

DOI: <https://doi.org/10.18359/rfcb.5012>

Comparación teórica entre técnicas fenotípicas y genotípicas utilizadas en la identificación de *Listeria monocytogenes**

Adriana Giraldo Aristizábal^a ■ Astrid Maribel Aguilera Becerra^b
 ■ Eliana Ximena Urbano Cáceres^c ■ Adriana María Pedraza Bernal^d
 ■ Claudia Patricia Jaimes Bernal^e

Resumen: *Listeria monocytogenes* es un patógeno ubicuo intracelular, causante de la Listeriosis, la cual se considera una enfermedad transmitida por alimentos (ETA). En la actualidad existe una creciente demanda de consumidores de productos alimenticios tratados mínimamente que pueden favorecer la proliferación de este microorganismo. Es necesario contar con programas de vigilancia que incluyan métodos fiables para la detección de este patógeno en casos de brotes epidémicos. Esta revisión bibliográfica compara las ventajas y desventajas de las técnicas fenotípicas y genotípicas utilizadas en la determinación de *L. monocytogenes* con el fin de definir la más adecuada que permita obtener resultados confiables y en el menor tiempo posible. Se realizó una búsqueda bibliográfica en bases de datos como Pubmed, Science Direct, Proquest y Ovid, en inglés y español, utilizando los siguientes descriptores: *L. monocytogenes*, *molecular typing*, *diagnosis*, *PCR* y *bacterial typing techniques*. Estos se combinaron de diferentes maneras para, finalmente, recopilar setenta artículos que cumplieron con los criterios de selección propuestos. Como resultado se presentan las técnicas de diagnóstico fenotípico y genotípico que representan una opción útil para el aislamiento e identificación de este patógeno a partir de diferentes orígenes. Las técnicas revisadas permiten la diferenciación entre especies patógenas y no patógenas, así como de serotipos y genotipos con base en la implementación de procedimientos cuya fundamentación puede diferir, pero que igualmente pueden ser complementarias.

Palabras clave: *L. monocytogenes*; técnicas moleculares; diagnóstico; PCR; técnicas de diagnóstico bacteriano

Recibido: 15 de agosto de 2020

Aceptado: 27 de octubre de 2020

Disponible en línea: 27 de agosto de 2021

* Artículo de revisión.

- a** Bacterióloga y Laboratorista Clínica, Universidad de Boyacá, Tunja, Colombia.
Correo electrónico: adrianagiraldo1522@gmail.com ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-0283-6915>
- b** Magíster en Prevención de Riesgos Laborales, Universidad de Boyacá, Tunja, Colombia.
Correo electrónico: amaguilera@uniboyaca.edu.co ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-2892-6916>
- c** Magíster en Prevención de Riesgos Laborales, Universidad de Boyacá, Tunja, Colombia.
Correo electrónico: eliurbano@uniboyaca.edu.co ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-7218-7300>
- d** Magíster en Epidemiología, Universidad de Boyacá, Tunja, Colombia.
Correo electrónico: adrcardenas@uniboyaca.edu.co ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-0576-8102>
- e** Candidata a Doctora en Biología Molecular y Celular, Universidad de Boyacá, Tunja, Colombia.
Correo electrónico: cpjaimes@uniboyaca.edu.co ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-8034-190X>

Cómo citar: A. Giraldo Aristizábal, A. M. Aguilera Becerra, E. X. Urbano Cáceres, A. M. Pedraza Bernal, y C. P. Jaimes Bernal, «Comparación teórica entre técnicas fenotípicas y genotípicas utilizadas en la identificación de *Listeria monocytogenes*», *Rev. Fac. Cienc. Básicas*, vol. 16, n.º 2, pp. 7-19, ago. 2021.

Theoretical Comparison Between Phenotypic and Genotypic Techniques Used in the Identification of Listeria Monocytogenes

Summary: *Listeria monocytogenes* is a ubiquitous intracellular pathogen, which causes Listeriosis. It is considered as a foodborne disease (FBD). Currently there is a growing consumer demand for minimally treated food products, situation that can promote the proliferation of this microorganism. It is necessary to have surveillance programs including reliable methods for detecting this pathogen in cases of epidemic outbreaks. This literature review compares the advantages and disadvantages of the phenotypic and genotypic techniques used in the determination of *L. monocytogenes* to define the most appropriate one, which obtains reliable results in the shortest possible time. A bibliographic research was carried out in databases such as Pubmed, Science Direct, Proquest and Ovid, in English and Spanish. The following descriptors were used: *L. monocytogenes*, *molecular typing*, *diagnosis*, *PCR* and *bacterial typing techniques*. These were combined in different ways to eventually collect seventy articles that complied with the proposed selection criteria. As a result, phenotypic and genotypic diagnostic techniques represent a useful option for the isolation and identification of this pathogen from different origins. The reviewed techniques allow the differentiation between pathogenic and non-pathogenic species, as well as serotypes and genotypes based on the implementation of procedures which substantiation may differ but may also be complementary.

Keywords: *L. monocytogenes*; molecular techniques; diagnosis; PCR; bacterial diagnostic techniques

Comparação teórica entre técnicas fenotípicas e genotípicas utilizadas na identificação de Listeria monocytogenes

Resumo: *Listeria monocytogenes* é um patógeno ubíquo intracelular, causador da listeriose, a qual é considerada uma doença transmitida por alimentos (DTA). Na atualidade, existe uma crescente demanda de consumidores de produtos alimentares tratados minimamente que podem favorecer a proliferação desse micro-organismo. É necessário contar com programas de vigilância que incluam métodos confiáveis para detectar esse patógeno em casos de surtos epidêmicos. Esta revisão bibliográfica compara as vantagens e as desvantagens das técnicas fenotípicas e genotípicas utilizadas na determinação de *L. monocytogenes* a fim de definir a mais adequada que permita obter resultados confiáveis e no menor tempo possível. Foi realizada uma busca bibliográfica em bases de dados como PubMed, Science Direct, Proquest e Ovid, em inglês e espanhol, utilizando os descritores "*L. monocytogenes*", "*molecular typing*", "*diagnosis*", "*PCR*" e "*bacterial typing techniques*". Estes foram combinados de diferentes maneiras para finalmente recopilar setenta artigos que cumprissem com os critérios de seleção propostos. Como resultado, são apresentadas as técnicas de diagnóstico fenotípico e genotípico que representam uma opção útil para o isolamento e a identificação desse patógeno a partir de diferentes origens. As técnicas revisadas permitem a diferenciação entre espécies patogênicas e não patogênicas, bem como de sorotipos e genótipos com base na implementação de procedimentos cuja fundamentação pode diferir, mas que igualmente podem ser complementares.

Palavras-chave: *L. monocytogenes*; técnicas moleculares; diagnóstico; PCR; técnicas de diagnóstico bacteriano

Introducción

La listeriosis es una enfermedad transmitida por alimentos (ETA), documentada por primera vez en 1981 durante un brote canadiense en Nueva Escocia (Canadá) [1]. Esta enfermedad es causada por *Listeria monocytogenes*, patógeno intracelular, bacteria grampositiva, catalasa positiva, oxidasa negativa, anaerobia facultativa que pertenece al género *Listeria* [2]. Afecta a diferentes grupos de riesgo: recién nacidos, embarazadas, adultos mayores e individuos inmunocomprometidos.

