

Tesis de Maestría

Identificación de *Listeria monocytogenes* y los genes *tet-A*, *tet-B*, *tet-C* y *erm-B* mediante PCR Multiplex en queso costeño artesanal en venta al por menor en el mercado público de Barranquilla en el periodo 2018 - 2019

Yoharis Esther Rodríguez Ospino

Barranquilla Atlántico - Colombia

2019

Universidad Simón Bolívar

Identificación de *Listeria monocytogenes* y los genes *tet-A*, *tet-B*, *tet-C* y *erm-B* mediante PCR Multiplex en queso costeño artesanal en venta al por menor en el mercado público de Barranquilla en el periodo 2018 - 2019

Tesis presentada al Programa de
Postgrado en Genética como
Requisito parcial para obtener
el grado de Maestría.

Yoharis Esther Rodríguez Ospino

Tutores:

MSc. Ludís Oliveros Ortiz

PhD. Antonio Acosta Hoyos

Barranquilla Atlántico - Colombia

2019

Dedicatoria

Esta dedicatoria va a mi querido y amado esposo Alexander Pulido por su sacrificio y esfuerzo en el día a día, para brindarme la oportunidad de seguir formándome y tener un mejor futuro como familia. A mis queridos hijos por ser esa fuente de inspiración y motivación para seguir luchando. A mis padres, hermanos y familiares por ser esa fuente de aliento donde me brindaron los mejores consejos en este proceso.

Agradecimientos

A JEHOVA por permitirme culminar con éxito uno de mis sueños más anhelados.

A Ludís Oliveros Ortiz y Antonio Acosta Hoyos por su disposición como directores, guía, motivación, consejos y apoyo permanente en todas las circunstancias.

A mi familia.

A mis amigos, compañeros y todas aquellas personas que aportaron su grano de arena y me ayudaron en la culminación de este sueño.

Resumen

Introducción: Las enfermedades transmitidas por alimentos (ETA) son causadas por diferentes microorganismos como bacterias, virus, hongos y parásitos, los cuales se adquieren por la ingesta de alimentos contaminados donde se encuentran los productos lácteos, embutidos y productos cárnicos. La *Listeria monocytogenes*, es una de las bacterias patógenas causante de ETA y el principal agente causante de listeriosis. La listeriosis afecta a población vulnerable como edades extremas, mujeres embarazadas, y pacientes inmunosuprimidos. Esta patología se caracteriza por ocasionar alteraciones gastrointestinales y complicaciones clínicas como bacteriemia, septicemia y meningitis, entre otras. El Objetivo de este estudio fue identificar el género, especie y los genes *tet-A*, *tet-B*, *tet-C* y *erm-B* en *Listeria monocytogenes*, mediante PCR Múltiple en queso costeño en ventas al por menor en el mercado público de Barranquilla. **Materiales y métodos:** Se recolectaron 54 muestras de queso costeño artesanal en el mercado público de Barranquilla entre 2018 y 2019. Para los procesos y procedimientos se realizó de acuerdo a lo descrito en el Manual Analítico Bacteriológico (BAM). La extracción del ADN bacteriano se realizó utilizando el kit DNA DNeasy aplicando el protocolo descrito por la casa comercial y la PCR Multiplex se realizó con el Termociclador CFX96, utilizando cebadores específicos para el gen 16S rRNA para identificar género y el gen *hylA* para la especie de la *Listeria monocytogenes*. Los productos de PCR se analizaron por electroforesis en gel de agarosa. **Resultados:** En esta investigación se identificó el género de *Listeria spp* en 12 de las 54 muestras de queso costeño donde 5 de estas resultaron positivas para *Listeria monocytogenes*. Además, se destaca que ninguna de las muestras identificadas con la especie de *Listeria monocytogenes* expresó los genes de resistencia a los antibióticos Tetraciclina y Eritromicina. Estos resultados fueron obtenidos tanto por métodos convencionales como por métodos moleculares, sin embargo, la identificación por métodos moleculares se obtuvo en 2 días, mientras que el método convencional fue 7 días. **Conclusión:** de acuerdo a los resultados obtenidos se puede

decir que el consumo de queso costeño artesanal en ventas al por menor en el mercado público de Barranquilla puede ser un factor de riesgo para desarrollar ETA y las complicaciones clínicas en la salud de la comunidad en general. Se sugiere realizar más investigación para identificar *Listeria monocytogenes*, en las distintas ventas al por menor en la región del Caribe colombiano.

Palabras clave: *ETA, Listeriosis, PCR, Zoonosis, Listeria monocytogenes.*

Abstract

Introduction: Foodborne diseases are caused by different microorganisms such as bacteria, viruses, fungi and parasites, which are acquired by the intake of contaminated food, including: dairy products and processed and unprocessed meat products. *Listeria monocytogenes* is one of the pathogenic bacteria that causes foodborne diseases and the main causative agent of listeriosis. Listeriosis affects the vulnerable population such as infants, children and the elderly, pregnant women, and immunosuppressed patients; this pathology is characterized by causing gastrointestinal disturbances and clinical complications such as bacteremia, septicemia and meningitis, among others. The aim of this study was to identify the genus, species and the antibiotic resistance genes *tet-A*, *tet-B*, *tet-C* and *erm-B* in *Listeria monocytogenes* by PCR Multiplex in unpasteurized cheese from retail sales in the public market of Barranquilla. **Materials and methods:** Fifty-four samples of handcrafted cheese were collected in the public market of Barranquilla between 2018 and 2019. For the collection and processing of the samples, it was done according to the Bacteriological Analytical Manual (BAM). The DNA was extracted with the DNAeasy kit (Qiagen, Copenhagen, Denmark) according to the manufacturing protocol. Multiplex PCR was performed with the CFX96 Thermocycler using primers specific to the *16S rRNA* gene for genus and the *hylA* gene for the *Listeria monocytogenes* species. The PCR product was analyzed by agarose gel electrophoresis. **Result:** In this investigation, the genus of *Listeria spp* was identified in 12 of the 54 samples of cheese and 5 of these samples were positive for *Listeria monocytogenes*. In addition, it is noted that none of the samples identified as *Listeria monocytogenes* expressed resistance genes to the antibiotics Tetracycline and Erythromycin. These results were obtained both by conventional methods and by molecular methods, however, identification by molecular methods was obtained in 2 days, while the conventional method was 7 days. **Conclusion:** According to our results, it can be said that the consumption of handcrafted cheese in retail sales from the public market of Barranquilla can be a risk factor for developing

foodborne diseases and clinical complications in the community in general. Further research is suggested to identify *Listeria monocytogenes* in the various retail sales in the Colombian Caribbean region.

Keywords: *Foodborne diseases, Listeriosis, PCR, Zoonosis, Listeria monocytogenes.*

Contenido

	Pág.
Resumen	5
Abstract	7
Lista de figuras	10
Lista de tablas	11
Introducción.....	12
1. Problema de Investigación	15
1.1 Planteamiento del Problema	15
1.2 Justificación	18
2. Objetivos	21
2.1 Objetivo General.....	21
2.2 Objetivo específicos	21
3. Marco Teórico	22
3.1 Antecedentes.....	22
3.2 Taxonomía.....	25
3.3 Etiología	25
3.4 Serotipificación	27
3.5 Factores de virulencia	27
3.6 Patogenia.....	30
3.7 Adhesión celular	30
3.8 Invasión Celular	31
3.9 Sobrevivencia, multiplicación y extensión célula-célulaObjetivo General.....	31
3.10 Epidemiología	33
3.11 Resistencia antibióticos	34
4. Diseño Metodológico	36
4.1 Tipo de Estudio.....	36
4.2 Muestra	36
4.3 Identificación del Género y Especie.....	36
4.3.1 Pruebas bioquímicas comerciales Microbact™ Listeria 12L	37
4.4 Identificación de Género y especie mediante PCR Multiplex.....	38
4.4.1 Extracción de ADN	38
4.4.2 PCR Multiplex	38
4.4.3 PCR para identificación de los genes <i>tet-A</i> , <i>tet-B</i> , <i>tet-C</i> y <i>erm-B</i>	39
5. Resultados	40
5.1 Identificación fenotípica.....	41
5.2 Identificación bioquímica	42
5.3 Identificación molecular PCR Multiplex.....	44
5.4 Identificación de los genes <i>tet-A</i> , <i>tet-B</i> , <i>tet-C</i> y <i>erm-B</i>	46
6. Conclusiones y Recomendaciones	47
7. Referencias Bibliográficas	49

Lista de figuras

	Pág.
Figura 1. Fisiopatogenia de <i>L. monocytogenes</i>	32
Figura 2. Cultivos y coloración de gram. a) Identificación <i>Listeria spp</i> y b) coloración de gran con presencia de bacilos gram positivos.....	42
Figura 3. Cultivos. a) control positivo ATCC 19115 y b) UFC de <i>Listeria monocytogenes</i>	42
Figura 4. Producto de PCR Multiplex.....	45
Figura 5. Flujo de trabajo para método convencional y PCR Multiplex	46

Lista de tablas

	Pág.
Tabla 1. Supervivencia de <i>L. monocytogenes</i>	26
Tabla 2. Serología de las principales especies de <i>Listeria</i>	27
Tabla 3. Cebadores para identificar género y especie de <i>Listeria monocytogenes</i>	39
Tabla 4. Listado de Primer, secuencias y tamaño del producto en PCR de detección de resistencia frente a tetraciclina.....	39
Tabla 5. Listado de Primer, secuencias y tamaño del producto en PCR de detección de resistencia frente a eritromicina	40
Tabla 6. Pruebas bioquímicas para identificación de <i>Listeria spp</i>	43
Tabla 7. Pruebas bioquímicas para identificación de <i>Listeria monocytogenes</i>	44

Introducción

Las enfermedades transmitidas por alimentos (ETA) están estrechamente relacionadas con el consumo de alimentos contaminados con gérmenes patógenos, que ocasionan alteraciones gastrointestinales y complicaciones clínicas. Los patógenos relacionados con ETA son bacterias, hongos, parásitos y virus que afectan al humano (1). La *Listeria monocytogenes* es un microorganismo emergente zoonótico, es un bacilo Gram positivo, anaerobio facultativo, móvil, no formador de esporas (2). *L. monocytogenes* tiene una amplia distribución en el medio ambiente, se encuentra presente en suelos, fuentes hídricas superficiales, aguas residuales, animales, frutas y vegetales; sin embargo, no hace parte de la microbiota del humano. Esta bacteria tiene la capacidad de sobrevivir en periodos de tiempo muy prolongados en el medio ambiente debido a su resistencia a distintas temperaturas (>0-45°C), a diferentes Ph (6-9) y altas concentraciones de sal, permitiendo que los alimentos logren contaminarse en cualquier estado de la cadena productiva e incluso cuando se almacena en frío (3).

Se estima que aproximadamente el 30% de las enfermedades infecciosas emergentes en los últimos 60 años han sido ocasionadas por la ingesta de alimentos, donde las bacterias aisladas con frecuencia son: *Salmonella spp*, *Listeria spp*, *Escherichia coli*, *Campylobacter spp*, *Brucellas spp*, entre otras; siendo el género *Listeria spp*, aislada con frecuencia de productos lácteos derivados de la leche cruda y el queso (3a). Además, en los últimos años, el consumo de queso ha sido una de las causas principales de *Listeriosis*. La *Listeria spp*, es una bacteria psicótrofa que suele encontrarse con mayor frecuencia en alimentos procesados contaminados, poco cocidos, crudos o sin pasteurizar (4)

(5). Según la Organización Mundial de Salud (OMS), la Listeriosis es una de las infecciones con menos frecuencia (0.1 a 10 casos anuales por millón de personas, dependiente de la zona geográfica) pero una de las más severas a nivel mundial, causante del 20 – 30 % de las muertes (6). Hasta el momento, se conocen 15 especies relacionadas con el género *Listerias spp*, donde la *Listeria monocytogenes* es la causante de graves enfermedades como alteraciones gastrointestinales causando diarrea, vómitos, también puede cuásar bacteriemia, septicemia y en mujeres embarazadas causa aborto, ya que tiene la capacidad de atravesar la barrera placentaria (7) (8) (9). Las técnicas microbiológicas convencionales son las más usadas para la identificación de *Listeria spp*, sin embargo, requieren de más tiempo que las técnicas moleculares a la hora de su identificación. La resistencia de *Listeria spp* a los antibióticos puede originarse por mutaciones o transferencia de genes que impiden al antibiótico cumplir su función (10). El objetivo de este estudio es identificar *Listeria monocytogenes* y los genes *tet-A*, *tet-B*, *tet-C* y *erm-B* mediante PCR Múltiplex en queso costeño hecho artesanalmente de ventas al por menor en el mercado público de Barranquilla.

