

ZAMORANO
CARRERA DE AGROINDUSTRIA ALIMENTARIA

Optimización de dos protocolos de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para la detección de *Listeria monocytogenes*

Proyecto especial presentado como requisito parcial para optar
al título de Ingeniera en Agroindustria Alimentaria en el Grado
Académico de Licenciatura.

Presentado por:

Priscila Carolina Latorre Viteri

Zamorano, Honduras
Diciembre, 2008

RESUMEN

Latorre, P. 2008. Optimización de dos protocolos de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para la detección de *Listeria monocytogenes*. Proyecto de graduación del programa de Ingeniería en Agroindustria Alimentaria, Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano. Honduras. 27p.

Listeria monocytogenes es una bacteria patógena que puede crecer a temperatura de 4 °C y pH de 5.0, causa listeriosis y está asociada con cárnicos, lácteos y vegetales. El objetivo de este estudio fue optimizar dos protocolos de PCR para la detección de *L. monocytogenes* adaptados a las condiciones del Laboratorio de Biotecnología Aplicada, Zamorano, Honduras. Se optimizaron los primers LM y MAR que identifican los genes *hlyA* e *iap*, respectivamente. Se extrajo ADN de *L. monocytogenes* con buffer de lisis con Proteinasa K, y de *Escherichia coli* ATCC 25922 y *E. coli* O157:H7 con buffer PEX como controles negativos. Se optimizó la mezcla maestra para la amplificación en PCR con cada primer. Para el primer LM el volumen de la mezcla maestra fue 45 µl (agua destilada y desionizada 27 µl, buffer 6 µl, dNTP's + MgCl₂ 9 µl, primer LM1 1.25 µl, primer LM2 1.25µl, Taq polimerasa 0.5 µl). Para el primer MAR el volumen de la mezcla maestra fue de 15 µl (agua destilada y desionizada 8.75 µl, buffer 3 µl, dNTP's + MgCl₂ 1 µl, primer MAR1 1 µl, primer MAR2 1µl, Taq polimerasa 0.25 µl). Para ambos protocolos la cantidad de ADN muestra fue 5 µl. Se validó el funcionamiento de los primers aplicándolos en alimentos. Se inocularon muestras de carne, leche y lechuga que incubaron por 24 horas a 37 °C. Se hizo la extracción de ADN con buffer PEX. Los protocolos resultantes amplificaron sólo para las muestras incubadas de lechuga y leche. Con este estudio se obtuvo dos protocolos optimizados para la detección de *Listeria monocytogenes* por PCR.

Palabras clave: ADN, *hlyA*, *iap*, LM, MAR, primers

CONTENIDO

	Página
Portadilla	i
Página de firmas	ii
Resumen	iii
Contenido	iv
Índice de Cuadros, Figuras y Anexos	v
1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. REVISIÓN LITERARIA	3
3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	6
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	13
5. CONCLUSIONES	21
6. RECOMENDACIONES.....	22
7. BIBLIOGRAFÍA	23
8. ANEXOS.....	25

ÍNDICE DE CUADROS, FIGURAS Y ANEXOS

Cuadro		Página
1	Descripción de los primers utilizados.....	8
2	Perfil térmico de PCR para primer LM.....	8
3	Perfil térmico de PCR para primer MAR.....	8
4	Protocolo referencia para PCR.....	9
5	Protocolo referencia para PCR.....	9
6	Perfil de los primers utilizados.....	9
7	Concentración inicial de ADN de <i>L. monocytogenes</i> a partir de cultivos puros.....	13
8	Cantidad de ADN de <i>E. coli</i> O157:H7 en ng/ml.....	14
9	Cantidad de ADN de <i>E. coli</i> ATCC 25922 en ng/ml.....	14
10	Protocolos resultantes.....	15
11	Protocolos realizados en los ensayos #1 y #2 para el primer LM.....	16
12	Protocolos realizados en los ensayos #3 y #4 para los primers LM y MAR.....	17
13	Protocolos realizados en los ensayos #5 y #6 para los primers LM y MAR.....	18

Figura		Página
1	Amplificación de los productos de PCR de los protocolos P7 a P10 usando los marcadores LM y MAR.....	17
2	Amplificación de los productos de PCR de los protocolos P6 para el marcador LM y P16 para el marcador MAR.....	19
3	Validación del protocolo P6 para el marcador LM con alimentos intencionalmente inoculados.....	20
4	Validación del protocolo P16 para el marcador MAR con alimentos intencionalmente inoculados.....	20

Anexo	Página
1	Siembra por estría en tubos con medio sólido inclinado 26
2	Preparación de Agar de soya tríptica (Difco modificado) 26
3	Siembra de muestra líquida en placa con asa de Digrafsky 26
4	Aislamiento en estría múltiple (técnica de rayado) 27
5	Preparación BBL TM Extracto de carne de vacuno en polvo (Difco modificado)..... 27
6	Cuantificación de ADN 27
7	Dilución de ADN (15, 20, 25 y 30 ng/ml) por el método de la Universidad de Wisconsin, UW – Madison (modificado) 28
8	Protocolo para extracción de ADN con Proteinasa K. 28
9	Reactivos usados para la extracción de ADN de <i>Listeria monocytogenes</i> 29
10	Rehidratación de primers 29
11	Escalera molecular de 100 pb (PROMEGA, 2007) 30
12	Preparación Difco TM Caldo Universal de Preenriquecimiento. 30

1. INTRODUCCIÓN

Listeria monocytogenes es una bacteria gram positiva, aerobia y anaerobia facultativa que se encuentra fácilmente en el ambiente. Su capacidad para resistir condiciones adversas de temperatura y pH la convierten en un patógeno importante en la industria alimentaria. Sus cualidades psicrotófas la hacen capaz de tolerar temperaturas de refrigeración de hasta 4 °C; también resisten un pH relativamente bajo de hasta 5.0, aunque crecen lentamente.