El género *Listeria*, hasta el momento, incorpora diecisiete especies, divididas en dos grupos: *Listeria sensu stricto*, el cual incluye: *L. monocytogenes*, *L. innocua*, *L. seeligeri*, *L. welshimeri*, *L. ivanovii* y *L. marthii*; y *Listeria sensu lato*, que incluye once especies: *L. rocourtiae*, *L. weihenstephanesis*, *L. fleischmannii*, *L. floridensis*, *L. aquatica*, *L. newyorkensis*, *L. cornellensis*, *L. grandensis*, *L. riparia*, *L. booriae* y *L. grayi*. Se han reportado como patógenas *L. monocytogenes*, causante de enfermedades en humanos y mamíferos, y *L. ivanovii*, en rumiantes [3], [4], [5], [6]. Se pueden aislar del suelo, el agua, los drenajes, la vegetación, las heces de animales silvestres, mediante ensilaje, en granjas y en instalaciones de procesamiento de alimentos [7].

L. monocytogenes puede ser aislada de un sinnúmero de alimentos, especialmente los de consumo directo tales como carnes (carne de res, pavo, jamón cocido), leche, productos lácteos (mantequilla, queso blando), pescado (ahumado, marinado) y otros mariscos (cangrejo, camarones, mejillones ahumados), además de helados, vegetales frescos (maíz, apio, repollo) y frutas, como, por ejemplo, el melón [6].

En relación con *L. monocytogenes*, se ha aislado en el laboratorio utilizando medios selectivos con un rango de pH entre 4,4-9,4, resiste temperaturas que oscilan entre 0-45 °C (se destaca su capacidad de crecer en refrigeración), con una temperatura óptima entre 30-37 °C, e, igualmente, puede crecer en presencia de un 10 % de NaCl. Es una bacteria móvil a 25 °C e inmóvil a 37 °C. Existen cinco serogrupos de *L. monocytogenes* y trece serotipos de acuerdo con el antígeno somático (1/2a, 1/2b, 1/2c,

3a, 3b, 3c, 4a, 4b, 4c, 4d, 4e, 4ab y 7), de los cuales los serotipos 1/2a, 1/2b, 1/2c y 4b son los responsables del 95 % de las listeriosis en humanos [5], [8], [9].

A nivel mundial el comportamiento epidemiológico muestra que entre los años 1976 y 2019 se reportaron en los Estados Unidos, aproximadamente, 24 brotes de listeriosis, casi al menos uno por año. En la Unión Europea, en 1999 se registraron 667 casos de listeriosis, número que aumentó a 1583 casos en veintitrés países en el 2006. Adicionalmente, en el 2018 se reportó un brote transmitido por alimentos en cinco países europeos, lo cual implicó 32 casos y seis muertes por esta infección. En Asia, desde 1964 hasta el 2010, se reportaron en total 147 casos de listeriosis en países como Japón, Tailandia y Taiwán, afectando con mayor frecuencia a mujeres embarazadas, neonatos e individuos inmunocomprometidos. Finalmente, en África, entre enero del 2017 y enero del 2018 se reportaron 820 casos [10].

En Colombia los datos epidemiológicos son escasos respecto a la listeriosis, debido a que no se diagnostica con frecuencia y, por tanto, presenta subregistro epidemiológico, el cual se incrementa si se considera que tampoco es una enfermedad de notificación obligatoria [11]. Así mismo, son pocos en estos países los estudios epidemiológicos que han demostrado la presencia de *L. monocytogenes* en diferentes tipos de alimentos como, por ejemplo, la leche y sus derivados, así como en productos cárnicos [12], [13].

En el 2017 se encontró un 2,7% ($n = 8$) de *L. monocytogenes* en tanques de almacenamiento de leche cruda de vaca en la ciudad de Tunja (293 muestras analizadas) [14]. Adicionalmente, en el departamento de Boyacá, Colombia, el consumo de la leche sin procesar es muy alta [15]. Alrededor del 95 % de los habitantes compran la leche en los mercados artesanales, porque afirman que la cruda es más nutritiva que la pasteurizada [16].

Considerando la incidencia de la infección y el consumo de leche cruda, se recomienda la implementación de métodos fenotípicos y genotípicos en la investigación de brotes causados por este microorganismo. Algunos autores afirman que la caracterización molecular debería ser parte esencial

del protocolo de identificación de *L. monocytogenes*, específicamente en investigaciones de tipo epidemiológico [17], [18].

Por tanto, esta revisión bibliográfica tiene como objetivo comparar las técnicas de identificación de *L. monocytogenes* tanto en lo que se refiere a la forma como a los rasgos genéticos del microorganismo, con el fin de brindar información en la adopción de la técnica más útil en cuanto a confiabilidad y rapidez en el proceso.

Metodología

Para la elaboración de este artículo se realizó una búsqueda bibliográfica en las bases de datos PubMed, Science Direct, Proquest y Ovid, en inglés y español, utilizando los siguientes descriptores: *Listeria monocytogenes* (D008099), *molecular typing* (D008889), *diagnosis* (D003933), *polymerase chain reaction* (D016133), y *bacterial typing techniques* (D015373). Estos se combinaron de diferentes

maneras para, finalmente, obtener setenta artículos. Los criterios de selección de los artículos fueron: 1) publicaciones en revistas indexadas; 2) publicaciones de los últimos quince años; 3) publicaciones en idioma inglés y español, 4) publicaciones que incluyan métodos diagnósticos, artículos de revisión y artículos de investigación; asimismo, se evaluaron los artículos que incluyeran valoraciones relacionadas con las ventajas y desventajas de la aplicación de las técnicas.

Técnicas fenotípicas y genotípicas utilizadas para la identificación de *Listeria monocytogenes*

En la Tabla 1 se sintetizan algunos de los estudios encaminados al aislamiento e identificación de *L. monocytogenes* a partir de agua y alimentos contaminados, entre los cuales se encuentran carnes conservadas, leche y sus derivados, por medio de técnicas fenotípicas y genotípicas.

Tabla 1. Técnicas utilizadas para fenotipificación y genotipificación de *Listeria monocytogenes* en diferentes estudios

País	Tipo de muestras	Métodos de detección	Ref.
Portugal (Europa)	Plantas productoras de queso artesanal a pequeña escala e industrial: leche, quesos y ambiente	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Sistema de ensayos automatizados (Vidas) ▪ Genoserotipificación por PCR múltiple ▪ Caracterización molecular por medio de PFGE (Asci y Apat) 	[19]
Portugal (Europa)	Plantas procesadoras de salchichas fermentadas	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Caracterización por medio de RAPD ▪ Serotipificación molecular basada en PCR múltiple ▪ Caracterización molecular por medio de PFGE (Asci y Apat) 	[20]
Francia (Europa)	Plantas de procesamiento de alimentos y derivados lácteos	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Serotipificación convencional (métodos bioquímicos y aglutinación) ▪ Serotipificación molecular: PCR múltiple (<i>prfA</i>, <i>prs</i>, <i>lmo0737</i>, <i>lmo1118</i>, <i>orf2819</i>, <i>orf2110</i>) y ensayo de PCR (<i>flaA</i>) 	[21]
Irán (Asia)	Leche cruda almacenada en tanques (vaca, cabra, oveja)	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Sistema de detección ausencia presencia, metodología microbiología convencional PCR para amplificar el gen 16SARNr (938 bp) y el gen de Listeriolisina O (<i>hylA</i>) ▪ Serotipificación por PCR múltiple (<i>orf2819</i>, <i>orf2120</i>, <i>lmo0737</i>, <i>lmo1118</i> y <i>prs</i>) 	[22]
India (Asia)	Muestras de agua del río Ganges, humanos, leche y productos lácteos (quesos, helados y mantequilla)	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Método de detección convencional ▪ PCR para identificación de <i>L. monocytogenes</i> (gen <i>inIA</i>) ▪ Serotipificación por PCR múltiple (<i>lmo0737</i>, <i>ORF2819</i>, <i>ORF2110</i>, <i>lmo1118</i> y <i>prs</i>) ▪ Huella genómica por medio de ERIC y REP-PCR 	[8]

