

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA



CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA Y MOLECULAR DE
Listeria monocytogenes

TESIS

Que para obtener el grado de
Doctor en Ciencias Biológicas

PRESENTA

OSCAR RODOLFO RODAS SUÁREZ

Comité tutorial:

Tutor: Dr. Carlos Vázquez Salinas
Asesor: Dr. José Francisco Flores Pedroche
Asesor: Dr. José Miguel Betancourt Rule

MÉXICO DF

OCTUBRE DEL 2009

“El Doctorado en Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma Metropolitana pertenece al Padrón de Posgrados de Excelencia del CONACyT y además cuenta con apoyo del mismo Consejo, con el convenio PFP-20-93”.

El jurado designado por la División de Ciencias Biológicas y de la
Salud de la Unidad Iztapalapa
aprobó la tesis que presentó

OSCAR RODOLFO RODAS SUÁREZ

El día 2 de octubre de 2009.

Tutor: Dr. Carlos Vázquez Salinas.

Asesor: Dr. José Francisco Flores Pedroche.

Asesor: Dr. José Miguel Betancourt Rule.

Sinodal: Dra. Luz Irene Rojas Avelizapa.

Sinodal: Dr. Jorge Francisco Cerna Cortés.

Dedico este trabajo:

A mis amados padres, Oscar Rodas Reyna y Martha Suárez Grajales (q.p.d), quienes en todo momento han creído en mí.

A mis queridos hermanos y sobrinos.

A la memoria de la Dra. Ana María Mesta Howard (q.p.d).

A todos mis amigos y amigas, no escribo los nombres por no omitir alguno.

Laus Deo

Agradecimientos:

A mis directores de tesis y a los sinodales por sus sugerencias y el tiempo que amablemente dedicaron para revisión y corrección de esta tesis.

Dr. Carlos Vázquez Salinas

Dr. José Francisco Flores Pedroche

Dr. José Miguel Betancourt Rule

Dra. Luz Irene Rojas Avelizapa

Dr. Jorge Francisco Cerna Cortés

CONTENIDO

Capítulo		Página
Índices	Índice general	i
	Índice de tablas	iii
	Índice de figuras	v
Resúmenes	Resumen en Español	vii
	Resumen en Inglés	viii
1. Introducción		1
	1.1 Descripción del género <i>Listeria</i>	2
	1.1.1 Microbiología del género <i>Listeria</i>	2
	1.1.2 Historia	2
	1.2 Generalidades de la especie	3
	1.2.1 Características de <i>L. monocytogenes</i>	3
	1.2.2 Hábitat	4
	1.3 Taxonomía	5
	1.4 Estructura antigénica	5
	1.5 Epidemiología	7
	1.6 Fisiopatología de la infección	9
	1.6.1 Características clínicas	9
	1.6.2 Listeriosis neonatal	9
	1.6.3 Listeriosis en adultos	10
	1.6.4 Diagnóstico	11
	1.6.5 Tratamiento	11
	1.6.6 Patogénesis	12
	1.7 Patogenicidad y virulencia	13
	1.7.1 Generalidades	13
	1.7.2 Asociación	14
	1.7.3 Adherencia	15
	1.7.3.1 Mecanismos involucrados en la adherencia	15
	1.7.3.2 Estructuras bacterianas implicadas en la adhesión	17
	1.7.3.2 Naturaleza y función de las adhesinas involucradas en al adhesión	18
	1.7.3.3 Moléculas del huésped que funcionan como receptores	19
	1.7.3.4 Consecuencias de la adhesión bacteriana	21
	1.7.4 Adherencia e invasividad	22
	1.7.5 Crecimiento intracelular y propagación celular	22
	1.7.6 Factores asociados a la virulencia	24
	1.8 Tipificación	25
	1.8.1 Métodos fenotípicos	25
	1.8.2 Métodos genotípicos	26
	1.8.2.1 Ribotipificación	27
2. Justificación		29
3. Objetivos		30
	3.1 Objetivo general	30
	3.2 Objetivos particulares	30
4. Material y métodos		
	4.1 Pruebas de pureza e identificación bacteriana	31
	4.2 Evaluación de la patogenicidad de las cepas aisladas del género <i>Listeria</i>	32

4.2.1 Métodos indirectos para valorar la patogenicidad del género <i>Listeria</i>	32
4.2.1.1 Actividad hemolítica	32
4.2.1.2 Hidrólisis de la esculina	32
4.2.1.3 Hidrólisis de los fosfolípidos de la yema de huevo	32
4.2.2 Caracterización de las cepas mediante marcadores fenotípicos	33
4.2.2.1 Caracterización bioquímica y biotipificación	33
4.2.2.2 Resistencia a antimicrobianos	33
4.3 Métodos directos para evaluar la patogenicidad del género <i>Listeria</i>	35
4.3.1 Cultivos celulares	35
4.3.1.1 Propagación celular	35
4.3.1.2 Preparación de microplacas con células prefijadas	35
4.3.1.3 Cultivos bacterianos	36
4.3.1.4 Adherencia en células HEp-2 prefijadas	36
4.3.2 Tinción de Giemsa	36
4.4 Determinación de los índices de adherencia	36
4.5 Caracterización de las cepas mediante “marcadores genéticos”	41
4.5.1 Conservación de las cepas	41
4.5.2 Obtención del DNA cromosómico	41
4.5.3 Amplificación de la región rDNA 16S	42
4.5.4 Digestión enzimática del rDNA 16S	44
4.5.5 Análisis estadístico de los patrones de restricción	45
4.5.6 Índice de discriminación	46
5. Resultados	47
5.1 Caracterización fenotípica	47
5.1.1 Sensibilidad-resistencia a antimicrobianos	51
5.2 Patrones, porcentaje e índices relativos de adherencia	55
5.2.1 Análisis estadístico	70
5.3 Caracterización genética	71
5.3.1 Amplificación del rDNA 16S	71
5.3.2 Patrones de digestión enzimática	73
5.3.2.1 Patrones de restricción con HhaI	73
5.3.2.2 Patrones de restricción con AluI	75
5.3.2.3 Patrones de restricción con MboI	77
5.3.2.4 Patrones de restricción con RsaI	78
5.3.2.5 Patrones de restricción con HaeIII	80
5.3.2.6 PCR-Ribotipificación	81
5.3.3 Análisis de datos	82
5.3.3.1 Utilización de la ribotipificación para trazar un dendrograma de relación genética	83
6. Discusión	88
7. Conclusiones	105
8. Bibliografía	107
9. Anexos	122
9.1 Artículo publicado	122

Índice de tablas

Tabla número	Título	Página
1.	Comparación entre <i>Listeria monocytogenes</i> y algunas otras especies representativas del género <i>Listeria</i>	4
2.	Esquema de identificación de acuerdo a las serovariedades principales del género <i>Listeria</i>	6
3.	Principales brotes de listeriosis asociados al consumo de alimentos	9
4.	Principales métodos genotípicos	27
5.	Colección de aislados empleados en el presente estudio	32
6.	Lista de sustancias antimicrobianas ensayadas.	36
7.	Mezcla de reacción empleada en la PCR para la amplificación de la región 16S.	44
8.	Condiciones de la PCR para la amplificación del rDNA 16S.	44
9.	Enzimas empleadas en la ribotipificación.	45
10.	Condiciones de digestión enzimática.	45
11.	Fenotipos y biotipos de <i>Listeria</i> .	48
12.	Biotipificación del género <i>Listeria</i> . Correlación con marcadores de virulencia.	49
13.	Serotipificación de cepas de <i>Listeria monocytogenes</i> .	50
14.	Relación de las cepas de <i>Listeria monocytogenes</i> según su origen, serotipo y biotipo.	51
15.	Resistencia de <i>Listeria monocytogenes</i> frente a antimicrobianos.	52
16.	Perfiles de resistencia a antimicrobianos de <i>Listeria monocytogenes</i> .	53
17.	Valoración de los marcadores fenotípicos como métodos de tipificación.	55
18.	Resultados representativos de los ensayos realizados con la cepa de referencia.	56
19.	Índices de adherencia de las cepas aisladas a partir de hortalizas en el Distrito Federal.	61
20.	Índices de adherencia de las cepas aisladas a partir de hortalizas provenientes de Sonora	63
21.	Índices de adherencia de las cepas aisladas a partir de jugos en el	64

	Distrito Federal.	
22.	Índices de adherencia de las cepas aisladas a partir de lácteos en el Distrito Federal.	65
23.	Índices de adherencia de las cepas aisladas a partir de cárnicos y peces* en el Distrito Federal.	66
24.	Índices de adherencia de las cepas de referencia y de origen clínico	67
25.	Clasificación de las cepas en base a los porcentajes de adherencia observados.	67
26.	Número de cepas pertenecientes a cada clasificación	68
27.	Cepas pertenecientes a cada grado de adherencia de acuerdo a su patrón	68
28.	Ribotipos de <i>Listeria monocytogenes</i>	82
29.	Valoración de la técnica de ribotipificación como método de tipificación de <i>L. monocytogenes</i>	83

Índice de figuras

Figura número	Título	Página
1.	Mapa de distribución de casos reportados de <i>Listeria monocytogenes</i> .	8
2.	Fuerzas fisicoquímicas involucradas en la adhesión bacteriana. Como es indicado en la figura, estas operan a diferentes distancias entre la bacteria y el substrato al cual se adhiere.	16
3.	Los principales tipos de interacciones moleculares involucradas en la adhesión. En la adhesión de una bacteria a un substrato pueden participar una o más de éstas.	16
4.	Diagrama mostrando los principales tipos de moléculas que se encuentran en la superficie de una célula típica de mamífero. La mayoría de estos pueden funcionar como receptores para adhesinas bacterianas.	20
5.	La adhesión bacteriana a una célula huésped puede inducir uno o más cambios en la células huésped, los más comunes son mostrados en el diagrama	21
6.	<i>L. monocytogenes</i> induce su entrada a fagocitos no profesionales. b. La bacteria es internalizada en una vacuola (también conocida como fagosoma)	23
7.	<i>L. monocytogenes</i> expresa proteínas de superficie y de secreción que permiten su adhesión a las células huésped, el escape de la vacuola fagocitaria y la locomoción en el citosol de la célula invadida.	24
8.	Representación gráfica de un operón rDNA	28
9.	Diagrama general de trabajo.	31
10.	Diagrama de adherencia. Adherencia localizada de <i>Listeria monocytogenes</i> en células HEp-2 prefijadas.	38
11.	Patrones de adherencia de <i>Escherichia coli</i> en células HEp-2.	41
12.	Testigo de células HEp-2 prefijadas con metanol.	57
13.	Adherencia localizada (LA) de <i>L. monocytogenes</i> en células HEp-2 prefijadas.	58
14.	Adherencia difusa (DA) de <i>L. monocytogenes</i> en células HEp-2 prefijadas.	58
15.	Adherencia agregativa (AA) de <i>L. monocytogenes</i> en células HEp-2 prefijadas.	59
16.	Adherencia a células HEp-2 de la cepa 22. (a) Después de 60 minutos de incubación, aún se aprecian la estructura celular. (b) Después de 120 minutos de incubación	59
17.	Gráfica comparativa del número de cepas que presentan cada patrón de	60

	adherencia observado.	
18.	Gráfica comparativa de los porcentajes de cepas pertenecientes a cada grado de adherencia, de acuerdo a sus patrones.	69
19.	Gráfica donde se muestra el porcentaje de cepas perteneciente a cada grado de adherencia respecto a su origen.	70
20.	Gráfica donde se muestra el porcentaje de cepas pertenecientes a cada patrón de adherencia con respecto a su origen.	70
21.	Amplificación del rDNA 16S de <i>L. monocytogenes</i> .	73
22.	a) Patrones electroforéticos obtenidos por la digestión con HhaI.	74
	b) Patrones electroforéticos obtenidos por la digestión con HhaI.	75
23.	a) Patrones electroforéticos obtenidos por la digestión con AluI.	76
	b) Patrones electroforéticos obtenidos por la digestión con AluI.	77
24.	Patrones electroforéticos obtenidos por la digestión con AluI.	78
25.	a) Patrones electroforéticos obtenidos por la digestión con RsaI	79
	b) Patrones electroforéticos obtenidos por la digestión con RsaI	80
26.	Patrones electroforéticos obtenidos por la digestión con HaeIII.	81
27.	Dendrograma construido con la matriz obtenida a partir de los patrones de digestión enzimática que representa la similitud existente entre las cepas de <i>L. monocytogenes</i> , con respecto a los fragmentos de restricción obtenidos.	85
28.	Dendrograma construido con la matriz obtenida a partir de los patrones de digestión enzimática y pruebas bioquímicas, que representa la similitud existente entre las cepas de <i>L. monocytogenes</i> con respecto al origen de aislamiento.	87
29.	Dendrograma construido a partir del matriz de datos binarios obtenida a partir de los patrones de digestión enzimática y pruebas bioquímicas que representan la similitud existente entre cada una de las cepas de <i>L. monocytogenes</i> con respecto al origen de aislamiento y tomando en cuenta como grupo externo la cepa de <i>L. innocua</i> .	88

Resumen

La listeriosis es una infección bacteriana provocada por *Listeria monocytogenes*, bacteria Gram positiva ampliamente distribuida en la naturaleza. Esta enfermedad se ha reconocido recientemente como un importante problema de salud pública debido al gran número de brotes que han tenido lugar en las últimas décadas ocasionados por el consumo de alimentos. Sin embargo en México existen escasos estudios donde se haya evaluado la sensibilidad a antimicrobianos, así como su diversidad genética.

El objetivo de este trabajo fue: evaluar la diversidad genética de 45 cepas de *L. monocytogenes* de muestras clínicas, agua, carne, quesos y verduras frescas y congeladas se identificaron con pruebas fenotípicas y genotípicas así como su capacidad de adherirse a células HEp-2 prefijadas. Se evaluó también el patrón de sensibilidad hacia los antimicrobianos de uso común en la listeriosis.

Las cepas de *L. monocytogenes* presentaron una resistencia hacia antimicrobianos β -lactámicos: ampicilina (48.8%), cefalotina (71.11%), ceftazidina (37.77%), penicilina (62.2%) y sensibles a Cefuroxima (84.45%), dicloxacilina (88.89%); a la quinolona: pefloxacima (74.41%); macrólido: eritromicina (68.89%); tetraciclina (84.457%) y al quimioterapéutico trimetropin-sulfametoxazol (68.89%). Al evaluar la capacidad de adherencia se observó que el 28.8% presentaron patrón de adherencia localizada, el 35.5% adherencia difusa y el 28.8% agregativa, el 4.4% restante presentó una actividad vacuolizante, fenómeno no descrito hasta la fecha para *L. monocytogenes*.

La determinación de la diversidad genética de las cepas de *L. monocytogenes* se realizó mediante la amplificación por PCR del gen rDNA16S, usando iniciadores universales. Los productos de purificados de la PCR se digirieron con las enzimas de restricción: AluI, HhaI, HaeIII, MboI y RsaI. Los productos de la digestión enzimática fueron separados por electroforesis. Con estos resultados se construyó un dendrograma, en el cual el 85% de cepas formaron cuatro grupos con 95% de índice de similitud, no existiendo una relación entre las cepas y su origen. Cuatro cepas de *L. monocytogenes* presentaron mayor variación en los patrones de restricción. La construcción de un dendrograma usando los patrones de restricción así como la actividad bioquímica permitió distinguir a *L. innocua* y *L. seeligeri* de *L. monocytogenes* con un 89% de índice de similitud. Los resultados obtenidos en nuestro trabajo sugieren que en estudios epidemiológicos la ribotipificación es una técnica rápida y fiable para la discriminación entre aislamientos de *L. monocytogenes*.

Abstract

Listeria monocytogenes is a Gram positive bacteria, facultative, psychrotrophic, intracellular foodborne pathogen. Recently, *L. monocytogenes* has been implicated in foodborne outbreaks. However, human listeriosis cases at Mexico are unknown.

The aim of this work was to evaluate the diversity of 45 *Listeria monocytogenes* strains from clinical, water, meat, cheese, frozen and fresh vegetables samples using phenotypic and genotypic methods. Additionally, we measured *L. monocytogenes* capacity to adhere to HEp-2 prefixed cells. Moreover, we investigated the strains sensitivity to several antibiotics by Kirby-Bauer and microdilutions methods.

L. monocytogenes strains exhibited resistance to β -lactamic antimicrobials: ampicillin (48.8%), cephalotine (71.11%), ceftazidime (37.77%), penicillin (62.2%), and sensitives to cefroxime (84.45%), dicloxacillin (88.89%); quinolone: pefloxacime (74.41%), macrolide: eritromycine (68.89%); tetracycline (84.45%) and to the quimiotherapeutic trimetropime-sulfametoxazol (68.89%). 28.8 % of tested strains presented a localized adhesion pattern, 35.5% diffuse adhesion and 28.8% composite, the remaining 4.4% had a vacoulizing activity. To our knowledge, vacoulizing phenomenon has not been reported in *L. monocytogenes*.

Genetic diversity of the strains of *L. monocytogenes* was estimated by RFLP patterns, obtained by amplification and digestion to 16S rDNA gene with AluI, HhaI, HaeIII, MboI and RsaI restriction enzymes. Enzymatic digestion products were separated by electrophoresis and each different RFLP pattern was codified into 0 and 1 matrix. With these results, a dendrogram was constructed using a simple matching index and grouped by UPGMA method. Dendrogram exhibited that 85% of the strains formed four groups with a 95% similarity index, without relationship between strains and sources. Four *L. monocytogenes* strains presented a higher variation in the restriction patterns. The construction of the dendrogram using the restriction patterns, as well as the biochemical activity allowed the differentiation of *L. innocua* and *L. seeligeri* from *L. monocytogenes* with an 89% similarity index. The results obtained in this work suggested that ribotyping was a rapid technique to differentiate *L. monocytogenes* isolates in epidemiological research.

INTRODUCCIÓN

1. INTRODUCCION

Los alimentos han sido durante siglos una parte fundamental para la existencia y subsistencia del hombre en la tierra. Proveen diferentes sustancias esenciales, que contribuyen a la salud y el funcionamiento adecuado del organismo. Sin embargo, también funcionan como vehículos potenciales de diferentes sustancias tóxicas y agentes infecciosos, causantes de diversas enfermedades que ponen en riesgo la salud y la vida de miles de personas en todo el mundo (OMS 2002).

Se estima que cada año, un tercio de las poblaciones de los países desarrollados y al menos dos mil millones de personas en todo el mundo, se enferman por la ingesta de alimentos contaminados, en donde las enfermedades diarreicas transmitidas por agua y alimentos son las principales causas de morbilidad y mortalidad, enfermando hasta 2.2 millones de personas, en su mayoría niños. Algunos de los agentes más comúnmente relacionados a este tipo de enfermedades son *Salmonella* spp., *Campylobacter jejuni*, *Escherichia coli* enterohemorrágica (EHEC) y parásitos de los géneros *Criptosporidium*, *Criptospora*, y tremátodos. Así mismo, destacan agentes causantes de numerosos brotes, como: *Cyclosporidium* sp, *Cyclospora* sp y *Listeria monocytogenes*. (Kaefenstein y Abdussalam 2001). Los cuales han sido considerados como los patógenos emergentes, descritos en las recientes décadas (OMS 2002).

La listeriosis, una enfermedad causada por *L. monocytogenes*, que ha tomado importancia en las últimas décadas, a pesar de que desde hace cincuenta años se sabe que *L. monocytogenes* es causante de cuadros patológicos en animales y humanos (Farber y Peterkin, 1991).

1.1 Descripción del género *Listeria*

1.1.1 Microbiología del género *Listeria*

El género *Listeria* comprende bacilos cortos Gram positivos de 0.4 a 0.5 μm de diámetro por 0.5 a 2 μm de largo, anaerobios facultativos, catalasa positivos, oxidasa negativos, rojo de metilo y Voges-Proskauer positivos, hidrolizan la esculina, móviles de 20-25°C por flagelos peritricos, pero no móviles a 37°C; no formadores de esporas y de bajo contenido de GC. Son microorganismos euitérmicos, que se pueden desarrollar en intervalos de temperatura que van desde 1 hasta 45 °C con un óptimo de crecimiento entre 30 y 35°C. Además toleran condiciones de acidez y alcalinidad (pH entre 6 y 9) teniendo un crecimiento óptimo en pH neutro o ligeramente alcalino (Farber y Peterkin, 1991; Seeliger y Jones, 1992, Schuchat *et al.*, 1991).

1.1.2 Historia

La primera descripción detallada de este microorganismo fue realizada por Murray en 1926, al cual denominaron *Bacterium monocytogenes*, debido a una monocitocis prolongada producida en la sangre periférica de conejos experimentales. Un año más tarde, Pirie independientemente describió al mismo microorganismo denominándolo *Listerella hepatolitica*. Sin embargo, al reconocer que se trataba del mismo microorganismo que había descrito Murray y de que el nombre de *Listerella* ya había sido empleado previamente, Pirie decide en 1940 nombrarlo como *Listeria monocytogenes* (Seeliger y Jones, 1992).

Posteriormente, en 1929, Gill y Nyfeldt realizaron los primeros registros del aislamiento de este bacilo a partir de animales y humanos infectados respectivamente (Gray y Killinger, 1966). A partir de esta fecha, diversos brotes de listeriosis comenzaron a registrarse no sólo en personas que estaban en contacto con animales infectados sino también en personas inmunocomprometidas, resultado del desarrollo de poderosos inmunosupresivos como los corticoesteroides y la quimioterapia en los años 60 (Schlech, 2000). Sin embargo, no fue sino hasta la década de los 80 que *L. monocytogenes* comenzó a tomar mayor importancia,

debido a diversos brotes asociados a la ingesta de diversos alimentos contaminados (Farber y Peterkin, 1991). Para esta época este género ya contaba con 7 especies: *L. monocytogenes*, *L. innocua*, *L. ivanovii*, *L. seeligeri*, *L. welshimeri*, *L. grayi* y *L. murrayi*, diferenciadas por su patogenicidad, así como por diversos estudios bioquímicos y moleculares (Rocourt *et al.*, 1987). Aunque algunos autores ya consideraban a *L. murrayi* como una subespecie de *L. grayi* (Seeliger y Jones, 1992).

Desde entonces diversos investigadores han estudiado ampliamente a este microorganismo, mostrando a lo largo de este tiempo diferentes cambios en su taxonomía, e incrementando cada vez más la lista de alimentos en los cuales es capaz de desarrollarse (Seeliger y Jones, 1992).

1.2 Generalidades de la especie

1.2.1 Características de *L. monocytogenes*

Listeria monocytogenes es el patógeno responsable de la enfermedad conocida con el nombre de listeriosis, listerilosis, listeriasis, infección listérica o granulomatosis infantiséptica.

Este patógeno es un bacilo intracelular facultativo, oportunista y β -hemolítico, capaz de producir ácido sin gas a partir de L- rhamnosa y α - D-manosa, pero no de D -Xilosa ni D-manitol (Tabla 1) (Jay, 1995).

Crece a temperaturas relativamente bajas desde -0.4 a 10°C y con límites superiores de hasta 50°C. Al observarlo al microscopio, en cultivos jóvenes presenta un movimiento de deslizamiento muy particular a temperatura ambiente, semejante a un espiral, parecido a las corinebacterias o a los diplococos Gram positivos, mientras que en cultivos viejos se pueden apreciar estructuras filamentosas largas que miden de 6-20 μm de longitud, presentando una tinción irregular (Seeliger y Jones, 1986; Junttila *et al.*, 1988; Jones y Seeliger, 1992; Bayles *et al.*, 1996).

Tabla 1. Comparación entre *L. monocytogenes* y algunas otras especies representativas género *Listeria*.

Prueba	<i>L. monocytogenes</i>	<i>L. innocua</i>	<i>L. ivanovii</i>	<i>L. seeligeri</i>	<i>L. welshimeri</i>	<i>L. grayi</i>
Catalasa	+	+	+	+	+	+
Movilidad a 25°C	+	-	-	-	-	-
β-hemólisis	+	+	-	-	+	-
Rojo de metilo	+	+	+	+	+	+
Voges proskauer	+	+	+	+	+	+
D- glucosa	+	+	+	+	+	+
D- manosa	+	+	-	-	+	+
D- manitol	-	-	-	-	-	+
D- Xilosa	-	+	-	+	+	-
L- ramnosa	+	-	V	V	-	-
Hidrólisis de la esculina	+	+	+	+	+	+
Hidrólisis del hipurato	+	+	+	+	-	-
CAMP/ <i>S. aureus</i>	+	-	-	+	-	-

V= variable

Modificado de Jay 1995.

1.2.2 Hábitat

La capacidad de *L. monocytogenes* para sobrevivir y desarrollarse en una amplia variedad de condiciones (pH, temperatura, salinidad, etc.), hacen posible la amplia distribución de este microorganismo en el ambiente. Puede encontrarse como saprófito en el suelo y plantas, o bien en ambientes acuáticos como: aguas limpias, ríos, lagos, estuarios marinos (Macgowan *et al.*, 1994) y lugares en donde la población celular es alta como el fango, aguas residuales y vegetación en descomposición donde, la presencia del microorganismo es probablemente debida a la contaminación fecal (Watkins y Sleath, 1981; Seeliger y Jones, 1992).

Además, se ha descrito que al menos 42 diferentes especies de mamíferos y 17 especies de aves (Seeliger y Jones, 1992) así como del 2-6% de la población sana (Rocourt, 1996) son portadores asintomáticos de este microorganismo.

Esta extraordinaria ubicuidad, además de su capacidad para crecer a temperaturas de refrigeración, pH bajo y tolerancia hacia agentes conservadores como el cloruro de sodio y nitrato de sodio, han permitido la incorporación de *L.*

monocytogenes en diferentes alimentos tanto crudos como procesados que van desde vegetales, carne, mariscos, leche y sus derivados, hasta productos ahumados, congelados precocinados y pasteurizados (Ben Embarek, 1994; Beuchat, 1996; Eklund *et al.*, 1995; Farber y Peterkin, 1991; Flemming *et al.*, 1985; Jay, 1996; Kozak *et al.*, 1996).

1.3 Taxonomía

Inicialmente el género *Listeria* estaba clasificado por el manual de Bacteriología Sistemática en la sexta y séptima edición, en la familia Corynebacteriaceae (Breed *et al.*, 1957). Sin embargo, diversos estudios clasifican a éste género en una sección titulada “Bacilos Gram positivos no formadores de esporas” junto con *Lactobacillus*, *Erysipelotrix*, *Brochotrix* y otros géneros en la octava edición de dicho manual. Para entonces, por medio de taxonomía numérica y análisis químico de la pared celular y contenido y composición de lípidos, se sabía que el género estaba estrechamente relacionado con el género *Brochotrix*, y que ambos géneros ocupaban una posición entre *Lactobacillus* y *Bacillus*, los cuales, a su vez están mas distantemente relacionados de los géneros *Streptococcus*, *Lactococcus*, *Enterococcus*, *Staphylococcus*, *Kurthia*, *Gemella* y *Erysipelothrix* (Seeliger y Jones, 1986).

Actualmente en la segunda edición del manual Bergey’s de Bacteriología Sistemática, el género *Listeria* esta clasificado en el volumen 3, sección XXII, que pertenece a las bacterias Gram positivas con bajo contenido de GC, dentro de la familia Listeriaceae con 6 especies que son: *L. monocytogenes*, *L. ivanovii*, *L. innocua*, *L. seeligeri*, *L. welshimeri* y *L. grayi*; esta ultima con las subespecies *grayi* y *murrayi*. De éstas, sólo *L. monocytogenes* y *L. ivannovi* son capaces de producir infecciones, la primera tanto en humanos como en animales, mientras *L. ivanovii* únicamente en animales (Garrity *et al.*, 2002).

1.4 Estructura antigénica

Dentro del género *Listeria* 5 especies relacionadas serológicamente dan origen a 16 serovariedades de acuerdo a sus 15 antígenos somáticos O (I - XV) y 5 antígenos flagelares H (A-E). *Listeria grayi* es diferente de las otras debido a sus

determinantes antigénicos, pero existe una estrecha relación entre cada una de sus subespecies: *L. grayi* y *L. murrayi*.

Tabla 2. Esquema de identificación de acuerdo a las serovariedades principales del género *Listeria*.

ESQUEMA DE IDENTIFICACION																			
Paterson	Seeliger-Donker-Voet	Antígenos O												Antígenos H					
1	1/2a	I	II	III											A	B			
	1/2b	I	II	III											A	B	C		
2	1/2c	I	II	III												B		D	
3	3a		II	III	IV										A	B			
	3b		II	III	IV							XII	XIII		A	B	C		
	3c		II	III	IV							XII	XIII			B		D	
4	4a			III		V		VII		IX					A	B	C		
	4ab			III		V	VI	VII		IX	X				A	B	C		
	4b			III		V	VI								A	B	C		
	4c			III		V		VII							A	B	C		
	4d			III		V	VI		VIII						A	B	C		
	4e			III		V	VI		VIII	IX					A	B	C		
	5			III		V	VI		VIII		X				A	B	C		
	7?			III								XII	XIII		A	B	C		
	6a (4f)			III		V	VI	VII						XV	A	B	C		
	6b (4g)						VI	VII		IX	X	XI			A	B	C		
<i>L. grayi</i>				III								XII	XIV						E
<i>L. murrayi</i>				III								XII	XIV						E

Fuente: Jones y Seeliger 1992

Los determinantes antigénicos que dan origen a las 16 serovariedades del género (1/2a, 1/2b, 1/2c, 3a, 3b, 3c, 4a, 4ab, 4b, 4c, 4d, 4e, 5, 7, 6a(4f) y 6b(4g)),

están asociados principalmente a la diversidad estructural de 2 tipos de ácidos teicoicos presentes en la pared celular bacteriana (Tabla 2) (Jones y Selliger, 1992).

Uno de estos ácidos teicoicos, está asociado a los serotipos 1/2a, 1/2b, 1/2c, 3a, 3b, 3c y 7 mientras que el otro está asociado a 4a, 4b y 4d. Los serovares de este género no son específicos a excepción del serovar 5 que pertenece a *L. ivanovii*, aunque si puede diferenciarse *L. innocua* y *L. welshimeri* de *L. monocytogenes* ya que presentan diferente estructura antigénica (tabla 2). Por lo que el uso exclusivo de serología para la diferenciación de *L. monocytogenes* no es de mucha utilidad, sin embargo, los serotipos 1/a, 1/2b y 4 b son los más frecuentes asociados en los casos de listeriosis tanto en animales como en humanos.

1.5 Epidemiología

La listeriosis, una enfermedad causada por *Listeria monocytogenes*, se ha reconocido recientemente como un importante problema de salud pública debido al gran número de brotes que han tenido lugar en las últimas décadas ocasionados por el consumo de alimentos contaminados. Esta infección, puede producirse en diferentes formas que dependen de una variedad de factores que incluyen: la cantidad del inóculo, la susceptibilidad del huésped y la virulencia específica de la cepa (Schuchat *et al.*, 1991).

Esta infección se presenta con mayor frecuencia en niños, personas de la tercera edad y personas inmunocomprometidas. De hecho, las poblaciones más susceptibles al microorganismo en orden descendente de riesgo son: pacientes transplantados, pacientes con VIH, mujeres embarazadas, enfermos de cáncer y ancianos (Rocourt, 1996).

A partir de 1981 se han descrito diversos brotes y casos esporádicos de listeriosis con un índice de mortalidad promedio del 30%, los cuales, han sido asociados al consumo de una gran diversidad de alimentos (Tabla 3). El análisis de los brotes transmitidos por estos alimentos han mostrado que los serotipos más frecuentemente involucrados son: 1/2a, 1/2b y 4b, sin embargo, no muestran alguna relación con respecto al periodo de incubación y a la dosis infectante (Farber y Peterkin, 1991; Schlech, 2000; Bell y Kyrikiades 2000).

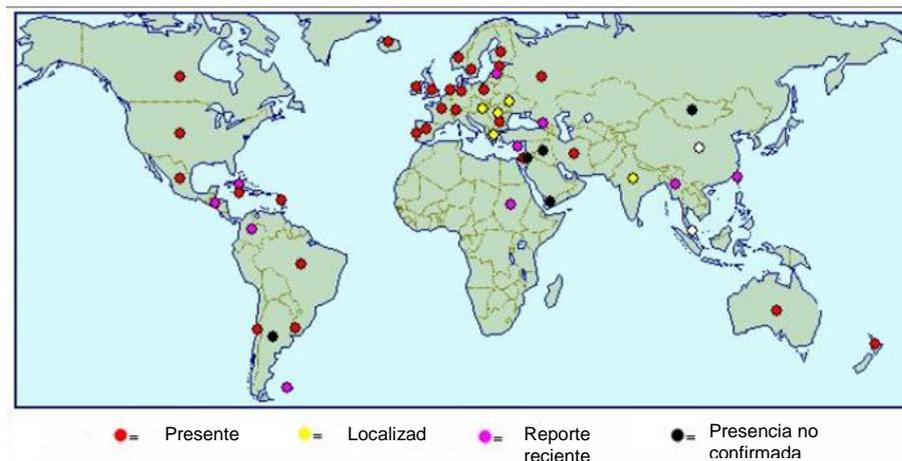


Figura 1. Mapa de distribución de casos reportados de *Listeria*

Fuente: URL3

En este momento hay evidencia de que números bajos de *L. monocytogenes* pueden causar listeriosis, pero se piensa que menos de 1000 organismos/g de alimento son suficientes para causar la infección en personas susceptibles (Lorber, 1996). Por otro lado, se reconoce que el periodo de incubación tiene un amplio intervalo que va desde 1 hasta 91 días, que bajo condiciones ideales, puede reducirse, de 1 a 2 días (Broome, 1993) y que cantidades extremadamente elevadas de *L. monocytogenes* pueden provocar la rápida aparición de síntomas como vómito y diarrea. (Salamina *et al.*, 1996).

En la actualidad la incidencia de listeriosis en diferentes países ha disminuido considerablemente. Se estima que alrededor de entre 2-11 casos de listeriosis por millón de habitantes se presentan en países como Inglaterra, Dinamarca, USA, Canadá y Francia. En México, la frecuencia y mortalidad de ese importante patógeno es desconocida (Figura.1).

Es importante hacer notar que las poblaciones susceptibles (tercera edad, cáncer, SIDA, etc.) continúan en aumento así como los productos alimenticios en los cuales *L. monocytogenes* es capaz de sobrevivir y multiplicarse por lo que deben seguir aplicándose mejoras en el sector industrial así como recomendaciones dirigidas a los grupos de riesgo para evitar la diseminación y la aparición de nuevos brotes asociados a este importante patógeno (Bell y Kyrikiades, 2000).

Tabla 3. Principales brotes de Listeriosis asociados al consumo de alimentos

Periodo	País	Casos (%mortalidad)	Alimento
1980-1981	Canadá	41 (34)	Ensalada de col
1983	USA	49 (29)	Leche pasteurizada
1983-1984	Suiza	57 (32)	Queso
1985	USA	142 (34)	Queso estilo mexicano
1986-1987	USA	36 (44)	Desconocido
1989	?*	10 (10)	Camarón
1992	Francia	38 (32)	Lengua de credo
1993	Italia*	39	Ensalada de arroz
1994	USA*	45	Leche con chocolate
1997	Italia*	1566	Ensalada de maíz
1998-1999	USA	102 (21)	Hot dogs
1999	Francia	32 (31)	Puerco
2002 ^a	USA	46(15)	Pollo

*Brotes de incubación corta (Gastroenteritis febril)

^a Fuente no oficial

Tomado de: Schelench 2000

1.6 Fisiopatología de la infección

1.6.1 Características clínicas

La listeriosis puede presentarse principalmente en dos formas clínicas: la listeriosis perinatal y listeriosis en el paciente adulto, donde los signos clínicos de la infección son muy similares en todos los casos. A pesar de que *L. monocytogenes* es un patógeno capaz de atravesar las barreras digestiva, placentaria y nerviosa, la forma clínica predominante es una infección diseminada o local en el sistema nervioso central (SNC) (Vázquez-Boland *et al*, 2000).

1.6.2 Listeriosis neonatal

Esta forma se presenta por la invasión del feto vía transplacentaria, que puede ocasionar aborto, generalmente a los 5 meses de gestación, alumbramiento prematuro o bien un recién nacido con infección generalizada, conocida como

granulomatosis infantiséptica y caracterizada por la presencia de microabscesos pyogranulomatosos diseminados por todo el cuerpo del recién nacido (Klatt *et al*, 1986). En la madre esta infección es generalmente asintomática o puede presentarse como un síndrome gripal leve (flu-like) con fatiga, dolor muscular y dolor de cabeza (Schuchat *et al*, 1991). La listeriosis neonatal aunque es menos frecuente (10-15%), se presenta de 1-8 semanas post parto e incluye un síndrome febril acompañado de meningitis y en algunos casos gastroenteritis y neumonía. Esta forma de infección puede tener secuelas importantes como hidrocefalia o retraso psicomotor (Vázquez-Boland *et al*, 2000).

1.6.3 Listeriosis en adultos

En esta forma de listeriosis la afectación al SNC es la más importante. Esta infección generalmente se desarrolla como una meningoencefalitis acompañada de cambios severos en la conciencia, desordenes motores, y en algunos casos, parálisis de los nervios craneales. Esta forma encefálica es bifásica, en la primera fase se presenta un síndrome subfebril que dura de 3 a 10 días, en la cual, se puede presentar dolor de cabeza, vómito, desordenes visuales y malestar general, seguida de una segunda fase de signos severos de romboencefalitis (Schlech, 2000; Vázquez-Boland *et al*, 2001).

Listeria monocytogenes es uno de los patógenos más comunes que causan meningitis en adultos después de *Streptococcus pneumoniae*, *Neisseria meningitidis* y *Streptococcus* del grupo B. Aunque en pacientes con cáncer, *L. monocytogenes* es la causa más común de meningitis bacteriana (Schuchat *et al*, 1997).

La listeriosis puede también presentarse en forma de bacteremia o septicemia y en otras formas clínicas atípicas de la infección como miocarditis, neumonía, pleuritis, hepatitis, colecistitis, peritonitis, siendo el síndrome gastroentérico febril la principal manifestación clínica de la infección con síntomas como vómito, diarrea y fiebre (Dalton *et al*, 1997).

La forma cutánea caracterizada por un sarpullido poligranulomatoso, ocurre en personas que se encuentran en contacto con animales infectados (Blanco y Aranaz, 2004).

