilidad a 30°C o menos, pero es inmóvil a 37°C, temperatura a la cual sus flagelos se inactivan (Koneman , 1996).

El género se encuentra definido por poseer un contenido de DNA G+C, aproximadamente de un 38%, además su membrana celular tiene una pared celular de mureina,

péptidoglucano que contiene ácido mesodiamino pimérico que se encuentra fijo a la membrana celular por el ácido teicoico y el ácido lipoteicoico presentes en la membrana celular.

Listeria monocytogenes es un patógeno oportunista asociado a enfermedades transmitidas por alimentos llamada listeriosis, causando infecciones graves en un grupo de riesgo (mujeres embarazadas, recién nacidos, pacientes inmunosuprimidos y ancianos). La listeriosis es poco común, su gravedad y la frecuencia asociada a alimentos de elaboración la sitúan entre las enfermedades transmitidas por alimentos (ETAS) de mayor relevancia social y económica. Cabe destacar las características de *Listeria monocytogenes* como: la capacidad de sobrevivir a temperaturas de refrigeración (2-4 °C), resistir diversas condiciones ambientales, como pH bajo, altas concentraciones de sal, tratamientos insatisfactorios de pasteurización y que se encuentra ampliamente distribuida en el ambiente, logrando que se constituya en una seria amenaza a la seguridad de la industria alimentaria (Schawartz B, Hexter D, Broome CV , 1999).

Los quesos nicaragüenses son un importante rubro agropecuario de exportación del país. Este producto elaborado artesanalmente es uno de los productos lácteos que ofrece condiciones favorables para el crecimiento de *Listeria*, porque es elaborado a partir de leche cruda sin pasteurización, inadecuadas prácticas de manufactura, que sumados a la alta humedad y al hecho de no estar sujetos a controles de almacenamiento, distribución y expendio, se convierten en un vehículo potencial de transmisión para *L. monocytogenes* y otros microorganismos patógenos.

6.2 Taxonomía y Nomenclatura

El análisis filogenético basados en la secuencia de los rDNAs 16S y 23S, han revelado que el género *Listeria* comprende dos grupos evolutivos, uno relativamente distante, correspondiente a *L. grayi* y el otro formado por las especies restantes, dentro de las cuales existen especies patógenas (*L. monocytogenes*) y especies no patógenas como *L. innocua*, *L. seeligeri* y *L. welshimeri*. Se ha encontrado un alto grado de homología en la secuencia

del rDNA 16S, entre *L. monocytogenes* y *L. innocua* siendo las de mayor cercanía taxonómica.

El genoma completo de *L. monocytogenes* fue secuenciado en el 2001 y se encontró un cromosoma circular de 2'944.528 pb con un porcentaje de GC~39%.

Además, la secuenciación o análisis de polimorfismos de longitud de los fragmentos de restricción (RFLP) de genes de *L. monocytogenes*, que codifican para listeriolisina O, flagelina, p60 y de una región genómica esencial para el crecimiento a baja temperatura han permitido diferenciar cepas de los serotipos 1/2a, 1/2c, 3a y 3c de cepas de los serotipos 1/2b, 3b y 4. En otras bacterias patógenas es común encontrar linajes clonales, pero la división de las especies de *Listeria* en grupos serotípicos no es común, lo que sugiere que las cepas de ciertos linajes y/o serotipos son más virulentas en humanos que otras. Cepas del serotipo 1/2c se han encontrado formando biopelículas (Achenson D, 2000).

6.3 Epidemiología

En la actualidad se considera que el hábitat primario de *L. monocytogenes* es el suelo, agua residuales, agua fresca y los vegetales en descomposición en los que se puede desarrollar en forma saprófita. Debido a que el microorganismo tiene tan amplia distribución, contamina frecuentemente los alimentos durante su producción o procesamiento (Miron M, Feraz S, Mellado JM, Vidal F, 2002).

Aunque la infección suele ser considerada dentro de las zoonosis, la mayoría de los casos se presentan en áreas urbanas sin antecedentes de contacto con animales. Los datos epidemiológicos implican a los alimentos como el vehículo más común para la transmisión de la listeriosis humana. Los vegetales crudos, los productos lácteos y las carnes han sido implicados directamente en brotes separados de infecciones humanas.

En Colombia desde 1994 hasta 1998, se encontraron un total de 19 casos de listeriosis: 10 adultos inmunosuprimidos, 2 mujeres embarazadas, 6 neonatos y 1 adolescente de 12 años.

La distribución fue casi igual con respecto al sexo 10 femenino y 9 masculinos. Del total de pacientes el rango de edad fue de 1 a 76 años; la distribución anual fue: 1 en 1994, 2 en 1995, 3 en 1996, 8 en 1997 y 5 en 1998; todas se asocian al consumo de queso no pasteurizado (Marin Paul, 2000).

En Chile durante los años 2008-2009 ocurrieron brotes de *Listeria monocytogenes* asociados al consumo de queso artesanal (A. Pino Francisco , 2003)

En la actualidad en nuestro país no se ha reportado ningún brote por parte de este agente patógeno.

6.4 Ciclo Infeccioso de *Listeria monocytogenes*

El ciclo infeccioso de *L. monocytogenes* inicia con su internalización a la célula hospedera, ya sea por fagocitosis (en el caso de los macrófagos) o por fagocitosis inducida (invasión) en los fagocitos no profesionales. En todo caso, es el propio microorganismo el que promueve su ingreso, asegura su libertad en el citosol de la célula eucarionte, prolifera eficazmente y se desplaza hacia el exterior, para inducir su ingreso a las adyacentes, sin que ello represente su exposición a la acción defensiva de anticuerpos, complemento y polimorfonucleares (PMNs). (Figura 2) (Jawest Ernest, Melnick Joseph, Adelbert Edward , 1996)

Los eventos implicados en el proceso infeccioso global, son:

- a. Entrada a las células del hospedero.
- b. Escape del fagosoma y desarrollo intracelular.
- c. Desplazamiento intracitoplásmico.
- d. Diseminación célula a célula.

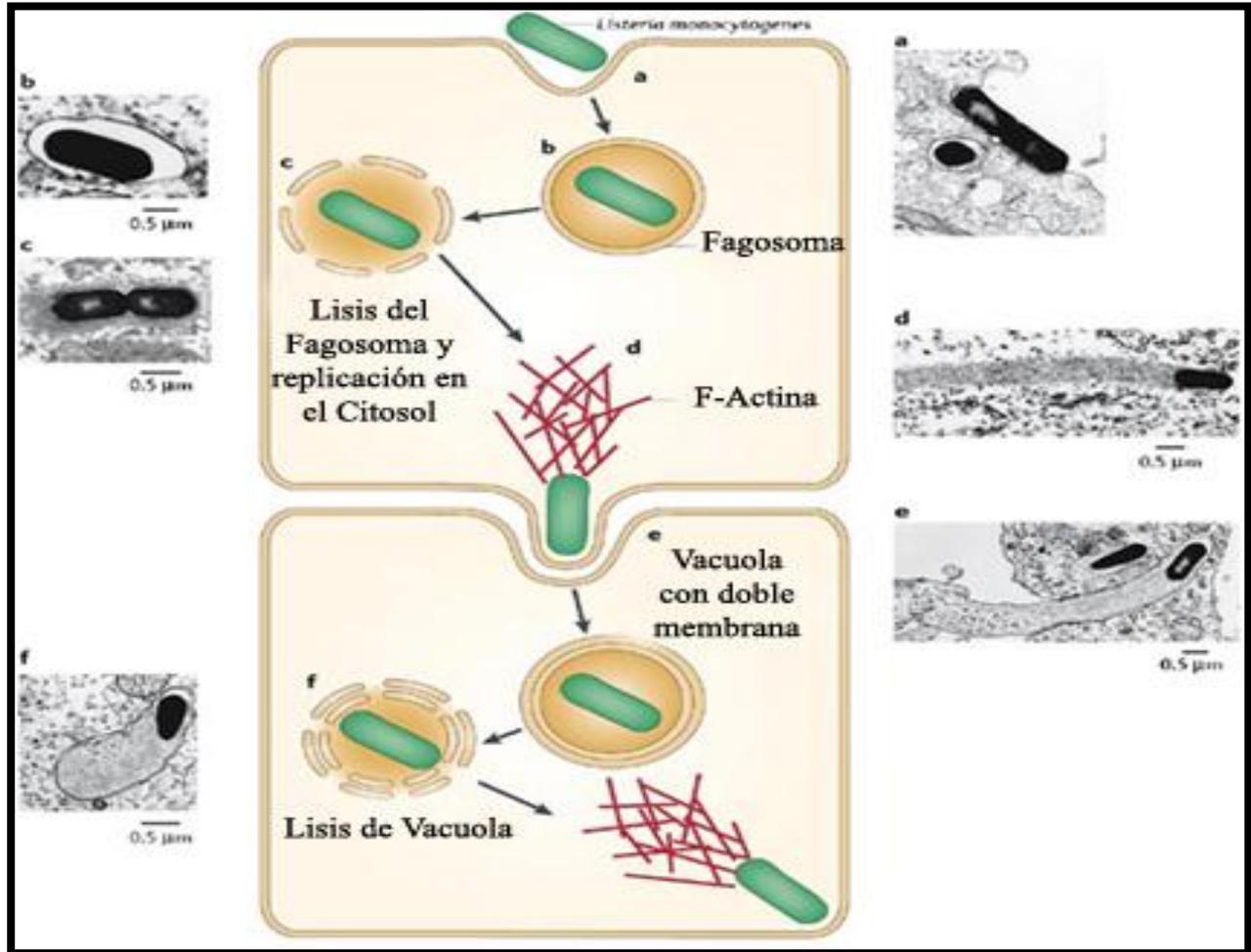


Fig. 2: sykofanta.wordpress.com

a. Entrada a las células del hospedero

Evidentemente, la forma en que el microorganismo ingresa a las células no fagocíticas es semejante a la clásica fagocitosis, ya que implica la interacción del primero ligando con el receptor de las segundas y toda una serie de reestructuraciones en la membrana de la célula “blanco”, las cuales se revierten mediante un mecanismo similar al cierre de los zipper.

En el intestino, *L. monocytogenes* se adhiere a la mucosa intestinal, la cual posteriormente invade. Al parecer, los enterocitos y las células “M” ubicadas en las Placas de Peyer representan el primer sitio de invasión pero, posteriormente, el bacilo es englobado por los macrófagos residentes, dentro de los cuales puede sobrevivir y proliferar, antes de diseminarse por las vías linfática y sanguínea hacia el hígado y el bazo, en donde la

mayoría de su población es eliminada. No obstante lo anterior, algunas *Listerias* sobreviven e infectan a las células adyacentes, hasta provocar cuadros sistémicos en otras palabras, después de la invasión de la barrera intestinal, los dos tipos de células hospederas que resultan críticas en el proceso infeccioso son los macrófagos y los hepatocitos (.ver figura 3)

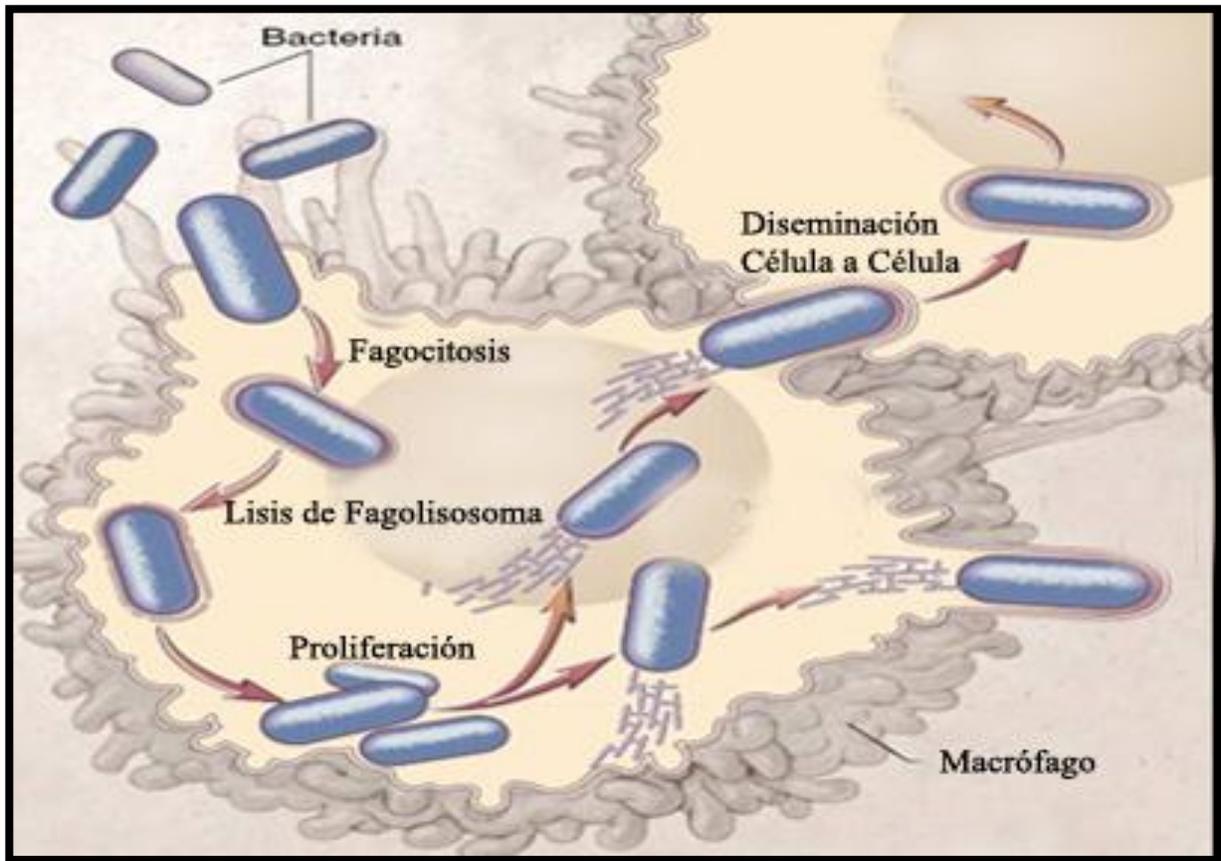


Fig. 3: www.mednet.cl

b. Escape del fagosoma y desarrollo intracelular

Una vez que *L. monocytogenes* ha ingresado a la célula hospedera, lleva a cabo la lisis de la membrana vacuolar, con base en la acción de una potente toxina formadora de poros:

