

UNIVERSIDAD DE COSTA RICA
SISTEMA DE ESTUDIOS DE POSGRADO

VALIDACIÓN DE UNA TÉCNICA DE DETECCIÓN PARA *Listeria monocytogenes* EN LECHE, EMBUTIDOS Y QUESO MEDIANTE LA IMPLEMENTACIÓN DE PCR PUNTO FINAL BASADO EN LOS PARES DE INICIADORES LM8, LM13 Y LM20.

Tesis sometida a la consideración del Programa de Estudios de Posgrado en Microbiología y Química Clínica para optar al grado y título de Maestría Académica en Microbiología y Química Clínica

FABIOLA JIMÉNEZ RODRÍGUEZ

Ciudad Universitaria Rodrigo Facio, Costa Rica

2019

Dedicatoria

A mi familia que me ha brindado su apoyo incondicional en este y todos mis proyectos: mis padres Edwin y Pilar, mi esposo Fernando y mi hermana Melisa. Mi gratitud por estar presentes en cada uno de mis momentos más importantes.

Un agradecimiento especial a quienes me brindaron su ayuda con la materialización de este proyecto: a la Comisión de Investigación de UCIMED encabezada por el Dr. Misael Chinchilla, a la Dra. María Alejandra Vethencourt, al Dr. Julio Mora, a la Dra. Ana León del Laboratorio Clínico de UCIMED, a los Doctores Jason Vieto y Angélica Espinoza que en su momento colaboraron como asistentes en la primera parte y a las estudiantes María José Acevedo, María Paula Rodríguez y Marialex Miranda que han estado colaborando en los últimos tiempos.

De forma especial agradezco a mi tutora la Dra. María Laura Arias y a mis lectores, el Dr. Mauricio Redondo y al Dr. Adrián Avendaño por todo el apoyo y el aporte que me han dado para la presentación de este trabajo.

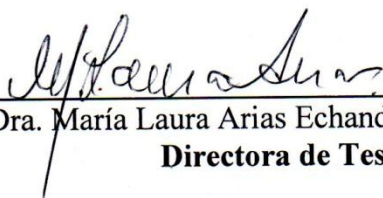
Y a todas las personas que a lo largo del tiempo me han apoyado en este proceso. Sería ambicioso poner todos los nombres y pecaría por dejar a alguien por fuera, todos ellos saben quiénes son y en algún momento se los he hecho o se los haré saber.

A Dios que empujó muchas veces mi pensamiento cuando las ideas se perdían vanamente entre las horas y los días y llenó mi camino de personas bondadosas.


“Esta tesis fue aceptada por la Comisión del Programa de Estudios de Posgrado en Microbiología y Química Clínica de la Universidad de Costa Rica, como requisito parcial para optar al grado y título de Maestría Académica en Microbiología y Química Clínica”




Dr. Max Chavarría Vargas PhD.
**Decano o Representante del Decano
Sistema de Estudios de Posgrado**



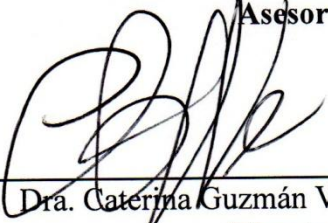
Dra. María Laura Arias Echandi MSc. M.Q.C
Directora de Tesis



Dr. Mauricio Redondo Solano PhD. M.Q.C
Asesor

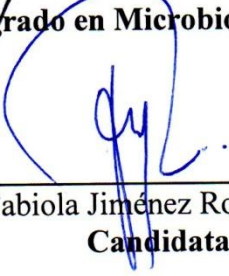


Dr. Adrián Avendaño López MSc. M.Q.C
Asesor



Dra. Caterina Guzmán Verri PhD. M.Q.C
Director

Programa de Posgrado en Microbiología y Química Clínica



Fabiola Jiménez Rodríguez
Candidata

Tabla de contenido

Dedicatoria	II
Resumen	V
Abstract	VI
Lista de Cuadros	VII
Lista de Figuras	VIII
Lista de abreviaturas	X
Marco Teórico	1
Hipótesis	16
Objetivo General	16
Objetivos Específicos	16
Materiales y métodos	19
Resultados	30
Discusión	48
Conclusiones	65
Referencias	66

Resumen

Listeria es un género que se puede ubicar en muchos sitios como suelo, agua no tratada, superficies, etc. En este género sobresale *Listeria monocytogenes* como un patógeno de transmisión alimentaria de importancia en la industria que afecta principalmente a pacientes inmunosuprimidos. Su detección resulta fundamental en la industria de alimentos y las técnicas tradicionales requieren de varios días para su consecución, por esta razón ha ido cobrando relevancia el desarrollo de metodologías que permiten tener resultados en menos tiempo como las técnicas basadas en biología molecular que utilizan la detección de ácidos nucleicos del patógeno. A partir de tres pares de iniciadores, Lm8, Lm13 y Lm20, descritos por Tao y colaboradores (2015) se realizaron pruebas para evaluar la eficiencia de estos en la detección de *Listeria monocytogenes* en queso, embutido y leche luego de incubarse en caldo BLEB. Se realizaron pruebas que confirmaron como los tres iniciadores amplificaron el ADN de *Listeria monocytogenes*, siendo Lm20 el más específico al generar más productos detectables en el análisis electroforético luego de 24 horas de incubación en enriquecimiento selectivo. A partir de estos resultados se propuso una técnica mediante la cual se utiliza un PCR luego de ese tiempo y se valida. En este procedimiento se observan resultados distintos esperados: con una especificidad de 60% para la leche, 70% para salchicha y 10% para queso; sensibilidad de 90% para leche, 80% para salchicha y 100% para queso. La exactitud relativa de la matriz leche y de salchicha fue de 75 mientras que la de queso fue de 55 y un índice de concordancia de Kappan de 0,6 para leche y salchicha y 0,4 para queso. Esto puede explicarse por la competencia de *L.monocytogenes* con los otros microorganismos agregados en la validación, generando un crecimiento poblacional menor al cultivo puro en su condición inicial, en combinación con la interferencia de ciertos componentes en las matrices y medios de cultivo que inhibieron a la enzima Taq-polimerasa. En la validación, la matriz con mejores resultados fue la leche y el queso presentó mayores discrepancias. Se hace una prueba de recuperación de *Listeria monocytogenes* (inoculada como cultivo puro) a lo largo de 12 días. En este ensayo se observó que los mejores resultados se obtuvieron en la matriz leche y por otro lado, la matriz queso presentó problemas para la recuperación en el tiempo. Se concluyó que hay matrices alimentarias complejas con problemas para implementar técnicas de biología molecular para la detección de patógenos.

Abstract

Listeria genus can be located in many places such as soil, untreated water, surfaces, etc. given its biochemical capacities and its environmental resistance. The detection of this bacteria is essential in the food industry because it can affect immunosuppressed patients, event though traditional techniques require several days; for this reason the development of new molecular techniques of detection has been increasingly important. Tao and collaborators (2015) evaluated the use of three primers, Lm8, Lm13 and Lm20 for the detection of this bacteria in milk. Those results are the base to analyze the efficiency of these primers in the detection of *Listeria monocytogenes* in cheese, sausage and milk after incubation in BLEB broth. Tests are carried out confirming that the three primers amplify the DNA of *Listeria monocytogenes*; LM20 had more specific results and it generated more detectable products in the electrophoresis gel after 24 hours of incubation in selective enrichment. From these results we propose a technique for the detection of *L.monocytogenes* in milk, sausage and cheese with PCR. . In this procedure it is observed that the results are not expected:with a specificity of 60% for milk, 70% for sausage and 10% for cheese; sensitivity of 90% for milk, 80% for sausage and 100% for cheese, the relative accuracy of the milk and sausage matrix was 75 while the cheese was 55 and a Kappan concordance index of 0.6 for milk and sausage and 0.4 for cheese. This can be explained by the competition of *L. monocytogenes* with the other microorganisms present during the validation. Also, the presence of certain components in the matrices and culture media could inhibited the enzyme Taq-polymerase. In the validation, the matrix that has the best results is milk and cheese is the most problematic. A test of recovery of *Listeria monocytogenes* over 12 days has been done and it was observed that the best results are found in the milk matrix and cheese is the one that presents more problems for recovery over time. It is concluded that there are food matrices that can give problems for molecular biology techniques in the detection of pathogens.

Lista de Cuadros

Cuadros	Página
Cuadro 1: Secuencia e información sobre proteína expresada de los pares de iniciadores Lm8, Lm13 y LM20 utilizados por Tao y colaboradores (2015)	17
Cuadro 2. Listado de microorganismos que fueron utilizados como competencia para <i>Listeria monocytogenes</i> en los ensayos de validación.	19
Cuadro 3: Esquema de inoculación de réplicas de las muestras de leche, queso y salchicha para la validación de la determinación de la presencia de <i>Listeria monocytogenes</i> en estos alimentos por PCR utilizando el iniciador Lm20 luego de 24 horas de incubación en caldo BLEB.	19
Cuadro 4: Recuentos de los inóculos de cada una de las especies bacterianas agregados a los 25 gramos o mililitros a las réplicas de las matrices de leche, salchicha y queso para el ensayo de validación de la técnica propuesta	21
Cuadro 5: Cuadro de tabulación de los resultados obtenidos en la validación para los cálculos de los parámetros a evaluar	26
Cuadro 6: Comparación de los resultados obtenidos al realizar la extracción de ADN de <i>Listeria monocytogenes</i> complementando el procedimiento del kit Nucleo Spin Tissue- Machery-Nagel con un paso previo de reacción con lisozima diluida en agua, en amortiguador Tris-HCl y sin utilizar esta enzima	29
Cuadro 7. Parámetros de validación obtenidos para la detección de <i>Listeria monocytogenes</i> en leche utilizando PCR con el iniciador Lm20 luego de 24 horas de incubación en enriquecimiento selectivo en caldo BLEB	38
Cuadro 8. Parámetros de validación obtenidos para la detección de <i>Listeria monocytogenes</i> en salchicha utilizando PCR con el iniciador Lm20 luego de 24 horas de incubación en enriquecimiento selectivo en caldo BLEB	38
Cuadro 9. Parámetros de validación obtenidos para la detección de <i>Listeria monocytogenes</i> en queso utilizando PCR con el iniciador Lm20 luego de 24 horas de incubación en enriquecimiento selectivo en caldo BLEB	38
Cuadro 10. Resultado del análisis de resencia/ausencia de <i>Listeria monocytogenes</i> por el método de referencia (BAM-FDA 2018)	39
Cuadro 11. Volúmenes y concentraciones de reactivos utilizados para la reacción de PCR en la amplificación con los pares de iniciadores Lm8, Lm13 y Lm8.	43
Cuadro 12. Composición del caldo buferizado enriquecido para <i>Listeria</i>	44
Cuadro 13. Comparación de los resultados de los parámetros de validación de técnicas de detección de <i>Listeria monocytogenes</i> mediante PCR punto final	62
Cuadro 14. Comparación de los resultados de los parámetros de	63

validación de técnicas de detección de <i>Listeria monocytogenes</i> mediante PCR tiempo real.	
--	--

Lista de Figuras

Figuras	Página
Figura 1. Electroforesis en gel de agarosa al 1,5% del PCR en amortiguador TBE obtenido a partir del ADN extraído de <i>Listeria monocytogenes</i> con el iniciador Lm 20 al estandarizar el protocolo de Tao y colaboradores (2015).	25
Figura 2. Electroforesis en gel de agarosa al 1% del PCR en amortiguador TBE obtenido a partir del ADN extraído de <i>Listeria monocytogenes</i> (con lisozima y sin lisozima en el proceso de extracción) con el iniciador Lm 20).	26
Figura 3 Electroforesis en gel de agarosa al 1% del PCR en amortiguador TBE obtenido a partir del ADN extraído de <i>Listeria monocytogenes</i> (con lisozima y sin lisozima en el proceso de extracción) con el iniciador Lm 13).	26
Figura 4. Electroforesis en gel de agarosa al 1% del PCR en amortiguador TBE obtenido a partir del ADN extraído de <i>Listeria monocytogenes</i> (con lisozima y sin lisozima en el proceso de extracción) con el iniciador Lm 8).	27
Figura 5 Electroforesis en gel de agarosa al 1% en amortiguador TBE obtenido a partir del PCR de varias concentraciones de ADN de <i>Listeria monocytogenes</i> con los pares de iniciadores Lm20 (A), Lm 13 (B) y Lm 8 (C).	28
Figura 6. Electroforesis en gel de agarosa al 1% en amortiguador TBE obtenido a partir del PCR del ADN extraído a partir de varias diluciones de una suspensión 0,5 Mc Farland de <i>Listeria monocytogenes</i> con los pares de iniciadores Lm20, Lm 13 y Lm 8.	29
Figura 7. Electroforesis de agarosa al 1% en amortiguador TBE del ADN obtenidos del PCR a partir de cultivos de varias bacterias y los pares de iniciadores Lm20, Lm13 y Lm8.	30
Figura 8. Electroforesis de agarosa al 1% en amortiguador TBE del ADN obtenido del PCR a partir de caldo BLEB inoculado con diluciones decimales de <i>Listeria monocytogenes</i> luego de 48 horas a 35°C.	31
Figura 9. Electroforesis de agarosa al 1% en amortiguador TBE de ADN obtenido mediante amplificación de los pares de iniciadores Lm8, Lm 13 y Lm20 a partir de ADN extraído del caldo BLEB inoculado con leche de 48 horas de incubación.	32
Figura 10 Electroforesis de agarosa al 1% en amortiguador TBE de ADN amplificado mediante los pares de iniciadores Lm8, Lm 13 y Lm20 a partir del ADN extraído del caldo BLEB inoculado con salchicha a 48 horas de incubación	32
Figura 11. Electroforesis de agarosa al 1% en amortiguador TBE de	33

ADN amplificado con los pares de iniciadores Lm8, Lm 13 y Lm20 a partir del ADN extraído del caldo BLEB inoculado con queso	
Figura 12. Electroforesis de agarosa al 1% en amortiguador TBE de ADN amplificado con los pares de iniciadores Lm8, Lm 13 y Lm20 a partir del ADN extraído del caldo BLEB con leche a inóculos bajo, medio y alto luego de 12, 24 y 36 horas de incubación.	34
Figura 13. Electroforesis de agarosa al 1% en amortiguador TBE de ADN amplificado con los pares de iniciadores Lm8, Lm 13 y Lm20 a partir del ADN extraído del caldo BLEB inoculado con salchicha, inóculo bajo, medio y alto luego de 12, 24 y 36 horas de incubación.	35
Figura 14. Electroforesis de agarosa al 1% en amortiguador TBE de ADN amplificado con los pares de iniciadores Lm8, Lm 13 y Lm20 a partir del ADN extraído del caldo BLEB inoculado con queso, inóculos bajo, medio y alto luego de 12, 24 y 36 horas de incubación.	36
Figura 15. Electroforesis de agarosa al 1% en amortiguador TBE de ADN amplificado con el iniciador Lm20 a partir del ADN extraído del caldo BLEB durante la validación de la técnica para la detección de <i>Listeria monocytogenes</i> en la matriz leche.	37
Figura 16. Electroforesis de agarosa al 1% en amortiguador TBE de ADN amplificado con el iniciador Lm20, a partir de ADN extraído de caldo BLEB en validación de técnica para la detección de <i>Listeria monocytogenes</i> en la matriz salchicha.	37
Figura 17. Electroforesis de agarosa al 1% en amortiguador TBE de ADN amplificado mediante el iniciador Lm20 a partir de ADN extraído del caldo BLEB en validación de técnica para la detección de <i>Listeria monocytogenes</i> en matriz queso.	37
Figura 18. Electroforesis de agarosa al 1% en amortiguador TBE de ADN amplificado con iniciador Lm20 a partir de ADN extraído del caldo BLEB en la prueba de detección de <i>Listeria monocytogenes</i> durante 12 días en las matrices leche, salchicha y queso.	40

Lista de abreviaturas

ADN	Ácido Desoxirribonucleico
ARN	Ácido ribonucleico
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero
AOAC	Asociación de Químicos Analíticos Oficiales
aW	Actividad del agua
BAM	Manual de Bacteriología Analítica
BLEB	Caldo Listeria enriquecido y buferizado
°C	Grados centígrados
EPA	Agencia de Protección Ambiental
FDA	Administración de Drogas y Alimentos
FEM	Foro de Mediciones Ambientales
H ₂ S	Sulfuro de Hidrógeno
ISO	Organización Internacional de Estandarización
LAMP	Amplificación isotérmica mediada por bucle
Log UFC	Logaritmo decimal de Unidades Formadoras de Colonias
mm	Milímetros
NASBA	Amplificación de ácidos nucleicos basada en secuencia
NGS	Secuenciación de nueva generación
OMA	Métodos Oficiales de Análisis
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
pH	Potencial de hidrógeno
TBE	Tris borato EDTA (ácido etilendiaminotetracético)

Marco Teórico

Listeria monocytogenes es un microorganismo pocas veces relacionado con patologías, no obstante es capaz de producir cuadros clínicos que incluso llegan a comprometer la vida de los pacientes afectados. *L. monocytogenes*, es una bacteria intracelular facultativa, bacilo corto, Gram positiva vinculada con infecciones en seres humanos y animales, entre éstas sobresalen las del sistema nervioso central afectando a pacientes de grupos como neonatos, mujeres embarazadas e inmunosupresos (Drevets & Bronze 2008). Fue descrita inicialmente en la década de 1920 por dos equipos de trabajo que la aislaron de diferentes animales, uno fue el encabezado por Murray, el cual en 1926 la denominó *Bacterium monocytogenes*, pues presentaba un cuadro clínico muy similar a la mononucleosis. Pirie y sus colaboradores la aislaron en 1927 y la nombraron *Listerella hepatolytica*, en honor a Joseph Lister. Cuando se evidenció que los dos hallazgos eran del mismo microorganismo, se llamó primero *Listerella monocytogenes*, luego *Listeria monocytogenes*, pues dicho nombre había sido utilizado previamente para un moho y un protozoario (Ryser & Donnelly 2015).

Listeria monocytogenes empieza a ser considerado un patógeno de transmisión alimentaria de importancia a partir de la década de 1980, cuando en el año 1983 en Canadá se informa el primer brote bien documentado producido por este microorganismo (Välilmaa *et al.* 2015). La emergencia de esta bacteria como patógeno se ha explicado por el aumento en la población de personas inmunosuprimidas, los cambios en los hábitos alimenticios y en las nuevas tecnologías de diagnóstico de enfermedades (Ryser & Buchanam 2013).

El género *Listeria* incluye 17 especies y de estas, tres se clasifican como hemolíticas (*L. monocytogenes*, *L. ivanovii* y *L. seeligeri*). *L. monocytogenes* ha sido relacionada con patología principalmente en seres humanos mientras que *L. ivanovii* se relaciona con enfermedad en animales; el resto de especies son no hemolíticas e incluyen especies como *L. innocua*, *L. welshimeri*, *L. grayi*, *L. rocourtii*, y *L. marthii*. Las bacterias de este género se encuentran en una gran cantidad de ambientes como suelos, aguas superficiales, vegetación, heces de animales, ambientes de granjas, plantas procesadoras de alimentos, entre otros (Korsak & Szuplewska 2016, Sauders *et al.*, 2012, Orsi & Wiedmann 2016). Esto ha hecho

pensar que este género tiene un estilo de vida saprófito y que a partir del suelo puede llegar a transmitirse después a animales y seres humanos. Esta persistencia se explica por la viabilidad de las bacterias en ambientes estresantes con bajo aW, un amplio rango de pH (4,4 a 9,6) y de temperatura (1 a 45°C) (Ryser & Donnelly 2015, NicAogáin & O'Byrne 2016). Además, en el ambiente, algunas especies como *Listeria monocytogenes* puede formar biopelículas que les permiten tolerar sustancias antimicrobianas, sanitizantes y desinfectantes (Välímää *et al.* 2015).

L.monocytogenes y *L.ivanovii* se han relacionado con patologías en animales tanto aves como mamíferos y tienen una importancia especial los animales de compañía y aquellos utilizados para la producción de alimentos para consumo humano. Algunos rumiantes pueden ser portadores asintomáticos de *L.monocytogenes* y secretar la bacteria a través de la leche, esta es la razón por la cual este microorganismo se ha relacionado con productos lácteos (Ryser & Donnelly 2015).

Listeria monocytogenes produce en seres humanos dos tipos de cuadros clínicos con síntomas y tiempos de incubación diferentes. Uno de estos cuadros puede ser no invasivo y agudo y desarrollan una gastroenteritis febril con un periodo de incubación de 9 a 36 horas (Ryser & Buchanam 2013, Ryser & Donnelly 2015, Orsi & Wedmann 2016). El otro síndrome es un cuadro invasivo que se presenta entre 11 a 70 días después de ingerir el patógeno, generalmente en pacientes con algún tipo de inmunosupresión y se puede manifestar como bacteremia, meningitis y meningoencefalitis principalmente, aunque también con menor frecuencia se ha asociado con endocarditis, artritis séptica, osteomielitis y peritonitis. En este último caso, por la capacidad que tiene *L.monocytogenes* de pasar la barrera placentaria también se asocia con abortos e infecciones fetales (Hernandez-Milian & Payeras-Cifre 2014, Ryser & Donnelly 2015, Orsi & Wedmann 2016).

Los cuadros relacionados con *L. monocytogenes* se adquieren al ingerir alimentos contaminados con la bacteria. Con respecto a esto, las granjas de animales y los ambientes relacionados con éstas son una de las principales fuentes de diseminación por contaminación cruzada con productos como carne, leche y hortalizas. Esto explica cómo alimentos listos para ser consumidos, no requieren de procesos de cocción adicionales para

eliminar al microorganismos y dan por resultado productos con un mayor riesgo de infección (Jemmi & Stephan 2006, Ryser & Buchanam 2013, Ryser & Donnelly 2015).

NicAogáin & O'Byrne (2016) y Linke y colaboradores (2014) sugieren la existencia de una serie de factores facilitadores de la supervivencia y transmisión de *Listeria monocytogenes* a lo largo de la cadena alimentaria. Inicialmente puede sobrevivir en el suelo, a pesar de competir en ese nicho con otros microorganismos como bacterias y protozoarios. Por la irrigación o la lluvia llega a las superficies de las plantas o a suministros de agua donde puede alcanzar a la cadena alimentaria. En este punto, por contaminación cruzada, *L.monocytogenes* puede pasar a productos listos para ser consumidos que no se someten a procesos de cocción. Por su capacidad de multiplicarse a bajas temperaturas *L.monocytogenes* se ha relacionado con alimentos conservados mediante refrigeración a temperaturas de menos de 10°C como lácteos, cárnicos y mariscos (Ryser & Buchanam 2013).

La detección de *L. monocytogenes* en productos alimenticios resulta muy importante para asegurar la inocuidad de los mismos, por lo tanto esta es en una de las principales preocupaciones en esta industria (Jemmi & Stephan 2006, Ryser & Donnelly 2015).

Detección de *Listeria monocytogenes* en alimentos

Listeria monocytogenes es un bacilo Gram positivo (en cultivos longevos puede presentar una forma cocoide o filamentosa) capaz de crecer en atmósferas aerobias o anaerobias y prefiere las condiciones de microaerofilia. En medios sólidos no selectivos no diferenciales forma colonias lisas gris azulado entre 0,2 y 0,8 mm luego de 24 horas de incubación a temperaturas entre 30°C y 37°C; puede crecer en un ámbito de temperatura entre los (1 a 45)°C con una temperatura óptima de 37°C: su crecimiento se presenta a un pH de crecimiento entre los 4,4 a 9,6, siendo 7,0 su pH óptimo y un aW de hasta 0,90 (lo que le permite sobrevivir en medios de cultivo con altas concentraciones de sal) (Ryser & Donnelly 2015).