I.6.4 Diagnóstico

La listeriosis se diagnostica cuando *L. monocytogenes* es cultivada a partir de sangre, líquido cefalorraquídeo, o algún otro sitio normalmente estéril. El aislamiento de *Listeria* a partir de sitios como la placenta y el líquido amniótico en asociación con los síntomas clínicos puede sugerir listeriosis perinatal. *Listeria* crece en una amplia variedad de medios de cultivo no selectivos como agar sangre, agar chocolate, agar soya tripticasa y agar infusión cerebro corazón. El aislamiento a partir de alimentos y muestras clínicas no estériles requiere enriquecimiento previo al aislamiento selectivo. El cultivo de *L. monocytogenes* a partir de heces no es útil en el diagnóstico, ya que el transporte gastrointestinal del microorganismo puede ocurrir sin la enfermedad clínica. Las pruebas serológicas no contribuyen al diagnóstico debido a que la respuesta de anticuerpos puede ser no específica y por que los pacientes con cultivos confirmados han mostrado niveles indetectables de anticuerpos contra *L. monocytogenes* (Schuchat *et al*, 1991).

I.6.5 Tratamiento

Al ser la listeriosis una enfermedad relativamente rara en humanos, no hay estudios prospectivos y controlados que establezcan el mejor tratamiento. Se ha visto que *L. monocytogenes* puede ser resistente a los mecanismos de muchos antibióticos porque es intracelular y usa este mecanismo para multiplicarse y protegerse de los antibióticos que se encuentran en el fluido extracelular; sólo pocos agentes pueden penetrar, acumularse y alcanzar el citosol de las células que hospedan este microorganismo (Charpentier y Courvalin 1999).

Actualmente se considera que los antibióticos de primera elección son la penicilina o la ampicilina, solas o asociadas a gentamicina. Se han descrito fallos terapéuticos con estos antibióticos, pero nunca se ha demostrado resistencia al compuesto utilizado; el antibiótico de segunda elección es la eritromicina (Hof *et al*, 1997). La combinación de trimetoprim y sulfametoxazol se ha utilizado con éxito en pacientes alérgicos a penicilinas, considerándose en la actualidad la terapia

alternativa en esta circunstancia (Charpentier y Courvalin, 1999). La duración del tratamiento no está clara. Tras dos semanas de terapia se han descrito recurrencias en pacientes inmunosuprimidos; por lo que parece conveniente prolongar la terapia entre tres y seis meses. En general dos semanas parecen ser suficientes en bacteremias mientras que en meningitis se deberían utilizar ciclos más largos (Hof *et al*, 1997).

1.6.6 Patogénesis

Debido a que los alimentos contaminados son la principal fuente de infección en epidemias y casos esporádicos, se piensa que tras haber superado la acidez del estómago, el tracto gastrointestinal es el sitio primario de entrada del patógeno al huésped, en este caso, el curso clínico de la infección comienza alrededor de 20 horas después de haber ingerido el alimento contaminado (Riedo *et al*, 1994). Aunque también, se ha sugerido que la invasión del SNC puede producirse directamente a partir de lesiones en la mucosa bucal, desde donde el microorganismo puede acceder a las terminaciones de los nervios trigémino o facial, ascendiendo hasta alcanzar el tronco del encéfalo (Blanco y Aranaz, 2004).

L. monocytogenes es un patógeno intracelular capaz de multiplicarse en varios tipos de células (fagocíticas y no fagocíticas). Además, tiene la habilidad de atravesar la barrera intestinal, placentaria y hematoencefalica durante su infección. Una vez que ha atravesado la barrera intestinal, *L. monocytogenes* comienza su multiplicación en las células fagocíticas adyacentes a las placas de Peyer para posteriormente trasladarse mediante la vía linfática y circulación sanguínea al hígado y bazo, los cuales, constituyen los órganos blanco primarios de la infección. (Schuchat *et al*, 1991; Vázquez –Boland *et al*, 2001)

Esta fase hepática, donde comienza la aparición de granulomas, generalmente es controlada por la respuesta inmune celular. Sin embargo, si el individuo se encuentra inmunodeprimido a algún defecto patológico o fisiológico e incluso por el embarazo, que afecte principalmente la inmunidad mediada por células T, el organismo puede verse incapacitado para frenar la infección, lo que ocasionaría una intensa multiplicación bacteriana con una posterior fase de septicemia y la llegada a órganos secundarios como la placenta y el SNC dando

lugar a los cuadros clínicos característicos de la infección (Vázquez- Boland *et al*, 2001; Schuchat *et al*, 1991).

1.7 Patogenicidad y virulencia

La patogenicidad y la capacidad de crecer intracelularmente de *L. monocytogenes* esta determinada por diferentes compuestos considerados como factores de virulencia que, durante mucho tiempo han indicado que su virulencia es multifactorial. Entre estos factores de virulencia podemos mencionar: enzimas como catalasa y superóxido dismutasa; compuestos de fierro, componentes de superficie, hemolisinas, un compuesto que induce la actividad productora de monocitocis y otro que promueve la actividad inmunosupresora (Abigail y Whitt, 1994).

1.7.1 Generalidades

Como se mencionó anteriormente, el ciclo intracelular de *L. monocytogenes* comienza con la adherencia a la superficie de la célula eucariota, seguida de la invasión de la bacteria dentro de la célula huésped, con el fin de establecerse en el tejido y colonizarlo eficientemente, logrando así producir la enfermedad (Arp, 1988).

La colonización es la formación de una población estable de bacterias en un hábitat favorable. Este proceso requiere la adecuada multiplicación de la población bacteriana localizada para poder reemplazar a las bacterias perdidas por dispersión y/o mecanismos bactericidas locales. La estrategia básica de las bacterias es primeramente vivir dentro de microcolonias protectoras adherentes, en hábitats nutricionalmente favorables y dirigirse así hacia las células adyacentes para reconocerlas y establecer nuevas microcolonias en ambientes más favorables. El destino de la bacteria sobre la superficie de la mucosa está determinado por la capacidad de la bacteria para explotar el hábitat disponible y por su evasión a los mecanismos de defensa del huésped. El primer paso crítico para que se lleve a cabo la infección de la mucosa es que la bacteria establezca y mantenga su posición en estrecha proximidad con la superficie de la mucosa (Arp, 1988)

La colonización bacteriana de una superficie mucosa requiere que la bacteria (i) establezca una interacción estrecha sobre la superficie de la mucosa, (ii) adquiera los nutrientes esenciales para su crecimiento, (iii) se multiplique lo suficiente como para mantener o expandir su población y (iv) resista las defensas locales de la célula huésped.

Los mecanismos por los que la bacteria mantiene proximidad estrecha sobre la superficie de una mucosa pueden clasificarse en asociación, adherencia e invasión, de acuerdo al grado de cercanía entre la bacteria y la superficie de la célula huésped. La asociación, la menor forma de interacción implica un proceso de adherencia débil y reversible o la localización de la bacteria a lo largo de la superficie. Adherencia, una forma más íntima de adherencia que la asociación, describe un ataque relativamente estable e irreversible mediado por moléculas especializadas complementarias de la bacteria y de la superficie celular. La forma más íntima de interacción bacteria-célula es la invasión, en donde la bacteria patógena penetra la barrera mucosa para establecerse dentro de las células epiteliales o el tejido adyacente (Arp, 1988).

I.7.2 Asociación

Es un periodo inespecífico para la localización de la bacteria sobre una superficie; puede preceder a la adhesión específica o a la invasión. Las bacterias pueden mantener su posición a lo largo de la superficie de la mucosa por este mecanismo a pesar de la presencia de moco o exudado al establecer un pequeño número de enlaces no covalentes entre la superficie de la bacteria y por quimiotaxis. El mecanismo de quimiotaxis requiere que la bacteria exprese flagelos y el arreglo necesario de receptores en la célula huésped. Este mecanismo capacita a la bacteria para explotar regiones de la mucosa con sustratos óptimos disponibles y también para penetrar la capa mucosa y aumentar el contacto con receptores sobre la superficie de células epiteliales (Arp, 1988).

I.7.3 Adherencia

La adhesión (o adherencia) es la unión entre una bacteria y un sustrato a través de adhesinas bacterianas, mediante un ataque relativamente estable e irreversible, por lo tanto, se dice que la bacteria se ha adherido cuando se requiere energía para separar a la bacteria del sustrato (Ofek y Doyle, 1994; Arp, 1988).

La mayoría de las bacterias adherentes pueden no ser dañinas, pero para algunas bacterias patógenas la adhesión representa el primer paso esencial en la cadena de eventos que pueden resultar en la patología. No obstante, es importante recordar que un microorganismo que se adhiere a una superficie debe encontrar condiciones apropiadas en el sitio de adhesión que le permitan sobrevivir y crecer en dicho sitio. Un cuerpo sano provee tres tipos de superficie para que una bacteria pueda adherir: mucosas, piel y dientes. Sin embargo, ninguno de estos es una estructura uniforme y en cada uno existen una gran variedad de formas que proveen diferentes tipos de sitios para la adhesión. Es difícil, por lo tanto, para un amplio número de bacterias instalarse sobre tales superficies (Wilson *et al*, 2002a).

I.7.3. 1 Mecanismos involucrados en la adherencia

A pesar de que una amplia variedad de superficies pueden funcionar como sustratos para la adhesión bacteriana, las bases moleculares del proceso de adhesión son similares en todos los casos. Recordemos que una bacteria típica tiene un diámetro de aproximadamente 1 μ m, cuando la distancia entre ambos se encuentra en el orden de los nanómetros, los dos objetos son afectados por fuerzas de van der Waals y fuerzas electrostáticas. A una distancia de >50 nm sólo operan fuerzas de van der Waals, esto resulta en la inducción de un momento dipolo entre los dos objetos causando la mutua atracción. Cuando la distancia entre los dos objetos disminuye (10-20nm) las fuerzas electrostáticas se vuelven significantes y, la mayoría de las bacterias y superficies adquieren una carga negativa, el efecto neto es la repulsión. En acercamientos mas pronunciados entre la bacteria y la superficie interviene moléculas de agua que actúan como una barrera del acoplamiento. Sin embargo, las moléculas hidrofóbicas en la superficie de la bacteria, el sustrato o ambos pueden excluir estas moléculas de agua. (Figura 2). Las interacciones

hidrofóbicas entre la bacteria y el sustrato pueden resultar en la adhesión o pueden permitir un acercamiento suficiente (<1.0 nm) para que otras interacciones adhesivas ocurran. Estas interacciones adhesivas incluyen los enlace de hidrógeno, la coordinación mediante cationes y la unión receptor-ligando y son reconocidas como las más importantes en la adhesión de una bacteria a su célula huésped y a sustratos inanimados (Wilson *et al*, 2002a).

Las interacciones hidrofóbicas actúan cuando moléculas no polares en la bacteria y el sustrato se aproximan demasiado ocasionando que capas de agua sean desplazadas, lo que resulta en el incremento de la entropía, por lo cual la adhesión se vuelve energéticamente favorable. Los componentes de superficie responsables de estas interacciones son conocidas como hidrofobinas e incluyen hidrocarburos, aminoácidos aromáticos, ácidos grasos y ácidos micólicos (Wilson *et al*, 2002a).

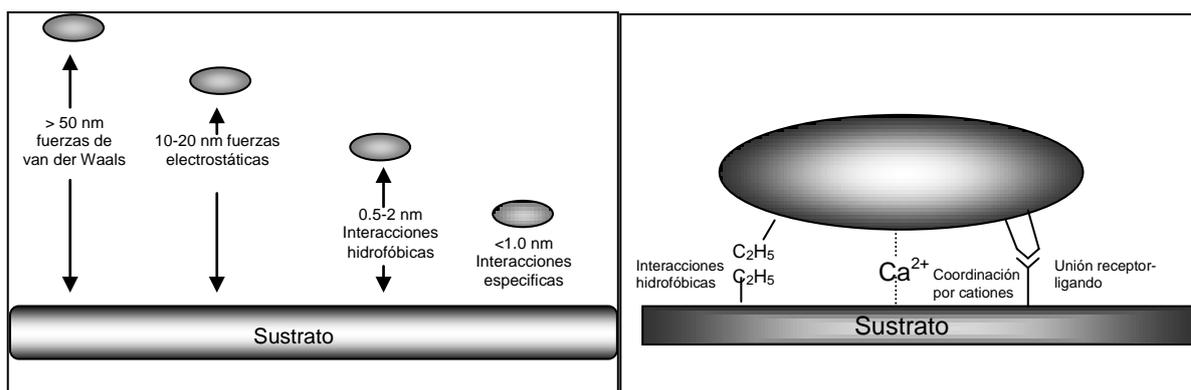


Figura 2. Fuerzas fisicoquímicas involucradas en la adhesión bacteriana. Como es indicado en la figura, estas operan a diferentes distancias entre la bacteria y el sustrato al cual se adhiere.

Figura 3. Los principales tipos de interacciones moleculares involucradas en la adhesión. En la adhesión de una bacteria a un sustrato pueden participar una o más de éstas.

Las superficies de las bacterias, células huésped y materiales inanimados invariablemente poseen una carga negativa en medio acuoso. La repulsión mutua entre estas superficies cargadas puede ser contrarrestada por iones metálicos divalentes como los iones calcio, los cuales actúan como un puente entre las dos superficies (Wilson *et al*, 2002a).

Por último, la unión receptor-ligando se genera cuando una molécula (receptor) en la superficie de una célula o molécula inanimada puede reconocer a una molécula (ligando) en la superficie bacteriana, ya que poseen una estructura complementaria, lo que genera una unión fuerte (pero no covalente). El proceso es similar al de llave-cerradura entre el sitio catalítico de una enzima y su sustrato. (Figura 3). Una gran variedad de moléculas pueden funcionar como receptores o ligandos, incluyendo proteínas, polisacáridos, glicoproteínas y glicolípidos (Wilson *et al*, 2002a).

I.7.3.2 Estructuras bacterianas implicadas en la adhesión

Existen estructuras en la superficie bacteriana que poseen funciones en la adhesión de algunas especies bacterianas a ciertas superficies. Muchas de estas moléculas, sin embargo, son multifuncionales y han sido involucradas en procesos distintos a la adhesión. No obstante, algunas estructuras producidas por bacterias parecen ser designadas únicamente para mediar la adhesión a una superficie, si esta es celular o no, estas estructuras son conocidas como pilis o fimbrias (Wilson *et al*, 2002a). Éstas consisten en apéndices, formados por subunidades de proteínas que están anclados en la membrana externa de las bacterias Gram negativas y en la pared celular de las Gram positivas. Las fimbrias pueden ser tubulares (rígidas) o flexibles. Las fimbrias rígidas son usualmente de 6-10 nm de diámetro y llevan adhesinas en las puntas o en algunos casos, a lo largo de sus lados. Las fimbrias flexibles son delgadas (<5 nm de diámetro) y por lo general poseen adhesinas a lo largo de toda su longitud. Otras estructuras y apéndices

que poseen adhesinas son los flagelos, capsulas, membrana externa y las fibrillas (Ofek y Doyle, 1994).

Algunos organelos especializados se han encontrado en un intervalo más limitado de organismos, por ejemplo, las estructuras denominadas “curli” en *Escherichia coli* y *Salmonella* spp las cuales participan en el ataque a células epiteliales y a ciertas proteínas huéspedes tales como fibronectina y plasminógeno. En adición, algunos organismos producen estructuras especializadas involucradas en la adhesión solo bajo ciertas circunstancias, por ejemplo, con solo 15 minutos de contacto con una célula epitelial, *Salmonella typhimurium* produce apéndices de superficie conocidos como invasomas y desaparecen cuando la internalización ha comenzado (Wilson *et al*, 2002a).

I.7.3.2 Naturaleza y función de las adhesinas involucradas en la adhesión

Una amplia variedad de moléculas presentes en las estructuras adherentes de las bacterias pueden funcionar como adhesinas, las cuales se definen como moléculas de superficie bacterianas capaces de unir a un receptor a su sustrato. (Ofek y Doyle, 1994). La mayoría de las adhesinas bacterianas están compuestas de proteínas, polisacáridos, lipopolisacáridos, enzimas, ácidos lipoteicoicos o conjugados de estos (Wilson *et al*, 2002a).

Una gran variedad de especies bacterianas expresan más de un tipo de adhesinas. Se denomina sitio de adhesina a la región de la molécula de adhesina que participa en la interacción estéreo-específica con el receptor. En algunos casos, una adhesina puede poseer dos o más sitios de adhesina específicos para dos distintos receptores (Ofek y Doyle, 1994). En muchos casos, las adhesinas se localizan al final de las estructuras adherentes, las cuales sobresalen relativamente largas distancias de la pared celular. Esto resulta ventajoso para algunos organismos en los que la adhesión puede ser conseguida a grandes distancias de separación en los que la repulsión, debida a las cargas negativas, surte efecto.

Las adhesinas se clasifican en dos grupos: fimbriales y afimbriales. Las fimbrias son apéndices que sobresalen a manera de cabellos de la superficie bacteriana y consisten en arreglos ordenados helicoidalmente de subunidades de una sola proteína llamada pilina. Frecuentemente, la punta de la fimbria es que se une al receptor en el huésped. Los patógenos Gram negativos dependen particularmente de fimbrias para la adherirse, ejemplos de estos microorganismos son *Escherichia coli*, *Vibrio cholerae*, *Pseudomonas aeruginosa* y algunas especies de *Neisseria* (Wilson *et al*, 2002b).

Las adhesinas afimbriales son proteínas que funcionan como factores de adherencia, pero no forman largas estructuras poliméricas como las fimbrias. Generalmente propician un contacto más íntimo con el huésped. Algunos Gram negativos (*Yersinia pseudotuberculosis*, *E. coli* enteropatógena, *Neisseria* spp), Gram positivos (*Staphylococcus* spp, *Streptococcus* spp) y las micobacterias expresan adhesinas afimbriales (Wilson *et al*, 2002b).

Las adhesinas pueden ser moléculas multifuncionales, como en el caso de la enzima gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa participante de la vía glicolítica, dicha enzima ha sido encontrada en la superficie de bacterias tales como *Staphylococcus aureus*, *S. epidermidis* y *Streptococcus pyogenes*, en éstas, la enzima no sólo posee la función de adhesina, sino que también está involucrada en la adquisición de transferrina y en la señalización bacteria-huésped. Se ha observado que un organismo particular a menudo posee varias adhesinas, aunque es poco probable que estas se expresen al mismo tiempo; este es el caso de especies invasivas, dichos organismos pueden encontrar una gran variedad de superficies en diferentes momentos durante el inicio y desarrollo del proceso infeccioso (Wilson *et al*, 200a).

I.7.3.3 Moléculas del huésped que funcionan como receptores

Como se mencionó anteriormente, los humanos proveen diferentes tipos de superficies susceptibles al ataque bacteriano. Sin embargo, independientemente de si la superficie es celular, acelular (por ejemplo, las moléculas de matriz extracelular o ECM), mineralizados (ej. dientes o huesos) o inanimados (ej. dispositivo prostético), la adhesión es mediada, al menos en parte, por la unión receptor-ligando. Las bacterias pueden adherirse a las células huésped por tres medios: (i) directamente a la bicapa lipídica, (ii) directamente a los receptores de la superficie celular para moléculas del huésped, o (iii) indirectamente a las moléculas del huésped ya unidas a la superficie de la célula huésped. La figura 4 muestra los componentes de la superficie de una típica célula huésped, esta es la clásica estructura de bicapa lipídica en la cual se encuentran proteínas embebidas. Varias de estas estructuras contienen moléculas que funcionan como sitios de unión para adhesinas bacterianas.

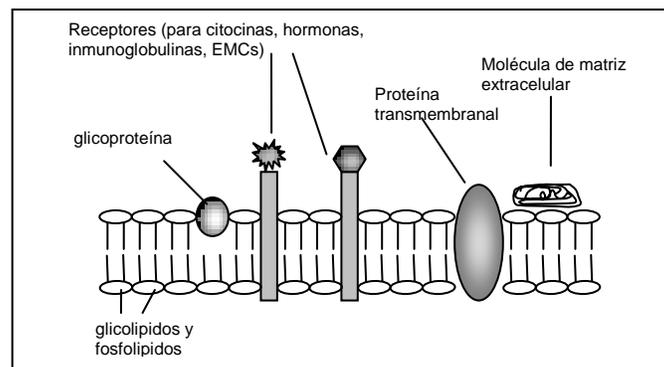


Figura 4. Diagrama mostrando los principales tipos de moléculas que se encuentran en la superficie de una célula típica de mamífero. La mayoría de estos pueden funcionar como receptores para adhesinas bacterianas. Tomado de Wilson *et al*, 2002a.

Los principales lípidos presentes en una bicapa lipídica son fosfatidilcolina, fosfatidilserina, fosfatidilinositol, esfingomiélna, colesterol y varios glicolípidos, la mayoría de estos contienen moléculas que funcionan como sitios de unión para adhesinas bacterianas. Ciertas secuencias de aminoácidos de las proteínas y

algunos carbohidratos de las glicoproteínas funcionan como receptores para adhesinas. Las EMC no solo poseen funciones estructurales, se ha observado que algunas bacterias pueden adherir a las ECM y también a los receptores de la célula huésped para estas moléculas. Entre las EMC que pueden funcionar como sitios de unión para adhesinas se encuentran el colágeno, elastina, laminina, fibronectina, heparan sulfato y heparina. Estos dos últimos funcionan como sitios de adhesión de *Listeria monocytogenes* (Wilson *et al*, 2002a).

I.7.3. 4 Consecuencias de la adhesión bacteriana

Por muchos años se ha sabido que la adhesión de un organismo a un sustrato afecta considerablemente su velocidad de crecimiento, utilización de carbohidratos, síntesis de proteínas y generación de energía; todo esto como consecuencia del nuevo ambiente al que se expone y a sus factores, a los cuales se debe adaptar.

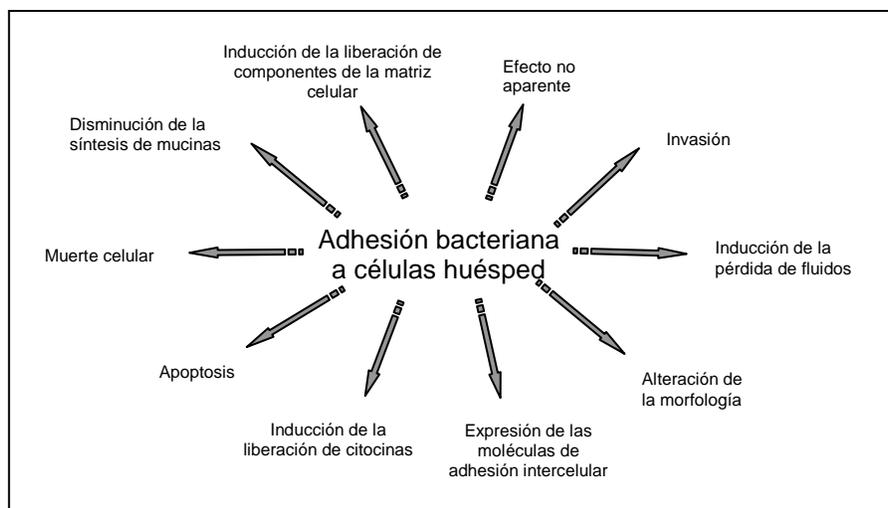


Figura 5. La adhesión bacteriana a una célula huésped puede inducir uno o más cambios en la células huésped, los más comunes son mostrados en el diagrama. Tomado de Wilson *et al*, 2002a.

Sin embargo, poca atención se ha puesto en los efectos que genera la adhesión sobre el huésped. A nivel microscópico, la adhesión puede ocasionar cambios no aparentes en la células huésped (aunque pudiera estar afectada la

regulación positiva o negativa de algunos productos de genes) o la célula puede sufrir cambios dramáticos en su morfología resultando en la invasión por la bacteria, la muerte celular o ambos (Figura 5)

Por ejemplo, la mayoría de los miembros de la microflora normal no provocan efectos aparentes; las cepas de *Escherichia coli* enteropatógena y *Streptococcus pyogenes* inducen la alteración de la morfología de las células en las que se establecen, *Mycoplasma* spp provoca la muerte celular, *Yersinia enterocolítica* induce apoptosis. *Helicobacter pylori* provoca varios efectos, como son alteración de la morfología, inhibición de la secreción de mucina, apoptosis e inducción de la liberación de citocinas. Entre las bacterias invasivas se encuentran, *L. monocytogenes*, *Salmonella* spp, *Shigella* spp y *Neisseria* spp.

1.7.4 Adherencia e invasividad

L. monocytogenes es capaz de atravesar la barrera intestinal e invadir otros tejidos mediante la inducción de su propia endocitosis. La adherencia de la bacteria a la célula huésped, se lleva a cabo mediante el reconocimiento de diferentes receptores celulares como son: los receptores de α -D galactosa, receptores de las fracciones C1Q, C3bi del complemento, y algunos componentes de la matriz extracelular (Abigail *et al*, 1994; Vázquez-Boland *et al*, 2001). Además, 2 proteínas de 80 y 60 KDa denominadas Internalina y proteína p60 respectivamente, parecen estar involucradas en la entrada e invasividad del patógeno a su célula huésped (Farber y Perterkin, 1991).

1.7.5 Crecimiento intracelular y propagación celular

La virulencia de la cepa y la activación de los macrófagos son factores determinantes para la sobrevivencia de *L. monocytogenes* en la célula huésped. La secreción de la hemolisina, conocida como Listeriolisina O (LLO), como factor de virulencia no es necesaria para el crecimiento dentro de los tejidos del huésped, sin embargo, si permite el escape de la bacteria a través de la

membrana del fagosoma, permitiendo con ello el crecimiento y replicación de *L. monocytogenes* en el citoplasma celular (Vázquez-Boland *et al*, 2001).

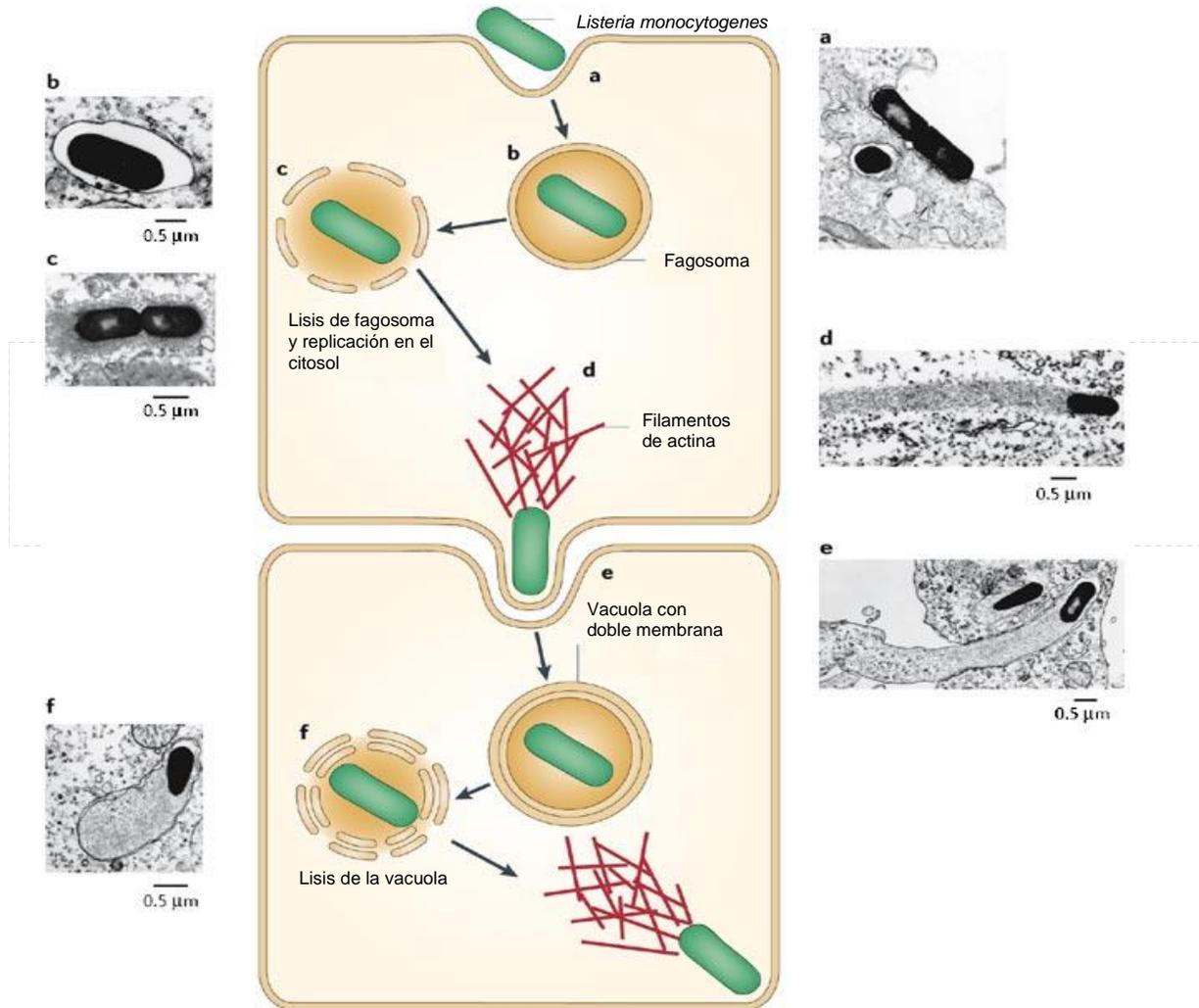


Figura 6. a. *L. monocytogenes* induce su entrada a fagocitos no profesionales. b. La bacteria es internalizada en una vacuola (también conocida como fagosoma). c, d. La membrana de la vacuola es lisada por la secreción de dos fosfolipasas, PlcA y PlcB, y la toxina formadora de poros listeriolisina O. La bacteria es liberada en el citoplasma, donde se multiplican y comienzan a polimerizar colas de actina. e. La polimerización de actina permite que las bacterias se diseminen a células vecinas, mediante la formación de protuberancias en la membrana plasmática. f. A la entrada de las células vecinas, la bacteria presenta una vacuola con doble membrana, de la cual puede escapar para repetir el ciclo. Se muestran, además, micrografías electrónicas de los procesos descritos (Modificado de URL2).

Una vez en el citoplasma, 2 horas después de la infección aproximadamente, *L. monocytogenes* comienza a desplazarse en el interior de la célula mediante la polimerización de la actina celular en largos tallos que la impulsan incluso hacia células adyacentes, evitando de esta manera el contacto con efectores humorales del sistema inmunológico. (Figura 6) (Modificado de URL2).

En el momento en que este patógeno ha sido capaz de trasladarse a las células adyacentes, se vuelve a activar la síntesis de la Listeriolisina junto con la síntesis de enzimas con actividad de fosfolipasa C (PlcA y PlcB), que ayudan a *L. monocytogenes* a liberarse nuevamente del fagosoma y de esta manera propagarse a través de todo el tejido. (Vázquez- Boland *et al*, 2001)

1.7.6 Factores asociados a la virulencia

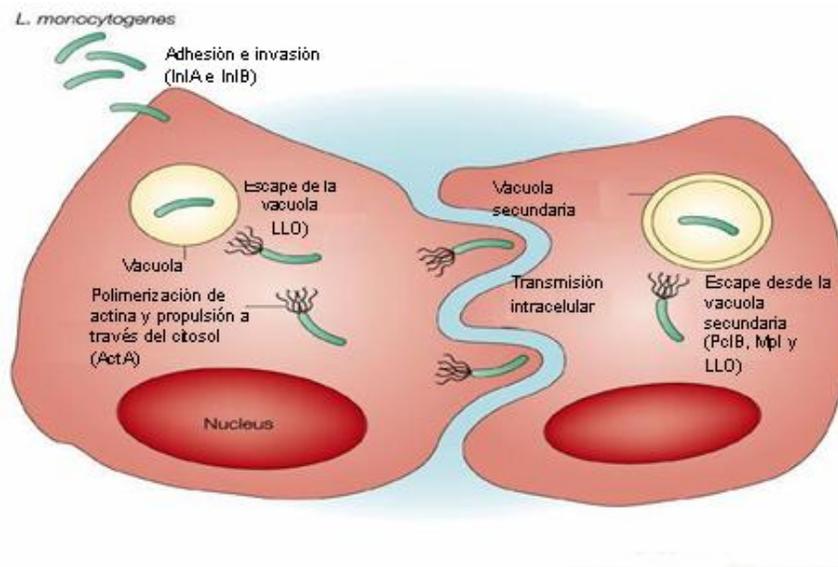


Figura 7. *L. monocytogenes* expresa proteínas de superficie y de secreción que permiten su adhesión a las células huésped, el escape de la vacuola fagocitaria y la locomoción en el citosol de la célula invadida. La Internalina A (InlA) e InlB median el ataque de a la superficie de la célula huésped, y al listeriolisina O (LLO) lisa la membrana del fagosoma. El ensamblaje y polimerización de actina es inducido por la acción de la proteína ActA, las colas de actina impulsan a las bacterias a través de la célula y colaboran en la transmisión a células vecinas. Para escapar de la vacuola secundaria en la célula recién invadida, *L. monocytogenes* expresa la PlcB , (Modificado de URL3)

Los 6 principales genes asociados a la virulencia de *L. monocytogenes* (*prfA*, *plcA*, *hly*, *plcB*, *mpl* y *actA*) están unidos en una región cromosómica de 9kb conocida como: genes de virulencia asociados a PrfA. *prfA* es el gen que codifica para una proteína reguladora, PrfA, la cual activa la transcripción del genes, *hly*, y del operón de lecitinasa que incluye los genes *mpl*, *plcB* y *actA* (Figura 7).

El monocistrón *hly*, codifica para la listeriolisina O, esta hemolisina fue el primer y más importante factor de virulencia demostrado en la patogénesis de la infección por *Listeria*. Esta hemolisina tiene una función similar a la estreptolisina O de *Streptococcus pyogenes* (Jenkins *et al*, 1964). Tiene actividades citotóxicas sobre las células fagocíticas a pH relativamente bajos, entre 4.5 a 6.5. y es inhibida por el colesterol (Datta y Kothary, 1993). Además, la listeriolisina O es capaz de modular la señalización de internalización vía calcio y expresión de citocinas en macrófagos (Tang *et al*, 1996), desgranular y formar leucotrienos en neutrofilos (Sibelus *et al*, 1999), producir apoptosis en células dendríticas (Guzmán *et al*, 1996) y activar NF-κB (Kayal *et al*, 1999).

La activación del operón de lecitinasa da como resultado la transcripción de los genes *mpl*, *plcB* y *actA*. El gen *mpl*, codifica para una metaloproteasa dependiente de zinc involucrada en el procesamiento de las fosfolipasas. En el caso del gen *plcB*, este codifica para una hemolisina con actividad de fosfolipasa C, al igual que el gen *plcA*, el cual no está integrado en este operón. *plcB*, codifica para una fosfolipasa con actividad específica sobre la fosfatidil colina, también conocida como lecitinasa, mientras *plcA* codifica para una fosfolipasa con actividad específica sobre el fosfatidil inositol. Ambas hemolisinas ayudan a la liberación de *L. monocytogenes* del fagosoma mediante la hidrólisis de los fosfolípidos de la membrana fagosomal. El último gen de este operón (*actA*), codifica para una proteína denominada ActA, la cual, toma la actina el citoesqueleto de la célula huésped y lo polimerizada en colas de fibras cortas de actina, ocasionando con esto, la movilidad de la bacteria en el citoplasma celular y la invasión de las células adyacentes (Abigail *et al*, 1994).

1.8 Tipificación

Debido a la gran diversidad de los microorganismos a nivel de género e incluso de especie y a la importancia en la patología humana de diferentes agentes infecciosos se han establecido una serie de técnicas que proporcionan esquemas de caracterización y clasificación intraespecie conocidos como métodos de tipificación clasificados generalmente en fenotípicos y genotípicos.

1.8.1 Métodos fenotípicos

Los métodos fenotípicos, están basados en las características biológicas y bioquímicas como: morfología colonial, resistencia a antibióticos, serotipificación, pruebas bioquímicas, fagotipificación entre otras. Actualmente estos métodos son poco usados debido a que son poco reproducibles, laboriosos y en ocasiones algunos marcadores fenotípicos pueden no ser expresados bajo ciertas condiciones ambientales o de cultivo.

1.8.2 Métodos genotípicos

Los métodos genéticos por otra parte, analizan directamente el DNA cromosómico o extracromosómico, lo que le permite tener ciertas ventajas sobre los métodos fenotípicos. Además, el poder de discriminación entre estos métodos es mayor, es decir, su capacidad para distinguir entre dos cepas relacionadas estrechamente es mayor, lo cual es útil epidemiológicamente en aislados que parecen ser idénticos cuando son analizados por otros métodos.

Actualmente los métodos genotípicos pueden ser definidos como los métodos basados en la composición de moléculas biológicas como proteínas, ácidos grasos, carbohidratos y ácidos nucleicos para diferenciar cualquier tipo de bacteria.

Además de los métodos de tipificación fenotípica, diferentes métodos genotípicos se han aplicado para la caracterización de especies y subespecies de *L. monocytogenes* entre los que destacan: análisis de restricción enzimática (REA) (Unnerstad *et al*, 1999; Wesley y Fraser 1991), electroforesis en campos pulsados

(Howard *et al*, 1992); isoenzimas (Farber *et al*, 1991), Ribotipificación (Meregheti *et al*, 2001) RAPD (Lawrence *et al*, 1993) y Ribotipificación por PCR (Sontakke y Farber, 1995). Tabla 4.

Tabla 4. Principales métodos genotípicos

Método	Fundamento
Tipificación de plasmidos	Análisis de DNA extracromosomal mediante su separación electroforetica en agarosa para determinar su numero y tamaño
Análisis de restricción enzimática (REA)	Análisis de DNA cromosomal mediante el uso de endonucleasas de restricción adecuadas
Electroforesis de campos pulsados	Análisis y separación de largos fragmentos de DNA en gel mediante campos eléctricos
Tipificación por isoenzimas	Análisis de enzimas metabólicas mediante la variación en la movilidad de un campo eléctrico
Ribotipificación	Análisis de los genes que codifican para las diferentes proteínas del RNA ribosomal
RAPD	Análisis de DNA cromosómico mediante la amplificación de regiones aleatorias del cromosoma.

1.8.2.1 Ribotipificación

La ribotipificación se define como el uso las técnicas capaces de reconocer e identificar las genes que codifican para el RNA ribosomal (RDNA).

Los genes que codifican para el RNA ribosomal se encuentran agrupados en operones denominados *rrn*. Estos operones se encuentran presentes en todas las bacterias y son altamente conservados. A diferencia de la mayoría de los genes bacterianos, estos pueden encontrarse en más de una copia en el genoma

(de 2 a 11 por célula), obviamente, entre mayor sea el número de copias de los operones *rrn* por célula, será mayor el poder de discriminación para esa bacteria en particular.

En el caso de los organismos procariontes los genes que codifican para el RNA ribosomal están integrados en un operón que contiene los genes 16S, 23S y 5S, los cuales están separados por las regiones separadoras (Fig 8).

La ribotipificación mediante PCR consiste en la amplificación de una región de este operón y su posterior análisis mediante enzimas de restricción, en donde pueden ser utilizados iniciadores universales o bien, iniciadores específicos para cada especie o género del cual se desee tipificar, lo que aumentaría con ello el poder de discriminación del método.