La Listeriolisina O (LLO), que es, entre las citolisinas, la única producida por esta bacteria intracelular, además de ser activa a bajos pH, como los que imperan en el interior del fagolisosoma, induce la apoptosis, estimula a diversas cinasas y promueve la expresión de moléculas de adhesión y la generación de mediadores lipídicos en las células endoteliales infectadas, promueve el escape del microorganismo antes de que ocurra la fusión

fagolisosomal. Además, esta hemolisina es responsable de la hemólisis tipo β que caracteriza a las colonias de *L. monocytogenes* en agar sangre. (Ver figura 4)

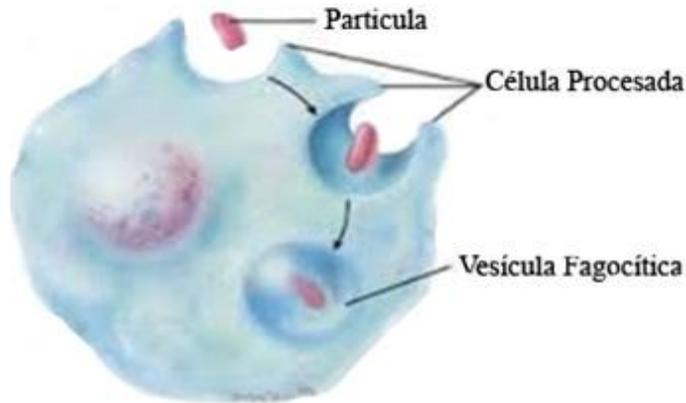


Fig. 4: www.loseskakeados.com

Sin embargo, otros factores que participan en el proceso, son:

- La fosfolipasas C
- Fosfatidilinositol-específica (PI-PLC)
- la ClpC ATPasa (Decatur AI, Porthoy DA, 2000).

Adicionalmente, *L. monocytogenes* produce catalasa y superóxido dismutasa, dos enzimas que la protegen de la oxidación fagolisosómica. Una vez que concretada la lisis del fagosoma, el microorganismo se libera al citosol, en donde se multiplica con un tiempo de generación de 50 minutos, lo que se considera una alta velocidad de crecimiento para un patógeno intracelular (Dubail I, Berche P, 2000).

❖ Desplazamiento intracitoplásmico

En términos generales, puede señalarse que el microorganismo también manipula los componentes del citoesqueleto de la célula hospedera para poder transitar intracelular e intercelularmente.

La movilidad de *L. monocytogenes* se sustenta en el hecho de que, durante el proceso de internalización, la superficie bacteriana adsorbe varios filamentos cortos de actina situados originalmente en la membrana de la célula “blanco”, a merced de la afinidad de ésta por la proteína listeriana ActA, la cual presenta una distribución polar sobre el bacilo; de esta

manera, la morfología del microorganismo muestra estructuras (actínicas) semejantes a la cola de un cometa. Consecuentemente, la polimerización de la actina aporta la fuerza locomotora para que *Listeria* transite en el ambiente intracelular a velocidades de 0.05 a 0.3 $\mu\text{m}/\text{seg}$ (Decatur A.L, Porthoy D.A , 2000).

En general, las colas propulsoras se constituyen por filamentos de 0.2 μm , integrados por 73 monómeros de actina interconectados entre sí y, por obvio, de la polimerización actínica dependen la fuerza y rapidez del desplazamiento bacteriano.

Cabe señalar que la actina representa uno de los componentes proteicos más abundantes del citoesqueleto hospedero, y que se asocia al Ca^{2+} y a una molécula de ATP cuyo fosfato terminal se hidroliza cuando cada molécula se suma a otra (durante la polimerización) (A. Julian, Jimenez A, Gongolas M, Fernandez R, Fernandez MI, 2001).

ActA esta proteína superficial de *L. monocytogenes* es fundamental para la polimerización de la actina en el citosol de la célula hospedera, que no es indispensable, pero actúa como estimulador de la movilidad, debido a que contiene una región con 4 pequeñas repeticiones ricas en prolina, las cuales actúan como sitios de enlace para la proteína VASP10.

Al ingresar a la célula hospedera *L. monocytogenes* pierde sus flagelos y a su vez, la VASP se enlaza en otra molécula hospedera. La profilina y VASP influyen en la velocidad de polimerización de la actina. Evidentemente esto lo hacen para promover el desplazamiento bacilar.

Lógicamente, la continuidad de la polimerización actínica durante el transito intracelular de *L. monocytogenes* requiere de la secuencial despolimerización de los filamentos para el permanente reciclaje de las subunidades monoméricas. En tales eventos sobresale la participación de otras proteínas del hospedero, sobresaliendo la gelsolina, el factor despolimerizador de actina (ADF) y la cofilina.

La gelsolina se adhiere a los extremos (+) de los filamentos de actina y los escinde en pequeños fragmentos y monómeros, lo cual a su vez incrementa la velocidad de ensamble de las colas y la propia migración intracelular de la bacteria, debido a que contribuye eficazmente al óptimo reciclaje de los monómeros actínicos. En cuanto al ADF y la cofilina, su papel es análogo al de la gelsolina, aunque lo desempeñan uniéndose a los extremos negativos de los filamentos de actina (Iretron K, Cossart P, 1997).

❖ **Diseminación célula a célula**

La adquisición de movilidad asociada a filamentos actínicos tiene como su principal propósito el de que *Listeria* pueda invadir a otras células del hospedero; en concreto, una vez que ha proliferado en el citosol de su primer “blanco”, los bacilos se desplazan hacia la membrana celular de éste y la “empujan” progresivamente con base en la polimerización actínica de las colas que ha adsorbido, provocando que produzca prolongaciones alargadas, llamadas filópodos o protrusiones, desde cuyo interior continúan ejerciendo presión; de esta manera, dichas proyecciones terminan siendo “fagocitadas” por la célula adyacente, con lo cual la bacteria volverá a quedar encerrada dentro de un fagosoma secundario, esta vez de doble membrana, del cual procederá a escapar y a repetir los eventos que protagonizó anteriormente (ESFSA, 2009).

Cabe mencionar que tanto en la formación de las protrusiones como en el propio englobamiento de estas últimas por parte de la célula adyacente, es posible que cada filamento se integre por 2 cadenas de monómeros de actina enrollados en espiral y sólo crezca en su extremo positivos, obedeciendo a la localización de la molécula de ATP asociada al monómero de más reciente incorporación a otra célula epitelial, macrófago o hepatocito. Adicionalmente, tampoco se han logrado identificar a las moléculas de superficie que median la interacción “célula hospedera–célula hospedera” durante el proceso que engloba a la protrusión, ni aquélla incluye algún proceso activo o pasivo dependiente de la célula que fungirá como receptora de *listerias*.

Por el contrario, recientemente se han reconocido 3 factores bacterianos implicados en la lisis de la vacuola de doble membrana:

- la lecitinasa
- la PI-PLC.
- una metaloproteasa (Mpl).

Lecitinasa: Es secretada como un precursor inactivo (proPC-PLC) de 33 kDa, a partir del cual una escisión proteolítica en su región N-terminal genera la forma activa. Dicha activación puede ocurrir por alguno de dos mecanismos: el primero depende precisamente de la Mpl, dependiente de zinc, en tanto que, el segundo, es mediado por una proteasa de cisteína.

Fosfolipasas C Fosfatidilinositol-específica (PI-PLC): A diferencia del mecanismo lítico utilizado por la LLO, esta enzima (33 kDa) afecta a la membrana celular de las células hospedadoras hidrolizando al lípido de membrana PI (Fosfatidilinositol). Además, está codificada por el gen *plcA*, el cual desempeña un papel importante en el escape bacilar de las vacuolas de doble-membrana y su actividad catalítica es necesaria en otras numerosas funciones intracelulares de *L. monocytogenes* (Cossart P, Lecuit M, 1998).

6.5 Patogenia e Inmunidad

Listeria monocytogenes entra en el cuerpo a través del aparato digestivo tras la ingestión de alimentos contaminados como quesos o verduras. El microorganismo tiene varias proteínas de adhesina (Ami, Fbp A y flagelina) que facilitan la fijación de las bacterias a las células hospedadoras y que contribuyen a la virulencia. Tiene una proteína de superficie de la pared celular denominada internalina A que interactúa con la E-caderina, un receptor en las células epiteliales, que favorece la fagocitosis hacia las células epiteliales. Después de la fagocitosis, la bacteria es envuelta en un fagolisosoma, donde es activada por el pH bajo para producir listeriolisina O. Esta enzima produce lisis de la membrana del fagolisosoma y permite que las *Listerias* escapen hacia el citoplasma de la célula epitelial. Los microorganismos proliferan y ActA, otra proteína de superficie de *Listeria*, activa la polimerización de la actina de la célula anfitriona, lo cual las impulsa hacia la membrana celular. Empujando la membrana de la célula hospedadora, produce la formación de

protrusiones elongadas denominadas filópodos, que son ingeridos por células epiteliales adyacentes, macrófagos y hepatocitos, las *Listerias* son liberadas y el ciclo comienza de nuevo. *L. monocytogenes* se puede mover de una célula a otra sin estar expuesta a anticuerpos, complemento o células polimorfonucleares. El hierro es un factor de virulencia importante. Las *Listerias* producen sideróforos y pueden obtener hierro de la transferrina. La inmunidad para *L. monocytogenes* es mediada principalmente por células, según se demuestra por la ubicación intracelular de la infección y por la notable relación de la infección con los estados que cursan con alteración de la inmunidad mediada por células como el embarazo, SIDA, linfoma y trasplante de órganos. La inmunidad puede ser transferida por los linfocitos sensibilizados pero no por los anticuerpos (Cameron LA, Footer MJ, 1999).

6.6 Cuadro Clínico

Listeria monocytogenes es un patógeno oportunista y parásito intracelular facultativo, está ampliamente distribuida en el medio ambiente y afecta al hombre, mamíferos y aves.

Las formas clínicas más características de la infección producida por *Listeria* son:

❖ Meningoencefalitis

Se trata de la presentación más frecuente de la Listeriosis en humanos adultos inmunocomprometidos y sobre todo en neonatos. Corresponde a una patología supurativa aguda, en la cual la linfocitosis del LCR y los signos clínicos llegan a sugerir una meningitis tuberculosa. La enfermedad con frecuencia cursa como meningoencefalitis y rara vez como encefalitis.

La meningoencefalitis se caracteriza por fiebre, cefalea y alteraciones de la conciencia; la aparición de los síntomas suele ser abrupta y la rigidez de nuca está ausente en casi la mitad de los pacientes, particularmente cuando se trata de personas muy ancianas o inmunocomprometidas. Con frecuencia se observan convulsiones y otros signos tales como ataxia, hemiparesia y parálisis de los pares craneales, manifestaciones que reflejan una

romboencefalitis; ésta corresponde a la afectación del tronco cerebral y suele coexistir con la inflamación meníngea.

❖ **Septicemia**

La septicemia afecta a neonatos y adultos inmunodeprimidos, quienes evidencian notables episodios de escalofrío y fiebre.

En los adultos, la mayoría de los casos se relaciona con personas inmunocomprometidas, en quienes a menudo cursa en forma fulminante.

Por su parte, los neonatos empiezan a manifestarla después de los 3 días de edad con un cuadro inespecífico, por lo cual se corre el riesgo de tratarla empíricamente sin eficacia terapéutica alguna.

❖ **Presentaciones locales**

Se han descrito multitud de presentaciones localizadas con infección circunscrita a un determinado órgano, como mastitis, endocarditis, enteritis, queratoconjuntivitis, miocarditis e iritis. Las infecciones cutáneas parecen relacionarse más frecuentemente con la granulomatosis infantil.

Las lesiones ulcerativas no se distinguen de las de otros orígenes, por lo cual es necesario el cultivo de las muestras para establecer el diagnóstico.

❖ **Granulomatosis Infantiséptica**

En la granulomatosis infantiséptica el infante presenta abscesos diseminados y/o granulomas en múltiples órganos internos, incluyendo hígado, bazo, pulmones, riñón y cerebro; además, el niño nace en estado de muerte aparente, con rinitis purulenta, erupción cutánea y hasta nódulos faríngeos. Este tipo de infección se observa dentro de los primeros cuatro días de vida, suele asociarse a meningitis y su pronóstico es malo, con tasas de mortalidad cercanas al 100 %.

En los neonatos, es causa de sepsis en 2 modalidades clínicas:

➤ **Primera modalidad**

Con un período de incubación de 1-5 días, se origina en el útero y se traduce en abortos, alumbramiento de productos muertos o partos prematuros asociados a neonatos que padecen de granulomatosis infantiséptica, grave afección ocasionada exclusivamente por *L. monocytogenes*.