Continúa

País	Tipo de muestras	Métodos de detección	Ref.
China (Asia)	Leche entera cruda proveniente de quince provincias de China	PCR para identificación de <i>L. monocytogenes</i> (gen <i>HlyA</i>)	[23]
Algeria (África)	Leche cruda almacenada en tanques provenientes de granjas	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Elisa ▪ Serotipificación por PCR múltiple ▪ Caracterización molecular por medio de FGE (Asci y ApaI) 	[24]
Brasil (Suramérica)	Productos lácteos provenientes de tres plantas diferentes	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Método de detección convencional ▪ Serotipificación ▪ Caracterización molecular por medio de FGE (Asci y ApaI) 	[25]
Colombia (Suramérica)	Leche cruda del municipio de Pamplona (Norte de Santander)	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Método de detección convencional ▪ PCR para amplificar el gen 16SARNr (938 bp) y el gen de Listeriolisina O (<i>hylA</i>) 	[26]
Colombia (Suramérica)	Leche cruda de cinco municipios de Boyacá	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Método de detección convencional ▪ PCR en tiempo real (gen <i>mlp</i>) para identificación de <i>L. monocytogenes</i> 	[16]

Fuente: elaboración propia.

Identificación fenotípica

El grupo de técnicas fenotípicas utilizadas para la identificación de *L. monocytogenes* incluyen el aislamiento en medios selectivos y la posterior caracterización bioquímica y serológica. Inicialmente, la caracterización fenotípica consiste en realizar la identificación de las colonias (por aislamiento en medios de cultivo) y la coloración de Gram, la cual se observa en la forma de bacilos grampositivos.

Generalmente, para el aislamiento de *L. monocytogenes* se debe hacer un pre-enriquecimiento en medio cultivo Fraser (FB). El uso de este caldo es el paso más importante, pues este medio inhibe microorganismos gramnegativos, dado que contiene ácido nalidíxico, acriflavina y cloruro de litio [27]. Posterior a este paso, los cultivos se siembran en placas de agar con un medio selectivo/diferencial que permite el aislamiento de las colonias presuntivas de *L. monocytogenes*, de modo que el medio seleccionado para este paso es el agar de Oxford o una modificación de este. El agar de Oxford contiene cloruro de litio, cicloheximida, colistina, acriflavina, cefotetan y fosfomicina como agentes selectivos. Además del agar de Oxford, el método de la agencia de alimentos y medicamentos (FDA) incluye cloruro de litio/feniletanol/moxalactam (LPM) o agar Palcam, que contiene cloruro de litio, polimixina B, acriflavina y ceftazidima [28], [29].

Al ser un organismo no exigente, puede crecer en una variedad de medios de cultivo [30]. Entre los medios utilizados se encuentran los agares basados en esculina y los agares cromogénicos. En el primer grupo se destacan por su uso el agar Oxford, Palcam, agar Oxford modificado (MOX, por sus siglas en inglés) y LPM fortificado con esculina y Fe³⁺. En el segundo grupo está el agar R&F *Listeria monocytogenes*, Rapid, agar *Listeria* según Ottaviani y Agosti (ALOA) y CHROM agar *Listeria* [31].

Gasanov *et al.* consideran que el aislamiento en medios de cultivo selectivos permite una caracterización de la colonia y la identificación bioquímica. De hecho, refieren que puede ser considerada la técnica Gold estándar para su identificación, pero resulta ser un método muy lento [32]. En contraposición, otros autores consideran que estas metodologías presentan desventajas en el propósito de alcanzar una detección exitosa del microorganismo a partir de diferentes fuentes, entre las cuales se encuentran las siguientes:

- concentraciones reducidas del microorganismo, es decir, nivel de contaminación bajo de las muestras analizadas;
- enmascaramiento de *L. monocytogenes*, debido a la existencia de microbiota competidora;

- modificaciones en las características fenotípicas de la cepa aislada por su exposición a condiciones extremas, lo que conduce a falsos resultados [33];
- metodología laboriosa que requiere entre cinco días a dos semanas para obtener resultados;
- presencia de sustancias inhibidoras naturales en la leche, o la fuerte contaminación de la muestra que no permite a la bacteria competir y, por tanto, le impide crecer en los medios seleccionados [34].

En relación con la última desventaja mencionada, existen microorganismos capaces de inhibir el crecimiento de *L. monocytogenes* en medios de cultivo, tales como *Enterococcus faecium*, productor de una bacteriocina responsable de este efecto [35], [36]. Además, esta bacteria puede cambiar el pH, lo cual hace que el medio se vuelva ácido y logre así inhibir el crecimiento de *L. monocytogenes* [37], [38].

En este mismo sentido, *Listeria innocua* puede enmascarar a *L. monocytogenes*, lo que podría conducir a un resultado falso negativo ante la presencia de esta en un medio de cultivo; esto es posible puesto que *L. innocua* crece más rápido [39].

También se ha mencionado que algunas bacterias, como, por ejemplo, las ácido lácticas, utilizadas como cultivos bioprotectores, reducen el crecimiento de patógenos debido a que producen metabolitos secundarios tales como ácidos orgánicos, peróxido de hidrógeno, bacteriocinas, acetaldehído y otros compuestos como acetato, etanol, CO₂, formato y succinato a partir de carbohidratos fermentables, lo que aumenta la inocuidad microbiológica de los alimentos [40].

En el grupo de pruebas bioquímicas se cuenta con una gran variedad de estas, como, por ejemplo, la prueba de CAMP (Christie, Atkins, Munch-Petersen) que permite la visualización del halo de hemólisis, que en este caso sería β hemolíticas, lo que establece la diferencia entre *L. monocytogenes* y otras *Listeria* spp. Adicionalmente, se realizan pruebas como catalasa, fermentación de azúcares (ramnosa y manitol), esculina y motilidad a 25 °C y

37 °C [41]. *L. monocytogenes* presenta una reacción de Voges-Proskauer positiva y sin fermentación de xilosa, lo que permite identificar que genera ácidos y diacetilo, ya que el medio contiene azúcares fermentables [42]. Algunos autores, posterior a la identificación fenotípica por medio de aislamiento en medios de cultivo, han realizado evaluación por medio de pruebas rápidas inmunológicas de las colonias presuntivas y su posterior confirmación utilizando kits de caracterización bioquímica que permiten identificar las diferentes especies de *Listeria* [43].