Su importancia también radica en que es causante de la listeriosis, una grave infección producto de la ingestión de alimentos contaminados; que afecta principalmente a inmunosuprimidos, mujeres embarazadas y población en riesgo como niños y ancianos. Las manifestaciones de la listeriosis incluyen septicemia, meningitis, encefalitis y abortos. Su morbilidad no es alta ya que es de 10 casos por millón de habitantes por año; sin embargo, tiene una alta mortalidad, entre el 20 y 30 % de los enfermos con listeriosis fallecen.

En la actualidad muchos productos alimenticios son exportados e importados, y garantizar la calidad e inocuidad de estos es imprescindible. Actualmente, los métodos convencionales para detectar *Listeria monocytogenes* requieren de mucho tiempo, entre 5 y 7 días, o más. Como alternativa a estos métodos convencionales han surgido procesos altamente precisos y rápidos que se enfocan en la detección de patógenos a través de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés); mediante la cual se obtiene millones de copias de un fragmento específico de ADN característico del patógeno analizado.

En Honduras no se han hecho estudios previos de ningún tipo con este patógeno y resulta difícil deducir la incidencia de esta bacteria en el país, ya que los hospitales y centros de salud registran a todos los pacientes con problemas gastrointestinales como cuadros diarreicos (Centro de Salud Alonso Suazo, 2008, comunicación personal) ¹

El objetivo de este estudio fue implementar dos protocolos de PCR para la detección de *L. monocytogenes* en la Escuela Agrícola Panamericana E.A.P. Zamorano; extrayendo ADN de *L. monocytogenes* a partir de un cultivo puro y también ADN de *Escherichia coli* O157:H7 y *E. coli* ATCC 25922 para ser usados como controles negativos. Estableciendo protocolos de PCR para la detección de *Listeria monocytogenes* con los primers LM y MAR los cuales identifican los genes *hlyA* e *iap*, respectivamente.

¹ Centro de Salud Alonso Suazo, 2008. Estudios recientes en Honduras con *Listeria monocytogenes* (entrevista telefónica). Tegucigalpa.

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo general

- Implementar dos protocolos de PCR para la detección de *Listeria monocytogenes* en la Escuela Agrícola Panamericana E.A.P, Zamorano.

1.1.2 Objetivos específicos

- Extraer ADN de *Listeria monocytogenes* a partir de un cultivo puro.
- Extraer ADN de *Escherichia coli* O157:H7 y *Escherichia coli* ATCC 25922 para ser usados como controles negativos.
- Establecer protocolos de PCR para la detección de *Listeria monocytogenes* con los primers LM y MAR, que identifican los genes *hlyA* e *iap* de *Listeria monocytogenes*, respectivamente.
- Validar los protocolos obtenidos realizando PCR para muestras de carne, leche y lechuga inoculadas con *Listeria monocytogenes*.

2. REVISIÓN LITERARIA

2.1 *Listeria monocytogenes*

Según Holt *et al.* (1994), *Listeria monocytogenes* es una bacteria gram-positiva, no esporulada ni encapsulada. Las colonias en agar nutriente poseen un bajo perfil convexo, son translúcidas, enteras y de color azul grisáceo. Es comúnmente encontrada en la naturaleza y en el sistema digestivo de animales de sangre caliente incluyendo humanos. Es un microorganismo aerobio y anaerobio facultativo. Su temperatura óptima de crecimiento está entre 30-37 °C. Las cualidades psicotrópicas de este organismo le permiten crecer a temperaturas de refrigeración alrededor de 4 °C, aunque lentamente, por lo que es considerada de gran importancia para la industria alimentaria. Si está presente en alimentos y bajo condiciones óptimas, esta bacteria puede crecer a un pH bajo de hasta 5.0, a una actividad de agua de hasta 0.94 y a una temperatura tan baja como 1 °C. (Beckers *et al.*, 1990)

Cuando los alimentos son almacenados durante largos períodos de tiempo, la bacteria puede alcanzar números altamente considerables. Está asociada con alimentos tales como leche cruda, leche fluida pasteurizada, quesos (particularmente variedades blandas-maduras), helados, vegetales crudos, embutidos fermentados de carne cruda, carnes crudas de todos los tipos y pescado ahumado y cocido Hitchins (1998).

Según el CDC (2008), la listeriosis es una infección grave causada por comer alimentos contaminados con esta bacteria. Recientemente ha sido reconocida como un importante problema de salud pública en los Estados Unidos. La enfermedad afecta principalmente a personas de edad avanzada, mujeres embarazadas, recién nacidos y adultos con sistemas inmunes debilitados. Las manifestaciones de la listeriosis incluyen septicemia, meningitis, encefalitis e infecciones intrauterinas en mujeres embarazadas. Los síntomas gastrointestinales como náuseas, vómitos y diarrea pueden preceder a formas más graves de listeriosis. El tiempo de latencia para formas graves de la listeriosis es desconocida, pero puede variar desde unos pocos días a tres semanas. El tiempo de latencia de síntomas gastrointestinales probablemente sea superior a las 12 horas. La dosis infecciosa se cree que varía en función de la cepa y la susceptibilidad de la víctima. Sin embargo, en personas susceptibles, menos de 1000 organismos totales pueden causar la enfermedad. La patogenia de *L. monocytogenes* se centra en su capacidad para sobrevivir y multiplicarse en las células fagocíticas del hospedero (Hitchins, 1998).