➤ **Segunda modalidad**

Se presenta después de la primera semana de vida, casi siempre como una meningitis sin características clínicas específicas; es decir, se adquiere a partir de la madre; durante o después del nacimiento (no intraútero).

❖ **Infecciones durante el embarazo.**

Éstas se adquieren más frecuentemente en el tercer trimestre (coincidiendo con la mayor declinación de la inmunidad celular) y, en general, las pacientes presentan síntomas transitorios, inespecíficos, leves a moderados, que incluyen fiebre, cefalea, dorsalgia y trastornos gastrointestinales tales como náuseas, vómito, dolor abdominal y diarrea. En tal sentido, es común que la enferma no acuda a consulta médica.

Cuando la infección tiene lugar al inicio del embarazo, el aborto ocurre durante el quinto o sexto mes; sin embargo, también existe la posibilidad de que la gestación llegue a su término, a pesar de que son más frecuentes los nacimientos prematuros (Braun L, Ghebrehwet B, Cossart P, 2006).

6.7 Vías de transmisión de *Listeria monocytogenes* al ser humano:

A través del consumo de alimentos contaminados con dicha bacteria: Actualmente se reconoce que la mayoría de los casos de listeriosis humana son de transmisión alimentaria (99%) por falta de higiene, contaminación cruzada, inadecuado procesado de los alimentos tanto en la transformación de los alimentos en la industria como en la preparación y cocinado de los alimentos en el hogar.

- **Vertical:** De madre embarazada a feto. Los bebés pueden nacer con *Listeria* si sus madres comen alimentos contaminados durante el embarazo. Aunque las personas saludables pueden consumir alimentos contaminados sin llegar a enfermarse, en ellos el riesgo de infección es mayor y pueden contraer *Listeria* probablemente después de volver a comer alimentos contaminados con incluso una pequeña cantidad de la bacteria. Las personas en riesgo pueden prevenir la infección con *Listeria monocytogenes* evitando ciertos alimentos de alto riesgo y manipulando los alimentos apropiadamente.

- **Zoonótico:** Por contacto con animales enfermos, lo cual es poco frecuente, como son los casos de veterinarios y ganaderos después del parto de un animal infectado sin protección.

- **Nosocomial (adquisición hospitalaria):** En obstetricia y ginecología es muy poco frecuente (Marquis H, Goldfine H, Porthoy DA, 1997).

6.8 Incidencia

En las últimas tres décadas las enfermedades producidas por *Listeria* se han convertido en una de las principales zoonosis emergentes de transmisión alimentaria. La Listeriosis es una enfermedad rara de la que anualmente en el mundo se reportan varios miles de casos, que solo representan una pequeña parte de los diagnosticados.

La incidencia de la enfermedad es también desproporcionada en las poblaciones de alto riesgo, como los neonatos, los ancianos, las mujeres embarazadas y los pacientes con deficiencias graves de la inmunidad celular (como receptores de trasplantes, aquejados de linfomas o del síndrome de inmunodeficiencia adquirida [SIDA]).

La Listeriosis humana es una enfermedad esporádica que se ve durante todo el año, aunque su incidencia máxima ocurre en los meses más cálidos. Las epidemias focales y los casos esporádicos de Listeriosis se han asociado al consumo de leche contaminada, quesos poco curados, carne poco hecha (p. ej., salchichas de pavo, carnes frías), vegetales crudos mal

lavados y repollo. Debido a que *Listeria* puede crecer en un amplio intervalo de pH, así como a temperaturas frías, los alimentos con un pequeño número de microorganismos pueden presentar una notable contaminación tras un período prolongado de refrigeración. Si la comida no está cocinada o lo ha sido de manera inadecuada (p. ej., preparación en el microondas de una carne de vaca o salchichas de pavo) antes de ser consumida, puede aparecer la enfermedad. La tasa de mortalidad de las infecciones sintomáticas por *Listeria* (20%-30%) es más alta que la de casi todas las restantes toxiinfecciones alimentarias (Hof H, Nichterlein T, Krestshmar M, 1997).

6.9 Prevención

L. monocytogenes ha venido representando un problema cada vez mayor en el campo de la elaboración de alimentos; por ello, resultan indispensables las buenas prácticas industriales en todas las fases de la producción: procesamiento, empaquetamiento y almacenamiento. Puesto que no existen vacunas antilisterianas, las medidas vigentes de prevención y control corresponden a precauciones simples aplicables contra cualquier enfermedad de origen alimentario: la higiene personal y la adecuada higienización, cocción y almacenamiento de los alimentos.

➤ Los principios específicos incluyen:

a) Evitar la contaminación cruzada: Antes de preparar alimentos, la persona debe lavarse bien las manos y limpiar los utensilios y las superficies destinados a picar y preparar los alimentos; es conveniente emplear un utensilio para cada alimento. La verdura, los mariscos y la carne cruda de res, cerdo, aves, pescados, etc., no deben colocarse en los sitios destinados a los alimentos cocinados. Los alimentos deben almacenarse en refrigeración, aunque no durante lapsos muy prolongados, ya que éstos no impiden las infecciones alimentarias.

b) Destruir las bacterias potencialmente dañinas: La carne roja, aves y mariscos deben cocerse completamente para eliminar a la mayor parte de los microorganismos presentes. Las verduras deben lavarse bien y desinfectarse.

c) Otras medidas generales. No es conveniente ingerir leche cruda ni sus respectivos derivados. Además, es preciso lavar las tablas y otras superficies asociados a la preparación y manejo de los alimentos crudos (Payan A, Austillo M, 1994).

6.10 Métodos de Detección

En la actualidad existen varios métodos convencionales y rápidos disponibles para la detección e identificación de *Listeria monocytogenes* en muestras de alimentos y en muestras procedentes de Listeriosis animal.

Los métodos convencionales para el aislamiento de *L. monocytogenes* a partir de alimentos que han ganado aceptación con propósitos reglamentarios internacionales son el método de la Administración de Drogas y Alimentos de los Estados Unidos (FDA), el método oficial de la Asociación Oficial de Químicos Analistas (AOAC), los Estándares ISO 11290, el método del Servicio de Inspección y Seguridad Alimentaria (FSIS) del Departamento de Agricultura de los Estados Unidos (USDA) y los Estándares franceses.

Los métodos de la FDA y de la AOAC pueden utilizarse para el análisis de la leche y los productos lácteos.

6.10.1 Método Internacional Estándar según FDA-BAM

❖ Medio De Enriquecimiento

Principio de Buffer *Listeria* De Enriquecimiento (BLEB)

Digerido enzimático de caseína, digerido enzimático de harina de soja y extracto de levadura proporciona nitrógeno, vitaminas y minerales en Buffer de *Listeria* Caldo de enriquecimiento Base. La dextrosa es la fuente de carbohidratos. El cloruro sódico mantiene el equilibrio osmótico del medio. Fosfato monopotásico, fosfato dipotásico, fosfato disódico son los agentes tampón. Piruvato de sodio se añade asépticamente como un eliminador de oxígeno. El ácido nalidíxico, Acriflavina y cicloheximida se agregan como agentes selectivos después de una de cuatro horas de pre-enriquecimiento inicial. Ácido nalidíxico inhibe el crecimiento de organismos Gram- negativos. Acriflavina inhibe las bacterias Gram- positivas. La cicloheximida se utiliza para inhibir el crecimiento de hongos

saprófitos. El retraso en la adición de estos agentes tiene por objeto facilitar la reanimación, la reparación, y el crecimiento de organismos de *Listeria*.

❖ **Medios de Cultivo Diferenciales**

Después del enriquecimiento selectivo, los cultivos se siembran en placas de agar con un medio selectivo/diferencial para el aislamiento de las colonias presuntivas de *L. monocytogenes*. En todos los métodos, a excepción del método de la Norma ISO, se utiliza el agar de Oxford o una modificación.

❖ **Agar Oxford**

El agar de Oxford contiene cloruro de litio, cicloheximida, colistina, acriflavina, cefotetan y fosfomicina como agentes selectivos, y las colonias de *Listeria spp* son pequeñas, negras y rodeadas de un halo negro. Además del agar de Oxford, el método de la FDA incluye cloruro de litio/feniletanol/moxalactam (LPM) o agar PALCAM, que contiene cloruro de litio, polimixina B, acriflavina y ceftazidima.

✓ **Fundamento**

Es un medio de cultivo selectivo y diferencial, contiene nutrientes necesarios para el desarrollo de *Listeria spp*. Es diferencial para *Listeria spp*. Debido a que el producto de la hidrólisis de esculina en presencia de iones férricos forma un compuesto fenólico de color negro. La selectividad para *Listeria spp.*, se obtiene por el agregado del suplemento selectivo para Agar base Oxford modificado, debido a que contiene antibióticos que inhiben total o parcialmente el desarrollo de la flora acompañante presente en la muestra.

❖ **Agar cromogénic *Listeria***

Es un medio cromogénico selectivo, para la detección directa y enumeración de *L. monocytogenes*, basado en el aislamiento selectivo, la detección cromogénica de fosfolipasa C específica para fosfatidilinositol (PI-PLC) y el uso de xilosa. *Listeria monocytogenes* se desarrolla en colonias azules (positivas a la PI-PLC) sin halo amarillo (negativo a la xilosa); *L. ivanovii* produce colonias verde-azuladas (positivas a la PI-PLC) con halo amarillo (positivo a la xilosa). Otras colonias de *Listeria spp* son blancas (negativas a la PI-PLC).

Las colonias típicas de *Listeria spp.*, una vez crecidas en el medio selectivo diferencial, se seleccionan para la identificación adicional de *L. monocytogenes* (Seeliger HPR, Jones D, 1986).

❖ La prueba Christie–Atkins–Munch–Peterson(CAMP)

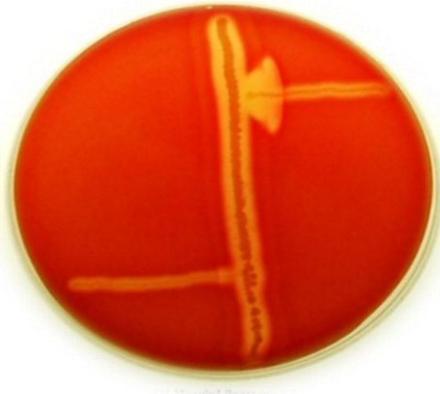


Fig.6: www.diatek.com.tr

Es una herramienta muy útil que facilita la identificación de las especies de *Listeria spp* a partir de los aislamientos. Consiste en sembrar en estría una cepa β -hemolítica de “*Staphylococcus aureus*”, formando unas únicas líneas rectas y paralelas, en una placa de agar sangre de oveja o en una placa por la técnica de la doble capa de agar, con la capa de agar sangre superior muy delgada. Las estrías deben tener la

suficiente separación para permitir que las cepas de *Listeria* de prueba y de control se puedan sembrar perpendicularmente, entre los dos organismos indicadores, sin que los toquen (separados 1–2 mm).

❖ Pruebas Bioquímicas

Fermentación de Ramnosa, Xilosa y Manitol

Fundamento: Esta prueba sirve para determinar la capacidad de un microorganismo de fermentar los carbohidratos (azúcares), produciendo ácido o gas visible.

Se utiliza una base rica en nutrientes, cuyo indicador de PH es el púrpura de bromocresol. El carbohidrato requerido se agrega, ya sea en forma de discos comerciales impregnados o adicionados al caldo, el carbohidrato previamente esterilizado por filtración.

Es de gran utilidad para la determinación de *Listeria monocytogenes* ya que esta, fermenta ramnosa pero no la xilosa ni el manitol.

Tabla.1. Fermentación de Azúcares y Prueba de CAMP Test.

Especies	Hemólisis	Producción de ácido		Prueba de CAMP S. aureus
		Ramnosa	Xilosa	
<i>L. monocytogenes</i>	+	+	-	+
<i>L. innocua</i>	-	V	-	-
<i>L. ivanovii</i>	+	-	+	-
<i>L. seeligeri</i>	+	-	+	+
<i>L. welshimeri</i>	-	V	+	-
<i>L. grayi subsp. Grayi</i>	-	-	-	-
<i>L. grayi subs. Murrayi</i>	-	V	-	-

V: reacción variable (+: reacción débil
+: > 90% de la reacción positiva -: sin reacción

Nota: Existen cepas extrañas de *L. monocytogenes* las cuales no presentan β -hemólisis o una reacción positiva a la CAMP, bajo las condiciones descritas en el presente apéndice normativo C (Landeta Roberto , 2009).

6.10.2 Medios de Detección Molecular

Debido al incremento de *Listeria spp* y su complejo ciclo de vida, la existencia de métodos de detección rápido y efectivo son importantes como base de las estrategias de control. Tal es el caso de la Técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) y la técnica PCR en Tiempo Real, ambas tecnología moleculares basadas en la amplificación in vitro del ADN.

Fundamento del método

Básicamente la PCR se desarrolla en tres pasos:

Desnaturalización: Consiste en separar la doble cadena de DNA y convertirla en hebra sencilla. Típicamente se usa una temperatura de 95°C-97°C, por 15 a 40 segundos. Esta temperatura dependerá del tamaño del genoma.

Apareamiento o Annealing: Los cebadores o “primers”, reaccionan con la hebra sencilla de DNA y se pegan en lugares específicos por complementariedad de bases. Para esto, se baja la temperatura a 55°C por 30 segundos.

Polimerización o Extensión: Una polimerasa de DNA extiende los “primers”, en el espacio comprendido entre ambos “primers”, y coloca dinucleótidos trifosfatados (dNTP's) de 5'a 3' leyendo el DNA de 3'a 5'. De esta forma sintetiza la secuencia complementaria de las hebras de DNA molde. Se efectúa a 70°C (International Organization for standarditation , 2004).