Entre las técnicas inmunoenzimáticas que se basan en la unión entre anticuerpos de diferentes tipos (monoclonales, policlonales y recombinantes) a los antígenos específicos presentes en la superficie bacteriana se incluyen los ensayos inmunoabsorbentes ligados a enzimas (Elisa), cuyas mayores desventajas son la cantidad de muestra que se necesita, el elevado costo y los equipos especializados para su ejecución [44]. Por otra parte, Vanegas *et al.* [12] refieren que la serotipificación convencional tiene algunas desventajas, si se tiene en cuenta la necesidad de contar con antisueros y cepas específicas debido a que los antígenos flagelares y somáticos (H, A, B y D) pueden compartirse entre las serovariedades. Otros inconvenientes que se mencionan relacionados con el uso de los métodos inmunológicos es que son menos sensibles en comparación con las técnicas basadas en la amplificación de ácidos nucleicos, específicamente en los relacionados con el límite de detección de este microorganismo. Adicionalmente, la preparación de los anticuerpos es más demorada que la de los *primers*, dado que durante el proceso de preparación se deben determinar la sensibilidad y especificidad de los anticuerpos producidos y, finalmente, que la molécula objetivo puede perderse durante el procesamiento, de manera que permita considerar que el ADN es una molécula blanco más estable que una proteína, la cual puede variar en diferentes condiciones ambientales [45].

En la Tabla 2 se resumen las diferentes técnicas fenotípicas con sus ventajas y sus desventajas.

Tabla 2. Ventajas y desventajas de las técnicas fenotípicas

Técnica	Ventajas	Desventajas
Aislamiento en medios de cultivo	Caracterización macroscópica de las colonias	<ul style="list-style-type: none"> ■ Baja sensibilidad ■ Baja reproducibilidad ■ Inhibición por diversos factores del crecimiento bacteriano
Serotipificación	No reportadas en la literatura	<ul style="list-style-type: none"> ■ Equipos de alto costo ■ Asequibilidad ■ Baja reproducibilidad ■ Personal capacitado ■ La preparación de anticuerpos consume más tiempo que la preparación de <i>primers</i>
Pruebas bioquímicas	<ul style="list-style-type: none"> ■ Métodos de diagnóstico precoz ■ Homogeneidad de resultados (comparación entre laboratorios) 	<ul style="list-style-type: none"> ■ Menor poder discriminatorio ■ Menor reproducibilidad

Fuente: elaboración propia.

Identificación genotípica

Entre las metodologías que permiten realizar el seguimiento a los brotes generados por las ETA se puede mencionar la subtipificación molecular de ADN [46], necesaria para diferenciar o agrupar los serotipos responsables, pues, como se ha visto en los diferentes estudios, cada brote puede ser causado por diferentes cepas o serotipos [32]. En paralelo, la secuencia de nucleótidos de tres genes (*flaA*, *iap*, y *hly*) ha permitido agrupar a las cepas de *L. monocytogenes* en cuatro grandes grupos genéticos denominados linajes de evolución I, II, III y IV, dentro de los cuales los serotipos son incluidos de manera individual [6], [47], [48], [49].

Para realizar las técnicas de caracterización molecular el primer paso que se lleva a cabo es la extracción o aislamiento de ADN. A fin de aislar el ADN proveniente de *L. monocytogenes*, en la mayoría de los casos, se utiliza el método de extracción orgánica convencional con modificaciones, entre las cuales se encuentran la adición de lisozima para la lisis celular y un paso anexo de digestión de proteínas contaminantes con proteinasa K. Este método involucra la degradación de proteínas, lípidos y restos celulares con fenol: cloroformo y la precipitación de ácidos nucleicos con etanol [50]. Posteriormente, se verifica la calidad y la concentración del ADN por medio de la medición de absorbancia

usando un espectrofotómetro y calculando la relación de A_{260}/A_{280} . Este paso es esencial para ejecutar la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) u otra técnica, como, por ejemplo, digestión enzimática, las cuales requieren de un ADN de alta calidad (mínima una pureza > 1,7).

La PCR genera excelentes resultados, siempre y cuando se realice una adecuada selección de los genes que se van a amplificar, dado que existen tanto específicos de género como de especie. Aunado a esto, también es necesario un adecuado diseño de los *primers* (especificidad), con un tamaño adecuado de los amplicones y una temperatura de fusión apropiada (para cuando se hace amplificación simultánea de los genes). Además, los ensayos de PCR requieren de una menor concentración de ADN, con unos límites de detección bajos, lo cual facilita la identificación de los patógenos en las muestras de estudio.

A continuación, se mencionan los tipos de PCR que se han empleado en la caracterización de *L. monocytogenes*.

PCR múltiple

La PCR, con su variante múltiple, es una técnica que ofrece la posibilidad de determinar género y especie en una sola reacción, de manera que reduce el tiempo de detección y aumenta la especificidad del

diagnóstico [51]. Al genotipificar *L. monocytogenes* se han utilizado diferentes genes para la identificación de serotipos. Uno de los primeros estudios que se reportan en este sentido empleó los genes *lmo0737*, *orf2819*, *lmo1118* y *orf2120*, en una sola reacción de PCR, la cual fue validada con 222 cepas de *Listeria* [18]. Poutou *et al.* [52] validaron la técnica de PCR para la detección de *L. monocytogenes* aislada de diferentes muestras de alimentos, para lo cual emplearon los *primers* LI1/U1 amplificando una banda de 938 pb del gen rDNA 16S. Liu *et al.* [50] ensayaron nuevos cebadores dirigidos al gen *iap*, que fue seleccionado para detectar y diferenciar *L. monocytogenes* y otras especies de *Listeria*, por medio de amplificación con PCR múltiple a partir de ADN extraído por el método de ebullición de cepas aisladas en medio de cultivo Palcam, provenientes de muestras de carnes frías. Posteriormente, Tao *et al.* [53] en su estudio amplificaron los genes LMof2365_2721, AX25_00730, lin1814, int, lwe1673 y gen de la oxidoreductasa en una sola reacción de PCR, lo cual origina seis amplicones de 583 pb, 703 pb, 421 pb, 994 pb, 345 pb y 201 pb que permiten identificar a *L. monocytogenes*, *Listeria ivanovii*, *Listeria innocua*, *Listeria seeligeri*, *Listeria welshimeri* y *Listeria grayi*, respectivamente.

PCR en tiempo real (Q PCR)

Es una variante de la PCR utilizada para amplificar y, de forma simultánea, cuantificar de manera absoluta el producto de la amplificación de ADN, dado que la fluorescencia, o intensidad de la señal, está correlacionada con la concentración de ADN en la muestra [54], [55].

Kim *et al.* [56] desarrollaron un procedimiento simple y rápido para la detección de *L. monocytogenes* en jugo de fruta no pasteurizado basado en qPCR y sin cultivo de enriquecimiento. Para alcanzar este objetivo, primero, los investigadores eliminaron los inhibidores de la PCR usando la resina Chelex, seguido de una filtración con una columna de Sephadex, procedimiento que solo requiere de veinte minutos. Posteriormente, el jugo purificado fue usado directamente como muestra blanco para realizar la qPCR. Gianfranceschi *et al.* [57], basados en la norma ISO 16140 (microbiología

de los alimentos para consumo humano y animal, protocolo de validación de métodos alternativos), implementaron una técnica de qPCR que permitió obtener resultados en veinticuatro horas por medio de la coamplificación de los genes *hly* y *IAC* de *L. monocytogenes*.