L. monocytogenes produce una toxina llamada listeriolisina O, que actúa como un importante factor de virulencia. Se secreta a pH bajo y baja concentración de hierro. Cuando es fagocitado, el microorganismo empieza a fabricar la listeriolisina, que se fija al

colesterol y rompe la membrana del fagolisosoma. (Oteo y Alós, s.f.). En la invasión intestinal por *L. monocytogenes* también participa la proteína p60 la cual es ajena al regulador central de virulencia *prfA*. Se localiza en la superficie bacteriana y resulta trascendental para el crecimiento celular. Cuando el gen que codifica para la p60, gen *iap*, es afectado se manifiesta una pequeña o nula capacidad para invadir a las células hospederas (Garza *et al.*, s.f.).

En los Estados Unidos, se estima que 2500 personas se enferman gravemente de listeriosis cada año; de estos, 500 mueren (CDC, 2008). En general, la morbilidad es baja, 10 casos por millón; pero la mortalidad es alta, el 30% de los pacientes con listeriosis mueren (Beckers *et al.*, 1990).

De acuerdo a Hitchins (1998), los métodos de análisis de alimentos son complejos y consumen tiempo; se requiere 24 y 48 horas de enriquecimiento, y el tiempo total para la identificación es de 5 a 7 días.

2.2 Acido Desoxiribonucleico (ADN)

El ADN es un polímero largo y delgado, compuesto de dos cadenas entrelazadas de polinucleótidos que forman una doble hélice. Cada nucleótido contiene un fosfato, un azúcar, y una base nitrogenada. La característica estructural más importante es el apareamiento específico entre sus cuatro bases complementarias: adenina con timina y guanina con citosina. (PIF, 2008).

Según Stansfield (1992), en las bacterias la mayor parte de su información genética reside en una sola molécula de ADN circular llamada genóforo. La estructura de las bacterias aerobias es parecida a la de una mitocondria, ya que esta posee un genoma propio de doble hélice circular como el de las bacterias (Viklund, 2007).

2.3 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Técnica desarrollada por Mullis en 1983. La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) es una técnica para la duplicación enzimática *in vitro* de fragmentos específicos de ADN. (Mullis, s.f.; citado por PIF, 2008). Para efectuar la reacción se necesita: una horma o molde de ADN, que provee la información genética de interés que desea amplificarse para lograr su visualización. Se requieren cebadores o primers, que son fragmentos "sintéticos" de ADN con una secuencia de bases nitrogenadas conocida que se acoplan a segmentos complementarios en las cadenas individuales de ADN. La Taq polimerasa es la enzima catalizadora termoestable que elonga los cebadores. Las bases nitrogenadas libres están en forma de desoxinucleótidos trifosfatos (dNTP's), y extienden la nueva cadena de ADN mediante su acoplamiento a la original por acción de la Taq-polimerasa. Por último se necesita el tampón, que es una solución estabilizadora que contiene iones de potasio y magnesio con un pH aproximado de 8.4. El magnesio es un ion indispensable para que la Taq polimerasa pueda catalizar la reacción.

Todos estos elementos se acoplan en tres fases: desnaturalización, acoplamiento y elongación. Durante la primera fase el molde de ADN en una mezcla con los cebadores, la Taq polimerasa y las bases nitrogenadas, es sometido a alta temperatura (90-95 °C) para su completa desnaturalización por la ruptura de las uniones de hidrógeno. Durante el acoplamiento la mezcla es enfriada (55-72 °C) para que los cebadores se unan a la secuencia complementaria en cada una de las cadenas de ADN. En la elongación se incrementa la temperatura (72 °C) para que la Taq polimerasa extienda los primers sobre la horma de ADN mediante la adición de las bases nitrogenadas libres, con el fin de sintetizar la nueva cadena amplificando las regiones de ADN de interés. Al finalizar el proceso se obtienen dos moléculas idénticas de ADN. Estas tres fases forman un ciclo de PCR y permiten la multiplicación exponencial del ADN original. El número de ciclos oscila entre 20 y 35 (PIF, 2008).

2.4 Electroforesis

Técnica empleada para separar ácidos nucleicos con masa molecular diferente. Las moléculas más grandes de ADN, mayor a 100 pb, se fraccionan en gel de agarosa (Karp, 2006). Se utiliza un tampón de carga que es un reactivo compuesto por un colorante, que permite visualizar la muestra dentro del gel. Los productos amplificados de PCR se colocan en el gel en el siguiente orden: escalera molecular, control positivo y control negativo. La escalera molecular es una mezcla de ADN de varios tamaños y peso molecular, que sirve para comparar la migración de sus bandas con la banda obtenida en la amplificación y determinar de esta manera el tamaño de esta última. El control positivo es el producto de una reacción de PCR que contiene el ADN amplificado del patógeno en estudio y sirve de patrón de comparación para determinar si las demás muestras son positivas. El control negativo es el producto de una reacción de PCR que no contiene ADN amplificado del patógeno en estudio.

Para poder visualizar el ADN en el gel de agarosa se utiliza bromuro de etidio que tiene la propiedad de intercalarse entre las bases que componen la doble cadena de ADN. El complejo que forma el bromuro de etidio con el ADN al momento de ser expuesto a luz ultra violeta fluoresce, tomando un color anaranjado (PIF, 2008).