1. Problema de Investigación

1.1 Planteamiento del Problema

La *Listeria monocytogenes* es un microorganismo emergente zoonótico con la capacidad de adherirse, colonizar, internalizarse, multiplicarse y diseminarse en células humana (epiteliales, endoteliales, hepáticas, fagocitos), provocando complicaciones clínicas (11). Este patógeno se caracteriza por atravesar las barreras vitales como la intestinal, la hemato - encefálica y la placentaria (12). Las manifestaciones clínicas clásicas son vómito, diarrea, fiebre y dolor muscular, pero en algunas ocasiones puede cursar de manera asintomáticas (7). La infección pasa desapercibida al relacionarse con procesos gripales, llevando a complicaciones más severas en la población vulnerable como es el caso de mujeres embarazadas, edades extremas e inmunocomprometidos (8). Dentro de las complicaciones clínicas puede presentar enteritis bacteriana, septicemia, meningitis y abortos espontáneos (13).

En la actualidad, las ETA constituyen un importante problema para la salud pública, debido al surgimiento de múltiples formas de transmisión y los distintos factores de riesgo que son importantes para la inocuidad de los alimentos; como son las malas condiciones de salubridad, fallas en las buenas prácticas de manufacturas, almacenamiento no adecuado, pérdida de la cadena en frío en el transporte de algunos alimentos, fallas en los controles microbiológicos y la ausencia de procedimientos para identificar los indicadores microbiológicos en los pequeños productores como se evidencia en las ventas artesanales de productos lácteos en mercados públicos. Estas fallas representan un impacto negativo de

gran escala a nivel socioeconómico, ya que los eventos positivos en humanos ocasionados por las ETA están altamente relacionados con la calidad higiénico-sanitaria de los alimentos (5). También, las condiciones culturales de algunos países juegan un papel importante en las ETA, debido a la ingesta de productos lácteos sin pasteurizar como queso, leche, mantequilla casera, además del consumo de carnes crudas o mal cocidas, lo que incrementa la tasa de morbilidad y mortalidad de este tipo de enfermedades (14) (15).

Existen diferentes técnicas para la detección de la *Listeria monocytogenes* en alimentos, donde las técnicas microbiológicas convencionales son las más usadas para la valoración cuantitativa y cualitativa de esta bacteria. Sin embargo, estas técnicas requieren de muchos días para la determinación del patógeno y en ocasiones no se puede detectar la bacteria porque algunas de ellas son de crecimiento lento. Esto, abre la puerta al uso de técnicas moleculares como la PCR Multiplex, la cual por su rapidez y alta probabilidad de detección (confiabilidad), permite especificar el género y la especie de la bacteria (16) (17) (18).

Estudios realizados en América latina en los periodos de 2007 a 2016 demuestran que los brotes reportados de ETA son en un 96% por el consumo de productos lácteos sin pasteurizar. En el 2017 en Lima Perú se encontró presente *Listeria monocytogenes* en 14 de 75 muestras de queso fresco, representando un 18.7% de las muestras analizadas (7).

En Colombia, el Sistema Nacional de Vigilancia en Salud Pública (SIVIGILA) reportó que las ETA están relacionados con microorganismos patógenos como *E. coli*, *Salmonella spp*, *Staphylococcus áureos*, *Clostridium spp* y *Listeria spp*, convirtiéndose en un problema de salud pública. Dichos estudios muestran que se ha incrementado los brotes de ETA en 2.5 % del 2016 al 2018, donde en el 2016 fueron 668 brotes mientras que en el 2018 fueron 881 brotes reportados en SIVIGILA, desde 6 regiones de Colombia. Además, en estos estudios, el queso

fue el principal agente causal de las ETA con un porcentaje de 19.4%, siendo el alimento de mayor consumo en la canasta familiar (4) (19). De los casos reportados recientemente en el SIVIGILA se destacan los siguientes brotes: en el 2017 se presentó 1 caso en Nariño por consumo de queso fresco, en el 2018, 4 brotes de los cuales en uno estuvo implicado el queso fresco y en el 2019, 3 fueron los casos reportados (uno por queso en Antioquia) (20) (21). Lo preocupante es que en diferentes regiones de Colombia no se tiene en cuenta seguimientos o controles adecuados en las ventas al por menor de alimentos del consumo de la canasta familiar. Aunque este hecho estimula el fácil contagio de las ETA en nuestro país, el porcentaje de mortalidad en Colombia por consumo de alimentos contaminados por *Listeria monocytogenes* es del 26%, mucho más bajo en comparación con otros países del mundo que alcanzan entre el 38% y 40% de mortalidad (22) (18).

Es menester de esta investigación identificar la *Listeria monocytogenes* en queso costeño de venta al por menor en el mercado público de Barranquilla, teniendo en cuenta que es de carácter obligatorio los controles microbiológicos en alimentos y específicamente en derivados lácteos. La ausencia de monitoreo por los entes encargados de verificar el cumplimiento de esta normativa en los pequeños productores y expendios minoristas, pone en riesgo la salud de los consumidores. Cabe resaltar que los distribuidores de este producto alimentario no tienen puestos fijos de venta al por menor, si no que cambian de puestos como estrategia de venta, siendo este un factor predisponente para contaminar a una mayor población; Además, las condiciones precarias de salubridad de los puntos de ventas al por menor, también convierte este producto en una fuente de infección para los consumidores.

Pregunta problema

¿Cuál es el beneficio del uso de la PCR Múltiple en la identificación de *Listeria monocytogenes* y los genes *tet-A*, *tet-B*, *tet-C* y *erm-B* en queso costeño artesanal en venta al por menor en el mercado público de Barranquilla?

1.2 Justificación

En los últimos años la *Listeria monocytogenes* se ha convertido en un agente patógeno que ha llamado la atención a nivel mundial. La alta resistencia a diferentes ambientes, el alto índice de brotes recientes y las complicaciones ocasionadas por esta bacteria, hace que su estudio sea mucho más frecuente. A través de los años los brotes de *Listeriosis* se han venido incrementando alrededor del mundo. La OMS en el 2010 reportó 23.150 casos de listeriosis por consumo de alimentos contaminados, siendo la *Listeria monocytogenes* el agente etiológico. En estos casos se reportaron un total de 5.453 muertes (23). Actualmente, se estima que, se enferman 600 millones de personas por ingerir alimentos contaminados, donde 420,000 mueren por esta causa y 125,000 corresponden a niños menores de 5 años. Asimismo, en estudios realizados en el año 2005 por investigadores estadounidenses, se encontró que en países como Estados Unidos se presentan aproximadamente 2500 casos y 500 muertes al año por causa de *Listeria monocytogenes* (24) (8). En el año 2014 se reportaron al Sistema Nacional de Vigilancia en Salud Pública (SIVIGILA) del Instituto Nacional de Salud en Colombia, un total de 9730 casos de enfermedades causadas por alimentos y aguas contaminadas, con la presencia de la *Listeria monocytogenes* en alimentos como la carne con un 33.9%, y las salchichas en un 7.69% (5). Todo lo anterior provoca una sobrecarga en los sistemas de salud a nivel mundial, lo que obstaculiza el desarrollo económico y social de los países. Se estima que el impacto económico sobre pasa los miles de millones de dólares en pérdidas en el comercio mundial y el turismo (25). Una de las más grandes preocupaciones con respecto a este patógeno es que la cultura de la región Caribe Colombiana, se caracteriza por consumir queso costeño hecho de forma artesanal. Al encontrarse este producto en ventas al por menor sin control sanitario y sin monitoreo de inocuidad, se convierte en una fuente de infección para la comunidad en general. Cabe destacar que la *Listeria monocytogenes* causa mastitis en el ganado bobino y en muchas ocasiones este proceso infeccioso no es atendido antes del ordeño y,

por lo tanto, la leche cruda es distribuida o utilizada para la elaboración del queso blanco fresco hecho artesanalmente.

Datos obtenidos entre los años 1995 y 2009 mostraron 11 brotes de *Listeriosis* asociados al consumo de quesos a nivel mundial, con 545 personas afectadas. Las tasas estimadas de mortalidad encontradas estuvieron entre el 14% y 30%, con un porcentaje de hospitalización del 100% (26). Estudios realizados en 2013 en Colombia muestran un reporte del 13.3% para *Listeria monocytogenes* aisladas en queso fresco artesanal (20). Asimismo, se ha demostrado que, en nuestro país, el queso fresco es uno de los productos con mayor fuente de contaminación por microorganismos patógenos, incluyendo la *Listeria monocytogenes*. Reportes presentados por investigadores de Universidad Libre de Barranquilla, demuestran casos positivos para *Listeria spp* en 13 de 17 muestras de queso recolectadas de diferentes regiones del país en el año 2013. Esto representa un 76.5% de casos positivos en las muestras recolectadas. Asimismo, los estudios pilotos realizados en queso de la Región Caribe Colombiana (provenientes de Atlántico, Magdalena, Bolívar, Córdoba y Sucre), vendidos en expendios mayoristas de la ciudad de Barranquilla para 27 muestras recolectadas en el primer semestre del año 2013, revelan la presencia de la *Listeria spp*, en el 66.6 % de las muestras procedentes del Atlántico, el 62.5 % de las muestras procedentes del Magdalena, el 100% de las muestras procedentes de Bolívar, el 100% de las muestras procedentes de Córdoba y el 100% de las muestras procedentes de Sucre. Aunque cabe destacar que en estos estudios no se realizaron muestreos probabilísticos para obtener el tamaño de las muestras analizadas (27).

El consumo de queso costeño es alto en los diferentes estratos sociales, por su fácil acceso, costo e importancia nutricional. Es un alimento hecho artesanalmente con leche de vaca cruda y por su condición físico-química lo convierte en un caldo de cultivo para la multiplicación de las bacterias. La mayoría de los pequeños productores de la costa atlántica desconocen y no aplican las buenas prácticas de manufacturas; además de las fallas en las condiciones de salubridad en el

procesamiento, almacenamiento, transporte y expendio de este producto. Lo anterior, convierte al queso fresco artesanal en un alimento fuente de infección, con un alto riesgo para la salud de los consumidores. Más compleja es la situación cuando la bacteria que contamina este tipo de alimento es portadora de plásmido; fragmento de ADN que le confiere resistencia a los antimicrobianos que se utilizan para su erradicación. Como se ha mencionado, Colombia no cuenta con un control efectivo o adecuado en la identificación de *Listeria monocytogenes* como agente causal de ETA (5) (22) (27). En este sentido, la oportuna identificación de la *Listeria monocytogenes* en ambientes que son altamente probables encontrarlas, por ejemplo, en ambientes con bajo control; como en los procesos de manipulación y almacenamiento de queso artesanal, favorece a la prevención de brotes y a las consecuencias perjudiciales en la salud de los consumidores, así como, la disminución de gastos hospitalarios como consecuencia de las ETA relacionada con la bacteria. Los diagnósticos oportunos no solo previenen las alteraciones en la salud a causa de la *Listeria* (enteritis bacterianas, bacteriemia o septicemia), sino que, además, evitan cualquier epidemia que pueda causar la muerte a personas altamente vulnerables (niños menores de 5 años, adulto mayor, pacientes inmunosuprimidos o mujeres embarazadas) (3). Es menester realizar este estudio para identificar la *Listeria monocytogenes* mediante técnicas moleculares como la PCR Multiplex para contar con una herramienta diagnóstica confiable, económica y oportuna, participando así en la implementación de programas para la prevención de brotes epidemiológicos, asimismo esta herramienta es útil para el monitoreo microbiológico en la inocuidad de los alimentos. Por las carencias de seguimientos de controles sanitarios y de calidad para la fabricación de los quesos hecho artesanalmente se convierte este en foco infeccioso lo que puede conllevar a brotes epidemiológicos causado por la *Listeria monocytogenes*. Con este estudio se permite realizar un monitoreo de esta bacteria en otro tipo de alimentos de consumo, para así determinar la epidemiología de este patógeno en la región del Caribe Colombiana.