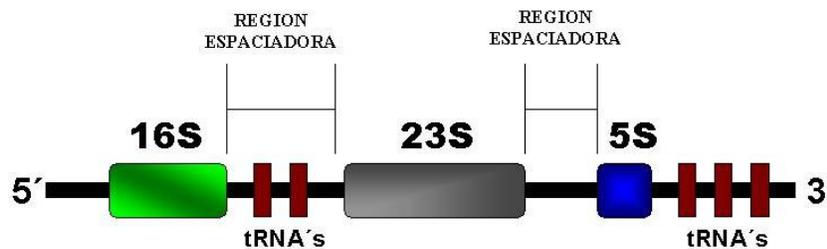


Figura 8. Representación grafica de un operón de rDNA

Diferentes autores han aplicado esta técnica para la tipificación de diferentes organismos como *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecium*, *Escherichia coli*, y *Enterobacter* spp (Kostman *et al*, 1995), al igual que *Listeria monocytogenes* (Sontakke y Farber, 1995). Todos ellos han basado su método en el análisis de las regiones espaciadoras que separan los genes ribosomales, las cuales, aparentemente muestran un mayor grado de variabilidad en su longitud y secuencia, incluso en cepas de la misma especie. Sin embargo, a la fecha, no existen registros del análisis de un gen en especial del operón para la tipificación de una especie probablemente debido a que no existe una alta variabilidad en la secuencia de cada uno de los genes (Farber, 1995).

JUSTIFICACIÓN

2. JUSTIFICACIÓN

Listeria monocytogenes se ha considerado en las últimas décadas como un importante patógeno causante de enfermedades transmitidas por alimentos y es por lo tanto un problema de salud pública.

En México no existen registros sobre brotes o frecuencia de aislamiento en alimentos de *Listeria monocytogenes*, ya que en nuestro país su búsqueda no es de carácter obligatorio.

La finalidad del presente trabajo fue relacionar diferentes cepas de *Listeria monocytogenes* aisladas de casos clínicos, alimentos y agua, respecto a su origen y distribución geográfica mediante el análisis estadístico de los patrones electroforéticos obtenidos por digestión enzimática.

OBJETIVOS

3. OBJETIVO GENERAL

- ♣ Caracterizar diferentes cepas de *Listeria monocytogenes* mediante perfiles fenotípicos y genotípicos

3.1 OBJETIVOS PARTICULARES

- ♣ Caracterizar mediante biotipificación (perfil bioquímico) las cepas de *Listeria monocytogenes* aisladas de diferentes ambientes.
- ♣ Determinar el perfil de resistencia a antimicrobianos de *L. monocytogenes*.
- ♣ Determinar la capacidad adherente de *L. monocytogenes* en células HEp-2 prefijadas.
- ♣ Evaluar la diversidad genética mediante ribotipificación.

MATERIALES Y MÉTODOS

4. MATERIAL Y MÉTODOS

DIAGRAMA GENERAL DE TRABAJO

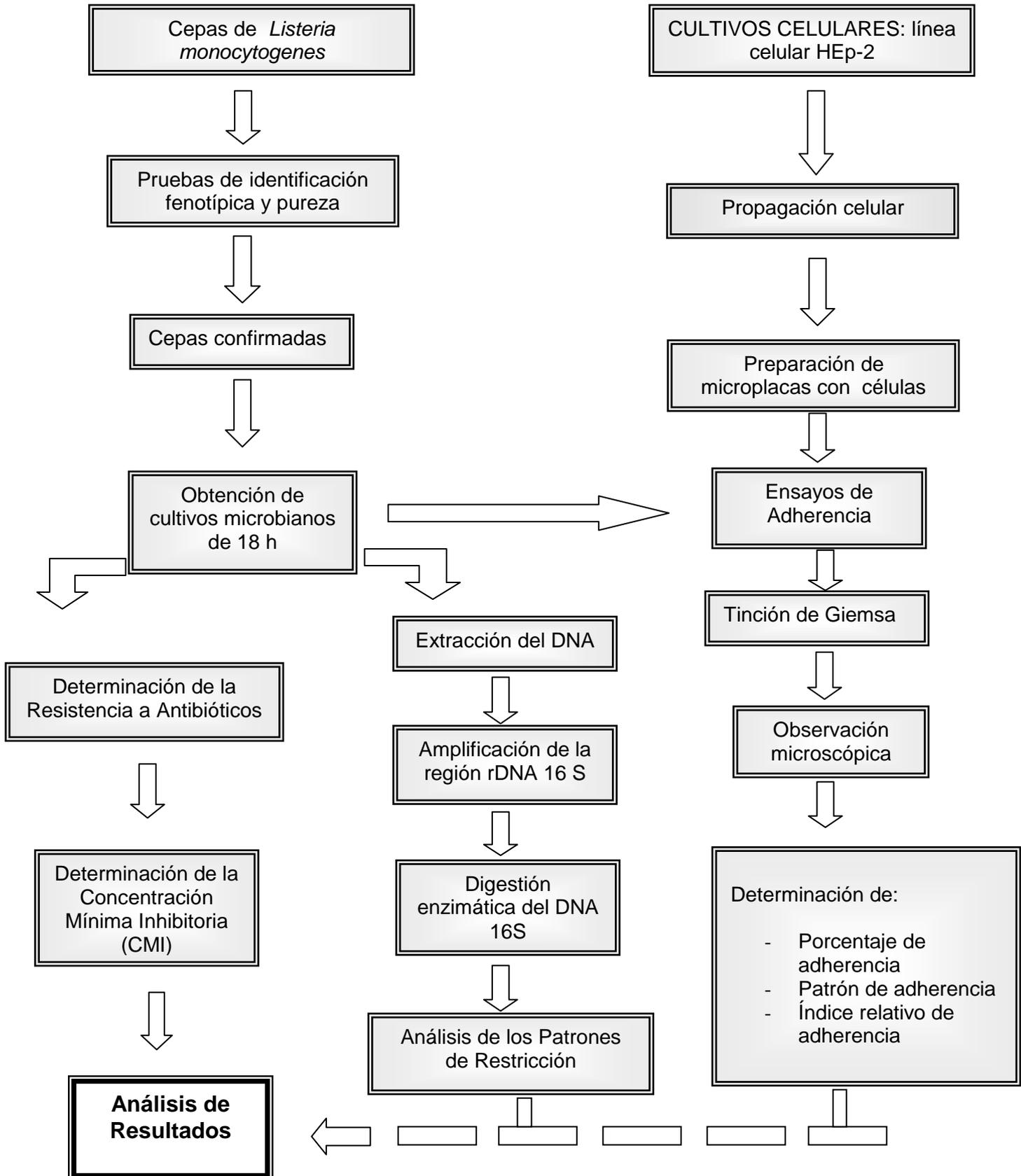


Figura 9. Diagrama general de trabajo

4.1. Pruebas de pureza e identificación bacteriana:

Se estudiaron un total de 71 de aislados presuntivos para *Listeria monocytogenes* entre las cuales se incluyeron: aislamientos clínicos, de alimentos y aguas residuales (tabla 5). Para determinar la pureza del cultivo se sembraron cada uno de los 71 aislados de *Listeria* en agar Oxford adicionado con el suplemento selectivo (formulación Oxford, Oxoid), se incubaron a 37°C/ 24-48 h. Se observó la morfología colonial y se hizo la tinción de Gram para describir la morfología microscópica. Se probaron las reacciones de catalasa y oxidasa, hidrólisis de esculina y pruebas de rojo de metilo y Vogues Proskauer.

La identificación de los aislados se siguió de acuerdo a la metodología propuesta por el manual de bacteriología de la FDA (Hitchens, 2003).

Para el desarrollo de una enfermedad bacteriana es necesaria la localización de la bacteria en un ambiente adecuado para su establecimiento, reproducción y expresión de los factores de virulencia. Para evaluar algunos factores asociados a la patogenicidad y virulencia de esta bacteria se probaron métodos indirectos y directos.

Tabla 5. Colección de cepas empleadas en el presente estudio

Origen	Procedencia	Número de aislados
Frutas y hortalizas.	Sonora	10
Agua de riego	Sonora	2
Vegetales congelados	México D.F.	8
Jugos de naranja	México D.F.	10
Peces	Tamaulipas	7
Cárnicos	México D.F.	10
Lácteos	México D.F.	12
Aislados clínicos	Aguascalientes	8
Cepas de referencia	ATCC	4
	Total	71

ENCB. Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, IPN.

CIAD. Centro de investigación en alimentos y desarrollo A.C. (CIAD) Hermosillo Son

LESP-AGS. Laboratorio de salud pública del estado de Aguascalientes.

4.2. Conservación de las cepas confirmadas

Las cepas se conservaron para su uso a corto plazo en tubos inclinados de 13X100 mm con tapón de rosca con 4 mL de agar base sangre a 4°C.

4.3 Evaluación de la patogenicidad de las bacterias aisladas del género

Listeria.

Algunos microorganismos presentan la capacidad de infectar y de producir enfermedad (es decir, capacidad patógena y virulencia) en unos hospedadores y no en otros. Ambas características están condicionadas por la capacidad del genoma bacteriano para expresar estructuras, moléculas o funciones (factores de virulencia) que proporcionan al microorganismo una ventaja en relación con el hospedador, que a menudo se identifica con la producción de daño en éste. En este sentido, se enumeran, por ejemplo, la adhesividad a la superficie de células y tejidos, la actividad antifagocítica, la capacidad para 'escapar' de la acción de los lisosomas permitiendo la multiplicación intracelular, la producción de toxinas, la producción de receptores de superficie para la captación de hierro, etc. Frecuentemente, genes aislados, grupos de genes organizados en operones e incluso formaciones más complejas, como las denominadas 'islas de patogenicidad', son responsables de la producción de tales capacidades, con la particularidad de que los cambios mínimos en el genoma, producen cambios y modificaciones muy importantes en la patogenicidad y virulencia, como se ha observado en numerosas ocasiones, por ejemplo en la proteína M de los estreptococos del grupo A o en las proteínas de superficie de los virus influenza. Para determinar si los aislados de *Listeria monocytogenes* presentaban algún factor asociado a la virulencia bacteriana se evaluó de forma indirecta y directa la patogenicidad de las cepas:

4.3.1- Métodos indirectos para valorar la patogenicidad del género *Listeria*.

4.3.1.1 Actividad hemolítica (Hem). Las bacterias se cultivaron en gelosa Sangre al 5% durante 24-48 horas a 30°C. La aparición de un halo verdoso o transparente, indicó la reacción positiva de las diferentes hemolisinas que produce el género *Listeria*.

4.3.1.2 Hidrólisis de la esculina (Esc). Las bacterias se inocularon en agar esculina y se incubaron a 30°C durante 24-48 horas, un ennegrecimiento del medio se consideró positivo. La capacidad de hidrolizar la esculina se relacionó con las cepas patógenas.

4.3.1.3. Hidrólisis de los fosfolípidos de la yema de huevo (Lec). Las cepas se inocularon en agar Baird Parker y se incubaron a 30°C durante 24-48 horas, el desarrollo de colonias negras por la reducción del telurito y la aparición de un halo opalescente alrededor de la colonia se consideraron positivas a la hidrólisis de fosfolípidos y se asoció a la virulencia de las cepas.

En aquellos casos en los que los resultados eran dudosos, los experimentos se repitieron para confirmar el carácter.

4.3.2. Caracterización de las cepas mediante “marcadores fenotípicos”

Se valoraron las características bioquímicas, antigénicas, criterios de patogenicidad y sensibilidad frente a los antimicrobianos de la serie seleccionada para este trabajo.

4.3.2.1. Caracterización bioquímica y biotipificación. Todas las cepas, de forma preliminar, fueron identificadas y caracterizadas bioquímicamente mediante el sistema API-*Listeria* (*bioMérieux*), que consiste en una galería de 10 cúpulas con diferentes sustratos bioquímicos deshidratados que se reconstituyen con una suspensión bacteriana.

Además se realizaron pruebas adicionales como lecitinasa, producción de Indol, fermentación de carbohidratos, reducción de nitratos, prueba de Voges-Proskauer (producción de acetoina), prueba de CAMP. La incubación de estas pruebas se realizó a 30°C por 24-48 horas.

Serotipificación: El perfil antigénico de los aislados, fue valorado por microaglutinación en portaobjetos (Shipp y Rowe, 1980), utilizando antisueros comerciales (Difco) frente a antígenos somáticos (O). Los sueros disponibles utilizados correspondían a polivalentes y serotipos 1 y 4.

4.3.2.2. Resistencia a antimicrobianos.

a) La sensibilidad-resistencia a antimicrobianos se realizaron mediante la técnica de difusión “disco-placa”, utilizando discos comerciales de papel de filtro cargados con una concentración estándar de antibiótico o quimioterápico (SANOFI), sobre agar Müller-Hinton (MH), siguiendo las recomendaciones del *National Comitee for Clinical Laboratory Standars (NCCLS)* (1994). Las cepas fueron cultivadas en agar BHI a 30°C durante toda la noche y se procedió a la dilución del cultivo en agua destilada estéril, en proporción 1:100, mostrando una densidad igual al 0.5 de la escala de MacFarland. Las placas con agar MH se inocularon con la suspensión microbiana, para ello se utilizó un hisopo de algodón estéril y se eliminó el exceso haciéndolo rotar contra la pared del tubo.

El hisopo se pasó por la superficie del agar MH en varias direcciones, con el fin de sembrar uniformemente el medio de cultivo, el cual se dejó secar por espacio de diez minutos. A continuación se colocaron los discos que contenían los antimicrobianos a valorar, con la ayuda de pinzas flameadas y asegurándose de que mantenían un perfecto contacto con la superficie del agar.

La separación entre los discos fue como mínimo de 1cm, para evitar interferencias entre los agentes antimicrobianos. Antes de incubar las placas se dejaron reposar a temperatura ambiente durante otros diez minutos, para que los discos tuvieron una predifusión y posteriormente se incubaron a 35°C durante 24-48 horas.

b) determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI) y concentración mínima bactericida (CMB). Se utilizó el método de dilución seriada en tubo, siguiendo las recomendaciones de la NCCLS. Las sales de los antibióticos empleados en esta prueba fueron obtenidas de los laboratorios fabricantes: ampicilina (Bristol Myers-Squibb), cefalotina y pefloxacina (Hoescht-Marison-Roussel) y penicilina. Para cada antibiótico se preparó una solución

conteniendo 10,000 $\mu\text{g/mL}$, a partir de la cual se realizaron diluciones seriadas en caldo Todd-Hewitt para obtener concentraciones desde 5120 hasta 0.031 $\mu\text{g/mL}$. Las cepas a probar y la cepa testigo se sembraron en agar Mueller-Hinton y se ajustaron al tubo 0.5 del Nefelómetro de McFarland y antes de inocularse se diluyeron 1:10. De las cepas ajustadas se inocularon 100 μl en los caldos Todd-Hewitt conteniendo las diluciones del antibiótico. Los tubos fueron incubados a 30°C por 24-48 h, al término de la incubación se leyeron los tubos para calcular la CMI, resemebrándose en caldos Todd-Hewitt sin antibiótico para determinar si la CMI fue bactericida o bacteriostática.

Las sustancias antimicrobianas ensayadas y sus concentraciones se enlistan en la tabla 6.

Tabla 6.- Lista de antimicrobianos ensayados.

Antimicrobiano	Abreviatura	Concentración ($\mu\text{g/mL}$)
Ampicilina	AM	10
Cefalotina	CF	30
Cefotaxima	CTX	30
Ceftazidima	CAZ	30
Cefuroxima	CXM	30
Dicloxacilina	DC	1
Eritromicina	E	15
Gentamicina	GE	10
Pefloxacina	PEF	5
Penicilina	PE	10 UI
Tetraciclina	TE	30
Trimetropim-sulfametoxazol	SXT	25

Modificado de NCCLS 1994.

4.4.- Métodos directos para evaluar la patogenicidad del género *Listeria*.

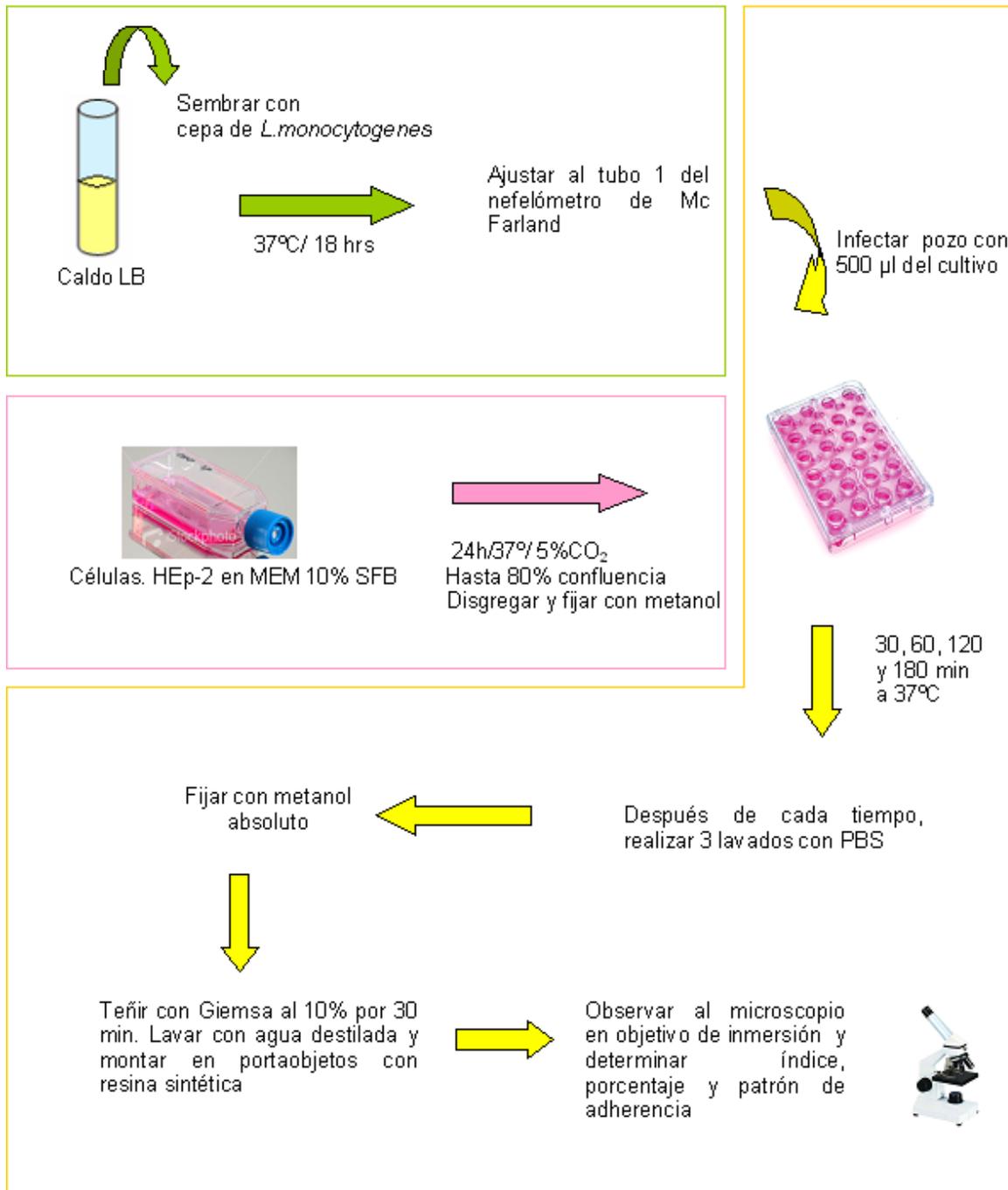
4.4.1 Cultivos celulares:

4.4.1.1. Propagación Celular:

A partir de una botella con células HEp-2 (Epiteloma de laringe humano) crecidas con medio de cultivo MEM adicionado con 10% de suero fetal bovino (medio de crecimiento) con una confluencia del 80-100%, se eliminó el medio de cultivo por la cara opuesta de la monocapa, se adicionó 0.5 mL de solución de tripsina al 0.025% en verseno al 0.05% por 5-10 segundos, eliminando el exceso de tripsina y adicionando nuevamente 0.5 mL de tripsina-verseno el tiempo necesario para disgregar el paquete celular, se agregaron 2.5 mL de medio de crecimiento y se homogeneizó, se repartieron equitativamente en 2 botellas y se adicionó la cantidad necesaria de medio de crecimiento para conservar la relación fluido:gas de 1:8 (volumen final de aproximadamente 6 mL en botellas de 25 cm² de superficie), se homogeneizó e incubó a 37 °C en atmósfera húmeda con 5% de CO₂.

4.4.1.2. Preparación de microplacas con células prefijadas:

Una vez alcanzada la confluencia deseada (aproximadamente 80%), se disgregó la monocapa de una botella de cultivo celular utilizando la metodología anteriormente mencionada, esto se homogeneizó en el volumen necesario de MEM+10% SFB para distribuir 0.5 mL de la suspensión a cada pozo de una microplaca de 24 pozos previamente dispuestas con cubreobjetos redondos estériles. Posteriormente se incubó a 37 °C en atmósfera húmeda con 5% de CO₂ hasta obtener una confluencia del 80%. El medio de cultivo se eliminó, y se realizaron lavados con PBS estéril y se fijaron con metanol absoluto frío (Zepeda y González, 1995).



■ Adherencia
 ■ Cultivos celulares
 ■ Cultivos bacterianos

Figura 10. Diagrama de adherencia

4.4.1.3. Cultivos bacterianos:

A partir de cultivos puros de *L. monocytogenes*, se sembraron cada una de las cepas en caldo mínimo de Luria-Bertani e incubándose a 37°C/ 18- 24 h. Después de este tiempo, se ajustó el cultivo al tubo No.1 del nefelómetro de McFarland.

4.4.1.4. Adherencia en células HEp-2 prefijadas:

A partir de los cultivos bacterianos anteriormente descritos, se infectaron con 500 µL cada pozo de la microplaca conteniendo células prefijadas. Se incubaron por 0.5, 1, 2 y 3 horas a 37°C. Después de cada tiempo se retiró el cultivo bacteriano y se lavaron 3 veces con PBS. Se fijaron con metanol frío y tiñeron por medio de la técnica de Giemsa. Colocando cada uno de los cubreobjetos en portaobjetos de vidrio y se fijaron con resina sintética. Cada ensayo se hizo por triplicado, incluyendo en cada uno de ellos un testigo positivo de adherencia: *Escherichia coli* E2348 (0126:H6) con adherencia localizada y un control de células (Zepeda y González, 1995).

4.4.2. Tinción de Giemsa:

Los portaobjetos secos y fijados, se cubrieron con el colorante de Giemsa al 10%, se tiñeron durante 20 min, se eliminó el exceso de colorante, se enjuagaron con agua corriente y se dejaron secar al aire. Los cubreobjetos se colocaron sobre los portaobjetos con la resina sintética, y se dejaron secar.

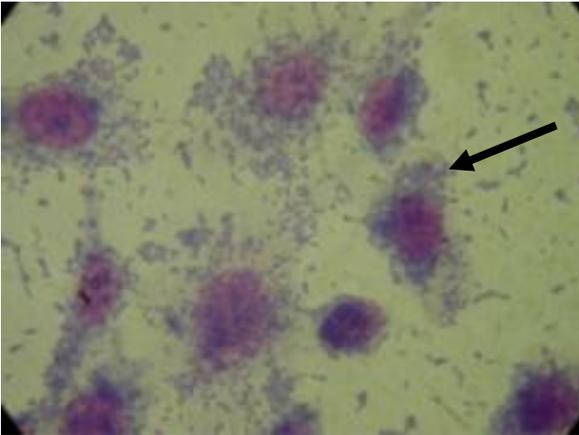
4.5. Determinación de los índices de adherencia:

Se examinó bajo el objetivo de inmersión de un microscopio (aumento, X 1000) y se hicieron los conteos necesarios para calcular el porcentaje de adherencia y la adherencia relativa. También se observó el patrón de adherencia.

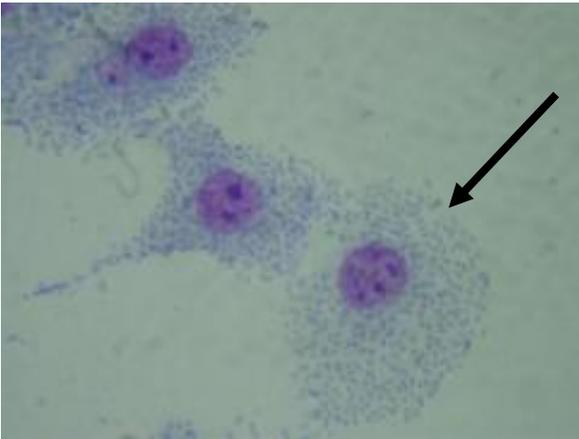
INDICES RELATIVOS, PORCENTAJES Y PATRONES DE ADHERENCIA

- **Adherencia relativa:** Número de bacterias adheridas por célula, se establece de acuerdo a los siguientes valores:
 - (++++) 16 o más bacterias adheridas por célula.
 - (+++) 1 a 15 bacterias adheridas por célula.
 - (++) 6 a 10 bacterias adheridas por célula.
 - (+) 1 a 5 bacterias adheridas por célula.
 - (-) No adherencia.
- **Porcentaje de adherencia:** Se define como en número de células que presentan 2 o más bacterias adheridas de un total de cien células.
Se calcula mediante la siguiente fórmula:

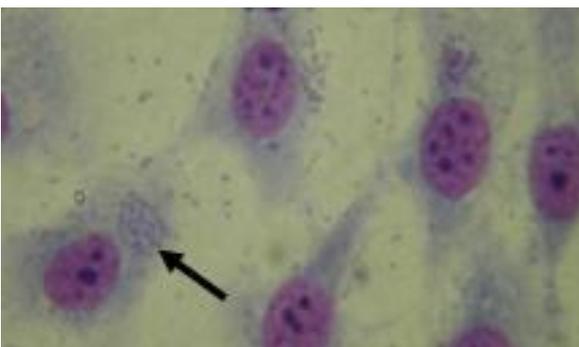
$$\% \text{ adherencia} = \frac{\text{Número de células con 2 o más bacterias adheridas}}{100} \times 100$$



- a) Patrón de adherencia agregativa (AggA): La bacteria se adhiere formando agregados que cubren el borde celular.



- b) Patrón de adherencia difusa (DA): Cuando las bacterias se adhieren sobre toda la superficie celular.



- c) Patrón de adherencia localizada (LA): Las bacterias forman microcolonias en uno o varios puntos de la célula.

Figura 11. Patrones de adherencia de *Escherichia coli* en células HEP-2. Tomado de Zepeda y González (1995)

4.6. Caracterización de los microorganismos mediante “marcadores genéticos”

4.6.1 Obtención de DNA cromosómico

La obtención de DNA fue realizada de acuerdo a la metodología establecida por González y Merchand *et al.* (1996), para lo cual, cada una de las cepas fueron propagadas en 25 mL de caldo BHI incubándose a 37°C con agitación a 150 rpm durante toda la noche hasta llegar a su fase logarítmica. Posteriormente el cultivo fue centrifugado a 10,000 rpm durante 20 minutos, se desechó el sobrenadante y se recuperó el paquete celular, resuspendiéndolo en regulador de lisis (GuCl 6M, Tween 80 al 0.1% v/v, 2β-mercaptoetanol 1mM EDTA 10mM).

Una vez recolectada la suspensión bacteriana, las células fueron lisadas mediante choque térmico, incubando en 3 ciclos en baño de hielo seco- etanol hasta su congelación durante de 10 minutos seguido de una incubación a 65°C durante 10 minutos. El lisado se incubó durante 5 minutos y posteriormente se adicionó un volumen igual de Fenol-cloroformo-alcohol isoamílico (24:24:1), se agitó vigorosamente y se centrifugó durante 5 minutos a 14, 000 rpm. Se recuperó la fase acuosa en microtubos y se adicionaron 2 volúmenes de cloroformo-alcohol isoamílico (24:1 v/v), se agitó vigorosamente y se centrifugó a 14,000 rpm durante 3 minutos. Se recuperó nuevamente la fase acuosa y se adicionaron 2 volúmenes de etanol absoluto incubándose durante 18 h a -20°C.

El DNA precipitado se recuperó por centrifugación a 14,000 rpm durante 20 minutos, después se lavó con alcohol al 75%, centrifugándose nuevamente a

14,000 rpm por 15 minutos. Finalmente, el DNA fue secado y re suspendido en 450 μ L de TE 1X (Tris 10mM, EDTA 1mM).

La calidad e integridad del DNA obtenido se comprobó mediante una electroforesis en gel de agarosa al 1%, teñido con bromuro de etidio (0.83 μ g/mL). Para lo cual se colocaron en cada pozo 5 μ L de TE 1X, 2 μ L de DNA y 1 μ L de colorante de corrimiento (Glicerol 20%, EDTA 100mM, Tris 10 mM, azul de bromofenol al 0.25%), utilizando DNA del fago λ digerido con HindIII (INVITROGEN) como marcador de peso molecular y TBE 1X (Tris 1mM, Boratos 10mM, EDTA 10mM) como regulador de corrimiento a 96 V durante 1 hora. El DNA se visualizó en un transiluminador de luz UV a una longitud de onda (λ) de 302 nm, digitalizando la imagen obtenida. Posteriormente el DNA fue conservado a -20°C hasta su uso.

4.6.2. Amplificación de la región rDNA 16S

La amplificación de la región del DNA que codifica para el gen 16S fue llevada a cabo mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), empleando los iniciadores 13 B y 18 FLP reportados por Relman (1993), con las siguientes características:

Iniciador: 13B

Secuencia: 5'-CGG GAT CCC AGG CCC GGG AAC GTA TTC AC- 3'

Posición: 1390-1371

Iniciador: 8FPL

Secuencia: 5'-GCG GAT CCG CGG CCG CTG CAG AGT TTG ATC CTG GCT
CAG- 3'

Posición: 8-27

Las concentraciones de la mezcla de reacción así como las condiciones en las que se llevo a cabo la reacción de la PCR se muestran en las tablas 7 y 8. Una vez terminada la reacción, el DNA amplificado fue comprobado mediante una electroforesis en gel de agarosa al 1.5% teñido con bromuro de etidio (0.83 μ g/mL), colocándose en cada pozo 1 μ L de colorante de corrimiento con 5 μ L del producto de PCR.

Tabla 7. Mezcla de reacción empleada en la PCR para la amplificación de la región 16S

Reactivo	Concentración inicial	Volumen por reacción	Concentración por reacción
Regulador	10X	5.0 μ L	1 X
dNTP's	5mM	2.0 μ L	0.2 mM
Iniciador (8FLP)	20 μ M	1.5 μ L	0.6 μ M
Iniciador (13B)	20 μ M	0.5 μ L	0.6 μ M
Taq DNA pol.	5U/ μ l	0.2 μ L	1 U
MgCl ₂	50 mM	1.5 μ L	1.5 mM
DNA	-----	2.0 μ L	-----
H ₂ O	Cbp 50 μl	38.3 μL	-----

Tabla 8. Condiciones de la PCR para la amplificación del rDNA 16S

Etapa	Condiciones de la reacción temperatura /tiempo	No. De ciclos
Desnaturalización inicial	94°C /5 minutos.	1
Desnaturalización	94°C /1minutos	45
Alineamiento	52°C/1minutos	
Extensión	72°C/ 2.5 minutos.	
Extensión final	72°C/10minutos	1

Posteriormente, el producto de la PCR fue purificado con el Kit de extracción QI Aquick® (Qiagen), cortando la banda a partir del gel conforme a las instrucciones del proveedor.

4.6.3 Digestión enzimática del rDNA 16S

La digestión enzimática fue hecha con endonucleasas de restricción seleccionadas mediante el análisis de las secuencias que corresponden al gen 16S de *Listeria monocytogenes* (X56153, X98530, U84150, 355472, M58822, y U84149) obtenidas del Genbank, con el software encontrado en la pagina web www.nebcutter.com. Las enzimas fueron seleccionadas de acuerdo al número y tamaño de bandas así como a la variabilidad que presentaron en dicho programa.

La digestión enzimática se llevó a cabo con las endonucleasas de restricción: AluI, MboI, HaeIII, RsaI y HhaI (invitrogen) (Tabla 9) y las condiciones de la tabla 10.

Tabla 9. Enzimas empleadas en la Ribotipificación

Enzima	Origen	Sitio de corte
AluI	<i>Arthrobacter luteus</i>	5'-AG↓CT-3' 3'-TC↑GA-5'
MboI	<i>Moraxella bovis</i>	5'-↓GATC- 3' 3'-CTAG↑-5'
HhaI	<i>Haemophilus haemolyticus</i>	5'-GC↓GC-3' 3'-CG↑CG-5'
RsaI	<i>Rhodopseudomonas sphaeroides</i>	5'-GT↓AC-3' 3'-CA↑TG-5'
HaeIII	<i>Haemophilus aegypticus</i>	5'-GG↓TG- 3' 3'-CC↑GG-5'

Una vez concluido el tiempo de incubación los fragmentos obtenidos fueron visualizados mediante una electroforesis en gel de agarosa al 2.0% teñido con bromuro de etidio (0.83µg/mL) y colocándose en cada pozo 1.5 µL de colorante de corrimiento y 15 µL de la muestra digerida.

Tabla 10. Condiciones de digestión enzimática.

Reactivo	Concentración inicial	Volumen	Concentración por reacción
Producto PCR	-----	7 μ L	0.5-1.0 μg
Enzima	10 U/ μ L	1 μ L	5 U
Regulador	10X	1.5 μ L	1X
Agua	-----	5.5 μL	-----

Cada reacción fue incubada a 37°C durante 90 minutos

4.6.4 Análisis estadístico de los patrones de restricción

A partir de las imágenes obtenidas de los diferentes patrones de restricción obtenidos por electroforesis, se hizo una matriz de datos binarios de presencia (1) y ausencia (0), con respecto a cada una de los marcadores (bandas) obtenidos con cada una de las cepas en los perfiles electroforéticos.

Una vez obtenida esta matriz se realizaron los diferentes análisis numéricos mediante el programa NTSYSpc 2.0 (Rohlf, 1998), en el cual, inicialmente se construyó una matriz de similitud a partir de la matriz binaria original utilizando el índice de DICE (D) (Dice, 1945), considerando:

$$D = 2a / (2a + b + c)$$

Donde:

a: es la banda presente en ambas cepas

b: es la banda presente en la primera pero ausente en la segunda

c: es la banda presente en la segunda pero ausente en la primera

Una vez obtenida la matriz de similitud se construyó un dendograma por medio del método de agrupamiento por promedio aritméticos no ponderados

(UPGMA) con la finalidad de observar gráficamente la relación existente entre cada una de las cepas, así mismo, con la matriz de datos que da origen al dendrograma, se calculó una matriz cofenética.

Posteriormente, con la matriz cofenética y la matriz de similitud de DICE se hizo una prueba de comparación de matrices mediante la prueba de Mantel (Manly 1997), la cual, muestra un valor de correlación y la probabilidad estimada mediante el método producto de Pearson cofenético (r), para saber el grado de dispersión que se presentó en el análisis de las datos y saber si el dendrograma refleja una relación adecuada con respecto a la matriz original.

Por último, se hizo la prueba de punto de corte con la ayuda del software "Phylip3.6", con la finalidad de valorar la robustez estadística de los grupos obtenidos en el dendrograma.

4.6.5 Índice de discriminación.

El índice numérico de discriminación (ID), nos da la probabilidad de que dos cepas no relacionadas, tomadas de la población analizada, se sitúen en diferentes grupos de tipificación y viene determinado por el número de tipos definidos por el método aplicado y la frecuencia relativa de estos tipos. Se calcula por el índice de diversidad de Simpson (Hunter y Gaston, 1988), con la siguiente ecuación:

$$ID = 1 - \left[\sum_{j=1}^s n_j(n_j-1) / N(N-1) \right]$$

N= número de cepas en la muestra

s= número total de tipos descritos

n_j = número de cepas pertenecientes al tipo j

RESULTADOS

5. RESULTADOS

5.1 CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA:

Del total de los 71 aislados presuntivos del género *Listeria*, se procedió a su identificación mediante su actividad bioquímica utilizando el sistema API *Listeria* (bioMérieux, Francia). Los 71 aislados se confirmaron dentro del género *Listeria*, diferenciándose 45 cepas (63.38 %) como *L. monocytogenes*; 12 cepas (16.9%) como *L. ivanovii*; 9 como *L. seeligeri* (12.6%) y 5 (7.04%) fueron asignadas a *L. innocua*.

Los 45 aislamientos confirmados como *Listeria monocytogenes*, siguiendo el esquema del BAM-FDA 2003 (tabla 11), se describieron dos biotipos diferentes, los resultados se indican en la tabla 12. El biotipo 2 resultó ser más frecuente e incluyó 38 (53.53%) aislamientos. El biotipo 1 representado por 7 (9.58%) aislamientos, se diferenció del prevalente por ser no hemolítico y CAMP positivo.

Tabla 11. Fenotipos y biotipos de *Listeria*

Especie	Fenotipo	Biotipo
<i>L. monocytogenes</i>	Hly ⁺ , Rha ⁺ , Xyl ⁻	2,3,5
	Hly ⁺ , Rha ⁻ , Xyl ⁻	6,9
	Hly ⁻ , Rha ⁺ , Xyl ⁻	1,5 (no común)
<i>L. innocua</i>	Hly ⁻ , Rha ⁺ , Xyl ⁻	2,3,5
	Hly ⁻ , Rha ⁻ , Xyl ⁻	2,3,5
	Hly ⁺ , Rha ⁻ , Xyl ⁻	4,7
	Hly ⁺ , Rha ⁺ , Xyl ⁻	No reportado
<i>L. innocua</i> -like	Hly ⁺ , Rha ⁻ , Xyl ⁻	<i>L. innocua</i> no hemolítica*
<i>L. seeligeri</i>	Hly ⁺ , Rha ⁻ , Xyl ⁺	2,3,5
	Hly ⁺ , Rha ⁻ , Xyl ⁻	8 (no común)
	Hly ⁻ , Rha ⁻ , Xyl ⁺	No reportado

Hly = hemólisis; Rha= producción de ácido a partir de la ramnosa; Xyl = producción de ácido de la xilosa

*Cepa hemolítica, negativa para *L. monocytogenes*.

Tres de las pruebas valoradas en el esquema de biotipificación: la capacidad para fermentar la xilosa y ramnosa, la actividad hemolítica e hidrólisis de la esculina, son propiedades de codificación cromosómica y la ausencia de estas propiedades se considera de valor probado con marcadores de virulencia. Entre las 45 cepas de género *Listeria monocytogenes* estudiadas, 40 aislamientos de muestras naturales, 4 de origen clínico y 4 cepas de referencia presentaban estos criterios relacionados con virulencia.

Mientras que las 6 cepas restantes no mostraron reacciones positivas para los tres marcadores, lo que se considera importante por ser un biotipo poco frecuente asociado a la listeriosis en humanos.