Recientemente, Garrido-Maestu *et al.* [58] optimizaron un método que permite la identificación de *L. monocytogenes* viable en muestras de alimentos, con un límite de detección de 10 UFC/25g. Para esto emplearon los siguientes pasos: enriquecimiento, filtración, aislamiento de ADN y amplificación por medio de qPCR, con lo cual brindaban la posibilidad de implementar esta técnica como un análisis de rutina en la industria de alimentos.

Por otra parte, Alía *et al.* [59] desarrollaron un método de PCR en tiempo real cuádruple que permite establecer la diferencia entre los cuatro serotipos de *L. monocytogenes*, empleando los genes *lmo0737*, *lmo0308*, *ORFC* (locus genómicamente equivalente a *gltA-gltB*) y *ORFC2110*, junto con un fragmento del gen 16S ARNr. El estudio fue realizado a partir de muestras de carne.

Electroforesis en gel de campo pulsado (PFGE)

La electroforesis en gel de campo pulsado (PFGE) se considera la técnica molecular Gold estándar utilizada para tipificar y diferenciar aislamientos de *L. monocytogenes*; esto se debe a que tiene un alto poder discriminatorio, ya que es una técnica exacta y rápida. Algunos autores refieren que para la realización de esta técnica se utiliza el protocolo estandarizado de Pulset Net con algunas modificaciones, empleando las enzimas de restricción *AscI* y *ApaI* [19]. Las enzimas mencionadas se seleccionan dado que el sitio de corte dentro de la secuencia del ADN genómico de *L. monocytogenes* es poco frecuente, lo que genera perfiles simples y simplifica el análisis de los patrones resultantes, así como permite realizar un análisis más rápido y fácil de los aislamientos a través de un *software* [60].

Cardozo-Bernal *et al.* [7] para la caracterización molecular de *L. monocytogenes*, además de las enzimas *AscI* y *ApaI*, recomiendan emplear *NotI*, *SmaI*, *Sse8387I*, *XbaI*, las cuales tienen secuencias

de reconocimiento ricas en GC y, dado que el genoma de *L. monocytogenes* tiene un porcentaje de GC igual a 37,8 %, permite obtener un menor número de bandas al realizar la digestión (de 10 a 20), como ya se había mencionado.

Esta técnica ha sido empleada por varios investigadores para caracterizar *Listeria*, como, por ejemplo, Barancelli *et al.* [25], quienes lograron diferenciar *Listeria* spp. por el perfil de macrorestricción genómica empleando las enzimas AscI y ApaI, y, por otra parte, Gálvao *et al.* [61], quienes consiguieron caracterizar *Listeria monocytogenes* obtenidas de canales bovinos y de plantas de procesamiento de carne.

Entre las ventajas de esta técnica se encuentra su alto poder de discriminación y reproducibilidad, sin embargo, consume más tiempo y trabajo. En años anteriores se han utilizado otros métodos de tipificación genómica que también tienen un alto poder de discriminación como son los RAPD y ERIC PCR, considerados métodos rentables (eficientes, menor tiempo de consumo, menor costo) y simples, que permiten obtener resultados tan confiables como las huellas generadas por PFGE [62].

Microarreglos

En relación con los microarreglos de ADN existen dos formatos: uno basado en oligonucleótidos específicos de secuencia y otro en productos específicos de PCR. Se caracterizan por presentar un número de sondas que son inmovilizadas sobre una superficie sólida. Tras los pasos de hibridación y lavado, el ácido nucleico enlazado a las sondas genera un patrón de fluorescencia que se registra y analiza utilizando un escáner [63]. Bang *et al.* [64] desarrollaron un microarreglo que contiene fragmentos aleatorios de ADN genómico de bacterias patógenas transmitidas por los alimentos, entre ellas *L. monocytogenes*, favoreciendo la detección rápida y simultánea de estos agentes patógenos en una amplia variedad de alimentos. Chan *et al.* [65] emplearon microarreglos de todo el genoma para definir el crecimiento de *L. monocytogenes* en frío, y a fin de identificar los genes expresados diferencialmente durante el crecimiento a 4 °C y a 37 °C.

Otras técnicas

Recientemente, un grupo de investigadores evaluó la técnica de Maldi-TOF MS (desorción/ionización láser asistida por una matriz con detección de masas por tiempo de vuelo) con miras a detectar directamente en caldos de enriquecimiento, es decir, sin aislar colonias, a partir de muestras de heces y alimentos contaminados de forma natural, e identificar *Listeria monocytogenes*. Reportaron una tasa de éxito del 77 %. Esta técnica podría ser prometedora, porque además de permitir la reducción del tiempo, puede llegar a disminuir los costos de diagnóstico. No obstante, aún necesita más pruebas para determinar su viabilidad [66], aunque incluso puede ser de utilidad a nivel epidemiológico.

Finalmente, considerando la importancia de la detección de *L. monocytogenes*, principalmente en los alimentos, la industria ha solicitado a la academia el diseño y la elaboración de métodos para detección rápidos, sensibles y específicos. Estas características requeridas las cumplen, en su mayoría, los métodos de detección molecular. Una de las razones de esto es que el ADN posee una mayor estabilidad frente a los cambios ambientales e incluso ante situaciones extremas de temperatura, humedad y tiempo, lo cual permite la detección del microorganismo de forma precisa e incluso en concentraciones mínimas [67].

En la identificación de *L. monocytogenes* se utilizan con mayor frecuencia métodos moleculares, dado que estos son más precisos, sensibles y específicos, pues permiten tanto identificar como diferenciar *L. monocytogenes* de otras especies de *Listeria* a un nivel de subespecies [68]. Esto se logra por medio de la detección de genes específicos tanto del género como de la especie, para lo cual se utiliza la PCR múltiple [69], [70]. Son técnicas rápidas, sin embargo, requieren de personal capacitado, así como equipos y reactivos que pueden ser de alto costo [45].

En la Tabla 3 se resumen las técnicas de diagnóstico molecular utilizadas en la identificación de *L. monocytogenes*, en lo referente a sus ventajas y desventajas.

Tabla 3. Ventajas y desventajas de las técnicas moleculares

Técnica	Ventajas	Desventajas
PCR simple y múltiple	<ul style="list-style-type: none"> Menor tiempo para la obtención de los resultados comparado con los métodos fenotípicos (4-24 h vs. 5-7 días) Alta especificidad y sensibilidad Detección de varios patógenos al mismo tiempo en una sola reacción (variante múltiple de la PCR) Procesos automatizados Diferenciación de varios serotipos de microorganismos 	<ul style="list-style-type: none"> No permite establecer diferencias entre células vivas y muertas La optimización de la PCR inicialmente puede resultar un reto para los investigadores Requiere enriquecimiento para detectar células visibles Es necesario realizar electroforesis (para evaluar los productos de PCR)
PCR en tiempo real	<ul style="list-style-type: none"> Alta especificidad y sensibilidad No es influenciada por la amplificación no específica Los resultados se pueden leer de inmediato sin necesidad de electroforesis Permite establecer diferencias entre células vivas y muertas 	<ul style="list-style-type: none"> Optimización de ensayos con múltiples genes puede resultar laborioso Equipos de alto costo Posibilidad de contaminación cruzada
Microarreglos	<ul style="list-style-type: none"> Menor tiempo para la obtención de los resultados comparado con los métodos fenotípicos (2-4 h vs. 5-7 días) Labor efectiva (formato de 96 pocillos) Detección simultánea de varias especies o serotipos (acoplamiento de múltiples sondas de forma simultánea) 	<ul style="list-style-type: none"> No permite establecer diferencias entre células vivas y muertas Baja sensibilidad, dado que no es posible detectar directamente sobre la muestra la presencia del microorganismo
PFGE	<ul style="list-style-type: none"> Técnica altamente discriminatoria utilizada en estudios epidemiológicos Alta reproducibilidad si se realiza de manera adecuada 	<ul style="list-style-type: none"> Técnica laboriosa Requiere personal capacitado Equipo de alto costo
Secuenciación	<ul style="list-style-type: none"> Alta especificidad Alto poder de discriminación 	<ul style="list-style-type: none"> Requiere personal capacitado Equipo de alto costo

Fuente: elaboración propia.