Estas tres fases constituyen un ciclo de la PCR, de la cual se obtiene una copia de un pequeño fragmento del DNA molde. En este primer ciclo, los fragmentos generados no tienen el mismo tamaño: la copia de cada una de las cadenas se inicia, a partir del extremo 3', en el punto en el que el cebador hibrida con el DNA molde y termina en el momento en el que la enzima polimerasa no es capaz de añadir más nucleótidos, esta ultima tiene la ventaja de que lleva a cabo simultáneamente los procesos de amplificación y detección en el mismo vial y que determina la cantidad de DNA sintetizado en cada momento de la reacción.

PCR Convencional

La Reacción en Cadena de la Polimerasa o PCR (siglas de su nombre en inglés polimerasa chain reaction) permite generar una gran cantidad de copias de un fragmento de DNA (ácido desoxirribonucleico). El requisito fundamental para poder llevar a cabo la reacción es disponer de fragmentos cortos de ADN de cadena sencilla complementarios a los extremos del fragmento servirían como cebadores para que un enzima polimerasa sea capaz de incorporar nucleótidos complementarios a la cadena molde. Una vez completada la reacción la cantidad de fragmento amplificado se puede visualizar mediante técnicas sencillas de separación de fragmentos de DNA.

PCR en Tiempo Real

La PCR en Tiempo Real se diferencia de la PCR Convencional en que permite monitorear en cada ciclo la aparición del ADN producto de la reacción mediante el uso de sondas fluorogénicas que “iluminan o fluorescen” mostrando la cantidad de ADN presente en cada ciclo de amplificación. Cada vez que se realiza una copia del ADN molde se libera fluorescencia, por lo que esta es proporcional a la cantidad de ADN generado. Además, el sistema de PCR en Tiempo Real brinda mayor sensibilidad y especificidad, son pruebas rápidas, confiables y permiten procesar grandes cantidades de muestras en menor tiempo.

El resultado de PCR en Tiempo Real se visualiza en un gráfico de amplificación. En él se expresa la fluorescencia leída por el termociclador en el eje de las ordenadas y el número de ciclos de la PCR en el eje de abscisas. De esta forma, la curva de amplificación consta de una fase inicial donde la producción de fluorescencia (DNA producto) está por debajo del nivel de detección del termociclador, una segunda fase en la que se da un incremento de la fluorescencia, la cual es en forma exponencial en su inicio, y una tercera fase (plateau) donde finaliza la reacción y se estabiliza la fluorescencia.

El número de ciclos necesarios para que la señal fluorescentes alcance el nivel umbral, se conoce como Threshold cycle (CT) este es el parámetro en el cual se fundamenta la cuantificación. A mayor CT, menor será la cantidad de DNA blanco, representando en la figura 7.

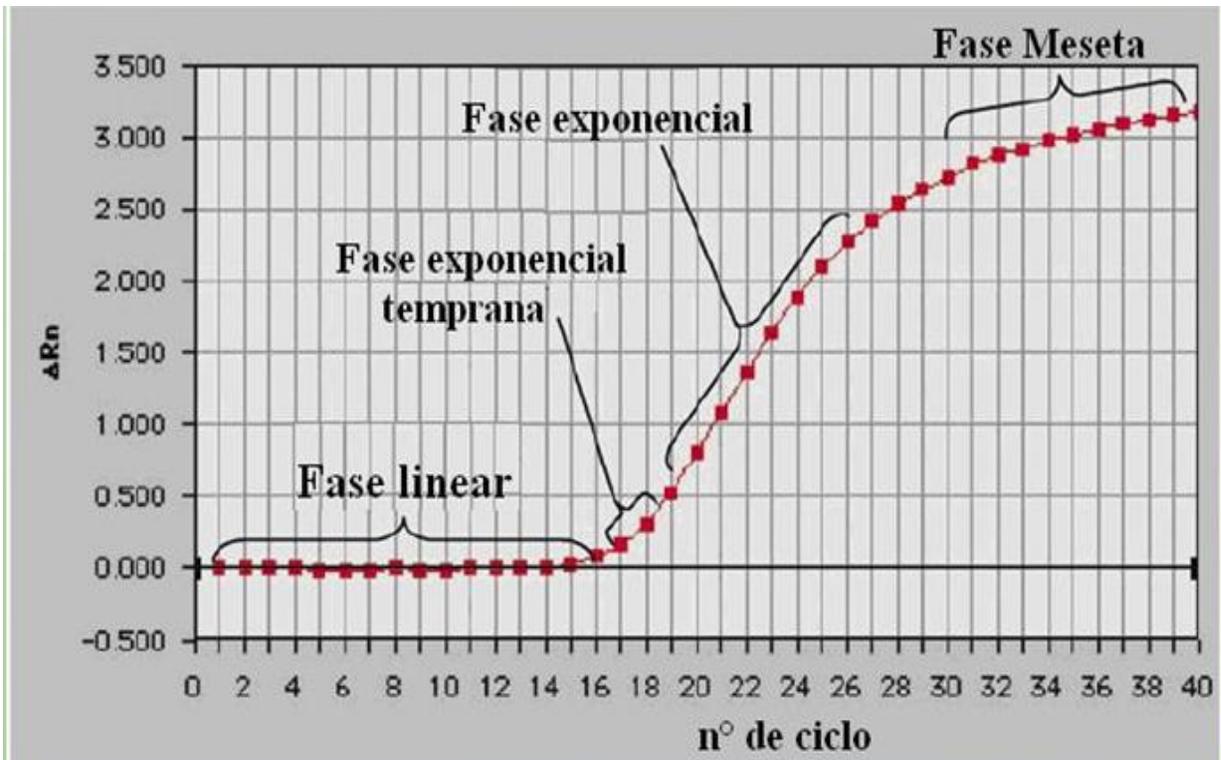


Fig. 7: Amplificación de PCR en Tiempo Real mostrando las tres fases de las que consta. 1^{er} fase inicial, 2^{da} incremento exponencial y 3^{er} plateau.

Este sistema de detección utiliza principalmente las sondas de hidrólisis o taqman, las sondas molecular beacons y las zonas FRET.

Sondas de Hidrólisis

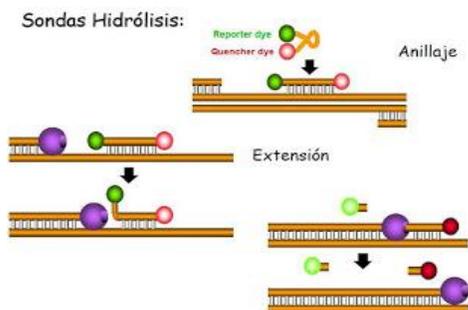


Fig. 8: www.laboratorioysalud.com

Son oligonucleótidos lineales que han sido marcados con un fluorocromo donador en la región 5' que emite Fluorescencia al ser excitado y un aceptor en el extremo 3' que absorbe la fluorescencia liberada por el donador. Para que este fenómeno ocurra, las dos moléculas deben estar cerca. Mientras la sonda esté intacta, la

fluorescencia emitida por el donador es absorbida por el aceptor. Sin embargo durante la amplificación del DNA, la sonda se hibrida en su cadena complementaria. Al desplazarse a lo largo de la cadena, en su acción de síntesis, la DNA polimerasa que tiene actividad

exonucleasa, hidroliza el extremo libre 5' de la sonda, produciendo la señal fluorescente del fluorocromo donador.

Molecular beacons: Son sondas parecidas a las Taqman. Tienen una molécula donadora en

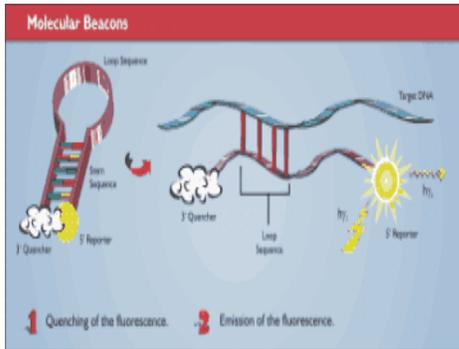


Fig. 9: www.sigmaaldrich.com

el extremo 5' y una aceptora en 3', pero además presentan una estructura secundaria en forma de asa, en la que se encuentra la secuencia de unión específica con el DNA blanco. Los extremos permanecen plegados, hasta cuando el DNA se hibridiza, la sonda se abre alejándose del donador y aceptor, y la fluorescencia del donador es detectada.

Sondas FRET (Transferencia de Energía de Resonancia Fluorescente): El sistema se compone de dos unidades que se unen a secuencias adyacentes del DNA blanco. Una de las sondas lleva un donador en el extremo 3' y la otra un aceptor en el 5'. Cuando las sondas están hibridizadas, los dos fluorocromos están cercanos. Al ser excitado, el donador transfiere su energía al aceptor, que a su vez emite la fluorescencia que detecta el lector del equipo.

Sondas de Degradación TaqMan: El ensayo TaqMan aprovecha la actividad

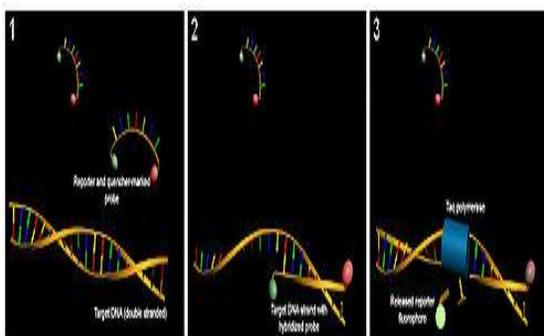


Fig. 10: eslider.es

exonucleásica 5' - 3' de la ADN polimerasa Taq para dividir una sonda de degradación durante la PCR. La sonda de degradación o TaqMan, suele ser un oligonucleótido de 20-30 bases de longitud (usualmente con una T_f 10 °C superior a la T_f de los cebadores) que contiene un colorante delator fluorescente en

el extremo 5' y un colorante inhibidor en el 3'. Al estar bloqueado el extremo 3', la sonda no puede extenderse como un cebador. Durante la PCR, en presencia de una diana, la sonda se hibrida específicamente entre los sitios de los cebadores directo e inverso. Cuando la sonda está intacta, la proximidad del colorante delator al colorante inhibidor produce la supresión

de la fluorescencia delatora principalmente por transferencia de energía de tipo Forster. Durante la reacción, la actividad exonucleásica 5'-3' de la ADN polimerasa Taq degrada la sonda entre los colorantes delator e inhibidor solamente si la sonda se hibrida con la diana. De esta manera, la fluorescencia aumenta a medida que progresa la amplificación.

Análisis gráficos de los datos de una PCR en Tiempo Real

Fluorescencia de fondo: Es la primera fase de «latencia» con ligeras fluctuaciones en los valores correspondientes a la señal de fondo.

Valor umbral (CT): Se define como ciclo umbral (CT) aquel ciclo en que la señal de fluorescencia alcanza el valor medio de las señales de fluorescencia medidas entre el ciclo tercero y el decimoquinto incrementado en diez desviaciones estándar. Cuanto mayor es la cantidad inicial de ADN genómico, antes se detecta el producto acumulado en el proceso de la PCR, y más bajo es el valor CT. En la práctica, a menudo es el operador el que elige la línea umbral que determina el valor CT, lo que constituye uno de los elementos subjetivos de la PCR en Tiempo Real. La línea umbral debe situarse por encima de cualquier actividad basal y dentro de la fase de crecimiento exponencial, que adquiere forma lineal en la transformación logarítmica (todas las líneas son paralelas).

Fase exponencial: La cantidad de ADN amplificado (R_n) alcanza un valor significativamente superior a la señal de fondo. Al medir de esta manera, mejora considerablemente la exactitud de la cuantificación, ya que existe una correlación directa entre la cantidad de plantilla inicial y la fase en la que la amplificación empieza a ser exponencial.

Intervalo (meseta): Punto máximo de amplificación.

Aplicaciones de la PCR en Tiempo Real

Esta técnica puede ser utilizada en diversas aplicaciones, entre las que se encuentran:

- a. Determinación agentes patógenos
- b. Expresión génica en tejido en diferentes estadios de la enfermedad o tras tratamiento
- c. Delección o amplificación de genes
- d. Discriminación alélica
- e. Diagnóstico clínico de tumores o respuesta a tratamiento
- f. Detección de SNPs, haplotipo
- g. Validación de resultados de experimentos con arrays
- h. Metilación de DNA y estudio de apoptosis
- i. Monitorización de patrones de expresión de citoquinas.

Ventajas que tiene la PCR en Tiempo Real

- a. Amplificación específica
- b. Automatización y disminución del tiempo de análisis
- c. Reacción monitorizada a Tiempo Real (De Prado E, 2010).

VII- DISEÑO METODOLÓGICO

Tipo de estudio

Se realizó un estudio descriptivo aleatorio simple de corte transversal. El cual fue realizado en los meses de Noviembre a Diciembre del 2014.

Área de estudio

Mercado Iván Montenegro.

Universo y sitios de muestreos

El mercado Iván Montenegro cuenta con 117 expendios que distribuyen queso fresco artesanal; cada expendio significo 1 lote y de cada lote se tomaron 5 sub-muestras.

Muestra

Para la selección de la muestras se utilizó el Software Epidata versión 3.5.1. Para calcular la muestra se utilizaron los siguientes parámetros: proporción esperada 1.5%, intervalo de confianza 95%, efecto de diseño 1% y una precisión absoluta del 3% resultando 20 expendios seleccionados aleatoriamente.