2. Objetivos

2.1 Objetivo General

Identificar *Listeria monocytogenes* y los genes *tet-A*, *tet-B*, *tet-C* y *erm-B*, mediante PCR Multiplex en queso costeño artesanal en venta al por menor en el mercado público de Barranquilla.

2.2 Objetivos específicos

- Estandarizar las técnicas de PCR para la identificación de género, especie y los genes *tet-A*, *tet-B*, *tet-C* y *erm-B* en *Listeria monocytogenes*.
- Identificar género y especie de *Listeria monocytogenes* mediante PCR múltiplex y métodos microbiológicos convencionales en queso costeño artesanal de ventas al por menor en el mercado público de Barranquilla.
- Determinar los genes *tet-A*, *tet-B*, *tet-C* y *erm-B* en *Listeria monocytogenes* mediante PCR Multiplex en queso costeño artesanal de ventas al por menor en el mercado público de Barranquilla.

3. Marco Teórico

3.1 Antecedentes

Listeria monocytogenes es una especie del género *Listeria* con una gran distribución en el medio ambiente; como suelos, aguas contaminadas, tracto digestivo de animales, plantas, desagües, etc. (28).

La *Listeria* obtuvo su nombre en honor al microbiólogo inglés Joseph Lister (1865), quien descubrió que en pacientes expuestos a operaciones sin un control aséptico previo podría provocar infecciones por microorganismos, causando muertes en individuos en estado posoperatorio. Lister implementó métodos de limpiezas en las cirugías para evitar contaminación durante las operaciones quirúrgicas, usando medidas antisépticas como el fenol, sin embargo, inicialmente Lister no supo que se trataba de la *Listeria*. Solo años después de su muerte, los investigadores Murray, Webb y Swann en 1926, descubrieron en conejos bacterias similares a las identificadas por Lister, dándoles el nombre de *Bacterium monocytogenes*. Posteriormente, fueron muchos investigadores quienes estudiaron esta bacteria dándole diferentes nombres, hasta que en 1957 el Alemán Heinz Seeliger le dio como nombre *Listeria monocytogenes* usado hasta el día de hoy (29).

El género *Listeria* está clasificado actualmente por 15 especies reconocidas (*Listeria monocytogenes*, *Listeria seeligeri*, *Listeria ivanovii*, *Listeria welshimeri*, *Listeria marthii*, *Listeria innocua*, *Listeria grayi*, *Listeria fleischmannii*, *Listeria floridensis*, *Listeria aquatica*, *Listeria newis*, *Listeria roisiais*, *Listeria grandensis*, *Listeria riparia* y *Listeria booriae*) siendo la *L.*

monocytogenes un patógeno que afecta al ser humano debido a que es una bacteria intracelular. Esta condición le permite afectar células en el organismo como los fagocitos, los monocitos y las células epiteliales, ayudando a la bacteria a pasar de una célula a otra hasta atravesar la barrera intestinal, la barrera placentaria y la barrera hemato-encefálica, llegando a producir complicaciones severas (8) (30).

La *Listeriosis* es una enfermedad poco común pero muy grave, fue descubierta por primera vez en 1981 en Nueva Escocia (Canadá), en una ensalada de col contaminada con la bacteria *Listeria monocytogenes*, que tuvo un brote de 41 personas infectadas, dejando 18 muertes en un periodo de 6 meses. A partir de este brote, se identificó posteriormente la presencia de la bacteria en alimentos como queso, carne, pollo y pescado. Esta bacteria posee unos genes de virulencia que le permiten su sobrevivencia dentro del huésped, afectando a cualquier tipo de persona, con mayores consecuencias en pacientes más vulnerables (embarazadas, adultos mayores, recién nacido y pacientes inmunocomprometidos); convirtiéndola en un problema para la salud pública y la industria alimentaria a nivel mundial (31) (32).

Los métodos microbiológicos utilizados para la identificación de patógenos en alimentos son confiables, pero requiere de 7 a 9 días, para agilizar los procesos de identificación se ha implementado técnicas moleculares como la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) útil para la identificación de género, especie y genes de resistencia de patógenos en alimentos, herramienta importante para la implementación como método de identificación en los grandes y pequeños productores de alimentos listos para el consumo como es el queso artesanal.

Organismos como la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO) y la Organización Mundial de la Salud (OMS) establecieron el Codex Alimentario CAC/RCP 57-2004 con la finalidad de establecer controles en las medidas sanitarias en la producción de productos lácteos y de esta manera,

velar por la salud de los consumidores (33). En Colombia, el ministerio de Salud y el Instituto Nacional de Vigilancia de Medicamentos y Alimentos (INVIMA), a través de la resolución número 02310 de 1986, se encargan de establecer controles para el procesamiento, composición, transporte y comercialización de los derivados lácteos para garantizar un buen control sanitario y minimizar los riesgos de salud en los consumidores de los diferentes productos de la canasta familiar (34).

Se han realizado estudios para determinar la presencia la *Listeria spp* en alimentos listos para el consumo, donde la bacteria es capaz de crecer en entornos refrigerados y en altas temperaturas, hallándose en quesos, verduras, jamón, carnes, entre otros alimentos de mayor consumo en la canasta familiar (5) (35). El National Institute for Communicable Diseases (NICD) reportó que, entre enero 2017 y marzo 2018, se presentaron 978 casos de *Listeria* confirmados en Sudáfrica con 189 muertes, siendo el brote más grande de *Listeria spp* en la historia. Dentro de estos casos, el 91% de las cepas pertenecían a *Listeria monocytogenes*. Asimismo, se reportó que el 42% de los afectados fueron neonatos infectados durante el embarazo o en el parto. Se piensa que el brote fue provocado por el consumo de salchicha bolonio procesada en una fábrica local (36). Recientemente, en el mes de agosto del año 2019, Salud Pública de la Comunidad Autónoma de Andalucía en España notificó al Centro de Coordinación de Alertas y Emergencias Sanitarias del Ministerio de Sanidad, Consumo y Bienestar Social un brote de toxiinfección alimentaria por *Listeria monocytogenes*, asociado al consumo de carne mechada industrial elaborada por la empresa Magrudis S.L. En este reporte estuvieron implicados varios productos elaborados de carne mechada que habían sido consumidos por la mayor parte de los afectados que fueron confirmados como “positivo”. En total fueron 207 casos repartidos de la siguiente manera: 170 casos en Sevilla, 10 casos en Cádiz, 5 casos en Granada, 17 casos en Huelva y 5 casos en Málaga. En estos casos se presentaron 3 muertes de adultos mayores a 70 años, 3 abortos con menos de 22

semanas de gestación, 2 muertes fetales intrauterinas y 1 recién nacido infectado (37) (38) (39).

3.2 Taxonomía

La *Listeria monocytogenes* fue descubierta por primera vez en 1926 por el cirujano inglés Lord Lister, pero esta bacteria fue renombrada por muchos investigadores, hasta que en 1957 el Alemán Heinz Seeliger fue quien le dio nombre de *Listeria monocytogenes*. Es una bacteria que pertenece al género *Listeria* de la familia Listeriaceae, orden Bacillales, clase Bacilli, filo Firmicutes. Inicialmente estaba constituida por ocho especies, de bajo contenido de guanina y citosina (G+C): *L. innocua*, *L. welshimeri*, *L. grayi*, *L. seeligeri*, *L. ivanovii* (compuesta por dos subespecies: *L. ivanoviisubsp. ivanovii* and *L. ivanoviisubsp. londoniensis*), *L. monocytogenes*, *L. marthii* y *L. rocourtae*. *L. monocytogenes* es la responsable de la mayoría de casos de listeriosis en humanos (40).

3.3 Etiología

La bacteria *Listeria monocytogenes* perteneciente al género *Listeria* se caracteriza por ser un bacilo gram positivo de tamaño pequeño con medidas entre 0,4 – 0,5 de diámetro y 0,5 - 1.5 μm de longitud. No formadores de esporas, con presencia de flagelos que le permiten la movilidad dentro de las células del huésped y adherencia a diferentes superficies como plástico y acero, logrando así, formar la matriz de biopelículas que le permite sobrevivir en el medio ambiente. Es anaerobia facultativa, catalasa positiva, oxidasa negativa. La *Listeria monocytogenes*, a pesar de no presentar esporas, es resistente a los cambios fisicoquímicos logrando sobrevivir a temperaturas bajas ($\geq 1^{\circ}\text{C}$) y crecer a temperaturas altas ($\leq 45^{\circ}\text{C}$), siendo la temperatura óptima para su crecimiento de 30 a 37 $^{\circ}\text{C}$. Tiene la capacidad de crecer y desarrollarse en medios con pH entre 4 y 9 al igual que en medios de salinidad (ver Tabla 1). Esto ofrece condiciones idóneas de supervivencia a la *Listeria monocytogene*, en el medio ambiente, en

superficies, utensilios, alimentos como el queso por sus condiciones físico-químicas y alimentos listos para el consumo (8) (41). También puede sobrevivir en el medio ambiente y en ambientes de refrigeración, por lo tanto, son muy importantes los controles a nivel microbiológico en la industria alimentaria para así prevenir enfermedades causadas por *Listeria monocytogenes* (31). Las personas vulnerables, que son las más afectadas, presentan complicaciones severas a causa de este microorganismo. En este sentido, encontramos como principales vehículos de contaminación, la leche sin pasteurizar y los productos pre-envasados o envasados como el queso fresco artesanal, alimentos listos para el consumo y embutidos (42).

Tabla 1. Supervivencia de *L. monocytogenes*. Fuente: (31)

	Rango	Optimo
Atmosfera	Anaerobio facultativo crece en ambientes modificados	Anaerobio facultativo crece en ambientes modificados
Temperatura (°C)	1 -45	30 - 37
pH	4.0 – 9.0	6.0 – 8.0
Actividad d agua (aw)	> 0.90	0.995
Concentración de sal (NaCl %)	0.5 – 16	0.7

A pesar de que la especie de *Listeria monocytogenes* puede encontrarse en una gran variedad en la naturaleza, como ya ha sido mencionado, no es una de las causas más comunes de infecciones en el ser humano por la ingesta de alimentos contaminados. Esta especie puede provocar enfermedades invasivas o no invasivas; dependiendo del sistema inmunológico del hospedador. En personas sanas se presentan los casos de *Listeria* no invasiva en la forma de cuadros de gastroenteritis febril, mientras que los pacientes vulnerables pueden ocasionar complicaciones severas o muerte (6).

3.4 Serotipificación

En los avances investigativos de la secuenciación del genoma completo de la *Listeria monocytogenes* han sido identificados 4 linajes en donde la *Listeria* se caracteriza por presentar factores antigénicos (O) y flagelares (H). Estos factores dan origen a 13 serotipos (1/2a, 1/2b, 1/2c, 3a,3b, 3c, 4a,4ab, 4b, 4c, 4d, 4e, 7), de los cuales solo 3 serotipos (1/2a, 1/2b y 4b) han sido identificados como los responsables de las listeriosis en humano. Los 13 serotipos hacen parte una población estructurada en la bacteria *Listeria monocytogenes* donde se agrupan los 4 linajes (I, II, III y IV) (3).