Entre los genes usados en PCR para la de detección de *L. monocytogenes* están el *hlyA* (*LisA*, listeriolysin O), que codifica la listeriolisina (Mengaud *et al.* 1988; citado por Aznar y Alarcón, 2001), el *iap* (proteína asociada a la invasión) (Köhler *et al.* 1990; citado por Aznar y Alarcón, 2001). El elegido con más frecuencia ha sido el gen *hlyA* a partir del cual la amplificación de fragmentos de diferentes tamaños se ha generado con primers específicos (Hill, 1996; citado por Aznar y Alarcón, 2001). Estos genes han sido mencionados como específicos para *L. monocytogenes* después de haber sido probados, ya sea por hibridación de membrana o PCR (Aznar y Alarcón, 2001).

Estudios realizados por Manzano y Comi (1997) nos sugieren que los primers MAR1 y MAR2, localizados dentro del gen *iap* de *L. monocytogenes* causan la amplificación de un fragmento de 453 pb. Mientras que Border *et al.* (1990), sugieren que los primers LM1 Y LM2 localizados en el gen *hlyA* amplifican un fragmento de 702 pb.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Ubicación.

El ensayo se llevó a cabo en el Laboratorio de Fitomejoramiento y Biotecnología Aplicada del Programa de Investigaciones en Frijol (PIF) y el Laboratorio de Microbiología de Alimentos de la EAP/Zamorano.

3.2 Microorganismos utilizados.

Se utilizó *Listeria monocytogenes* la cual fue donada en medio de cultivo sólido por el Departamento de Microbiología de la Universidad Nacional Autónoma de Honduras (UNAH). Se obtuvo un banco de la bacteria para preservarla por mayor tiempo usando el método de siembra por estría en tubos con medio sólido inclinado (Anexo 1), se inoculó en seis tubos de ensayo de 30 ml y se mantuvieron a temperatura de refrigeración de 7°C. Se empleó *Escherichia coli* ATCC 25922 y *E. coli* O157:H7 aisladas de estiércol.

3.3 Condiciones de crecimiento en medio de cultivo sólido.

Para *Listeria monocytogenes* se preparó un medio de cultivo de agar nutriente de soya tríptica (Difco) según el procedimiento sugerido por la casa comercial (Anexo 2). Se colocó el medio de cultivo esterilizado en seis platos petri y posteriormente se sellaron con láminas de parafilm para evitar su contaminación. Para la inoculación se tomó con un asa de siembra el cultivo de *Listeria monocytogenes* del banco previamente preparado y por medio de la técnica de siembra de muestra líquida en placa con asa de Digralsky (Anexo 3). Se realizó la inoculación en los platos petri, los cuales se incubaron a 28°C por 96 horas. Para aislar las *E. coli* se homogenizó 10g de estiércol con 10 ml de agua peptonada al 0.1% en un homogenizador. Se inoculó mediante la técnica de rayado (Anexo 4) en medio selectivo Agar MacConkey con sorbitol y se incubó a 37 °C durante 24 horas. Todo el proceso se realizó bajo condiciones asépticas y siguiendo las normas de buenas prácticas de seguridad (BPS).

3.4 Condiciones de crecimiento en caldo nutritivo.

El caldo nutritivo con extracto de carne (Scott) se preparó según el procedimiento sugerido por la casa comercial (Difco) (Anexo 5). Se distribuyó la mezcla al 2% en 24 microtubos de 1.5ml y se autoclavó a 125°C durante 20 min. Se inoculó la bacteria

tomando con el asa de siembra las colonias presentes en los platos petri que anteriormente se inocularon. Se introdujo el asa en el medio de cultivo en la zona central; por cada microtubo se depositó una colonia. Todo el proceso se realizó bajo condiciones asépticas. Los microtubos se mantuvieron en agitación por ocho días a una temperatura ambiente de 25° C.

3.5 Extracción de ADN cromosomal a partir de un cultivo puro.

Para la extracción de ADN se modificó el protocolo de extracción con Proteinasa K para plantas descrito por Guidet 1994 (Anexo 8); citado por Valadez y Kahl (2000). De acuerdo a este autor la acción combinada de la proteinasa K y el ácido etilen-diamino-tetracético (EDTA) inhibe o destruye completamente a las nucleasas, que son enzimas que catalizan la hidrólisis de enlaces fosfodiéster en las moléculas de ácidos nucleicos (Valadez y Kahl, 2000). Se centrifugó los 24 tubos de 1.5 ml que contenían la bacteria a 14000 rpm durante 10 minutos. Se eliminó parte del sobrenadante. Se colocó 50 µl del líquido restante en un plato de PCR y se añadió 20.8 µl de buffer de lisis a cada tubo en el plato de PCR. Se cubrió con papel cubre plato de aluminio y se introdujo en el termociclador (Techne TC-512) a 65° C por 15 minutos, tiempo y temperatura necesarios para que actúe de forma eficiente la Proteinasa K, y a 95 °C por 10 minutos para desnaturalizar el ADN (Guachambala, 2007). El ADN para los controles negativos fue extraído usando buffer PEX.

3.6 Cuantificación de ADN.

Para la cuantificación y dilución del ADN obtenido se siguió los protocolos sugeridos por el Manual del Módulo de Diagnóstico Molecular del Laboratorio de Fitomejoramiento y Biotecnología Aplicada (Anexo 6 y Anexo 7). Se mezcló 2ml de buffer de cuantificación (10 µl solución para tinción concentrada + 100 ml buffer TNE 1X; pH=7.4) con 2 µl de muestra de ADN. Se empleó un fluorómetro Hoefler DyNA Quant 200 TKO-100, λ_{ex} + 365 nm, λ_{em} + 460 nm, calibrado con ADN estándar concentrado a 100 ng/ml. Las mediciones se realizaron a 260 nm y las muestras se diluyeron a una concentración final de 15, 20, 25 y 30 ng/ml.