Tipo de muestra

Por cada expendio seleccionado se tomaron 5 unidades de 1 libras de queso fresco artesanal según la Norma Técnica Obligatoria Nicaragüense para los Quesos (NTON-03-065-06).

Criterios de inclusión

- ✚ Productos distribuidos en el mercado en estudio.
- ✚ Quesos frescos artesanales de producción nacional

Criterios de exclusión

- ✚ No aplica a productos distribuidos en mercado fuera de estudios.
- ✚ No aplica queso ahumado, queso seco, queso de crema y queso madurado.

Muestreo y Transporte de la muestra

Para el muestreo nos trasladamos al Mercado Iván Montenegro para la recolección de la muestra para detectar la presencia de *Listeria monocytogenes*, se tomaron quesos con pesos de 5 libras por cada expendio en las condiciones normales de venta al público y se transportaron refrigeradas al CNDR-MINSA sitio de procesamiento de dichas de muestra. Se utilizó la técnica recomendada por la FDA para productos lácteos de muestras no compuestas.

Limitaciones del estudio.

La mayor limitación en nuestro estudio fue la ausencia de positividad en las muestras analizadas lo que conllevó a no poder realizar los cálculos para valorar sensibilidad y Valor Predictivo Positivo, así como también no poder evaluar los métodos de extracción empleados.

Redacción de la información.

Para la redacción de la información se usaron los programas Microsoft Office Word 2013, para diseñar el documento; así también se utilizó el software Epidata versión 3.5.1 para la selección de las muestras y Microsoft Office Power Point, para la elaboración de presentaciones en nuestra defensa.

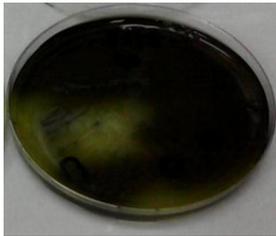
Materiales e Instrumentos utilizados:

1. Campana de seguridad tipo 1.
2. Balanza analítica.
3. Stomacher 400 circulator.
4. Centrifuga 5424 – Eppendorf.
5. Thermomixer confort – Eppendorf.
6. Step One Plus Applied Biosystems.
7. Pipetas automáticas.
8. Puntas.
9. Espátulas
10. Tijeras

11. Pinzas
12. Mecheros
13. Bolsas stomacher
14. Platos Petri
15. Gradillas

Medios de cultivo

- 1) Buffer *Listeria monocytogenes* caldo + selective suplement. (BLEB).
- 2) Chromogenic *Listeria* agar Merck.
- 3) OXFORD medium



Aislamiento de *Listeria monocytogenes* según el BAM-FDA

🚦 Enriquecimiento

Para muestras no compuestas

- ❖ Pesar 25gr de la muestra en una bolsa stomacher.
- ❖ Agregar 225 ml de Buffer *Listeria* enriquecimiento caldo (Oxoid).
- ❖ Incubar a 30 °C durante 4 horas.
- ❖ En la cuarta hora de la incubación, se añaden los agentes selectivos de inhibición Oxoid (acriflavina 10 mg / L; cicloheximida 50 mg / l; ácido nalidíxico, 40 mg / l).
- ❖ La incubación para el enriquecimiento selectivo se continúa a 30 ° C durante un total de 48 h.



✚ Aislamiento

Después de 48 h de incubación en el medio de enriquecimiento BLEB, resembrar en los medios agar *Listeria* Chromogenic (Merck) y agar *Listeria* OXFORD (Titan Media).

Características de colonias en agar OXFORD: colonias pequeñas, negras y rodeadas de un halo negro.

Características de colonias en agar *Listeria* Chromogenic (Merck): Colonias azul turquesa (positivas a la PI-PLC) sin halo amarillo (negativo a la xilosa).

Se seleccionaron las colonias más características por cada placa de agar selectivo y sembrarla en agar tripticosa soya agar (TSA). Incubar 24 horas a 35°C.

✚ Otras pruebas

❖ Prueba de CAMP Test

Trazar una línea de *Staphylococcus aureus* a lo largo de la placa en forma de inóculo fino. De igual manera sembrar perpendicularmente a las cepas patrones las colonias aisladas que se desean probar, sin tocar la línea del *S. aureus*, a distancia aproximada de 5 mm. Incubar a 35 °C durante 24 horas.

Reacción positiva: Formación de un halo rectangular de hemolisis acentuada a la parte cercana al inóculo de *S. aureus*.

Reacción negativo: No hubo formación del halo rectangular de hemolisis.

❖ Prueba de utilización de carbohidratos

Inocular tubos de caldo púrpura para fermentación de carbohidratos al 0,5 %: Ramnosa, manitol y xilosa. Incubar 7 días a 35°C. Una coloración amarilla indica una prueba positiva.

PCR en Tiempo Real para la detección de *Listeria monocytogenes*

La detección de *Listeria monocytogenes* se llevo a cabo a partir del medio de enriquecimiento BLEB después de 48 horas de incubación a 30°C, aplicando los siguientes métodos: NucleoSpin®Tissue e Hidróxido de Sodio para la extracción de ADN bacteriano.

❖ NucleoSpin®Tissue



NucleoSpin® Tissue es un método de amplificación de ADN genómico que puede ser preparado a partir de tejidos, células (por ejemplo, bacterias), y muchas otras fuentes. La lisis se consigue mediante la incubación de la muestra de material en una solución de proteinasa K/SDS. Las condiciones apropiadas para la unión de ADN a la membrana de sílice en el NucleoSpin en columnas de tejido se crean mediante la adición de sales caotrópicas y etanol al lisado. El proceso de unión es reversible y específico para ácidos nucleicos. Contaminaciones se eliminan mediante lavado posterior con dos tampones diferentes. El ADN puro se elude finalmente en condiciones de baja fuerza iónica en un tampón de elución ligeramente alcalino.

❖ Preparación de soluciones de trabajo

- 1. Tampón de Lisis B3:** Transferir el contenido total de Buffer B1 a Buffer B2 y mezclar. Coloque las etiquetas de tampón de lisis B3 en la botella. El tampón de lisis resultante B3 es estable durante hasta un año a temperatura ambiente.
- 2. Tampón de lavado B5:** Añadir el volumen indicado de etanol (96 - 100 %) para lavar Buffer Concentrado B5. Marque la etiqueta de la botella para indicar que el etanol se añadió. Guarde Wash Buffer B5 a temperatura ambiente (18 - 25 ° C) durante un máximo de un año.
- 3. Proteínasa K:** Añadir el volumen indicado de proteína Buffer PB para disolver Proteínasa K. Solución que se liofilizó de proteína K es estable a - 20 ° C durante un máximo de 6 meses.

Tabla 2. Preparación de soluciones de trabajo de NucleoSpin® Tissue

	10 prep	50 prep	250 prep
Buffer B5 de lavado (concentrado)	4ml Añadir 16 ml de etanol	2 x 7 ml Añadir 28 ml de etanol a cada botella	2 x 40 ml Añadir 160 ml de etanol a cada botella
Proteinasas K	6 mg Añadir 260 µl proteinasas Buffer	30 mg Añadir 1.35 ml proteinasas Buffer	2 x 75 mg Añadir 3.35 ml proteinasas Buffer a cada vial

Antes de comenzar la preparación

- Comprobar si el buffer B3, buffer B5 y proteinasas k estén preparados.
- Establecer thermomixer a 56 ° C
- Antes de la elución, verificar que tampón de elución de precalentamiento sea a 70°C

1. Preparar la Muestra

- ❖ Seleccionar 1 tubo de microcentrífuga y dispensar en el tubo de microcentrífuga 1ml del caldo de 48hrs
- ❖ Centrifugar durante 5 minutos a 8000 x g. Eliminar el sobrenadante.

2. Pre lisis de la muestra

- ❖ Resuspender el sedimento en 180 µl de tampón T1 pipeteando arriba y abajo.
- ❖ Añadir 25 µl de proteinasas k. Agitar vigorosamente e incuba a 56 ° C hasta obtener una lisis completa durante 2 horas.

3. Lisis de muestra

- ❖ Mezcle las muestras. Añadir 200 µl de tampón B3 y agitar vigorosamente e incubar a 70 ° C durante 10 minutos. Mezclar brevemente.
- ❖ Si las partículas insolubles son visibles, centrifugar durante 5 minutos a 11.000 x g y transferir el sobrenadante a un nuevo tubo de microcentrífuga.

4. Ajustar las condiciones de unión de ADN

- ❖ Añadir 210 µl de etanol (96 - 100%) para la muestra y agitar vigorosamente.
- ❖ Después de la adición de etanol un precipitado fibroso puede convertirse visibles. Esto no afectará el aislamiento de ADN. Asegúrese de cargar todo el precipitado en la columna en el siguiente paso.

5. Unión ADN

- ❖ Para cada muestra, coloque un NucleoSpin[®]Tissue Columna en un tubo de recogida.
- ❖ Centrifugar durante 1 min a 11.000 x g.
- ❖ Descartar el filtrado y coloque la columna de nuevo en el tubo.
- ❖ Si la muestra no se extrae completamente a través de la matriz, repetir la etapa de centrifugación a 11.000 x g. Deseche caudal continuo.

6. Lavar la membrana

▪ 1er lavado

- ❖ Añadir 500 µl Buffer BW. Centrifugar durante 1 min a 11.000 x g.
- ❖ Deseche el filtrado y coloque la columna de nuevo en el tubo de colecta.

▪ 2do lavado

- ❖ Añadir 600 µl de buffer B5 a la columna y centrifugar durante 1 min a 11.000 x g.
- ❖ Deseche el filtrado y coloque la columna en el tubo de recogida.

Secar membrana

- ❖ Se centrifuga la columna durante 1 min a 11.000 x g.
- ❖ Se elimina el etanol residual durante este paso.

7. ADN altamente puro

- ❖ Colocar la columna NucleoSpin[®]Tissue en un 1,5 ml en un tubo de microcentrífuga y añadir 100 µl Buffer BE precalentado a (70 ° C).
- ❖ Incubar a temperatura ambiente durante 1 min. Centrifugar 1 min a 11.000 x g.



NaOH- Tris/HCL

Procedimiento

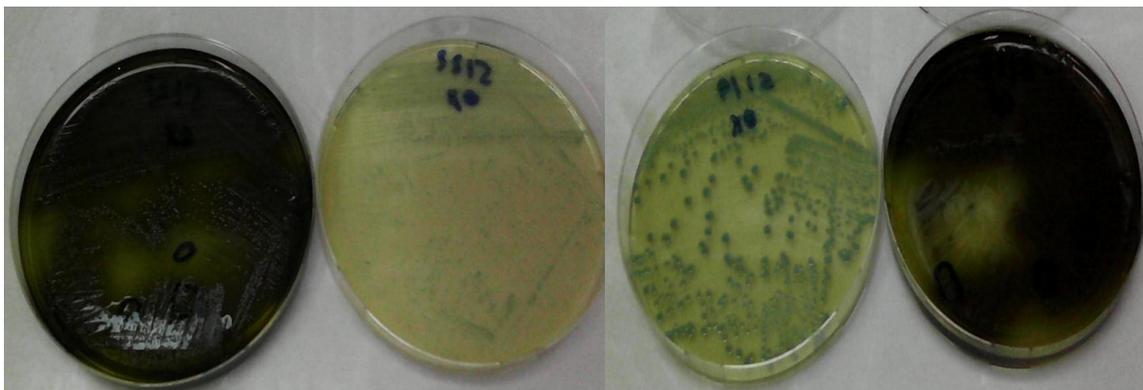
1. Seleccionar 1 tubo de microcentrífuga y dispensar en el tubo de microcentrífuga 1ml del caldo de 48hrs.
2. Centrifugar la muestra durante 5 minutos a 12000g.
3. Aspirar y desechar el sobrenadante.
4. Añadir 100 μ l de NaOH 25 mmol, dejar reposar por 10 minutos
5. Incubar a temperatura de 99 °C por 10 minutos
6. Dejar enfriar durante 10 minutos.