Tabla 12. Biotipificación del género *Listeria*. Correlación con marcadores de virulencia.

Biotipo	Pruebas Bioquímicas									Marcadores de virulencia			Cepas n=45		Ref n=4
	Dex	Xil	Ram	Man	VP	RM	Ure	Cat	NO ₃	Hem	Esc	CAMP	%		
1	+	-	+	-	+	+	-	+	-	α	+	+	7	15.5	4
2	+	-	+	-	+	+	-	+	-	β	+	+	38	84.4	

La caracterización serológica de las 45 cepas identificadas como *Listeria monocytogenes* se analizaron para detectar sus antígenos somáticos (O) mediante un prueba de aglutinación utilizando sueros para cuatro serotipos Polivalente O, O:1, O:2 y O:4 permitiendo la diferenciación de 3 perfiles antigénicos (Tabla 13).

Tabla 13. Serotipificación de cepas de *Listeria monocytogenes*.

Serotipo	Cepas		Cepas de referencia	Total serie	
	Total	%		Num.	%
polivalente					
O:1	31	68.8	2	33	67.34
O:4	13	28.8	2	15	30.61
No glutinable	1	2.2		1	2.04
Total	45	100%	4	49	100%

El serotipo O:1 fue el predominante e incluyó 31 (68.8%) aislamientos, seguido del serotipo O:4 con 13 aislamientos (28.8%). Mientras que 1 (2.2%) aislamiento resultó no aglutinable con los sueros O:1 y O:4. Los serotipos de las cepas de *L. monocytogenes* empleadas como referencia se indican en la tabla 13. Las cepas identificadas como *L. seeligeri* y *L. innocua* no aglutinaron con los antisueros comerciales utilizados y se utilizaron como controles negativos para todas las determinaciones.

La correlación entre los marcadores fenotípicos (serotipo y biotipo) mostró que las cepas de los sueros más frecuentes así como la NA se diferenciaban en biotipos y viceversa. Las cepas O:1 y O:4 se diferenciaron en dos biotipos para cada serotipo: BT1 (15.5%) y BT2 (84.4%) respectivamente. Las cepas restantes que no aglutinaron con los sueros comerciales, no presentaron criterios indirectos de virulencia.

Las cepas caracterizadas como *L. monocytogenes* se agruparon de acuerdo a su origen y biotipo, asignándoles un número consecutivo como se menciona en la tabla 14, como controles negativos para los ensayos posteriores se incluyeron a *L. seeligeri* y *L. innocua*.

Tabla 14. Relación de cepas de *Listeria monocytogenes* según su origen, serotipo y biotipo.

Número	Fuente	Origen	Serotipo	Biotipo
1.	Hortalizas	Sonora	O:1	1
2.	Hortalizas	Sonora	O:1	1
3.	Hortalizas	Sonora	O:1	1
4.	Hortalizas	Sonora	O:1	2
5.	Hortalizas	Sonora	O:4	2
6.	Hortalizas	Sonora	O:4	2
7.	Hortalizas	Sonora	O:4	2
8.	Hortalizas	Sonora	O:1	2
9.	Hortalizas	Sonora	O:1	2
10.	Hortalizas	Sonora	O:1	2
11.	Agua de riego	Sonora	*	
12.	Lácteos	D.F.	O:1	2
13.	Lácteos	D.F.	O:1	2
14.	Lácteos	D.F.	O:1	2
15.	Lácteos	D.F.	O:1	2
16.	Lácteos	D.F.	O:1	2
17.	Lácteos	D.F.	O:1	2
18.	Lácteos	D.F.	O:1	2
19.	Lácteos	D.F.	O:1	2
20.	Cárnicos	D.F.	O:1	2
21.	Cárnicos	D.F.	O:4	2
22.	Cárnicos	D.F.	O:4	2
23.	Cárnicos	D.F.	O:1	2
24.	Jugo de Naranja	D.F.	O:4	2
25.	Jugo de Naranja	D.F.	O:1	2
26.	Jugo de Naranja	D.F.	O:1	2
27.	Jugo de Naranja	D.F.	O:1	2
28.	Jugo de Naranja	D.F.	O:1	2
29.	Jugo de Naranja	D.F.	O:1	2
30.	Jugo de Naranja	D.F.	O:4	2
31.	Jugo de Naranja	D.F.	O:1	2
32.	Jugo de Naranja	D.F.	O:1	2
33.	Jugo de Naranja	D.F.	O:1	2
34.	Jugo de Naranja	D.F.	O:4	2
35.	Verduras congeladas	D.F.	O:1	2
36.	Verduras congeladas	D.F.	O:1	2
37.	Verduras congeladas	D.F.	O:4	2
38.	Verduras congeladas	D.F.	O:4	2
39.	Verduras congeladas	D.F.	O:4	2
40.	Verduras congeladas	D.F.	O:4	2
41.	Verduras congeladas	D.F.	O:4	2
42.	Clínico	Aguascalientes	O:1	1
43.	Clínico	Aguascalientes	O:1	1
44.	Clínico	Aguascalientes	O:1	1
45.	Clínico	Aguascalientes	O:1	1

**Listeria seeligeri*. Control negativo

5.1 SENSIBILIDAD-RESISTENCIA A ANTIMICROBIANOS.

Se valoró la sensibilidad-resistencia frente a 12 antimicrobianos mediante la técnica “difusión disco-placa”, algunas de ellas (aminoglucósidos, tetraciclina y trimetropin-sulfametoxazol) son utilizadas en la práctica clínica, especialmente en aquellos casos con manifestaciones extraintestinales de la enfermedad. Atendiendo a la diferente resistencia a estas sustancias las cepas fueron descritas como resistentes (R) o sensibles (S). Las cepas aisladas de los diferentes alimentos así como las de referencia también fueron tipificadas por este método.

Tabla 15. Resistencia de *Listeria monocytogenes* frente a antimicrobianos

Antimicrobiano	Origen de la muestra		Total serie (n = 45)	
	Alimentos	Clínico	Nº	(%)
Ampicilina (Am)	20	2	22	48.8
Cefalotina (Cf)	30	2	32	71.11
Cefotaxima (Ctx)	-	-	-	-
Ceftazidina (Caz)	15	2	17	37.77
Cefuroxima (Cxm)	7	-	7	15.55
Dicloxacilina (Dc)	5	-	5	11.11
Eritromicina (E)	12	2	14	31.11
Gentamicina (Ge)	3	-	3	6.06
Pefloxacina (Pef)	26	2	28	62.2
Penicilina (Pe)	26	2	28	62.2
Tetraciclina (Te)	5	2	7	15.55
Trimetropin- Sulfametoxazol (Sxt)	13	1	14	31.11

Tabla 16. Perfiles de resistencia a antimicrobianos de *Listeria monocytogenes*.

PR	Antimicrobiano												Cepas (n = 45)	
	Ctx	Am	Pe	Caz	Cf	Cxm	Pef	Dc	Ge	Te	E	Sxt	No	%
PR1	S	R	R	R	R	S	R	S	S	S	R	R	7	15.50
PR2	S	R	R	R	R	S	R	S	S	S	S	S	5	11.11
PR3	S	R	R	R	R	S	R	S	S	S	S	R	2	4.44
PR4	S	R	S	S	S	S	R	S	R	R	R	R	2	4.44
PR5	S	R	R	S	R	S	R	S	S	S	R	S	2	4.44
PR6	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S	R	S	2	4.44
PR7	S	S	R	S	S	S	R	R	S	S	R	R	1	2.20
PR8	S	R	S	S	R	S	R	S	S	S	S	S	1	2.20
PR9	S	S	S	S	S	R	R	R	R	R	S	R	1	2.20
PR10	S	R	S	S	R	S	R	S	S	S	S	R	2	4.44
PR11	S	R	R	S	R	S	S	S	S	S	S	S	1	2.20
PR12	S	S	R	S	R	S	R	S	S	S	S	R	4	8.88
PR13	S	R	S	S	R	S	R	S	S	S	S	S	1	2.20
PR14	S	S	R	S	R	R	S	S	S	S	S	S	2	4.44
PR15	S	R	R	S	R	R	S	S	S	S	S	S	1	2.20
PR16	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S	1	2.20
PR17	S	R	R	S	R	S	R	S	S	S	S	S	1	2.20
PR18	S	S	R	S	R	S	R	S	S	S	S	S	1	2.20
PR19	S	R	R	S	R	S	S	S	S	S	S	S	2	4.44
PR20	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	1	2.20
PR21	S	S	S	S	R	R	S	S	S	S	S	S	2	4.44
PR22	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S	1	2.20
PR23	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	2	4.44

PR: perfil de resistencia; Ref: cepas de referencia; R: resistente; S: sensible.

Todos los aislamientos fueron sensibles al antibiótico β -lactámicos:Cefotaxina, así como al aminoglucósido gentamicina (93.13%). En nuestra serie hemos encontrado resistencia a otros antimicrobianos β -lactámicos: ampicilina (48.8%), cefalotina (71.11%), ceftazidina (37.77%), penicilina (62.2%) y sensibles a Cefuroxima (84.45%), dicloxacilina (88.89%); a la quinolona:

pefloxacima (74.41%); macrólido: eritromicina (68.89%); tetraciclina (84.45%) y al quimioterapéutico trimetropin-sulfametoxazol (68.89%). Los resultados se recogen en la tabla 15.

Los resultados obtenidos diferenciaron a las 45 cepas de *L. monocytogenes* en 23 perfiles de resistencia (PRs), denominados desde PR1 hasta PR23 (Tabla 16.), siendo el PR1: Am, Pe, Caz, Cf, Pef, E, Sxt el más frecuente (6 cepas), seguido por el PR2: Am, Pe, Caz, Cf, Pef (4 cepas) y PR12: Pe, Cf, Pef, Sxt (4 cepas). Los perfiles PR3, PR6, PR14, PR19 y PR23 incluyeron dos cepas por perfil. Los restantes comprendían un único representante por cada perfil.

A la vista de estos resultados se pueden hacer los siguientes comentarios:

- Los tres perfiles de resistencia (PR1, PR2 y PR12) que aparecen con mayor frecuencia (9.30-13.95%), incluyen resistencia a los β -lactámicos; Am, Pe, Cf, a la quinolona: Pef y al Stx, inhibidor de la ruta metabólica del ácido fólico.
- El perfil de resistencia más frecuente, PR1, se encontró en aislamientos provenientes de leche, mientras que los PRs 2 y 12 aparecieron en aislamientos de germinados.
- Se observó que existe correlación entre el perfil de resistencia más frecuente PR1 (Am, Pe, Caz, Cf, Pef, E, Sxt) y el serotipo O:1, ya que en todos los casos estuvo asociado a cepas de este serotipo. Este perfil incluye resistencia a Ampicilina, Pencilina, eritromicina y trimetropin-sulfametoxazol, antibióticos de uso en el tratamiento de la listeriosis clínica.

Se procedió a valorar las técnicas de biotipificación, serotipificación y perfil de resistencia a antimicrobianos como métodos de tipificación en *Listeria monocytogenes*, según los criterios que ha de cumplir un método útil para estudios epidemiológicos como son estabilidad de las marcas analizadas, reproducibilidad y facilidad de los resultados, capacidad de discriminación del método, índice de discriminación, disponibilidad de materiales y costo de la técnica (Arbeit, 1995):. Los resultados se muestran en la tabla 17.

Tabla 17.. Valoración de los marcadores fenotípicos como métodos de tipificación.

Propiedad valorada	Métodos de tipificación		
	Biotipificación	Serotipificación	Perfil de resistencia
Estabilidad de indicadores	++	++	++ ^a
Reproducibilidad	++	+++	+++
Capacidad de tipificación	100%	35%	100%
Poder de discriminación:			
No. De tipo	4	2 ^b , NA	23
ID	0.54	0.41 ^c	0.90
Facilidad de interpretación	++	++	+++
Disponibilidad de reactivos	+++	+	+++
Costo (tiempo/dinero)	Bajo	Bajo	Bajo

+++ : muy buena; ++ : media; + : deficiente; ID : índice de discriminación.

- En los ensayos realizados buena, pero teóricamente pueden ser inestables (codificación plasmídica).
- Entre las 39 cepas estudiadas, aparecieron 2 serotipos diferentes. Un grupo más serían todas las cepas no aglutinables (NA).
- ID: se calculó sobre 12 cepas de serotipo conocido, no comparable con los ID de los otros métodos calculados con el total de la serie de las cepas.

5.2 Métodos directos para evaluar la patogenicidad: Patrones, porcentajes e índices relativos obtenidos.

El primer índice de adherencia determinado en los ensayos realizados fue el patrón de adherencia, es decir, la disposición de las bacterias adheridas sobre la célula huésped. Se han descrito tres distintos patrones de adherencia para

Escherichia coli: adherencia localizada, adherencia difusa y adherencia agregativa (figura 9), en este trabajo se encontró que ninguna de las 45 cepas de *Listeria monocytogenes* analizadas presentó un patrón de adherencia distinto a los ya reportados para *Escherichia coli*.

Cabe mencionar que simultáneamente a cada ensayo realizado para las cepas de *Listeria monocytogenes*, se incorporaron testigos de células los cuales consistieron en cultivos celulares adicionados con medio de cultivo e incubados simultáneamente con los experimentos, también se realizaron como testigos de adherencia ensayos con la cepa de referencia *Escherichia coli* E2348 (O126:H6) que presenta adherencia localizada. Los resultados obtenidos fueron muy semejantes en todos los ensayos realizados, en la tabla 18 se muestran algunos ejemplos de porcentajes de adherencia obtenidos en tiempos distintos.

Tabla 18. Resultados representativos de los ensayos realizados con la cepa de referencia.

TIEMPO (MIN)	% DE ADHERENCIA			ADHERENCIA RELATIVA			PATRÓN DE ADHERENCIA		
	E.1	E.2	E.3	E.1	E.2	E.3	E.1	E.2	E.3
30	16	15	16	+	+	+	LA	LA	LA
60	35	34	33	+	+	+	LA	LA	LA
120	52	51	53	++	++	++	LA	LA	LA
180	92	90	92	+++	+++	+++	LA	LA	LA

E.1 Resultados correspondientes al ensayo realizado con la cepa de referencia simultaneo al realizado para la cepa 08, E.2 con la cepa L22 y E.3 con la cepa 39.

En la figura 12 se muestra un testigo de células HEp-2 prefijadas donde se aprecia la integridad del núcleo y la membrana citoplásmica y la ausencia de contaminantes que pudieran interferir con los ensayos.

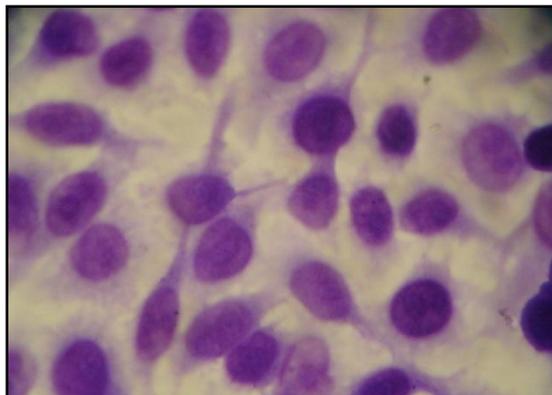


Figura 12. Testigo de células HEp-2 prefijadas con metanol. Obsérvese la integridad del núcleo y citoplasma. Aumento 100X.

En la figuras 13, 14 y 15 se muestran algunas fotografías de ejemplos de los tres distintos patrones de adherencia encontrados en las cepas de *L. monocytogenes*. Además de la presencia de las bacterias adheridas sobre la célula, se observan alteraciones morfológicas en las células eucarióticas, tales como formación de vacuolas en el citoplasma, la membrana se observó dañada en la mayoría de las células empleadas en los ensayos y en ocasiones el núcleo se observó deteriorado. Dos de las cepas (22 y 23) mostraron un comportamiento atípico de lo observado en las cepas de *L. monocytogenes*, ya que a partir de los 30 minutos de incubación se observó la producción masiva de vacuolas de forma bacilar en toda la superficie celular, dentro de las cuales se observa claramente el bacilo y las cuales provocan la destrucción total del material celular a los 180 minutos de incubación (Figura 16), por lo cual no se pudo asignar ninguna descripción de patrón de adherencia a dichas cepas.

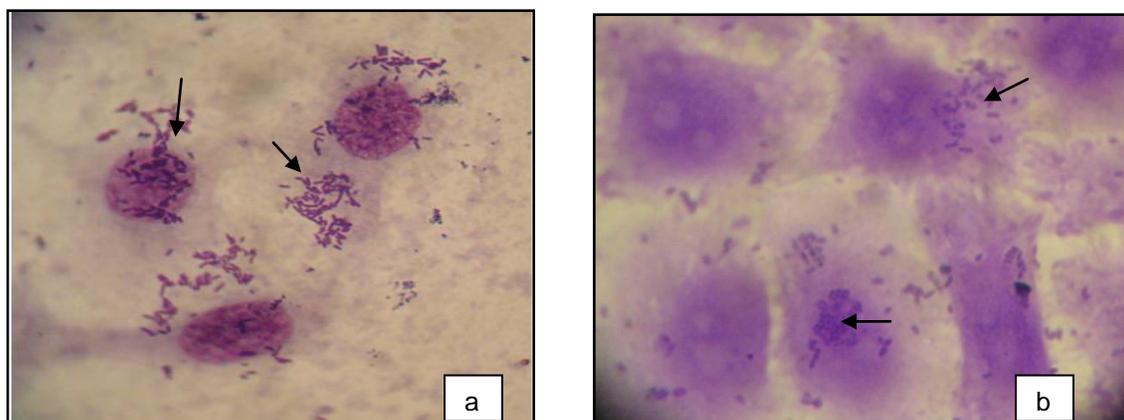


Figura 13. Adherencia localizada (LA) de *L. monocytogenes* en células HEp-2 prefijadas. (a) Cepa 07 a los 120 minutos de incubación, (b) Cepa 18 a los 180 minutos de incubación. Como se muestran en las flechas las bacterias forman microcolonias en varios puntos de la célula como indican las flechas. Aumento 100X.

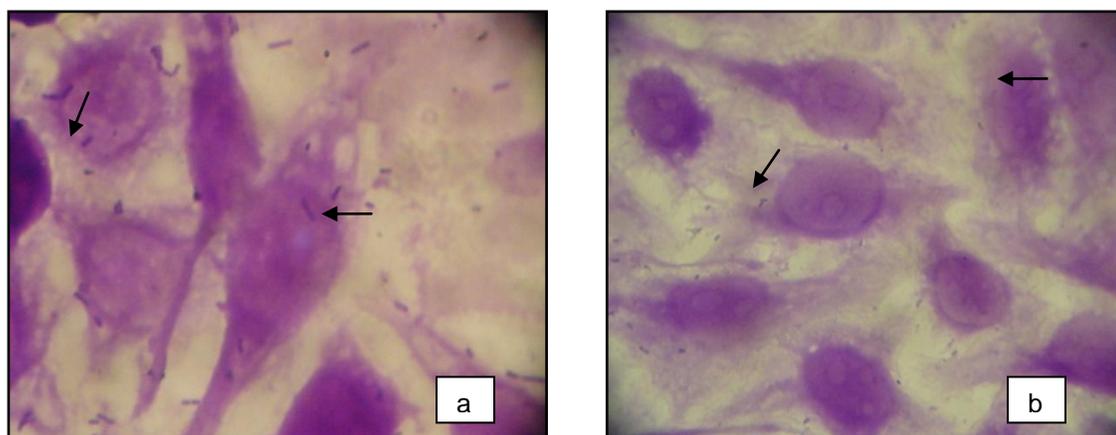


Figura 14. Adherencia difusa (DA) de *L. monocytogenes* en células HEp-2 prefijadas. (a) Cepa 33 a los 120 minutos de incubación, (b) Cepa 25 a los 180 minutos de incubación. Las flechas muestran a las bacterias en la superficie celular. Aumento 100X.

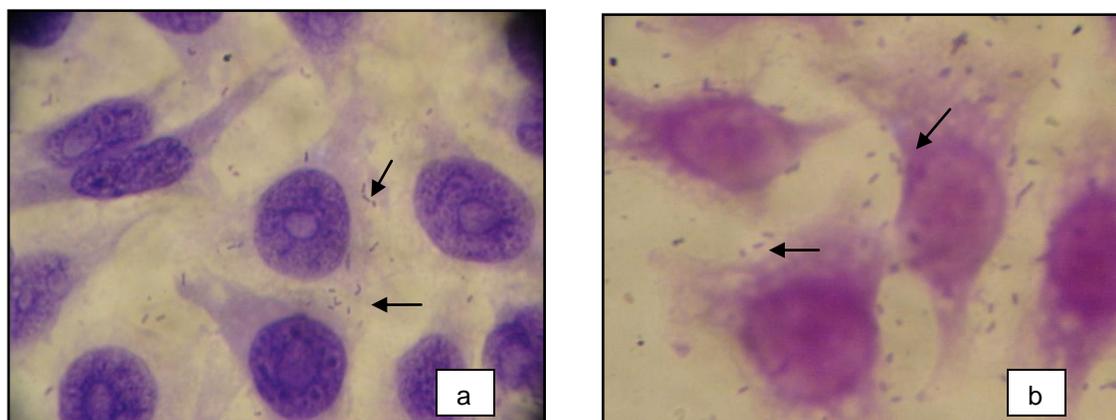


Figura 15. Adherencia agregativa (AA) de *L. monocytogenes* en células HEp-2 prefijadas. (a) Cepa 43 a los 60 minutos de incubación, (b) Cepa 40 a los 180 minutos de incubación. En ambos casos las bacterias forman agregados que cubren el borde celular, como indican las flechas. Aumento 100X.

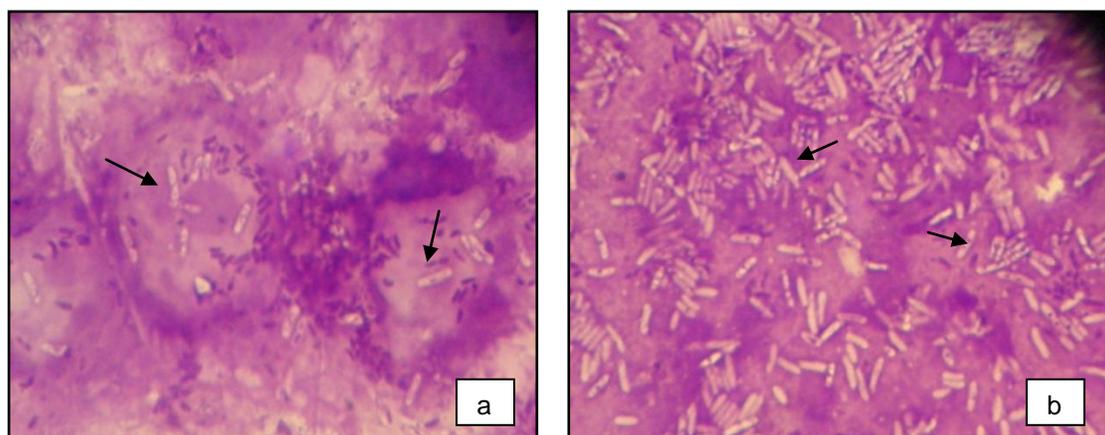


Figura 16. Adherencia a células HEp-2 de la cepa 22. (a) Después de 60 minutos de incubación, aún se aprecian la estructura celular. (b) Después de 120 minutos de incubación, obsérvese la destrucción casi total del material celular. Las flechas indican la formación de vacuolas.

De las 45 cepas analizadas, el 28.8% (13/45) presentaron patrón de adherencia localizada (Figura 13), el 35.5% (16/45) adherencia difusa (Figura 14) y el 28.8% (13/45) agregativa (Figura 15), el 4.4% (2/45) restante corresponde a las cepas con actividad vacuolizante (Figura 16).

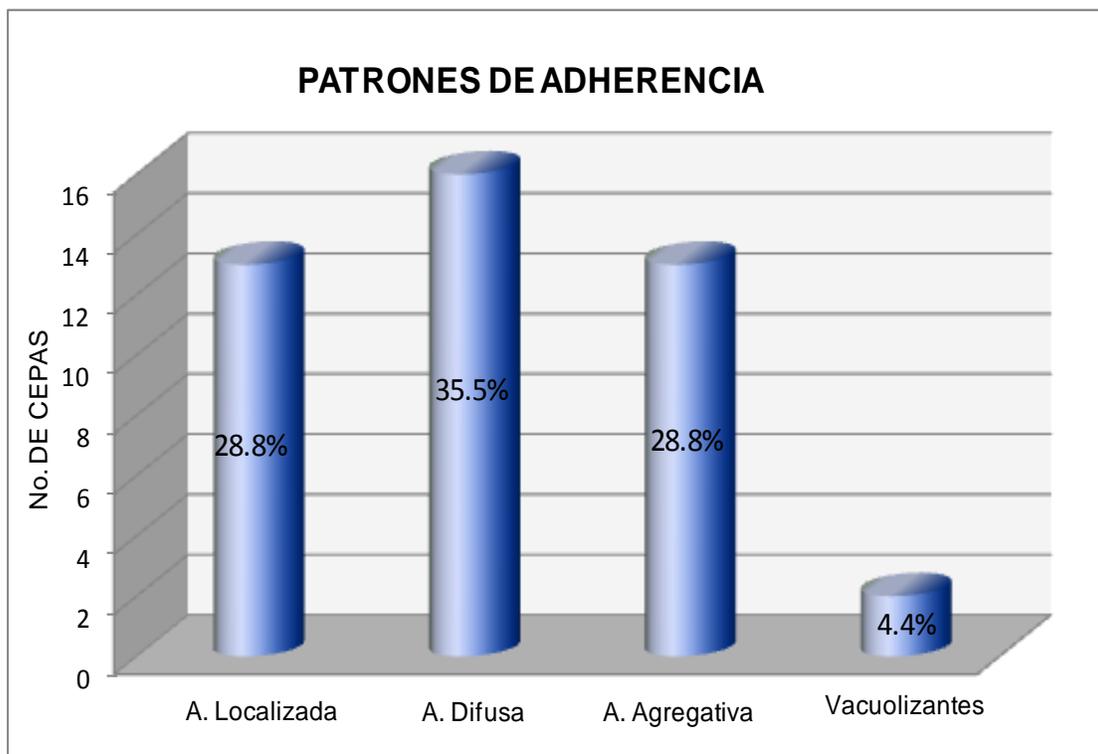


Figura 17. Gráfica comparativa del número de cepas que presentan cada patrón de adherencia observado.

Además de los patrones de adherencia, se determinaron los porcentajes y adherencias relativas de las cepas (figura 17) En las siguientes tablas (19-23) se muestran los índices de adherencia determinados para cada una de las cepas, agrupadas con base en el tipo de alimento del cual fue aislada. También se muestran los promedios de los porcentajes de adherencia obtenidos, ya que los experimentos se realizaron por triplicado para cada una de las cepas. Por último, se indica el patrón de adherencia encontrado para cada una de las cepas.

Tabla 19. Índices de adherencia de las cepas aisladas a partir de hortalizas en el Distrito Federal.

CEPA	TIEMPO (MIN)	% ADHERENCIA				ADHERENCIA RELATIVA	PATRÓN
		Exp. 1	Exp. 2	Exp. 3	Promedio		
19	30	4	3	3	3.33	+	DA
	60	7	9	8	8	+	
	120	10	10	9	9.66	+	
	180	26	23	26	25	+	
21	30	22	23	32	25.66	++	LA
	60	66	65	65	65.33	++	
	120	71	70	74	71.66	++	
	180	92	90	92	91.33	+++	
24	30	46	44	38	42.66	+	LA
	60	65	63	67	65	++	
	120	73	72	71	72	++	
	180	83	82	82	82.33	++	
25	30	62	59	61	60.66	+	DA
	60	67	69	63	66.33	++	
	120	71	72	69	70.66	++	
	180	79	76	76	77	++	
40	30	35	35	36	35.33	++	AggA
	60	67	66	67	66.66	+++	
	120	83	86	84	84.33	+++	
	180	97	95	97	96.33	+++	
43	30	63	65	62	63.33	+++	AggA
	60	77	82	83	80.66	+++	
	120	88	92	87	89	+++	
	180	95	95	93	94.33	++++	
44	30	23	22	26	23.66	+	AggA
	60	41	39	40	40	++	
	120	68	71	66	68.33	++	
	180	85	85	83	84.33	+++	

DA= Adherencia difusa, LA= Adherencia localizada, AggA= Adherencia agregativa, Exp= Ensayo

En la tabla 19 se muestran los resultados para las cepas aisladas a partir de hortalizas en el Distrito Federal. Como se observa, ninguno de los patrones de adherencia fue predominante. Los porcentajes de adherencia fueron en su mayoría superiores al 80%, sin embargo, la cepa 19 presentó solamente 25% de adherencia y de 1 a 5 bacterias adheridas por célula. La cepa 40 presentó la mayor adherencia relativa de las 45 cepas analizadas con más de 16 bacterias adheridas por célula, además de un alto porcentaje de adherencia (94%).

En la tabla 20 se observa nuevamente que la mayoría de las cepas presentan porcentajes de adherencia por arriba del 80%. La cepa 11 presentó el porcentaje de adherencia más bajo con solo el 36% y de 1 a 5 bacterias adheridas por célula. Las cepas 02 y 04 mostraron porcentajes muy altos de adherencia, ambas con 99.33% y entre 11 y 15 bacterias adheridas por célula. En este grupo de alimentos procedentes de Sonora se encontraron los tres patrones de adherencia.

En la tabla 21 se observa que las cepas aisladas de jugos de naranja, presentan en su mayoría porcentajes de adherencia de entre 50 y 80% con adherencias relativas bajas, ya que se observaron menos de 10 bacterias por célula. Sólo 4 de estas cepas presentaron porcentajes de adherencia por arriba del 80%.

Tabla 20. Índices de adherencia de las cepas aisladas a partir de hortalizas provenientes de Sonora.

CEPA	TIEMPO (MIN)	% ADHERENCIA				ADHERENCIA RELATIVA	PATRÓN
		Exp. 1	Exp. 2	Exp. 3	Promedio		
02	30	32	28	29	29.66	+	DA
	60	44	40	39	41	+	
	120	99	99	100	99.33	++	
	180	100	98	100	99.33	+++	
03	30	15	12	13	13.33	+	DA
	60	38	41	40	39.66	+	
	120	69	70	70	69.66	+	
	180	94	93	95	94	++	
04	30	40	44	41	41.66	+	DA
	60	68	62	69	66.33	+	
	120	96	97	94	95.66	++	
	180	100	99	99	99.33	+++	
05	30	66	59	63	62.66	+	AggA
	60	71	67	67	68.33	++	
	120	92	88	87	89	++	
	180	94	97	93	94.66	+++	
06	30	60	58	62	60	+	DA
	60	72	70	66	69.33	++	
	120	88	86	87	87	++	
	180	92	93	90	91.66	++	
07	30	68	66	65	66.33	++	LA
	60	63	72	75	70	+++	
	120	77	80	79	78.66	+++	
	180	86	85	87	86	+++	
08	30	15	19	18	17.33	+	LA
	60	31	29	33	31	+	
	120	70	68	65	67.66	++	
	180	80	85	86	83.66	++	
09	30	45	48	49	47.33	+	AggA
	60	52	50	53	53	+	
	120	57	55	57	56.33	++	
	180	67	69	70	68.66	++	
10	30	45	47	47	46.33	+	DA
	60	57	61	60	59.33	+	
	120	73	74	77	74.66	++	
	180	89	86	87	87.33	++	
11	30	1	2	1	1.33	+	AggA
	60	6	8	9	7.66	+	
	120	20	23	24	22.33	+	
	180	38	35	35	36	+	

DA= Adherencia Difusa, LA= Adherencia localizada, AggA= Adherencia Agregativa, Exp= Experimento

Tabla 21. Índices de adherencia de las cepas aisladas a partir de jugos en el Distrito Federal.

CEPA	TIEMPO (MIN)	% ADHERENCIA				ADHERENCIA RELATIVA	PATRÓN
		Exp. 1	Exp. 2	Exp. 3	Promedio		
26	30	20	16	16	17.33	+	DA
	60	27	24	20	23.66	+	
	120	36	41	32	36.33	+	
	180	69	73	68	70	++	
27	30	7	9	7	7.66	-	AggA
	60	24	20	21	21.66	+	
	120	47	41	48	45.33	+	
	180	75	76	74	75	++	
28	30	0	0	0	0	-	DA
	60	28	26	25	26.33	+	
	120	40	38	41	39.66	+	
	180	57	58	56	57	+	
29	30	0	1	1	0.66	-	LA
	60	2	1	1	1.33	-	
	120	19	21	24	21.33	+	
	180	58	62	61	60.33	+	
30	30	0	0	0	0	-	LA
	60	6	5	5	5.33	+	
	120	47	42	49	46	++	
	180	76	75	79	76.66	++	
31	30	2	1	0	1	+	DA
	60	11	7	6	8	+	
	120	44	35	38	39	+	
	180	60	58	58	58.66	+	
32	30	3	4	1	2.66	+	DA
	60	15	17	19	17	+	
	120	76	78	74	66	++	
	180	88	82	89	86.33	+++	
33	30	2	4	1	2.33	+	DA
	60	8	7	11	8.66	++	
	120	75	79	72	75.33	++	
	180	82	89	90	87	+++	
34	30	12	15	13	13.33	+	DA
	60	31	29	29	29.66	++	
	120	70	68	66	68	++	
	180	83	85	82	83.33	+++	
38	30	43	45	43	43.66	++	LA
	60	67	68	70	68.33	++	
	120	75	75	73	74.33	++	
	180	87	90	88	88.33	+++	
39	30	16	18	19	17.66	+	LA
	60	31	34	28	31	+	
	120	52	57	52	53.66	++	
	180	82	76	77	78.33	+++	

DA= Adherencia Difusa, LA= Adherencia localizada, AggA= Adherencia Agregativa, Exp= Experimento

Tabla 22. Índices de adherencia de las cepas aisladas a partir de lácteos en el Distrito Federal.

CEPA	TIEMPO (MIN)	% ADHERENCIA				ADHERENCIA RELATIVA	PATRÓN
		Exp. 1	Exp. 2	Exp. 3	Promedio		
12	30	19	21	18	19.33	+	DA
	60	35	32	33	33.33	+	
	120	47	47	44	46	+	
	180	69	73	67	69.66	++	
13	30	1	2	2	1.66	+	DA
	60	2	1	2	1.66	+	
	120	5	5	6	5.33	+	
	180	12	14	14	13.33	+	
14	30	14	16	13	14.33	+	LA
	60	22	23	25	23.33	+	
	120	77	82	85	81.33	+++	
	180	66	72	65	67.66	++	
15	30	50	56	58	54.66	++	LA
	60	73	75	75	74.33	++	
	120	87	86	85	86	+++	
	180	89	86	85	86.66	+++	
17	30	40	43	43	42	+	AggA
	60	73	75	76	74.66	++	
	120	88	91	88	89	+++	
	180	96	93	93	94	+++	
22	Vacuolizante						-
41	30	22	25	21	22.66	+	AggA
	60	42	43	43	42.66	++	
	120	49	52	47	49.33	++	
	180	55	57	62	58	++	
42	30	33	33	35	33.66	++	AggA
	60	64	67	68	66.33	+++	
	120	77	75	77	76.33	+++	
	180	96	95	98	96.33	+++	

DA= Adherencia Difusa, LA= Adherencia localizada, AggA= Adherencia Agregativa, Exp= Experimento

La cepa 38 presentó el mayor porcentaje de adherencia con 88.33% y entre 10 y 15 bacterias adheridas por célula. La cepa 28 presentó el menor porcentaje de adherencia y una baja adherencia relativa con menos de 5 bacterias adheridas por célula. Respecto a los patrones de adherencia, se encontró que de las 11 cepas solamente la cepa 27 presentó patrón de adherencia agregativo, 6 cepas presentaron adherencia difusa y 4 adherencia localizada.

En la tabla 22 se muestran los resultados obtenidos para las cepas aisladas a partir de lácteos en el Distrito Federal, en este grupo de alimentos se encontraron los tres patrones de adherencia sin predominio de ninguno.

Tabla 23. Índices de adherencia de las cepas aisladas a partir de cárnicos y peces* en el D.F.

CEPA	TIEMPO (MIN)	% ADHERENCIA				ADHERENCIA RELATIVA	PATRÓN
		Exp. 1	Exp. 2	Exp. 3	Promedio		
20	30	6	8	5	6.33	+	AggA
	60	13	12	10	11.66	+	
	120	36	34	39	36.33	+	
	180	78	75	78	77	+++	
23	Vacuolizante					-	-
36	30	17	18	17	17.33	+	AggA
	60	57	51	54	54	++	
	120	65	67	63	65	++	
	180	82	87	80	83	+++	
37	30	15	17	13	15	+	DA
	60	28	32	29	29.66	++	
	120	62	58	60	60	++	
	180	79	82	78	79.66	+++	

*Cepas 20, 23 y 36 aisladas de cárnicos, 37 aislada de peces. DA= Adherencia Difusa, LA= Adherencia localizada, AggA= Adherencia Agregativa, Exp= Experimento

De las 3 cepas aisladas a partir de cárnicos (Tabla 23), una cepa (23) presentó actividad vacuolizante, las dos restantes (20 y 36) presentaron patrón de adherencia agregativa y porcentajes de adherencia similares, mientras que la cepa proveniente de peces exhibió un patrón de adherencia difusa y un porcentaje de adherencia cercano al 80%.

En la tabla 24 se muestran los resultados obtenidos con las cepas de referencia de *L. monocytogenes* (16 y 35), se encontró que la cepa 16 presentó un patrón de adherencia localizado, mientras que la cepa 35 exhibió un patrón de adherencia agregativa.

Tabla 24. Índices de adherencia de las cepas de referencia y de origen clínico*.

CEPA	TIEMPO (MIN)	% ADHERENCIA				ADHERENCIA RELATIVA	PATRÓN
		Exp. 1	Exp. 2	Exp. 3	Promedio		
16	30	61	60	57	59.33	++	LA
	60	71	74	69	71.33	++	
	120	73	76	77	75.33	++	
	180	83	87	82	84	+++	
35	30	29	28	26	27.66	+	AggA
	60	43	41	40	41.33	+	
	120	54	52	53	53	++	
	180	73	69	71	71	++	
01	30	33	30	30	31	+	LA
	60	50	47	50	49	+	
	120	94	97	96	95.66	++	
	180	98	99	98	98.33	+++	
18	30	2	2	4	2.66	+	LA
	60	8	6	7	7	+	
	120	24	21	27	24	+++	
	180	46	45	48	46.33	+++	

*Cepa 16 y 35 son cepas de referencia, las cepas 01 y 18 son de origen clínico. DA= Adherencia Difusa, LA= Adherencia localizada, AggA= Adherencia Agregativa, Exp= Experimento

La cepa 16 resultó más adherente ya que alcanzó 84% de adherencia presentando de 10 a 15 bacterias por célula, mientras que la cepa 35 tuvo un porcentaje de adherencia de 71% y una adherencia relativa menor. Las dos cepas restantes enlistadas en esta tabla son de origen clínico, la cepa 01 presentó un porcentaje de adherencia de 98.33% y de 10 a 15 bacterias adheridas por célula y la cepa 18 presentó un porcentaje de adherencia de 46.33%, pero la misma adherencia relativa y el mismo patrón de adherencia que la cepa 01.