Bioquímicamente, el género *Listeria* se caracteriza por ser catalasa positivo, oxidasa negativo, generar hemólisis beta en agar sangre, fermentar carbohidratos y así generar ácido sin producir gas, hidroliza la esculina y el hipurato de sodio, en la reacción de rojo de metilo el resultado es positivo, no produce H₂S, y los resultados en las pruebas de gelatina, indol, nitrato e hidrólisis de urea y almidón son negativos (Ryser & Donnelly 2015). Para distinguir entre las especies del género se utilizan pruebas como hemólisis en agar sangre, producción de ácido a partir de D-xilosa, L-ramnosa, alfa-metil-D manosido y manitol (Ryser & Buchanan 2013, BAM-FDA 2017).

Sin embargo, antes de realizar estas pruebas en bacterias aisladas de muestras de alimentos, se debe recurrir a varios procedimientos que faciliten la recuperación de un microorganismo en concentraciones bajas, condiciones estresantes y en competencia con la microbiota acompañante; en algunos casos, por la acción de sustancias preservantes o tratamientos físicos, podrían estar en estado “viable no cultivable” sin afectar su capacidad infecciosa pero que requiere de mucho trabajo para ser recuperado en el laboratorio (Välimaa *et al.* 2015). Los primeros métodos utilizados para el aislamiento de *Listeria monocytogenes* en alimentos se basaron en la capacidad de este microorganismo de crecer a bajas temperaturas, esto permitía seleccionarlo entre otros microorganismos que pudieran estar presentes. Sin embargo, estas técnicas requieren de varios días de incubación, lo que constituye una desventaja porque requiere el uso de otros procedimientos (Ryser & Donnelly 2015).

De acuerdo con Ryser & Donnelly (2016), actualmente se utilizan tres tipos de metodologías para la detección de *Listeria monocytogenes* en alimentos:

1. Detección directa en placa a partir de la muestra: en este caso se pesa una determinada cantidad de muestra y se coloca en un medio diluyente e inmediatamente, a partir de éste se traslada un volumen determinado a una placa con un medio selectivo diferencial (Stessl *et al.* 2009). Este método permite cuantificar cuantas unidades formadoras de colonia hay en una muestra, pero presenta límites de detección que están entre 10 y 100 UFC por gramo o mililitro y en algunos casos requeriría mayor sensibilidad.

2. Detección en medios selectivos diferenciales luego de una etapa de enriquecimiento: estas metodologías son las más utilizadas y están descritas por la Agencia de Drogas y Alimentos (FDA por sus siglas en inglés), el Servicios de Inspección y Seguridad Alimentaria (FSIS por sus siglas en inglés) y el protocolo de ISO 11290-2.

En estos casos se inicia inoculando la muestra en un caldo de enriquecimiento y se procede a incubar por 24 y 48 horas. Dependiendo de la metodología, en algunos casos esta fase puede tener dos etapas, la segunda fase se caracteriza por el uso de agentes inhibitorios (generalmente ácido nalidíxico, acriflavina y cicloheximida) para la microbiota acompañante. Luego de esta etapa se pasa a placas con medios selectivos diferenciales.

3. Detección mediante técnicas inmunológicas o genéticas: estos métodos poco a poco han ido adquiriendo relevancia porque permiten conseguir resultados en tiempos más breves, sin embargo, algunos presentan problemas para distinguir cepas de *Listeria* spp. no patógenas de *L.monocytogenes*.

La mayoría de los laboratorios dedicados a la determinación de la presencia de *Listeria monocytogenes* en alimento utilizan las metodologías del apartado 2 donde se inicia el procedimiento con un medio de preenriquecimiento o enriquecimiento selectivo como caldo *Listeria* enriquecido y amortiguado (BLEB, por sus siglas en inglés), caldo Fraser, medio Vermont y caldo *Listeria* enriquecido. Estos permiten aislamientos adecuados a partir de muestras con cantidades muy bajas de células de *L.monocytogenes* y en condiciones de estrés así se recupera hasta 10^5 UFC/mL de caldo. Para esto, los medios son suplementados con una serie de antibióticos capaces de inhibir la microbiota acompañante, entre estos se mencionan acriflavina (para evitar la proliferación de otras bacterias Gram positivas, en algunos casos junto con polimixina B o tiosulfato de potasio), ácido nalidixico (para contrarrestar el crecimiento de bacterias Gram negativas) y cicloheximida (para inhibir el crecimiento de mohos y levaduras). Generalmente, luego de 48 horas de incubación se utilizan agares selectivos diferenciales como agar Oxford, Palcam, agar Oxford modificado, agares cromogénicos entre otros que luego de 24-48 horas de incubación, si presentan colonias sospechosas y requieren de pruebas bioquímicas

adicionales para confirmar o descartar la presencia de *Listeria monocytogenes* (Ryser & Donnelly 2015, Law *et al.* 2015, BAM-FDA 2017, FSIS-USDA 2017).

A pesar de la simplicidad y lo económico de esto, la industria de alimentos necesita tiempos de respuesta cortos por parte del laboratorio. Por esta razón se han desarrollado las técnicas del apartado tres, muchas basadas en biología molecular mediante el uso de anticuerpos o la detección de segmentos específicos de *L.monocytogenes* en el ADN mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR por sus siglas en inglés) en sus diferentes variantes: punto final, tiempo real, multiplex, amplificación de ácidos nucleicos basados en secuencia (NASBA, por sus siglas del inglés, amplificación isotérmica mediada por bucle (LAMP por sus siglas en inglés), microarreglos y secuenciación de nueva generación (NGS, por sus siglas en inglés).

Los ensayos basados en la técnica de LAMP permiten detectar segmentos de ADN en condiciones isotérmicas, sin embargo, el diseño de los iniciadores de esta técnica resulta ser complejo y en algunos casos requieren de hasta seis pares de iniciadores. Esto ha propiciado la búsqueda de opciones para esta técnica con un menor requerimiento en cuanto a número de iniciadores (Wu *et al.* 2014, Law *et al.* 2015). Los ensayos de NASBA también trabajan en condiciones isotérmicas, pero amplifican ARNm; el éxito de esta técnica depende de la existencia de células viables y la capacidad de recuperación del ARN (Law *et al.* 2015, Woan-Fei *et al.* 2015). También se han planteado técnicas que detectan ARN ribosomal y aprovechan su estabilidad, su menor probabilidad de mutaciones y su concentración en cantidades suficientes en la célula (Livezey *et al.* 2013).

Las nuevas técnicas moleculares han ido desarrollándose en los últimos años y se han convertido en un aporte importante a la investigación de la microbiología alimentaria. Woan-Fei y colabores (2015) citan varios estudios en los cuales han utilizado técnicas de biología molecular para la detección de varios enteropatógenos, entre estas PCR multiplex para la detección simultánea de varias cepas de *Escherichia coli* enterohemorrágicas en carne, carcasas de pollo y queso, PCR tiempo real para la detección de *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* O157:H7, *Shigella*, *Staphylococcus aureus* y *Salmonella* sp. en carne, huevo líquido, maní y vegetales, LAMP para estos mismos patógenos y

Campylobacter jejuni en alimentos como ostras, carne de diversos orígenes, leche y vegetales y NASBA para *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes* y *Salmonella* Enteritidis en agua, carnes, ensaladas, jamón y salmón ahumado.

La técnica de PCR permitió a varios grupos de investigadores interesados en el tema de *Listeria monocytogenes* en alimentos, el desarrollo de nuevos procedimientos mediante la implementación de pares de iniciadores de forma individual o varios en forma simultánea (PCR multiplex). Entre estos primeros estudios se encuentra el realizado por Wernars *et al.* (1991). En este trabajo se identifica la presencia de *Listeria monocytogenes* en queso fresco de forma directa, sin ningún tipo de enriquecimiento; esto se logra con límites de detección mayores a 10^3 UFC/0,5g y además se informa la presencia en la muestra de componentes inhibitorios para la actividad polimerasa. Furrer y colaboradores (1991) utilizaron el gen de la hemolisina *hly* para identificar colonias sospechosas aisladas de embutidos y para la detección en muestras de leche luego de un enriquecimiento selectivo. Posteriormente Niederhauser y colaboradores (1992) se basan en este trabajo para la detección de *L. monocytogenes* luego de un enriquecimiento selectivo aplicando posteriormente dos procedimientos diferentes, con y sin centrifugación; ellos observan en ambos casos como los tiempos de trabajo de laboratorio bajan a 32 y 52 horas respectivamente y que el desempeño es similar al de la técnica tradicional. En estos primeros estudios y otros contemporáneos se evidencia la necesidad de un enriquecimiento selectivo previo a la extracción del ADN anterior al montaje del PCR (Bonilauri *et al.* 2016).

En la década siguiente se desarrollan variaciones de la técnica de PCR, una de ellas es el PCR tiempo real, que se comentará más adelante. Sin embargo, se siguen publicando estudios basados en la técnica de PCR punto final pues esta permite hacer evaluaciones preliminares de protocolos basados en la detección de ADN antes de pasar a otras variantes más sensibles con mayor requerimiento de equipos y reactivos más costosos (Jin-Qiang *et al.* 2010). Gouws & Liedemann (2005) utilizaron PCR punto final para la identificación de colonias sospechosas en agar Oxford y RAPID'L aisladas a partir de muestras de queso, carne de res, pollo y pescado (con enriquecimiento en caldo Fraser previo a la inoculación de las placas) amplificando el gen *hly*; esto les permitió identificar como *Listeria monocytogenes* al 37% de las colonias sospechosas encontradas en agar (aisladas

inicialmente luego del enriquecimiento selectivo de muestras de queso, productos cárnicos y frutos secos), los hallazgos de Gows & Liedemann plantean que el uso de PCR punto final amplificando *hly* permite disminuir los porcentajes de falso positivos.

Sin embargo, la mayoría de los autores de estudios contemporáneos que utilizan PCR punto final para la detección de *L. monocytogenes* en alimentos se inclinan por hacer la extracción del ADN luego de un enriquecimiento selectivo sin tener que pasar por el aislamiento de colonias en medios sólidos. D'Agostino *et.al.* (2004) plantea y valida un procedimiento para la detección de *L. monocytogenes* en leche a partir de un enriquecimiento de dos pasos en caldo Fraser y en caldo YPCE después de amplificar el gen *prfA*. En un trabajo realizado en 13 laboratorios europeos se obtiene una conformidad de 87,9%, una especificidad de 81,8% y una concordancia de 68,1%; en las muestras inoculadas la sensibilidad fue de 89,4%, la conformidad de 81,2%, y la concordancia de 80,7%.

Torres y colaboradores (2004) presentan y validan un protocolo de PCR multiplex capaz de detectar dos secuencias simultáneamente, una de 16S ARN y otra del gen *hlyA*, para esto inoculan muestras de carne de res y de pollo, se incubaron en agua peptonada durante 24 horas, luego se hace la extracción de ADN y el PCR, respectivo. Los investigadores obtienen para la carne de pollo una sensibilidad de 96,6%, una especificidad de 100%, un valor predictivo positivo de 100%, un valor predictivo negativo de 97%, y una concordancia de un 98,43%, para la carne de res obtienen un 100% para todos los parámetros anteriores. Los límites de detección de esta técnica los describen entre 10^2 y 10^4 UFC/g. Posteriormente, basándose en este estudio, el mismo grupo de trabajo publica otro trabajo utilizando leche fresca, queso y las matrices de la publicación anterior. Se obtienen parámetros de validación tan positivos como los del estudio anterior e informan límites de detección de 10^1 UFC/mL en leche, 10^3 UFC/g en queso fresco y 10^5 UFC/g en las carnes (Poutou *et al.* 2005).

Aznar y Alarcón (2003) comparan la técnica tradicional de cultivo, considerada la técnica de referencia con una propuesta por estos investigadores basada en el uso de los genes *iap*, *hlyA* y 16S ARN utilizando las matrices de carne y leche. Con los resultados obtenidos determinan que el uso de los diferentes iniciadores permite obtener límites de sensibilidad

entre 10^1 y 10^3 UFC/mL o g. En el año 2015 Liu y colaboradores plantean una técnica para la detección de *L. monocytogenes* en productos cárnicos luego de un enriquecimiento y plateo en medios selectivos diferenciales utilizando iniciadores nuevos del gen *iap* y comparando los resultados obtenidos con los informados para 16S ARN. Concluyen que el método planteado permite detectar mejor a *L. monocytogenes* y diferenciarlo de otras especies del mismo género.

Tao y colaboradores (2015) deciden buscar otros posibles iniciadores para ser utilizados en la detección de *Listeria monocytogenes* en alimentos, planteando tres posibles pares de secuencias del total estudiado, como resultados prometedores para la detección del patógeno a futuro. Posteriormente realizan pruebas en los cuales utilizan un PCR multiplex con los iniciadores descritos en el estudio anterior (Tao *et al.* 2016).

En India un grupo de trabajo ha estado estudiando una técnica de PCR multiplex en punto final capaz de detectar cuatro patógenos en alimentos, entre ellos *L.monocytogenes* utilizando el gen *hlyA* con resultados satisfactorios (Latha *et.al.* 2014, Latha *et.al.* 2017).

Los trabajos anteriormente citados son algunos de los muchos desarrollados y validados para la detección de *Listeria monocytogenes* por PCR punto final. Esta técnica tiene varias ventajas como su sencillez y lo relativamente económico de la amplificación de fragmentos de ADN por esta vía, sin embargo no permite cuantificarlo y es relativamente laboriosa por lo que requiere de personal calificado. Para subsanar esas debilidades se desarrolla el PCR tiempo real básicamente con el mismo fundamento pero utiliza una sonda fluorescente capaz de monitorear la reacción mientras sucede, la cuantificación del ADN inicial y en algunos casos, la automatización del procedimiento. Con esta nueva tecnología y con los iniciadores previamente probados en PCR punto final se desarrollan nuevas metodologías para la detección de *Listeria monocytogenes* en alimentos (Jin-Qiang 2010). Tal es el caso de la técnica descrita por Rossmannith y colaboradores (2006) basada en una metodología previamente validada en PCR punto final la cual utiliza el gen *prf A*; en este caso se validó una metodología de PCR tiempo real para la detección de *L. monocytogenes* en salmón, paté, queso maduro y leche entera luego de una fase de enriquecimiento en caldo Fraser. Al hacer la validación comparando la técnica propuesta con el método de cultivo descrito en

ISO 11290-1 obtuvieron una exactitud de 96%, una especificidad de 100%, y una sensibilidad de 76,9%.

En España, Rodríguez Lázaro y colaboradores (2004) describieron un método de detección directa en muestras de carne utilizando el gen *hly* determinando límites de detección de 10^2 ó 10^3 UFC/g (dependiendo si la suspensión de la muestra es filtrada o no). Al comparar este método con el de referencia (cultivo) se obtuvo una exactitud con valores entre 89,12% a 116,28%. En Italia se describe un método para detectar, cuantificar y determinar la viabilidad de *Listeria monocytogenes* en alimentos (leche, carne, queso fresco, embutidos y ensalada) mediante un PCR tiempo real utilizando el gen *hly*, el cual trabaja directamente en la muestra, sin enriquecimiento previo, permitiendo detectar un mínimo de 10^3 a 10^4 UFC/g (Kalliopi *et.al* 2008). O'Grady y colaboradores (2009) validan un método para amplificar el gen *ssrA* en PCR tiempo real para la detección de *Listeria monocytogenes* en una variedad de matrices de alimentos utilizando un enriquecimiento previo en caldo Fraser. De acuerdo con los resultados obtenidos el método propuesto tiene una especificidad de 99,4%, una sensibilidad de 96,14% y una exactitud de 99,03%.

Gattuso y colaboradores (2014) presentaron una metodología que planteó trabajar con una dilución del caldo de enriquecimiento Fraser (1:10, 1:5, 1:3) a 30°C durante 5, 8 y 24 horas para luego amplificar el gen *hly* en PCR tiempo real. El ensayo generó resultados positivos (comparándolo con el método de referencia) luego de 24 horas de incubación en las diluciones 1:10 y 1:5. Garrido *et.al.* (2013) presentan y validan un ensayo multiplex por PCR tiempo real para la detección simultánea de *Salmonella* ssp. y *L. monocytogenes* en alimentos variados y muestras ambientales con un enriquecimiento previo en un medio denominado TA-10. En el caso de *L.monocytogenes* utilizaron el iniciador *hly*. Con respecto al método de referencia obtienen valores de concordancia mayores a 90% y el 90% de las muestras positivas con un límite de detección de 5UFC/25 g, dieron este resultado. Los investigadores presentan otro artículo con una técnica similar de PCR tiempo real que únicamente detecta *L.monocytogenes* luego de un enriquecimiento con el medio anteriormente mencionado y obtuvieron para este caso un límite de detección de 9,5 UFC/25 g, una especificidad, eficiencia y concordancia mayores a 90% (Garrido-Maestu *et.al* 2018).

La literatura informa una validación de una técnica de PCR tiempo real para la detección de *L.monocytogenes* desarrollada en 10 laboratorios europeos de forma simultánea y que utilizó el gen *hly* luego de un enriquecimiento en caldo Fraser. Se obtuvieron límites de detección menores a 10 UFC/25g, una exactitud de 82,75%, una especificidad de 96,70% y una sensibilidad de 97,62% al compararse con el método de referencia (Gianfranceschi *et.al.* 2014). De forma similar, Reyes y colaboradores (2018) presentan una validación de una técnica que detecta *L.monocytogenes* en carne amplificando el gen *hly* en PCR tiempo real luego de un enriquecimiento previo en caldo Fraser. Se informa una inclusividad, exclusividad y exactitud de 100% en 53 réplicas analizadas.

Como puede apreciarse, a pesar de que la técnica de PCR tiene varias décadas de estarse empleando para la determinación de *Listeria monocytogenes*, en general, se han venido utilizando prácticamente las mismas secuencias de ADN: 16S rARN, 23S rARN, *hlyA* o *hly* (codifica para listeriocina O), *iap* (proteína p60 relacionada con invasión) *actA* (proteína de superficie ActA), *lma* (antígeno de *Listeria monocytogenes*) *inlA* (internalina A), *inlB* (internalina B), *prfA* (factor regulador positivo A), *pepC* (aminopeptidasa C), *fbp* (proteína de unión a fibronectina), *ssrA* (ARNtm) y *plcB* (fosfolipasa B). De todas estas la más usada es la secuencia de *hly* tanto para las técnicas basadas en PCR como NASBA y LAMP (Law *et al.* 2015, Woan-Fei *et al.* 2015, Jin-Qiang *et al.*2010, Varadaraj 2010).

Idealmente las secuencias utilizadas deben ser específicas y poseer una baja tasa de mutación. Sin embargo, la literatura científica ha informado cepas poco virulentas de *Listeria monocytogenes* con mutaciones o deficiencias de estos genes. Por ejemplo algunas cepas de la serovariedad 4c son negativas para el gen *hly*, uno de los más empleados o el caso de *iap* con problemas cuando se trabaja con poblaciones no homólogas (Jin-Qiang *et al.* 2010, Aznar & Alarcón 2002).

Tao y colaboradores (2015) presentan un trabajo donde a partir de herramientas bioinformáticas estudian nuevos posibles iniciadores para la determinación de *Listeria monocytogenes* en muestras de leche utilizando PCR punto final. De estos, tres iniciadores denominados por los autores Lm8, Lm13 y Lm20 se obtienen resultados positivos en cuanto a sensibilidad cuando son probados en muestras de leche inoculadas. Si estas

primeras observaciones son ciertas y se confirman mediante PCR punto final, en un futuro podría valorarse el uso de estos iniciadores para una técnica más automatizada en PCR tiempo real.

Validación de métodos microbiológicos

Los métodos alternativos son métodos de análisis nuevos o modificados que permiten obtener el mismo resultado para un analito al resultado esperado mediante el uso del método de referencia. Con respecto a éste pueden presentar alguna cualidad que mejore su desempeño, por ejemplo, ser más sencillo, más económico o más rápido. La verificación de la capacidad de un método alternativo de generar el mismo resultado que un método de referencia se logra mediante una validación (ISO 16140:2016, FDA, 2015).

La validación de un método es el proceso para demostrar lo apto y confiable de un método para su propósito original: la determinación de un analito en una determinada matriz (EPA-FEM 2009). De acuerdo con el propósito de estas validaciones se clasifican en primarias, las cuales pretenden establecer límites operacionales y las características del desempeño de un método nuevo, modificado o que no ha sido correctamente clasificado y validaciones secundarias o verificaciones, donde el objetivo es demostrar que el laboratorio cumple satisfactoriamente con las especificaciones establecidas en la validación primaria (EPA-FEM 2009).

Las validaciones primarias se realizan comparando el método en estudio contra el método de referencia. Los siguientes métodos son los aceptados por la AOAC (2012) como técnicas microbiológicas de referencia: AOAC OMA, Manual de Bacteriología Analítica (BAM) de FDA, las guías para análisis de inocuidad alimentaria y servicios de inspección de Laboratorio de Microbiología, la Organización Internacional de Estandarización (ISO) y el Compendio de Métodos Analíticos de la Oficina de Salud de Canadá.

Las validaciones realizadas por el desarrollador de un método de estudio normalmente se hacen en un solo laboratorio, usualmente el que lo describe pero también se puede contratar a otro laboratorio para hacer la validación (AOAC 2012).

En una validación de un método cualitativo se definen los siguientes parámetros para el método en estudio:

Especificidad

Habilidad de un método para discriminar entre el organismo blanco y otros. (EPA-FEM 2009). Es el resultado de:

$$\frac{\text{Muestras que dieron negativo correctamente}}{\text{Muestras que dieron negativo correctamente e incorrectamente}} \quad (\text{EPA-FEM 2009})$$

Tradicionalmente se demuestra en pruebas de laboratorio que utilizan cultivos puros tanto positivos como negativos. Un método robusto debe permitir distinguir el organismo blanco en matrices complejas y con un potencial de albergar millones de microorganismos de otras especies (EPA-FEM 2009).

En el caso de las técnicas que utilizan PCR se refiere a la habilidad del método de discriminar entre las secuencias blanco del resto de secuencias. Entre los factores que pueden influir en este parámetro está el diseño del iniciador, la degeneración de estos, la concentración de ADN, la calidad de la extracción de ADN, impurezas en el amortiguador, la concentración de iniciadores, parámetros del programa del termociclador, efecto de la matriz (si tiene impurezas con potencial de inhibir la reacción), amplificación de fragmentos no específicos, calidad de las muestras utilizadas como referencia. En el caso de PCR punto final especificidades bajas pueden relacionarse con la amplificación de bandas con el tamaño incorrecto, bandas con “efecto cometa” en la electroforesis de ADN en muestras que si tienen el tamaño correcto, bandas no esperadas en los controles cuando se ha descartado contaminación cruzada (EPA-FEM 2009).

Sensibilidad

Proporción de microorganismos blanco capaces de ser detectados mediante el método en estudio. Los datos utilizados para determinar este parámetro se obtienen de ensayos desarrollados con diluciones seriadas a partir de un estándar (EPA-FEM 2009). Es el resultado de:

$$\frac{\text{Muestras que dieron positivo correctamente}}{\text{Muestras que dieron positivo correctamente e incorrectamente}} \quad (\text{EPA-FEM 2009})$$

La sensibilidad se puede ver afectada por características propias de la matriz que se pueden detectar en el laboratorio en ensayos en los cuales se trabaja el ADN en una matriz ya caracterizada (como agua de grado molecular), determinando la sensibilidad de laboratorio y una no caracterizada (cualquier muestra ambiental) que sería la sensibilidad de campo (EPA-FEM 2009).

Límite de detección:

Cantidad mínima del microorganismo blanco detectado por la técnica (EPA-FEM 2009, ISO 16140:2016).

EPA-FEM (2009) define el límite de detección para las pruebas que utilizan PCR como la cantidad mínima de la secuencia blanco detectable con un nivel de confianza dado en una matriz caracterizada (agua destilada o una solución amortiguador). En esta guía también se define el límite de detección de muestra, como la cantidad mínima de la secuencia detectable con un nivel de confianza dado en una matriz no caracterizada, es específica para cada matriz y puede presentar variaciones de una muestra a otra.