Conclusiones

A la ETA, causada por *L. monocytogenes*, a pesar de considerarse un problema de salud pública, no se le ha prestado la importancia que merece, lo cual conduce a subregistros de su incidencia y prevalencia, puesto que no se tiene como uno de los microorganismos de notificación obligatoria.

Aunque las técnicas de diagnóstico fenotípico puedan ser consideradas Gold estándar en la identificación de *L. monocytogenes*, estas presentan muchas desventajas, entre ellas el tiempo requerido para su ejecución, pues requiere de varios días, lo que a su vez hace que aumenten los costos.

A nivel genotípico se realiza la detección de genes de diferentes tipos, relacionados con factores de virulencia del microorganismo, genes conservados como el 16SARNI, lo cual permite la identificación

tanto de género y especie como de serotipos y cepas, así como el establecimiento de relaciones filogenéticas con fines epidemiológicos.

En el grupo de métodos basados en el análisis de los ácidos nucleicos se encuentran los cultivo-dependientes y los cultivo-independientes. En la mayoría de los estudios revisados se observó la combinación de ambos métodos, es decir, fenotípicos y genotípicos, con el fin de obtener resultados fiables.

Debido a que *L. monocytogenes* es un patógeno alimentario se han desarrollado diversos métodos, cada vez más rápidos y sensibles, para su identificación, los cuales permiten la diferenciación entre especies patógenas y no patógenas mediante la implementación tanto de técnicas fenotípicas como genotípicas que se complementan entre sí.

Referencias

- [1] E. C. D. Todd y S. Notermans, “Surveillance of listeriosis by its causative pathogen, *Listeria monocytogenes*”, *Food Cont.*, vol. 22, n.º 9, pp. 1484-1490, sep., 2011.
- [2] C. Buchrieser, “Biodiversity of the species *Listeria monocytogenes* by the genus *Listeria*”, *Microbes Infect.*, vol. 9, n.º 10, pp. 1147-1155, ag., 2007.
- [3] R. S. Hellberg, K. G. K. G. Martin, A. L. Keys, C. J. Haney, Y. Shen y R. D. Smiley, “16S rRNA partial gene sequencing for the differentiation by molecular subtyping of *Listeria* species”, *Food Microbiol.*, vol. 36, n.º 2, pp. 231-240, Dec., 2013.
- [4] R. H. Orsi y M. Wiedmann, “Characteristics y distribution of *Listeria* spp., including *Listeria* species newly described since 2009”, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, vol. 100, n.º 12, pp. 5273-5287, jun., 2016.
- [5] E. Scallan *et al.*, “Foodborne illness acquired in the United States--major pathogens”, *Emerg. Infect. Dis.*, vol. 17, n.º 1, pp. 7-15, en., 2011.
- [6] A. Chlebicz y K. Śliżewska, “Campylobacteriosis, salmonellosis, yersiniosis, y listeriosis as zoonotic foodborne diseases: a review”, *Int. J. Environ. Res. Public Health*, vol. 15, n.º 5, may., 2018.
- [7] Á. M. Cardozo -Bernal *et al.*, “Electroforesis en gel de campo pulsado (PFGE) para la diferenciación molecular de *Listeria monocytogenes*”, *Univ. Sci.*, vol. 18, n.º 2, pp. 203-222, 2013.
- [8] D. K. Soni, R. K. Singh, D. V. Singh y S. K. Dubey, “Characterization of *Listeria monocytogenes* isolated from Ganges water, human clinical y milk samples at Varanasi, India”, *Infect. Genet. Evol.*, vol. 14, pp. 83-91, mar., 2013.
- [9] L. Lotfollahi, A. Chaharbalesh, M. Ahangarzadeh Rezaee y A. Hasani, “Prevalence, antimicrobial susceptibility y multiplex PCR-serotyping of *Listeria monocytogenes* isolated from humans, foods y livestock in Iran”, *Microb. Pathog.*, vol. 107, pp. 425-429, 2017.
- [10] C. D. K. Tchatchouang *et al.*, “Listeriosis outbreak in South Africa: a comparative analysis with previously reported cases worldwide”, *Microorg.*, vol. 8, n.º 1, 2020.
- [11] M. V. Medrano, S. Restrepo y M. C. Vanegas, “Tipificación molecular de *Listeria monocytogenes* aisladas de muestras clínicas y alimentos”, *Biomédica*, vol. 26, no. 3, pp. 442-450, 2006.
- [12] M. C. Vanegas López y A. J. Martínez León, “Serotipificación molecular de cepas colombianas de *Listeria monocytogenes*”, *Aliment. Hoy*, vol. 13, n.º 13, pp. 3-9, oct. 2011.
- [13] A. I. Muñoz, “Distribución de serotipos de *Listeria monocytogenes* aislados de alimentos, Colombia, 2000-2009”, *Biomédica*, vol. 32, n.º 3, mar., 2012.
- [14] E. X. Urbano-Cáceres, A. M. Aguilera-Becerra, y C. P. Jaimes-Bernal, “Determinación del perfil de sensibilidad a antibióticos de *Listeria* spp. en aislamientos de leche cruda de vaca, Tunja”, *Rev. Investig. Salud Univ Boyacá*, vol. 4, n.º 1, pp. 38-52, 2017.
- [15] N. Merchán, S. Zurymar T, L. Niño y E. X. Urbano-Cáceres, “Determinación de la inocuidad microbiológica de quesos artesanales según las normas técnicas colombianas”, *Rev. Chil. Nutr.*, vol. 46, no. 3, pp. 288-294, jun., 2019.
- [16] M. C. Vanegas, E. Vásquez, A. J. Martínez y A. M. Rueda, “Detection of *Listeria monocytogenes* in raw whole milk for human consumption in Colombia by real-time PCR”, *Food Cont.*, vol. 20, n.º 4, pp. 430-432, abr., 2009.
- [17] J. A. Lepe, M. J. Torres, J. Liró, R. Luque y J. Aznar, “Caracterización microbiológica de los aislados de *Listeria monocytogenes* procedentes de casos humanos en Andalucía”, *Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.*, vol. 30, n.º 10, pp. 602-607, dic., 2012.
- [18] M. Doumith, C. Buchrieser, P. Glaser, C. Jacquet y P. Martin, “Differentiation of the major *Listeria monocytogenes* serovars by multiplex PCR”, *J. Clin. Microbiol.*, vol. 42, n.º 8, pp. 3819-22, ag., 2004.
- [19] G. Almeida *et al.*, “Foci of contamination of *Listeria monocytogenes* in different cheese processing plants”, *Int. J. Food Microbiol.*, vol. 167, n.º 3, pp. 303-309, nov. 2013.
- [20] V. Ferreira *et al.*, “Diverse geno- y phenotypes of persistent *Listeria monocytogenes* isolates from fermented meat sausage production facilities in Portugal”, *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 77, n.º 8, pp. 2701-2715, 2011.
- [21] A. Kérouanton, M. Marault, L. Petit, J. Grout, T. T. Dao y A. Brisabois, “Evaluation of a multiplex PCR assay as an alternative method for *Listeria monocytogenes* serotyping”, *J. Microbiol. Methods*, vol. 80, n.º 2, pp. 134-137, feb., 2010.
- [22] H. Jamali, B. Radmehr y K. L. Thong, “Prevalence, characterisation, y antimicrobial resistance of *Listeria* species y *Listeria monocytogenes* isolates from raw milk in farm bulk tanks”, *Food Cont.*, vol. 34, n.º 1, pp. 121-125, nov., 2013.
- [23] P. Ning *et al.*, “Pilot survey of raw whole milk in China for *Listeria monocytogenes* using PCR”, *Food Cont.*, vol. 31, n.º 1, pp. 176-179, may., 2013.
- [24] T. M. Hamdi, M. Naïm, P. Martin y C. Jacquet, “Identification y molecular characterization of *Listeria*