La mayoría de los aislados de *L. monocytogenes* hacen parte del linaje I; el cual agrupa a los serotipos 1/2b, 3b, 4b, 4d y 4e y el linaje II; el cual agrupa a los serotipos 1/2a, 3a, 1/2c y 3c, b en donde los principales serotipos que ocasionan la listeriosis en humanos se agrupan en 2 linajes diferentes (1/2a, 1/2b y 4b), dentro del linaje I el serotipo 4b es el que tiene mayor porcentaje de los casos de listeriosis en humano. Siendo los linajes III Y IV raros y asociados a animales (3).

Tabla 2. Serología de las principales especies de *Listeria*. Fuente: (32)

Especie	Serovariedad
<i>L. monocytogenes</i>	1/2a, 1/2b, 1/2c, 3a, 3b, 3c, 4a, 4ab, 4b, 4c, 4d, 4e, "7"
<i>L. ivanovii</i>	5
<i>L. innocua</i>	4ab, 6a, 6b, In ^a
<i>L. weishimeri</i>	6a, 6b
<i>L. seeligeri</i>	1/2b, 4c, 4d, 6b, In

3.5 Factores de virulencia

Entre los genes que codifican los factores de virulencia en la bacteria *Listeria monocytogenes* encontramos a *prfA*, *plcA*, *mpl*, *plcB*, *actA*, *inlA*, *inlB*, *hyla* y *hpt*, los cuales se encuentran ubicados en la región del cromosoma llamado isla LIPI-1.

Esta región se encuentra insertada, en el cromosoma de forma estable, en la misma posición en todas las especies de *Listeria* (43). Dentro de las características de los genes mencionados tenemos, el gen *prfA* que codifica las proteínas *prfA* del factor de transcripción estructural, que va permitir activar genes de virulencia actuando con un activador o represor en la bacteria *Listeria monocytogenes*. El gen *plcA* que codifica las fosfolipasas C fosfatidilinositol específica (PL-PLC) que le permite a la bacteria desestabilizar los fagosomas primarios (3). El gen *mpl* codifica la proteasa *mpl*, que resuelve extracelularmente el pro péptido inactivo de la PL-PLC. El gen *hylA* que codifica una citolisina sulfidriilo activada (*listeriolisina O* - LLO) encargada de la ruptura a la vacuola fagocítica y liberar la bacteria dentro del citoplasma (44). El gen *actA* el cual codifica la proteína *actA*, factor encargado de la motilidad de célula a célula de la *Listeria monocytogenes* y el gen *plcB* que codifica las fosfolipasas C fosfatidilcolina determinada PC-PLC que media la disolución de la doble membrana de los fagosomas secundarios desarrollados después de la propagación célula a célula (13).

La proteína *prfA* va a regular la expresión y transcripción de la bacteria, proceso en el cual van a participar organizadores del gen *prfA* como el *prfAP1* y *prfAP2*. Estos van a generar niveles basales requeridos para la activación de los genes *plcA* que codifican las fosfolipasas C fosfatidilinositol (PL-PLC) permitiendo a la bacteria desestabilizar los fagosomas primarios (LLO) (3) (44).

La *Listeria monocytogenes* también cuenta con factores de virulencia que están representados por los genes conocidos como la internalina *InlA* y la internalina *InlB*, quienes no se encuentran codificados en la región LIPI-1, sino que se han asociado a islotes genéticos, los cuales también han sido identificados en otras especies de *Listeria*. La *InlA* y *InlB* van a facilitar la adhesión de la *Listeria monocytogenes* en el huésped. Además, estos genes aseguran su sobrevivencia en el medio ambiente, logrando así colonizar e infectar a los alimentos crudos o

listos para el consumo, entre ellos el queso fresco artesanal (45). Las internalinas *InIA* y *InIB* actuarán después de que la bacteria ha sido ingerida a través de los alimentos contaminados y atravesase la barrera gastrointestinal. Seguidamente, se iniciará un proceso de colonización por genes que se van adherir a las células epiteliales del hospedador E-cadherina para interactuar con las proteínas presentes en dichas células y así, originar la fagocitosis. Después de este suceso, la bacteria queda atrapada en una fagolisosomas donde actúa la listeriolisina O (LLO) junto con dos fosfolipasas C (PI-PLC y PC-PLC) (3) (43).

El movimiento que presenta la bacteria *L. monocytogenes* dentro de la célula del huésped se da por medio de filamentos de actina que van a inducir a la bacteria a trasladarse del citoplasma a las células vecinas. La bacteria quedara rodeada por una vacuola de doble membrana donde la listeriolisina O, junto con las fosfolipasas PC-PLC y PI-PLC, lisaran las vacuolas y darán lugar a otro período de infección celular, pasando así a torrente sanguíneo y provocando complicaciones en los pacientes que tengan el sistema inmunológico comprometido. Esto podría provocar septicemia y afecciones en el sistema nervioso central del huésped, asimismo puede llegar a provocar abortos en mujeres gestantes (46) (47).

Otro factor de virulencia que se asocia en la bacteria *Listeria monocytogenes* es la formación de biopelícula, la cual es una matriz formada de microorganismos patógenos que pueden adherirse a superficies como plástico, metal, cristal, alimentos y madera. Esta biopelícula, ofrece protección y condiciones nutricionales necesarias para la supervivencia de muchos microorganismos causante de enfermedades transmitidas por alimentos, incluyendo la *Listeria monocytogenes*. En este contexto, la *Listeria* tiene la capacidad de adherirse a superficies y crecer dentro de la biopelícula, permitiendo resistencia a agentes físicos y químicos a la bacteria, logrando que sobreviva en los alimentos o utensilios contaminados; lo que lo convierte en una gran preocupación para la industria alimentaria, ya que facilita la contaminación de alimentos listos para el consumo (48) (49) (50).

3.6 Patogenia

La *Listeria monocytogenes* es un patógeno intracelular que puede sobrevivir a diferentes condiciones del medio ambiente donde sus vías de ingreso son fecal-oral, animal-hombre y madre-feto siendo su principal vía de infección la oral en donde es ingerido el alimento contaminado por el microorganismo infectante con inóculo entre 10^4 - 10^6 UFC llegando al tracto gastrointestinal permitiéndole a la bacteria llegar a su primer sitio de entrada que es la barrera intestinal donde traspasan las células epiteliales y luego pasa al sistema linfático para más tarde pasar al sistema circulatorio diseminándose así a distintos órganos (3). El proceso cuenta con varios períodos infecciosos que se puede presentar en un paciente donde su sistema inmunológico no sea inmunocompetente.

3.7 Adhesión celular

La adhesión a la célula del hospedador es una etapa primordial en el proceso infeccioso, en ella participan varios factores como internalinas A e internalinas B (InIA, InIB) de la *Listeria monocytogenes* en unión con las células E-caderina del hospedador; facilitando el ingreso de la bacteria a las células intestinales y posteriormente a la sangre. Las internalinas son proteínas que corresponden a una súper-familia en la que están presentes proteínas como *Lap*, *Ami*, *InIJ*, que le permiten proceder en el proceso de infección. *Lap* es una proteína nombrada como proteína 104, que está presente en todas las especies de *Listeria spp*, a excepción de *Listeria grayi*, la proteína *InIJ*, corresponde a la familia de las internalinas (*InI*), cuya expresión es provocada *in vivo* y actúa como una adhesina que se une covalentemente al peptidoglucano, la unión se realiza mediante la enzima sortasa A (*SrtA*). Esta enzima va a reconocer sitios específicos con motivos LPXTG característicos, la enzima *SrtA* es de trascendental importancia para la detención superficial de la internalina A (InIA) y el ingreso de *Listeria monocytogenes* a las células epiteliales (13).

3.8 Invasión celular

Diferentes factores de virulencia participan en cada etapa del ciclo invasivo de la *Listeria monocytogenes*. Las proteínas necesarias para el ingreso e invasión a la célula del hospedador son conocidas como *InIA* y *InIB*, las cuales se unen al peptidoglucano y a las moléculas de ácidos lipoteicoicos logrando la invasión. La *InIA* se va unir al receptor de E-cadherina logrando invadir las células epiteliales. La E-cadherina es una glucoproteína de transmembrana dependiente de Ca^{+2} regulada por el gen de la cadherina (*CDH1*), localizado en el cromosoma 16q22.1. *InIA* y *InIB* se adherirán a la E-cadherina del epitelio y a los receptores Met del hospedador, respectivamente, para iniciar su multiplicación. Luego de esta unión, las internalinas A y B con sus receptores E-cadherina y Met formarán una fosforilación y activación de proteínas para la reorganización del citoesqueleto y así, diseminarse de célula a célula hasta llegar a otras partes del organismo, como a la barrera placentaria y hemato-encefalica. Como se puede ver, las *InIA*, *InIB*, E-cadherina y Met, son los principales factores de virulencia implicados en la invasión celular, y por lo tanto, las responsables de la activación de la cascada de señales que conlleva a la polimerización de los filamentos de actina, proceso fundamental para la internalización e invasión de *L. monocytogenes* (43).

3.9 Sobrevivencia, multiplicación y extensión célula-célula

Una vez esté la bacteria en el interior de la célula fagocitada va hacer lisada por la toxina listeriolisina O (*LLO* en conjunto de dos fosfolipasas C (*PLC*): fosfatidilinositol (*PI-PLC*) y fosfatidilcolina (*PC-PLC*), que van hacer codificadas por los genes (*plcA* y *plcB*). *LLO* es una toxina dependiente de colesterol, codificada por el gen *hylA*, capaz de formar poros en la membrana de los fagosomas, permitiendo que *L. monocytogenes* escape de las vacuolas primarias y secundarias (13). Cuando la bacteria *L. monocytogenes* está libre en el citosol expresará genes necesarios para adquirir los nutrientes y llevar a cabo su

multiplicación intracelular. Se ha determinado que el gen *hpt*, que codifica para el transporte de hexosa 6-fosfato, es trascendental para el óptimo crecimiento intracelular de *Listeria*. Al instante de la replicación de la bacteria se estimula la polimerización de filamentos de actina en uno de los extremos de la bacteria; proceso regido por la proteína *ActA*. Se forma una estructura parecida a una cola de cometa facilitando el movimiento intracelular, cediendo la invasión a células vecinas, mediante un proceso que envuelve la formación de una protrusión que sujeta a la bacteria rodeada por una vacuola de doble membrana, la cual es lisada por *PC-PLC*, *PI- PLC* y *LLO* (Figura 1) (44) (51).

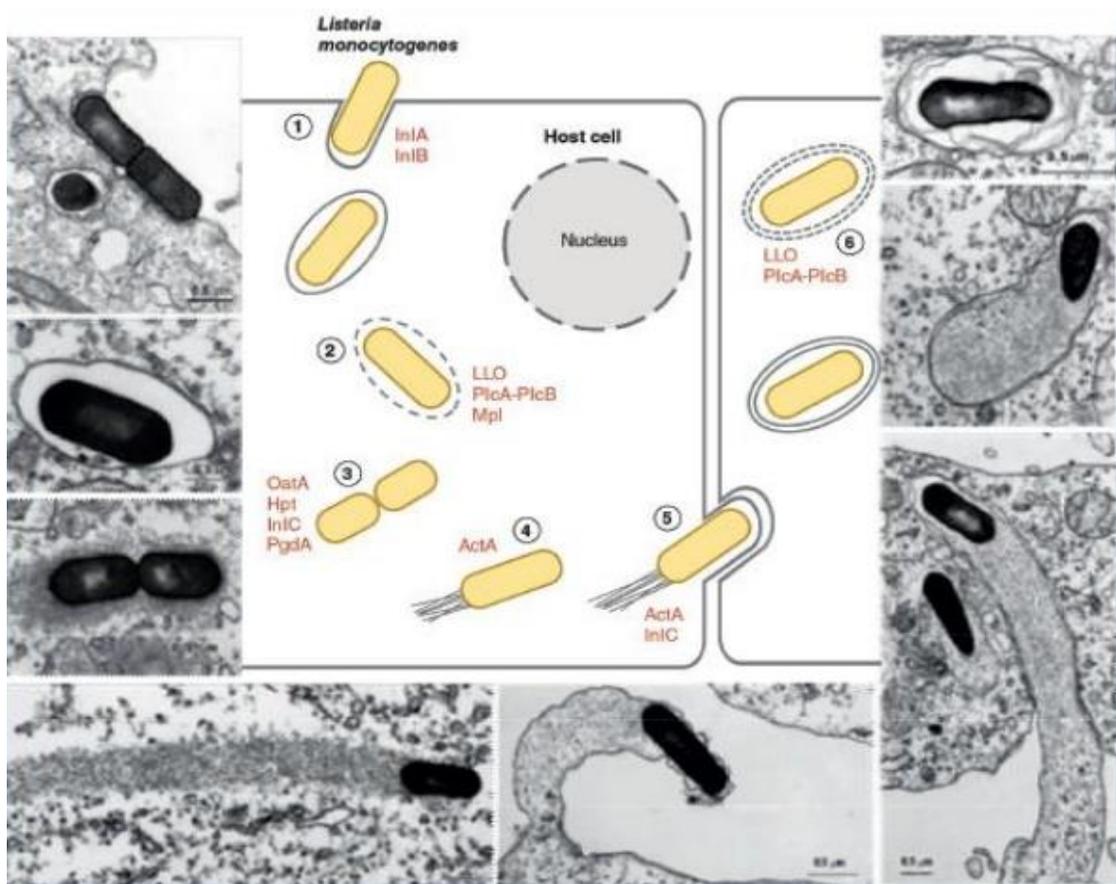


Figura 1. Fisiopatogenia de *L. monocytogenes*. Fuente: (52)

Una vez que la bacteria ingresa al hospedador, las proteínas Int A y B se van a unir a los receptores E- caderina y *Met*, logrando así escapar de la vacuola

fagocítica por medio de la LLO toxina, que produce la bacteria junto con las proteínas llamadas *PC-PLC* y *PI- PLC*, formando poros y escapando al citosol logrando su supervivencia y su diseminación de célula a célula.