Falso positivo

Resultado positivo obtenido por un método de análisis, se confirma como negativo por el método de referencia (ISO 16140:2016)

Falso negativo

Resultado negativo obtenido por un método de análisis, se confirma como positivo por el método de referencia (ISO 16140:2016)

Antes de una validación se debe pasar por un proceso de optimización donde se identifiquen los factores específicos que son parte del método: procedimiento, condiciones ambientales, temperaturas, reactivos vinculados con la introducción de variabilidad en el proceso. Con esa información, se debe determinar cómo se deben manejar esos factores para obtener la menor variabilidad posible, y de esta forma asegurar su reproducibilidad (EPA-FEM 2009).

En la optimización debe considerarse todo el método, desde el inicio tomando en cuenta el muestreo y el análisis de la muestra hasta la interpretación del análisis. En el caso de técnicas que utilicen la reacción en cadena de la polimerasa es importante tomar en cuenta la recuperación de microorganismos viables y la interferencia de posibles inhibidores de la reacción que puedan encontrarse en la matriz por evaluar (EPA-FEM 2009).

En este trabajo se utilizarán los iniciadores Lm8, Lm13 y Lm20 descritos por Tao y colaboradores (2015) para la detección de *Listeria monocytogenes* en muestras de queso, embutidos y leche. Se busca evaluar la eficiencia de estos y la posibilidad de que puedan detectar este patógeno en tiempos menores de incubación mediante la propuesta de un método alternativo al que se le realiza una validación primaria comparándolo con el método de referencia.

Hipótesis

Listeria monocytogenes puede ser detectada en queso tipo Turrialba, leche pasteurizada y embutido (salchicha) con una metodología que contemple una etapa de enriquecimiento selectivo y la amplificación de los iniciadores Lm8, Lm13 y Lm20 en PCR punto final con una eficiencia mayor al 90% en los parámetros de validación al compararse con la técnica de referencia.

Objetivo General

Desarrollar una técnica para la detección de *Listeria monocytogenes* en leche pasteurizada, queso tipo Turrialba y salchicha a partir de un enriquecimiento selectivo y la amplificación de los iniciadores Lm8, Lm13 y Lm20 que al compararse con la técnica de referencia tenga más del 90% en los parámetros de validación.

Objetivos Específicos

- Evaluar el uso de los marcadores Lm8, Lm13 y Lm20 para la detección de *Listeria monocytogenes* en muestras inoculadas de queso tipo Turrialba, salchicha y leche pasteurizada inoculadas después de 48 horas de incubación en caldo BLEB mediante la técnica de PCR punto final.
- Determinar el menor tiempo de incubación de la fase de enriquecimiento selectivo en caldo BLEB que permita detectar la presencia de *Listeria monocytogenes* en queso tipo Turrialba, leche pasteurizada y salchicha por PCR punto final con los iniciadores en estudio.
- Validar este nuevo desarrollo con respecto a la técnica de referencia para la detección de *Listeria monocytogenes* en leche, queso tipo Turrialba y salchicha con el menor tiempo de enriquecimiento en caldo BLEB y en el cual los iniciadores presenten el mejor desempeño.

Diseño experimental

Se probaron los marcadores Lm8, Lm13 y Lm20 amplificando el ADN obtenido de cultivos puros de *Listeria monocytogenes* y de otras bacterias para evaluar la sensibilidad y la especificidad de la técnica de PCR punto final.

Cuadro 1: Secuencia e información sobre proteína expresada de los iniciadores Lm8, Lm13 y LM20 utilizados por Tao y colaboradores (2015) que se emplearan en este estudio.

Iniciador	Secuencia	Proteína que codifica
Lm8	GCTCAGCGGCAAATCAAAC GGCACTCGCAACAGAAACG	Proteína hipotética
Lm13	GTTCGTCGGTCCGTGGTA TTGGCAAGCAAGCAGTTCA	Glicosil hidrolasa
Lm20	TGATGAAATAAAGGTCCACG CAAGCCATAATGAACAAACG	Metalopeptidasa de Zinc

Una vez que se comprobó que funcionaban, se procedió a inocular muestras de queso tipo Turrialba, un embutido (salchicha) y leche pasteurizada de 25 gramos o mililitros de la matriz donde a cada una se le agregó 1 mL de carga baja (aproximadamente 1-2 Log UFC, obtenido a partir de diluciones decimales de una suspensión 0,5 Mac Farland), carga media (4-5 Log UFC) y carga alta (7-8 Log UFC) de *L.monocytogenes*. Se incubaron durante 48 horas a 35°C, de acuerdo con la técnica de enriquecimiento selectivo descrita por el BAM para luego tomar alícuotas, extraer ADN y realizar un PCR punto final con los tres iniciadores en estudios. Al confirmarse que es posible la detección en esa matriz de alimento se repitió el procedimiento anterior pero disminuyendo los tiempos de enriquecimiento selectivo a 12, 24 y 36 horas.

A partir de los resultados obtenidos se propuso y validó con respecto a la técnica de referencia, una metodología que permitiría detectar *L. monocytogenes* en muestras de queso tipo Turrialba, leche y salchicha con 24 horas de enriquecimiento, que fue el menor tiempo de incubación en caldo BLEB que dio una amplificación visible de ADN y utilizando Lm 20 que fue el par de iniciadores que presentó mejor rendimiento.

En la validación se trabajaron, para cada matriz, 10 réplicas con un inóculo de 1 LogUFC de *Listeria monocytogenes* y de 2 Log UFC de cada uno de los microorganismos de

competencia que se indican en el cuadro 2, otras 10 réplicas sin el inóculo de *Listeria monocytogenes* pero si con los mismos inóculos de los microorganismos de competencia y una réplica sin ningún inóculo que sirvió como control negativo.

Cuadro 2. Listado de microorganismos que fueron utilizados como competencia para *Listeria monocytogenes* en los ensayos de validación.

<p><i>Listeria innocua</i></p> <p><i>Listeria welshimeri</i></p> <p><i>Escherichia coli</i></p> <p><i>Proteus mirabilis</i></p> <p><i>Salmonella</i> sp.</p> <p><i>Shigella</i> sp.</p> <p><i>Staphylococcus aureus</i></p> <p><i>Pseudomonas aeruginosa</i></p>
--

Cada una de estas réplicas se puso a incubar a 35°C como enriquecimiento selectivo, a las 24 horas se tomaron alícuotas a las que se les extrajo el ADN y se amplificó el par de iniciadores Lm20 y a las 48 horas (es decir 24 horas después) se rayaron en agar Oxford para luego aislar colonias e identificarlas como indica el método de referencia. Los resultados obtenidos con ambas técnicas fueron los que se utilizaron para calcular los parámetros de la validación.

También se evaluó la capacidad del método propuesto para recuperar *Listeria monocytogenes* en alimentos almacenados en refrigeración. Para esto se inocularon 125 gramos o mililitros de leche, salchicha y queso, se guardaron en esas condiciones y en los días 1, 4, 8 y 12 se sacaron alícuotas a las que se les extrajo el ADN y se amplificó los iniciadores Lm20.

Materiales y métodos

1. Optimización de la técnica de detección de *Listeria monocytogenes* mediante PCR punto final con los iniciadores Lm8, Lm13 y Lm20

1.1 Extracción de ADN

Para la extracción de ADN se utilizó un kit de NucleoSpin Tissue- Machery-Nagel®. Este protocolo se modificó al agregar como paso adicional el uso de lisozima para romper la pared bacteriana de *L. monocytogenes* y optimizar el proceso.

Se inició con la extracción de ADN de cultivos puros de *L.monocytogenes* utilizando el equipo de extracción previamente mencionado. La casa comercial sugería el uso de lisozima para mejorar la extracción de ADN, por lo que se hicieron pruebas de la extracción con esta enzima diluida en agua, en amortiguador Tris-HCl y sin ella.

La extracción de ADN se evaluó por electroforesis en gel de agarosa al 1% con Gel Red (90V durante 20 minutos) y por espectrofotometría para cuantificación y evaluación de la eficiencia del proceso (utilizando las longitudes de onda de 260nm y 280nm).

1.2 PCR punto final con los iniciadores Lm8, Lm13 y Lm20 en ADN obtenido a partir de un cultivo puro de *Listeria monocytogenes* ATCC 13932

Antes de iniciar con las pruebas que utilizan los tres pares de iniciadores se realizó la optimización de la reacción de PCR para corroborar las cantidades de reactivos con las que se trabajaría. Para esto se utilizaron los iniciadores Lm20 en dos concentraciones distintas, 0,4 μ M y 0,8 μ M con tres concentraciones de ADN, una sin diluir de una extracción cuantificada por el NanoDrop® del Centro Nacional de Biotecnología que fue de 51 μ g/mL, una diluída 1:5 (aproximadamente 10 μ g/mL) y otra diluída 1:10 (5 μ g/mL). Se emplearon los tiempos y las temperaturas indicados por Tao y colaboradores (2015).

Se determinó que la concentración de de 0,4 $\mu\text{g/mL}$ de los iniciadores se utilizaría para los ensayos posteriores.

Luego de optimizar la reacción de PCR, se define el procedimiento para el montaje de esta técnica con los iniciadores Lm 8, Lm13 y Lm20 descritos por Tao y colaboradores (2015). Este ensayo se montó para confirmar la presencia de las bandas, con suspensión de una cepa de *L.monocytogenes* ATCC 13932 que fue rayada en agar sangre y se incubó durante 24 horas. Luego de esto se realizó la extracción de ADN y el PCR de acuerdo a lo indicado por Tao y colaboradores (2015): iniciando con 3 minutos a 94°C para luego trabajar con 35 ciclos de 30 segundos a 94°C para desnaturalización, 30 segundos a 60°C para alineación y 40 segundos a 72°C para extensión. Finalmente se concluyó con 10 minutos a 72°C para una extensión final. Esto se realizó en el termociclador Biometra T-Professional® de la sección de biología molecular del Laboratorio de Investigación Dr. Misael Chinchilla Carmona de UCIMED. Los productos obtenidos en la amplificación se evaluaron por electroforesis en gel de agarosa 1 % con Gel Red utilizando Gen Ruler 100 pb DNA Ladder de Thermo Fisher® como marcador de peso molecular. Los iniciadores se probaron por separado y juntos.

2. Determinación de la sensibilidad analítica de la técnica de detección de *Listeria monocytogenes* utilizando los iniciadores Lm8, Lm13 y Lm20

Se hicieron diluciones a partir de ADN extraído de un cultivo de *Listeria monocytogenes* cultivado en caldo tripticasa soya (incubada 24 horas a 35°C), del que se tomaron alícuotas de 1 mL, se colocaron en tubos de 1,5 ml, se centrifugaron a 10 000 rpm y al precipitado se le hizo una suspensión en amortiguador Tris-HCl a la que se le extrajo el ADN siguiendo el procedimiento establecido anteriormente. Las concentraciones de ADN se establecieron por espectrofotometría a partir de la absorbancia detectada a una longitud de onda de 260 nm.

Los tres pares de iniciadores se probaron inicialmente con diluciones de ADN extraído con y sin lisozima en concentraciones que iban desde 260 $\mu\text{g/mL}$ a 0,6 $\mu\text{g/mL}$ en el primer caso y de 57 $\mu\text{g/mL}$ y 5,7 $\mu\text{g/mL}$ en el segundo.

Posteriormente se realizó un PCR en las mismas condiciones anteriormente descritas con diluciones decimales que llegaban hasta 4,3 fg/ μ L del ADN total extraído y previamente cuantificado por espectrofotometría de una suspensión de *L.monocytogenes*

También se evaluó la sensibilidad de la técnica para la detección de células bacterianas a partir de diluciones decimales de *Listeria monocytogenes*. Para esto se rayó una placa de agar tripticasa soya (incubada 24 horas a 35°C), con las UFC aisladas se preparó una suspensión 0,5 Mac Farland, se hicieron las diluciones correspondientes y de cada dilución se tomó una alícuota de 1,0 mL, se colocó en un tubo de 1,5 mL, se centrifugó a 10 000 rpm, el precipitado obtenido se suspendió en amortiguador Tris-HCl y se realizó la extracción de ADN con el método indicado en este trabajo.

A partir del ADN obtenido para cada dilución se hizo la amplificación por PCR para cada uno de los pares de iniciadores y mediante electroforesis de ADN se visualizó el resultado.

La concentración de la suspensión 0,5 Mc Farland se confirmó mediante un recuento en placa en agar de recuento estándar y se determinó que era de $4,3 \times 10^8$ UFC/mL y las concentraciones de las diluciones llegaron hasta 4,3 UFC/mL.

3. Determinación de la especificidad analítica de la técnica de detección de *Listeria monocytogenes* utilizando los iniciadores Lm8, Lm13 y Lm20

Para evaluar la especificidad analítica de la reacción de PCR con Lm8, Lm13 y Lm 20 se usaron las siguientes bacterias *L. innocua*, *L. welshimeri*, *Escherichia coli*, *Proteus* sp., *Salmonella* sp., *Shigella* sp., *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa*. De esta manera se descartaría la amplificación de ADN de otras especies con los iniciadores empleados en el procedimiento.

Para esto, cada uno de los microorganismos fue inoculado en caldo triptasa soya, se incubó 24 horas a 35°C, se tomó una alícuota de 1mL se depositó en un tubo de 1,5 mL, se centrifugó a 10 000 rpm, el precipitado obtenido se suspendió en amortiguador Tris-HCl y se extrajo el ADN con la técnica anteriormente citada.

El ADN obtenido se usó para la reacción de PCR indicada en este trabajo para los tres pares de iniciadores. Posteriormente el resultado se visualizó por electroforesis de ADN en las condiciones anteriormente descritas.

4. Evaluación de la técnica de detección de *Listeria monocytogenes* amplificando los iniciadores Lm8, Lm13 y Lm20 a partir del enriquecimiento selectivo de 48 horas en caldo BLEB

Se procedió a evaluar si la técnica de detección por PCR de *Listeria monocytogenes* con los iniciadores Lm 18, Lm13 y Lm 20 podía detectar esta bacteria a partir del caldo BLEB en las condiciones de incubación descritas para la fase de enriquecimiento según la técnica de referencia del BAM (48 horas de incubación a 35°C).

Para esto se hicieron varias diluciones a partir de una suspensión 0,5 Mac Farland ($3,0 \times 10^8$ UFC/mL) y se agregó 1 mL de cada una a sus respectivas botellas con 225 mL de caldo BLEB, se incubaron 48 horas y luego de esto se tomaron de cada una alícuotas de 1 mL que se depositaron en tubos de 1,5 mL. Cada una de estas, posteriormente, fue centrifugada a 10 000 rpm, suspendida en amortiguador Tris-HCl y se le extrajo el ADN según el método indicado.

El ADN extraído se amplificó en PCR utilizando los pares de iniciadores Lm8, Lm10 y Lm20 y el resultado se evidenció mediante electroforesis de ADN.

5. Determinación de la presencia de *Listeria monocytogenes*, utilizando PCR punto final con los iniciadores Lm8, Lm13 y Lm20 en muestras de queso, embutidos y leche inoculadas con esa bacteria e incubadas durante 48 horas en caldo BLEB

Se prepararon muestras de queso tipo Turrialba, salchicha y leche pasteurizada y se agregó 25 gramos de cada una a 225 mL de caldo BLEB y se homogenizó en stomacker. A cada una se le añadió 1 mL de carga baja (aproximadamente 1-2 Log UFC), carga media (4-5 Log UFC) y carga alta (7-8 Log UFC) de un inóculo de *L.monocytogenes* obtenido a partir de un cultivo de esta bacteria en agar tripticasa soya (24 horas de incubación a 35°C) con el

cual se hizo una suspensión 0,5 Mac Farland y diluciones decimales, de las que utilizaron las de 10^{-7} (carga alta), 10^{-4} (carga media) y 10^{-1} (carga baja).

Los caldos BLEB con los 25 gramos del alimento correspondiente y el mililitro de la dilución con el inóculo se incubaron durante 48 horas a 35°C, dejando una muestra de cada una de las matrices sin inocular en las mismas condiciones de ensayo como control negativo. Luego de esto, se tomaron 3 alícuotas de 1 mL de cada uno de los niveles y se les extrajo el ADN con el procedimiento anteriormente mencionado y se realizó una amplificación por PCR punto final y electroforesis de ADN siguiendo el protocolo descrito anteriormente.

6. Determinación de la presencia de *Listeria monocytogenes*, utilizando PCR punto final con los iniciadores Lm20 en muestras de queso, leche y embutidos inoculadas con esa bacteria e incubadas durante 12, 24 y 36 horas en caldo BLEB

Se realizó un procedimiento similar al citado en el punto anterior, pero cambiando para los tres niveles de inóculo (bajo, medio y alto) y el control sin inocular los tiempos de incubación del alimento en caldo BLEB: 12, 24 y 36 horas. Luego de cada uno de los periodos de enriquecimiento selectivo, se tomaron alícuotas de 1 mL con las que se siguieron los procedimientos anteriormente citados para la extracción de ADN, amplificación por PCR utilizando los tres pares de iniciadores Lm8, Lm 13 y Lm20 y evidenciando esta reacción en electroforesis de ADN.

Una vez obtenidos los resultados se determinó el menor tiempo de incubación para obtener un resultado positivo en los tres niveles de carga microbiana en las muestras inoculadas. Este fue de 24 horas.

7. Validación de la técnica de detección de *Listeria monocytogenes* en leche, queso y salchichas por la amplificación del iniciador LM20 luego de un enriquecimiento selectivo de 24 horas en caldo BLEB

La validación de la técnica se hizo con base en *Guidelines for the Validation of Analytical Methods for the Detection of Microbial Pathogens in Foods and Feed* (2nd Edition) de la Administración de Alimentos y Drogas de Estados Unidos, valiéndose de los criterios definidos en dicho documento para los métodos que detectan analitos microbianos de difícil aislamiento que requieren etapas de enriquecimiento y los parámetros requeridos por *ISO 16140 Microbiology of food and animal feeding stuff Protocol for the validation of alternative methods*.

El método de referencia empleado es el descrito en el *Bacteriological Analytical Manual* de FDA.

7.1 Preparación del inóculo

Se prepararon suspensiones bacteriana al 0,5 Mac Farland en solución salina estéril a partir de un cultivo de *Listeria monocytogenes* y de cada uno de los microorganismos citados en el cuadro 2. Todos previamente fueron inoculados en agar tripticasa soya e incubados 24 horas a 35°C.

A partir de estas suspensiones se hicieron 7 diluciones de cada una de las bacterias en solución salina estéril rotulando claramente cada tubo con la dilución correspondiente. Posteriormente para inocular las réplicas de la validación se utilizaron las diluciones de 10^{-7} para *L.monocytogenes* y 10^{-6} para todas las demás.

De las dos últimas diluciones se tomó 1 mL por duplicado, se inoculó en una placa de Petri estéril y se le agregó agar de recuento estándar. Se homogenizó, se dejó solidificar y se incubó a 35°C durante 48 horas. Luego de este tiempo se procedió a hacer el recuento y a determinar la concentración de las diluciones que se usaron para definir la carga microbiana utilizada.

7.2 Preparación de las muestras

Se alistaron 20 réplicas de 25 gramos o mililitros de la matriz a trabajar en bolsas estériles de stomacker y se numeran de 1 a 20 para luego inocular con una carga baja de microorganismos.

Se rotularon para trabajarse siguiendo el siguiente esquema:

Cuadro 3: Esquema de inoculación de réplicas de las muestras de leche, queso y salchicha para la validación de la determinación de la presencia de <i>Listeria monocytogenes</i> en estos alimentos por PCR utilizando el iniciador Lm20 luego de 24 horas de incubación en caldo BLEB.	
Réplica 1-10	Carga baja <i>Listeria monocytogenes</i> + microorganismos de competencia
Réplica 11-20	Microorganismos de competencia
Réplica 21	Control negativo (sin inocular nada)

A cada una se le agregó el o los inóculos correspondientes de tal forma que:

Nivel bajo o carga baja: fue de aproximadamente 1 Log UFC (dilución 10^{-7})

De todas las demás bacterias distintas a *Listeria monocytogenes* se inocularon aproximadamente 2 Log UFC (dilución 10^{-6}).

La réplica 21 se dejó sin inocular como control negativo.

A cada una de las réplicas, una vez inoculadas, se les agregó 225 mL de caldo BLEB.

Los recuentos de los inóculos fueron confirmados por recuento en placa en agar de recuento estándar, como se indicó anteriormente y se obtuvieron las cantidades de microorganismos indicadas en el cuadro 4.

Cuadro 4: Recuentos de los inóculos de cada una de las especies bacterianas agregados a los 25 gramos o mililitros a las réplicas de las matrices de leche, salchicha y queso para el ensayo de validación de la técnica propuesta

Microrganismos	Leche (UFC)	Salchicha (UFC)	Queso (UFC)
<i>Listeria monocytogenes</i>	3,1	4,3	4,0
<i>Listeria welshimeri</i>	15	32	13
<i>Listeria innocua</i>	12	22	27
<i>Escherichia coli</i>	11	19	28
<i>Staphylococcus aureus</i>	18	21	56
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	12	270	33
<i>Proteus mirabilis</i>	21	38	104
<i>Shigella sonnei</i>	10	18	202
<i>Salmonella enterica</i>	15	22	32

7.3 Preparación de réplicas para la detección de *Listeria monocytogenes* por PCR utilizando el iniciador Lm20

A las 24 horas de incubación se tomaron 1 mL de cada una de las réplicas inoculadas y el resto se incubó por 24 horas más. Cada alícuota tomada se centrifugó a 10 000 rpm y se le eliminó el sobrenadante y el precipitado se suspendió en amortiguador Tris-HCl. Posteriormente se procedió a realizar la extracción de ADN siguiendo el método anteriormente descrito. Se hizo la amplificación de ADN únicamente con el par de iniciadores Lm20 como se indicó antes y posteriormente se revisó la presencia de la banda correspondiente por electroforesis de ADN de acuerdo con el procedimiento anteriormente mencionado.

7.4 Preparación de réplicas para la detección de *Listeria monocytogenes* por el método de referencia

A las 48 horas de incubación en caldo BLEB se procedió a rayar por duplicado en agar Oxford y se incubó a 35°C durante 48 horas. Luego de este tiempo se buscaron colonias sospechosas (pequeñas, oscuras con un halo oscuro alrededor con o sin centro hundido) las

cuales fueron sometidas a pruebas bioquímicas de identificación (tinción de Gram, oxidasa, catalasa e identificación por VITEK).

Se anotó en cuáles réplicas se obtuvieron colonias positivas por *Listeria monocytogenes* y con los resultados obtenidos se determinaron los parámetros de la validación.

7.5 Cálculo de los parámetros de la validación del procedimiento para determinar la presencia de *Listeria monocytogenes* en los queso tipo Turrialba, salchicha y queso mediante la amplificación del par de iniciadores Lm20 luego de 24 horas de enriquecimiento selectivo en caldo BLEB

Estos cálculos se realizaron según lo indica ISO: 16140-2 Protocolo para validación de métodos alternativos frente a métodos de referencia. De acuerdo con esta guía, se tabuló la información de los datos obtenidos como se indica en el esquema del cuadro 5.

Cuadro 5: Cuadro de tabulación de los resultados obtenidos en la validación para los cálculos de los parámetros a evaluar

	Método de referencia (positivos)	Método de referencia (negativos)	Total
Método de prueba (positivo)	A	B	A+B
Método de prueba (negativo)	C	D	C+D
Total	A+C	B+D	

Se calcularon los siguientes parámetros con las fórmulas que a continuación se indican:

Especificidad (Inclusividad)

$$Especificidad\% = 100 \left[\frac{A}{(A + C)} \right]$$

Falsos negativos

$$Falsos\ negativos\% = 100 \left[\frac{C}{(A + C)} \right]$$

Falsos positivos

$$Falsos\ positivos\% = 100 \left[\frac{B}{(B + D)} \right]$$

Sensibilidad (Exclusividad)

$$Sensibilidad\% = 100 \left[\frac{D}{(B + D)} \right]$$

Exactitud relativa

$$Exactitud\ relativa = 100 \left(\frac{(A + D)}{(A + B + C + D)} \right)$$

Equivalencia analítica con el método de referencia (Índice de concordancia Kappa):

$$Kappa = 2 \left[\frac{(A + C)(B + D) - CB}{(A + C + B)(2B + D) + (A + 2C)(B + C + D)} \right]$$

8. Evaluación de la detección de *Listeria monocytogenes* en leche, queso y salchicha inoculados y almacenados en refrigeración durante 1, 4, 8 y 12 días utilizando el iniciador Lm20 luego de 24 horas de enriquecimiento selectivo en caldo BLEB

En esta prueba se inocularon 125 gramos o mililitros de queso tipo Turrialba, de salchicha y de leche con aproximadamente 36 UFC de *Listeria monocytogenes* y se almacenaron en refrigeración durante 12 días junto a otros 125 gramos o mililitros sin inocular y planteados como un control negativo.