De acuerdo a las observaciones realizadas, y con el fin de facilitar el manejo de datos, se realizó una clasificación considerando los porcentajes de adherencia determinados (tabla 25).

Tabla 25. Clasificación de las cepas en base a los porcentajes de adherencia observados.

% DE ADHERENCIA	GRADO DE ADHERENCIA
≤ 50	No adherente
51-60	Poco adherente
61-80	Medianamente adherente
≥ 81	Muy adherente

Con esta clasificación y considerando los patrones de adherencia, las cepas se agruparon como se muestra en la tabla 26:

Tabla 26. Número de cepas pertenecientes a cada clasificación.

GRADO DE ADHERENCIA	NO. DE CEPAS		
	A. Localizada	A. Agregativa	A. Difusa
No adherentes	1	1	2
Poco adherentes	0	1	2
Medianamente adherentes	4	4	4
Muy adherentes	8	7	8

En la tabla 27 se muestran las cepas pertenecientes a cada clasificación:

Tabla 27. Cepas pertenecientes a cada grupo de adherencia de acuerdo a su patrón.

GRADO DE ADHERENCIA	CEPAS		
	A. Localizada	A. Agregativa	A. Difusa
No adherentes	18	11	13, 19
Poco adherentes	-	41	28, 31
Medianamente adherentes	14, 29, 30,39	09, 20, 27, 35	12, 25, 26,37
Muy adherentes	01, 07,08,15,16,21,24	05, 17, 36, 40, 42, 43, 44	02, 03, 04, 06, 10, 32, 33, 34

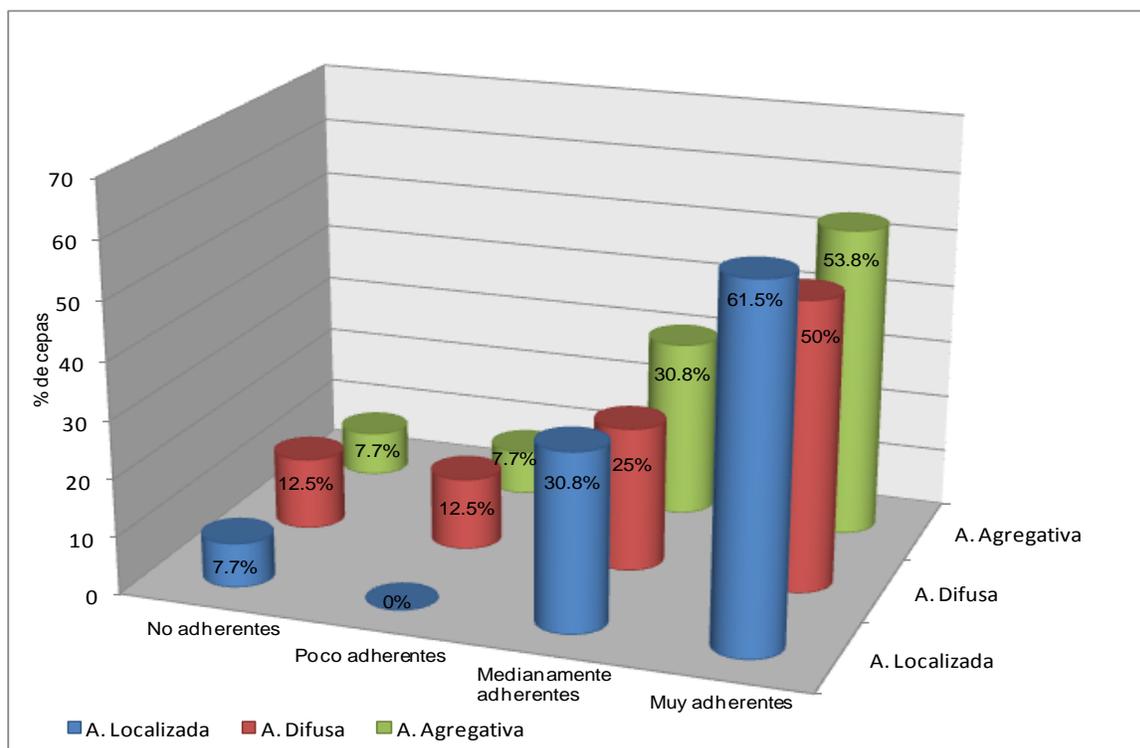


Figura 18. Gráfica comparativa de los porcentajes de cepas pertenecientes a cada grado de adherencia, de acuerdo a sus patrones.

Con el fin de establecer la relación entre el comportamiento de la adherencia y el origen de las cepas se construyeron las gráficas (16, 17) donde se observa la relación existente entre los orígenes de las cepas y los grados de adherencia y entre los orígenes de la cepa y los patrones de adherencia.

Cabe señalar que para la realización de estas gráficas se agruparon las cepas provenientes de hortalizas aisladas en el Distrito Federal y las aisladas en Sonora, generando la clasificación indicada como Hortalizas.

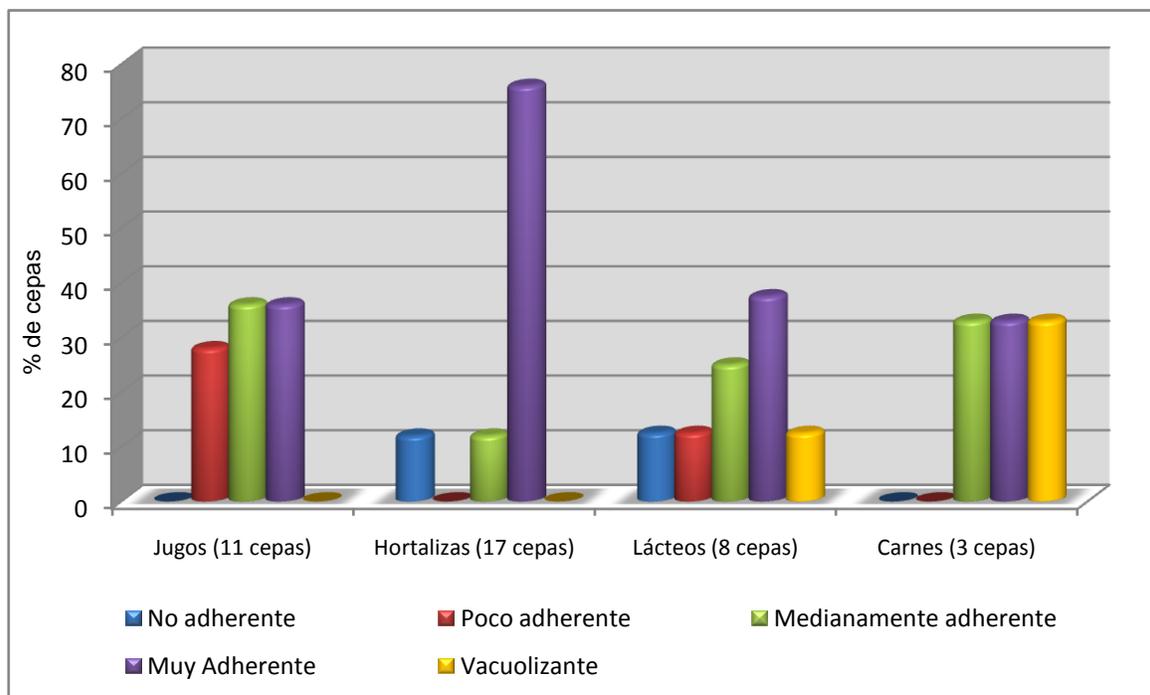


Figura 19. Gráfica donde se muestra el porcentaje de cepas perteneciente a cada grado de adherencia respecto a su origen.

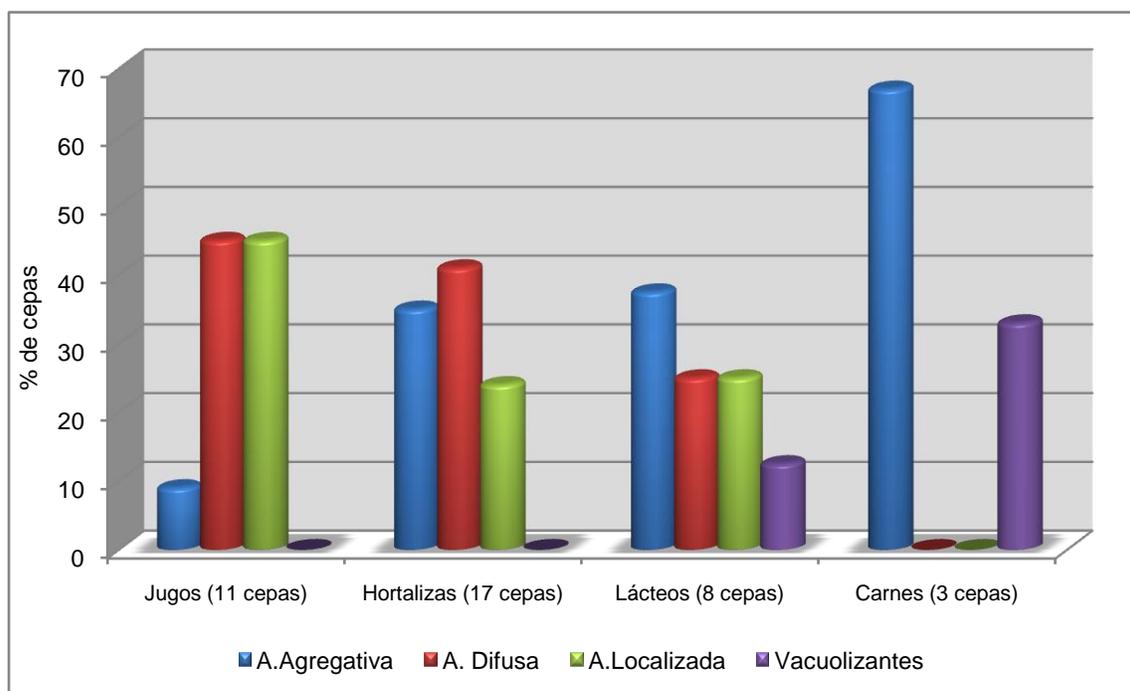


Figura 20. Gráfica donde se muestra el porcentaje de cepas pertenecientes a cada patrón de adherencia con respecto a su origen.

5.2.1 Análisis estadístico

Con el fin de demostrar si existe una diferencia significativa entre los comportamientos de las cepas estudiadas se realizó un análisis estadístico utilizando el programa de SigmaStat v3.5. El análisis efectuado fue un análisis de varianza de dos vías (anova bifactorial) mediante el método de Holm-Sidak. Esta técnica estadística es utilizada para analizar el efecto de dos variables independientes (factores) sobre una variable respuesta. Se dice que entre dos factores hay interacción si los efectos de un factor dependen de los valores del otro. La existencia de interacciones indica que los efectos de los factores sobre la respuesta no son aditivos y por tanto no pueden separarse los efectos de los factores.

En este estudio la variable denominada factor 1 fue la cepa, el factor 2 fueron los cuatro tiempos analizados y la variable dependiente (respuesta) fueron los resultados obtenidos de adherencia. Por lo tanto el factor interacción surgió a partir de los factores 1 y 2. Para los tres factores se obtuvieron valores de $p < 0.001$, este valor indica que sí existe interacción, lo que revela que hay una diferencia significativa entre estos, es decir, que el comportamiento de la adherencia cambia respecto al tiempo y que esto es variable para cada cepa analizada. Se obtuvieron resultados con 95% de confianza.

El análisis realizado brindó también comparaciones de los porcentajes de adherencia obtenidos para cada cepa, a los cuatro diferentes tiempos estudiados, mostrando si existe o no diferencia significativa entre estos. La mayoría de las cepas tuvieron un comportamiento similar en el cual la adherencia aumenta con respecto al tiempo, observándose diferencias significativas entre los tiempos analizados; sin embargo, algunas cepas presentaron comportamientos distintos, una de estas cepas fue la 01, en la cual no se presentó diferencia significativa entre el tiempo de 120 minutos y 180 minutos, lo que indica que el máximo de adherencia se alcanza a los 120 minutos ya que no hay un cambio significativo

respecto a las 180 minutos. Este mismo comportamiento se observó en las cepas 02 y 15. La cepa 29 no mostró diferencia significativa entre los 30 y 60 minutos, la 09 y 19, entre los 60 y 120. Caso especial resultó la cepa 13, la cual no mostró diferencias significativas entre ninguno de los tiempos analizados, es decir, entre los 30, 60 y 120 minutos lo que indica que esta cepa comienza su proceso de adherencia en un mayor tiempo con respecto a las demás cepas analizadas.

Por último, el análisis realizó una comparación de cepa contra cepa para cada uno de los cuatro tiempos, analizando la serie de resultados se encontró que existen 6 combinaciones de cepas en las cuales no existen diferencias significativas en ninguno de los tiempos, es decir, presentaron comportamientos similares a lo largo de la cinética de adherencia. Dichas cepas son: 05 y 06; 06 y 15; 08 y 34; 10 y 24; 37 y 39; y finalmente, 38 y 24. Sin embargo, se observó fenotípicamente que en la mayoría de los casos los patrones de adherencia difieren entre los pares de cepas, con excepción de las cepas LM38 y LM24, las cuales presentan un patrón localizado pero presentan una ligera variación en la adherencia relativa.

5.3 CARACTERIZACIÓN GENÉTICA

5.3.1 Amplificación del rDNA 16S

Con los iniciadores universales empleados se logró amplificar una región de aproximadamente 1350 -1400 pb (Figura 21), que coincide con el fragmento esperado para la región del rDNA 16S reportado por Relman, 1993.

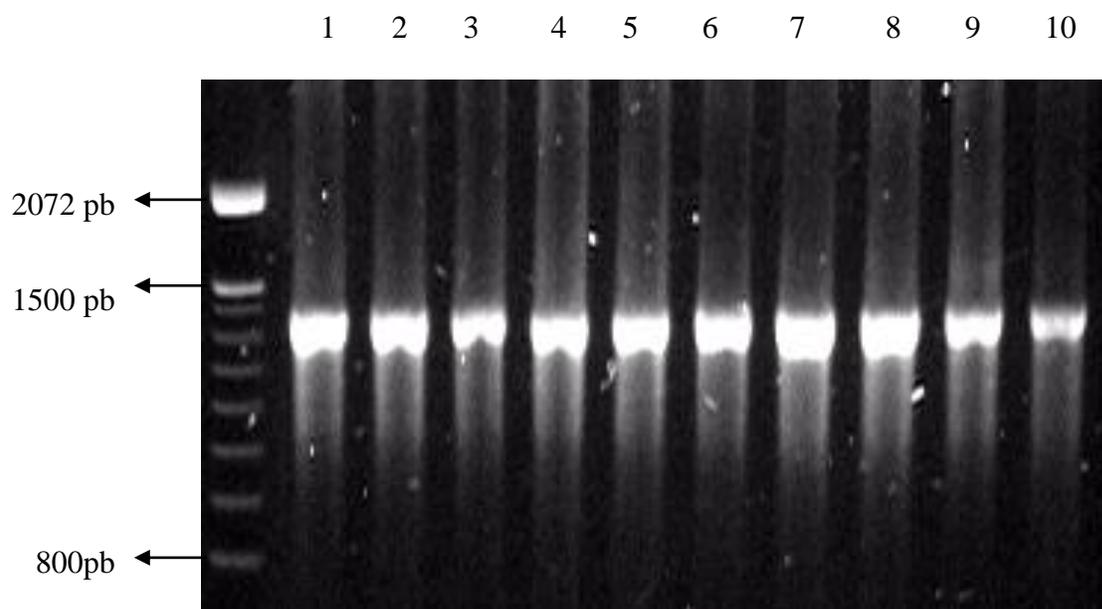


Figura 21. Amplificación del rDNA 16S de *L. monocytogenes* con un tamaño de peso molecular de entre 1350 y 1400pb de acuerdo a los iniciadores reportados por Relman (1993). Carril 1-10 DNA de cepas de *L. monocytogenes* aisladas de Sonora

5.3.2 Patrones de digestión enzimática

5.3.2.1 Patrones de restricción con HhaI

Para el caso de la digestión con HhaI se obtuvieron 3 patrones electroforéticos diferentes, el primero caracterizado por 5 bandas de longitudes entre 180 y 390 pb se presenta en la mayor parte de las cepas, el segundo sólo se observó en la cepa proveniente de agua de riego con 4 bandas longitudinales de 180 a 590 pb (Figura 22a) y el tercero se observó en una cepa proveniente de jugo con 4 bandas longitudinales de 228 a 535 pb aproximadamente. (Figura 22b)

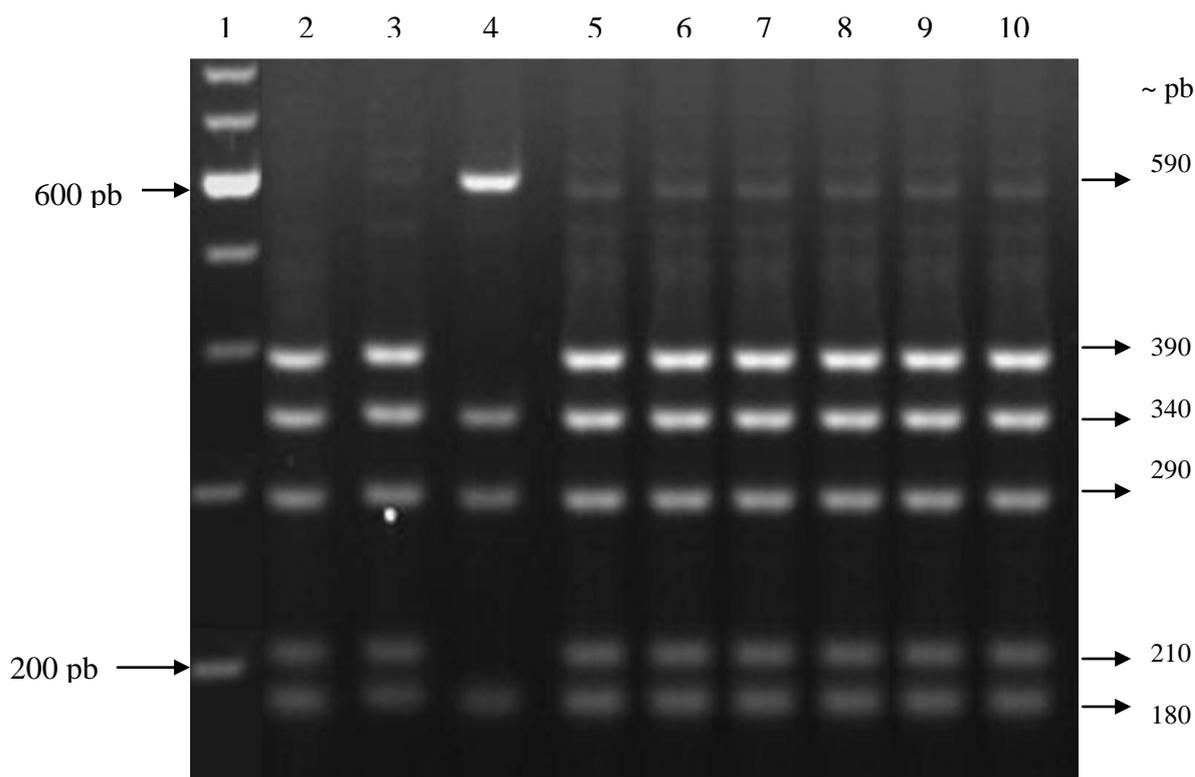


Figura 22a. Patrones electroforéticos obtenidos por la digestión con HhaI. Carril 1 marcador 100 pb. Patrón 1 carril 2, 3 cepas de jugos, carril 5 a 8 cepas de origen lácteo, carriles 9 y 10 cepas de origen cárnico y en el carril 4 se observa el patrón 2 de digestión diferente.

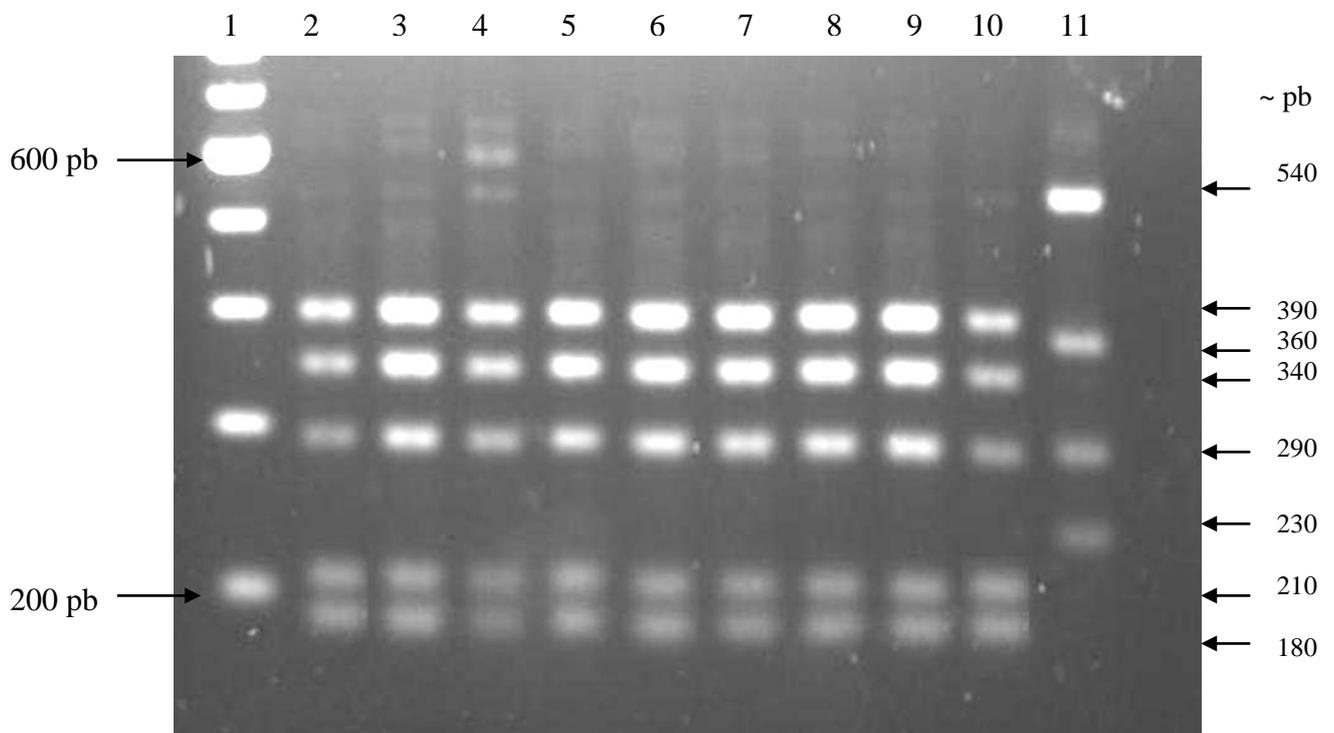


Figura 22b. Patrones electroforéticos obtenidos por la digestión con HhaI. Carril 1 marcador 100 pb. Patrón 1 carril 2 a 10 cepas obtenidas de frutas de hortalizas Hermosillo Son., y en el carril 11 cepa de agua de riego se observa el patrón 3 de digestión diferente.

5.3.2.2 Patrones de restricción con AluI

En el caso de la digestión con AluI también se observaron 3 patrones electroforéticos diferentes el primero caracterizado por 6 bandas longitudinales entre 80 y 615 pb lo presentaron la mayoría de las cepas, el segundo patrón con 5 bandas longitudinales de 115 a 800 pb lo presentó la cepa proveniente de agua de riego (Fig. 23a), mientras que el tercer patrón de 5 bandas longitudinales entre 80 y 615 pb lo presentaron 2 cepas de vegetales, la cepa de peces, una de jugos, y la cepa de referencia de *L. innocua* (Fig. 23b).

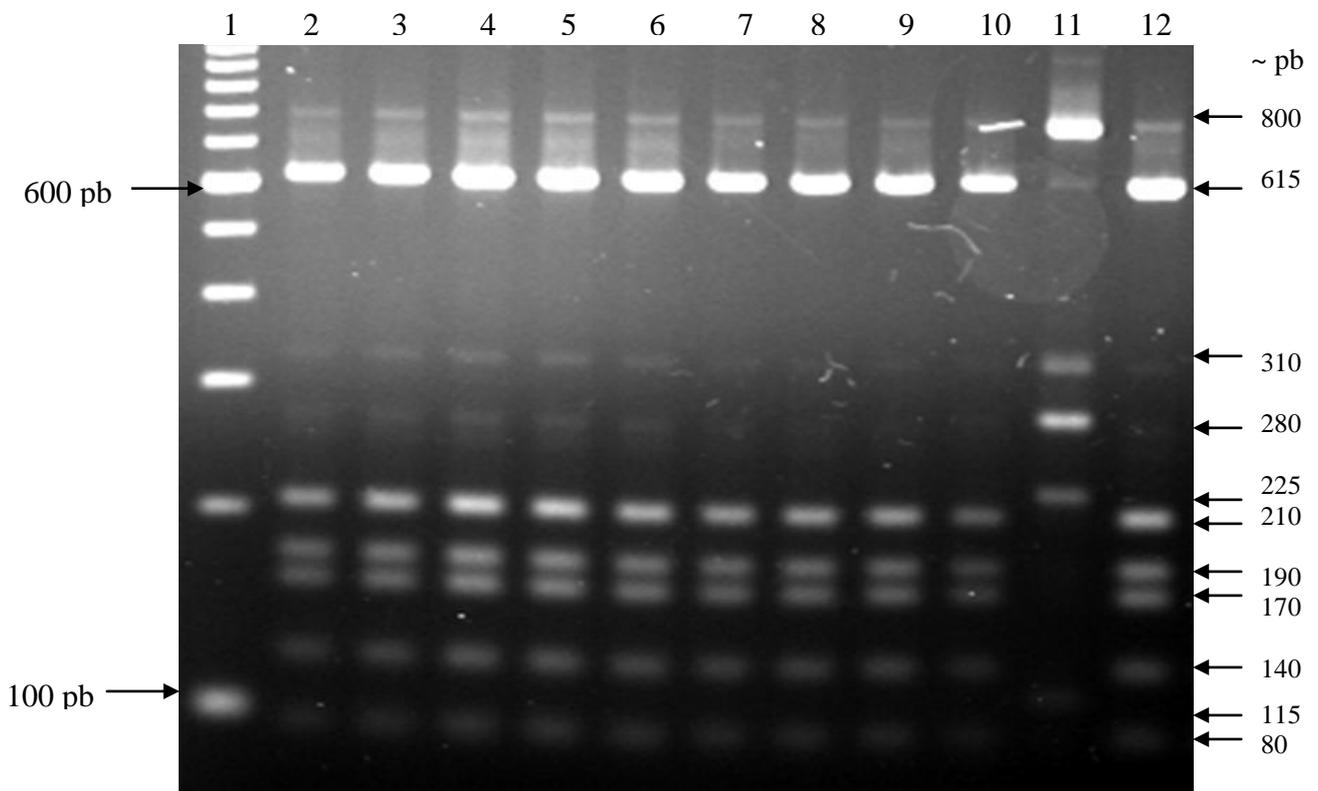


Figura 23a. Patrones electroforéticos obtenidos por la digestión con AluI. Carril 1 marcador de 100 pb, Patrón 1 carriles 2 a 10, 12 cepas obtenidas de frutas de hortalizas Hermosillo Son. Patrón 2 carril 11 cepa de agua de riego Hermosillo Son.

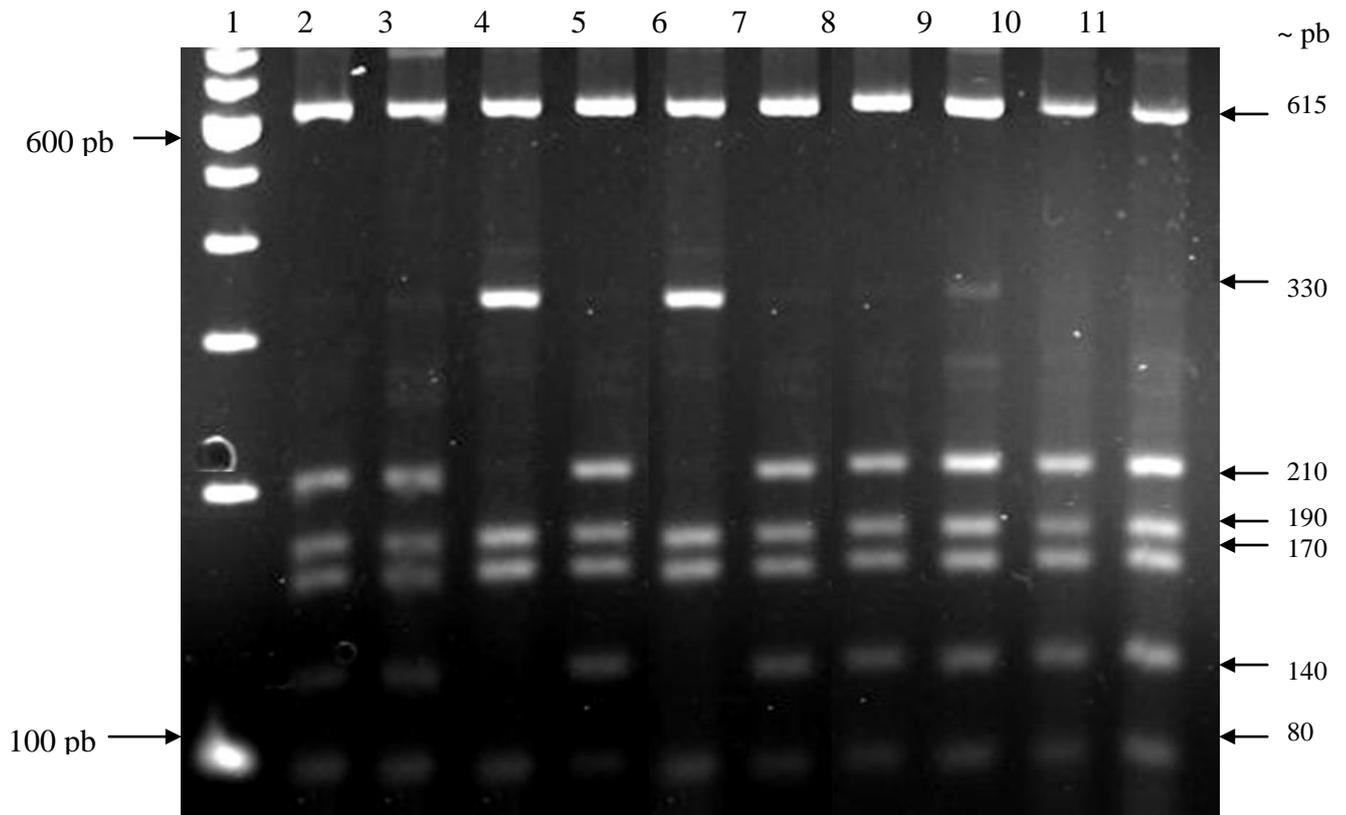


Figura 23b. Patrones electroforéticos obtenidos por la digestión de Alu. Carril 1 marcador de 100 pb. Patrón 1 carriles 2, 3, 5 cepas de jugos, carril 8 cepa de vegetales, carriles 9 a 11 cepas de referencia. Patrón 3 carril 4 cepa de jugos y carril 6 cepa de vegetales.

5.3.2.3 Patrones de restricción con Mbol

En el caso de la digestión con Mbol sólo se obtuvieron 2 patrones electroforéticos, de los cuales uno de ellos se presentó en casi todas las cepas excepto en la cepa proveniente de agua de riego que difiere en el tamaño de una de las bandas por muy poca diferencia. (Figura 24).

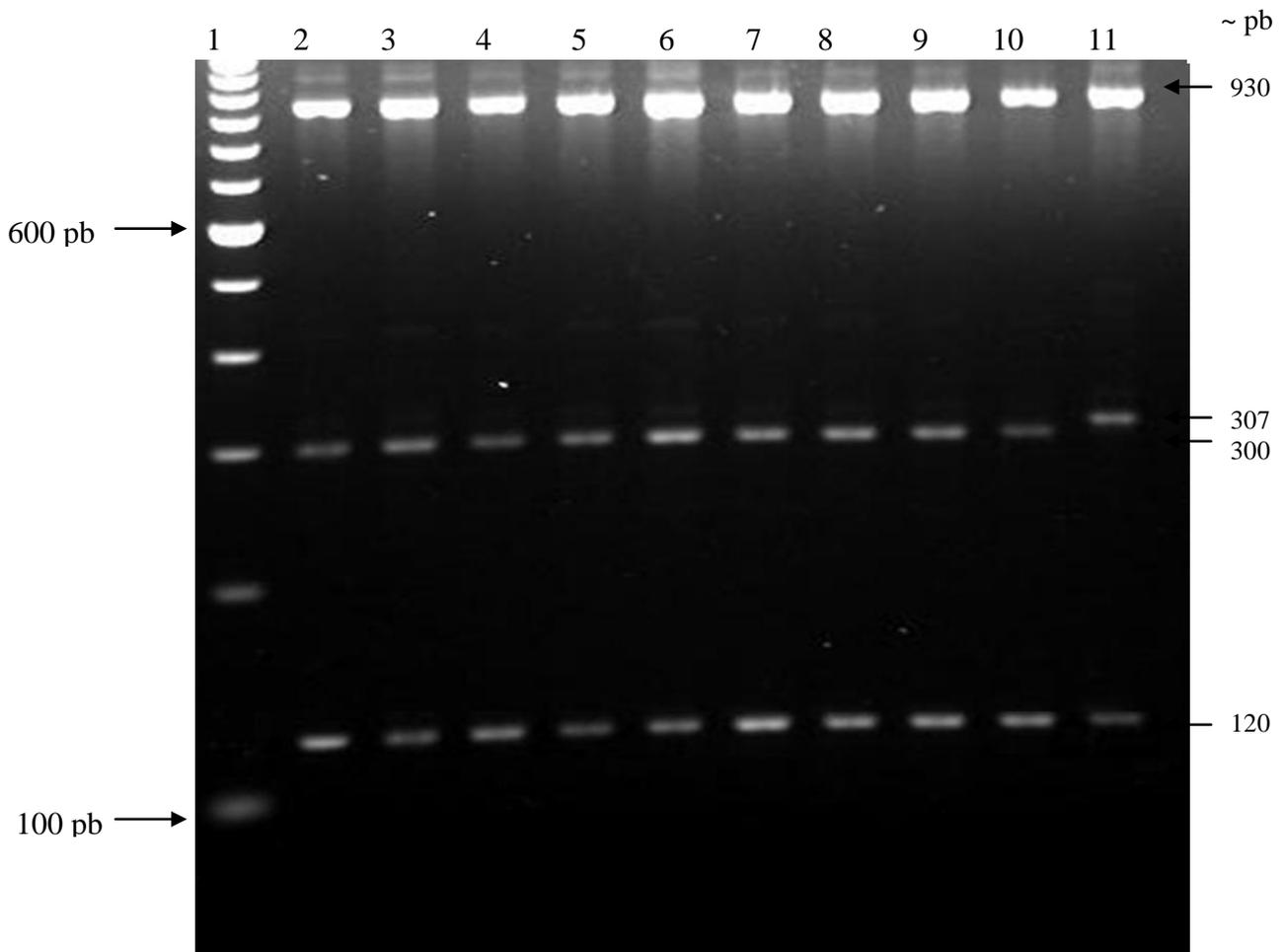


Figura 24. Patrones electroforéticos obtenidos por la digestión con Alul. Carril 1 marcador 100pb, Patrón 1 carriles 2 a 10 cepas obtenidas de frutas y hortalizas; Hermosillo Son. Patrón 2 carril 11 cepa de agua de riego, Hermosillo Son. En el

carril 11 solo se observa una mínima diferencia de aproximadamente de 7pb en la banda 300 pb aproximadamente.

5.3.2.4 Patrones de restricción con RsaI

En el caso de la digestión con RsaI, se obtuvieron 3 patrones electroforéticos diferentes, el primero con 5 bandas longitudinales de 450pb, 350pb, 140pb, 70pb y 50pb, se presenta en la mayoría de las cepas. El segundo patrón presenta cuatro bandas longitudinales de 450pb, 440pb, 350pb y 140pb (Fig. 25a), por el contrario en el tercer patrón (Fig. 25b) se observa una disposición de 3 bandas longitudinales de 520pb, 350pb y otra de 140pb (carril 10)

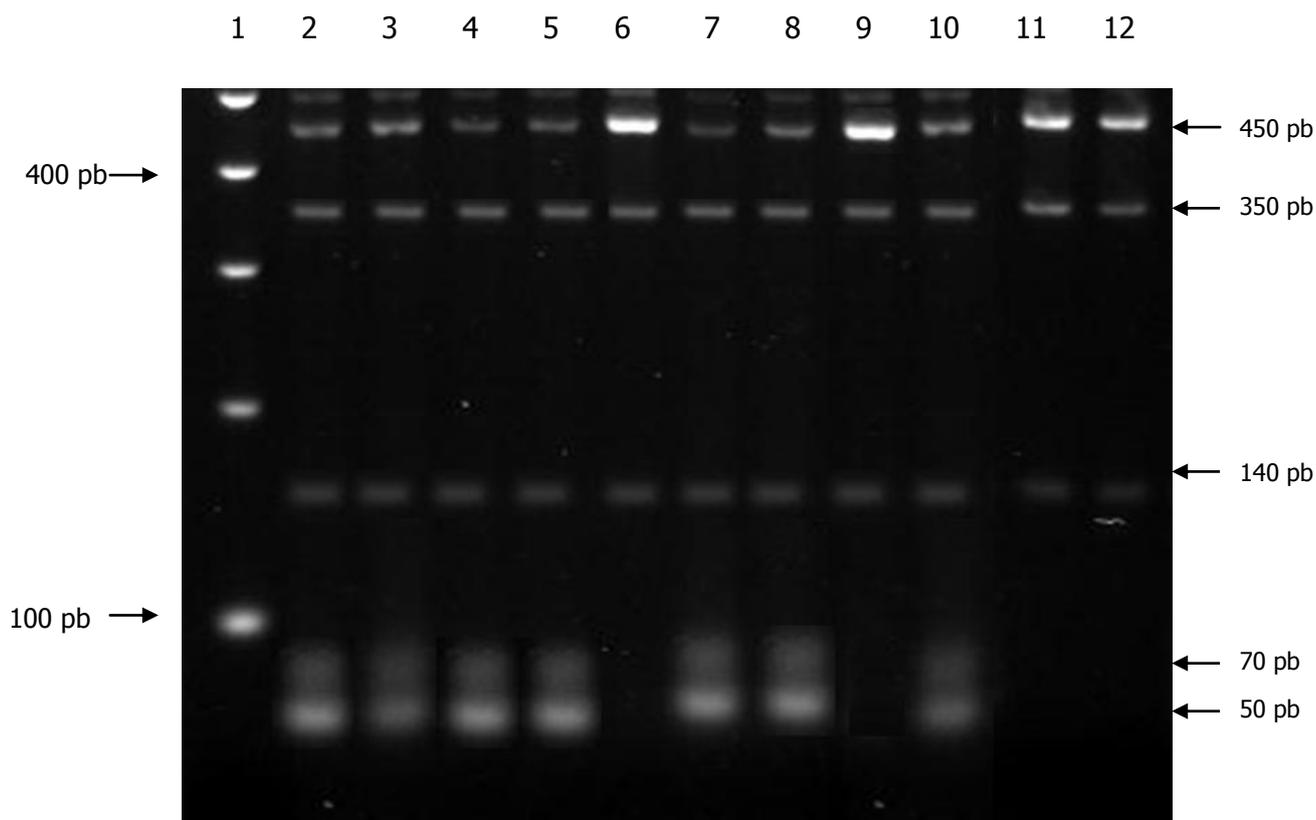


Figura 25a. Patrones electroforéticos obtenidos por la digestión con RsaI. Carril 1 marcador 100 pb. Patrón 1 carril 2, 5 cepas de jugos, carril 7, 8 cepas de origen cárnico, carril 10 cepa de origen clínico de Aguascalientes, Ags., El patrón 2 de digestión diferente se observa en el carril 6 cepa de jugo de naranja y carriles 11 y 12 son cepas de referencia.