VIII- OPERACIONALIZACIÓN DE VARIABLES

Variable	Subvariable	Indicador	Valor	Criterio
Aislamiento Convencional de <i>Listeria monocytogenes</i> según FDA-BAM	Oxford	Capacidad de hidrolizar la esculina.	Hubo crecimiento bacteriano. No hubo crecimiento bacteriano.	colonias pequeñas, negras y rodeadas de un halo negro -
	Cromogenic <i>Listeria</i>	Determina la acción cromogénica de fosfolipasa C específica para fosfatidilinositol (PI-PLC) y el uso de xilosa	Hubo crecimiento bacteriano No hubo crecimiento bacteriano	Colonias azul turquesa (positivas a la PI-PLC) sin halo amarillo (negativo a la xilosa). -
	Prueba de CAMP Test	Permite determinar la actividad hemolítica de <i>Listeria monocytogenes</i>	Positivo	Formación de un halo rectangular de hemolisis acentuada a la parte cercana al inóculo de <i>S. aureus</i> .
			Negativo	No hubo formación del halo rectangular de hemolisis.
	Fermentación de Carbohidratos	Capacidad de un microorganismo de fermentar los carbohidratos produciendo ácido o gas visible.	Positivo	Viraje de color del medio de violeta a amarillo
			Negativo	No hay cambio de color
Detección de <i>Listeria monocytogenes</i> por PCR en Tiempo Real.	Método de extracción Núcleo Spin® Tissue	Extracción y amplificación de un fragmento de ADN específico de <i>Listeria monocytogenes</i>	Positivo	Curva de amplificación eficiente Δ RN mayor 0.1
		Negativo	No amplificación	
	Método de extracción NaOH-Tris/HCL	Extracción y amplificación de un fragmento de ADN específico de <i>Listeria monocytogenes</i>	Positivo	Curva de amplificación eficiente Δ RN mayor 0.1
			Negativo	No amplificación

IX-ANÁLISIS Y DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS

1. Aislamiento de *Listeria monocytogenes* en queso fresco artesanal según la norma internacional FDA-BAM.



Con respecto al aislamiento de *Listeria monocytogenes* esta no se logró aislar en las 100 muestras analizadas. En investigaciones realizadas por Guerra M, Bernardo F, 2001, demuestran que en el queso fresco predominan bacterias lácticas que son parte de la flora bacteriana normal de este producto, las cuales pueden inhibir el crecimiento de este patógeno durante el proceso de fermentación debido a la síntesis de ácidos orgánicos, diacetil, peróxidos de Hidrogeno, y bacteriocinas que tienen efectos antagónicos contra *Listeria monocytogenes* compitiendo por nutrientes. Otra posibilidad es la teoría de la selección natural la cual explica que un microorganismo o individuo al no poder desarrollarse o reproducirse será desplazado por aquel que tiene la capacidad de herencia, variación y reproducción diferencial dando como resultado la evolución de este por selección natural, dado que *Listeria monocytogenes* no se encontró en los quesos frescos, la supresión de este pudo haber inducido la selección natural de otras cepas bacterianas entre ellas: bacterias lácticas y *Escherichia coli*. Por otro parte Okovic C y Colaboradores afirman: que los quesos que se expenden al aire libre en forma ambulatorio y expuestos a la irradiación solar casi directa, pierden la humedad y por tanto provocan el endurecimiento del producto; condición donde la probabilidad de encontrar este microorganismo es nula. Alpas y Col., 1998 también hacen mención que la pérdida de viabilidad de *L. monocytogenes* se incrementa con el aumento de la presión, la temperatura y del tiempo.

Con la realización del presente estudio se comprobó que la prevalencia de este microorganismo en este tipo de alimento en el sector del mercado Iván Montenegro fue ausente. En relación a otros estudios realizados como el de Colombia en el 2006 en queso fresco en el Mercado Caqueza Cundinamarca encuentra un 13% de *Listeria monocytogenes*, en Perú (2003) se logra aislar en un 4%, Bolivia en el 2005 lo aísla en un 17%, y Chile en el 2013 con la realización de nuevas investigaciones la reporta con un 22%.

Observándose la diferencia que existe en lo que se refiere a presencia de esta bacteria en nuestro país resultando estos datos satisfactorios debido a la ausencia de *Listeria monocytogenes* en los quesos crudos elaborados artesanalmente y comercializados en el mercado Iván Montenegro, Nicaragua.

Sin embargo se logró aislar dos especies de *Listeria* no patógenas para el ser humano como *Listeria innocua* (3%) y *Listeria welshimeri* (2%) las cuales se identificaron mediante el empleo de la prueba Camp-Test y la Fermentación de Carbohidratos como Xilosa, Ramnosa y Manitol, es importante mencionar que ambas especies se han descrito como mesófilos, que funcionan en una amplia gama de temperatura las cuales oscilan entre 30°C a 37°C grados por lo que se lograron aislar en nuestro país. El empleo de las cepas controles *Listeria monocytogenes* ATCC-7644 y el lograr aislar dos de las especies de *Listeria*, nos indica que el método utilizado según la norma FDA-BAM es adecuada para el aislamiento de esta. Sin embargo por otra parte nos confirma que el queso consumido es inocuo para el microorganismo de interés. No obstante la evidencia encontrada de las dos especies, no descarta la probabilidad de que este producto en un futuro sea contaminado por *Listeria monocytogenes*; debido a que estas comparten el mismo hábitat y que el queso siempre será un vehículo potencial para el desarrollo de dicho microorganismo.

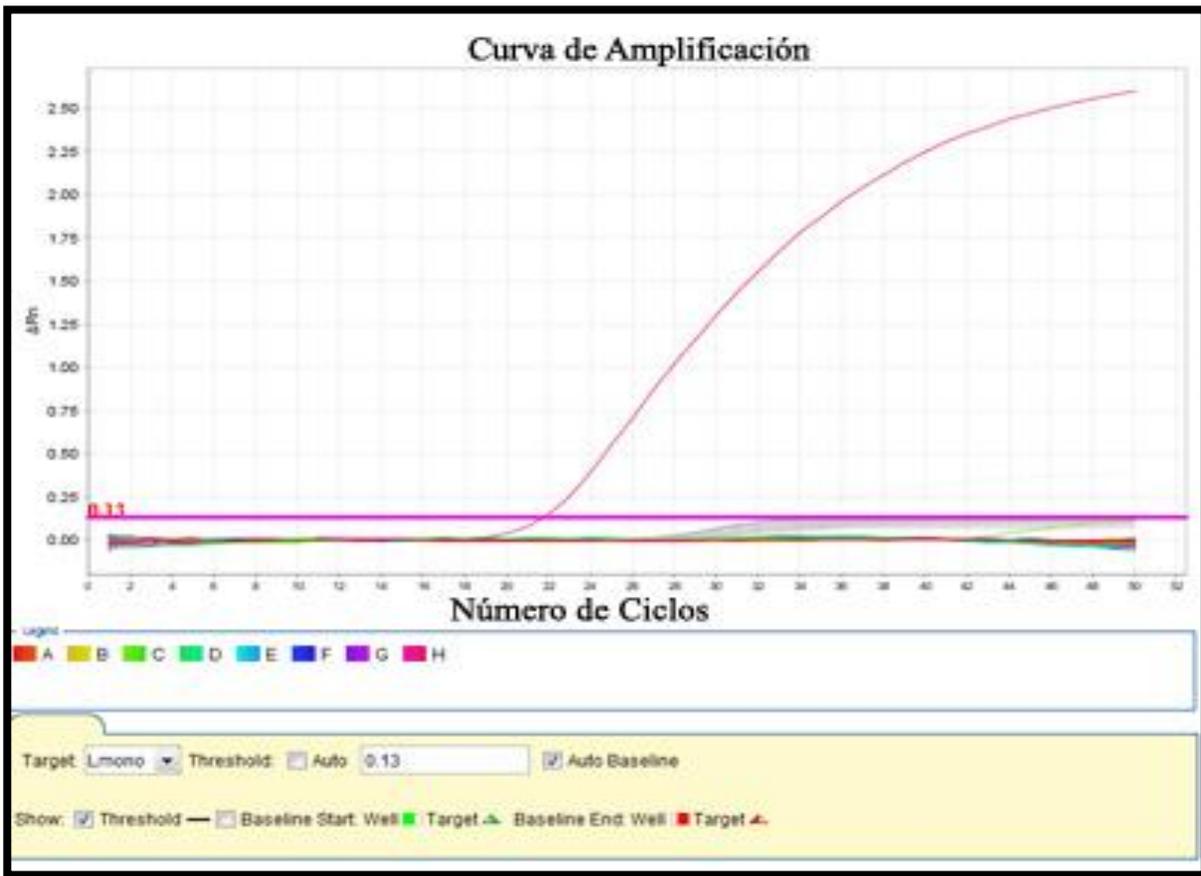
2. Detección de *Listeria monocytogenes* por PCR en Tiempo Real como prueba de tamizaje.

Debido a la tecnología que utiliza el PCR en Tiempo Real se reconoce como una valiosa herramienta en el análisis de muestras de alimentos gracias a su alta especificidad y sensibilidad; ya que brinda resultados confiables en un tiempo no mayor de 48 horas, lo que beneficia a las empresas privadas las cuales obtendrán resultados en menor tiempo y de igual manera al laboratorio, reduciendo el trabajo laborioso a diferencia del cultivo convencional que tiene una mayor duración (12 días) para el diagnóstico definitivo de *Listeria monocytogenes*.

Con la realización de este estudio logramos calcular solamente la Especificidad (100%) y el Valor Predictivo Negativo (100%) debido a la ausencia de *Listeria monocytogenes* en nuestra investigación. Un estudio similar fue realizado en San Jose Costa Rica en el año 2010 donde no detectaron por medio de esta técnica molecular la presencia de *Listeria monocytogenes* en quesos frescos artesanales encontrándose también un 100% de especificidad, permitiéndonos la PCR Tiempo Real para *Listeria monocytogenes* diferenciar los géneros bacterianos y las especies del mismo género. Esta alta especificidad también se corroboró con los resultados obtenidos en el aislamiento, cuando a nivel de cultivo se obtuvieron colonias con una morfología semejante a la de *L. monocytogenes* y que correspondieron bioquímicamente a *L. innocua* y *L. welshimeri*, pero la amplificación de las bandas específicas resultó negativa.

La implementación de la PCR Tiempo Real del Kit de Sondas Taqman para la detección de *Listeria monocytogenes* también es efectiva debido al uso de controles internos dentro de cada muestra así como también del uso de un control externo producto de una cepa de *Listeria monocytogenes* ATCC-7644. Siendo promisorio por lo tanto la implementación de esta técnica molecular como una valiosa alternativa para la detección de *Listeria monocytogenes* en alimentos, por su especificidad y rapidez, sobre todo a la hora de distribuir productos inocuos para el mercado consumidor (Ver **Grafico1**).

Grafica 1. Amplificación de las muestras de *Listerias monocytogenes* realizadas por PCR-Tiempo Real



Con respecto a los métodos de extracción utilizados: Núcleo Spin Tissue e Hidróxido de Sodio estos no fueron evaluados debido a la falta de positividad dentro de nuestro estudio.

X- CONCLUSIONES

- ✚ Se analizaron por medio del Método Estándar Internacional FDA-BAM, un total de 20 lotes (100 muestras) de queso fresco artesanal del Mercado Iván Montenegro, de las cuales todas las muestras resultaron negativas para el aislamiento de *Listeria monocytogenes* lo que correspondió al 100% del total de las muestras analizadas.
- ✚ En relación a la técnica de PCR en Tiempo Real para la detección de *Listeria monocytogenes* en queso fresco artesanal se obtuvo un 100% de muestras negativas.

XI- RECOMENDACIONES

CNDR-MINSA

- ✚ Implementar el uso del medio cromogénic *Listeria* para el aislamiento convencional ya que este recupera mejor colonias presuntamente sospechosas de *Listeria spp* y suprime mejor la flora competitiva.
- ✚ Realizar nuevos estudios de *Listeria monocytogenes* en quesos frescos artesanales expendidos en los diferentes Mercados del País para determinar la frecuencia de este microorganismo y de esta forma evaluar la Sensibilidad y el Valor Predictivo Positivo de esta prueba.
- ✚ Utilizar la técnica molecular PCR en Tiempo Real como prueba de tamizaje para la detección de *Listeria monocytogenes* en queso fresco artesanal.

XII- BIBLIOGRAFÍA

1. EFSA- European Union Summary Reports on Trends and Sources of Zoonoses, Zoonotic Agents and Food-borne Outbreaks in 2009 and 2010-specifically for the data on *Salmonella*, *Campylobacter*, verotoxigenic *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes* and foodborne outbreaks.
2. Posfay, K.M., Wald, E.R. (2009). Listeriosis. Aug; 14(4):228-33.
3. Cordano, A.M., Rocourt, J. (2006). Occurrence of *Listeria monocytogenes* in food in Chile. Int J Food Microbiol. Oct 22; 70(1-2):175-8. | CrossRef | PubMed.
4. Jawetz, E., Melnick, J., Aldelberg, E. (2011). Microbiología Médica, 25^a edición.
5. Roberts, A. K., Nightingale, G., Jeffers, E., Fortes, J. M. (2006.). Kongo and M. Wiedmann. Genetic and phenotypic characterization of *Listeria monocytogenes* lineage III. *Microbiology*
6. <http://www.cdc.gov/listeria/outbreaks/cheese>
7. Rivera, J.L. (2004) Rev. Perú. med. exp. Salud pública v.21 n.2 Lima abr./jun.
8. Arias, M.L., Chávez, C., Solano, G. (2010). Evaluación de la prueba de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en la detección e identificación de *Listeria monocytogenes* en queso fresco proveniente del Área Metropolitana de San José, Costa Rica. Centro de Investigación en Enfermedades Tropicales. Facultad de Microbiología, Universidad de Costa Rica.
9. Espada, A.M. (2007). Universidad lanza microbiología de los alimentos. INLASA.LA PAZ.