El inóculo se preparó a partir de un cultivo de *Listeria monocytogenes* en agar tripticasa soya (incubado 24 horas a 35°C) con el que se preparó una suspensión 0,5 Mac Farland y se hicieron diluciones decimales en solución salina estéril. De éstas se utilizó el tubo con la dilución de 10^{-7} que se montó por triplicado (con una concentración de $3,6 \times 10^1$ UFC/mL determinada por recuento en placa) que tenía 10 mL de volumen vertiéndose cada una completamente en la bolsa o botella estéril donde estaba la muestra correspondiente.

En cada uno de los días 1, 4, 8 y 12, se tomaron 25 gramos y se agregaron a 225 mL de caldo BLEB. Se incubó 24 horas a 35°C. Luego de ese tiempo se tomaron alícuotas de 1 mL, se extrajo ADN con el método antes mencionado y se efectuó la determinación de *Listeria monocytogenes* mediante la amplificación del iniciador Lm20 de acuerdo con los procedimientos anteriormente descritos. Mientras tanto el caldo BLEB sigue incubándose 24 horas más.

A las 48 horas de incubación se procedió a realizar la determinación de la presencia de *Listeria monocytogenes* con el método de referencia.

Resultados

Optimización de la técnica de detección de *Listeria monocytogenes* mediante PCR punto final con los iniciadores Lm8, Lm13 y Lm20

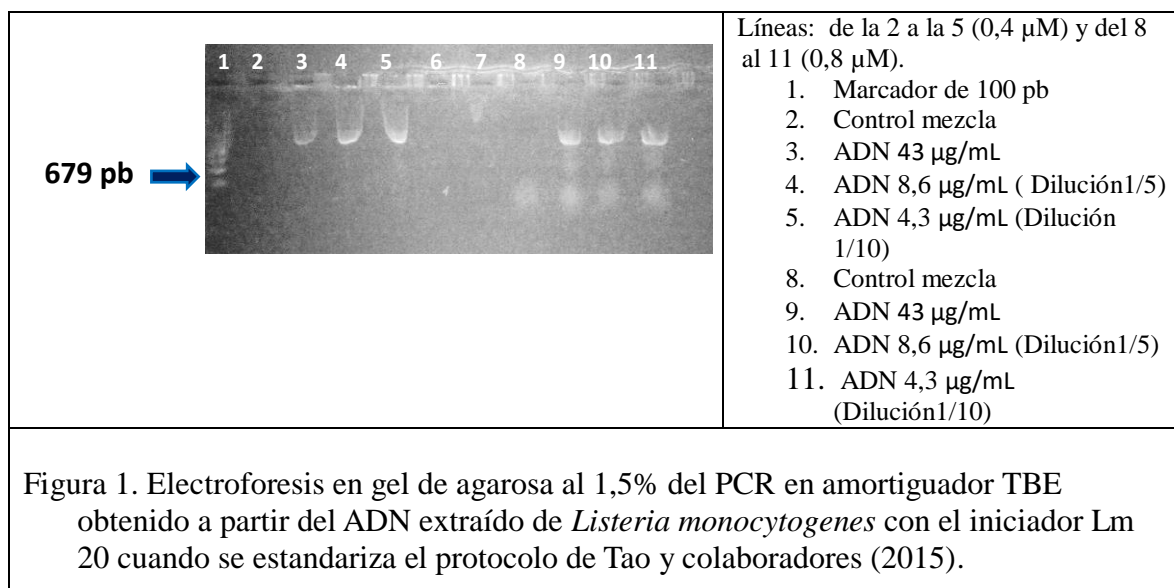
La primera parte de esta investigación se dedicó a la optimización de la técnica de PCR que permitió amplificar las secuencias Lm8, Lm13 y Lm20 a partir de ADN de *L. monocytogenes*. Se hicieron las pruebas con y sin lisozima

Los resultados obtenidos se presentan en el cuadro 6.

Cuadro 6. Comparación de los resultados obtenidos al realizar la extracción de ADN de <i>Listeria monocytogenes</i> complementando el procedimiento del kit Nucleo Spin Tissue- Machery-Nagel con un paso previo de reacción con lisozima diluida en agua, en amortiguador Tris-HCl y sin utilizar esta enzima.				
Metodología utilizada	A ₂₆₀	A ₂₈₀	A ₂₆₀ /A ₂₈₀	Concentración de ADN (ug/mL)
Lisozima disuelta en agua	0,058	0,043	1,3	5,8
Lisozima disuelta en amortiguador Tris-HCl al 0,01M	0,260	0,279	0,93	26
Extracción sin Lisozima	0,011	0,0	----	1,1

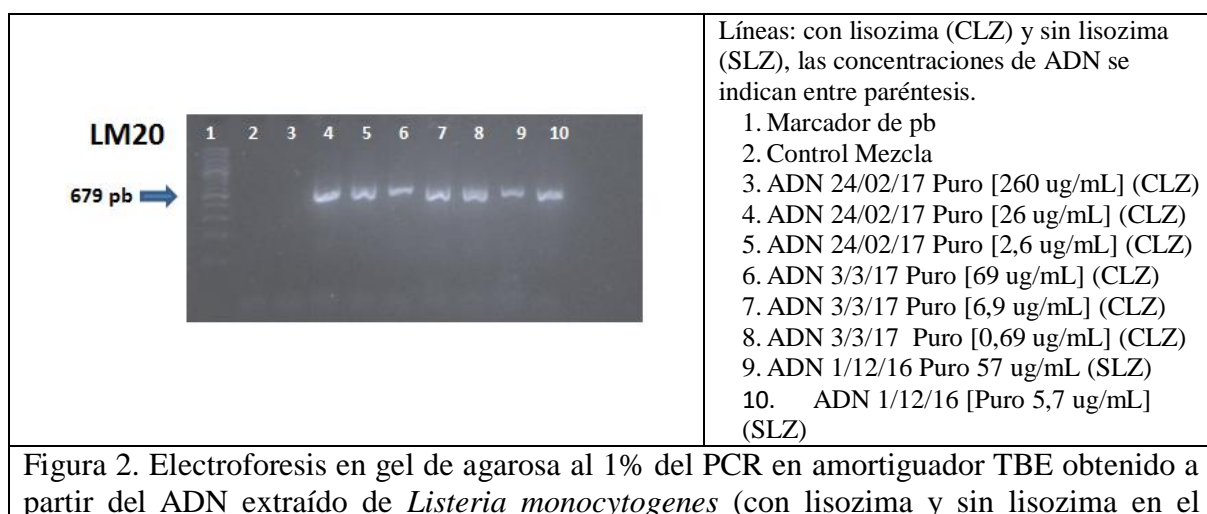
De acuerdo con los resultados obtenidos se continuó trabajando con un paso previo de digestión con lisozima diluida en amortiguador Tris-HCl.

Se procedió a optimizar las condiciones para la ejecución del PCR. Tal y como se indica en la figura 1 se obtuvieron bandas de ADN claramente visibles en las tres concentraciones de ADN y las dos concentraciones del iniciador Lm20, por lo que se decide utilizar la concentración de 0,4 µg/mL de pares de iniciadores para los siguientes ensayos.

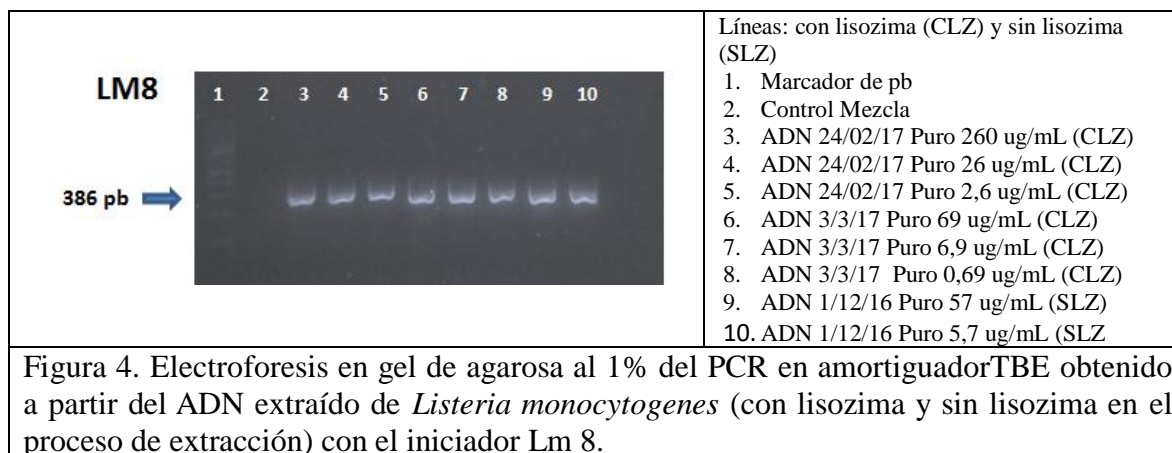
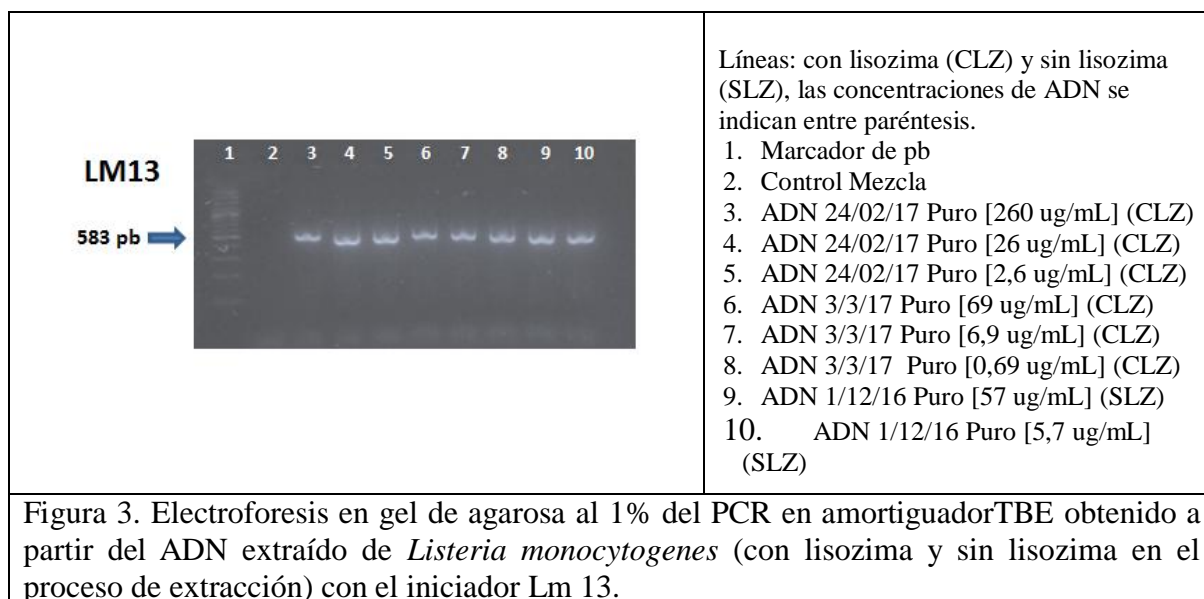


Determinación de la sensibilidad analítica de la técnica de detección de *Listeria monocytogenes* utilizando los pares de iniciadores Lm8, Lm13 y Lm20

A partir de varias muestras de ADN de *Listeria monocytogenes* extraídas previamente con y sin lisozima se procede a realizar el PCR en las condiciones que ya se optimizaron usando varias diluciones de ADN con los pares de iniciadores Lm8, Lm13 y Lm20, así se obtienen los resultados presentados en las figuras 2, 3 y 4. Aquí se puede observar cómo al realizar la electroforesis es posible determinar una banda clara de ADN amplificado en todas las concentraciones ensayadas de ADN molde.



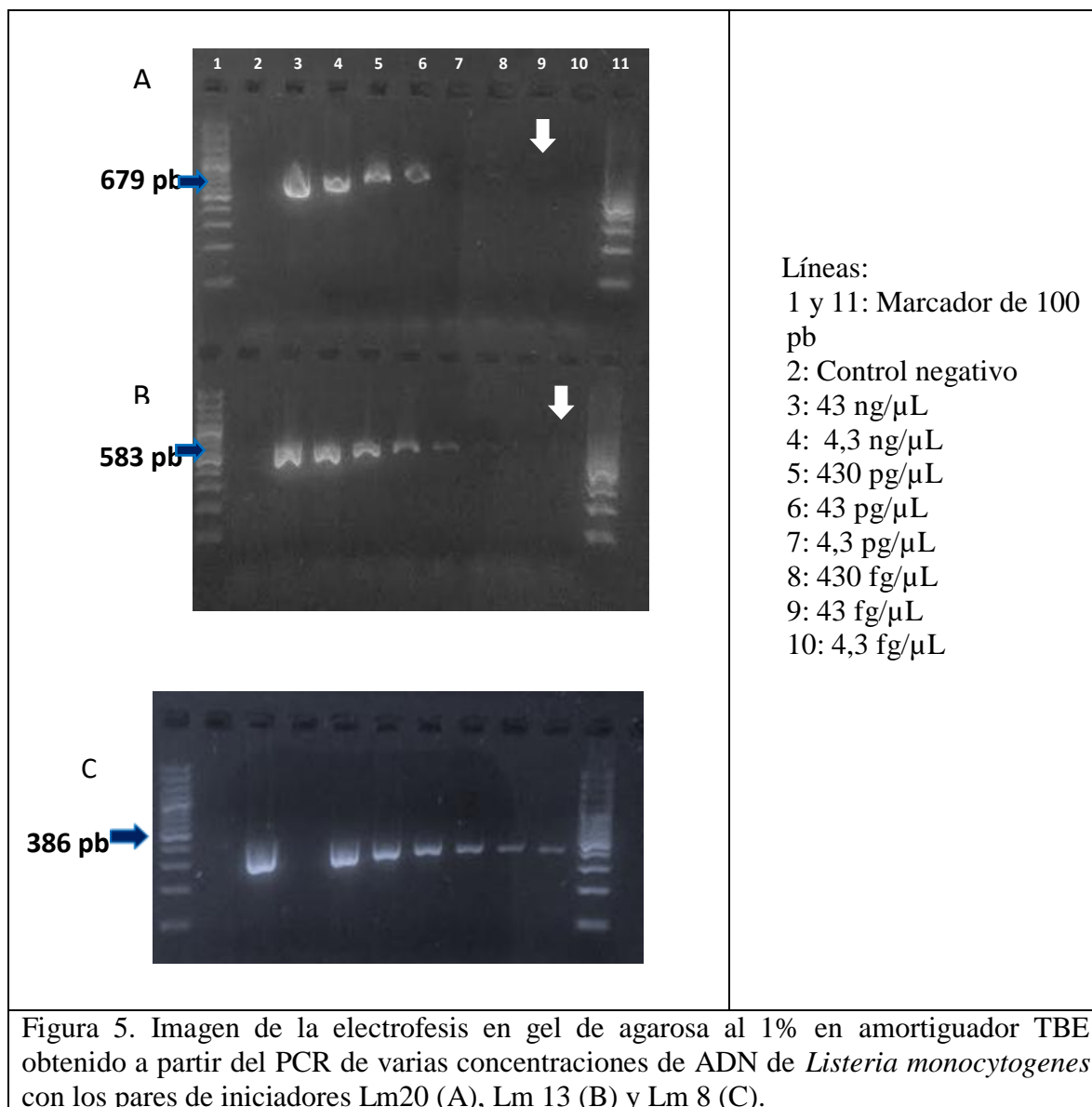
proceso de extracción) con el iniciador Lm 20



Se evalúa la sensibilidad analítica de la reacción de PCR con una prueba similar a la presentada por Tao y colaboradores (2015) para este fin, en la cual se diluye decimalmente una muestra de ADN y a cada una de las diluciones se le monta una dilución de PCR obteniéndose los resultados presentados en la figura 5. Aquí se puede apreciar que para el

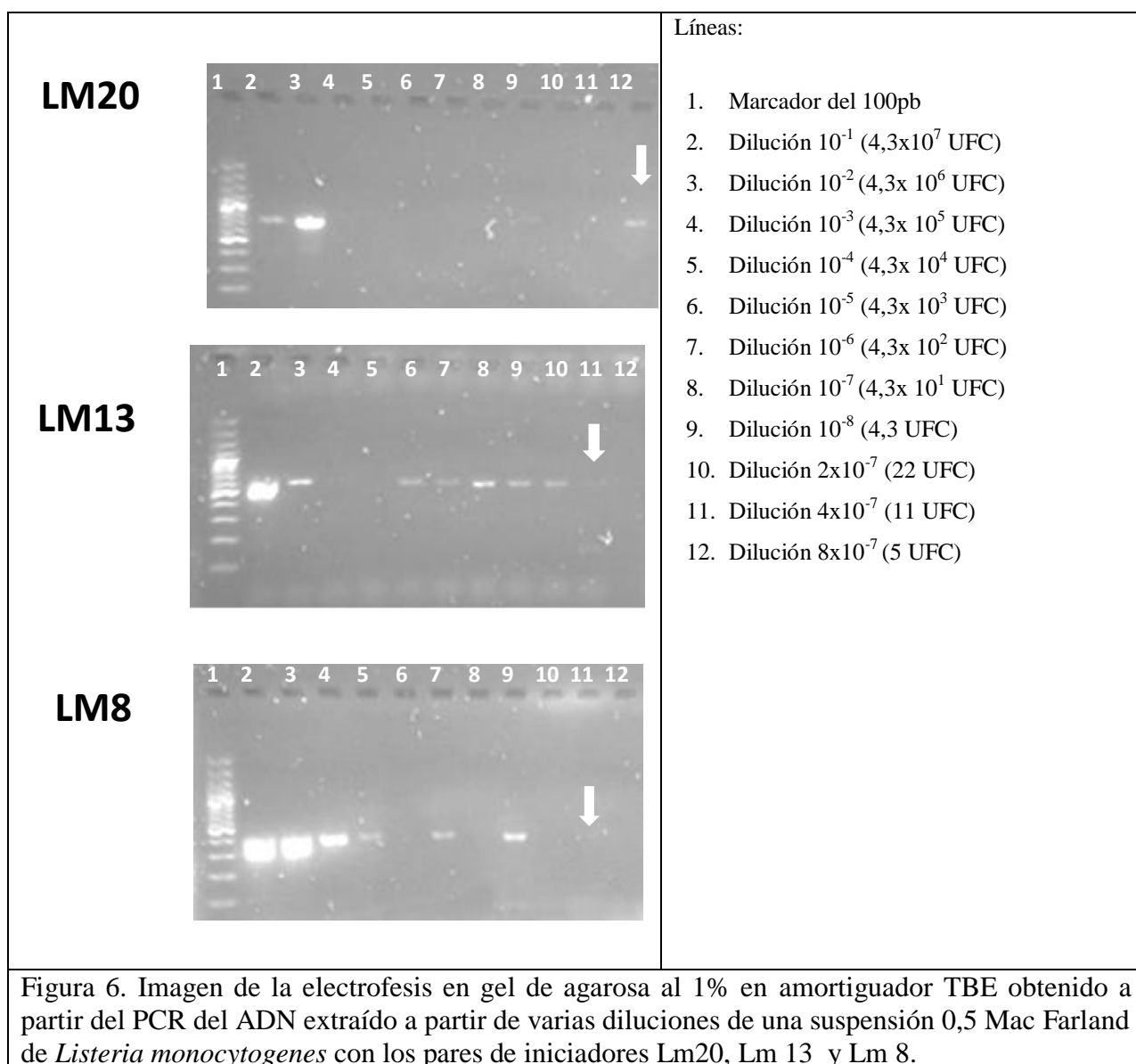
iniciador Lm20 se observan bandas del amplificado a partir de la dilución que correspondía a 43 fg/ μ L de ADN y para Lm8 y Lm13 para la concentración de 4,3 fg/ μ L

De acuerdo con estos resultados se evidencia que la técnica de PCR permite detectar hasta 4,3 fg/ μ L de ADN.



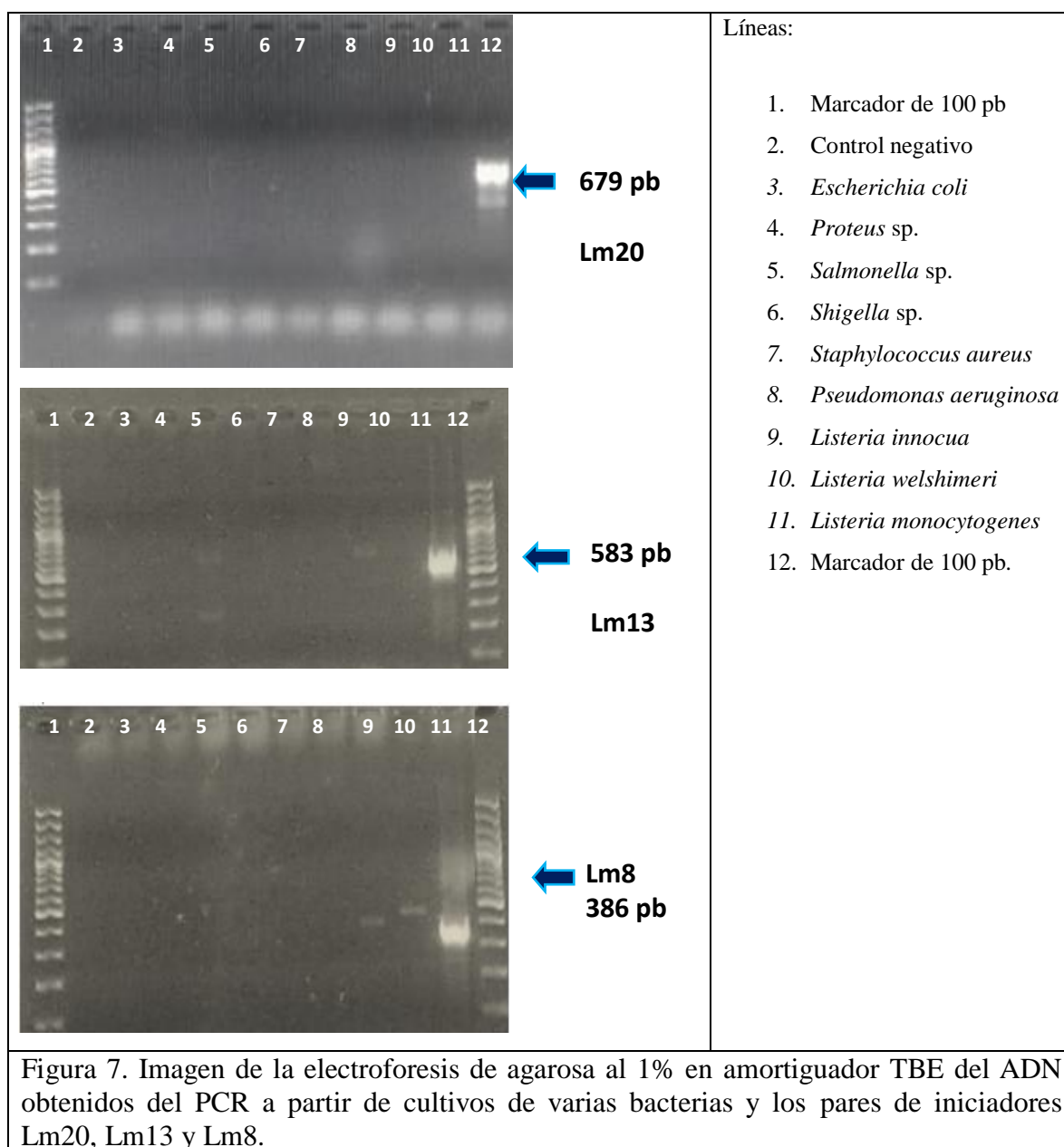
Se evalúa la sensibilidad analítica con respecto a la cantidad de células bacterianas con los tres pares de iniciadores en estudio, así se logran los resultados presentados en la figura 6.