3.7 Condiciones para la reacción de PCR.

Para la reacción de PCR se empleó los siguientes reactivos: primers LM1-LM2 y MAR1-MAR2 (Cuadro 1) los cuales se llevaron a una concentración final de 1µM y a volumen final de 500 µl (Anexo 10), buffer PCR 5X Green GoTaq® Flexi Buffer que contiene colorante azul el cual migra a la misma tasa que un fragmento de ADN de 3-5 kb y el colorante amarillo que migra a una tasa más rápida que los primers (<50pb), cloruro de magnesio (MgCl₂), dideoxinucleótidos trifosfatos (dNTP's), enzima GoTaq® ADN Polimerasa (PROMEGA, 2005) y ADN muestra. El volumen final de la reacción fue 50 µl para LM1-LM2 y 20 µl para MAR1-MAR2. Como referencia se tomó el protocolo sugerido por la casa comercial PROMEGA (Cuadro 4) y el protocolo

propuesto por el Dr. César Benito Profesor de la Universidad Complutense de Madrid (Cuadro 5).

Cuadro 1. Descripción de los primers utilizados.

Secuencias de Primer Orientación 5' a 3'	Gen	tamaño (pb)	Referencia
LM1: CCTAAGACGCCAATCGAA		18	
LM2: AAGCGCTTGCAACTGCTC	<i>hlyA</i>	18	Border (1990)
MAR1: GGGCTTTATCCATAAAATA		19	
MAR2: TTGGAAGAACCTTGATTA	<i>Iap</i>	18	Manzano y Comi (1997)

Cuadro 2. Perfil térmico de PCR para pimer LM.

Etapas	Temperatura (°C)	Tiempo
Desnaturalización inicial	94	5 min
Desnaturalización	94	30 s
Acoplamiento	50	45 s
Extensión	72	45 s
Extensión final	72	5 min

} 35 ciclos

Cuadro 3. Perfil térmico de PCR para primer MAR.

Etapas	Temperatura (°C)	Tiempo
Desnaturalización inicial	95	5 min
Desnaturalización	95	90s
Acoplamiento	46	80s
Extensión	72	2 min
Extensión final	72	7 min

} 35 ciclos

Cuadro 4. Protocolo referencia para PCR.

Componente	Volumen Final	Concentración final
5X Green GoTaq® Flexi Buffer	10 µl	1X
Solución MgCl ₂ , 25 Mm	2-8 µl	1.0-4.0 mM
PCR Nucleotide Mix, 10mM cada uno	1 µl	0.2 mM cada dNTP
Primer superior	X µl	0.1-1.0 µM
Primer inferior	Y µl	0.1-1.0 µM
GoTaq® ADN Polimerasa (5u/µl)	0.25 µl	1.25 u
ADN templete	Z µl	<0.5µg/50 µl
Nucleasa libre de agua a	50 µl	

Fuente: PROMEGA (2005).

Cuadro 5. Protocolo referencia para PCR.

Componente	Volumen Final
Agua destilada y desionizada	11 µl
Solución Buffer 5X	2 µl
dNTP's con MgCl ₂	0.4 µl
Primer superior	2µl
Primer inferior	2µl
Taq Polimerasa	0.6 µl
ADN templete	2 µl
Volumen final de mezcla maestra	20 µl

Fuente: Dr. César Benito Universidad Complutense de Madrid (2008)².

Cuadro 6.- Perfil de los primers utilizados.

Secuencias de Primer	nanomoles por			
	Orientación 5' a 3'	OD's	OD	ug's
LM1: CCTAAGACGCCAATCGAA		9.93	5.60	303.15
LM2: AAGCGCTTGCAACTGCTC		9.30	6.16	312.32
MAR1: GGGCTTTATCCATAAAATA		11.36	5.22	343.78
MAR2: TTGGAAGAACCTTGATTA		10.34	5.55	317.73

Fuente: Invitrogen (2008).

3.8 Electroforesis de ADN.

Los ADN obtenidos en las extracciones y los productos de PCR fueron visualizados en geles de agarosa al 1.2% en tampón TBE 0.5X (Tris-HCl, pH 7.5; ácido bórico, EDTA). Fueron separados a 80V durante 40 minutos en geles pequeñas y 75 minutos en geles grandes, teñidos en una solución 1:10 bromuro de etidio y agua destilada durante 40 minutos y fotografiados bajo luz ultravioleta. Como marcador de talla molecular se empleó una escalera molecular de 100 pb de PROMEGA (Anexo 11), y para visualizar la migración del ADN a través de la gel de electroforesis se empleó el blue/orange 6x loading dye (G190A) cuya composición es 15% Ficoll® 400, 0.03% azul de bromofenol, 0.03% xileno cianol FF, 0.4% anaranjado G, 10 mM Tris-HCl (pH 7.5) y 50 mM EDTA. El xileno cianol migra aproximadamente a 4kb, azul de bromofenol a 300pb y el anaranjado G a 50 pb en geles de agarosa de 0.5% a 1.4% en TBE 0.5X. Se usó una parte del compuesto por cada cinco partes de solución de ADN (PROMEGA, 2005). Como control negativo para los productos de PCR se utilizó ADN de *Escherichia coli* O157:H7.

3.9 Contaminación intencional de las muestras de alimentos

Para comprobar el funcionamiento de los protocolos, se inoculó con la bacteria estudiada los siguientes alimentos: leche descremada pasteurizada, carne molida cruda y lechuga. Estos se mantuvieron bajo temperatura de refrigeración a 4 °C. Se modificó el procedimiento sugerido por Pouton *et al.* (2005).