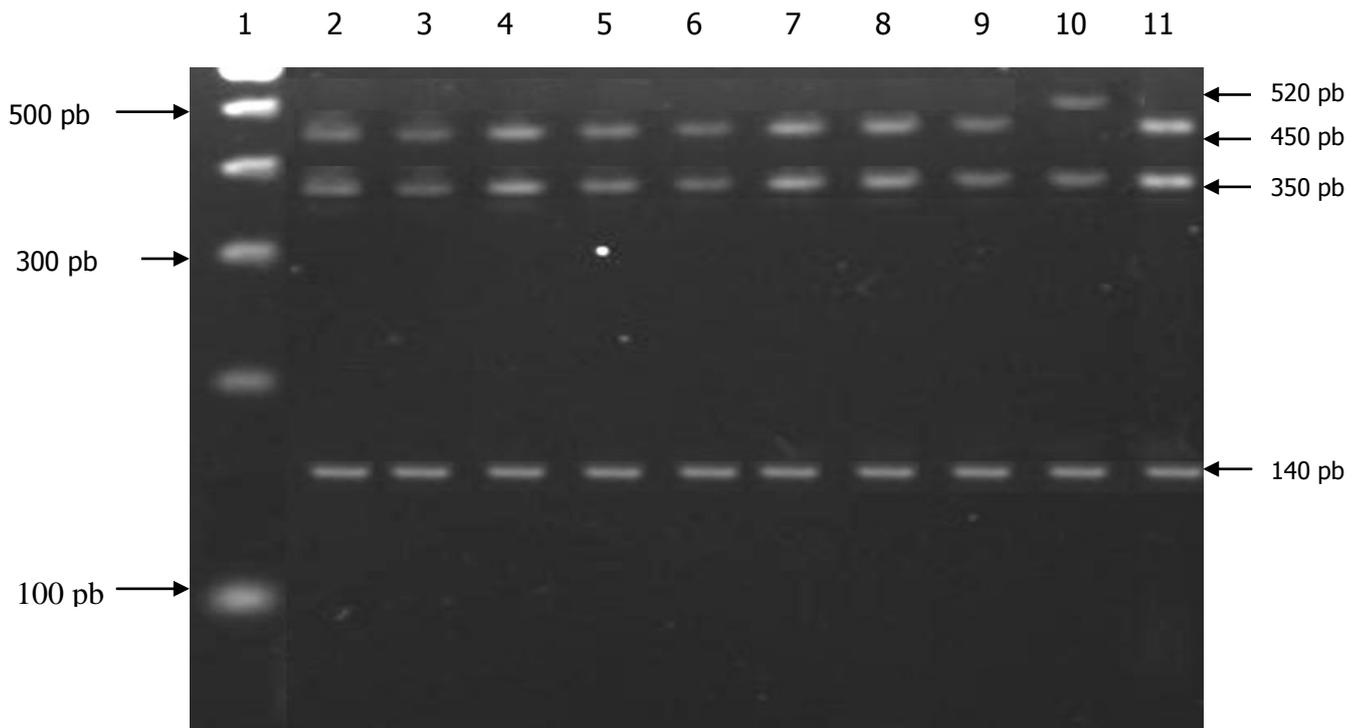


Figura 25b. Patrón electroforético obtenido por la digestión con *RsaI*. Carril 1 marcador 100 pb. Patrón 3 carriles 2 al 9 cepas de hortalizas de Hermosillo, Son., jugos, carril 10 cepa de agua de riego de Hermosillo, Son., y en el carril 11 cepa de origen clínico de Aguascalientes, Ags.

5.3.2.5 Patrones de restricción con HaeIII

Para el caso de la digestión con HaeIII se observan dos patrones electroforéticos diferentes; el primer patrón que representa a la mayoría de las cepas, muestra bandas longitudinales de 600pb, 450pb y 250pb; mientras que el segundo patrón (carril 9) presenta bandas longitudinales de 600pb, 450pb y 300pb.

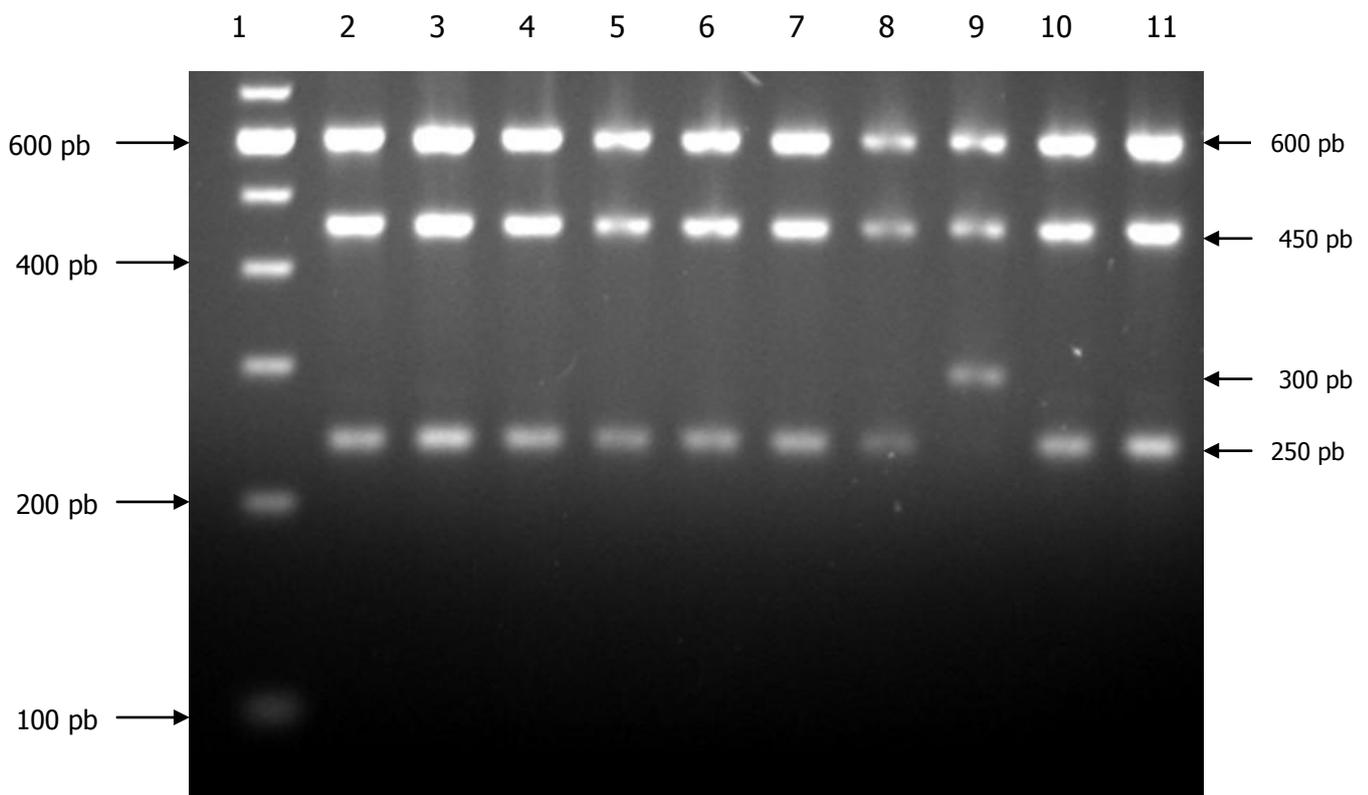


Figura 26. Patrones electroforéticos obtenidos por la digestión con HaeIII. Carril 1 marcador 100 pb. Patrón 1 carriles 2 al 8 cepas de frutas y hortalizas, carriles 10 y 11 cepas de origen clínico de Aguascalientes, Ags., carril 9 cepa de agua de riego de Hermosillo, Son.

5.3.2.6. PCR-Ribotipificación.

La detección del polimorfismo correspondiente al gen rDNA 16S permitió diferenciar 13 perfiles diferentes, denominados de RE-1 a RE-13 (tabla 28), que incluyen entre tres y seis bandas amplificadas y con tamaños comprendidos entre 50 y 930 pares de bases. El análisis conjunto de los distintos ribotipos reveló que no existen fragmentos en común entre los mismos. Ahora bien algunos perfiles mostraban varias bandas comunes, por ejemplo RE-1 y RE-2; RE-7 y RE-8. Por otra parte la cepa de *L. monocytogenes* ATCC 19114 mostró un ribotipo distinto a *L. seeligeri* y *L. innocua*.

Tabla28. Ribotipos de *Listeria monocytogenes*.

Enzima de restricción	RE	Número de cepas	%
HhaI	RE-1	36	80
	RE-2	18	40
	RE-3	7	15.5
AluI	RE-4	33	73
	RE-5	6	13.3
	RE-6	25	55.5
MboI	RE-7	29	64.4
	RE-8	11	24.4
RsaI	RE-9	3	6.6
	RE-10	24	53.3
	RE-11	27	60
HaeIII	RE-12	17	37.7
	RE-13	10	22.2

En cuanto la distribución de cepas se encontró que el ribotipo mayoritario fue RE-1, representado por 36 cepas (80%), seguido de RE-4 con 33 cepas (70%), RE-7, con 29 (64.4%), RE-11 con 27 (60%), RE-6 con 25 (55.5%), RE-10 por 24 (53.3%), RE-2 por 18 (40%), RE-12 por 17 (37.7%), RE-8 por 11 (24.4%), RE-13 por 10 (22.2%), RE-3 por 7 (15%), RE-5 por 6 (13.3%) y RE-9 con 3 (6.6%). Las cepas de *L. innocua* y *L. seeligeri* presentaron sólo un ribotipo diferente a las de *L. monocytogenes*.

5.3.3 Análisis de los datos.

Se valoraron en la ribotipificación de cada endonucleasa ensayada y la tipificación fenotípica, los criterios que definen la validez del procedimiento para su utilización en diferenciación intraespecie como: capacidad de tipificación poder e índice de discriminación, reproducibilidad y facilidad de interpretación de perfiles de bandas en el análisis de las cepas de *L. monocytogenes* (tabla 29). En los métodos genéticos, teóricamente, la reproducibilidad debería ser total, pero en la práctica en el caso de la técnica basada en la restricción enzimática está en relación con la calidad y manejo de la enzima, lo que puede llevar a frecuentes digestiones incompletas o parciales y en la técnica basada en amplificación por PCR en la especificidad de los iniciadores y las condiciones de amplificación empleadas.

Tabla 29. Valoración de la técnica de ribotipificación como método de tipificación de *L. monocytogenes*.

Propiedad valorada	Restricción enzimática					Tipificación fenotípica
	HhaI	AluI	MboI	RsaI	HaeIII	
Capacidad de tipificación	100%	100%	100%	100%	100%	100%
Poder de discriminación						
No. de tipos	3	3	2	3	2	5
ID	0.89	0.76	0.65	0.85	0.63	0.59
Reproducibilidad	+++	+++	+++	+++	+++	+++
Facilidad de interpretación	+++	+++	+++	+++	+++	++
Comparación de perfiles de diferentes experimentos	+++	+++	+++	+++	+++	+

ID: índice de discriminación; +++: bueno; ++: regular; +: deficiente

El poder de discriminación varía según la enzima de restricción empleada, así con HhaI, AluI y HaeIII se obtuvieron 3 ribotipos diferentes, pero el ID fue

ligeramente superior en Hhal, debido a que algunos tipos estaban representados por una sola cepa. En todos los casos los resultados son reproducibles en cuanto a la adscripción de las cepas a diferentes tipos y en la definición de perfiles.

5.3.3.1 Utilización de la ribotipificación para trazar un dendrograma de relación genética.

Con la matriz de datos binaria construida a partir de la presencia y ausencia de los marcadores y con la ayuda del software antes mencionado se construyó un dendrograma, el cual nos permite observar gráficamente la relación existente entre cada una de las cepas estudiadas (Figura 27).

En este dendrograma se obtuvieron 7 grupos o ramas principales con valores de similitud pareada que van desde 0.260 hasta 1 (Figura 27). Las dos primeras ramas (A y B) agrupan a la mayor parte de las cepas con un índice de similitud pareada de 1 en las cepas presentes en cada grupo y de 0.965 entre cada grupo. El grupo A asocia el 50% de las cepas (21 de 41) de orígenes diversos junto con una de las cepas de referencia (ATCC 2540), mientras que el grupo B asocia al 34% (14 de 41) de las cepas analizadas donde se encuentran 2 cepas de referencia (ATCC 43249 y ATCC19114).

El grupo C está integrado por 2 cepas de vegetales, mientras que el D está integrado por la cepa de peces con un índice de similitud pareada de 0.962 entre cada grupo, y un valor de 0.873 con respecto a los grupos A y B. Los grupos E, F y G están integrados por una cepa cada uno con valores de similitud pareada de 0.841, 0.760 y 0.260 respectivamente. Las orígenes para cada uno de estos grupos son completamente variados, para el grupo E, la cepa de referencia de *L. innocua* (ATCC 33090) para el grupo F, una cepa de jugos, para el grupo G la cepa de *L. seeligeri* proveniente de agua de riego.

Por otro lado, la prueba de Mantel, obtenida a partir de la matriz de similitud de DICE y la matriz cofenética, mostró un valor de $ccc(r) = 0.9860$ y una probabilidad

(p)=0.0004 indicándonos que el dendrograma obtenido es una buena representación de la matriz de datos original.

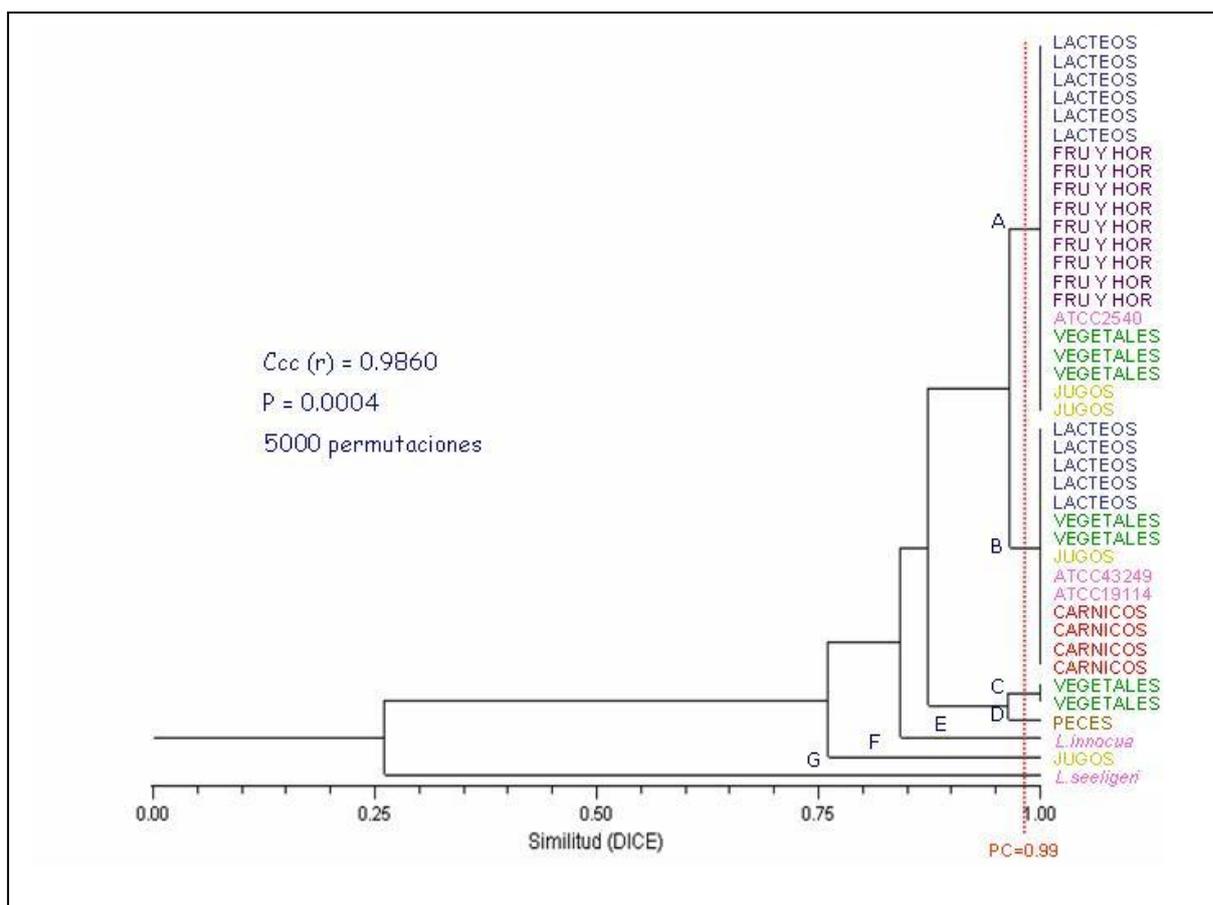


Figura 27. Dendrograma construido con la matriz obtenida a partir de los patrones de digestión enzimática que representa la similitud existente entre las cepas de *L. monocytogenes*, con respecto a los fragmentos de restricción obtenidos. La línea punteada representa el valor del punto de corte (PC), la r (ccc), después de 5000 permutaciones. El dendrograma se construyó por el método de agrupamiento UPGMA.

Sin embargo, una de las cepas de *L. monocytogenes* obtenida a partir de jugos de naranja tiene un valor de similitud menor que *L. innocua*, siendo que esta última, aunque muy estrechamente relacionada, es una especie completamente diferente de *L. monocytogenes*, debido a que no se podía distinguir a ésta cepa, se

construyó una nueva matriz de datos binarios incluyendo además las pruebas bioquímicas realizadas para la identificación de especie. Obteniéndose, de esta manera un nuevo dendrograma (Figura 28) que agrupa a las cepas nuevamente en 7 grupos con valores de similitud pareada muy similares entre los grupos A, B, C y D pero ahora, *L. innocua* se encuentra con un valor de similitud pareada menor al resto de las cepas de *L. monocytogenes* (0.8717), mientras que la cepa proveniente de jugos de naranja ahora se encuentra con un valor de similitud pareada mayor (0.9007).

Asimismo, del grupo B, una cepa de origen cárnico se separa ligeramente del grupo, debido a que esta cepa mostró una fermentación de la D-xilosa que no se observó en ninguna otra cepa de su grupo.

Con estos mismos datos se construyó otro dendrograma que agrupa a *L. innocua* como grupo externo y en el cual se obtuvieron los mismos resultados que en el dendrograma anterior (Figura 29)

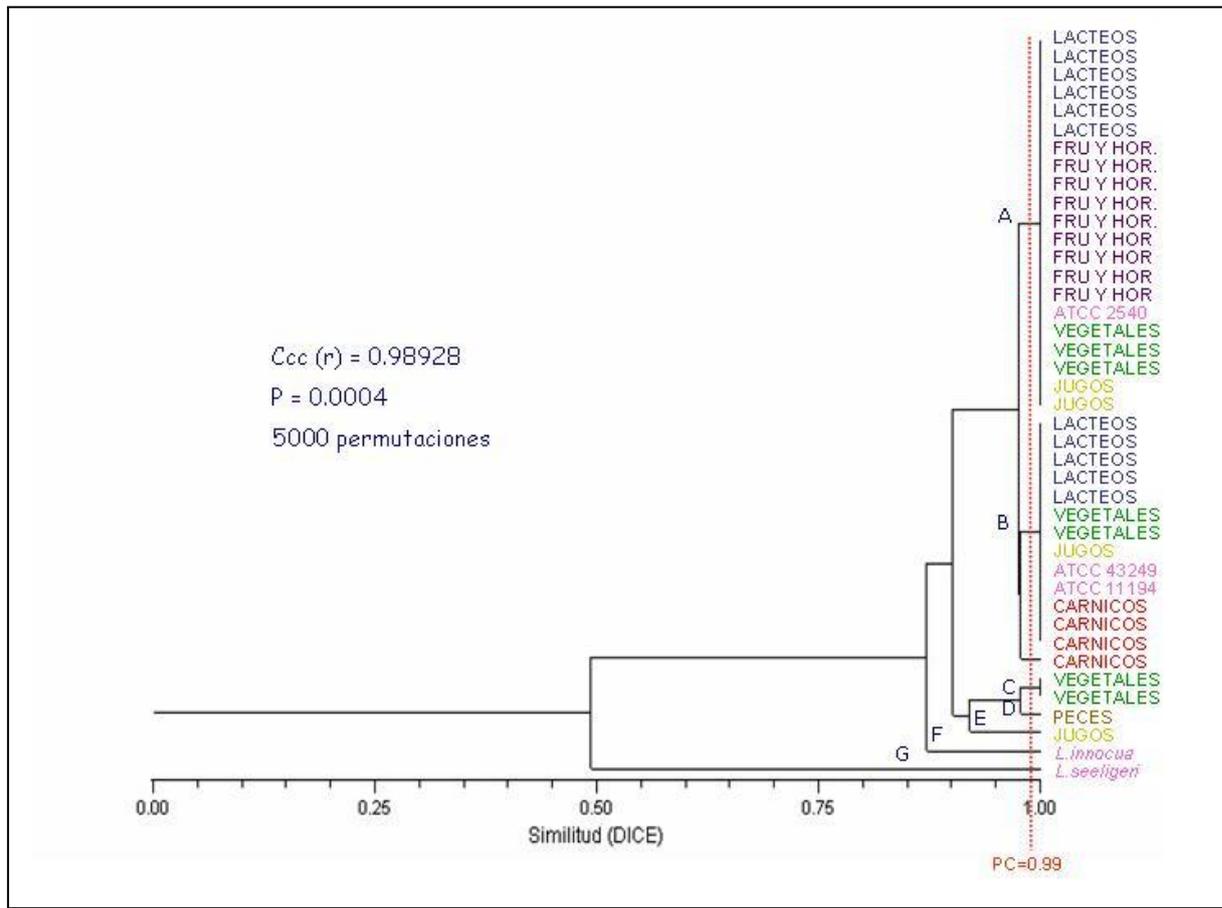


Figura 28. Dendrograma construido con la matriz obtenida a partir de los patrones de digestión enzimática y pruebas bioquímicas, que representa la similitud existente entre las cepas de *L. monocytogenes* con respecto al origen de aislamiento. La línea punteada representa el punto de corte (PC), la r (ccc) después de 5000 permutaciones. El dendrograma se construyó por el método de agrupamiento de UPGMA.

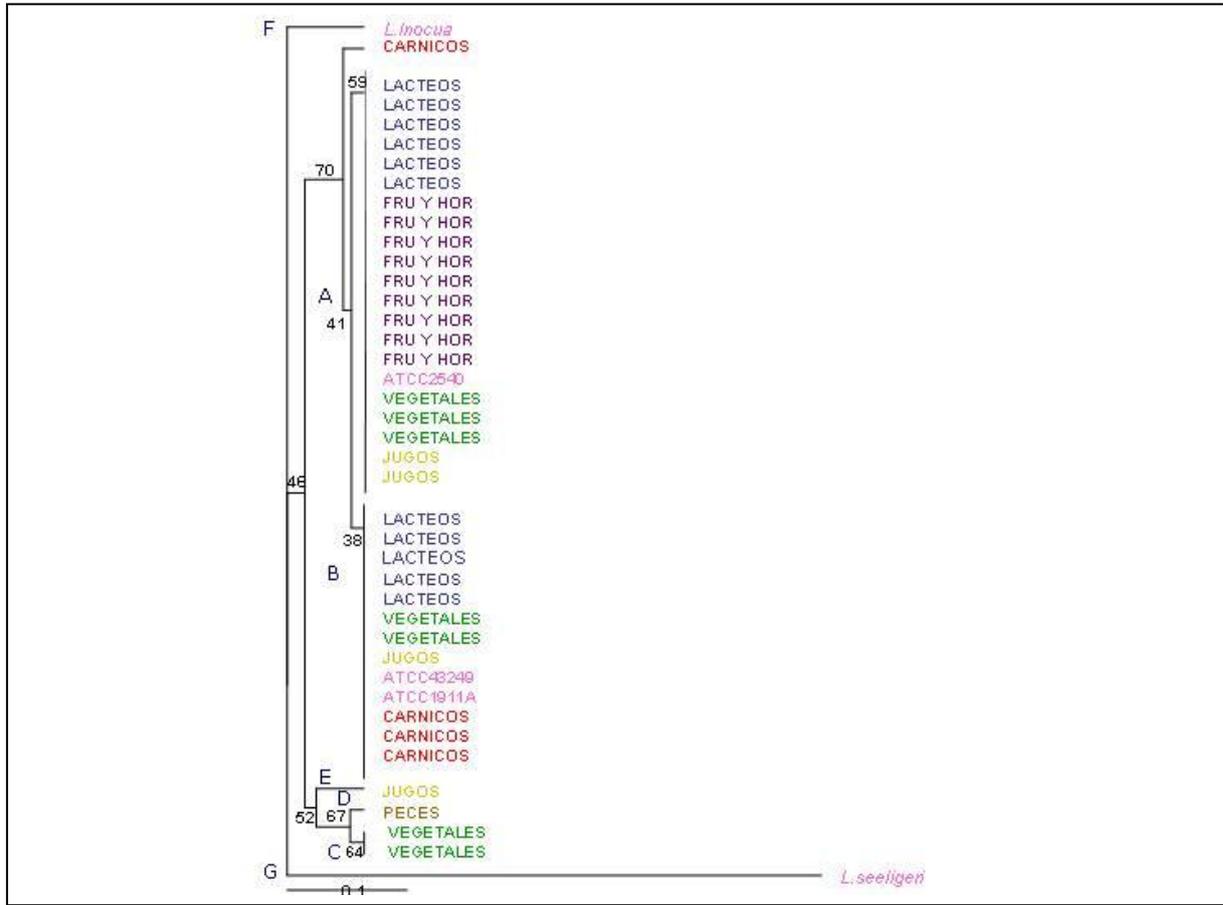


Figura 29. Dendrograma construido a partir del matriz de datos binarios obtenida a partir de los patrones de digestión enzimática y pruebas bioquímicas que representan la similitud existente entre cada una de las cepas de *L. monocytogenes* con respecto al origen de aislamiento y tomando en cuenta como grupo externo la cepa de *L. innocua*.

DISCUSIÓN

6. DISCUSIÓN

El objetivo central de este estudio fue valorar y optimizar varias técnicas fenotípicas y moleculares como métodos de tipificación, con la finalidad de hacer una propuesta de un método de tipificación genética de *L. monocytogenes* complementario o alternativo a la serotipificación/biotipificación. Un problema adicional es la resistencia a antibióticos, ya que la selección de microorganismos multirresistentes se ha relacionado con el aumento del uso de determinados antibióticos tanto en la práctica clínica como veterinaria y agricultura.

En México no existen casos registrados sobre la listeriosis y mucho menos si estos han sido causados por la intoxicación con alimentos, a pesar de que se ha reportado la presencia de alimentos contaminados con *Listeria monocytogenes* en alimentos que son importados a México. (Moncada, 2002).

La valoración de la resistencia hacia antimicrobianos se ha descrito como un método de tipificación útil en combinación con otros marcadores, ahora bien, ha de ser utilizado como marcador epidemiológico secundario ya que las resistencias no son caracteres estables pues es muy frecuente que puedan estar localizadas en plásmidos y transposones que pueden codificar para enzimas que inactivan o son competidores del sitio blanco de determinados antibióticos confiriendo resistencia de los mismos (Miró *et al.*, 1996). Hasta la fecha, no se han reportado cepas de *L. monocytogenes* con resistencias a penicilinas en aislamientos clínicos (Charpenter y Courvalin, 1999).

Algunos autores sugieren una cierta relación entre el comportamiento de *L. monocytogenes* frente a algunos antimicrobianos y el serotipo o biotipo y en consecuencia un patrón de sensibilidad predecible para la mayoría de sus aislamientos (Charpentier *et al.*, 1994, Facinelli *et al.*, 1993). Según esta proposición las cepas de *L. monocytogenes* biotipo 4/serotipo 2a/1b serían resistentes a la ampicilina, cefalotina y carbencilina, pero sensibles a los aminoglucósidos, tetraciclinas y cloranfenicol, mientras que las cepas ambientales además mostrarían sensibilidad a ampicilina y cefalotina (Charpentier y Courvalin, 1999). Sin embargo para otros autores esta relación sería poco consistente y se mostraban críticos con esta afirmación (Charpentier *et al.*, 1995).

Los resultados de este trabajo permitieron realizar las siguientes observaciones:

- 1) Todas las cepas resultaron sensibles al antibiótico β -lactámico: Cefotaxima, así como al aminoglucósido gentamicina (93.12%). En nuestro estudio hemos encontrado resistencia a otros antimicrobianos β -lactámicos: Ampicilina (Am) 60.46%, Cefalotina (Cf) 83.72%, Ceftazidina (Caz) 46.51%, Penicilina (Pe) 72.09% y Cefuroxima (Cxm) 83.73%, Dicloxacilina (Dc) 98.38%, a la quinolona: Pefloxacima (Pef) 74.41%; macrólido: Eritromicina (E) 32.55%; Tetraciclina (Te) 16.27% y al quimioterapéutico Trimetoprim-Sulfametoxazol (Sxt) 32.55%.
Tabla 14.
- 2) Las concentraciones mínimas inhibitorias (CMI) de los aislamientos a distintos antimicrobianos, muestran que del 9 al 14% de las cepas aisladas presentaron una multiresistencia hacia: Am, E, Te, Dc y Stx, este perfil de resistencia se encontró en los aislamientos provenientes de leche correspondientes al serotipo O:1, éste perfil incluye resistencia hacia los antimicrobianos de uso en el tratamiento de listeriosis clínica.

En las dos últimas décadas han tenido lugar un gran número de brotes de listeriosis asociados al consumo de alimentos, un hecho significativo de muchos brotes es el alto índice de mortalidad que llevan asociados. Los alimentos implicados en los brotes de listeriosis, incluyen productos pertenecientes a todos los grupos principales de alimentos: lácteos, carne, vegetales, y pescado/marisco (McLauchlin, 1990). Aunado a la resistencia de antimicrobianos que va presentado y la deficiencia en el tratamiento empírico de las infecciones en las que no se sospecha la participación de *Listeria* podría ser la causa adicional del incremento de la mortalidad. *Listeria* spp puede adquirir genes que le confieren resistencia antibiótica procedentes de *Enterococcus* sp y *Streptococcus* sp, microorganismos que fueron aislados frecuentemente en las muestras analizadas y que pueden favorecer la selección de las cepas resistentes (Charpentier y Courvalin, 1999).

Con excepción de las tetraciclinas la proporción de resistencia hacia los antimicrobianos de aislamientos clínicos, ambientales o de alimentos de *Listeria* spp es relativamente baja. A partir del aislamiento en Francia de una cepa clínica de *L. monocytogenes* multirresistente a los antibióticos (Poyart-Salmeron *et al.*, 1990), se han registrado cepas de *Listeria* spp aislada de diferentes fuentes resistente a uno o más antimicrobianos (Charpentier *et al.*, 1995). La multirresistencia está asociada a elementos génicos móviles provenientes de los géneros *Enterococcus*, *Streptococcus*, *Staphylococcus* (Charpentier *et al.*, 1994, Facinelli *et al.*, 1993).

La resistencia hacia STX detectada en los aislamientos en leche en el presente trabajo, es de llamar la atención en virtud de que es usado en el tratamiento de listeriosis cuando el paciente es alérgico al tratamiento con penicilinas (Charpentier *et al.*, 1995), además el uso indiscriminado de sulfas para el tratamiento de ciertas afecciones como la mastitis en el ganado vacuno puede favorecer la prevalencia de cepas resistentes lo que puede traer consecuencias importantes en el tratamiento de la listeriosis (Gitter *et al.*, 1980). Desde que se ha asociado a las infecciones humanas con el consumo de alimentos, es de capital importancia determinar la sensibilidad y resistencia hacia los antimicrobianos de los aislados de *Listeria* spp a partir de alimentos y reconsiderar el uso indiscriminado de los antibióticos como suplementos alimentarios en la formulación de piensos destinados al ganado de pie o de ordeña.

Aunque la listeriosis se puede considerar una enfermedad rara, sigue causando una importante mortalidad en los países industrializados. La enfermedad se observa cada vez más en personas sanas de edad avanzada, en donde los alimentos son la principal fuente de contaminación (Pimmer *et al.*, 1992. Farber y Peterkin, 1991).

Para minimizar los potenciales problemas de salud pública que puedan aparecer por la presencia y crecimiento de *L. monocytogenes*, es esencial que se apliquen las consideraciones basadas en el análisis de riesgos y control de puntos críticos dado que en muchos casos, sus efectos sobre la supervivencia de los

microorganismos respecto a la seguridad y alteración del alimento todavía no han sido determinados.

En nuestro estudio no hemos valorado marcadores indirectos de la virulencia como: zinc-dependencia, autoaglutinación, fijación de rojo congo y cristal violeta, formación de biopelículas, etc., pero relacionamos la expresión de ciertos factores de virulencia con las proteínas membranales de células HEP-2 usadas como modelo de estudio.

La capacidad de un microorganismo para adherirse a la superficie de la célula huésped es un mecanismo indispensable para la colonización y para dar inicio al daño tisular. Se sabe que la capacidad de *Escherichia coli* (EPEC) para adherirse íntimamente a la mucosa intestinal y a la destrucción de las microvellosidades, lesión denominada adherencia y esfacelamiento (A/E), es una característica de la patogenicidad de las EPEC, la expresión de adhesinas como el *pilus* formador de rizos (BPF), la proteína de membrana externa llamada intimina y la capacidad de inducir cambios en el citoesqueleto de células HEP-2 son factores de virulencia que pueden ser demostrados en el laboratorio por los métodos antes mencionados.

La adherencia de las bacterias patógenas a sus células o tejidos huéspedes es un paso clave en la patogenicidad. En el caso de *L. monocytogenes* este es el primer paso para producir la enfermedad (Yurdusev, 2001).

El uso de los cultivos celulares para el estudio de la adherencia e invasión bacteriana se ha considerado como un gran avance para entender la patogénesis de algunos organismos (Robins-Browned y Bennett-Wood, 1992), por esta razón, en este trabajo se llevaron a cabo estudios de adherencia de las 45 cepas de *L. monocytogenes* aisladas del Distrito Federal y de los estados de Sonora y Aguascalientes, utilizando células HEP-2 prefijadas según el método descrito por Zepeda-López y González-Lugo (1995).

Se ha reportado que la adherencia de *Listeria monocytogenes* a células CaCo-2 se debe a una proteína de superficie de 104-kDa denominada proteína de adhesión de *Listeria* (LAP) y que la expresión de esta proteína es diferente a diversas temperaturas y fase de crecimiento, demostrando que el aumento en la expresión de la LAP no incrementa la adhesión, evidenciando así que la proteína LAP por si misma no es suficiente para iniciar la unión a la línea celular Caco-2 (Santiago *et al.*, 1999).

Jaradat y Bhunia demostraron que medios con una composición rica en nutrientes y con alta concentración de glucosa suprimen la expresión de la LAP, lo cual posiblemente se debe a los cambios en el pH del medio durante el crecimiento. (Jaradat. y Bhunia, 2002). Debido a las consideraciones anteriores, el método de adherencia fue modificado con el fin de minimizar los factores que pudieran alterar la expresión de la proteína LAP. Para tal motivo nosotros probamos distintos medios de cultivo para las bacterias, y se encontró que la formulación de Luria-Bertani proporcionó porcentajes de adherencia mayores, lo cual sugiere que la expresión de la LAP también es dependiente del pH en la línea celular HEP-2, por este motivo, se utilizó el medio de Luria-Bertani como medio de crecimiento bacteriano en los ensayos de adherencia.

La cinética de adherencia se realizó en cuatro diferentes tiempos de incubación con el fin de observar el comportamiento de la adherencia respecto a esta variable, observándose en la mayoría de las cepas que la cantidad de bacterias adheridas aumenta con respecto al tiempo; no obstante, se encontraron algunas cepas en las cuales los porcentajes de adherencia se estabilizan a partir de los 120 minutos, lo cual indica que se ha alcanzado la saturación de los receptores para adhesinas bacterianas en la célula eucariótica. Estas apreciaciones fueron corroboradas mediante el análisis de varianza realizado con el software SigmaStat, el cual determinó que existen diferencias significativas entre los tres factores analizados: Cepa, Tiempo y Adherencia (variable

respuesta), es decir, que la adherencia presenta variaciones dependientes de la cepa y del tiempo.

También se observó que la mayoría de las cepas comienzan a adherirse en tiempos cortos de incubación, a los 30 minutos se alcanzan niveles considerables de bacterias adheridas a las células; sin embargo, no podemos asegurar que este sea el tiempo mínimo necesario para que se inicie el proceso de adherencia, ya que no se probaron tiempos de incubación menores. Los resultados obtenidos sugieren que a los 30 minutos de incubación se ha producido el contacto adhesina-receptor y se han expresado los factores proteicos participantes en el proceso de adherencia de *L. monocytogenes*.

Por otro lado, y con base en las observaciones realizadas, se establecieron parámetros con el fin de evaluar el grado de adherencia de acuerdo a los porcentajes observados, así, las cepas fueron clasificadas en no adherentes, poco, medianamente y muy adherentes. De esta manera se determinó que el 88.81 % (40/45) de las cepas son adherentes ya que presentaron arriba del 50% de adherencia después de 180 minutos de incubación y que en su mayoría (cerca del 65%) son muy adherentes ya que alcanzaron arriba del 80%, mientras que solamente el 30% de las cepas son medianamente adherentes y únicamente el 7.5% son poco adherentes.