Los resultados mostraron como los iniciadores se pueden detectar por la técnica de PCR el ADN de hasta 5 UFC o menos al observarse bandas en los amplificados de Lm20 conseguidos a partir del material genético extraído de las diluciones de 8×10^{-7} (5 UFC) y para Lm8 y Lm13 se demuestra amplificación a partir del ADN de las suspensiones de las diluciones de 4×10^{-7} (11 UFC) y 10^{-8} (4,3 UFC).



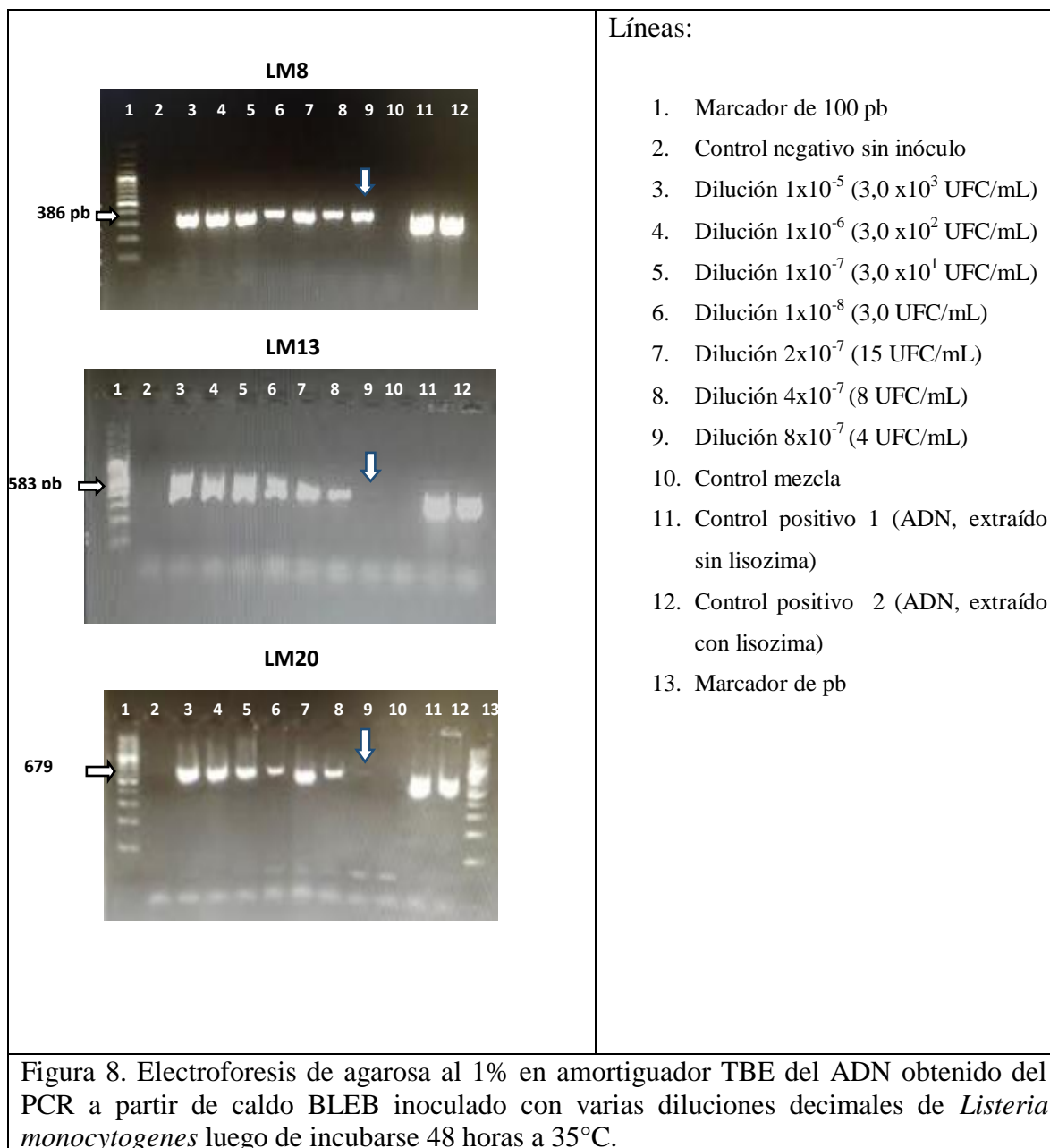
Determinación de la especificidad analítica de la técnica de detección de *Listeria monocytogenes* utilizando los pares de iniciadores Lm8, Lm13 y Lm20

La especificidad analítica de la reacción de PCR se evalúa con ADN extraído de *Listeria monocytogenes* y el de otras especies bacterianas, incluidas dos del género *Listeria*. Se alcanzan los resultados observados en la figura 7. En las imágenes se advierte al iniciador Lm20 amplificando el ADN de *Listeria monocytogenes*. En el caso de los pares de iniciadores Lm8 y Lm13 se observa una banda claramente visible para esta especie, pero otras bacterias del género *Listeria* como lo son *L. innocua* y *L. welshimeri* generan bandas muy tenues, esto evidencia una menor especificidad de estos marcadores.



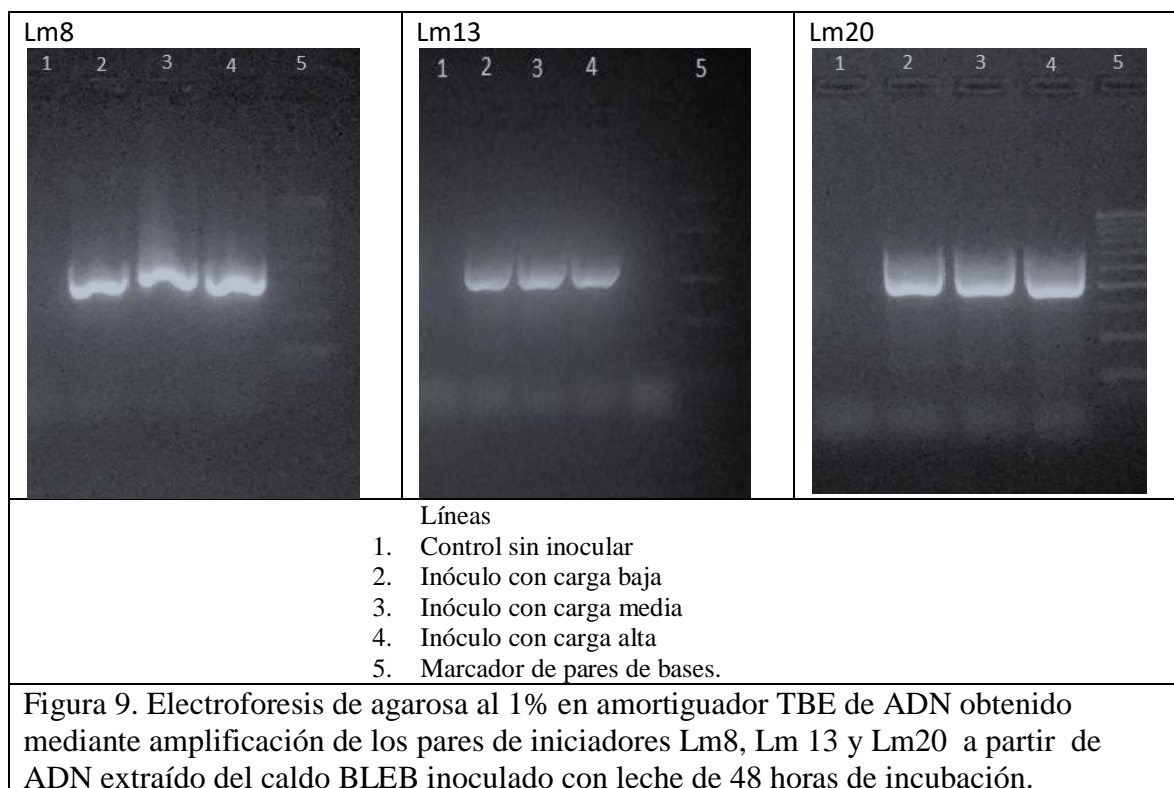
Evaluación de la técnica de detección de *Listeria monocytogenes* amplificando los iniciadores Lm8, Lm13 y Lm20 a partir del enriquecimiento selectivo de 48 horas en caldo BLEB

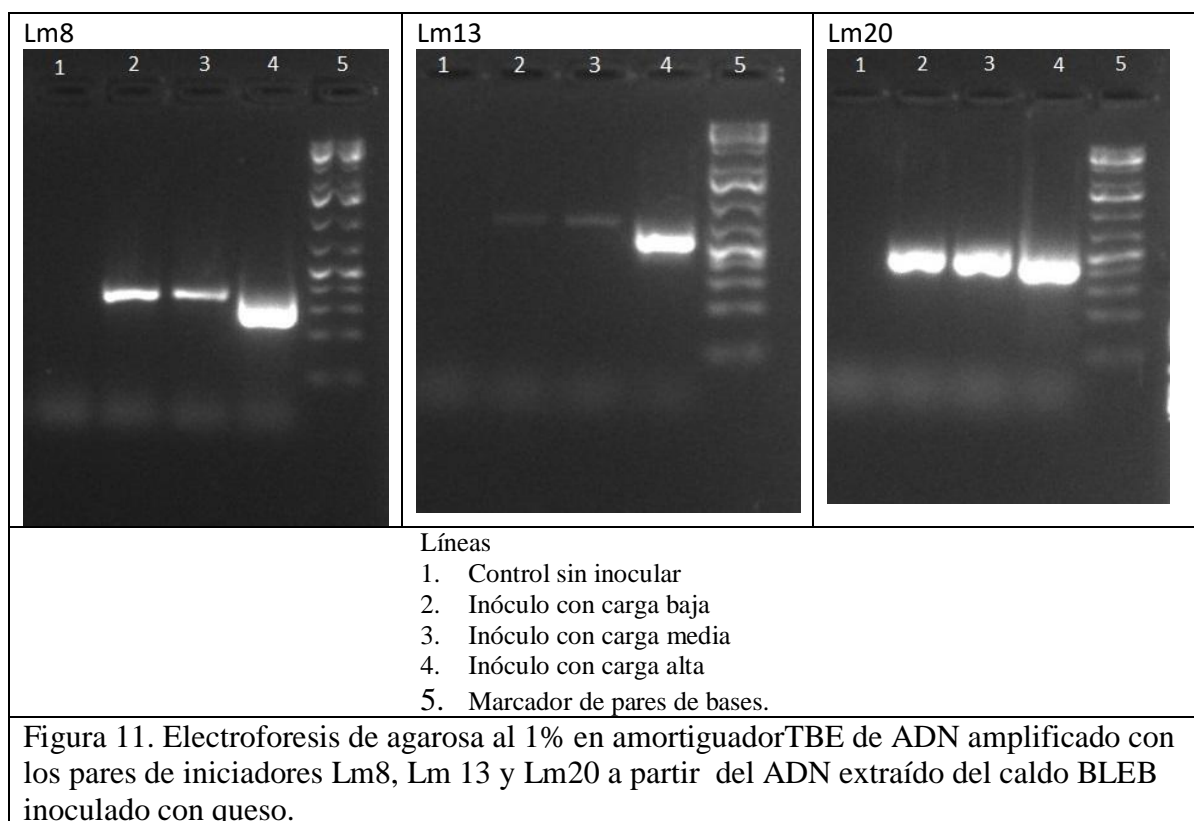
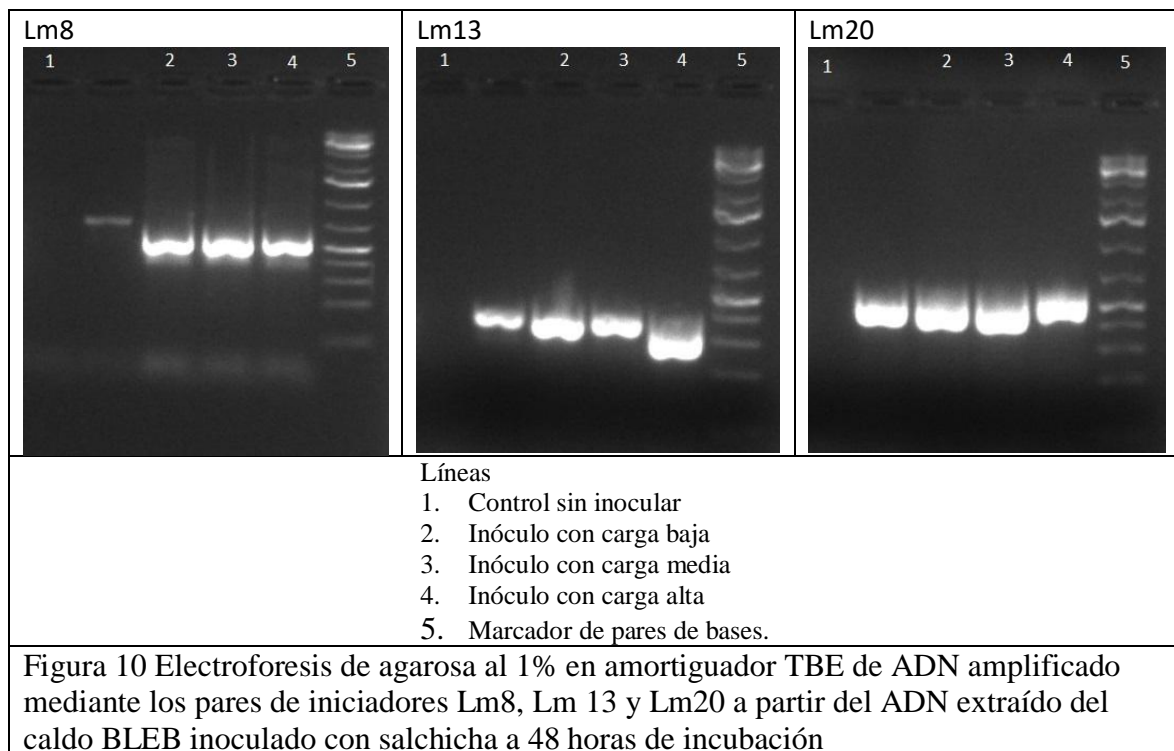
Una vez realizadas las pruebas mediante PCR con los pares de iniciadores Lm 8, Lm 13 y Lm 20 para la detección de *Listeria monocytogenes* se desarrolló un ensayo con varias diluciones realizadas a partir de una suspensión 0,5 Mac Farland ($3,0 \times 10^8$ UFC/mL), que se inocularon al caldo BLEB, se incubaron 48 horas y luego de esto se tomaron alícuotas a las que se les extrae el ADN y se lleva a cabo la respectiva prueba de PCR obteniéndose los resultados presentados en la figura 8. Aquí se observa que en todas las diluciones realizadas se genera una banda visible de ADN amplificado, siendo más evidente para el iniciador Lm8.



Determinación de la presencia de *Listeria monocytogenes*, utilizando PCR punto final con los iniciadores Lm20 en muestras de queso, embutidos y leche inoculadas con esa bacteria e incubadas durante 48 horas en caldo BLEB

Una vez definidas las condiciones para realizar la amplificación de los iniciadores a partir de cultivos enriquecidos selectivamente en caldo BLEB, se hicieron las pruebas con muestras de leche, salchicha y queso con inóculos bajo, medio y alto incubándose 48 horas a 35°C en caldo BLEB. Los resultados se muestran en la figura 9 para la matriz leche, la figura 10 para la matriz salchicha y la figura 11 de queso donde es posible ver que en los tres tipos de muestras de alimentos y en los tres niveles se aprecia una banda de ADN amplificado. En el caso de la muestra de queso, las bandas se observan más tenues para el amplificado de Lm13 del ADN de los inóculos bajo y medio.

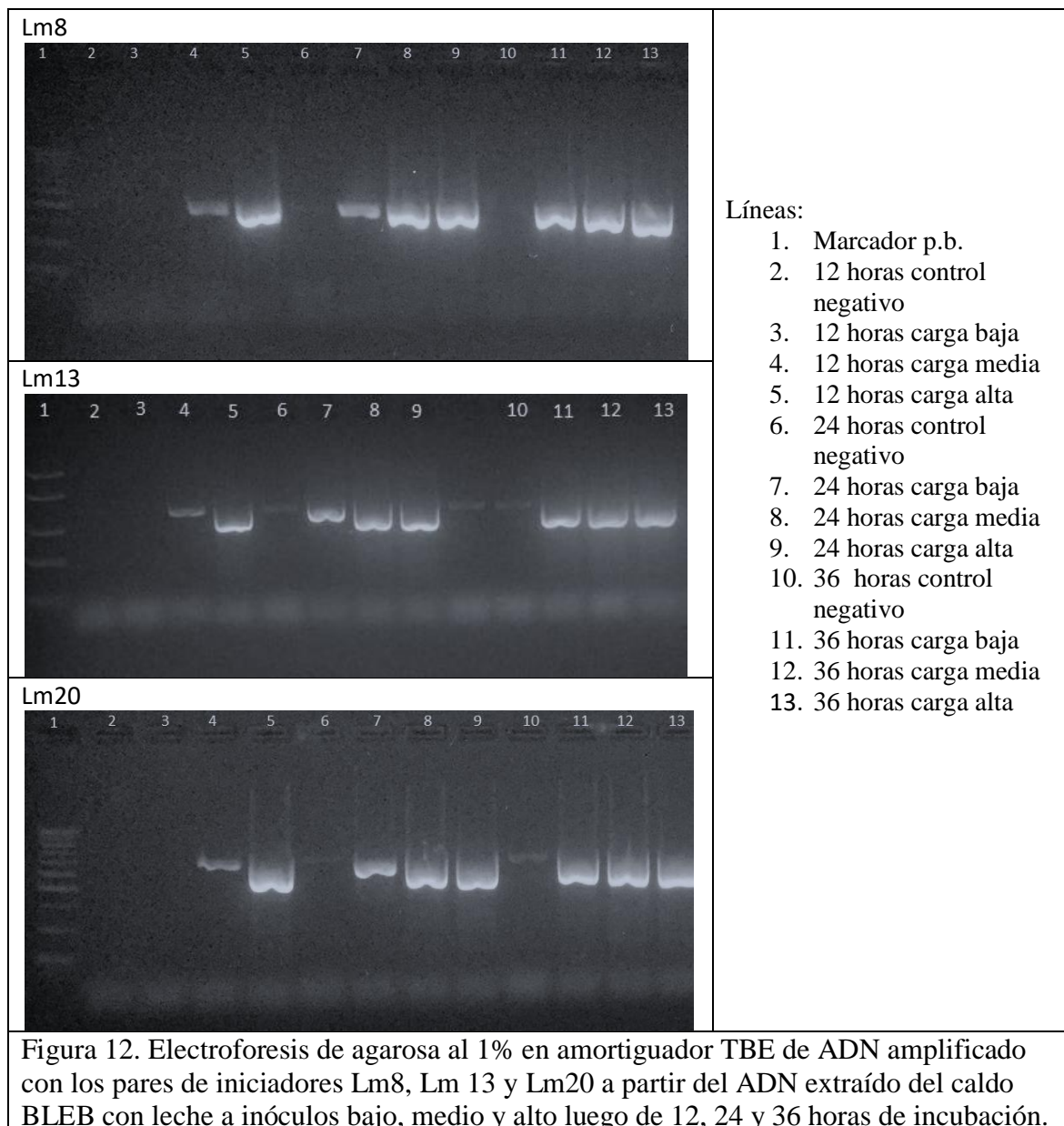




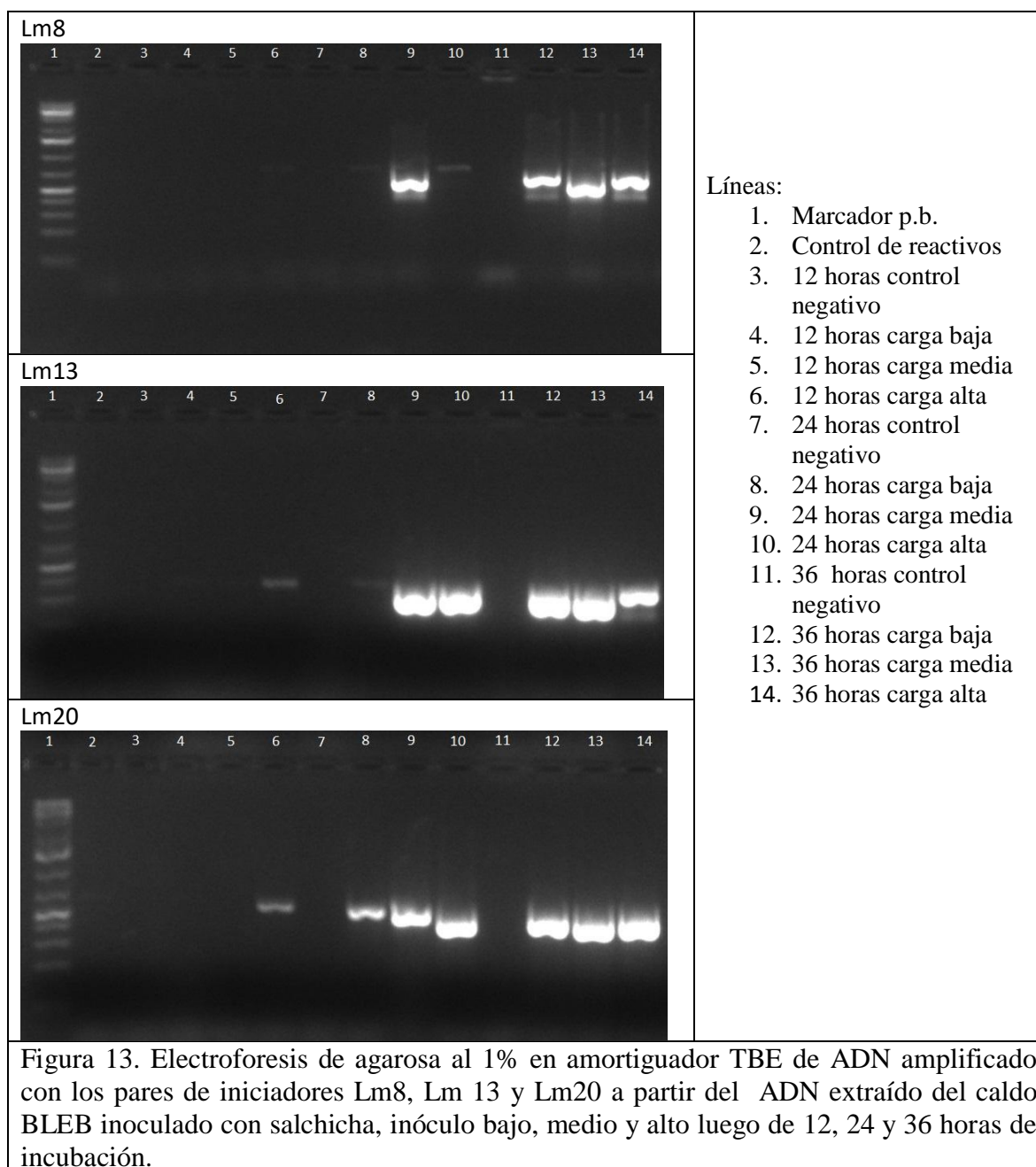
Evaluación de la técnica de detección de *Listeria monocytogenes* amplificando los pares de iniciadores Lm8, Lm13 y Lm20 a partir del enriquecimiento selectivo de 12, 24 y 36 horas en caldo BLEB

Se procede a repetir el ensayo anterior disminuyendo los tiempos de incubación en 12, 24 y 36 horas.