- monocytogenes* isolated in raw milk in the region of Algiers (Algeria),” *Int. J. Food Microbiol.*, vol. 116, n.º 1, pp. 190-193, may., 2007.
- [25] G. V. Barancelli *et al.*, “Pulsed-Field Gel Electrophoresis characterization of *Listeria monocytogenes* isolates from cheese manufacturing plants in São Paulo, Brazil”, *Int. J. Food Microbiol.*, vol. 173, pp. 21-29, mar., 2014.
- [26] A. K. Carrascal Camacho, Y. Albarracín Contreras y P. Sarmiento Torres, “Incidencia de *Listeria monocytogenes* en leche de vaca expendida en el municipio de Pamplona, Colombia”, *Bistua*, vol. 5, n.º 2, pp. 49-57, 2007.
- [27] G. Midelet-Bourdin, G. Leleu y P. Malle, “Evaluation of the International Reference Methods NF EN ISO 11290-1 y 11290-2 y an In-House Method for the Isolation of *Listeria monocytogenes* from retail seafood products in France,” *J. Food Prot.*, vol. 70, n.º 4, pp. 891-900, 2007.
- [28] M. Zunabovic, K. J. Domig y W. Kneifel, “Practical relevance of methodologies for detecting y tracing of *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat foods y manufacture environments. A review”, *LWT-Food Sci. Technol.*, vol. 44, n.º 2, pp. 351-362, mar., 2011.
- [29] T. Engelhardt, R. Ágoston, Á. Belák, C. Mohácsi-Farkas y G. Kiskó, “The suitability of the iso 11290-1 method for the detection of *Listeria monocytogenes*,” *LWT-Food Sci. Technol.*, vol. 71, pp. 213-220, sep., 2016.
- [30] V. López, M. Suarez, I. Chico-Calero, J. Navas y J. Martínez-Suárez, “*Listeria monocytogenes* en alimentos: ¿son todos los aislamientos igual de virulentos?,” *Rev. Argent. Microbiol.*, vol. 38, n.º 4, 2006.
- [31] J.-Q. Chen, P. Regan, P. Laksanalamai, S. Healey y Z. Hu, “Prevalence y methodologies for detection, characterization y subtyping of *Listeria monocytogenes* y *L. ivanovii* in foods y environmental sources,” *Food Sci. Hum. Wellness*, vol. 6, n.º 3, pp. 97-120, 2017.
- [32] U. Gasanov, D. Hughes y P. M. Hansbro, “Methods for the isolation y identification of *Listeria* spp. y *Listeria monocytogenes*: a review,” *FEMS Microbiol. Rev.*, vol. 29, n.º 5, pp. 851-875, nov. 2005.
- [33] D. Liu, “Preparation of *Listeria monocytogenes* specimens for molecular detection y identification”, *Int. J. Food Microbiol.*, vol. 122, n.º 3, pp. 229-242, mar., 2008.
- [34] O. Betancourt *et al.*, “Serotipos de *Listeria monocytogenes* aislados de alimentos producidos en la provincia de Cautín, Chile,” *Rev. Científica*, vol. 20, n.º 5, pp. 529-536, 2010.
- [35] Y. Huang, K. Ye, K. Yu, K. Wang y G. Zhou, “The potential influence of two *Enterococcus faecium* on the growth of *Listeria monocytogenes*”, 2016.
- [36] Z. Ben Belgacem *et al.*, “Antimicrobial activity, safety aspects, y some technological properties of bacteriocinogenic *Enterococcus faecium* from artisanal Tunisian fermented meat”, *Food Cont.*, vol. 21, n.º 4, pp. 462-470, apr., 2010.
- [37] M. C. Coelho, C. C. G. Silva, S. C. Ribeiro, M. L. N. E. Dapkevicius y H. J. D. Rosa, “Control of *Listeria monocytogenes* in fresh cheese using protective lactic acid bacteria”, *Int. J. Food Microbiol.*, vol. 191, pp. 53-59, nov., 2014.
- [38] K. Bayoub, I. Mardad, E. Ammar, A. Serrano y A. Soukri, “Isolation and purification of two bacteriocins 3D produced by *Enterococcus faecium* with inhibitory activity against *Listeria monocytogenes*”, *Curr. Microbiol.*, vol. 62, n.º 2, pp. 479-485, feb., 2011.
- [39] A. Carvalheira, C. Eusébio, J. Silva, P. Gibbs y P. Teixeira, “Influence of *Listeria innocua* on the growth of *Listeria monocytogenes*”, *Food Cont.* vol. 21, n.º 11, pp. 1492-1496, nov., 2010.
- [40] M. C. Vanegas *et al.*, “Acción bactericida de bacterias acidolacticas contra *Listeria monocytogenes* serotipo 4b,” *Aliment. Hoy*, vol. 21, n.º 25, pp. 91-99, apr., 2012.
- [41] Á. B. Muñoz, J. A. Chaves, E. Catering Rodríguez y M. E. Realpe, “*Listeria monocytogenes* en manipuladores de alimentos: un nuevo enfoque para tener en cuenta en los peligros de la industria alimentaria”, *Bioméd.*, vol. 3333, pp. 283-91283, 2013.
- [42] P. Murray, K. S. Rosenthal y M. A. Pfaller, *Microbiología médica*. Elsevier Editora, 2014.
- [43] E. X. Urbano-Cáceres, A. Aguilera-Becerra, C. James-Bernal y M. Pulido-Medellín, “*Listeria* spp., in churn storage of raw cow’s milk in Tunja-Boyacá,” *Rev. MVZ Cordoba*, vol. 23, n.º 3, pp. 6871-6877, 2018.
- [44] E. Shamloo, H. Hosseini, A. Z. Moghadam, H. M. Larsen, A. Haslberger, y M. Alebouyeh, “Importance of *Listeria monocytogenes* in food safety: a review of its prevalence, detection, y antibiotic resistance”, *Iran. J. Vet. Res.*, vol. 20, n.º 4, pp. 241-254, 2019.
- [45] S. Jadhav, M. Bhave y E. A. Palombo, “Methods used for the detection y subtyping of *Listeria monocytogenes*”, *J. Microbiol. Methods*, vol. 88, n.º 3, pp. 327-341, mar., 2012.
- [46] V. Boric Bonifaz, “Aplicaciones de la Epidemiología Molecular en la detección de brotes de enfermedades transmitidas por alimentos. Avances en Latinoamérica”, *Biofarbo*, vol. 16, pp. 92-97, 2008.
- [47] A. Vera, G. González, M. Domínguez y H. Bello, “Principales factores de virulencia de *Listeria monocytogenes* y su regulación”, *Rev. Chil. Infectol.*, vol. 30, n.º 4, pp. 407-416, 2013.