Respecto a los patrones de adherencia, es importante señalar que se observaron tres distintos patrones. El 28.8% (13/45) de las cepas presentaron patrón localizado, el 28.8% (13/45) agregativo y el 35.5% (16/45) difuso; como se observa, ningún patrón de adherencia fue predominante. Estos tres patrones se han descrito para *Escherichia coli* y se han relacionado con la capacidad de producir diarrea. Se demostró que las cepas con adherencia localizada presentan el plásmido de 60 MDa denominado EAF (factor de adherencia de *E. coli*) y que este se relaciona con la producción de lesiones histopatológicas en intestino y por

lo tanto la producción de diarrea. La patogenicidad de las células de *E. coli* con adherencia difusa sigue siendo controversial (Sobieszczanska y Gryko., 2001).

Cabe señalar que para los tres patrones, más del 50% de las cepas pertenecientes a cada patrón fueron muy adherentes, es decir, presentan 80% o más de adherencia (Tabla 25). La observación de estos tres patrones de adherencia sugiere que las adhesinas de las cepas de *L. monocytogenes* reconocen distintos receptores localizados en la superficie de las células HEp-2.

Caso especial resultaron las cepas 22 y 23 provenientes de lácteos y cárnicos respectivamente, las cuales presentaron una actividad vacuolizante bajo estas condiciones experimentales. Dichas cepas inducen la formación de vacuolas en todo el citoplasma de la célula eucariota, esta actividad se presentó a partir de los 30 minutos de incubación observándose aún la estructura celular, transcurridos 60 minutos de incubación se comenzó a observar daño en la membrana celular y abundante presencia de vacuolas dentro de las cuales se observa el bacilo; al cabo de 180 minutos el citoplasma se encontró destruido totalmente, por lo cual no se determinó el porcentaje y patrón de adherencia de estas cepas. Se realizó la búsqueda bibliográfica pertinente sin encontrar reportes de esta actividad para *L. monocytogenes*. Por lo tanto, se sugiere para trabajos posteriores la investigación de esta actividad mediante la purificación y caracterización de la molécula responsable de la formación de estas vacuolas.

Otro parámetro observado en los ensayos fue la adherencia relativa, la cual fue variable para las 45 cepas estudiadas. Se encontraron algunas cepas con adherencias relativas de (+) ó 1 a 5 bacterias por célula; no obstante, en la mayoría de las cepas por lo general se encontraron adherencias relativas de (++) ó (+++), es decir, de 6 a 15 bacterias adheridas por célula. El número de bacterias adheridas a la célula no se relaciona propiamente con la virulencia bacteriana pero una mayor cantidad de bacterias adheridas a una célula sugiere que algunas

cepas presentan una mayor cantidad de adhesinas para células HEp-2, aumentando la probabilidad de que la bacteria produzca daño.

Además de analizar el comportamiento general de la adherencia, el análisis estadístico incluyó en sus resultados haciendo comparaciones entre cepas para cada uno de los cuatro tiempos, encontrándose que seis pares de cepas no presentaron diferencia significativa en ninguno de los tiempos, sin embargo, los patrones e índices de adherencia son distintos entre cada par de cepas, demostrando nuevamente, que el comportamiento de la adherencia es distinto para cada una de las 45 cepas analizadas.

Se ha demostrado que el método de Zepeda y González posee el 100% de sensibilidad y especificidad comparado con los métodos de adherencia que utilizan células vivas, además de dar información acerca del papel que juegan la bacteria y la célula en el proceso de adherencia (Zepeda-López y González-Lugo, 1995).

Debido a que los experimentos fueron realizados por triplicado, se pudo observar que los porcentajes de adherencia variaron ligeramente entre cada ensayo, esto se debe a que los ensayos de la bacteria hacia cultivos celulares está sujeto a algunas variables que pueden modificar los resultados, como son la fuerza aplicada al realizar los lavados a la monocapa después de haber transcurrido el tiempo de incubación, la concentración bacteriana, la temperatura y tiempo de incubación, el estado de las células e incluso la calidad de la tinción. Sin embargo, se encontró una gran ventaja de este método sobre los métodos con células vivas, ya que permite aplazar eventos que en células vivas quizás resultaría difícil de observar, por ejemplo, la formación de vacuolas que se observó en células fijadas desde los 30 minutos de incubación, en un modelo con células vivas tal vez esta actividad vacuolizante destruiría a la célula en un menor tiempo impidiendo la apreciación de esta actividad.

En el presente estudio se buscaba también establecer si existe una correlación entre el origen de la cepa y su capacidad de adherencia, encontrándose que estos factores son independientes ya que se observaron índices de adherencia variables entre cada grupo de alimentos (Figuras 19 y 20). Las cepas provenientes de jugos de frutas naturales mostraron porcentajes de que van desde 57 hasta 88% y se encontraron los tres patrones de adherencia sin ser ninguno predominante. En el caso de las cepas provenientes de hortalizas el 76% de las cepas presentaron porcentajes superiores al 85%, lo cual resulta interesante ya que los vegetales a partir de los cuales se realizó el aislamiento recibieron un tratamiento previo de escaldado, esto sugiere que este tratamiento pudo haber seleccionado a las cepas más adherentes o que las cepas de *L. monocytogenes* adherentes presentes en estos alimentos son resistentes a cambios drásticos de temperatura. Respecto a las cepas provenientes de lácteos, previamente pasteurizados, se encontraron cepas con porcentajes de adherencia desde 13 hasta 96% y sin ningún patrón sobresaliente.

Finalmente, podemos dejar abiertas algunas interrogantes para estudios posteriores acerca del proceso infeccioso de *L. monocytogenes* en estas 45 cepas, tales como la capacidad de adherencia a líneas celulares de otros orígenes, cual es la relación entre el grado de adherencia y la capacidad de invasividad de las cepas, además de la purificación y caracterización de la posible molécula causante de la actividad vacuolizante en las cepas 22 y 23 y la realización de una cinética de citotoxicidad para estas últimas.

Recientemente, se ha introducido para la diferenciación de cepas y como herramienta de trabajo en “Epidemiología Molecular” la detección del polimorfismo de la región espaciadora de los genes RNA ribosomales 16S y 23S, mediante su amplificación por PCR y utilizando iniciadores complementarios a secuencias conservadas de cada gen (Barry *et al.*, 1991), la amplificación polimórfica al azar del DNA (RAPD), PCR por iniciadores arbitrarios (AP-PCR) y Ribotipificación mediante PCR han mostrado ser las más eficientes (Van Belkum, 1994).

El uso del rDNA 16S desarrollada inicialmente por Woese (1987), ha sido considerado uno de los mejores métodos para establecer relaciones filogenéticas entre las bacterias (Ludwing y Schleifer 1999). Estos genes se encuentran presentes en todas las bacterias y a diferencia de las demás, estos pueden encontrarse en más de 1 copia por célula. Además, el diseño de iniciadores universales dirigidos al gen rDNA 16S para su amplificación mediante PCR y con el análisis de los diferentes patrones enzimáticos generados como marcadores moleculares, han facilitado el estudio filogenético incluso en organismos de una misma especie (Relman, 1993).

Los resultados de este trabajo han demostrado el potencial como marcador epidemiológico en *L. monocytogenes* de la técnica denominada “ribotipificación”, con la que se revela la divergencia de las secuencias internas y adyacentes a los loci *rrn* (que incluyen los genes que codifican al rRNA).

En la ribotipificación, la elección de la endonucleasa de restricción adecuada es un paso crítico para intentar diferenciar tipos a nivel intraespecie e interespecie y además puede permitir subdividir tipos fenotípicos como serotipo y biotipo, de hecho el poder de discriminación del método dependerá de la endonucleasa utilizada. Además, es particularmente importante que la endonucleasa elegida genere perfiles de fácil interpretación en cuanto al número y tamaño de los fragmentos y que sean reproducibles.

La determinación de los patrones de digestión enzimática fueron hechos con las enzimas: Alu I, Mbo I, Hha I, Rsa I y Hae III debido a que en el software empleado mostraron una mayor diversidad en los patrones enzimáticos obtenidos con las secuencias obtenidas del Genbank. A pesar de que las secuencias que codifican para estos genes son altamente conservadas, los patrones de digestión mostraron pequeñas diferencias en algunas de las cepas, observándose que 2 cepas de vegetales, la cepa de origen clínico y una cepa de jugos; al igual que la cepa de referencia de *L. innocua* muestran pequeñas diferencias en las patrones de digestión con AluI y HhaI, mientras que en el caso de MboI, mostraron el mismo patrón a las demás cepas de *L. monocytogenes*.

Por otro lado, *L. seeligeri* fue la cepa que presentó patrones completamente diferentes tanto con la enzima Alul y Hhal, mientras que el patrón generado con Mbol fue muy similar al de las demás cepas, variando solamente en 7 pb aproximadamente en la banda de 300 pb que mostraron las demás cepas.

Este análisis molecular del rDNA 16S basado en PCR ha sido ampliamente utilizado para identificar y tipificar diferentes grupos bacterianos entre los que destacan *Clostridium*, *Mycobacterium*, *Streptococcus*, *Bacillus* (Vaneechoutte *et al.*, 1996; Vaneechoutte *et al.*, 1993; Jayarao *et al.*, 1992) al igual que *L. monocytogenes* (Vaneechoutte *et al.*, 1998; Sontakke y Faber, 1995; Franciosa *et al.*, 2001).

En este trabajo los perfiles de restricción con las enzimas Alul, Mbol, Hhal, RsaI y HaeIII, permitieron diferenciar las cepas pertenecientes a distintos serotipos y parece existir una buena correlación entre ciertos serotipos y biotipos. Los ribotipos RE-7 de las cepas O:1 no fueron encontrados en las cepas del serotipo O:4. En cuanto a la relación biotipo-serotipo, se encontró que alguno RE-1 estaban representados por cepas de varios biotipos e inversamente cepas del biotipo 2 se diferenciaron en cuatro ribotipos y cepas del biotipo 1 en tres ribotipos.

La combinación de los resultados patrones obtenidos con las enzimas de restricción (RE) aportaron un dendrograma que muestra una alta relación entre la mayoría de las cepas, las cuales están relacionadas en dos grupos con un índice de similitud del 95% (Figura 28).

En estos grupos no se aprecia una relación directa entre la cepa y el origen del alimento lo que sugiere que a pesar de que el alimento es el mismo la contaminación puede provenir de diferentes fuentes, por ejemplo, en el caso de lácteos si bien la contaminación no es de origen éste puede deberse a una contaminación cruzada obtenida en la planta procesadora. En estas plantas se ha recuperado a *Listeria* en un 0.5 a 17.5% (Charlton *et al.*, 1990), o bien por una sanitización deficiente o incluso por la combinación con leche no pasteurizada (Cotton y White, 1992). Además existen algunos alimentos como son los vegetales, otro grupo relativamente más heterogéneo, que sufren todo un proceso

desde que son cultivados, transportados y manipulados hasta que llegan al consumidor, en donde pudieron haber adquirido la contaminación por *L. monocytogenes*.

Sin embargo, observamos que las cepas provenientes de Hermosillo Sonora se relacionan todas ellas en el grupo B, estas cepas fueron donadas por el Centro de Investigación de Alimentos de esa Región y fueron obtenidos de diferentes cultivos en la misma época del año y de una misma hectárea, lo que sugiere que la contaminación puede ser propia del suelo o bien a alguna práctica sanitaria inapropiada como puede ser el uso de aguas residuales para el riego de dichos cultivos.

Tal como se esperaba, las cepas de *L. innocua* y *L. seeligeri* presentaron mayor variación en el patrón de bandas con respecto al resto de las cepas de *L. monocytogenes* sin embargo una de las cepas proveniente de jugos (Grupo D), mostró una variedad menor con valores de similitud menor al resto de las cepas de *L. monocytogenes* incluso menor que *L. innocua*.

La variación en el patrón de bandas presente en esta cepa puede deberse a la adaptación del microorganismo a las condiciones de stress que se encuentran en el jugo de naranja tal como el pH, aunque con estas modificaciones, no es posible que dicha cepa este más distanciada del resto de las cepas que *L. innocua* ya que aunque son las dos especies más estrechamente relacionadas son completamente diferentes, por ello se construyó un segundo dendrograma que incluye las pruebas bioquímicas obtenidas con cada cepa.

Este segundo dendrograma (Figura 28) relaciona a la cepas en la misma forma que el primero solo que aquí se observa a la cepa de jugos con un índice de similitud más cercano al resto de las cepas de *L. monocytogenes*. De hecho también se observa un índice de similitud muy cercano a *L. innocua*, lo cual concuerda con los estudios reportados por Czajka *et al* (1992) en los cuales se menciona la estrecha relación existente entre estas dos especies en donde la

secuencia nucleotídica varía únicamente en dos pares de bases ubicados en la región V9 del gen (Czajka *et al.*, 1992). Por lo que nuestros resultados soportan aun más esta estrecha relación.

A pesar de que varios registros señalan que la región del rDNA 16S es altamente conservada, el presente trabajo aporta importantes pruebas que evidencian la existencia de algunas diferencias en dicho gen, esto podría reforzarse si en un futuro se hicieran estudios de los genes 23S y 5S así como de las regiones espaciadoras que existen entre ellos.

Al hacer el análisis estadístico del polimorfismo genético del gen 16S junto con las pruebas bioquímicas, observamos que las cepas se ordenan en 7 grupos, en dos de los cuales (A y B) se encuentran la mayor parte de las cepas de *L. monocytogenes*, y los cuales están muy estrechamente relacionados uno del otro.

En el grupo A se puede apreciar que las cepas obtenidas de frutas y hortalizas obtenidas en Sonora son un grupo con muy poca variación en el patrón de bandas, a pesar de que fueron aisladas de diferentes cultivos, estos se encontraban en una misma porción de suelo y fueron aislados en la misma época, por lo que la probable contaminación puede que sea propia del suelo. De igual forma las cepas obtenidas de cárnicos son un grupo con poca variación, sin embargo, en este caso una de ellas a pesar de presentar los mismos patrones electroforéticos, está agrupada fuera del grupo B debido a que fue la única cepa capaz de fermentar la D-xilosa.

En el caso de las cepas provenientes de lácteos, agrupados en A y B, presentaron mayor variación en el patrón de bandas. Los productos lácteos pueden ser contaminados por diversos factores, ya sea que la contaminación sea de origen o bien una contaminación cruzada, proveniente de distintas fuentes involucradas en su procesamiento tal como las plantas pasteurizadoras, en la que se ha recuperado a *L. monocytogenes* hasta en un 17.5% (Carlton *et al.*, 1990), por la formación de aerosoles (Spurlock y Zottola 1991) o bien por prácticas

sanitarias deficientes (Cotton y White, 1992); lo que da como resultado la incorporación de cepas de diferentes ambientes a este tipo de productos.

Los aislados obtenidos de vegetales y de jugos de naranja fueron las cepas con mayor variación en el patrón de bandas, observando su presencia en varios grupos. La presencia de *L. monocytogenes* en este tipo de alimentos puede ser explicada por todo el proceso que sufren estos alimentos desde que son cultivados, seleccionados, transportados y manipulados, hasta que llegan al consumidor, además de la capacidad de éste microorganismo de sobrevivir a en condiciones de pH bajos para el caso de los jugos y de refrigeración, y concentración de sales para los vegetales congelados.

Sin embargo, a pesar de que se observa una mayor variación en estas muestras, en el caso de las cepas de jugos, las dos cepas del grupo A pertenecen a la misma zona de muestreo, en donde la contaminación puede provenir de origen o bien puede ser producto de una contaminación cruzada ocasionada probablemente a las deficientes prácticas sanitarias observadas en el momento del muestreo, mientras que las dos cepas restantes pertenecen cada una a distintas zonas de muestreo. De igual forma, las 2 cepas del grupo C (ambas de vegetales) pertenecen a la misma marca, lo que puede hacer pensar que la contaminación proviene de la planta industrializadora.

Por otro lado, la similitud encontrada entre *L. innocua* y *L. monocytogenes*, es muy cercana, tal como la han mostrado otros estudios, en los que se señala que *L. innocua* es la especie más estrechamente relacionada a *L. monocytogenes* (Boerlin *et al.*, 1991; Collins *et al.*, 1991) esto debido a que aparentemente solo 2 pb encontrados en la región V9 del gen son realmente diferentes entre cada especie (Czajka *et al.*, 1993), por lo que nuestros resultados refuerzan aun más la similitud existente entre ambas especies. Tal como lo indica el dendrograma, la similitud entre *L. seeligeri* y *L. monocytogenes* es mucho menor en comparación con la de *L. innocua* lo que nos permite diferenciar entre ambas.

La ribotipificación fue empleada por Kostman y colaboradores (1992) para tipificar cepas de *Pseudomonas cepacia* y resultó ser aplicable para otros microorganismos entre los que podemos mencionar: *Salmonella* serotipo Typhimurium (Nastasi *et al.*, 1995), *Salmonella* serogrupo G (Martin *et al.*, 1997), diferentes serotipos de *Salmonella* (Dolzani *et al.*, 1994; Lagatolla *et al.*, 1996), *Haemophilus influenzae* (Smith-Vaugahn *et al.*, 1995), *Francisella* y otras bacterias patógenas (Ibrahim *et al.*, 1996), *Acinetobacter* (Dolzani *et al.*, 1995; Ibrahim *et al.*, 1996), *Enterococcus* (Tyrell *et al.*, 1997) y *Staphylococcus aureus* meticilina resistente (Prasanna *et al.*, 1997). Ahora bien no hemos encontrado referencias sobre su empleo para la tipificación de *L.monocytogenes*, por lo que no podemos comparar nuestros resultados con ningún otro estudio. De nuestros resultados se ha de destacar el poder diferenciador de la técnica para el género *Listeria*. De hecho en la especie *L. monocytogenes* se diferenciaron 13 perfiles o ribotipos que incluían entre dos y siete amplicones y el serotipo-ribotipo prevalente en la patología humana (O:1, O:4)

Este trabajo provee las primeras evidencias de que a pesar de que la región del rDNA 16S es altamente conservada, pueden existir pequeñas diferencias entre diferentes cepas de *L. monocytogenes*. Lo que sugiere que el estudio de los genes ribosomales restantes (23S y 5S) quizás puedan aportar datos que nos permitan tipificar de mejor manera las cepas. Las diferencias entre los perfiles de amplicones generados a partir de las enzimas de restricción utilizadas ponen de manifiesto un polimorfismo que pueden ser interpretados en términos de variación genética. De hecho, existen evidencias de que las regiones que separan a cada una de estos genes varían tanto en tamaño como en secuencia (Graham *et al.*, 1997; Sontakke y Farber 1995), por lo que la combinación de los patrones de restricción generados de estas regiones junto con los análisis de cada uno de los genes podría incrementar aun más el poder de discriminación en la ribotipificación de *L. monocytogenes*.

Desde la aparición de los primeros árboles que reflejan en forma global la relación filogenético de los microorganismos basada en la utilización del rRNA 16S propuesta por Carl Woese en 1987, hasta la implementación de iniciadores

universales para la amplificación y utilización como marcadores moleculares de los genes que codifican para cada una de los RNA ribosomales, la ribotipificación ha sido considerada como uno de los mejores métodos para establecer las relaciones filogenéticas entre las bacterias (Ludwing y Schleifer, 1999).

Los resultados obtenidos en nuestro trabajo sugieren que en estudios epidemiológicos la ribotipificación es una técnica rápida y fiable para la discriminación ente aislamientos de *L. monocytogenes*, además de presentar un costo aceptable.

Listeria spp, incluyendo a *L. monocytogenes*, está presente y se seguirá encontrando en una amplia variedad de materias primas alimentarias. La exposición natural de verduras, frutas, cereales, alimentos de origen animal, pescado y carne de ave a las fuentes del medio ambiente hace imposible, en este tipo de alimentos, que su producción se lleve a cabo en ausencia de *L. monocytogenes*. Ahora bien, ninguno de los diferentes métodos de tipificación es el ideal, por lo que una vigilancia epidemiológica eficaz ha de buscar el método de caracterización óptima de las cepas.

CONCLUSIONES

7. CONCLUSIONES

1. Los aislados de *Listeria monocytogenes* bioquímicamente se biotipificaron en dos grupos: Biotipo 1 (38/45) y Biotipo 4 (7/45). No se identificaron los Biotipos 2 y 3.
2. Todas las cepas fueron sensibles al antibiótico cefotaxima.
3. La resistencia hacia β -lactámicos fue para: Ampicilina (Am) 48.8%, Cefalotina (Cf) 71.11%, Ceftazidina (Caz) 37.77%, Penicilina (Pe) 62.2% y Cefuroxima (Cxm) 84.45%, Dicloxacilina (Dc) 88.89%
4. La resistencia hacia las quinolonas fue: Pefloxacima (Pef) 74.41%.
5. La resistencia hacia los macrólidos fue: Eritromicina (E) 68.89%; Tetraciclina (Te) 84.45%.
6. Se observó una resistencia marcada hacia el quimioterapéutico Trimetoprim-Sulfametoxazol (Sxt) del 68.89%
7. Del 9 al 14% de las cepas aisladas presentaron multi-resistencia hacia: Am, E, Te, Dc y Stx,
8. El 88.8% (40/45) de las cepas de *L. monocytogenes* analizadas presentaron una adherencia superior al 50%, por lo cual se consideran adherentes.
9. El comportamiento de la adherencia cambia respecto al tiempo y es variable para cada cepa analizada, es decir, la cinética de adherencia es distinta para cada una de las cepas de *L. monocytogenes* aisladas de alimentos.

10. El 28.8% (13/45) de las cepas presentaron patrón de adherencia localizada, el 28.8% (13/45) adherencia agregativa y el 35.5% (16/45) adherencia difusa.
11. Dos de las cepas analizadas presentaron una actividad vacuolizante en células HEp-2 no reportada para *L. monocytogenes* bajo estas condiciones experimentales.
12. Se obtuvieron 5 grupos de *L. monocytogenes* que no tuvieron relación directa al origen pero probablemente si tiene relación a la fuente de contaminación.
13. Los patrones de restricción con las enzimas utilizadas permitieron diferenciar 13 ribotipos.
14. Los perfiles de restricción permitieron diferenciar a las cepas de serotipos diferentes.
15. Los patrones obtenidos con las enzimas de restricción permitieron agrupar a las cepas en dos grupos con un índice de similitud del 95%.
16. Solo 4 cepas mostraron una mínima diferencia intraespecífica del gen rDNA 16S, de las cuales, en orden descendente de similitud, 2 son de vegetales, la cepa de peces y una de jugos.
17. Se observa que *L. innocua* está más estrechamente relacionada a *L. monocytogenes* que *L. seeligeri*.
18. La combinación de la ribotipificación y biotipificación permiten reconocer líneas clonales de *L. monocytogenes* en un estudio de "Epidemiología Molecular".

BIBLIOGRAFÍA

8. BIBLIOGRAFIA

1. **Abigail, AS y DD Whitt.** 1994. Bacterial Pathogenesis. A molecular approach. ASM Press, Washington D.C. 182-198
2. **Arbeit, RD.** 1995. Laboratory procedures for the epidemiologic analysis of microorganisms. En: Manual of Clinical Microbiology. P.R. Murray, E.J. Baron, M.A. Tenover y R.H. Tenover (eds). 6th Ed. Pp 190-208. ASM Press. Washington DC.
3. **Arp, LH. 1988.** Bacterial Infection of Mucosal Surface: an Overview of Cellular and Molecular Mechanisms. En Roth A.J. (ed.) Virulence mechanisms of bacterial pathogens. 1a. ed. ASM. Washington, D.C. pp. 3-15.
4. **Barry T, CM Glennon, Lk Dunican y F Gannon.** 1991. The 16S/23S Ribosomal Spacer Region as a Target for DNA Probes to Identify Eubacterias. PCRMethodsAppl.1:149
5. **Bayless, DO, BA Annous y BJ Wikilson.** 1996. Cold stress proteins induced in *Listeria monocytogenes* in response to temperature down shock and growth at low temperatures. Appl. Environ. Microbiol. 41:414-420
6. **Bell, C y Kyriakides.** 2000. Listeria una aproximación práctica al microorganismo. Editorial Acribia.
7. **Ben Embarek, PK** 1994. Presence, detection and growth of *Listeria monocytogenes* in seafoods. Int J Food Microbiol. 23(1):17-34. Review
8. **Beuchat, L.R.** 1996. *Listeria monocytogenes*. Incidence on vegetables. Food Control, 7(4/5), 223-228
9. **Blanco, MM y A Aranaz.** 2004. Géneros *Listeria*, *Erysipelothrix*, *Renibacterium* y *Lactobacillus*. En S. Vadillo, S. Piriz y E. Mateos. Manual de Microbiología Veterinaria. Mac Graw Hill Editorial. p.p.477-483
10. **Boerlin P, J Rocourt y JC Piffaretti.** 1991. Taxonomy of the genus *Listeria* by using multilocus enzyme electrophoresis. Int J Syst Bacteriol. 41(1):59-64.
11. **Breed RS, EGD Murray y NR Smith**(ed.)1957. Bergey`s Manual of determinative bacteriology, 7th, ed. Baltimore: William & wilkins
12. **Broome, CV.** 1993. Listeriosis: Can we prevent it? ASM News. 59: 444-446 .

13. **Charlton, BR, H Kinde, y LH Jensen.** 1990. Environmental survey for *Listeria* species in California milk processing plants. *J. Food Protect.* **53**:198-201.
14. **Charpentier, E, y P Courvalin.** (1999). Antibiotic resistance in *Listeria* spp. *Antimicrobial Agents and Chemoterapy.* **43**:2103-2108.
15. **Chrapentier, E. G Gerbaud, y P Courvalin.** 1994. Presence of the *Listeria* tetracycline resistance gene *tet(S)* in *Enterococcus faecalis*. *Antimicrobial Agents and Chemoterapy.* **38**:2330-2335.
16. **Chrapentier, E, G Gerbaud, C Jacquet, J Rocourt y P Courvalin.** 1995. Incidence of antibiotic resistance in *Listeria* spp. *Journal Infection Disease.* **172**:277-281.
17. **Collins, MD, S Wallbanks, DJ Lane, J Shah, R Nietupski, J Smida, M Dorsch y E Stackebrandt.** 1991. Phylogenetic analysis of the genus *Listeria* based on reverse transcriptase sequencing of 16S rRNA. *Int J Syst Bacteriol.* **41**(2):240-6.
18. **Cotton, LN y CH White.** 1992. *Listeria monocytogenes*, *Yersinia enterocolitica* and *Salmonella* in dairy plant environments. *J. Dairy Sci.* **75**:51-57.
19. **Czajka J, N Bast, M Piani, W Russ, K Sultana, M Wiedmann, R Whitaker y CA Batt.** 1993. Differentiation of *Listeria monocytogenes* and *Listeria innocua* by 16S rRNA genes and intraspecies discrimination of *Listeria monocytogenes* strains by random amplified polymorphic DNA polymorphisms. *Appl Environ Microbiol.* **59**(1):304-8.
20. **Dalton, CB, CC Austin, J Sobel, PS Hayes, WF Bibb, LM Graves, B Swaminathan, ME Proctor y PM Griffin.** 1997. An outbreak of gastroenteritis and fever due to *Listeria monocytogenes* in milk. *N. Engl. J. Med.* **336**: 100-105.
21. **Datta, AR y MH Kothary.** 1993. Effects of glucose, growth temperature, and pH on Listeriolysin O production in *Listeria monocytogenes*. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**:3495-3497.
22. **Decatur AL y DA Portnoy.** 2000. A PEST-like Sequence in Listeriolysin O Essential for *Listeria monocytogenes* Pathogenicity, *Science*; **290**: 992-995.
23. **Dice, LR.** 1945. Measures of the amount of ecologic association between species. *Ecology*, **26**:297-302.

24. **Dolzani, L, M Di Michelle y C Monti-Bragadin.** 1994. Use of PCR-ribotyping for the characterization of *Salmonella*. J.Biol.Res. 20:27-33.
25. **Dolzani L, T Tonin, C Lagatolla, L Prandin y C Monti-Bragadin.** 1995. Identification of *Acinetobacter* isolates in the *A. calcoaceticus* *A. baumannii* complex by restriction analysis of the 16S-23S rRNA intergenic spacer sequences. J.Clin. Microbiol. 33:1108-1113.
26. **Donnelly, CW.** 1990. Resistance of *Listeria monocytogenes* to heat. Pp. 189-193. In A.J. Miller, J.L. Smith and G.A. Somkuti (ed) Foodborne Listeriosis. Society for Industrial Microbiology. New York.
27. **Doyle, MP y JL Schoeni.** 1985. Comparison of procedures for isolating *Listeria monocytogenes* in soft, surface ripened cheeses. J. Food Protect. 48:740-746.
28. **Eklund, MW, FT Poysky, y RN Paranjpye.** 1995. Incidence and sources of *Listeria monocytogenes* in cold-smoked fishery products and processing plants. Journal of Food Protection, 58(5), 502-508.
29. **Ei-Kest, SE y EH Marth.** 1992. Freezing of *Listeria monocytogenes* and other microorganisms: A review. Journal of Food Protection 51: 525-530.
30. **Facinelli, B, MC Roberts, E Giovanetti, C Casolari, U Fabio, y PE Varaldo.** 1993. Genetic basis of tetracycline resistance in food borne isolates of *Listeria innocua*. Applied and Environment Microbiolgy. 59:614-616.
31. **Farber, JM y PI Peterkin.** 1991. *Listeria monocytogenes*, a Food-Borne Pathogen. Microbiol. Rev. 55 (3): 476-511.
32. **Farber, JM, PI Peterkin, AO Carter, PV Varughese, FE Ashton y EP Ewan.** 1991. Neonatal listeriosis due to cross-infection confirmed by isoenzyme typing and DNA fingerprinting. J. Infect. Dis. 163:927:928.
33. **Farber, JM.** 1995. An introduction to the How and Why Molecular Typing. Journal of Food Protection 59 (10) 1091-1101.
34. **Farber, JM y CJ Addison.** 1994. RAPD typing for distinguishing species and strains in the genus *Listeria*. J. Appl. Bacteriol. 77: 242-250.
35. **Farber, JM, A Hughes, R Holley y B Brown.** 1989. Thermal resistance of *Listeria monocytogenes* in sausage, meat. Acta Microbiology Hung. 36:273-275.

36. **Farber, JM, A Armstrong y R Caldeira.** 1991. A Canadian comparative study of modified version of the "FDA" and "USDA" methods for the detection of *Listeria monocytogenes*. J. Food Protect. **54**:669-672.
37. **Farber, JM, E Daley, F Coates, DB Emmons y R Mc Kellar.** 1992. Factors influencing survival *Listeria monocytogenes* cells in milk in a high temperature short time pasteurizer. J. Food Prot. **55**:946-951.
38. **Felsenstein, J.** 2000. PHYLIP: phylogeny inference package. Version 3.6. Department of Genetic, University of Washington, Seattle.
39. **Fenlon, DR.** 1985. Wild birds and silage as reservoirs of *Listeria* in the agricultural environment. J. Appl. Bacteriol. **59**:537-543.
40. **Fernández-Garayzabal, y C Genigeorgis.** 1990. Quantitative evaluation of three selective enrichment broth and agars used in recovering *Listeria monocytogenes* microorganisms. J. Food Protect. **53**:105-110.
41. **Fleming, DW, SL Cohci, KL MacDonald, J Brondum, PS Hayes, BD Plikatis, MB Holmes, A Audurier, CCV Broome y AL Reingold.** 1985. Pasteurized milk as a vehicle of infection in an outbreak of listeriosis. New Engl. J. Med. **312**:404-407.
42. **Franciosa, G, S Tartaro, C Wedell-Neergaard y P Aureli.** 2001. Characterization of *Listeria monocytogenes* strains involved in Invasive and Noninvasive Listeriosis Outbreaks by PCR-Based Fingerprinting Techniques. Appl. Environ. Microbiol. **67**:1793-1799
43. **Garrity, MG, M Winters, WA Kuo y BD Searles.** 2002. Taxonomic outline of the prokaryotes Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Second edition.
44. **Gitter, M, R Bradley y PH Blampied.** 1980. *Listeria monocytogenes* in bovine mastitis. Vet. Rec. **107**:390-393.
45. **González y Merchand, G. I Estrada García, RC Jolston.** 1996. A novel method for the isolation of Mycobacterial DNA. FEMS Microbiology Letter, **135**. p.p.71-77.
46. **Graham TA, EJ Golsteyn-Thomas, JE Thomas y VP Gannon.** 1997. Inter- and intraspecies comparison of the 16S-23S rRNA operon intergenic spacer regions of six *Listeria* spp. Int J Syst Bacteriol. **47**(3):863-9.

47. **Gray, ML y AH Killinger.** 1966. *Listeria monocytogenes* and listeric infections. *Bacteriol. Rev.* 30:309-382.
48. **Guerra, MM, F Bernardo y J McLauchlin.** 2002. Amplified fragment length polymorphism (AFLP) analysis of *Listeria monocytogenes*. *Syst. Appl. Microbiol.* 25: 456-461.
49. **Guzman, CA, E Domann, M Rhode, D Bruder, A Darji, S Weiss, J Wehland, T Chakraborty y KN Timmis.** 1996. Apoptosis of mouse dendritic cells is triggered by listeriolysin, the major virulence determinant of *Listeria monocytogenes*. *Mol Microbiol.* 20: 119-126.
50. **Hitchens, AD.** 2003. *Listeria monocytogenes*. p 141-151. IN: FDA Food and Drug Administration, *Bacteriological Analytical Manual*. 7th ed.. Assoc. Off. Anal. Chem. Arlington, VA, U.S.A.
51. **Hof, H, T Nichterlein y M Kretschmar.** 1997. Management of Listeriosis. *Clinical Microbiology Reviews.* 10(2): 345-357.
52. **Hoffman, CS y F Winston.** 1987, A ten-minute DNA preparation from yeast efficiently releases autonomous plasmids for transformation of *Escherichia coli* . *Gene.* 57: 267-272.
53. **Howard, JP, KT Harsono y JB Luchansky.** 1992. Differentiation from yeast efficiently releases autonomous plasmids for transformation of *Escherichia coli*. *Gene* 57:267-272.
54. **Howard, J P, KT Harsono y JB Luchansky.** 1992. Differentiation of *Listeria monocytogenes*, *Listeria innocua*, *Listeria ivanovii* and *Listeria seeligeri* by pulsed-field gel electrophoresis. *Appl. Environ. Microbiol.* 58: 709-712.
55. Ilof, I., Nichterlein, I., and M. Kretschmar. 1997. Management of listeriosis. *Clin. Microbiol. Rev.* 10: 345-357.
56. **Hunter, PR y MA Gaston.** 1988. Numerical index of the discriminatory ability of typing detection system: an application of Simpson's index diversity. *J. Clin. Microbio.* 26:2465-2466.
57. **Ibrahim A, P Gerder-Smidt y Sjöstedt.** 1996. Amplification an restriction endonuclease digestion of a large fragment of genes coding for rRNA as a rapid

method for discrimination of closely related pathogenic bacteria. J.Clin.Microbiol. 34:2894-2896.

58. **Ibrahim A, W Liesack, MW Griffiths y RM Robins-Browne.** 1997. Development of a high specific assay for rapid identification of pathogenic strains of *Yersinia enterocolitica* based on PCR amplification of the *Yersinia* heat-stable enterotoxin gene (*yst*). J.Clin.Microbiol. 35:1636-1638.

59. **Jay, JM.** 1995. Foodborne listeriosis, Chapter 22 en Food Microbiology. Ed. Acriba. pp. 478-506.

60. **Jay, JM.** (1996) Prevalence of *Listeria spp.* in meat and poultry products. Food Control 7 (4/5), 209-214.

61. **Jaradat, Z y A Bhunia.** 2002. Glucose and Concentrations Affect the Expression of a 104-Kilodalton *Listeria* Adhesion Protein in *Listeria monocytogenes*. Applied and Environmental Microbiology. 68 (10): 4876-4883.

62. **Jayarao, BM, JJE Dore, GAJr Baumbach, KR Matthews y SP Oliver.** 1992. Restriction fragment length polymorphism analysis of 16S ribosomal DNA of *Streptococcus* an *Enterococcus* species on bovine origin. J. Clin. Microbiol. 30:2377-2381.

63. **Jenkins, E M, AN Njoku-Obi y EW Adams.** 1964 Purification of the soluble hemolysin of *Listeria monocytogenes*. J. Bacteriol. 88:418-424

64. **Johlik, WK, PH Willett y B Amos.** 1990. *Listeria y Erysipelothrix*. En Zinsser Microbiología. 18a edición. Madrid, España pp: 614-621.

65. **Jones, D y HPR Seeliger.** 1992. The genus *Listeria*. Balows, A., H.G.Trüper, M. Dworkin, W. Harder, K.H. Schleiser (Ed.). En The procaryotes. A handbook on the biology of bacteria: edophysiology, isolation, identification and applications. 2a edición. Springer-Berlang. New York. p.p: 1595-1616.

66. **Junttila, J R, SI. Niemala, y J Rin.** 1988. Minimum growth temperature of *Listeria monocytogenes* and non- hemolytic *Listeria* . J. Appl. Bacteriol. 65:321-327

67. **Kaferstein, F y M Abdussalam.** 2001. La inocuidad de los alimentos en el siglo XXI. Boletín de la Organización Mundial de la Salud. 77 (4): 347-351.

68. **Kayal S, A Lilienbaum, C Poyart, S Memet, A Israel y P Berche.** 1999. Listeriolysin O- dependent activation of endothelial cells during infection with *Listeria monocytogenes* activation de NF-kB and regulation of adhesion molecules and chemokines. *Mol. Microbiol.* 31: 1709-1722
69. **Kerr, KG, P Kite, J Heritage y PM Hawkey.** 1995. Typing of epidemiologically associate environmental and clinical strains of *Listeria monocytogenes* by RAPD. *Journal of Food Protection.* 58: 609-613.
70. **Klat, EC, Z Pavlova, AJ Teberg y ML Yonekura.** 1986. Epidemic neonatal listeriosis at autopsy. *Hum. Pathol.* 17:1278-1281.
71. **Klausner, RB y CW Donnelly.** 1991. Environmental sources of *Listeria* and *Yersinia* in Vermont dairy plants. *J. Food Protect.* 54:607-611.
72. **Kostman, JR, TD Edlind, JJ Lipuma y TL Stull.** 1992. Molecular epidemiology of *Pseudomonas cepacia* determined by polymerase chain reaction ribotyping. *J.Clin.Microbiol.* 30:2084-2087.
73. **Kostman, JR, MB Alden, M Mair, JD Edlind, JJ Lipuma y TL Stull** 1995. A universal approach to bacterial molecular epidemiology by polymerase chain reaction ribotyping. *J. Infect. Dis* 171: 204-208
74. **Kozak, J, T Balmer, y R Byrne.** 1996. Prevalence of *Listeria monocytogenes* in foods: incidence in diary products. *Food Control* 7(4/5), 669-673.
75. **Lagatolla C, L Dolzani, E Tonin, AM Lavenia, M Di Michele, T Tommasini y CM Monti-Bragadin.** 1996. PCR ribotyping for characterizing *Salmonella* isolates of different serotypes. *J.Clin.Microbio.* 34: 2440-2443.
76. **Lawrence, LM, J Harvey, A Gilmour y J Harvey.** 1993. Development of a Random Amplification of Polymorphic DNA Typing method for *Listeria monocytogenes* . *Appl. Environ. Microbiol.* 59: 3117-3119.
77. **Lober, B.** 1997. Listeriosis. *Clin.Infect.Dis.* 24:11-19.
78. **Ludwing, W y KH Schleifer.** 1999. Phylogeny of bacterial beyond the 16S RNAr standar. *ASM News.* 1-7.
79. **Lynch, M y BG Milligan.** 1994. Analysis of population genetic structure with RAPD markers. *Mol. Ecol.* 3: 91-99.