En el caso de la matriz leche (figura 12) los tres pares de iniciadores para los tres niveles de inoculación, bajo (10^1 UFC), medio (10^4 UFC) y alto (10^7 UFC), evidencian la presencia de ADN amplificado para las 24 y 36 horas de incubación. A las 12 horas solo se observa para el inóculo medio y el alto.

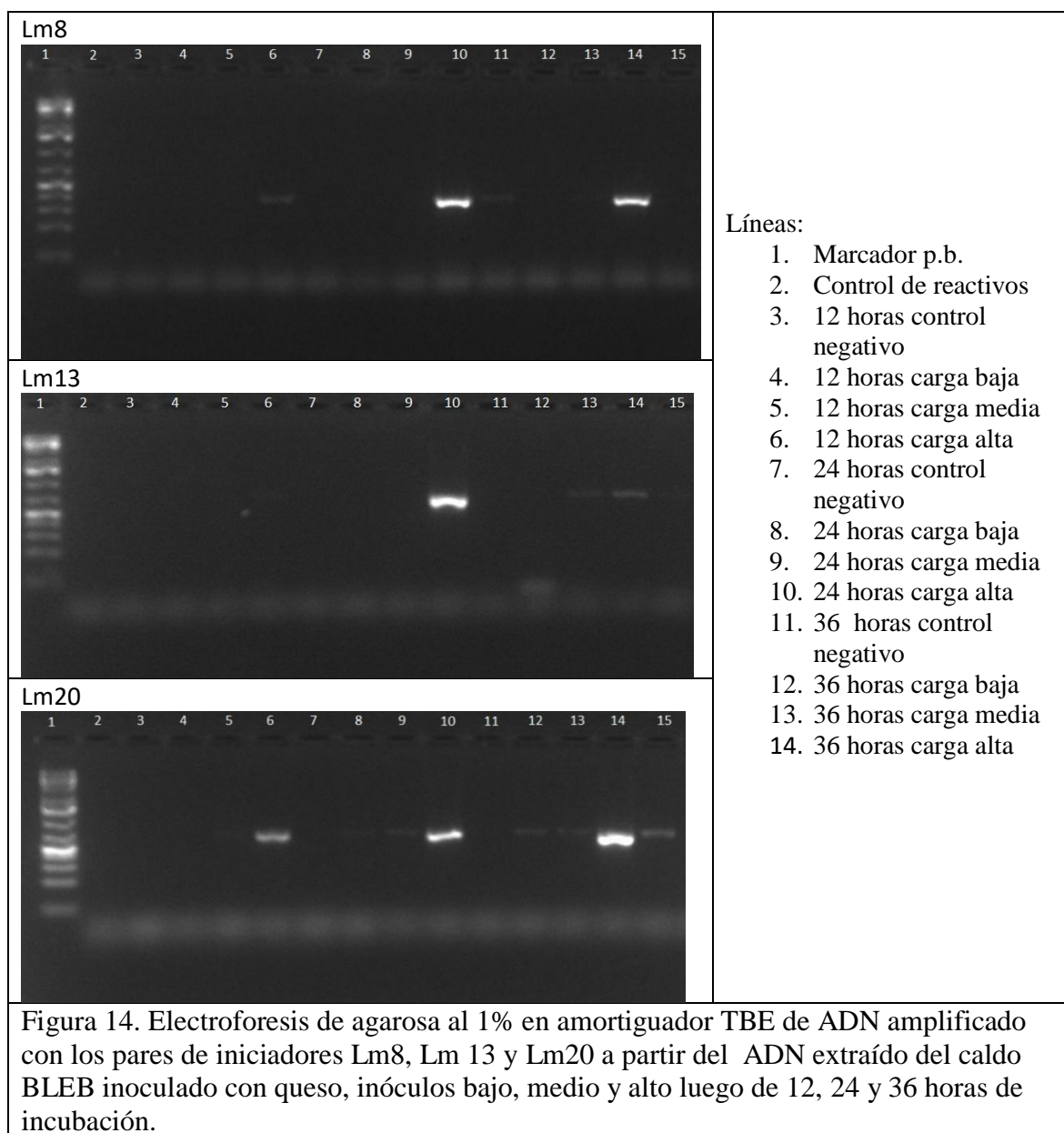


Al realizar este ensayo con la matriz salchicha (figura 13) se encuentra evidencia de amplificación de ADN para los tres pares de iniciadores a las 36 horas de incubación en los tres niveles, inóculos bajo (10^1 UFC), medio (10^4 UFC) y alto (10^7 UFC). A las 24 horas, también, pero las bandas observadas para Lm20 son más claras con respecto a los otros dos pares de iniciadores. A las 12 horas únicamente se puede percibir la presencia de bandas para el inóculo alto.



En la figura 14 se observa en la matriz queso un resultado similar a las matrices anteriores. El menor tiempo de incubación capaz de evidenciar la amplificación de ADN en los tres niveles de inoculación bajo (10^1 UFC), medio (10^4 UFC) y alto (10^7 UFC) fue 24 horas y se obtuvo con el iniciador Lm20. Para esta matriz es evidente que las bandas de ADN

amplificado son más tenues que las obtenidas al trabajar con salchicha o leche, de hecho, es esta última donde se observan las bandas más claras.



De acuerdo a los resultados que se obtienen al evaluar la amplificación de ADN utilizando los tres pares de iniciadores en las tres matrices de alimentos en diferentes tiempos, se escoge trabajar únicamente con el cebador Lm20 para realizar la prueba de validación en un tiempo de 24 horas de incubación en enriquecimiento selectivo.

Validación de la técnica de detección de *Listeria monocytogenes* en leche, queso y salchichas por la amplificación del iniciador LM20 luego de un enriquecimiento selectivo de 24 horas en caldo BLEB

Para la validación de la propuesta de técnica para la detección de *Listeria monocytogenes* en las tres matrices en estudio se trabajó con 10 réplicas a las cuales se les agregó un inóculo de este patógeno y uno mayor en un log UFC de otros microorganismos, otras 10 réplicas similares pero sin *Listeria monocytogenes* y una muestra sin ningún tipo de inóculo. Se obtuvieron los resultados presentados en las figuras 15, 16 y 17. En las 10 réplicas de leche que fueron inoculadas con *L.monocytogenes* 6 fueron positivas y en las no inoculadas una muestra mostró una banda en la electroforesis. Para la matriz salchicha, siete muestras inoculadas y dos no inoculadas dieron reacción positiva. En el caso de las réplicas de queso, solo una de las inoculadas dio resultado positivo.

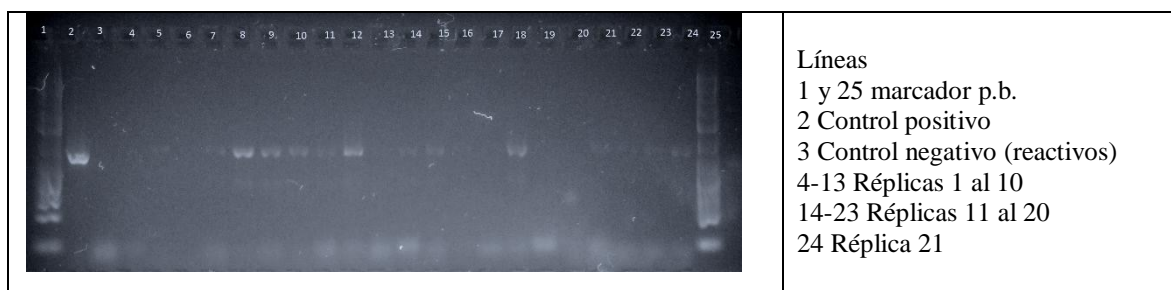


Figura 15. Electroforesis de agarosa al 1% en amortiguador TBE de ADN amplificado con el iniciador Lm20 a partir del ADN extraído del caldo BLEB durante la validación de la técnica para la detección de *Listeria monocytogenes* en la matriz leche.

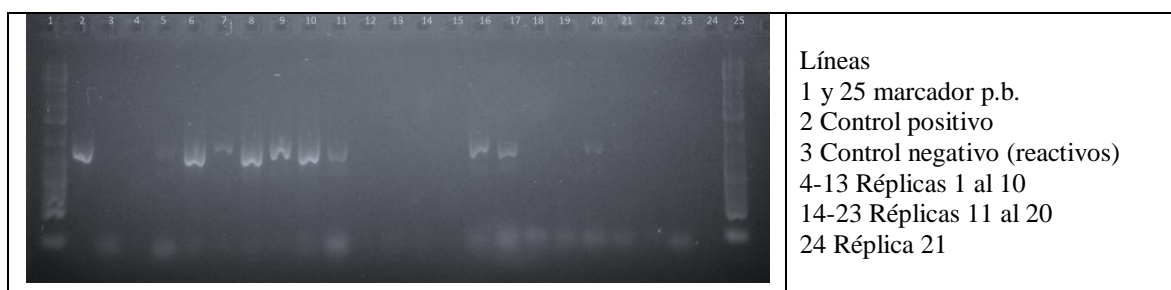
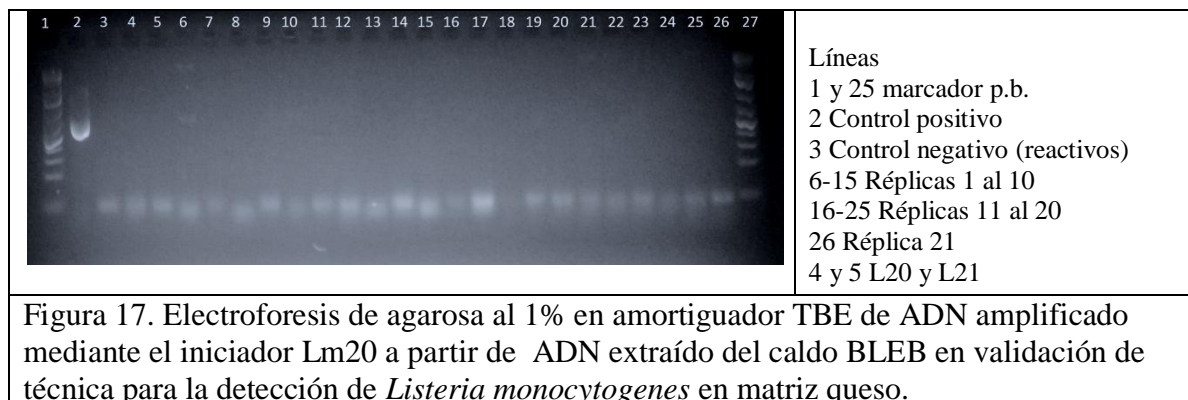


Figura 16. Electroforesis de agarosa al 1% en amortiguador TBE de ADN amplificado con el iniciador Lm20, a partir de ADN extraído de caldo BLEB en validación de técnica para la detección de *Listeria monocytogenes* en la matriz salchicha.



Como parte de la validación se calculan los respectivos parámetros comparándolos con los de la técnica de referencia y se obtienen los resultados presentados en los cuadros 7, 8 y 9.

Cuadro 7. Parámetros de validación obtenidos para la detección de *Listeria monocytogenes* en leche utilizando PCR con el iniciador Lm20 luego de 24 horas de incubación en enriquecimiento selectivo en caldo BLEB

- Especificidad: 60%
- Falsos negativos 40%
- Sensibilidad 90%
- Falsos positivos: 10%
- Exactitud relativa: 75
- Índice de concordancia de Kappan: 0,61

Cuadro 8. Parámetros de validación obtenidos para la detección de *Listeria monocytogenes* en salchicha utilizando PCR con el iniciador Lm20 luego de 24 horas de incubación en enriquecimiento selectivo en caldo BLEB

- Especificidad: 70%
- Falsos negativos 30%
- Sensibilidad 80%
- Falsos positivos: 20%
- Exactitud relativa: 75
- Índice de concordancia de Kappan: 0,60

Cuadro 9. Parámetros de validación obtenidos para la detección de *Listeria monocytogenes* en queso utilizando PCR con el iniciador Lm20 luego de 24 horas de incubación en enriquecimiento selectivo en caldo BLEB

- Especificidad: 10%
- Falsos negativos 90%
- Sensibilidad 100%
- Falsos positivos: 0%
- Exactitud relativa: 55
- Índice de concordancia de Kappan: 0,4

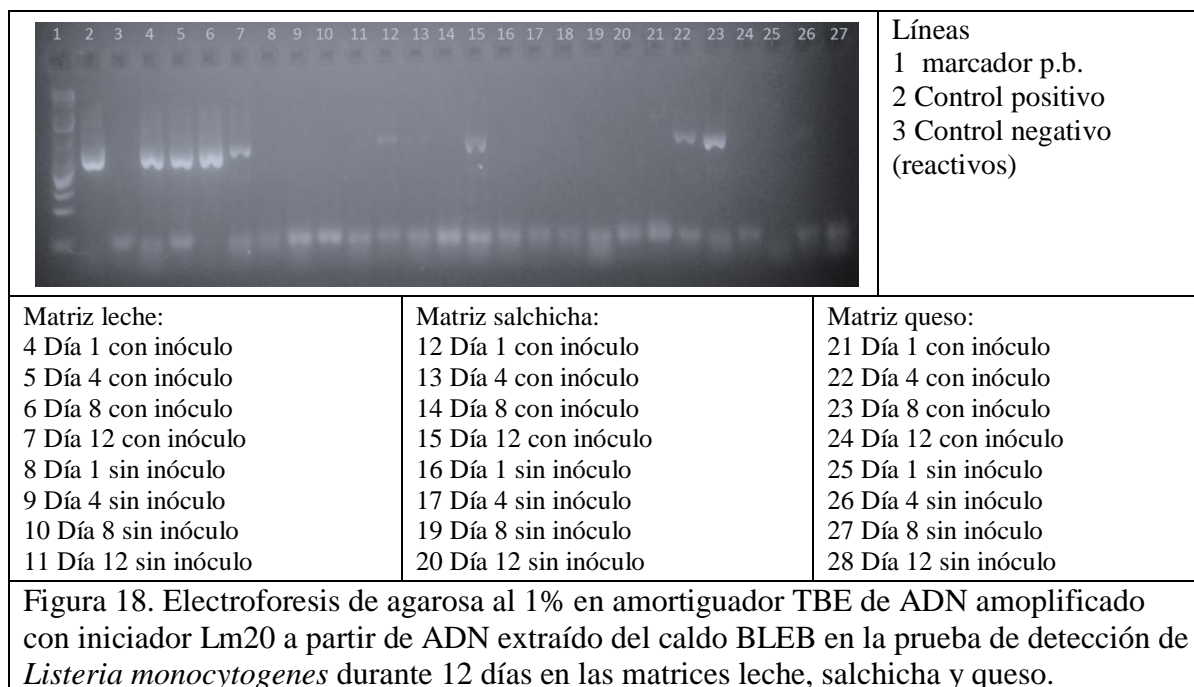
En las pruebas de validación se montó la técnica en estudio en paralelo con la técnica de referencia que usa el mismo enriquecimiento selectivo, pero con 48 horas de incubación, rayado en agar Oxford y una posterior identificación bioquímica. En esta última se obtuvieron los siguientes resultados presentados en el cuadro 10.

Cuadro 10. Resultado del análisis de presencia/ausencia de <i>Listeria monocytogenes</i> cuando se realiza el montaje por el método de referencia (BAM-FDA 2018)			
Réplicas	Resultado en la matriz leche	Resultado en la matriz salchicha	Resultado en la matriz queso
1 a 10	Presente	Presente	Presente
11 a 20	Ausente	Ausente	Ausente
21	Ausente	Ausente	Ausente

Evaluación de la detección de *Listeria monocytogenes* en leche, queso y salchicha inoculados y almacenados en refrigeración durante 1, 4, 8 y 12 días utilizando el iniciador Lm20 luego de 24 horas de enriquecimiento selectivo en caldo BLEB

Se realizó la prueba de recuperación a lo largo del tiempo para evaluar si la propuesta de técnica para la detección de *Listeria monocytogenes* permitía obtener resultados positivos cuando las matrices en estudio eran inoculadas y se hacía a la prueba en diferentes tiempos. De cada una de las matrices se tomaron muestras en el día 1, 4, 8 y 12 y se evaluaron con la metodología propuesta.

Como se muestra en la figura 18, al analizar la matriz de leche inoculada ésta generó resultados positivos en los días 1, 4, 8 y 12, donde se observa en el gel de la electroforesis bandas muy claras en todos los días evaluados. Para la matriz salchicha se obtiene un resultado similar, sin embargo, la intensidad de las bandas es menor en los cuatro días evaluados. En el caso del queso, solo se logra un resultado positivo para los días 4 y 8. Cuando se montó la técnica de referencia, con estas mismas réplicas, en paralelo a las pruebas de la metodología propuesta, se obtuvo como resultado la presencia de *Listeria monocytogenes*.



Discusión

Listeria monocytogenes es uno de los principales patógenos en la industria alimentaria y su determinación en alimentos en el menor tiempo posible resulta crucial para ésta (Ryser & Donnelly 2015). En este trabajo se planteó una modificación a la técnica normalizada de referencia que utiliza caldo BLEB como enriquecimiento selectivo en la que a partir de esta etapa se hace la detección de *L.monocytogenes* con PCR punto final amplificando los pares de iniciadores Lm8, Lm13 y Lm20 planteados por Tao y colaboradores (2015).

Se buscaba que la técnica planteada fuera reproducible por otros laboratorios. Por esta razón se decidió trabajar con un kit comercial de extracción de ADN. Éste, al igual que muchas presentaciones del mercado sugieren la implementación de un paso previo que utilice lisozima para trabajar con bacterias Gram positivas, como el caso de *L.monocytogenes*, pues poseen una pared de peptidoglicano más gruesa que la de las Gram negativas y esto puede interferir en la eficiencia de la extracción de ADN. De acuerdo con los resultados presentados en el cuadro 1 se determina que efectivamente el uso de lisozima diluida en amortiguador Tris-HCl permite obtener una mayor cantidad de ADN, por lo tanto, la recomendación sería utilizar esa enzima, aunque en caso de no tenerse disponible, se puede realizar la extracción con el kit y sin lisozima obteniéndose menos material genético pero suficiente para realizar la determinación. En un estudio de Quigley y colaboradores (2012) se compararon siete métodos de extracción de ADN a partir de leche y queso para usarlo posteriormente en la detección de *Listeria monocytogenes* y *Salmonella*. Concluyen que los métodos que emplean enzimas líticas, entre ellas lisozima, son los que permiten obtener mejores resultados, lo cual coincide con lo descrito acá. López y Mejía (2012) evaluaron dos técnicas para la extracción de ADN para la detección de *Listeria monocytogenes* en jamón salchicha y chorizo y en este caso no se utilizaron enzimas. Una técnica usó solventes orgánicos y la otra PBS y Tween 20. En ambas se obtuvieron resultados óptimos siendo la segunda la que dio mejor resultado. Esta revisión de la literatura nos confirma que si bien las técnicas de extracción de ADN que utilizan enzimas como la lisozima permiten obtener una cantidad y una calidad muy buena del

producto, otras técnicas que no los usan también dan resultados que permiten posteriormente una amplificación eficiente de ADN.

Una vez establecidas cuáles son las mejores condiciones para la extracción de ADN, como parte de la optimización de la técnica, se buscó determinar las concentraciones de los reactivos por utilizar en la PCR. Precisamente para asegurar que la técnica sea reproducible por otros laboratorios se emplea un reactivo Master Mix 2X (Dream Taq PCR Master Mix) que contiene la enzima *Taq* polimerasa, MgCl y los nucleótidos requeridos para lograr la reacción. Los pares de iniciadores se utilizaron con una concentración inicial de 10 μ M y se hicieron pruebas para determinar si la concentración de ADN de los iniciadores que daba mejor resultados era de 0,4 μ M ó 0,8 μ M. La estandarización se realizó según las condiciones indicadas por Tao y colaboradores (2015) tratando de adecuarse a las condiciones de trabajo en el laboratorio. Se desarrolló una prueba con estas dos concentraciones como ADN puro y diluciones de las mismas, amplificando el segmento Lm20 y se observó para ambas evidencia de amplificación de ADN en la electroforesis en gel de agarosa (figura 1). Por estos resultados se decide trabajar con la menor concentración que permite obtener evidencia de la amplificación de ADN, es decir 0,4 μ M.

De esta forma se procede a probar la amplificación de ADN con el uso de las secuencias Lm8, Lm13 y Lm20. Para esto se utiliza ADN de *Listeria monocytogenes* extraído con lisozima y sin ella en diferentes concentraciones. En todos los casos, como se observa en las figuras 2, 3 y 4, se obtiene evidencia de amplificación en la electroforesis en gel de agarosa, lo cual confirma que los pares de iniciadores funcionan tal y como lo describió Tao y colaboradores (2015).

Se evalúa la sensibilidad de la reacción de PCR utilizando varias diluciones decimales de ADN y con ADN extraído a partir de varias diluciones decimales de cultivo bacteriano. Los resultados son similares a los descritos por Tao y colaboradores (2015) donde indicaron que los pares de iniciadores más sensibles son Lm8 y Lm13 que detectan hasta fg/ μ L (figura 5), en el caso de las diluciones de cultivo de *L.monocytogenes* se determinó que los tres pueden detectarse en el ADN de aproximadamente 5 a 1 UFC (figura 6).

La sensibilidad de esta reacción de PCR puede considerarse similar a los límites de sensibilidad que otros autores han reportado para otros iniciadores empleados para la detección de *Listeria monocytogenes* en alimentos (Varadaraj 2010) y por lo tanto los resultados obtenidos se consideran aceptables para una técnica que pretende determinar la presencia de ese patógeno en alimentos. Por ejemplo, en el caso de segmentos de iniciadores del gen *hlyA*, dependiendo de la secuencia que se utilice se ha informado sensibilidades variables, de hasta 6 UFC/g detectados en repollo mediante PCR tiempo real (Hough et al 2002). Para el par iniciador *iap* se ha informado límites de detección de 3 UFC/g en un PCR transcriptasa reversa (Kleing & Juneja 1997) y de hasta 4 UFC/g del iniciador *actA* en queso en un PCR de punto final (Longhi et.al 2003).

Para evaluar la especificidad se utilizaron varias cepas de microorganismos incluyendo tres del género *Listeria*: *L.innocua*, *L.welshimeri* y *L.monocytogenes*. Los resultados se muestran en la figura 7 y llevan a las mismas conclusiones que presentaron Tao y colaboradores (2015) al respecto: el iniciador Lm20 posee una mayor especificidad que Lm8 y Lm13, ya que estos últimos presentan una banda débil en los casos de *L.innocua* y *L.welshimeri* lo que quiere decir que en el ADN de esta especie hay secuencias similares a la del ADN de *L.monocytogenes* que es reconocida por estos iniciadores. En el caso del estudio de Dong-Hyen y colaboradores (2014) para la detección de *L.monocytogenes* en PCR punto final usaron una secuencia de *hlyA*. Ellos indican que no se presentaron bandas para ninguna de las doce especies bacterianas que trabajaron (incluyendo *L.innocua* y *L.welshimeri*), sin embargo, el límite de detección de esta técnica fue de $7,2 \times 10^3$ UFC, mucho mayor a 5 UFC reportado en este ensayo.

En otros estudios para detección de *Listeria monocytogenes* en varios tipos de alimentos se ha informado de límites de detección similares o mayores a los obtenidos en este estudio: $4,3 \text{ fg}/\mu\text{L}$ y 5 UFC/mL lo que hace sugerente su uso, aun con el resultado observado en la especificidad relativa. En estas otras investigaciones se utilizaron otras secuencias de iniciadores y se obtuvieron límites de detección de $3 \text{ ng}/\mu\text{L}$ (De la Rosa-Zariñana *et al.* 2018) con la técnica de PCR punto final y 10 UFC/mL (Reyes 2017), 1 a 5 UFC (O'Grady *et al.* 2009) y 10 UFC/25 g (Gianfranceschi 2014).