3.10 Epidemiología

La *Listeria* hace parte de los microorganismos causantes de ETA, con una tasa de mortalidad de entre un 20% y 30%. El primer caso de brote de listeriosis se originó en el año 1981 en Canadá, cuando un grupo de personas consumieron col contaminada con *Listeria monocytogenes*. En este primer brote se presentaron 41 casos positivos, con 18 muertes registradas un lapso de 6 meses, 2 adultos y 16 neonatos. Seguido a este primer brote en Canadá, se descubrieron más casos de alimentos contaminados por *Listeria monocytogenes*, donde los alimentos implicados fueron el queso, las carnes frías, el pescado, la leche, convirtiéndola en una nueva fuente de epidemia (32).

En Europa, se notificaron aproximadamente 2200 casos de Listeriosis para el año 2015, provocando la muerte de 270 personas; uno de los valores más altos reportados en la Unión Europea. En el 2016, se reportaron 2555 casos y 247 muertes por Listeriosis, donde Alemania con 697 casos y Francia 375 casos fueron los países con mayor incidencia (35). Recientemente, El National Institute for Communicable Diseases (NICD) reportó 978 casos de *Listeria* en Sudáfrica con 189 muertes entre enero 2017 y marzo 2018; siendo el brote más grande de *Listeria* en la historia. Los estudios mostraron que el 91% de las cepas analizadas pertenecían a *Listeria monocytogenes*. También, se reportó que el 42% de los afectados fueron neonatos infectados durante el embarazo o en el parto (36). Asimismo, el Ministerio de Sanidad, Consumo y Bienestar Social de España reportó 207 casos por *Listeria monocytogenes* en el mes de agosto del año 2019, todos asociados al consumo de carne mechada industrial. Los brotes presentados mostraron una frecuencia de 170 casos en la ciudad de Sevilla, 10 casos en la

ciudad de Cádiz, 5 casos en la ciudad de Granada, 17 casos en la ciudad de Huelva y 5 casos en la ciudad de Málaga (37).

Por su parte, el sistema de vigilancia epidemiológico de Colombia ha realizado un estudio donde notifica que las enfermedades transmitidas por alimentos en el periodo de 2000 – 2012 tuvieron un crecimiento de 2983 a 11836 casos, no siendo estos todos los casos notificados, confirmados e investigados por partes de salud pública, siendo de mucha importancia investigar y esclarecer las enfermedades transmitidas por alimentos para así tomar un control de los posibles factores que estén causando los brotes y tomar medidas preventivas ante las situaciones que se presenten (41).

3.11 Resistencia antibióticos

La resistencia de la *L. Monocytogenes* a los antibióticos se ha convertido en un problema para la salud pública a nivel mundial, dificultando los tratamientos terapéuticos.

Dentro de los antibióticos utilizados en pacientes que cursan con listeriosis se encuentran los β -lactámicos como la penicilina G, las cefalosporinas (de primera a tercera generación), los carbapenémicos, estos pueden ser usados solos o en combinación con aminoglucósidos. El mecanismo de acción de estos antibióticos actúa en la inhibición de la síntesis de la pared celular y la inducción de la autólisis de la bacteria (53) (54). Una de las características de la *Listeria monocytogenes* es la presencia de un regulador conocido como *VirR*, siendo este responsable de la activación del gen *mprf* que está implicado en la modificación de fosfolípidos y proporciona resistencia a péptidos antimicrobianos catiónicos (13). Además, este mismo regulador *VirR* codifica el gen *dlt* involucrado en la D-alanilación de ácidos teicoicos permitiendo el rechazo de péptidos catiónicos generando una resistencia innata a la nisina, permitiendo que algunas cepas de estas bacterias presenten resistencia y multiresistente a los antibióticos β -lactámicos (55).

Otros de los antibióticos utilizados para la erradicación de *Listeria monocytogenes* son las tetraciclinas y la eritromicina, aunque se ha reportado una alta resistencia a este tipo de antibióticos debido a la presencia de los genes *tet-A*, *tet-B*, *tet-C* y *erm-B*, dando lugar a algunos mecanismos de resistencia como inactivación enzimática, protección ribosomal o bomba de eflujo (56) (13). Este proceso de resistencia también se debe el uso inadecuados de los antibióticos en los tratamientos médicos a largo plazo en humanos, veterinaria, el no control de las ventas de estos medicamentos para tratar infecciones, son factores predisponentes para que la *Listeria monocytogenes* pueda desarrollar resistencia a los antimicrobianos. La distribución de este patógeno a nivel de la comunidad, suelo, aguas superficiales y el entorno social, se convierte en un riesgo para la salud en humanos y animales (32). Por lo anterior, es indispensable tener un buen uso y control de los antibióticos como medida preventiva para la resistencia de este patógeno.

4. Diseño Metodológico

4.1 Tipo de Estudio

La investigación se desarrolló bajo el marco de estudio experimental.

4.2 Muestra

Se recolectaron 54 muestras de distintos tipos de queso costeño en el mercado público de Barranquilla. Para la toma y recolección de la muestra se hizo teniendo en cuenta lo descrito en el Manual de Análisis Bacteriológico (BAM) de la FDA (57). Se tomó 250 gr de queso costeño en cada uno de las ventas al por menor en el mercado público y se depositó en bolsas estériles con cierres herméticos y rotulados. Las muestras de queso se almacenaron en nevera portátil con hielo seco y se trasladaron al laboratorio de la unidad de Genética de la Universidad Simón Bolívar.

4.3 Identificación del Género y Especie

Para la identificación de género y especie de la *Listeria monocytogenes*, en queso costeño, se hizo de acuerdo a lo descrito en el Manual de análisis Bacteriológico (BAM). Se pesó 25gr de queso tomando la muestra de la superficie, se depositó en bolsa estéril con 225 ml de caldo Fraser para pre-enriquecimiento y se incubó a 35°C por 12 horas en el Shaker MAXQ 4450 (ThermoScientific) a 190 rpm. Pasado el periodo de incubación se tomó 2 ml del caldo de cultivo, se colocó en

tubo falcón con 3 ml de caldo Fraser suplementado estéril y se incubó a 35°C por 12 horas en el Shaker a 190 rpm. Después del tiempo de incubación se tomó 2 ml del caldo de cultivo y se realizó la extracción de ADN. Además, se utilizó caldo de cultivo para sembrar por agotamiento en el agar Palcam. Fueron incubadas durante 24 horas a 35°C, Trascurrido el tiempo se realizó las pruebas de identificación bioquímicas comercial mediante kit MICROBACT – LISTERIA 12L. Se incubó nuevamente a 35°C por 24 horas y se realizó también pruebas de catalasa, oxidasa, movilidad y coloración de gram. el control positivo utilizado fue ATCC 19115 de *Listeria monocytogenes* y para el control negativo fue ATCC 01452 de *Escherichia Coli*.

4.3.1 Pruebas bioquímicas comerciales Microbact™ Listeria 12L

El Microbact listeria 12L es útil para la identificación de la *Listeria monocytogenes* porque se basa en los cambios de Ph y la utilización de los sustratos. En la presente investigación, para aplicar las pruebas bioquímicas comerciales, se tomaron 5 colonias del cultivo de agar Palcam con características específicas de la *Listeria ssp* (colinas pequeñas de color gris) y se mezclaron al vial Microbact™ Listeria 12L. Posteriormente, se agregaron 100ul de la suspensión bacteriana a cada pozo de una tira reactiva. Al pocillo número 12 de la tira reactiva, se le agregaron 100ul de hemolisina, incubándose 24 horas a 35 °C (58).

Aunque la aplicación de esta prueba bioquímica no es el objetivo central de la presente investigación, la sección de resultados muestra lo analizado en la prueba Microbact™ Listeria 12L comparado con la prueba PCR Multiplex. (Ver sesión 5 de resultados).

4.4 Identificación de Género y especie mediante PCR Multiplex

4.4.1 Extracción de ADN

En la extracción total del ADN, se tomó 1 ml del cultivo líquido, se centrifugó por 10 minutos a 8000 rpm, se descartó el sobrenadante y se utiliza el kit DNeasy (Qiagen, Copenhague, Dinamarca) siguiendo lo descrito en el protocolo del fabricante. Después de la extracción, el ADN se guardó a - 20°C para su posterior uso.

4.4.2 PCR Multiplex

En la identificación molecular de la *Listeria monocytogenes* mediante PCR Multiplex convencional, se utiliza ADN total, los cebadores son dirigidos al gen 16S rRNA para identificar género y el gen *hylA* específicos para identificar especie. La calidad del ADN extraído y utilizado se determinó mediante la relación A260/A280 a través de un espectrofotómetro (NanoDrop). El Termociclador utilizado fue el CFX96 (Sistema Bio- RAD). Se utilizó el máster mix Platinum PCR 2X MM (Invitrogen) y la cantidad de cada uno de los cebadores utilizados se hace de acuerdo a lo descrito en el protocolo de la casa comercial. La concentración de ADN utilizada fue de 0,487 ng/ul. El volumen de la reacción fue 25 ul. La temperatura y los ciclos fueron controlados de la siguiente manera: 1 minuto a 95°C, seguido de 30 ciclos compuestos por 30 segundos a 94°C, 20 segundos a 51°C, 30 segundos a 72°C y un proceso final de extensión de 8 minutos a 72°C. En cada análisis de PCR Multiplex, se incluyó la cepa *Listeria monocytogenes* ATCC 19115 como control positivo y para el control negativo se utilizó ATCC 25922 de *E. coli* (59). Para visualizar el producto de la PCR, se corrió electroforesis en gel de agarosa al 2%. La Tabla 3 presenta los cebadores utilizados para la identificación del género y la especie de la bacteria.

Tabla 3. Cebadores para identificar género y especie de *Listeria monocytogenes*.