80. **MacGowan, AP, K Bowker, y J MacLuchin.** 1994. The occurrence and seasonal changes in the isolation of *Listeria* spp. In shop-bought foodstuffs, human faeces, sewage, and soil from urban sources. *International Journal of Food Microbiology*, 21, 325-334.
81. **MacGowan, AP, DS Reeves y J McLanchlin.** 1990. Antibiotic resistance in *Listeria monocytogenes*. *Lancet*. 336:513-514.
82. **Manly, JF.** 1997. Randomization, bootstrap and Monte Carlo methods in biology. Chapman & Hall. London.
83. **Martín MC, MA González-Hevia, I Moro y MC Mendoza.** 1997. Genetic typing methods applied to the differentiation of clonal lines among *Salmonella enterica* serogrup G strains causing human salmonellosis. *FEMS Immunol.Med,Micorbiol.* 19: 215-221.
84. **Mc Cullagh, P. y JA Nelder,** 1983. Generalized Linear Models. Chapman & Hall. London.
85. **McLauchlin, J.** 1987. *Listeria monocytogenes*, recent advances in the taxonomy and epidemiology of Listeriosis in humans. *J. Appl. Bacteriol.* 63: 1-11.
86. **McLauchlin, J.** 1990. Human listeriosis in Britain, 1967-1985, a summary of 722 cases. 2. Listeriosis in non-pregnant individuals, a changing pattern of infection and seasonal incidence. *Epidemiol. Infect.* 104: 191-201
87. **Mereghetti, L, P Lanotte, V Savoye-Marckuz, N Marquet-Van-Der Mee, A Audurier y R Quentin.** 2001, Combined Ribotyping and Random Multiprimer DNA Analysis to probe the population structure of *Listeria monocytones*. *Appl. Environ. Microbiol.*68:2849-2857.
88. **Miró E, B Mirelis, F Navarro y G Prats.** 1996. Detection of Resistance to the Amoxicillin-Clavulanic Acid Combination in *Salmonella* and *Shigella*. 1996. *Enferm.Infecc.Microbio.Clin.* 14:31-33.
89. **Moncada, FJ.** 2002. Se perfila un nuevo revés a los avicultores mexicanos. *Revista Vertigo.* Año II N° 14: 24-26.
90. **Nastasi, A y C Mammia.** 1995. Epidemiological evaluation by PCR ribotyping of sporadic and outbreak-associated strains of *Salmonella enterica* serotype Typhimurium. *Res.Microbiol.* 146:99-106.

91. **National Committee for Clinical Laboratory Standards.** 1994. Performance standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Test-Fifth Edition; Approved Standard Document M2-A5. NCCLS, Vilanova, Pa.
92. **Ofek, I y RJ Doyle.** 1994. Bacterial Adhesion to Cells and Tissues. 1a. ed. Chapman & Hall. New York. pp 1-28.
93. **Olive, DM y P Bean.** 1999. Principles and applications of methods for DNA – based Typing of microbial organisms. J. Clin. Microbiol. 37: 1661–1669.
94. **Organización Mundial de la Salud (OMS).** 2002. Estrategia global de la OMS para la inocuidad de los alimentos. Octava sesión plenaria. Clasificación NLM: WA 695 p.p. 5-14.
95. **Prasanna DN, V Keer, PM Hawkey, P Parnell, N Joseph, JF Richardson y B Cookson.** 1997. Comparison and application of ribosome spacer DNA amplicon polymorphisms gel electrophoresis for differentiation of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains. J.Clin.Microbiol. 35:881-885.
96. **Pimmer, R, A Schuchat, B Swaminathan.** 1992. Role of foods in sporadic listeriosis II. Microbiologic and epidemiological investigation. JAMA 267:2046-2050
97. **Poyart-Salmeron, C, C Carlier, P Trieu-Cout, AL Courtien y P Courvalin.**1990. Transferable plasmid mediated antibiotic resistance in *Listeria monocytogenes*. Lnacet 335:1422-1426.
98. **Poyart-Salmeron, C, P Trieu-Cout, C Carlier, A MacGowan, J MacLauchlin y P Courvalin.** 1992. Genetic basis of tetracycline resistance in clinical isolates of *Listeria monocytogenes*. Antimicrobial Agents and Chemoterapy. 36:463-466.
99. **Real, R y J M Vargas.** 1996. The probabilistic basis of Jaccard´s index of similarity. Syst. Biol. 45: 380-385.
100. **Relman, DA.** 1993. Universal Bacterial 16S rDNA Amplification and Sequencing. In: Diagnostic Molecular Microbiology. American Society for Microbiology. Washington D. C.
101. **Rholf, FJ.** 1998. Numerical taxonomy and multivariate analysis system. Exeter softwar. Inc. New York.

-
102. **Riedo, FX, RW Pinner, ML Tosca, ML Cartter, LM Graves, MW Reeves, RE Loeaver, BD Plikaytis y CV Broome.** 1994. A Point-Source Foodborne Listeriosis Outbreak; Documented Incubation Period and Possible Mild Illness. *J.Infect.Dis.* 170: 693-696.
103. **Rita, MM, R Bova, E Pascale y E D'Ambrosio.** 1994. Reproducible DNA fingerprinting with the Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) method. *Nucleic Acids Research.* 22: 1921-1922.
104. **Robins-Browne RM y V Bennett-Wood.** 1992. Quantitative Assessment of the Ability of *Escherichia coli* to Invade Cultured Animal Cells. *Microb.Pathol.* 12: 159-164.
105. **Robbins JR, Al Barth, H Marquis, EL Hostos, WJ Nelson y JA Theriot.** 1999. *Listeria monocytogenes* Exploits Normal Host Cell Processes to Spread from Cell to Cell, *J Cell Biol*; 146: 1333-1349.
106. **Rocourt, J, A Schrettenbrunner, H Hof y EP Espaze.** 1987 New species of the genus *Listeria*: *Listeria seeligeri*. *Pathol Biol.* 35(7):1075-80
107. **Rocourt, J.** 1996. Risk factors for listeriosis. *Food Control*, 7(4/5), 195-202
108. **Rocourt, J.** 1999. The genus *Listeria* and *Listeria monocytogenes* phylogenetic position, taxonomy and identification, pp. 1-20. En E. T. Ryser and E. H. Marth (ed), *Listeria*, listeriosis and food safety, 2nd ad. Marcel Dekker Inc., New York, N.Y.
109. **Rocourt, J.** 1994. *Listeria monocytogenes* the State of the Science. *D. Food Environ. Sanit.* 14: 70-82.
110. **Salamina, G, DE Dalle y A Niccolini.** 1996. A food-borne outbreak of gastro-enteritis involving *Listeria monocytogenes*. *Epidemiology and Infection*, 117, 429-436.
111. **Santiago, N., A. Zipf y A. Bhunia.** 1999. Influence of Temperature and Growth Phase on Expression of a 104-Kilodalton *Listeria* Adhesion Protein in *Listeria monocytogenes*. *Applied and Environmental Microbiology.* 65(6): 2765-2768.
112. **Schlech, W F.** 2000. Foodborne Listeriosis. *Clin. Infect. Dis.* 31: 770-775.

113. **Schlech, WF, PM Lavigne, RA Bortolussi, AC Allen, EV Haldane, AJ Wort, AW Hightower, SE Johnson, SH King, ES Nichols y CV Broome.** 1983. Epidemic listeriosis evidence for transmission by food. *N. Engl. J. Med.* 308:203-206.
114. **Schlech, WF.** 1992. Expanding the horizons of food borne listeriosis. *JAMA* **267**:2081-2082.
115. **Schuchat, A, B Wannathan y CV Broome.** 1991. Epidemiology of human listeriosis. *Clin Microbiol Rev*; 4: 169-183.
116. **Schuchat, A, K Robinson, JD Wenger, LH Harrison, M Farley, AL Reingold, L Lefkowitz, y BA Perkins.** 1997. Bacterial meningitis in the United States in 1995. Active surveillance team. *N. Engl. J. Med.* 337:970-976
117. **Seeliger, HPR y D Jones.** 1986. Genus *Listeria* Pirie. 1940, 383^{AL}, p1235-1245. In P.H.A. Sneath, N.S. Mair, M. E. Sharpe, and J.G. Holt (ed) *Bergey's Manual of Systemic bacteriology*, vol. 2. The Williams & Wilkins Co. Baltimore
118. **Seeliger, HPR y D Jones.** 1992. The genus *Listeria*. Balows, A., H. G. M. Dworkin, W. Harder, K.H. Schleiser (Ed). *En the prokaryotes. A handbook on the biology of bacteria: edophydiology, isolation, identification, and applications.* 2a edition. Springer-berlang. New York. P.p.1595-1616.
119. **Seong, KB, ChJ Suk y CSY Han.** 2001. Random amplification of polymorphic DNA typing of *Listeria monocytogenes* isolated from meat. *Int. J. Food Microbiol.* 69: 227-235.
120. **Shearer, AS, M Chrstiane y JD Rolf.** 2001. Evaluation of a Polymerase Chain Reaction-Based System for Detection of *Salmonella enteritidis*, *Escherichia coli* O157:H7, *Listeria* spp., and *Listeria monocytogenes* on Fresh Fruits and Vegetables. *J. Food Prot.* 64: 788-795.
121. **Ship CR y B Rowe.**1980. A Mechanised Microtechnique for *Salmonella* Serotyping. *J.Clin.Pathol.* 33: 595-597.
122. **Sibeliuss, U, EC Schulz, F Rose, K Hattar, T Jacobs, S Weiss, T Chakraborty, W Seeger y F Grimminger.** 1999. Role of *Listeria monocytogenes* exotoxins listeriolysin and phosphatidylinositol-specific phospholipase C in activation of human neutrophils. *Infect. Immun.* 67: 1125-1130.

-
123. **Smith-Vaugan, HC, KS Sriprakash, JD Mathews y DJ Kemp.** 1995. Long PCR-ribotyping of nontypable *Haemophilus influenzae*. J.Clin.Microbiol. 33:1192-1195.
124. **Sneath, PH, NS Mair, ME Sharpey y JG Holt.** 1986. Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, Vol 2, 9na. ed. En Williams and Wilkins Baltimore, EUA. pp: 1208-1244.
125. **Sobieszczanska, BM, y R Gryko.** 2001. Adherence Patterns of *Escherichia coli* isolated from children with diarrhea. Przegl Epidemiol. 55(3): 287-97.
126. **Sontakke, S y JM Farber.** 1995. The use of PCR ribotyping for typing strains of *Listeria spp.* Eur. J. Epidemiol. 11:1-9.
127. **Soriano, F, R Fernández Roblas, R Calvo y G García Calvo** 1998. *In vitro* susceptibilities of aerobic and facultative non spore forming Gram positive bacilli to HMR f3647 (RU 66647) and 14 antimicrobials. Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 42:1028-1033.
128. **Spurlock, AT y EA Zottola.** 1991. The survival of *Listeria monocytogenes* in aerosols. J. Food Protect. 54:910-912.
129. **Struelens, MJ.** 1996. Consensus guidelines for appropriate use and evaluation of microbial epidemiologic typing systems. Clin. Microbiol. Infect. 2: 2-11.
130. **Swaminathan B y GM Matar.** 1993. Molecular typing methods. En: Diagnostic Molecular Microbiology. Principles and applications. Persing, DH, TF Smith, FC Tenover y TJ White (eds). Pp: 26-45. ASM. Washington DC.
131. **Swaminathan, B, PS Hayes, VA Przybyszewski y BD Plikaytis.** 1988. Evaluation of enrichment and plating media for isolating *Listeria monocytogenes*. J. Assoc. Off. Anal. Chem. 71:664-668.
132. **Tang, P, I Rosenshine, P Cossart y BB Finlay.** 1996. Listeriolysin O activates mitogen-activated protein kinase in eukaryotic cells. Clin. Microbiol. Infect. 2: 2-11
133. **Tyrell, JG, RN Bethune, B Willey y DE Low.** 1997. Species identification of Enterococci via intergenic ribosomal PCR. J.Clin.Microbiol. 35:1054-1060.

134. **Unnerstad H, I Nilsson, H Ericsson, ML Danielsson, B Jacques, E. Bannerman y W Tham.** 1999. Division of *Listeria monocytogenes* serovar 1/2a strains into two groups by PCR and Restriction Enzyme Analysis. *Appl. Environ. Microbiol.* 65: 2054-2056.
135. **Van Belkum, A.** 1994. DNA fingerprinting of medically important microorganism by use of PCR. *Clin Microbiol Rev.* 7(2):174-84. Review.
136. **Vanderzant, C.** 1992. Compendium of methods for the microbiological examination of foods. Ed. APHA. MY. USA.
137. **Vaneechoutte, M, P Boerlin, VH Tichy, E Bannerman, B Jäger y J Bille.** 1998. Comparison of PCR-based identification of *Listeria* species and their use for atypical *Listeria* isolates. *Int. J. of Syst. Bacteriol.*48:127-139.
138. **Vaneechoutte, M, H De Beenhouwer, G Claeys, G Vershraegen, A De Rouck y G Verschraegen.** 1993 identification of *Mycobacterium* species with amplified DNA restriction analysis. *J. Clin. Microbiol.* 31:2061-2065.
139. **Vaneechoutte, M, CP Cartwright, EC Williams, B Jäger, HV Tichy, A De Rouck y G Verschraegen.** 1996. Evaluation of 16S rRNA gene restriction analysis for the identification of cultured organisms of clinically important *Clostridium* species.
140. **Vázquez-Boland, JA, JA Gamallo, MT Ripio, G Domínguez-Bernal, M Lara, Y Vega, RC Mainar y M Suárez.** 1996. Listeriosis animal: aspectos epidemiológicos y diagnósticos, implicaciones en salud pública y situaciones en España. *Med. Vet.* 13: 333-344.
141. **Vázquez-Boland JA, M Jun, P Merche, T Chakraborty, G Dominguez-Bernal, W Goebel, B González-Zorn, J Wehland y J Kreft.** 2001. *Listeria* pathogenesis and molecular virulence determinants. *Clin. Microbiol. Rev.* 14:584-640.
142. **Wagner, M., A. Maderner y E. Brandl.** 1999. Development of a multiple primer RAPD assay as a tool for phylogenetic analysis in *Listeria* spp. strains isolated from milkproducts associated epidemics, sporadic cases of listeriosis and dairy environments. *Int. J. Food Microbiol.* 52: 29-37.

-
143. **Watkins, J y KP Sleath.**1981. Isolation and enumeration of *Listeria monocytogenes* from Sewage, Sewage Sludge and River Water. J Appl Bacteriol. 50(1):1-9.
144. **Weiss, J, y HPR Seeliger.** 1975. Incidence of *Listeria monocytogenes* in nature. Appl. Microbiol. 30: 29-32.
145. **Welshimer, HJ y J Donker-Voet.**1971. *Listeria monocytogenes* in nature. J. Appl. Microbiol. 21: 516–519.
146. **Wesley, IV y A Fraser.** 1991. Restriction Enzyme analysis of *Listeria monocytogenes* strains associated with foodborne epidemics. Appl. Environ. Microbiol. 57:969-975.
147. **William, GK, AR Kubelik, KJ Livak, JA Rafalski y SV Tingey.** 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. Nucleic Acids Research. 18: 6531 – 6535.
148. **Wilson, M, R Mc Nab y B Henderson. 2002 (a).** Bacterial Disease Mechanisms. An Introduction to Cellular Microbiology. 1a. ed. Cambridge University Press, Washington, D.C. pp. 353-400.
149. **Wilson, JW, MJ Schurr, CL LeBlanc, R Ramamurthy, KL Buchanan y CA Nickerson. 2002 (b).** Mechanisms of Bacterial Pathogenicity. Postgrad Med J. 78:216–224.
150. **Woese, CR.** 1987. Bacterial Evolution: Microbiol. Rev. 51(2):221-227
151. **World health Organization report on prevention and control of Listeriosis.**1987. World health Organization. Geneva, Switzerland, WHO/CDS/VPH87. 69: 6.
152. **Yurdusev, N. 2001.** In vitro Model for the study of *Listeria* and *Salmonella* Adherence to Intestinal Epithelial Cells. Turk Journal of Biology. 25: 25-35.
153. **Zepeda-López, HM y GM González-Lugo. 1995.** *Escherichia coli* Adherence to HEp-2 Cells with Prefixed Cells. Journal of Clinical Microbiology. 33(5): 1414-1417.
- 154.

URLs

URL 1: Universidad Nacional Autónoma de México

<http://depa.pquim.unam.mx/bacteriologia/pdfs/ART%20CDC-Listeria.pdf>

Última fecha de consulta: 2008-11-28

URL 2: Nature, Reviews Microbiology

http://www.nature.com/nrmicro/journal/v4/n6/fig_tab/nrmicro1413_F1.html

Última fecha de consulta: 2008-12-16

URL 3: Nature, Reviews Microbiology

http://www.nature.com/nri/journal/v4/n10/fig_tab/nri1461_F1.html

Última fecha de consulta: 2008-12-16

URL 4: Pathogen Combat for safe food

<http://www.pathogencombat.com/Industry/industry/Interesting%20Articles.aspx>

Última fecha de consulta: 2008-11-03

URL 5: Food Research Institute, University of Wisconsin-Madison

<http://www.wisc.edu/fri/briefs/virulencelmono.pdf>

Última fecha de consulta: 2008-11-24

URL 6: Revista Digital del Centro Nacional de Investigaciones Agropecuarias de Venezuela

http://www.ceniap.gov.ve/pbd/RevistasTecnicas/ceniaphoy/articulos/n11/arti/pineda_y.htm

Última fecha de consulta: 2008-12-12

ANEXO

9. ANEXOS

9.1 ARTÍCULO PUBLICADO

Occurrence and Antibiotic Sensitivity of *Listeria monocytogenes* Strains Isolated from Oysters, Fish, and Estuarine Water[∇]

O. R. Rodas-Suárez,² J. F. Flores-Pedroche,² J. M. Betancourt-Rule,²
E. I. Quiñones-Ramírez,¹ and C. Vázquez-Salinas^{2*}

Departamento de Microbiología, Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, Instituto Politécnico Nacional, Carpio y Plan de Ayala S/N, Col. Casco de Santo Tomás, C.P. 11340, México,¹ and Departamento de Biotecnología, División de Ciencias Biológicas y de la Salud, Universidad Autónoma Metropolitana, Michoacán y Purísima S/N, Col. Vicentina, C.P. 09340, México²

Received 22 April 2006/Accepted 4 September 2006

We analyzed the presence of *Listeria* spp. in oyster, fish, and seawater samples and tested isolates for antibiotic sensitivity. *Listeria monocytogenes* was found in 4.5% of fish samples and 8.3% of seawater samples and was not recovered from oysters. Multiresistant environmental strains were found, representing a potential threat to human health.

Human listeriosis is a public health problem of low incidence but high mortality, requiring prompt diagnosis and adequate antibiotic therapy (1). Over the last 2 decades a high number of food-borne listeriosis outbreaks have occurred, some with high mortality rates (2, 13, 19). Antibiotic resistance and inefficient empirical treatment of *Listeria* infections could be responsible for this increased mortality (4). Since the first multiresistant *Listeria monocytogenes* strain was observed in France (14), different antibiotic resistance patterns in environmental, food, and clinical sources have been reported (7, 12, 20). Information on the presence of *Listeria monocytogenes* in Mexico is scarce, and the frequency of listeriosis is unknown. The purpose of this study was to determine the presence of *Listeria* spp. in fish, oysters, and saline waters in an area where fish are caught for local and regional consumption and to determine the sensitivities of the *L. monocytogenes* isolates to different antimicrobial agents.

A total of 66 oyster, 66 fish, and 144 estuarine water samples were collected over a 12-month period (June 2001 to May 2002) from 12 sites of the Pueblo Viejo lagoon, Veracruz, Mexico (Fig. 1). Fish and oyster samples were transported on dry ice in separate thermal containers, and estuarine water samples were collected in sterile plastic bottles (Nalgene) and transported to the laboratory on ice. Oyster and fish samples

were processed as previously described (9). Seawater samples were filtered through a 14-cm-diameter and 0.45- μ m-pore membrane (Millipore). Twenty-five milliliters of seawater or 25 g oyster or fish samples was added to 225 ml enrichment broth (EB; Merck) and incubated at 30°C for 24 to 48 h. The filter used for the water samples was washed with 100 ml peptone solution (0.1%), added to 225 ml EB, and incubated at 4°C for 7 days. Afterwards, a 0.1-ml sample was streaked in Oxford agar (Oxoid) and incubated at 30°C for 24 to 48 h. *L. monocytogenes* isolates were identified and serotyped as previously described (8). Antibiotic sensitivity was assessed using the Kirby-Bauer disk diffusion assay. The test and control strains were seeded in Mueller-Hinton agar supplemented with 0.5% defibrinated sheep blood and 0.1% esculin (17). Commercially available disks (Bio-Rad) with the following antibiotics were used: ampicillin, cephalothin, cefotaxime, ceftazidime, cefuroxime, dicloxacillin, erythromycin, gentamicin, pefloxacin, penicillin, tetracycline, and trimethoprim-sulfamethoxazole. MICs at which 50% of the isolates were inhibited (MIC₅₀s) and MIC₉₀s were calculated by following the CLSI (formerly NCCLS) guidelines (11). *L. monocytogenes* ATCC 19114, *Escherichia coli* ATCC 29922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, and *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 strains were used as controls in all assays.

TABLE 1. Isolation of *Listeria* spp. from fish and seawater samples

Sample source (n)	No. (%) of positive samples	No. of strains					
		Total	<i>L. monocytogenes</i>	<i>L. innocua</i>	<i>L. ivanovii</i>	<i>L. seeligeri</i>	<i>L. welshimeri</i>
Fish (66)	15 (22.7)	81	10	29	10	28	4
Seawater (144)	44 (30.5)	191	58	81	23	7	22
Total (210)	59 (28.1)	272	68	110	33	35	26

* Corresponding author. Mailing address: Departamento de Biotecnología, División de Ciencias Biológicas y de la Salud, Universidad Autónoma Metropolitana, Michoacán y Purísima S/N, Col. Vicentina, C.P. 09340, México D.F., México. Phone: (52 55) 5804-4724. Fax: (52 55) 5804-4712. E-mail: cvs@xanum.uam.mx.

[∇] Published ahead of print on 15 September 2006.

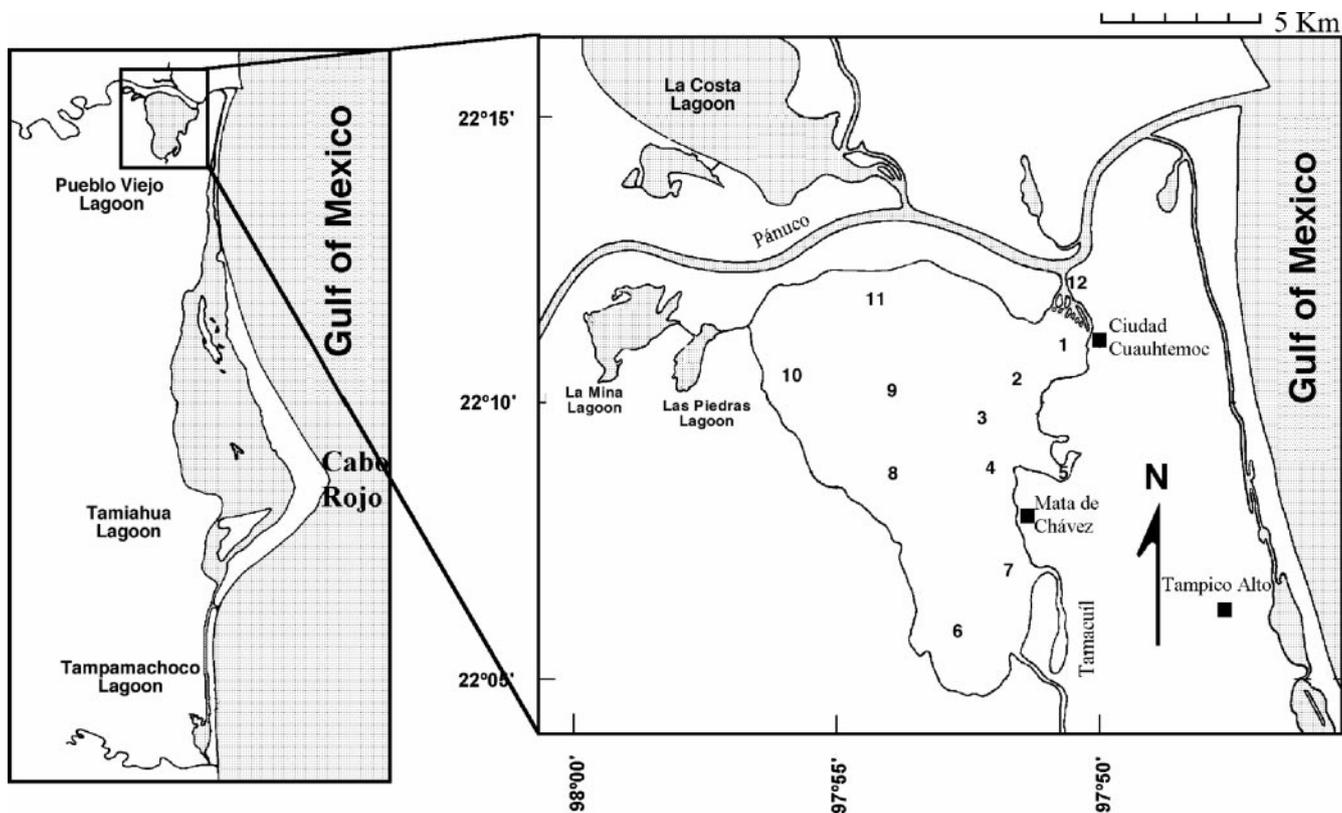


FIG. 1. Map of Pueblo Viejo lagoon in northeastern Mexico (reprinted from *Hidrobiológica* [3a] with the permission of the publisher).

Listeria spp. were not recovered from oyster samples, in accordance with the results of other studies (6). However, *Listeria* spp. were found in 22.7% and 30.5% of fish and estuarine water samples, respectively, while *L. monocytogenes* was identified in 3/66 (4.5%) fish samples and in 12/144 (8.3%) water samples (Table 1). Although *Listeria* spp. were initially reported as rarely found in water (3), isolation rates as high as 62% in estuarine freshwater samples have been found (6). *Listeria* sp. isolation frequencies were higher during the rainy seasons, because the increased water volume of the rivers draining into the lagoon reduce lagoon salinity, as occurs with some *Vibrio* species (10). Our results are comparable to those of Colburn et al. (6), who suggested a consistent input of *Listeria* spp. from freshwater tributaries draining into estuaries. The percent distribution of *Listeria* species isolated from seawater (Table 1) was greater than that of species isolated from fish products, although no species or serogroups were predominant at any specific sampling point, showing no evidence of direct influence of human activities or domestic animals near the lagoon.

Variance analysis showed no significant differences in isolation rates among the different sampling points ($P < 0.05$). Nonlinear regression analysis was used to determine the statistical significance of seasonal, salinity, temperature, and antibiotic sensitivity variations for *Listeria* isolates. Salinity clearly showed a negative correlation with *Listeria* recovery rates ($r = -0.88$; $P < 0.0001$), which dropped to zero at a salinity of 15 g/liter (Fig. 2). Temperature did not significantly influence recovery rates.

Because human listeriosis can be food borne, sensitivity and resistance of food isolates to antibiotics should be assessed. No *Listeria* isolates showed resistance to the β -lactam antibiotic cefotaxime, and only 5.9% showed resistance to gentamicin. Overall resistance frequencies for other antibiotics varied: 9.7% for dicloxacillin, 13.2% for cefuroxime and cephalothin, 16.7% for tetracycline, 30.9% for erythromycin, 37.4% for trimethoprim-sulfamethoxazole, 57.4% for penicillin, 60.3% for ampicillin, 67.6% for ceftazidime, and 73.5% for pefloxacin.

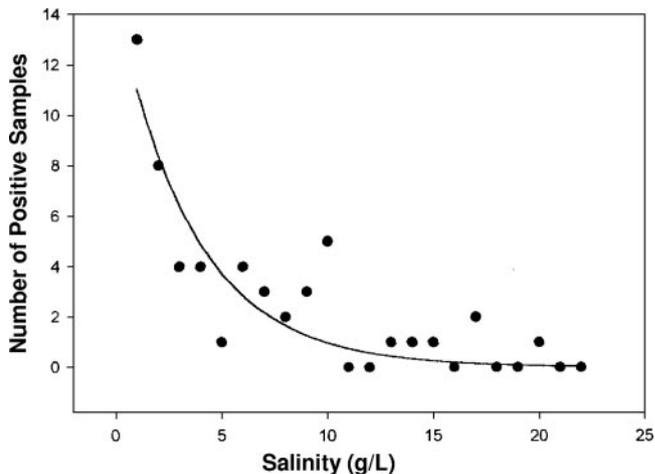


FIG. 2. Effect of salt concentration on the isolation rate of *L. monocytogenes* in estuarine water samples.

TABLE 2. Frequency of *Listeria* sp. isolates showing resistance to antibiotics as assessed by the Bauer-Kirby assay

Drug	Frequency (%) of resistance for:		
	<i>L. monocytogenes</i>	<i>L. innocua</i>	<i>L. ivanovii</i>
Ampicillin	23.7	56.6	5.0
Gentamicin	2.3	8.1	0
Cephalothin	26.7	45.7	6.9
Cefotaxime	0	0	0
Ceftazidime	14.4	31.8	4.6
Penicillin	22.5	46.8	1.7
Cefuroxime	5.2	19.6	2.3
Dicloxacillin	4.0	9.2	2.3
Pefloxacin	28.9	34.1	1.7
Erythromycin	12.1	19.6	6.3
Tetracycline	6.4	10.4	6.9
Trimethoprim/ sulfamethoxazole	12.7	19.1	1.7

Antibiotic resistance frequencies of individual *Listeria* species are shown in Table 2, and MICs for antibiotics are shown in Table 3. Importantly, 6% of *L. monocytogenes* strains isolated showed multiresistance to ampicillin, erythromycin, tetracycline, dicloxacillin, and trimethoprim-sulfamethoxazole. Multiresistant *L. monocytogenes* strains have been isolated from clinical (14) and other (5) sources. Although it was previously considered that multiresistant strains of *Listeria* spp. are not commonly found in nature, evidence of the emergence of multiresistant *L. monocytogenes* strains from various sources has been reported (15, 16, 18). Our results provide further evidence of the emergence of multiresistant strains in nature, representing a potential threat to human health.

In order to deal with potential *Listeria*-related public health problems, at-risk sites should be analyzed and control measures should be implemented. Pueblo Viejo lagoon is surrounded by small rural populations, some of which use latrines discharging feces into the lagoon. Furthermore, the waters of this lagoon are very shallow (only 1.5 m deep during the rain season), so that fisherman and dogs and other domestic animals can easily walk through it. The presence of antibiotic-resistant *L. monocytogenes* strains in these waters suggests that the bacterium is likely to be found in other ecosystems in

TABLE 3. MIC₅₀s and MIC₉₀s of 68 *L. monocytogenes* strains isolated from estuarine water and fish samples

Drug	MIC ₅₀ (μg/ml)	MIC ₉₀ (μg/ml)
Ampicillin	1.15	16.19
Erythromycin	4.04	11.98
Pefloxacin	0.165	17.67
Dicloxacillin	8.28	30.68
Trimethoprim/sulfamethoxazole	2.62	21.90

Mexico with similar sanitary and environmental conditions, posing a health risk for these populations.

REFERENCES

- Aureli, P., A. M. Ferrini, V. Mannoni, S. Hodzic, C. Wedell-Weergaard, and B. Oliva. 2003. Susceptibility of *Listeria monocytogenes* isolated from food in Italy to antibiotics. *Int. J. Food Microbiol.* **83**:325–330.
- Ben Embarek, P. K. 1994. Presence, detection and growth of *Listeria monocytogenes* in seafoods: a review. *Int. J. Food Microbiol.* **23**:17–34.
- Buchanan, R. L., H. G. Stahl, M. M. Bencivengo, and F. Del Corral. 1989. Comparison of lithium chloride phenylethanol-moxalactam and modified Vogel Johnson agars for detection of *Listeria* spp. in retail-level meats, poultry, and seafood. *Appl. Environ. Microbiol.* **55**:599–603.
- Castillo-Rivera, M., R. Zárate, and L. Sanvicente-Añorve. 2003. Patrones de la diversidad de peces en la laguna de Pueblo Viejo, Vera Cruz, México. *Hidrobiológica* **13**:289–298.
- Charpentier, E., and P. Courvalin. 1999. Antibiotic resistance in *Listeria* spp. *Antimicrob. Agents Chemother.* **43**:2103–2108.
- Charpentier, E., G. Gerbaud, C. Jacquet, J. Rocourt, and P. Courvalin. 1995. Incidence of antibiotic resistance in *Listeria* species. *J. Infect. Dis.* **172**:277–281.
- Colburn, K. G., C. A. Kaysner, C. Abeyta, Jr., and M. M. Wekell. 1990. *Listeria* species in a California coast estuarine environment. *Appl. Environ. Microbiol.* **56**:2007–2011.
- Hansen, J. M., P. Gerner-Smidt, and B. Bruun. 2005. Antibiotic susceptibility of *Listeria monocytogenes* in Denmark 1958–2001. *APMIS* **113**:31–36.
- Hitchens, A. D. 1995. *Listeria monocytogenes*, p. 10.1–10.13. In *FDA bacteriological analytical manual*, 8th ed. AOAC International, Arlington, Va.
- Miescier, J. J., D. A. Hunt, J. Redman, A. Salinger, and J. P. Lucas. 1992. Molluscan shellfish: oysters, mussels and clams, p. 897–917. In C. Vander Zant and D. F. Splittstoesser (ed.), *Compendium of methods for the microbiological examination of foods*. American Public Health Association, Washington, D.C.
- Motes, M. L., A. DePaola, D. W. Cook, J. E. Veazey, J. C. Hunsucker, W. E. Garthright, R. J. Blodgett, and S. J. Chirtel. 1998. Influence of water temperature and salinity on *Vibrio vulnificus* in northern gulf and Atlantic coast oysters (*Crassostrea virginica*). *Appl. Environ. Microbiol.* **64**:1459–1465.
- National Committee for Clinical Laboratory Standards. 1998. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. Eighth informational supplement. M100-S8.M2-A6. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Wayne, Pa.
- Paciorek, J. 2004. Antimicrobial susceptibilities of *Listeria monocytogenes* strains isolated from 2000 to 2002 in Poland. *Pol. J. Microbiol.* **53**:279–281.
- Pinner, R. W., A. Schuchat, B. Swaminathan, P. S. Hayes, K. A. Deaver, R. E. Weaver, B. D. Plikaytis, M. Reeves, C. V. Broome, and J. D. Wenger. 1992. Role of foods in sporadic listeriosis. II. Microbiologic and epidemiological investigation. *JAMA* **267**:2046–2050.
- Poyart-Salmeron, C., C. Carlier, P. Trieu-Cuot, A. L. Courtieu, and P. Courvalin. 1990. Transferable plasmid mediated antibiotic resistance in *Listeria monocytogenes*. *Lancet* **335**:1422–1426.
- Prazak, M. A., E. A. Murano, I. Mercado, and G. R. Acuff. 2002. Antimicrobial resistance of *Listeria monocytogenes* isolated from various cabbage farms and packing sheds in Texas. *J. Food Prot.* **65**:1796–1799.
- Schlegelova, J., V. Babak, E. Klimova, J. Lukasova, P. Navratilova, A. Sustackova, I. Sediva, and D. Rysanek. 2002. Prevalence of and resistance to anti-microbial drugs in selected microbial species isolated from bulk milk samples. *J. Vet. Med. Ser. B* **49**:216–225.
- Soriano, F., R. Fernández-Roblas, R. Calvo, and G. García-Calvo. 1998. In vitro susceptibilities of aerobic and facultative non-spore-forming gram-positive bacilli to HMR 3647 (RU 66647) and 14 antimicrobials. *Antimicrob. Agents Chemother.* **42**:1028–1033.
- Srinivasan, V., H. M. Nam, L. T. Nguyen, B. Tamilselvam, S. E. Murinda, and S. P. Oliver. 2005. Prevalence of antimicrobial resistance genes in *Listeria monocytogenes* isolated from dairy farms. *Foodborne Pathog. Dis.* **2**:201–211.
- Waak, E., W. Tham, and M. L. Danielsson-Tham. 2002. Prevalence and fingerprinting of *Listeria monocytogenes* strains isolated from raw whole milk in farm bulk tanks and dairy plant receiving tanks. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**:3366–3370.
- Walsh, D., G. Duffy, J. J. Sheridan, I. S. Blair, and D. A. McDowell. 2001. Antibiotic resistance among *Listeria*, including *Listeria monocytogenes*, in retail foods. *J. Appl. Microbiol.* **90**:517–522.

El jurado designado por la Comisión del Doctorado en Ciencias Biológicas
de la UAM (Unidades Cuajimalpa, Iztapalapa y Xochimilco)

aprobó la Tesis que presentó

SÓSTENES RAFAEL RODRÍGUEZ DEHAIBES

El día 6 de enero de 2011

Sinodales:

Dr. Pablo Corcuera Martínez del Río (Presidente)



Dra. Ma. Teresa Santillán Galicia (Secretaria)



Dr. Gabriel Otero Colina (Vocal)



Dr. Juan Antonio Villanueva Jiménez (Vocal)



Dra. Laura Guadalupe Espinosa Montaña (Vocal)



Dra. Laura Guadalupe Espinosa Montaña

Profesor Asociado "C" T. C.

F. M. V. Z.- Departamento de Producción Animal:

Abejas, Conejos y Organismos Acuáticos

Universidad Nacional Autónoma de México