Los resultados obtenidos evidencian como la reacción de PCR para detectar *Listeria monocytogenes* con el uso de los pares de iniciadores Lm8, Lm13 y Lm20, descrita en el artículo de Tao y colaboradores (2015), fue reproducida en condiciones similares y con los resultados descritos en los laboratorios de la Universidad de Ciencias Médicas, y se evidencia su uso para la detección de este patógeno de alimentos.

Luego de la optimización de la técnica, se tienen las siguientes indicaciones para el procedimiento de PCR de los iniciadores Lm8, Lm13 y Lm20 para la detección de *Listeria monocytogenes*:

- a. Para la extracción de ADN:
 1. Lavar las células bacterianas con PBS, centrifugar y descartar el sobrenadante.
 2. Agregar 150 μL de amortiguador de lisis más lisozima.
 3. Ajustar el amortiguador de lisis con lisozima 1:5 a partir de una solución de lisozima de 100 mg/mL más 120 μL de amortiguador de lisis del kit de extracción.
 4. Incubar la lisozima en amortiguador de lisis a 37°C durante 30 minutos.
 5. Añadir 25 μL de proteinasa K y continuar con las instrucciones que indica la casa comercial.

- b. Para el montaje del PCR, por cada muestra se utilizaron los siguientes volúmenes y concentraciones:

Cuadro 11. Volúmenes y concentraciones de los reactivos que se utilizan para la reacción de PCR en la que se amplifican los pares de iniciadores Lm8, Lm13 y Lm8.	
Reactivo	Cantidad (μL)
Master Mix 2X	12,5
Iniciador F (Lm8, Lm13 o Lm20) 0,4 μM	1,0
Iniciador R (Lm8, Lm13 o Lm20) 0,4 μM	1,0
ADN molde	2,0
Agua libre de nucleasas para PCR	8,5
Volumen total de reacción	25

- c. Temperaturas y tiempos del programa del termociclador para la amplificación de los pares de iniciadores Lm8, Lm13 y Lm20

Para esto se utilizaron los mismos tiempos y temperaturas indicados por Tao y colaboradores (2015) donde inicia con 3 minutos a 94°C, luego de esto vienen 35 ciclos que incluyen cada uno 30 segundos a 94°C, 30 segundos a 60°C y 40 segundos a 72°C. Finalmente se concluye con 10 minutos a 72°C, para un tiempo total aproximado de 66 minutos. El esquema de temperaturas viene siendo semejante al de otros autores, requiriendo un poco más de tiempo, como De la Rosa-Zariñana y colaboradores (2018) con 95°C durante un minuto, 35 ciclos de 30 segundos a 94°C, 20 segundos a 53°C y 30 segundos a 74°C, para finalmente terminar con 8 minutos de extensión a 74°C con un tiempo de reacción de 56 minutos aproximadamente; Potou y otros (2005) y Torres y colaboradores (2004) con 1 minuto a 95°C, 40 ciclos de 30 segundos a 94°C, 20 segundos a 51°C, 30 segundos a 74°C y una extensión de 8 minutos a 74°C, que es un tiempo aproximado de 62 minutos.

Enriquecimiento selectivo durante 48 horas

En alimentos contaminados con *Listeria monocytogenes* siempre es probable encontrar esta bacteria en condiciones de estrés, baja cantidad y acompañada de otros microorganismos. Es por esta razón que las técnicas normalizadas incluyen en la primera parte de la marcha analítica la incubación de la muestra en un medio de enriquecimiento selectivo que favorezca el crecimiento de *Listeria monocytogenes* e inhiba en lo posible a otros microorganismos (Law *et al.* 2015, Keys *et al.* 2016).

Tao y colaboradores (2015) utilizan como medio de enriquecimiento caldo infusión cerebro corazón, sin algún componente inhibitorio que contribuya a favorecer el crecimiento de *Listeria monocytogenes* con respecto a otros microorganismos. Si esto se aplicara a otras muestras distintas a leche pasteurizada y que tuvieran cargas de microbiota acompañante más alta, tal y como se utilizó en el estudio, existe la posibilidad de no lograr recuperación de *L.monocytogenes* en una cantidad suficiente para detectar en la técnica de PCR, pues la

microbiota no solo consume nutrientes, sino también puede secretar sustancias que inhiban el crecimiento de la bacteria patógena en cuestión (Cauchon *et al.* 2017).

Por esta razón, se considera como estrategia más oportuna para recuperar una cantidad de células de *Listeria monocytogenes* suficiente para la obtención de ADN en una concentración adecuada para la amplificación por PCR y que permita ser detectado utilizando un medio de enriquecimiento selectivo.

La técnica que FDA presenta en el BAM (2017) utiliza el caldo buferizado enriquecido para *Listeria*. El contenido de este medio se detalla en el cuadro 10.

Cuadro 12. Composición del caldo buferizado enriquecido para <i>Listeria</i>	
Reactivo	Cantidad por Litro de medio de cultivo
Caldo tripticasa soya	30 g.
Extracto de levadura	6 g.
Fosfato monopotásico (anhidro)	1,35g/L
Fosfato disódico (anhidro)	9,6g/L
Piruvato de sodio (sal sódica)	1,11g/L
Agua destilada	1 L
Acirflavina HCl	10 mg/L
Ácido nalidíxico (sal sódica)	40 mg/L
Cicloheximida	50 mg/L

Fuente: BAM-FDA 2017

El caldo BLEB posee fosfato monopotásico y fosfato disódico que permite aumentar la capacidad buferizante del medio, de esta forma mejora las propiedades de enriquecimiento del medio. Además posee acirflavina, capaz de inhibir otras bacterias Gram positivas, ácido nalidíxico que inhibe Gram negativas y cicloheximida que evita el crecimiento de mohos y levaduras (Law *et al.* 2015). A pesar de la presencia de estos componentes inhibitorios la literatura informa el crecimiento de otros microorganismos acompañantes y

la inhibición, por parte de estos, del crecimiento de *Listeria monocytogenes*, sin embargo, siempre logra presentar cantidades suficientes que permiten detectar a la bacteria blanco en los siguientes pasos del procedimiento (Keys *et al.* 2013, Dailey *et al.* 2014, Law *et al.* 2015, Dailey *et al.* 2015, Keys *et al.* 2016, Cauchon *et al.* 2017).

Por tal motivo, se propone como procedimiento de detección de *Listeria monocytogenes* en alimentos la modificación del procedimiento normalizado presentado por la FDA. Este incorpora luego de la etapa del enriquecimiento selectivo a 35°C durante 48 horas (BAM-FDA 2017) la extracción inmediata de ADN y la detección de los iniciadores Lm8, Lm13 y Lm20 para las tres matrices en estudio.

Tal y como se observa en las figuras 9, 10 y 11 se obtiene evidencia clara de la amplificación de los tres pares de iniciadores con los inóculos de 10^1 UFC, 10^4 UFC y 10^7 UFC. Esto indica que en el tiempo definido para el enriquecimiento selectivo se obtiene suficiente carga microbiana de *Listeria monocytogenes* para tener un evidente resultado positivo en PCR.

Law y colaboradores (2015) señalan los métodos de enriquecimiento selectivos utilizados en las técnicas tradicionales para detectar *Listeria monocytogenes* a partir de aislamiento en medios de cultivo e identificación, como idóneos para la recuperación de concentraciones entre 10^4 y 10^5 UFC/mL luego del enriquecimiento selectivo a partir de un mínimo de 1 UFC/mL. Específicamente para el caso del caldo BLEB, Cauchon y otros (2017) señalan en un alimento inoculado únicamente con *Listeria monocytogenes* se puede recuperar hasta $6,1 \pm 1,2$ logUFC/mL. Si estos datos aportados por la literatura se comparan con los obtenidos en los ensayos de optimización de la técnica de PCR que se está trabajando en este estudio la concentración de *L.monocytogenes* está por encima de lo mínimo que se puede detectar, lo que plantea la posibilidad de poder evidenciar la presencia de esta bacteria antes de las 48 horas; esto implicaría un menor tiempo de detección que en la industria alimentaria puede resultar muy valioso.

Enriquecimiento selectivo en tiempos menores de 48 horas de incubación

De acuerdo con los resultados obtenidos en una incubación de un enriquecimiento selectivo durante 48 horas, la optimización de la técnica y las posibles concentraciones de *Listeria monocytogenes* que informa la literatura, se consideró factible evaluar la posibilidad de detectar la presencia de esta bacteria en tiempos menores a 48 horas, lo cual sería otra modificación a la técnica presentada por FDA.

Se plantea, entonces, repetir el ensayo para las matrices de leche, salchicha y queso con tres diferentes concentraciones de inóculo de bacterias en tiempos menores de incubación: 12, 24 y 36 horas. Los resultados se observan en las figuras 12, 13 y 14.

Según lo presentado en las figuras 12, 13 y 14, solo a partir de las 24 horas en las tres matrices se observa evidencia de la presencia de ADN de *Listeria monocytogenes* para los tres niveles de inóculos, por lo que se determina que este sería el tiempo mínimo de los probados en los que se puede detectar la presencia de esta bacteria por PCR. Para las tres matrices, el par de iniciadores que da resultados más evidentes es el de Lm20, lo cual coincide con lo indicado anteriormente por Tao y otros (2015) que señalan que de los tres pares de cebadores éste es el más sensible.

Cuando las muestras inoculadas se agregaron al caldo BLEB, la carga inoculada de *Listeria monocytogenes* se diluyó en los 225 mL del medio. Luego de pasar la fase lag y empezar a crecer exponencialmente esta bacteria tendría una cantidad mínima requerida para ser detectada por la técnica de PCR (Van Derlinden *et al.* 2013) a las 24 horas. Esto permitiría disminuir los tiempos de respuesta del laboratorio al montar esta prueba microbiológica a prácticamente poco más de un día. Esto en industria alimentaria constituye una ventaja significativa para un método de análisis (Ryser & Donnelly 2015).

Otros estudios de técnicas moleculares de detección de *Listeria monocytogenes* en alimentos y con otros iniciadores han utilizado 24 horas como tiempo de incubación en la etapa de enriquecimiento selectivo, como es el caso de Reyes y colaboradores (2018) que utilizaron una técnica de PCR tiempo real para evaluar la presencia de esta bacteria en carne y O'Grady y otros (2009) que trabajaron con matrices de diversa naturaleza.

A partir de los resultados obtenidos se plantea como procedimiento para la detección de *Listeria monocytogenes* en alimentos una etapa de enriquecimiento selectivo con caldo BLEB que dure 24 horas y una detección mediante PCR que solo utilice el iniciador Lm20.

Se procede, entonces a validar esta propuesta de técnica.

Validación de la técnica propuesta

Los procedimientos de validación son los que permiten asegurar que una técnica es apta para el propósito que se desea de ésta (EPA-FEM 2009). Para este caso se plantea un modelo de experimentación que cumple con recomendaciones de la Agencia de Protección Ambiental de Estados Unidos para Métodos de Validación, la Guía de Validación para Métodos Microbiológicos para Alimentos y Superficies de AOAC (2012) y el procedimiento ISO 16140:2016 Microbiología de Alimentos y Alimentos de Animales Protocolo de Validación para Métodos Alternativos.

Para poder asegurar que el propósito de una técnica se cumple, en una validación se busca recrear las condiciones más pesimistas y difíciles que podrían encontrarse en la vida real, de si los parámetros por evaluar son satisfactorios, se tiene evidencia al utilizar la técnica de un desempeño óptimo. En este caso se trabajó con un inóculo bajo del microorganismo blanco (entre 3 y 4 UFC/mL para cada matriz) con varios microorganismos como competencia en una concentración que superaba en un orden decimal a *Listeria monocytogenes* y que incluía dos bacterias del género *Listeria*: *L.welshimeri* y *L.innocua*. Esta última condición difería de los ensayos anteriores donde solamente se inoculó *Listeria monocytogenes* en las matrices en estudio.

A partir de ahí se desarrolla el ensayo con la técnica propuesta en paralelo con la técnica de referencia (que es el cultivo), se realizan las lecturas correspondientes y a partir de los resultados se calculan los parámetros que se indican en los cuadros 7, 8 y 9.

Según esto, los resultados obtenidos no garantizan el desempeño adecuado de la técnica, pues los parámetros de sensibilidad y especificidad son menores a 90% y los de falsos

positivos y negativos son mayores a 10% con índices de concordancia de Kappan de 0,61 para leche, 0,60 para salchicha y 0,43 para queso (el cual se refiere a la coincidencia entre el método validado y el método de referencia).

El coeficiente Kappa es una herramienta estadística que permite comparar los resultados obtenidos por dos métodos diferentes que evalúan variables cualitativas y elimina las posibles coincidencias atribuibles al azar. De acuerdo a éste se obtienen valores que se encuentran entre 1 y 0 donde 1 es la concordancia perfecta entre los dos métodos y 0 implica que no hay concordancia y que si hay resultados iguales se deben al azar (Martínez-González *et al.*2014). Redondo (2015) plantea como interpretación al índice de Kappa: considerar de 0,00 a 0,20 como insignificante, mediano de 0,21 a 0,40; 0,41 a 0,60, moderado; 0,61 a 0,80 sustancial y 0,81 a 1,0 como perfecta. Conforme a esta clasificación, la concordancia entre la técnica de referencia y la técnica evaluada es moderada para las matrices de salchicha y queso y sustancial para la matriz leche.

Al analizar las condiciones en las que se planteó la técnica se encuentran posibles causas que hayan incidido en los resultados obtenidos.

Con respecto a las réplicas en las cuales no se inoculó *Listeria monocytogenes* y se obtuvo un resultado falso positivo de 10% en leche y de 20% en salchicha podríamos suponer que el haber utilizado una cepa de *Listeria welshimeri* aislada de alimentos y no una cepa de referencia ATCC caracterizada, podría en algunos casos haber presentado secuencias de ADN que pudieron haber sido reconocidas por el iniciador Lm20. Los controles de las muestras en ambos casos que se montaron para evaluar la presencia de microorganismos que dieran positivo y que fueron aportados por la muestra, indican que se descartaría esto. Sin embargo, no se podría descartar contaminación cruzada durante alguna de las etapas del proceso.

Con respecto a los falsos negativos en las tres matrices, una de las causas podría ser la referente a la presencia de posibles agentes inhibidores de la enzima *Taq*-polimerasa que es la que realiza la amplificación en la PCR. Publicaciones como la de Rodríguez-Lázaro & Hernández (2006) y Glynn (2006) advierten problemas cuando se trabaja con matrices complejas, como alimentos, en la detección de microorganismos por PCR pues la presencia

de inhibidores de la reacción puede alterar los resultados. Ellos señalan de forma particular el caso de los productos lácteos (como la leche y el queso que se trabajaron) donde se encuentran como posibles inhibidores la presencia de grasas, proteinasas y calcio. Los dos primeros estarían interfiriendo en la unión de la enzima con el sustrato y el último, al ser un catión divalente compite con el magnesio, que es cofactor de la reacción.

Rossen y colaboradores (1992) también mencionan a las proteinasas presentes en los productos lácteos como un posible inhibidor de la PCR. Además sugiere que concentraciones altas de proteínas o péptidos como aquellas probables de hallar en las matrices trabajadas, principalmente en queso y salchicha, pueden también interferir para el desarrollo de la reacción. Este mismo estudio también señala cómo los medios de cultivo utilizados para la fase de enriquecimiento pueden tener ciertos componentes que interfieran en la reacción. Al revisar lo indicado como posibles inhibidores con la composición del caldo BLEB se encuentran la acriflavina y el ácido nalidíxico.

Otro factor por considerar es el de las condiciones de crecimiento de *Listeria monocytogenes* en presencia de otras bacterias competidoras. A pesar de que el caldo BLEB, al igual que los otros medios de cultivo utilizados para el enriquecimiento selectivo buscan inhibir el crecimiento de otros microorganismos diferentes al patógeno blanco (Ryser & Donnelly 2016), bacterias del mismo género pueden proliferar y estas competirían con *Listeria monocytogenes* limitando el crecimiento de su población.

En un estudio donde se evaluó el efecto de la competencia de otros microorganismos en el crecimiento de *Listeria monocytogenes* en caldo BLEB, se indica que cuando esta bacteria se encuentra en este medio en compañía de otras del mismo género puede crecer de 2 a 4 logaritmos menos que si creciera en cultivo puro. En esta publicación se sugiere que esto puede deberse a que los microorganismos competidores generan una disminución de nutrientes, acumulación de desechos, reducción del pH, cambios en potencial REDOX, además de la producción de compuestos inhibidores que generalmente afecta a microorganismos filogenéticamente relacionados con el que los produce (Dailey *et al.* 2014).

Cauchon y colaboradores (2017) comparan la recuperación de *Listeria monocytogenes* en tres medios de enriquecimiento selectivo, uno de ellos el caldo BLEB. Describen cómo la presencia de *Listeria innocua* afecta negativamente la recuperación de *L.monocytogenes* en los tres medios. Los autores plantean, entonces, como la presencia de bacterias ajenas al género *Listeria* pueden complicar la recuperación de *L.monocytogenes* pues consumen nutrientes y al disminuir la cantidad de estos, podría ser que no sean suficientes para que *L.monocytogenes* alcance una población suficiente para ser detectada. Esto se puede complicar con la presencia de *Listeria* no patógenas, especialmente si éstas son las que predominan al final de la etapa de enriquecimiento.

Resultados similares se encuentran en un estudio que evalúa el efecto de la presencia de *L.innocua* en la recuperación de *L.monocytogenes* luego de la etapa de enriquecimiento selectivo en caldo BLEB. Aquí se encuentra que recuperación de *L.monocytogenes* se complica con la presencia de contaminantes. Cuando estos pertenecen al género *Listeria*, como el caso de *L.innocua* en este estudio, dependiendo de las variaciones de crecimiento que se presenten en la etapa de enriquecimiento, estas pueden presentar un predominio de colonias en las siguientes etapas en que se utilizan agares selectivos-diferenciales. En este estudio se vio que *Listeria monocytogenes*, luego de 48 horas de incubación crecía 1,3 logaritmos menos si estaba en presencia de *L.innocua* y que esta última puede alcanzar poblaciones mayores que la primera cuando están juntas (hasta 2 logaritmos más). Por lo tanto, *L.innocua* tendría un efecto inhibitorio sobre *L.monocytogenes* (Keys *et al.* 2013).

Estos estudios se hacen comparando las poblaciones a las 48 horas de incubación. En el caso de la técnica que se evaluó en la validación, se trabajó con una fase de enriquecimiento de 24 horas, por lo que con menos tiempo, las poblaciones en este punto son menores.

La PCR es una reacción que está a cargo de la enzima *Taq*-polimerasa. Según los principios de la cinética enzimática si disminuye la cantidad de enzima no inhibida y la cantidad de sustrato la velocidad de la reacción será menor y por lo tanto el producto obtenido también será menor (Mathews *et.al.* 2013). Por consiguiente los problemas presentados por la técnica durante la validación, pueden explicarse por un crecimiento menor de *Listeria*

monocytogenes al obtenido en los ensayos anteriores donde se trabajó como cultivo puro y no en presencia de competencia que la inhibiera, por lo que al final se obtuvo menos ADN blanco que en los ensayos anteriores y la presencia de inhibidores de la reacción presentes en las matrices y en los medios de cultivo.

La matriz de leche (figura 15 y cuadro 7) fue la que arrojó mejores resultados, pues por la naturaleza de este alimento, sus posibles agentes inhibitorios relacionados con productos lácteos (Glynn 2006, Rodríguez-Lázaro y Hernández 2006, Roseen 1992) se encuentran más diluidos y en menor cantidad que en las otras matrices.

En el caso de la salchicha (figura 16 y cuadro 8), se debe considerar también la presencia de agentes antimicrobianos agregados como preservantes (lactato de sodio, diacetato de sodio, nitrito de sodio) que se pudieron sumar al efecto inhibitorio de la competencia de las bacterias durante la fase de enriquecimiento selectivo, lo que habría contribuido a una menor población de *Listeria monocytogenes* y por ende, a menos ADN disponible para la PCR. Además esta matriz posee altas concentraciones de proteínas y péptidos que pudieron haber inhibido a la enzima Taq-polimerasa (Rossen et.al. 1992).

Los resultados más deficientes se observaron con la matriz queso (figura 17 y cuadro 9) pues resulta evidente un efecto inhibitorio mayor. Si se observan ensayos anteriores, cuando se trabajó con cultivos puros de *Listeria monocytogenes*, las bandas obtenidas a partir de muestras de esta matriz inoculadas luego de 12, 24 y 36 horas (figura 14) se aprecia que a las 24 horas la intensidad de las bandas es menor con respecto a las otras muestras (figuras 12 y 13) cuando se amplifica el iniciador Lm20. Con esta información más lo indicado en las referencias de Rossen y colaboradores (1992), Rodríguez-Lázaro & Hernández (2006) y Glynn (2006) se puede deducir que la concentración de componentes inhibitorios en este producto como proteinasas, grasas e iones de calcio interfieren en mayor medida con la PCR, por lo que se obtienen mucho más falsos negativos.

Se debe considerar para todas las matrices el posible efecto inhibitorio que pudo haber dado la presencia de la acriflavina y el ácido nalidíxico en el caldo BLEB (Rossen 1992).

Cabe resaltar que cuando las réplicas de las tres matrices en estudio se montaron simultáneamente por el método de referencia, luego de 48 horas de enriquecimiento sí se aislaron UFC sospechosas en el agar Oxford. Posteriormente en las muestras inoculadas con *L.monocytogenes* se confirmó la presencia de esta bacteria mientras las réplicas no inoculadas con *L.monocytogenes*, pero sí con otros microorganismos y dieron resultado negativo (cuadro 10).

Cuando se comparan los resultados obtenidos en este trabajo con otros similares que utilizaron PCR punto final presentados en el cuadro 13 se observa que el presente estudio obtuvo sensibilidades menores, los valores más cercanos se obtuvieron con la matriz leche. En el caso de la especificidad, se observa que en este estudio se obtuvo en la matriz leche un valor más alto que el reportado por D'Agostino y colaboradores (2004), pero menor al de las otras investigaciones. Al revisar el modelo experimental planteado en estas publicaciones los autores no utilizaron microorganismos de competencia lo que pudo haber contribuido a tener valores tan diferentes a los del presente estudio.

Cuadro 13. Comparación de los resultados de los parámetros de validación de técnicas de detección de <i>Listeria monocytogenes</i> mediante PCR punto final										
Referencias	D'Agostino <i>et al.</i> (2004)	Poutou <i>et al.</i> (2005)				Torres <i>et al.</i> (2004)		De La Rosa Zariñana <i>et al.</i> (2018)		
Matriz	Leche	Leche	Queso	Carne de pollo	Carne de res	Carne de pollo	Carne de res	Carne de pollo	Carne de res	Carne de cerdo
Origen de secuencia de iniciador	<i>prfA</i>	16sRNA y <i>hlyA</i>				16sRNA y <i>hlyA</i>		<i>iap</i>		
Especificidad	81,8%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%
Sensibilidad	89,4%	100%	96,3%	96,9%	100%	96,9%	100%	100%	100%	100%

Al revisar otras validaciones de técnicas de detección de *Listeria monocytogenes* en alimentos con el uso de PCR en tiempo real (cuadro 14) se encuentra que en general los resultados de especificidad y sensibilidad son mejores. Sin embargo al revisar el modelo

experimental de las publicaciones resulta tener diferencias no solo en la metodología. O'Grady y colaboradores (2009) y Rossmanith y otros (2006) no distinguen entre las diferentes matrices utilizadas, reportan los mismos valores sin importar en qué tipo de alimento se hace la determinación de *L.monocytogenes*. Esto no es recomendable según la guía ISO 16140:2016, ya que cada tipo de matriz tiene componentes que pueden interferir en el análisis de diferente forma. Reyes y colaboradores sí indican haber utilizado cepas de bacterias de otros géneros y de *Listeria* (*L.seeligeri*, *L.welshimeri* y *L.innocua*) que permitieran evaluar la interferencia de la competencia microbiana. También Gianfranceschi y otros (2014) mencionan la afectación de la determinación de *L.monocytogenes* en presencia de *L.innocua* en queso fresco (una de las matrices más similares a las que se utilizaron en este trabajo). La validación que ellos presentan se hizo en varios laboratorios por lo que el manejo estadístico es diferente al que se hizo en la presente investigación. De la Rosa-Zariñana y colaboradores (2018) validaron una técnica de detección de *Listeria monocytogenes* en carnes, utilizaron únicamente *Escherichia coli* como competencia y reportaron un 100% de sensibilidad y de especificidad.