Se preparó un cultivo madre de la bacteria a partir del banco de *Listeria monocytogenes* previamente elaborado. Con un asa de siembra se tomó un inóculo, se depositó en 90 ml de Caldo Universal de Pre-enriquecimiento (Difco) el cual se preparó siguiendo las recomendaciones de la casa comercial (Anexo 1), y se mantuvo a 37 °C durante 8 horas. Se tomó 10 ml de este cultivo y se depositó en 90 ml de un nuevo caldo de pre-enriquecimiento y se conservó a 37 °C durante 24 horas. Se preparó diluciones de 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} y 10^{-4} con 20 ml del cultivo madre o de dilución en 180 ml de agua peptonada al 0.1%.

Se tomó 12.5ml de leche descremada pasteurizada y se mezcló con 12.5ml de cada dilución. Se utilizó 125 g de lechuga desinfectada durante 10 minutos en agua clorada y se homogenizó 25 g de esta con 25 ml de cada dilución durante 30 segundos en una licuadora previamente desinfectada con alcohol puro. Se homogenizó 10 g de carne cruda molida de res con 50 ml de cada dilución adecuada de *L. monocytogenes* durante 30 segundos en una licuadora previamente lavada con agua estéril y desinfectada con alcohol puro. Como control negativo se mantuvo las mismas cantidades por muestra y se homogenizó con agua peptonada no contaminada. Se incubó las muestras a 37°C por 24 horas y se tomó 500 µl del sobrenadante de las muestras incubadas y sin incubar para la extracción de ADN.

3.10 Extracción de ADN a partir de muestras contaminadas intencionalmente.

Se siguió el protocolo propuesto por la Universidad de Wisconsin y que es utilizado en el Laboratorio de Fitomejoramiento y Biotecnología Aplicada del Programa de Investigaciones del frijol (PIF) para la extracción de ADN de frijol.

1. Se agregó 50 μ l del buffer de extracción PEX (Etil Xantogenato de Potasio) a los 500 μ l de muestra en un tubo para microcentrífuga eppendorf de 1.5 ml.
2. Se agregó 450 μ l adicionales de buffer PEX, se agitó el tubo en el vortex y se colocó los tubos con las muestras en baño maría a 65 °C durante 30 minutos.
3. Se centrifugó la muestra durante 10 min a >14,000 RPM (alta velocidad) usando una microcentrífuga 5424, para concentrar los residuos de tejido (*pellet*).
4. Se transfirió el sobrenadante a un tubo eppendorf de 1.5 ml limpio.
5. Se precipitó los ácidos nucleicos llenando los tubos con una mezcla 6:1 de etanol:acetato de amonio 7.5 M.
6. Se mezcló invirtiendo los tubos y se dejó precipitar por 30 min a temperatura ambiente.
7. Se agitó los tubos manualmente para romper el precipitado y se peletizó los ácidos nucleicos precipitados centrifugando las muestras a 3,000 RPM (baja velocidad) durante 10 min en una microcentrífuga.
8. Se eliminó el sobrenadante y se agregó a los tubos con los pellets 300 μ l de RNAasa a (concentración de 100 μ g/ml) + buffer TE 0.1X (juntas).
9. Se agitó los tubos manualmente y se incubó en baño maría a 37 °C por 1 hora.
10. Se centrifugó las muestras a >14,000 RPM por 1 min para peletizar los residuos de tejidos remanentes.
11. Se transfirió el sobrenadante a un tubo limpio de microcentrífuga de 1.5 ml y se precipitó el ADN llenando los tubos con una mezcla 10:1 de etanol: acetato de sodio 3 M.
12. Se mezcló invirtiendo los tubos y se dejó precipitar a temperatura ambiente por 30 min.
13. Se agitó bien los tubos manualmente para romper el precipitado y se centrifugó las muestras por 5 min a 3,000 RPM para peletizar el ADN.
14. Se vació el etanol/acetato de sodio y se lavó los pellets llenando los tubos con 70% etanol, se agitó manualmente.

15. Se colectó los pellets centrifugando por 15 segundos a 14,000 RPM.
16. Se vació el etanol y se secó los pellets invirtiendo los tubos sobre papel toalla de 2 a 3 horas.
17. Se rehidrató los pellets agregando 100µl de buffer TE 0.1X. y para disolverlos se colocó los tubos en baño maría a 65 °C durante 15 minutos.
18. Se almacenó las muestras de ADN en un congelador y se cuantificó.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Extracción de ADN de *Listeria monocytogenes* con buffer de lisis con Proteinasa K

Según Viklund (2007) el ADN de las bacterias es similar al ADN mitocondrial. La Proteinasa K fue empleada por Guachambala (2007) para extraer ADN mitocondrial de la mosca blanca. Con base en esto se empleó buffer de lisis con Proteinasa K y se extrajeron grandes cantidades de ADN de *L. monocytogenes* (Cuadro 7).

Cuadro 7. Concentración inicial de ADN de *L. monocytogenes* a partir de cultivos puros.