Fuente: (9)

Genes	Identificación	Secuencia	Pb
<i>ARN-16S-F</i>	Género	<i>CTCCATAAAGGTGACCCT</i>	938
<i>ARN-16S-R</i>		<i>CAGCMGCCGCGGTAATWC</i>	
<i>hyla -F</i>	Especie	<i>CAAACGTTAACAACGCAGTA</i>	750
<i>hyla-R</i>		<i>TCCAGAGTGATCGATGTTAA</i>	

4.4.3 PCR para identificación de los genes *tet-A*, *tet-B*, *tet-C* y *erm-B*

La identificación de resistencia a antibióticos por medio de PCR, se utilizaron ADN de *Listeria monocytogenes* y los cebadores específicos para los genes *tet-A*, *tet-B*, *tet-C* y *erm-B* descritos en las Tablas 4 y 5. Para esto, se empleó el Termociclador CFX96 (Sistema Bio- RAD). El volumen final de la reacción de la PCR fue de 25 ul. La temperatura y los ciclos fueron controlados de la siguiente manera: 1 minuto a 95°C, seguido de 30 ciclos compuestos por 30 segundos a 94°C, 20 segundos a 51°C, 30 segundos a 72°C y un proceso final de extensión de 8 minutos a 72°C. Con el producto final de la PCR, se realizó la electroforesis en gel de agarosa 2% (9).

Tabla 4. Listado de Primer, secuencias y tamaño del producto en PCR de detección de resistencia frente a tetraciclina. Fuente: (60)

Primer	Secuencia	Producto
<i>tet-(A) - F</i>	<i>GGCGGTCTTCTTCATCATGC</i>	502 pb
<i>tet-(A) - R</i>	<i>CGGCAGGCAGAGCAAGTAGA</i>	
<i>tet-(B) - F</i>	<i>CGCCCAGTGCTGTTGTTGTC</i>	173 pb
<i>tet-(B) - R</i>	<i>CGCGTTGAGAAGCTGAGGTG</i>	
<i>tet-(C) - F</i>	<i>GCTGTAGGCATAGGCTTGGT</i>	888 pb
<i>tet-(C) - R</i>	<i>GCCGGAAGCGAGAAGAATCA</i>	

Tabla 5. Listado de Primer, secuencias y tamaño del producto en PCR de detección de resistencia frente a eritromicina. Fuente: (61)

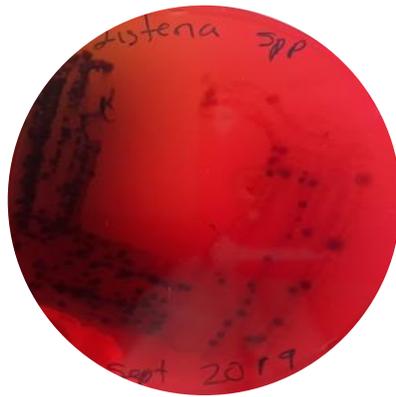
Primer	Secuencia	Producto
<i>erm(B)</i> - F	GAT ACC GTT TAC GAA ATT GG	364 pb
<i>erm(B)</i> - R	GAA TCG AGA CTT GAG TGT GC	

5. Resultados

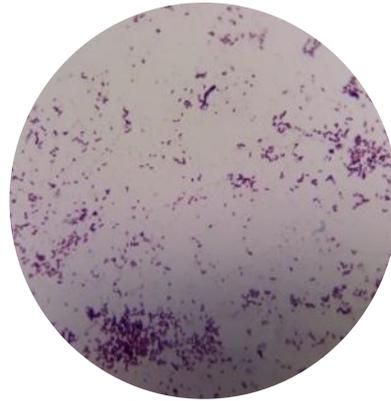
Para la identificación de *Listeria monocytogenes* en queso costeño artesanal de venta al por menor en el mercado público de Barranquilla se utilizaron y se compararon métodos convencionales microbiológicos con el ensayo molecular de PCR Multiplex. Además, se utilizó la técnica de PCR Multiplex para la identificación de los genes *tet-A*, *tet-B*, *tet-C* y *erm-B*.

5.1 Identificación fenotípica

De las 54 muestras de queso obtenidas y cultivadas en agar Palcam, medio selectivo para *Listeria*, 24 muestras presentaron colonias de color gris a verde grisáceo con halo de color marrón a negro en el medio, indicando fenotipo característico del género *Listeria* (Figura 2a). Posteriormente, se realizó coloración gram a las 24 muestras sospechosas y se observó bacilos gram positivos en 12 muestras como se evidencia en la Figura 2b. De las 12 UFC identificadas con características de *Listeria spp* en el medio Palcam, 5 muestras presentaron cambio del PH, convirtiendo el medio de color rojo a amarillo, posiblemente debido a la metabolización de ramnosa, manosa y glucosa actividades indicadoras de *Listeria monocytogenes* (Figura 3). Para confirmar los hallazgos descritos anteriormente, se procedió a realizar las pruebas de catalasa, oxidasa y movilidad como se describen a continuación.



(a) Identificación *Listeria spp*

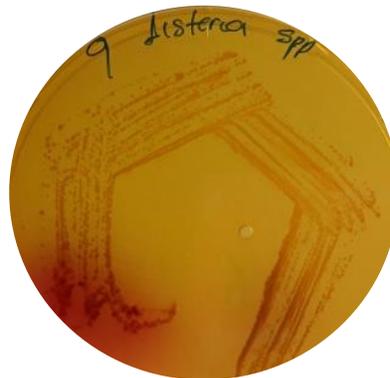


(b) Coloración de Gram

Figura 2. Cultivos y coloración de gram. a) Identificación *Listeria spp* y b) coloración de gram con presencia de bacilos gram positivos.



(a) Control Positivo



(b) Identificación *L. Monocytogenes*

Figura 3. Cultivos. a) control positivo ATCC 19115 y b) UFC de *Listeria monocytogenes*

5.2 Identificación bioquímica

Se realizaron las pruebas de catalasa, oxidasa y movilidad (SIM) establecidas como prueba estándar para identificación de *Listeria* (57). La tabla 6 muestra que los 12 cultivos identificados fenotípicamente como *Listeria spp* fueron catalasa positiva, oxidasa negativa y SIM positivo, revalidando que estos cultivos eran

Listeria spp. A continuación, se utilizó la prueba bioquímica comercial Microbact™ *Listeria* 12L diseñada específicamente para la detección de *L. monocytogenes* (58), con el fin de dar soporte a los análisis microbiológicos descritos arriba. Los resultados de las pruebas bioquímicas realizados a las 12 muestras positivas para *Listeria spp* se describen en la Tabla 7. Las muestras de queso 8, 28, 34, 39 y 53 resultaron en esculina positivo, manitol negativo, xilosa negativo, arabitol positivo, ribosa negativo, ramnosa positivo, trealosa positivo, taganosa negativo, glucosa 1 fostato negativo, glucosa positivo, manosa positivo y hemolisis positivo, confirmando estas bacterias como *L. Monocytogenes* ratificando el resultado fenotípico (Figura3).

Tabla 6. Pruebas bioquímicas para identificación de *Listeria spp*

	Catalasa	Oxidasa	SIM	Tinción de Gram	Crecimiento en medio Palcam	<i>Listeria spp</i>
8	+	-	+	B +	+	X
9	+	-	+	B +	+	X
10	+	-	+	B +	+	X
25	+	-	+	B +	+	X
26	+	-	+	B +	+	X
27	+	-	+	B +	+	X
28	+	-	+	B +	+	X
34	+	-	+	B +	+	X
39	+	-	+	B +	+	X
40	+	-	+	B +	+	X
46	+	-	+	B +	+	X
53	+	-	+	B +	+	X

Tabla 7. Pruebas bioquímicas para identificación de *Listeria monocytogenes*

	Esculina	Manitol	Xilosa	Arabitol	Ribosa	Ramnosa	Trealosa	Tagatosa	Glucosa-1 fosfato	M-D-Glucosa	M-D-Manosa	Hemolisis	<i>Listeria monocytogenes</i>
8	+	-	-	+	-	+	+	-	-	+	+	+	x
9	+			+			+						
10	+			+			+						
25	+			+			+						
26	+			+			+						
27	+			+			+						
28	+	-	-	+	-	+	+	-	-	+	+	+	x
34	+	-	-	+	-	+	+	-	-	+	+	+	x
39	+	-	-	+	-	+	+	-	-	+	+	+	x
40	+			+			+						
46	+			+			+						
53	+	-	-	+	-	+	+	-	-	+	+	+	x

5.3 Identificación molecular por PCR Multiplex

Para la identificación de *L. monocytogenes* mediante PCR Multiplex se utilizó el gen 16S RNA específico para identificar género en combinación con el gen *hylA* específico para la especie de *L. monocytogenes* (59). Se extrajo ADN total de los 54 cultivos pre-enriquecidos por 24 horas como se describe en el diseño metodológico y se procedió con el PCR Multiplex. En la Figura 4 se observan 5 muestras correspondientes a *L. monocytogenes* evidenciado por la presencia de 2 bandas, 1 banda de 938 pb correspondiente al gen 16S RNA y otra banda de 750 pb del gen *hylA*. Estos resultados concuerdan con los resultados obtenidos mediante las pruebas convencionales. Sin embargo, la identificación por PCR Multiplex tomó un tiempo de 2 días versus 7 días que demoró las pruebas convencionales indicando la importancia de emplear análisis moleculares para la identificación específica de bacterias de interés industrial y clínico. La figura 5 muestra el flujo de trabajo comparando las 2 metodologías utilizadas en este estudio.

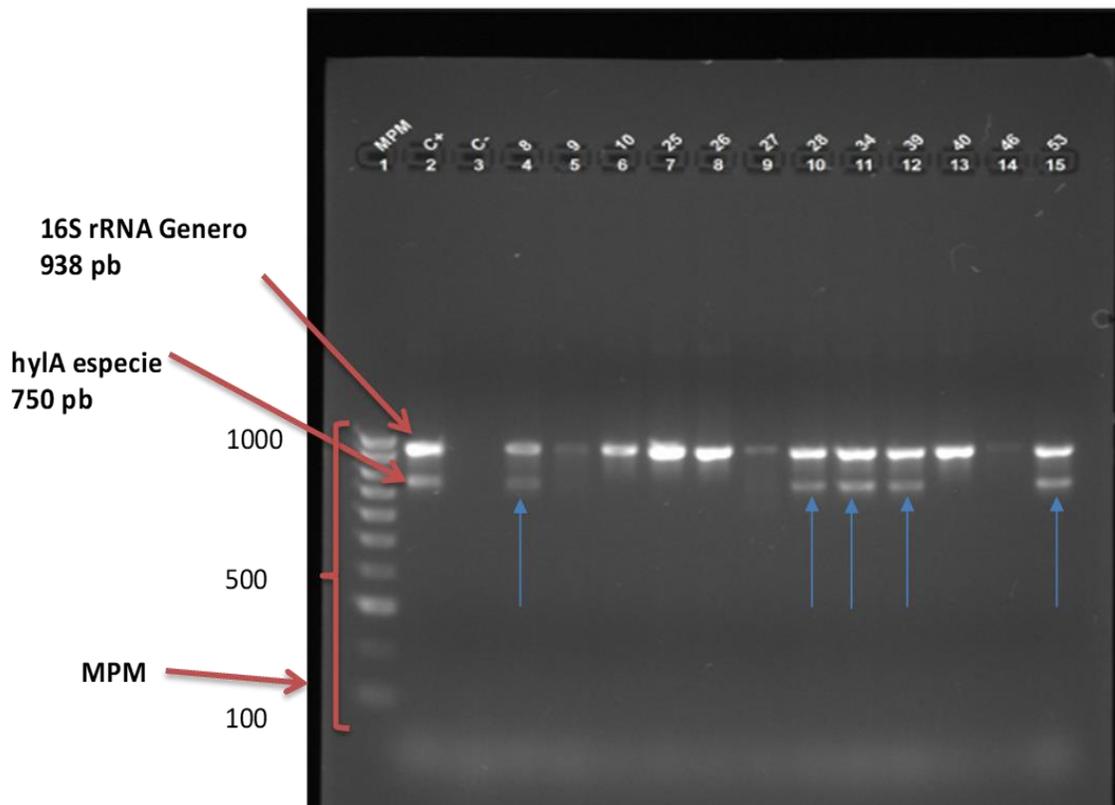


Figura 4. Producto de PCR Multiplex. 1. *MPM* (marcador de peso molecular), 2. Control positivo, *L. Monocytogenes* ATCC 19115, 3. Control negativo, *E. Coli* ATCC 25922, 4-15. Muestras de queso.