Cuadro 14. Comparación de los resultados de los parámetros de validación de técnicas de detección de *Listeria monocytogenes* mediante PCR tiempo real.

Referencia	O'Grady et al. (2009)	Reyes (2017)	Rossmannith et al. (2006)	Gianfranceschi et al. (2014)
Matriz	Varias	Carne	Salmón, paté, queso maduro y leche entera	Queso tierno
Origen de secuencia de iniciador	<i>ssrA</i>	<i>hly</i>	<i>prfA</i>	<i>hly</i>
Especificidad	99,44%	100%	100%	96,70%
Sensibilidad	96,15%	100%	76,9%	97,62%

Dong-Hyen y su grupo colaborador (2014) hace una comparación entre los métodos de cultivo, PCR punto final y PCR tiempo real para la detección de *Listeria monocytogenes* en alimentos. Concluyen que de las tres técnicas el PCR tiempo real es la que presenta mejor

desempeño, ya que permite obtener resultados aceptables en presencia de microbiota acompañante y posee un límite de detección menor. Ellos trabajaron con *L.innocua* y *L.welshimeri* y otras diez bacterias de otras especies. Sin embargo, para el análisis de los datos no utilizaron los parámetros de validación que se usaron en este estudio. La conclusión de este estudio coincide con observaciones realizadas por otros autores (Jin-Qiang *et al.* 2010, Bonilauri *et al.* 2016).

En términos generales aunque al comparar los resultados de la validación de este trabajo con otros reportados en la literatura pueden ser inferiores, al revisar las metodologías se encuentran diferencias que hacen que la comparación deba realizarse con mucho cuidado. En el caso de la metodología que se evaluó en esta investigación, las condiciones de la validación se basaron en las requeridas según ISO 16140:2016, la Guía de Validación para Métodos Microbiológicos para Alimentos y Superficies Ambientales de AOAC y la Metodología de Validación de Métodos Microbiológicos de Análisis de la Agencia de Protección Ambiental de Estados Unidos, buscando condiciones estandarizables y reproducibles. Eso no implica que otras investigaciones que no lo hicieran así hayan utilizado modelos estadísticos incorrectos.

Ensayo de recuperación a lo largo de tiempo del almacenamiento

En la figura 18 se puede ver que la matriz de leche es la que presenta mejores resultados, pues se obtiene una señal positiva evidente en la electroforesis de ADN en el día 1, 4, 8 y 12. En el caso de la matriz salchicha se observan señales leves en los días 1,4 y 8 y una más evidente el día 12, que podría deberse a un aumento de la población durante el almacenamiento o bien que la homogenización de las muestras de los primeros días no permitió recurrar cantidades mayores de bacteria. En el caso del queso solo se observa una señal débil a los 4 y 8 días, lo que podría deberse a problemas con la homogenización de la muestra.

Al observar la intensidad de las bandas de ADN en la figura 18, se puede confirmar que la presencia de sustancias inhibitorias de la reacción de la *Taq*-polimerasa podría también interferir en los resultados obtenidos luego de un enriquecimiento selectivo de 24 horas cuando se evalúa la recuperación a lo largo del tiempo. En este caso, se trabajó con cultivos

puros de *L.monocytogenes* por lo que no se contaría con la inhibición de microorganismos de competencia; sin embargo, sí se podría tener la interferencia de elementos que se encuentren en las matrices de queso y salchicha, lo que coincidiría con lo observado en el ensayo de validación y confirmaría que estos alimentos poseen inhibidores que pueden alterar la eficiencia de la actividad enzimática de la PCR.

Longhi y colaboradores (2003) buscaron determinar la presencia de *Listeria monocytogenes* en muestras de queso inoculadas luego de 7 y 15 días de almacenamiento mediante una técnica de biología molecular que utilizó un PCR punto final que amplificaba un segmento del gen *actA*. En los resultados observados se advierte que sí se recuperaba bien en los quesos ricota y mozzarella pero no en el crescenza. Ellos mismos indican que en este tipo de producto puede haber sustancias que inhiban la reacción de PCR. En este tipo de productos se puede dificultar su recuperación a partir de productos almacenados en refrigeración y previamente contaminados, lo cual también se observa en los hallazgos obtenidos.

En un ensayo similar donde se investigaba la recuperación de *Listeria monocytogenes* a partir de muestras inoculadas de pepino se encontró que luego de 21 días a temperaturas de refrigeración se podía recuperar de 2,8 logUFC/g de esta bacteria (Bardsely *et al.* 2019) también se logra aislar a partir de melones inoculados y conservados a 4°C hasta después de 15 días (Nyarko 2016) lo que confirma que este microorganismo se mantiene viable a bajas temperaturas y es posible recuperarlo en los tiempos que se utilizaron en el estudio, si no se logró hacerlo de forma eficiente con las matrices que salchicha y queso, fue precisamente por los agentes inhibidores que estos alimentos aportan a la reacción de PCR.

Conclusiones

A pesar de que en el estudio de Tao y colaboradores (2015) plantea como prometedor el uso de los pares de iniciadores Lm8, Lm13 y Lm20 para la detección de *Listeria monocytogenes* en leche, cuando se prueban en esta matriz, queso y salchicha, en condiciones de validación, con competencia con otras bacterias los resultados obtenidos mediante PCR punto final no son los deseables para una técnica de detección de este patógeno que se vaya a aplicar en estos alimentos.

Estos resultados indican que los métodos moleculares en matrices alimentarias no son tan prometedores y que no siempre se tienen las condiciones que permitan asegurar resultados positivos o negativos, por la complejidad y las características particulares que tienen este tipo de matrices. De ahí la importancia de utilizar las guías existentes para las validaciones y que el proceso de normalización de estas técnicas incluya todas las etapas previstas, desde las primeras validaciones en un laboratorio hasta las validaciones donde intervienen varios laboratorios.

Por lo tanto, la tradición de liberar lotes cuando un método molecular da negativo debe revisarse para cada método, según las validaciones ya probadas y especialmente en matrices alimentarias complejas.

En relación con los resultados obtenidos y las diferencias que la literatura señala entre metodologías, a futuro podría considerarse adaptar la técnica propuesta en este estudio a PCR tiempo real, que es más sensible que el PCR punto final, para confirmar o descartar si al cambiar a metodología de biología molecular los interferentes encontrados en las matrices estudiadas aún afectan el desempeño del análisis.

Referencias

AOAC. 2012. AOAC Internacionational Methods Committee Guidelines for Validation of Microbiological Methods for Food and Environmental Surfaces.

Aznar, R., & Alarcón, B. (2002). On the Specificity of PCR Detection of *Listeria monocytogenes* in Food: a Comparison of Published Primers. *Systematic and Applied Microbiology*, 25(1), 109–119. doi:10.1078/0723-2020-00079.

Aznar R., Alarcón B. (2003). PCR Detection of *Listeria monocytogenes*: a study of multiple factors affecting sensibility. *Journal of Applied Microbiology* 95:958-966.

Bacteriological Analytical Manual (BAM). (2018). *Fda.gov*. Recuperado 15 January 2018, a partir de <https://www.fda.gov/Food/FoodScienceResearch/LaboratoryMethods/ucm2006949.htm>.

Bardsley C.A., Truitt L.N., Pfuntner R.C., Danyluk M.D., Rideout S.L., Strawn L.K. (2019). Growth and survival of *Listeria monocytogenes* and *Salmonella* on whole and sliced cucumbers. *Journal of Food Protection* 82(2):301-309. doi:10.4315/0362-028x.jfp-18-341.

Bonilauri P., Bardasi L., Leonelli R., Ramini M., Luppi A., Giacometti F., Merialdi G. (2016). Detection of food hazard in foods: comparisons of real time polimerase chain reaction and cultural methods. *Italian Journal of Food Safety* (5:5641):37-40.

Cauchon K.E., Hitchins A.D., Smiley R.D. (2017). Comparasion of *Listeria monocytogenes* recoveries from spiked mung bean sprout by the enrichment methods of three regulatory agencies. *Food Microbiology* 66:40-47.

D'Agostino M., Wagner M., Vazquez-Boland J.A., Kuchta T., Karpiskova R., Hoorfar J., Novella S., Scotti M., Ellison J., Murray A., Fernandes I., Kuhn M., Pazlarova J., Heuvelink A., Cook N. (2004). A validated PCR-based method to detect *Listeria*

monocytogenes using raw milk as a food model--towards an international standard. Journal of Food Protection 2004 67(8):1646-55.

Dailey R.C., Martin K.G., Smiley R.D. (2014). The effects of competition from non-pathogenic foodborne bacteria during selective enrichment of *Listeria monocytogenes* using a modified Listeria enrichment broth. Food Microbiology (44):173-179.

De la Rosa-Zariñana A.E., Crosby-Galán M.C., Ramírez-Guzman M.E., Hernández-Sánchez D., Mata-Espinosa M.A. (2018) Standardization of PCR technique for detecting *Listeria monocytogenes* in chicken, beef and pork. Ecosistemas y Recursos Agropecuarios 5(13):25-34.

Dong-Hyeon K., Jung-Whan C., Hyunsock K., Hong-Seck K., Dasom C., Young-Ji K., Jin-Hyeok Y., Jin-San M., Kun-Ho Seo. (2014). Comparison of culture, conventional and real-time PCR methods for *Listeria monocytogenes* in foods. Korean Journal of Food Science 34(5): 665-673.

Drevets D.A & Bronze M.S. (2008). *Listeria monocytogenes*: epidemiology, human disease and mechanism of brain invasion, Jemmi & Stephan 2006 *Listeria monocytogenes*: food borne pathogen and hygiene indicator. FEMS Immunology and Medical Microbiology (53):151-165.

EPA Forum of Environmental Measurement (FEM). 2009. Method Validation of U.S. Environmental Protection Agency (EPA) Microbiological Methods of Analysis.

Food and Drug Administration. Guidelines for the Validation of Analytical Methods for the Detection of Microbial Pathogens in Foods and Feeds, 2nd Edition. Department of Health and Human Services; 20015

Furrer B., Candrian U., Höfelein C., Lüthy J. (1991). Detection and Identification of *Listeria monocytogenes* in cooked sausage products and in milk by in vitro amplification of haemolysin gene fragments. Journal of Applied Microbiology 70(5):372-379.

- Gattuso A., Gianfranceschi M. V., Sonnessa M., Delibato E., Marchesan M., Hernandez M., De Medici D., Rodriguez-Lazaro D. (2014). Optimization of a Real Time PCR based method for the detection of *Listeria monocytogenes* in pork meat. International Journal of Food Microbiology, doi: [10.1016/j.ijfoodmicro.2014.04.015](https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2014.04.015).
- Garrido A., Chapela M.J., Román B., Fajardo P., Lago J., Vieites J.M., Cabado A.G. (2013). A New Multiplex real-time PCR Developed Method for *Salmonella* spp. and *Listeria monocytogenes*. Detection in Food and Environmental Samples. Food Control 30: 76-85.
- Garrido-Maestu A., Azinheiro S., Carvalho J., Prado M. (2018). Rapid and sensitive detection of viable *Listeria monocytogenes* in food products by a filtration-based protocol and qPCR. Food Microbiology. 73:254-263.
- Gianfranceschi M.V., Rodriguez-Lazaro D., Hernandez M., González-García P., Comin D., Gattuso A., Delibato E., Sonnessa M., Pasquali F., Prencipe V., Sreter-Lancz Z., Saiz-Abajo M.J., Pérez-De-Juan J., Butrón J., Kozačinski L., Horvatek Tomic D., Zdolec N., Johannessen G.S., Jakočiūnė D., Elmerdahl Olsen J., De Santis P., Lovari S., Bertasi B., Pavoni E., Pausco A., De Cesare A., Manfreda G., De Medici D. (2014). European validation of a real-time PCR-based method for detection of *Listeria monocytogenes* in soft cheese. International Journal of Food Microbiology. 184:128-133.
- Glynn B., Lahiff S., Wernecke M., Barry T., Smith T.J., Maher M. (2006). Current and emerging molecular diagnostic technologies applicable to bacterial food safety. International Journal of Dairy Technology 56(2): 126-139.
- Gouws P.A., Liedemann I. (2005). Evaluation of Diagnostic PCR for the Detection of *Listeria monocytogenes* in Food Products. Food Technology and Biotechnology 43(2): 201-205.
- Hernandez-Milian A. & Payeras-Cifre A. (2014). What is new in listeriosis? BioMed Research International (2014) Article ID:358051.

- Hough, A. J., Harbison, S. A., Savill, M. G., et al. (2002). Rapid enumeration of *Listeria monocytogenes* in artificially contaminated cabbage using real-time polymerase chain reaction. *Journal of Food Protection*, 65, 1329–1332.
- ISO 16140. Microbiology of Food and Animal Feeding Stuff. Protocol for the Validation of Alternative Methods. Geneva: ISO; 2016.
- Jemmi T. & Stephan R. (2006). *Listeria monocytogenes*: food borne pathogen and hygiene indicator. Scientific and Technical Review of the Office International des Epizooties . 25(2):571-580.
- Jin-Qiang C., Healy S., Reagan P., Laksanalamai P., Zonglin H. (2010). PCR-base Detection and Characterization of *Listeria monocytogenes* and *Listeria ivanovii*. Food and Environmental Sources, <http://dx.doi.org/10.1016/j.fshw.2017.03.001>.
- Kalliopi R., Alessandria V., Urso R., Dolci P., Cocolin L. (2008). Detection, Quantification and Viability of *Listeria monocytogenes* in Food as Determinated by quantitative PCR. *Internat. J. Food Microbiol.* 121(1): 99-105.
- Klein, P. G., & Juneja, V. K. (1997). Sensitive detection of viable *Listeria monocytogenes* by reverse transcription-PCR. *Applied and Environmental Microbiology*, 63, 4441–4448.
- Keys A.L., Dailey R.C., Hitchins A.D., Derike R. (2013) Postenrichment population differentials using amorniguarding *Listeria* enrichment broth: Implication of the presence of *Listeria innocua* on *Listeria monocytogenes* in food test samples. *Journal of Food Protection* 76(11):1854-1862.
- Korsak D. & Szuplewska M. (2016) Characterization of nonpathogenic *Listeria* species isolated from food and food procesing environment. *International Journal of Food Microbiology*, doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2016.08.032.

Latha C., Anu C.J., Sunil B., Ajaykumar V.J. and Deepa Jolly. (2014). Multiplex PCR assay for the simultaneous detection of four common foodpathogens in meat. *Journal of Foodborne and Zoonotic Disease* 2(3):45-49.

Latha C, Anu C.J., Ajaykuma V.J., Sunil B. (2017) Prevalence of *Listeria monocytogenes*, *Yersinia enterocolitica*, *Staphylococcus aureus*, and *Salmonella enterica* Typhimurium in meat and meat products using multiplex polymerase chain reaction. *Veterinary World* 10(8): 927-931.

Law, J., Ab Mutalib, N., Chan, K., & Lee, L. (2015). An insight into the isolation, enumeration, and molecular detection of *Listeria monocytogenes* in food. *Frontiers In Microbiology*, 6. doi:10.3389/fmicb.2015.01227

Linke, K., R uckerl, I., Brugger, K., Karpiskova, R., Walland, J., & Muri-Klinger, S. et al. (2014). Reservoirs of *Listeria* Species in Three Environmental Ecosystems. *Applied of Environmental Microbiology* 80(18), 5583-5592. doi:10.1128/aem.01018-14.

Liu H., Liqun L., Pan Y., Sun X., Hwang C.A., Zhao Y., Wu V. (2015). Rapid Detection and Differentiation of *Listeria monocytogenes* and *Listeria* species in deli meats by a new multiplex PCR method. *Food Control* 52: 78-84.

Longhi, C., Maffeo, A., Penta, M., et al. (2003). Detection of *Listeria monocytogenes* in Italian-style soft cheeses. *Journal of Applied Microbiology*, 94, 879–885.

López L., Mejía C. (2012) Evaluación de métodos de extracción de ADN para la detección de *Listeria monocytogenes* en productos cárnicos. *Revista MVZ Córdoba* 17(3): 3169-3175.

Martínez-González M.A., Sánchez-Villegas A., Toledo-Atucha E.A., Faulin-Fajardo J. *Bioestad stica amigable*. 3ra edici n. España. 2014.

Mathew C.K., Van Holde K.E., Appling D.R. Antony-Cahill S.J. *Bioquímica*. 4ta ed. España. 2013. P ginas 410-473.

NicAogáin, K., & O'Byrne, C. (2016). The Role of Stress and Stress Adaptations in Determining the Fate of the Bacterial Pathogen *Listeria monocytogenes* in the Food Chain. *Frontiers In Microbiology*, 7. <http://dx.doi.org/10.3389/fmicb.2016.01865>.

Niederhauser C., Candrian U., Höfelein C., Jermini M., Bühler H., Lüethy J. (1992). Use of Polymerase Chain Reaction for Detection of *Listeria monocytogenes* in Food. *Applied and Environmental Microbiology* 58(5): 1564-1568.

Nyarko E., Kniel K.E., Reynells R., East C., Handy ET, Luo Y., Millner P.D., Sharma M. (2016) Survival and growth of *Listeria monocytogenes* on fresh-cut “Athena” and “Rocky Ford” cantaloupes during storage at 4°C and 10°C. *Foodborne Pathogen Disease* 13(11): 587-591.

O'Grady J., Ruttledge M., Sedado-Balbás S., Smith T.J., Barry T., Maher M. (2009). Rapid Detection of *Listeria monocytogenes* in Food Using Culture Enrichment Combined with PCR Real-Time. *Food Microbiology* 26:4-7.

Orsi, R., & Wiedmann, M. (2016). Characteristics and distribution of *Listeria* spp., including *Listeria* species newly described since 2009. *App. Microbiol. Biotech.*, 100(12), 5273-5287. <http://dx.doi.org/10.1007/s00253-016-7552-2>.

Poutou R.A., Burbano M., Sierra S., Torres K., Carrascal A.K., Mercado M. (2005). Estandarización de la Extracción de ADN y Validación de PCR multiple para detectar *Listeria monocytogenes* en queso, leche, carne de res y pollo. *Universitas Scientiarum* [en línea] 2005, 10 (julio-diciembre) : [Fecha de consulta: 26 de noviembre de 2018] Disponible en: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=49910207> ISSN 0122-7483.

Quigley L. O'Sullivan O., Beresford T.P., Paul Ross R., Fitzgerald G.F., Cotter P.D. (2012). A comparison of methods used to extract bacterial DNA from raw milk and raw milk cheese. *Journal of Applied Microbiology* 113: 96-105.

Redondo G.O. (2015). Validez y fiabilidad del conjunto mínimo básico de datos en la estimación de gastroenteritis aguda nosocomial por rotavirus. *Revista Española de Enfermedades Digestivas* 107:152-161.

Reyes C., Linares L.H., Moredo F., Lirón J.P., Brusa V., Londero A., Galli L., Oteiza J.M., Costa M., Leotta G.A..(2018). Development and In-House Validation of a Real-Time Polymerase Chain Reaction for the Detection of *Listeria monocytogenes* in Meat. *Foodborne Pathogens and Disease*. 15(1):55-57.

Rodríguez-Lázaro D., Hernández M. (2006). Molecular methodology in food microbiology diagnostics: trends and current challenges. IUFoST 2006. DOI: 10.1051/IUFoST:20060643

Rodríguez-Lázaro D., Jofré A., Aymerich T., Hugas M., Pla M. (2008). Rapid Quantitative Detection of *Listeria monocytogenes* in Meat Products by Real-Time PCR. *Applied Environmental Microbiology* 70(10):6299-6301.

Rossen L, Noskov P., Holstrom K., Rasmussen O.F. (1992). Inhibition of PCR by components of food samples, microbial diagnostic assays and DNA-extraction solutions. *International Journal of Food Microbiology* 17:37-45-

Rossmann P., Krassning M., Wagner M., Hein I. (2006). Detection of *Listeria monocytogenes* in food using a combined enrichment/real-time PCR method targeting the *prfA* gene. *Research in Microbiology* 157:763-771.

Ryser, E. and Donnelly, C. (2015). *Listeria*. In: Y. Salfinger and M. Tortorello, ed., *Compendium of Methods for the Examination of Foods*, 5th ed. Washington D.C.: American Public Health Association, pp.425-438.

Ryser E, Buchanan R. (2013). *Listeria monocytogenes*, p. 503-545. In Doyle, M, Buchanan, R (ed.), *Food Microbiology: Fundamentals and Frontiers*, 4th ed. ASM Press, Washington D.C

Sauders B.D., Overdeest J., Windham E., Schukken K., Lembo Y., Wiedmann A.. (2012). Diversity of *Listeria* species in urban and natural environments. *Applied of Environmental Microbiology* 78(12): 4420-4433.

Stessl, B., Luf, W., Wagner, M., & Schoder, D. (2009). Performance testing of six chromogenic ALOA-type media for the detection of *Listeria monocytogenes*. *Journal Of Applied Microbiology*, *106*(2), 651-659. doi:10.1111/j.1365-2672.2008.04039.x

Tao T., Chen Q., Bie X., Lu F., Lu Z. (2015). Mining of novel species-specific primers for PCR detection of *Listeria monocytogenes* based of genomic approach. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 31:1955-1966.

Tao T., Chen Q., Bie X., Lu F. & Lu Z. (2016). Investigation on prevalence of *Listeria* spp. and *Listeria monocytogenes* in animal-derived foods by multiplex PCR assay targeting novel genes, *Food Control*, doi: 10.1016/j.foodcont.2016.09.026.

Torres K.J., Poutou R.A., Carrascal A.K., Sierra S.C., Mercado M. 2004. Validación de PCR para la detección de *Listeria monocytogenes* en carnes crudas de res y pollo. *MVZ Córdoba* 9(2):414-427.

United States Department of Agriculture and Food Safety Inspection Service. 2017. Isolation and identification of *Listeria monocytogenes* from red meat, poultry egg and environmental samples. USDA-FSIS microbiology laboratory guidebook. Disponible en: <http://www.fsis.usda.gov>. Accesado el 14 de enero del 2017

Välilä, A., Tilsala-Timisjärvi, A., & Virtanen, E. (2015). Rapid detection and identification methods for *Listeria monocytogenes* in the food chain – A review. *Food Control*, *55*, 103-114. doi:10.1016/j.foodcont.2015.02.037.

Varadaraj M.C. (2010). Chapter 9 - Capacity Building: Building Analytical Capacity for Microbial Food Safety In C.E. Boisrobert, A. Stjepanovic, S. Oh, H. L.M. Lelieveld, Ensuring Global Food Safety, Academic Press. ISBN 9780123748454. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-374845-4.00009-6>.

Wernars K., Heuvelman C.J., Chakraborty T., Notermans S.H.W. (1991). Use of Polymerase Chain Reaction for the direct detection of *Listeria monocytogenes* in soft cheese. *Journal of Applied Microbiology* 70(2):121-126.

Woan-Fei J., Nurul-Syakima M., Kok-Gan C., Learn-Han L. (2015). Rapid Methods for Detection of Food-Borne Bacterial Pathogens: Principles, Applications, Advantages and Limitations. *Frontiers in Microbiology*. doi: 10.3389/fmicb.2014.00770

Wu R., Liu X., Guo B., Chen F., Wang X. (2014). Development of Double Loop-mediated isothermal amplification to detect *Listeria monocytogenes* in Food *Current Microbiology* 69:839-845.