Muestra	Ci	Cf ₁ =30 ng/ml	Cf ₂ =25 ng/ml	Cf ₃ =20 ng/ml	Cf ₄ =15 ng/ml
	ng/ml	Vi ₁ ml	Vi ₂ ml	Vi ₃ ml	Vi ₄ ml
LM1	315	10.53	8.62	6.78	5.00
LM2	333	9.90	8.12	6.39	4.72
LM3	477	6.71	5.53	4.38	3.25
LM4	405	8.00	6.58	5.19	3.85
LM5	689	4.55	3.77	2.99	2.23
LM6	437	7.37	6.07	4.80	3.55
LM7	290	11.54	9.43	7.41	5.45
LM8	541	5.87	4.84	3.84	2.85
LM9	457	7.03	5.79	4.58	3.39
LM10	410	7.89	6.49	5.13	3.80
LM11	445	7.23	5.95	4.71	3.49
LM12	214	16.30	13.23	10.31	7.54
LM13	414	7.81	6.43	5.08	3.76
LM14	374	8.72	7.16	5.65	4.18
LM15	571	5.55	4.58	3.63	2.70
LM16	630	5.00	4.13	3.28	2.44
LM17	1018	3.04	2.52	2.00	1.50
LM18	347	9.46	7.76	6.12	4.52
LM19	160	23.08	18.52	14.29	10.34
LM20	366	8.93	7.33	5.78	4.27
LM21	267	12.66	10.33	8.10	5.95
LM22	401	8.09	6.65	5.25	3.89
LM23	282	11.90	9.73	7.63	5.62
LM24	810	3.85	3.18	2.53	1.89

4.2 Extracción de ADN de *E. coli* O157:H7 y *E. coli* ATCC 25922 con buffer PEX.

Con la extracción de ADN de *E. coli* O157:H7 y *E. coli* ATCC 25922 con buffer de extracción PEX se obtuvo ADN pero en menor cantidad (Cuadro 8 y Cuadro 9), ya que el buffer PEX no es el recomendado para hacer extracciones de ADN en bacterias.

Cuadro 8 .- Cantidad de ADN de *E.coli* O157:H7 en ng/ml.

Muestra	Ci ng/ml
1 <i>E.coli</i> O157:H7	14
2 <i>E.coli</i> O157:H7	106
3 <i>E.coli</i> O157:H7	14
4 <i>E.coli</i> O157:H7	36
5 <i>E.coli</i> O157:H7	483
6 <i>E.coli</i> O157:H7	83
7 <i>E.coli</i> O157:H7	93
8 <i>E.coli</i> O157:H7	128
9 <i>E.coli</i> O157:H7	80
10 <i>E.coli</i> O157:H7	470
11 <i>E.coli</i> O157:H7	93

Cuadro 9.- Cantidad de ADN de *E. coli* ATCC 25922 en ng/ml.

Muestra	Ci ng/ml
1 <i>E.coli</i> ATCC 25922	13
2 <i>E.coli</i> ATCC 25922	28
3 <i>E.coli</i> ATCC 25922	20
4 <i>E.coli</i> ATCC 25922	42
5 <i>E.coli</i> ATCC 25922	23
6 <i>E.coli</i> ATCC 25922	23
7 <i>E.coli</i> ATCC 25922	18
8 <i>E.coli</i> ATCC 25922	8
9 <i>E.coli</i> ATCC 25922	25
10 <i>E.coli</i> ATCC 25922	11
11 <i>E.coli</i> ATCC 25922	23
12 <i>E.coli</i> ATCC 25922	0
13 <i>E.coli</i> ATCC 25922	30
14 <i>E.coli</i> ATCC 25922	31

4.3 Optimización de dos protocolos de PCR para la detección de *Listeria monocytogenes*

Se optimizaron 2 protocolos utilizando los primers LM y MAR, con presencia de bandas en todas las muestras, lográndose la reducción en algunos reactivos (Cuadro 10).

Cuadro 10. Protocolos resultantes.

Reactivos (µl)	Protocolo	
	P6	P16
Agua destilada y desionizada (dd H ₂ O)	27	8.75
Buffer 5x (PROMEGA)	6	3
dNTP's		
MgCl ₂	9	1
Primer A	1.25	1
Primer B	1.25	1
Taq-polimerasa	0.5	0.25
MM	45	15
ADN puro	5	5
Volumen final	50	20
Primer	LM	MAR
Muestra utilizada	ADN a 30 ng/ml	
Repeticiones	3X	

En el ensayo #1 (Cuadro 11) se hizo la validación del marcador LM utilizando ADN puro sin diluir. Este marcador amplificó en una banda de 702 pares de bases (Border *et al.* 1990). El protocolo 1 se basó en lo recomendado por PROMEGA y Aznar y Alarcón (2001). Para deducir todos los protocolos siguientes se manipuló los reactivos de mayor costo que son: dNTP's, primers y la enzima Taq polimerasa. En los protocolos P2 y P3 se disminuyó la cantidad de primers y Taq polimerasa empleada en P1. En el ensayo # 1 la validación se logró con los 3 protocolos. En el ensayo # 2 (Cuadro 11) se continuó utilizando el primer LM y el protocolo base fue el protocolo 3 del primer ensayo, el cual usó la menor cantidad de la enzima Taq polimerasa. Los protocolos P4 a P6 se obtuvieron reduciendo la cantidad de los reactivos de interés con base en el protocolo P3. Los dNTP's con MgCl₂ se redujeron de 9 µl a 8 µl, 7 µl y 6.5 µl. Los primers se redujeron de 1.25 µl a 1.2 µl, 1.15 µl y 1.1 µl. La Taq polimerasa se redujo de 0.5 µl a 0.4 µl, 0.35 µl y 0.3 µl. Se usó ADN muestra a concentraciones de 15, 20, 25 y 30 ng/ml. Todos los protocolos del ensayo #2 con ADN a 30 ng/ml amplificaron la banda de 702 pb.

Cuadro 11. Protocolos realizados en los ensayos #1 y #2 para el primer LM.