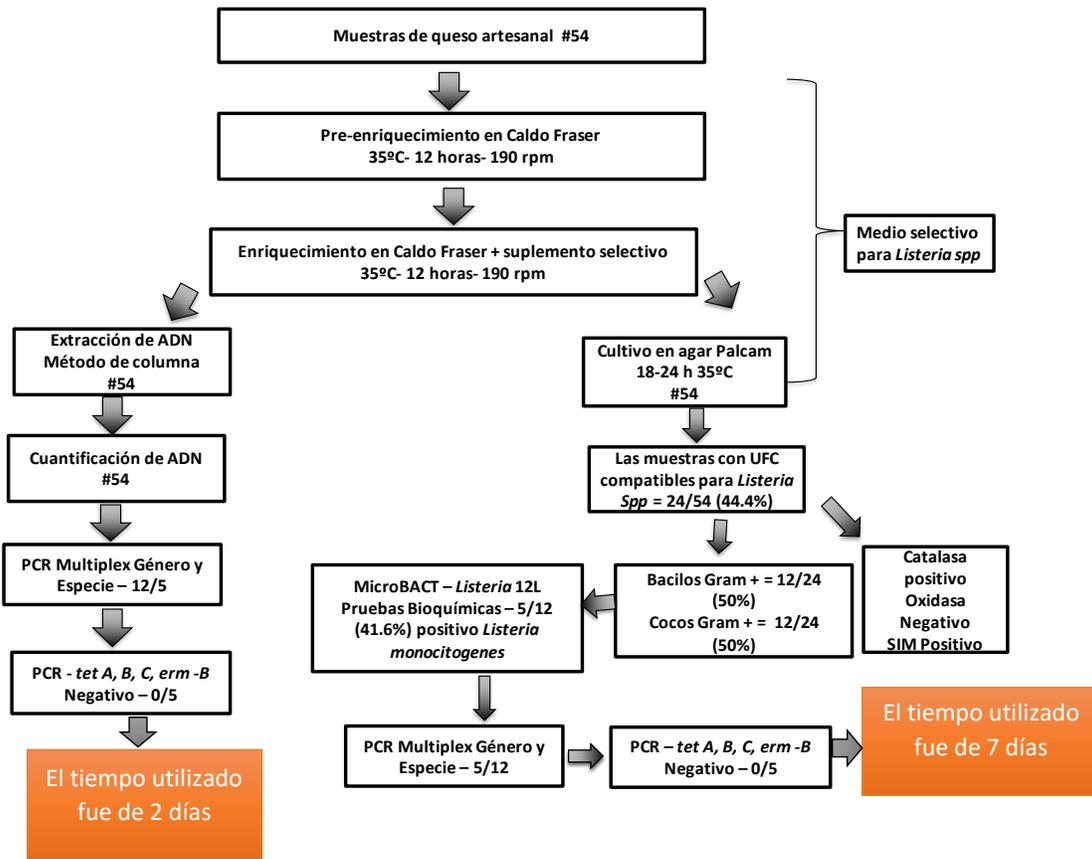


Figura 5. Flujo de trabajo para método convencional y PCR Multiplex

De las 54 muestras de queso costeño artesanal, se identificaron 12 muestras positivas para el género de *Listeria spp*, es decir, el 22.2% y de estas 12 muestras, 5 fueron positivas para la especie *monocytogenes*, es decir, el 41.67%.

5.4 Identificación de los genes *tet-A*, *tet-B*, *tet-C* y *erm-B*

A las 5 muestras positivas para *L. monocytogenes* identificadas como se describe arriba se les realizó la prueba de PCR Multiplex con el fin identificar la presencia de los genes *tet-A*, *tet-B*, *tet-C* y *erm-B* indicadores de resistencia a tetraciclina y eritromicina. No se evidenció productos de PCR (resultado no mostrado), lo que

indicaría que estas 5 muestras de *Listeria monocytogenes* son sensibles a tetraciclina y eritromicina.

6. Conclusiones y Recomendaciones

La *Listeria monocytogenes* se ha convertido en un patógeno de interés general debido a su alto grado de supervivencia en distintos ambientes, su resistencia, multirresistencia a los antibióticos y el incremento en la morbilidad y mortalidad en los últimos años. En los resultados obtenidos en esta investigación se pudo identificar de 54 muestras de queso costeño artesanal de venta al por menor del mercado público de Barranquilla, 12 (22,2%) muestras positivas para *Listeria spp* y de estas 12 muestras 5 (41.67%) positivas para la especie *monocytogenes*. Si comparamos nuestros resultados con estudios publicados en el año 2018, en donde 4 de 6 (66.6%) muestras de queso artesanal de expendios mayoristas de la ciudad de Barranquilla tomadas en el año 2013 dieron positivos para la *Listeria spp*, notamos que los porcentajes de la presencia de la bacteria son menores en la presente investigación, sin embargo, destacamos que el número de muestras tomadas en el 2013 fue menor y que, a pesar de la diferencia de 6 años entre los estudios, la bacteria aún está presente en queso costeño artesanal. Esto muestra la necesidad de realizar estudios para determinar la epidemiología y prevalencia de *Listeria monocytogenes* en este tipo de alimentos (27). Otro estudio que sirvió de referente para nuestra investigación fue realizado sobre queso costeño comercializado en Cali-Colombia, donde se reportó *Listeria monocytogenes* en 2 de 24 (8.33%) muestras analizadas de queso costeño artesanal (62), similar a nuestros resultados. Esto sugiere falta de monitoreo y control microbiológico a los pequeños productores de quesos procesados con leche sin previo tratamiento, por parte del ministerio de Salud y el Instituto Nacional de Vigilancia de Medicamentos y Alimentos (INVIMA), a través de la resolución número 02310 de 1986. Esta

investigación sirve como referente y consulta a futuros estudios que pretendan analizar *Listeria monocytogenes* en queso costeño artesanal mediante PCR Multiplex siendo esta una técnica molecular confiable, específica y oportuna.

Se recomienda realizar más investigaciones en ventas al por mayor y por menor de queso costeño artesanal en la ciudad de Barranquilla para la identificación de *Listeria monocytogenes* tomando en cuenta la procedencia y el tipo de queso. Además, se sugiere establecer mecanismos efectivos de seguimiento y control en la elaboración del queso artesanal por parte de los pequeños productores y de los entes de control sanitario. También se propone brindar capacitaciones a los productores, distribuidores y vendedores de este producto, para que reconozcan las consecuencias de la comercialización del queso costeño artesanal sin control microbiológico.

7. Referencias Bibliográficas

1. Rodríguez Torrens H, Barreto Argilagos G, Sedrés Cabrera M, Bertot Valdés J, Martínez Sáez S, Guevara Viera G. Las enfermedades transmitidas por alimentos, un problema sanitario que hereda e incrementa el nuevo milenio. REDVET. Revista Electronica. 2015 Aug; 16(8): p. 1-27.
2. Ruíz-Pérez R, Menco-Morales N, Chams-Chams L. Valoración microbiológica de queso costeño artesanal y evaluación higiénico-locativa de expendios en Córdoba, Colombia. Rev. Salud Pública. 2017 febrero; 19(3): p. 311-317.
3. Castañeda-Ruelas G, Eslava-Campos C, Castro-del Campo N, León-Félix J, Chaidez-Quiroz C. Listeriosis en México: importancia clínica y epidemiológica. 655salud pública de México. 2014 noviembre; 56(6): p. 654-659.
- 3a. Rossi ML, Paiva A, Tornese M, Chianelli S, Troncoso AR. Brotes de infección por *Listeria monocytogenes*: Una revisión de las vías que llevan a su aparición. Rev Chil Infectol. 2008;25(5):328–35.
4. Arteaga Márquez MR, Espitia Petro R, Ramírez Coronado EP, Hernández Bedoya CC, Chams Chams L, Espitia Petro DL, et al. Estudio del efecto de una película antimicrobiana en la vida útil del queso Costeño. Revista Venezolana de Ciencia y Tecnología de Alimentos. 2015 Junio; 6(1): p. 36-56.
5. Soto Varela Z, Pérez Lavalle L, Estrada Alvarado D. Bacterias causantes de enfermedades transmitidas por alimentos: una mirada en Colombia. Salud Uninorte. Barranquilla. 2016; 32(1): p. 105-122.
6. Urbano-Cáceres EX, Aguilera-Becerra AM, Jaimes-Bernal CP. Determinación del perfil de sensibilidad a antibióticos de *Listeria* spp. en aislamientos de leche cruda de vaca, Tunja. Revista Investigación en Salud Universidad de Boyacá. 2017 Junio; 4(1): p. 38-52.

7. Villanueva D, Salazar M. Formación de biopelículas por *Listeria monocytogenes* aisladas de queso fresco de mercados del Cercado de Lima. *Anales de la Facultad de Medicina*. 207 Mayo; 78(3): p. 322-325.
8. Rodríguez-Auad JP. Panorama de la infección por *Listeria monocytogenes*. *Rev Chilena Infecto*. 2018 noviembre; 35(6): p. 649-657.
9. Zamora A, Ossa H, Carrascal AK, Poutou RA, Jimenez DP. IDENTIFICACIÓN PRELIMINAR DE *LISTERIA monocytogenes* POR PCR. *Laboratorio Actual*. 2000 Noviembre; 17(33): p. 38-41.
10. Oromi Durich J. Resistencia Bacteriana a los Antibioticos. *Medicina Integral*. 2000 Dec; 36(10): p. 367-370.
11. Urbano-Cáceres E, Aguilera-Becerra A, Jaimes-Bernal C, Pulido-Medellín M. *Listeria spp.*, in churn storage of raw cow's milk in Tunja - Boyacá. *REVISTA MVZ CÓRDOBA*. 2018 Sep; 23(3): p. 6871-6877.
12. Martínez Galán P, Martín Gallardo E, Velamazán Martínez D. Listeriosis y gestación. Revisión de la evidencia científica actual. *Matrona Hospital Virgen de la Salud, Toledo*. 2016 Septiembre; 4(2): p. 36-46.
13. Vera A, González G, Domínguez M, Bello H. Principales factores de virulencia de *Listeria monocytogenes* y su regulación. *Rev Chilena Infectol*. 2013 Junio; 30(4): p. 407-416.
14. Palomino-Camargo C, González-Muñoz Y, Pérez-Sira E, Hugo Aguila V. METODOLOGÍA DELPHI EN LA GESTIÓN DE LA INOCUIDAD ALIMENTARIA Y PREVENCIÓN DE ENFERMEDADES TRANSMITIDAS POR ALIMENTOS. *Rev Peru Med Exp Salud Publica*. 2018 Junio; 35(3): p. 483-490.
15. Mercado-Martínez P, Moreno-Córdova YL. Sensibilidad antibacteriana de cultivos de *Listeria* proveniente de lugares de expendio de pescado de mercados de la ciudad de Trujillo (Perú). *Científica de la Facultad de Ciencias Biológicas*. 2015 junio; 35(1): p. 70-76.
16. Palomino-Camargo C, González-Muñoz Y. TÉCNICAS MOLECULARES PARA LA DETECCIÓN E IDENTIFICACIÓN DE PATÓGENOS EN ALIMENTOS: VENTAJAS Y LIMITACIONES. *Rev Peru Med Exp Salud Publica*. 2014 julio; 31(3): p. 535-546.
17. Instituto Nacional de Salud de Colombia. SIVIGILA. [Online].; 1975 [cited 2019 Noviembre 02. Available from:

<https://www.ins.gov.co/Direcciones/Vigilancia/Paginas/SIVIGILA.aspx>.