10. Baquero, Acuña, Deissy Milena., Bernal González Astrid Marcela, MSc. Campuzano Silvia. Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca. Presencia de *Listeria monocytogenes* en queso fresco artesanal, 2008.
11. S, Renato. (2013). Presencia de *Listeria monocytogenes* en leche cruda y quesos artesanales.
12. <http://www.saludymedicinas.com.mx/centros-de-salud/nutricion/consejosalimenticios/quesos-exquisita-fuente-de-proteinas-y-calcio>, 2006.html.
13. Espinoza, M.A., De La Torre, B. M., Salinas, F. Marianella., Sánchez, P. V. (2004). Determinación de *Listeria monocytogenes* en quesos frescos de producción artesanal que se expenden en los mercados del distrito de Ica, enero marzo 2003. Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública, vol. 21(núm. 2), 71-75.
14. M, Gelfand. (2006). Clinical manifestations and diagnosis of *Listeria monocytogenes* infection,
15. Del Potro, J. J., (2004) Rev. Perú. med. exp. Salud pública v.21 (n.2).
16. Murray, P.; Rosenthal, K.;Faller, Michael. (2009) Microbiología médica.
17. Koneman. (1996). Diagnóstico microbiológico: texto y atlas en color, Ed. Sexta, Pág. 733-735.
18. Schwartz, B., Hexter, D., Broome, C.V., et al: (1999). Investigation of an outbreak of listeriosis: New hypotheses for the etiology of epidemic *Listeria monocytogenes* infections. J InfectDis. 159:680.
19. Achenson, D. (2000). Foodborne Listeriosis, Clin infection Dis,31:770-775

20. Mirón, M., Feraz, S., Mellado, J.M., Vidal, F., Veloso, S. y Richard C. (2002). Coma vigil tras meningitis por *Listeria monocytogenes*, *Enferm. Infecc. Microbiol Clin*; 127-128.
21. Marín, Paul. [on line].París. Etat de la Listériose humaine en 2000 selon les données du CNR.2001, [http:// www.pasteur.fr/ externe](http://www.pasteur.fr/externe).
22. Pino, F. (2003). Universidad austral de chile listeriosis en chile.
23. Jawetz, E., Melnick, J., Adelber, E. *Microbiología médica*, 1996.
24. Payán, A., Astudillo, M. (1994). Listeriosis neonatal: ¿enfermedad poco frecuente o no diagnosticada? *Enfoque Microbiológico*, 25: 69-72.
25. Dubail, I., Berche, P. (2002). The European *Listeria* Genome Consortium and Charbit A. Listeriolysin O as a Reporter to Identify Constitutive and In Vivo-Inducible Promoters in the Pathogen *Listeria monocytogenes*, *Infect Immun*; 68: 3242.
26. Decatur, A.L., and Portnoy, D.A. (2000). Sequence in Listeriolysin O Essential for *Listeria monocytogenes* Pathogenicity, *Science*; 290: 992- 995.
27. A, J., Jiménez, A., Góngolas, M., Fernández, R. y Fernández, M.L. (2001). Infecciones por *Listeria monocytogenes* en el adulto. Aspectos clínicos y microbiológicos de una enfermedad cambiante, *Enferm Infecc Microbiol Clin*; 19: 297-303.
28. Ireton, K., Cossart, P. (1997) Host-Pathogen Interactions during Entry and Actin- Based movement of *Listeria monocytogenes*; *Annu Rev Genet*; 31: 113- 138.
29. EFSA-(2009) Scientific Opinion on the risk posed by pathogens in food of non- animal origin. Part I.

30. Cossart, P., Lecuit, M. (1998) Interactions of *Listeria monocytogenes* with mammalian cells during entry and actin-based movement: bacterial factors, cellular ligands and signaling, *EMBO*; 17: 3797-3806.
31. Cameron, L.A., Footer, M.J., Oudenaarden, A., Theriot, J.A. (1999) Motility of ActA protein-coated microspheres driven by actin polymerization, *Proc.Natl.Acad.Sci*; 196: 4908-4913.
32. Braun, L., Ghebrehwet, B., Cossart, P. (2006) gC1-R/p32, a C1q-binding protein, is a receptor for the InlB invasion protein of *Listeria monocytogenes*, *EMBO*; 19: 1458-1466.
33. Marquis, H., Goldfine, H., Portnoy, D.A. Proteolytic (1997). Pathways of Activation and Degradation of Bacterial Phospholipase C during Intracellular Infection by *Listeria monocytogenes*, *J Cell Biol*; 137: 1381-1392.
34. Hof, H., Nichterlein, T., Kretschmar, M. (1997). Management of Listeriosis, *Clin.Microbiol Rev*; 10: 345-357.
35. Calderón, V., et al. (2004). Manual de procedimientos bacteriología médica.
36. Landeta, R. (2009). Identificación pruebas bioquímicas de *Listeria monocytogenes* en alimentos, Chile.
37. International Organization for Standardization (2004), microbiologic of food animal feeding stuffs-horizontal method de detection and enumeration of *Listeria monocytogenes*.
38. Seeliger, H.P., Jones, D. (1986). Genus *Listeria* Pirie, in *Bergey's manual of systematic bacteriology*, PHA Sneath, Mair, N.S., Sharpe, M.E., Holt, J.G., Editors. Williams and Wilkins: Baltimore. pg. 1235-1245.
39. De prado, E. (2010). *Eppendorf & Real time PCR*. Eppendorf.

40. Diccionario Mediano Santa Inés. Básico Letra Grande. Una interesante gramática, un compendio ortográfico con ejemplos, verbos auxiliares y regulares. San Salvador, El Salvador C.A. Editorial Impresos Santa Inés.
41. Diccionario Manual de la Lengua Española Vox. © (2007). Larousse Editorial, S.L.nica
42. Liechti, H., Mendieta, D., Guzmán F., Lona R., Espinoza T., Cerna H., Machado J., García L., Mejía A., Soto Cl., Centeno M., Lanuza C., Lacayo C., Jerez P., Logo E., Guerrero S., (2006). Norma Técnica Obligatoria Nicaragüense (NTON-03-065-06).
43. Guerra, B. F. (2001). Caracterización de efectos inhibidores de *Listeria monocytogenes* producidos por microflora de maduración de queso. Rev port cien., 96 (538) 65-9.
44. Okovic, C., Sarquis, S., Martínez, B., Michanie, S. (1996). *Listeria monocytogenes* en quesos. Método rápido de hibridación de ADN. En: IV Congreso Latinoamericano de Microbiología e Higiene. Argentina.
45. Gardiner, L. (2005). Teoría de la evolución de la selección natural.
46. Vanegas, M. C., González, L. M., Martínez, A. J., Vives, H M. C., Arévalo, S. A. (2010). Acción bactericida de bacterias ácido lácticas contra *Listeria monocytogenes*.

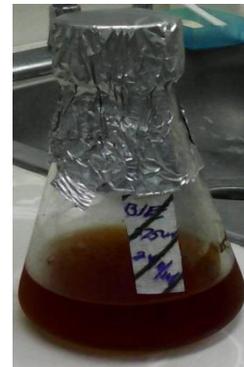
XVII- ANEXOS

ANEXOS 1: AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE MUESTRAS POSITIVAS PARA *LISTERIA SPP*

Pesaje de La Muestra



Medio de Enriquecimiento



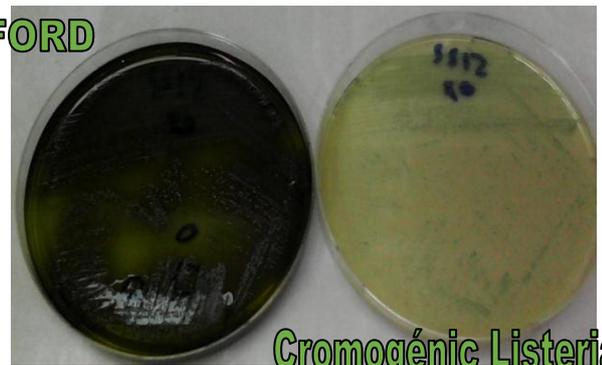
BLEB

Antibióticos utilizados



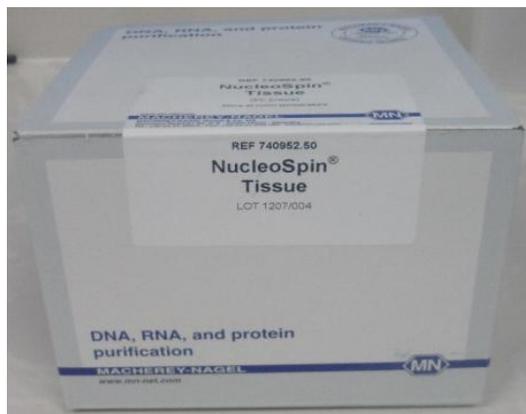
Medios Utilizados

OXFORD



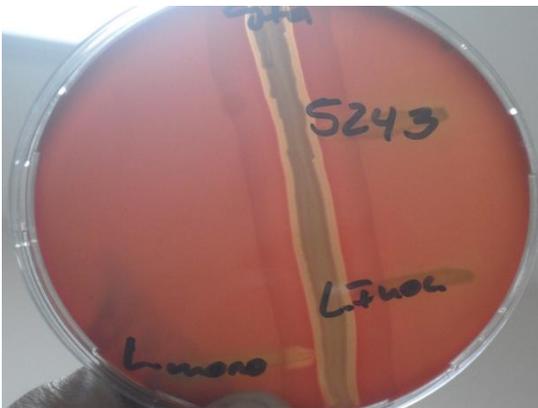
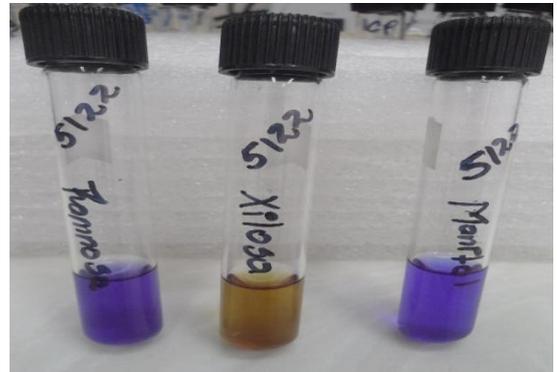
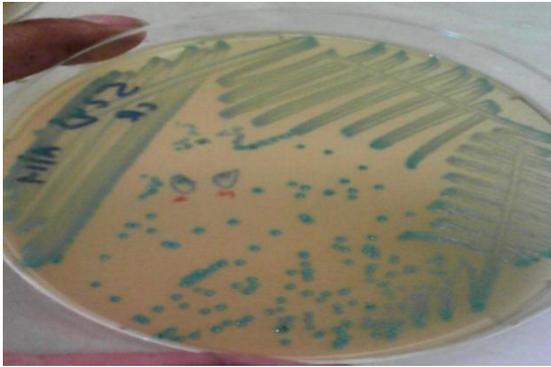
Cromogénic Listeria

Método de Extracción

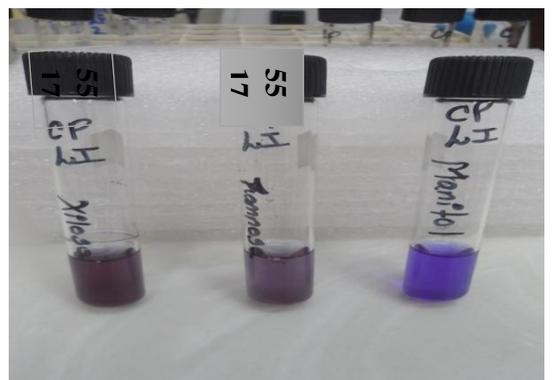
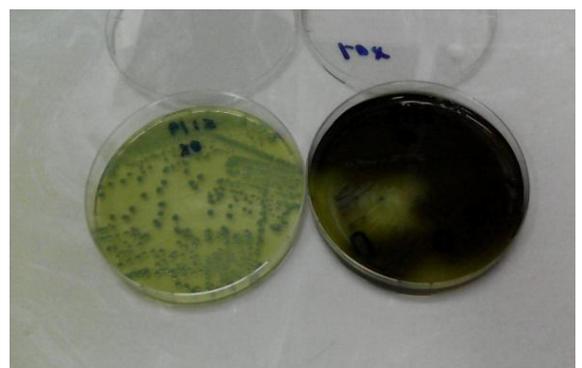
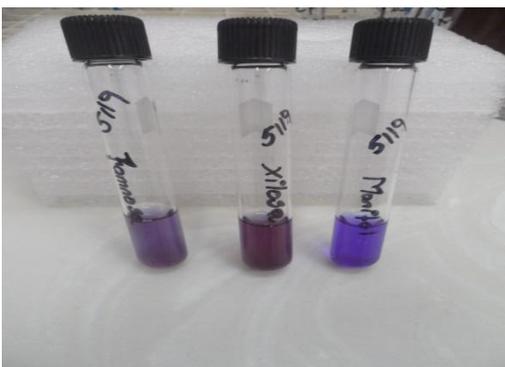