- [48] R. Callejo *et al.*, “Estudio mediante PCR múltiple de serotipos de *Listeria monocytogenes* aislados en Argentina,” *Rev. Argent. Microbiol.*, vol. 40, pp. 89-92, 2008.
- [49] J. Gallegos, G. Arrieta, S. Máttar, R. Poutou, A. Trespalacios, y A. Carrascal, “Frecuencia de *Listeria* spp. en quesos colombianos costeños,” *Rev. MVZ Córdoba Agosto*, vol. 12, n.º 23, pp. 996-1012, 2007.
- [50] H. Liu *et al.*, “Rapid detection y differentiation of *Listeria monocytogenes* y *Listeria* species in deli meats by a new multiplex PCR method,” *Food Cont.*, vol. 52, pp. 78-84, jun., 2015.
- [51] F. H. Rivera, I. Wesley, S. Hurd, D. Simoes, A. Sosa y S. Rivera, “Determinación microbiológica y molecular de *Listeria* sp. y *Listeria monocytogenes* en cerdas a nivel de una planta beneficiadora en EUA,” *Rev. Científica, FCV-LUZ*, vol. 16, no. 3, pp. 297-307, 2006.
- [52] R. Potou, M. Burbano, S. Sierra, K. Torres, A. Carrascal, y M. Mercado, “Estandarización de la extracción de ADN y validación de la PCR múltiple para detectar *Listeria monocytogenes* en queso, leche, carne de res y pollo,” *Univ. Sci. Rev. la Fac. Ciencias*, vol. 10, no. 2, pp. 61-78, 2005.
- [53] T. Tao, Q. Chen, X. Bie, F. Lu, y Z. Lu, “Investigation on prevalence of *Listeria* spp. y *Listeria monocytogenes* in animal-derived foods by multiplex PCR assay targeting novel genes,” *Food Cont.*, vol. 73, pp. 704-711, mar., 2017.
- [54] C. Vinuesa-Burgos, “PCR en Tiempo Real: la nueva era de la información genética celular”, *Redvet. Rev. electrónica Vet.*, vol. 10, no. 2, pp. 1695-7504, 2009.
- [55] M. Angarita Merchán, M. I. Torres Caicedo y A. K. Díaz Torres, “Técnicas de Biología Molecular en el desarrollo de la investigación. Revisión de literatura,” *Rev haban cienc méd*, vol. 16, n.º 5, pp. 796-807, 2017.
- [56] H.-J. Kim y J.-C. Cho, “Simple y rapid detection of *Listeria monocytogenes* in fruit juice by real-time PCR without enrichment culture,” *Food Control*, vol. 21, n.º 10, pp. 1419-1423, oct., 2010.
- [57] M. V. Gianfranceschi *et al.*, “European validation of a real-time PCR-based method for detection of *Listeria monocytogenes* in soft cheese,” *Int. J. Food Microbiol.*, vol. 184, pp. 128-133, ag., 2014.
- [58] A. Garrido-Maestu, S. Azinheiro, J. Carvalho y M. Prado, “Rapid y sensitive detection of viable *Listeria monocytogenes* in food products by a filtration-based protocol y qPCR,” *Food Microbiol.*, vol. 73, pp. 254-263, 2018.
- [59] A. Alía, M. J. Andrade, J. J. Córdoba, I. Martín y A. Rodríguez, “Development of a multiplex real-time PCR to differentiate the four major *Listeria monocytogenes* serotypes in isolates from meat processing plants,” *Food Microbiol.*, vol. 87, p. 103367, 2020.
- [60] S. B. Hunter *et al.*, “Establishment of a universal size standard strain for use with the PulseNet standardized pulsed-field gel electrophoresis protocols: converting the national databases to the new size standard,” *J. Clin. Microbiol.*, vol. 43, n.º 3, pp. 1045-50, Mar. 2005.
- [61] N. N. Galvão, E. Chiarini, M. T. Destro, M. de Aguiar Ferreira y L. A. Nero, “PFGE characterisation y adhesion ability of *Listeria monocytogenes* isolates obtained from bovine carcasses y beef processing facilities”, *Meat Sci.*, vol. 92, n.º 4, pp. 635-643, dic. 2012.
- [62] I. Shakuntala *et al.*, “Prevalence, characterization, y genetic diversity of *Listeria monocytogenes* isolated from foods of animal origin in North East India”, *Food Biotechnol.*, vol. 33, n.º 3, pp. 237-250, 2019.
- [63] C. Palomino-Camargo y Y. González-Muñoz, “Técnicas moleculares para la detección e identificación de patógenos en alimentos: ventajas y limitaciones”, *Rev. Peru. Med. Exp. Salud Publica*, vol. 31, n.º 3, pp. 535-546, 2014.
- [64] J. Bang *et al.*, “Development of a random genomic DNA microarray for the detection y identificación of *Listeria monocytogenes* in milk,” *Int. J. Food Microbiol.*, vol. 161, n.º 2, pp. 134-141, feb., 2013.
- [65] Y. C. Chan, S. Raengpradub, K. J. Boor y M. Wiedmann, “Microarray-based characterization of the *Listeria monocytogenes* cold regulon in log- y stationary-phase cells,” *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 73, n.º 20, pp. 6484-98, oct., 2007.
- [66] T. M. C. Araújo *et al.*, “Evaluation of Maldi-TOF MS as a tool for detection of *Listeria* spp. directly from selective enrichment broth from food y stool samples,” *J. Microbiol. Methods*, vol. 173, n.º ma., p. 105936, 2020.
- [67] P. Hyden *et al.*, “Whole genome sequence-based serogrouping of *Listeria monocytogenes* isolates”, *J. Biotechnol.*, vol. 235, pp. 181-186, oct., 2016.
- [68] L. Tamay de Dios, C. Ibarra y C. Velasquillo, “Fundamentos de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y de la PCR en tiempo real,” *Investig. en Discapac.*, vol. 2, n.º 2, pp. 70-78, 2013.
- [69] A. M. Bolivar, A. Rojas y P. G. Lugo, “PCR y PCR-Múltiple: parámetros críticos y protocolo de estandarización (PCR y PCR -Multiplex: critical parameters y standardization protocol),” *Av. en Biomed.*, vol. 3, n.º 1, pp. 25-33, 2014.
- [70] G. Díaz-Ruiz y C. Wachter, “Métodos actuales para el estudio de microorganismos en alimentos”, in *Impacto de la biología molecular y las nuevas tecnologías en el conocimiento de la función celular y sus aplicaciones.*, UAM, F. Fierro Fierro y M. Vergara Onofre, Eds. 2011, pp. 45-54.