18. Gutiérrez Castañeda C, Quintero Peñaranda R, Burbano Caicedo I, Simancas Trujillo R. Modelo de quesería artesanal bajo un signo distintivo en el Caribe colombiano: caso Atlántico. *Revista Lasallista de Investigación*. 2017 May; 14(1): p. 72-82.
19. Instituto Nacional de Salud de Colombia. Las enfermedades transmitidas por Alimentos-ETA. [Online].; 2018 [cited 2019 Junio 10. Available from: <https://www.ins.gov.co/buscador-eventos/BoletinEpidemiologico/2018%20Bolet%C3%ADn%20epidemiol%C3%B3gico%20semana%2052.pdf>.
20. Merchán Castellanos NA, Pineda Gómez LM, Cárdenas Parra AK, González Neiza NC, Otálora Rodríguez MC, Sánchez Neira Y. Microorganismos comúnmente reportados como causantes de enfermedades transmitidas por el queso fresco en las Américas, 2007-2016. *Revista Cubana de Higiene y Epidemiología*. 2018; 56(1): p. 1-24.
21. Instituto Nacional de Salud de Colombia. Reporte técnico de *Listeria monocytogenes* para queso en Colombia. [Online].; 2019 [cited 2019 OCTUBRE 26. Available from: https://www.ins.gov.co/buscador-eventos/BoletinEpidemiologico/2019_Boletin_epidemiologico_semana_43.pdf.
22. Garcia JP, Gil JE, Botero S, Valencia FE. Control de crecimiento de *Listeria monocytogenes* en co-cultivo con *Lactobacillus plantarum*. *Rev. Colomb. Biotecnol*. 2018 Diciembre; 20(2): p. 68-77.
23. Consumer- Fundacion EROSKI. Carga mundial de listeriosis en el mundo. [Online].; 2014 [cited 2019 Julio 13. Available from: <https://www.consumer.es/seguridad-alimentaria/carga-mundial-de-listeriosis-en-el-mundo.html>.
24. MacDonald P, Whitwam R, Boggs J, MacCormack J, Anderson K, Reardon J, et al. Outbreak of listeriosis among Mexican immigrants as a result of consumption of illicitly produced Mexican-style cheese. *Clin Infect Dis*. 2005; 40(5): p. 677-682.
25. Organización Mundial de la Salud. Inocuidad de los alimentos. [Online].; 2019 [cited 2019 Julio 07. Available from: <https://www.who.int/ES/NEWS-ROOM/FACT-SHEETS/DETAIL/FOOD-SAFETY>.
26. Instituto Nacional de Salud de Colombia. EVALUACIÓN DE RIESGOS DE *Listeria monocytogenes* EN QUESO FRESCO EN COLOMBIA. [Online].; 2011 [cited 2019 Julio 12. Available from:

<https://www.minsalud.gov.co/sites/rid/Lists/BibliotecaDigital/RIDE/IA/INS/Er-listeria-en-lpc.pdf>.

27. Soto-Varela ZE, Gilma Gutiérrez C, de Moya Y, Mattos R, Bolívar-Anillo HJ, Villarreal JL. Detección molecular de Salmonella spp., Listeria spp. y Brucella spp. en queso artesanal fresco comercializado en Barranquilla: un estudio piloto. Biomedica. 2018; 38(1): p. 30-36.
28. Medline Plus. Listeriosis. [Online].; 2019 [cited 2019 mayo 07. Available from: <https://medlineplus.gov/spanish/ency/article/001380.htm>.
29. De Jaimen Loren JM. LISTERIOSIS (GÉNERO LISTERIA). [Online].; 2001 [cited 2019 Mayo 07. Available from: <https://blog.uchceu.es/eponimos-cientificos/listeriosis-genero-listeria/>.
30. Orsi R, Wiedmann M. Characteristics and distribution of Listeria spp., including Listeria species newly described since 2009. Appl Microbiol Biotechnol. 2016 junio; 100(12): p. 5273–5287.
31. Sanchez Hernandez FJ. LISTERIA MONOCYTOGENES: UN RETO PARA LA SEGURIDAD ALIMENTARIA. FarmaJournal. 2016; 1(2): p. 157-161.
32. Vila Brugalla M. Listeria monocytogenes en comidas preparadas. seguridad alimentaria. 2014 octubre;(230): p. 69-79.
33. Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura. Codex Alimentarius. [Online].; 1945 [cited 2019 Julio 13. Available from: <http://www.fao.org/dairy-production-products/products/codex-alimentarius/es/>.
34. Ministerio de Salud de Colombia. RESOLUCION NUMERO 02310 DE 1986. [Online].; 1986 [cited 2019 Julio 10. Available from: http://biblioteca.saludcapital.gov.co/img_upload/03d591f205ab80e521292987c313699c/resolucion_2310_1986.pdf.
35. Red de Científicos para la Inocuidad Alimentaria. Agencia Chilena para la Calidad e Inocuidad Alimentaria. [Online].; 2017 [cited 2019 Mayo 25. Available from: <http://redcientifica.achipia.cl/achipia>.
36. Asociación de Microbiología y Salud. Listeriosis en Sudáfrica. Aumento inusual de casos. [Online].; 2018 [cited 2019 Julio 15. Available from: <http://www.microbiologiaysalud.org/noticias/listeriosis-brote-en-sudafrica/>.

37. Ministerio de Sanidad, Consumo y Bienestar Social. Brote de listeriosis por consumo de productos fabricados por la empresa Magrudis S.L. [Online].; 2019 [cited 2019 09 21. Available from: https://www.mscbs.gob.es/profesionales/saludPublica/ccayes/alertasActual/listeriosis/docs/20190906_Brote_de_listeriosis_asociado_al_consumo_de_carne_mechada.pdf.
38. Tecnológico de Costa Rica. Científicos del TEC descubren nueva bacteria. [Online].; 2018 [cited 2019 Octubre 30. Available from: <https://www.tec.ac.cr/hoyeneltec/2018/02/19/cientificos-tec-descubren-nueva-bacteria>.
39. América Economía: Cluster Salud. Ácidos grasos omega-3 inactivan virulencia de la listeria. [Online].; 1986 [cited 2019 10 13. Available from: <https://clustersalud.americaeconomia.com/tiinnovacion/descubrimiento-acidos-grasos-omega-3-inactivan-virulencia-de-la-listeria>.
40. Olivares R. Listeria monocytogenes: bacteria antigua, desafío permanente. Medwave. 2009 Junio; 9(6): p. 1-6.
41. Hernández-Porras EE, Rosero-Torres LE, Parra-Barrera EL, Guerrero-Montilla JA, Gómez-Rubio AL, Moreno J. Brotes de enfermedades transmitidas por los alimentos estudiados mediante técnicas moleculares. Revista de Salud Pública. 2017 octubre; 19(5): p. 671-678.
42. Matto C, Varela G, Braga V, Vico V, Giannechini RE, Rivero R. Detection of Listeria spp. in cattle and environment of pasture-based dairy farms. Pesquisa Veterinária Brasileira. 2018; 38(9): p. 1736-1741.
43. Reniere ML, Whiteley AT, Portnoy DA. An In Vivo Selection Identifies Listeria monocytogenes Genes Required to Sense the Intracellular Environment and Activate Virulence Factor Expression. PLOS Pathogens. 2016 julio; 12(7): p. 1-27.
44. Núñez-Montero K, Kühbacher A, Johnny P, Pizarro-Cerdá J. Rol de la Tropomiosina y del Adaptador NEDD9 durante la invasión celular de Listeria monocytogenes. Tecnología en Marcha. 2014 marzo; 1: p. 41-48.
45. Phelps CC, Vadia S, Arnett E, Tan Y, Zhang X, Pathak-Sharma S, et al. Relative Roles of Listeriolysin O, InlA, and InlB in Listeria monocytogenes Uptake by Host Cells. Infection and immunity. 2018 octubre; 86(10): p. 1-16.
46. Bierne H, Milohanic E, Kortebi M. To Be Cytosolic or vacuolar: The Double life of listeria monocytogenes. Frontiers in Cellular and Infection Microbiology. 2018 mayo; 8:

p. 64-72.

47. Vicente M. La bacteria rebelde. [Online].; 2010 [cited 2019 07 11. Available from: <http://www.madrimasd.org/blogs/microbiologia/2010/01/25/130395>.
48. Puga CH, Dahdouh E, SanJose C, Orgaz B. Listeria monocytogenes Colonizes Pseudomonas fluorescens Biofilms and Induces Matrix Over-Production. *Frontiers in Microbiology*. 2018 Julio 31; 9: p. 1-12.
49. King Tiong H, Muriana PM. RT-qPCR Analysis of 15 Genes Encoding Putative Surface Proteins Involved in Adherence of Listeria monocytogenes. *Pathogens*. 2016 Octubre; 5(60): p. 1-19.
50. Higiene Ambiental. Listeria monocytogenes: maestra en persistencia y contaminación cruzada. [Online].; 2017 [cited 2019 07 21. Available from: <https://higieneambiental.com/higiene-alimentaria/listeria-monocytogenes-maestra-en-persistencia-y-contaminacion-cruzada>.
51. Infogen. Listeriosis, Infecciones Adquiridas por Los Alimentos. [Online].; 2014 [cited 2019 07 22. Available from: <https://infogen.org.mx/listeriosis-infecciones-adquiridas-por-los-alimentos/>.
52. Rolhion , Cossart P. How the study of Listeria monocytogenes has led to new concepts in biology. *Future Microbiology*. 2017 Jun; 12: p. 621-638.
53. Krawczyk-Balska A, Lipiak. Critical Role of a Ferritin-Like Protein in the Control of Listeria monocytogenes Cell Envelope Structure and Stability under B-lactam Pressure. *PLoS ONE*. 2013 Octubre; 8(10): p. 1-10.
54. Suarez , Gudiol. Antibióticos betalactámicos. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*. 2009 Febrero; 27(2): p. 116-129.
55. Collins , Curtis , Cotter PD, Hill , Ross RP. The ABC Transporter AnrAB Contributes to the Innate Resistance of Listeria monocytogenes to Nisin, Bacitracin, and Various β -Lactam Antibiotics. *ANTIMICROBIAL AGENTS AND CHEMOTHERAPY*. 2010 Oct; 54(10): p. 4416 – 4423.
56. Jara MA. Tetraciclinas: Un modelo de resistencia antimicrobiana. *Avances en ciencias veterinarias*. 2007 Jan; 22(1): p. 49-55.
57. Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura. Manual para el control de calidad de los alimentos. [Online].; 1992 [cited 2019 10 23.

Available from: <http://www.fao.org/3/a-t0451s.pdf>.

58. OXOID. Manual Identification Systems. [Online].; 2001 [cited 2019 10 1. Available from:
http://www.analisisavanzados.com/modules/mod_tecdata/MB1128A%20Microbact%20Listeria%20OXOID.pdf.
59. Baquero Acuña DM, Bernal González AM, Campuzano SE. Determinación de *Listeria monocytogenes* en quesos blancos artesanales expendidos en la plaza de mercado de Cáqueza, Cundinamarca. Nova - Publicación Científica. 2006 Diciembre; 4(6): p. 80-83.
60. Kozak GK, Boerlin P, Janecko N, Reid-Smith RJ, Jardine C. Antimicrobial Resistance in *Escherichia coli* Isolates from Swine and Wild Small Mammals in the Proximity of Swine Farms and in Natural Environments in Ontario, Canada. APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY. 2009 Feb; 75(3): p. 559–566.
61. Chen , Yu , Michel, Jr. FC, Wittum , Morrison. Development and Application of Real-Time PCR Assays for Quantification of *erm* Genes Conferring Resistance to Macrolides-Lincosamides-Streptogramin B in Livestock Manure and Manure Management Systems. Appl Environ Microbiol. 2007 Jul; 73(14): p. 4407–4416.
62. Ocampo Ibáñez ID, González C, Moreno SL, Calderón C, Flórez Elvira LJ, Olaya MB, et al. Presencia de *Listeria monocytogenes* en quesos frescos artesanales comercializados en Cali-Colombia. Acta Agronómica. 2019 Jul; 68(2): p. 108-114.
63. Red de Científicos para la Inocuidad Alimentaria. Agencia Chilena para la Calidad e Inocuidad Alimentaria. [Online].; 2017 [cited 2019 MAYO 25. Available from:
<http://redcientifica.achipia.cl/achipia>.