ASC

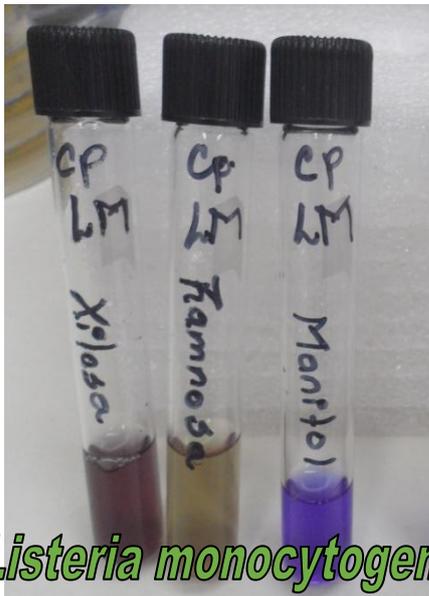
Listeria welshimeri



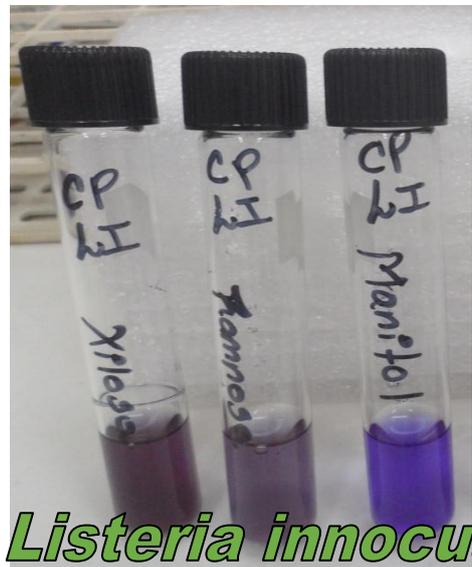
Listeria innocua



Cepas Control

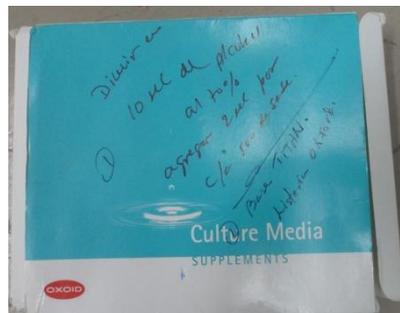
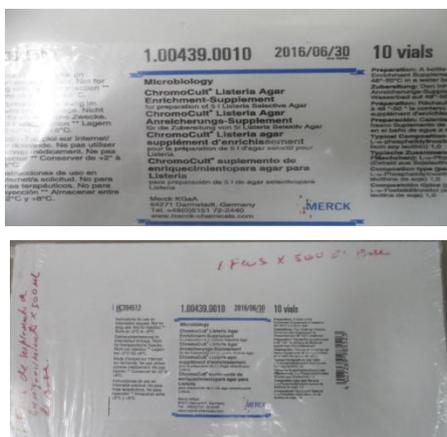
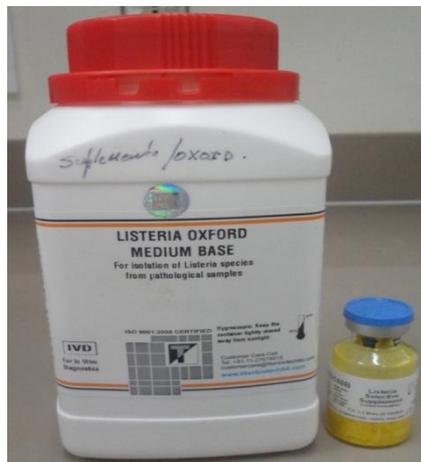
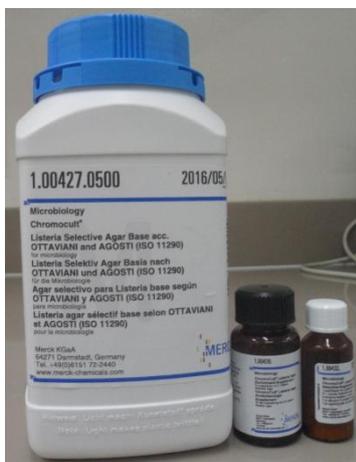


Listeria monocytogenes



Listeria innocua

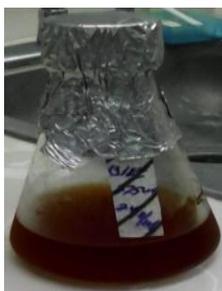
Preparación de Medios



Anexo 2: Detección de *Listeria monocytogenes* por PCR en Tiempo Real.

Protocolo para la reparación de muestras de DNA para cultivos de bacterias

HIDRÓXIDO DE SODIO



Caldo de enriquecimiento



Pipetear 1 ml en un tubo tapón de rosca / microcentrífuga

Centrifugar 5 minutos a 1200 g

Resuspender agregando 100 μ l de NaOH 25 mmol

dejar reposar por 10 min

Incubar a 99 °C por 10 minutos

Centrifugar 5 minutos a 1200g

Agregar 100 μ l tris/hcl 80 mmol y mezclar

Centrifugar 5 minutos a 12000 g

Utilizar el sobrenadante para la realización del PCR

EXTRACCIÓN DE ADN NUCLEOSPIN[®] TISSUE

1. Preparación de la muestra



- Dispensar un 1 ml a partir del medio de enriquecimiento BLEB
- Centrifugar...

2. Pre lisis de la muestra



- Resuspender el sedimento en 180 μ l de T1
- Añadir 25 μ l de proteinasa K.
- Incubar a 56° C durante 2 h.

3. Lisis de muestra



- Añadir 200 μ l de B3
- Incubar a 70°C durante 10 minutos.

4. Ajustar las condiciones de unión de ADN



- Añadir 210 μ l de etanol (96 - 100%)

5. Union ADN



- Coloque una columna NucleoSpin[®] Tissue en un tubo.
- Centrifugar durante 1 min a 11.000 x g, descartar filtrado.

6. Lavados



- 1^{er}lavado: Añadir 500 μ l Buffer BW.



- Centrifugar durante 1 min a 11.000 x g, descartar el filtrado.



- 2^{do}lavado: - Añadir 600 μ l de buffer B5 a la columna.



- Centrifugar durante 1 min a 11.000 x g, descartar el filtrado.

7. Secar membrana



- Se centrifuga la columna durante 1 min a 11.000 x g.



8. ADN altamente puro.

- Colocar la columna NucleoSpin[®] Tissue en un tubo de microcentrifuga.



- Añadir 100 μ l Buffer BE precalentado a 70 ° C.

- Incubar a temperatura ambiente durante 1 min. Centrifugar 1 min a 11.000 x g.

Equipos Utilizados



Lector de PCR



Termomixer



Centrifugadora

Tabla 1: Aislamiento de *Listeria monocytogenes* en queso fresco artesanal

	<i>Listeria monocytogenes</i>	<i>Listeria spp</i>
Negativo	100%	95%
Positivo	0%	5%
total	100%	100%

Tabla 2: Detección de *Listeria monocytogenes* por PCR en Tiempo Real

	Positivos	Negativos	Total
Positivos	0	0	0
Negativos	0	100	100
Total	0	100	100

	Porcentaje
Especificidad (%)	100%
Valor Predictivo Negativo (%)	100%

Norma Técnica Obligatoria Nicaragüense (NTON-03-065-06)

Requisitos microbiológicos

Microorganismos	n(1)	n(2)	m(3)	M(4)
<i>Staphylococcus aureus</i> , UFC/cm ³	5	1	10 ²	10 ³
Coliformes totales, UFC/cm ³	5	2	200	500
Coliformes fecales, UFC/cm ³	5	1	10	10
<i>Escherichia coli</i> , UFC/cm ³	5	0	0	0
<i>Listeria monocytogenes</i> en 25gramos	5	0	Ausencia	Ausencia
<i>Salmonella</i> en 25 gramos	5	0	Ausencia	Ausencia

- (1) **n**: número de muestras que deben analizarse.
- (2) **c**: número de muestras que se permite que tengan un recuento mayor que m pero no mayor que M.
- (3) **m**: Recuento máximo recomendado.
- (4) **M**: Recuento máximo permitido.

Anexo 4: Cálculo para el tamaño y selección de la muestra.

The screenshot shows the EPIDAT 3.0 interface with a dialog box titled "Tamaños de muestra y precisión para estimación de una proporción poblacional". The dialog is divided into "Datos y resultados" and "Calcular" sections.

Datos y resultados:

- Tamaño poblacional: 117
- Proporción esperada (%): 15.000
- Nivel de confianza (%): 95.0
- Efecto de diseño: 1.0

Calcular:

- Tamaño de muestra
- Precisión
- Precisión absoluta (%):
 - Mínimo: 1.000
 - Máximo: 3.000
 - Incremento: 2.000

Resultado de la muestra:

Precisión (%)	Tamaño de muestra
1.000	115
3.000	97

Muestreo simple aleatorio dialog:

Archivo de trabajo: [] Tamaño poblacional: 117
Tamaño de muestra: 100

1	2	3	4	6	7	8
9	10	11	13	14	15	16
17	18	19	21	22	24	25
26	27	28	30	31	32	33
34	35	36	37	38	39	41
43	44	45	47	48	49	50
51	52	53	54	55	56	57
58	59	60	61	64	65	66
67	68	70	71	72	73	74
75	77	78	79	80	81	82
83	84	85	86	88	90	91

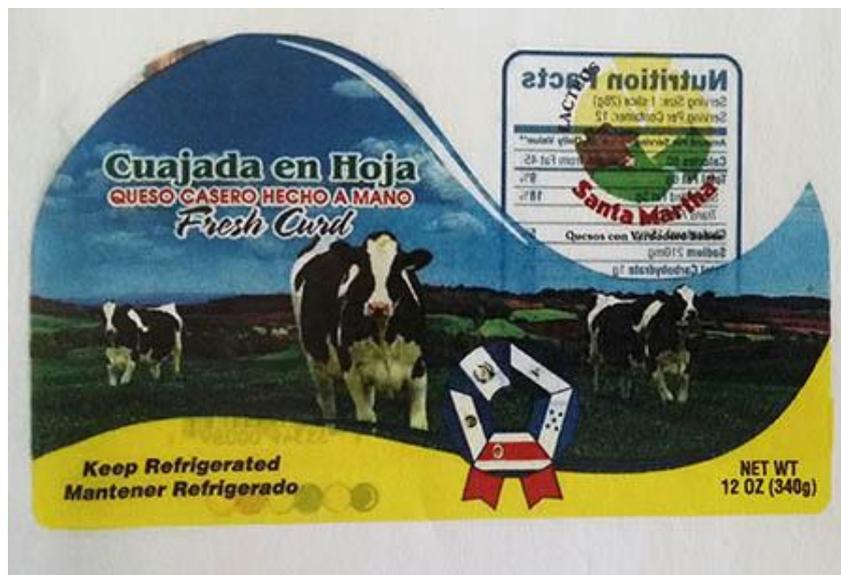
Anexos 3: Mezcla de PCR en Tiempo Real para *Listeria monocytogenes*

Listeria monocytogenes

Volumen total	Reacción ul	[]
Faststar applied Biosystem	5	1x
10x Exo control interno positivo	1	1x
50x Exo DNA CIP	0.2	1x
Primer 50 LMrt3F	0.6	0.4
Primer 51LMrt3R	0.6	0.4
Sonda Listp 10um	0.4	0.25
Agua	1.2	
Muestra	1	
Total	10ul	

Novel de PCR en Tiempo Real basado en el método de detección de *Listeria monocytogenes* en alimentos K. aravcova, T. Kuchta y Kadi Kova.

Productos de Origen Hispano Implicados en Brotes de *Listeria monocytogenes*



GLOSARIO

Aerobio: adj. biol. Dic. Del organismo que necesita oxígeno libre en el medio ambiente para subsistir.

Abrupta: adj. Escarpado.

Anaerobio: *m.* BIOL. Microorganismo que es capaz de vivir sin la presencia de oxígeno libre. Proceso que se desarrolla con ausencia total de oxígeno, como la fermentación.

Ataxia: *f.* Calma, tranquilidad, moral.

Biopelícula: Es un ecosistema microbiano organizado, conformado por uno o varios microorganismos asociados a una superficie viva o inerte, con características funcionales y estructuras complejas.

Circunscrito: Reducido a cierto límite.

Dorsalgia: Llamamos dorsalgia al cuadro de dolor situado en la región dorsal o torácica, de causa variable.

Escinde: Dividir, separar.

Extracción ADN: Constituye la primera etapa de la mayoría de los estudios de biología molecular y de todas las técnicas de recombinación de ADN. Permiten obtener ácidos nucleicos purificados a partir de diversas fuentes para después realizar análisis específicos de modificaciones genéticas mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

Filogenética: Se ocupa de determinar la filogenia, y consiste en el estudio de las relaciones evolutivas entre diferentes grupos de organismos, utilizando matrices de información de moléculas de ADN y de morfología.

Fluorescencia: La fluorescencia es un tipo particular de luminiscencia, que caracteriza a las sustancias que son capaces de absorber energía en forma de radiaciones electromagnéticas y luego emitir parte de esa energía en forma de radiación electromagnética de longitud de onda diferente.

Fungirá: Actuar, funcionar, desempeñar un cargo.

Gelsolina: f. Proteína globular, encontrada en macrófagos y amebas, que impide la polimerización de los filamentos de actina, convirtiendo el citoplasma celular de estado *Gel* a estado *sol* y, por tanto, haciendo más fluido el citoplasma celular.

Hemiparesia: Se refiere a la disminución de la fuerza motora o parálisis parcial que afecta un brazo y una pierna del mismo lado del cuerpo. Es la consecuencia de una lesión cerebral, normalmente producida por una falta de oxígeno en el cerebro.

Miliar: *adj.* Del tamaño o forma de un grano de mijo.

Mureina: Péptido glucano que contiene ácido mesodiamino pimélico que se encuentra fijo a la membrana celular por el ácido teicoico y el ácido lipoteicoico presentes en la membrana celular.

Pate: *s. m.* Pasta comestible hecha de carne o hígado picados y condimentados, especialmente de pato, cerdo o pescado.

Promisorio: *adj.* Que conlleva una promesa.

Rinitis: *s. f.* Inflamación de la mucosa nasal.

Sideroforos: Es un compuesto quelante de hierro secretado por microorganismos.

Sonda: Fragmento de ADN de pequeño tamaño, usado en biología molecular como herramienta para detectar la presencia de ADN o ARN de secuencia complementaria parecida o igual. Marcadas con dos tipos de fluorocromos, un donador y un aceptor.

ABREVIATURAS

ADN: Acido desoxiribonucleico.

ADF: Factor Despolimerizador de Actina.

AOAC: Asociación Oficial de Químicos Analítica.

BLEB: Buferd *Listeria* enriquecimiento.

Ct: Nivel umbral(Threshold cycle).

dNTPs: Dinucleotidos trifosfatado.

FDA: Administración de Drogas y Alimento de los Estados Unidos.

FSIS: Servicio de Inspeccion y Seguridad Alimentaria.

IC: Control Interno.

LLO: Listeriolisina O.

LPM: Litio/feniletanol/moxalactam.

Mpl: Metaloproteasa.

PI-PLC: fosfotidilinositol fosfolipasa C específica.

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa

RFLP: Análisis de Polimorfismo de Longitud de los fragmentos de Restricción.

Spp: Especies.

USDA: Departamento de Agricultura de los Estados Unidos.