Reactivos (µl)	Ensayo #1				Ensayo #2		
	P1	P2	P3	P3	P4	P5	P6
	1x	1x	1x	1x	1x	1x	1x
dd H ₂ O	27	27	27	27	20	20	20
Buffer 5x (PROMEGA)	6	6	6	6	13	13	13
dNTP's							
MgCl ₂	8	9	9	9	8	7	6.5
Primer A	1.5	1.15	1.25	1.25	1.2	1.15	1.1
Primer B	1.5	1.15	1.25	1.25	1.2	1.15	1.1
Taq-polimerasa	1	0.7	0.5	0.5	0.4	0.35	0.3
MM	45	45	45	45	43.8	42.65	42
ADN puro	5	5	5	5	6.2	7.35	8
Volumen final	50	50	50	50	50	50	50
Muestra utilizada	ADN puro			ADN a 30, 25, 20, y 15 ng/ml			
Repeticiones	3x			3x			
Primer	LM						

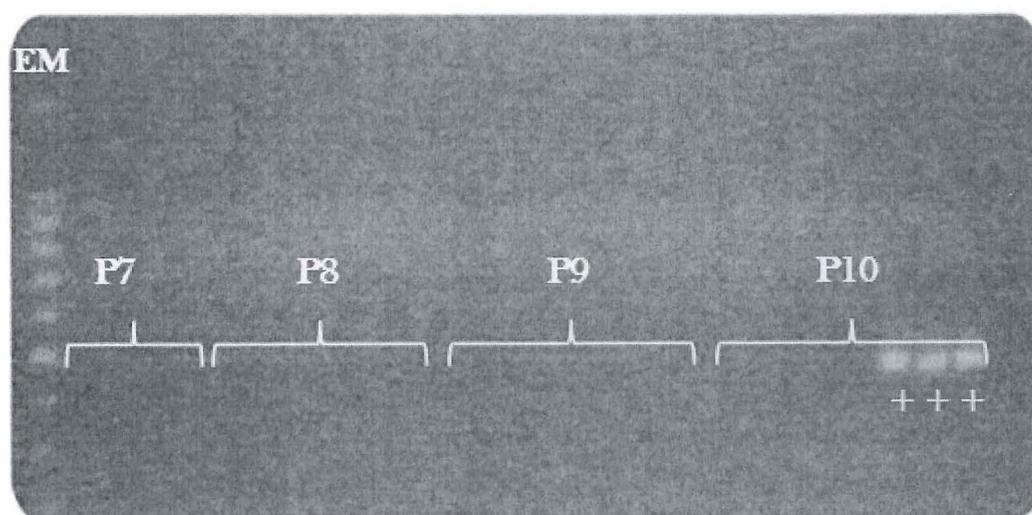
En el ensayo #3 (Cuadro 12) el protocolo base, P7, se tomó según el protocolo P1 y lo recomendado por PROMEGA. Los protocolos P8 y P9 se obtuvieron dividiendo todos los reactivos usados en P7 en 2 y 3 partes, respectivamente. Para estos protocolos el cloruro de magnesio (MgCl₂) y los dNTP's se colocaron en forma separada. El protocolo P10 fue cortesía de la Universidad Complutense de Madrid. Se realizó la electroforesis en gel de agarosa al 1.2% en TBE 0.5X teñido en solución 1:10 bromuro de etidio en agua destilada. Se utilizó los marcadores LM y MAR. con ADN de *L. monocytogenes* a 30 ng/ml. Las muestras se colocaron en la siguiente manera: celda 1: escalera molecular 100 pb (PROMEGA), celdas 2-4: protocolo P7 con marcador LM; celdas 5-7: protocolo P7 con marcador MAR, celdas 8-10: protocolo P8 con marcador LM, celdas 11-13 : protocolo P8 con marcador MAR, celdas 14-16: protocolo P9 con marcador LM, celdas 17-19: protocolo P9 con marcador MAR, celdas 20-22: protocolo P10 con marcador LM, celdas 23-25: protocolo P10 con marcador MAR. Sólo amplificó el protocolo P10 con el marcador MAR una banda de 453 pb (Manzano y Comi, 1997) (Figura 1).

Para el ensayo #4 (Cuadro 12) se usó el marcador LM. Se obtuvo P11, P12 y P13 modificando P7, P9 y P10 respectivamente. En el protocolo P11 se usó dNTP's con MgCl₂. En P12 se disminuyó la cantidad de dNTP's utilizada de 1.35 µl a 0.35 µl; en P13 el MgCl₂ y los dNTP's se colocaron en soluciones diferentes y se disminuyó la cantidad de primers a la mitad. En este ensayo ningún protocolo amplificó.

Cuadro 12. Protocolos realizados en los ensayos #3 y #4 para los primers LM y MAR.

Reactivos (µl)	Ensayo #3				Ensayo #4		
	P7	P8 (P7/ 2)	P9 (P7/ 3)	P10 (P. sugerido)	P11 (P7)	P12 (P9)	P 13 (P10)
	1x	1x	1x	1x	1x	1x	1x
dd H2O	27.75	13.87	9.25	11	27.75	9.25	11
Buffer 5x (PROMEGA)	10	5	3.35	2	14	4.7	2
dNTP's	4	2	1.35			0.35	0.4
MgCl2	1	0.5	0.35	0.4	1	3	2
Primer A	1	0.5	0.35	2	1	0.35	1
Primer B	1	0.5	0.35	2	1	0.35	1
Taq-polimerasa	0.25	0.13	0.09	0.6	0.25	0.09	0.6
MM	45	22.5	15.09	18	45	18.09	18
ADN puro	5	2.5	1.6	2	5	1.6	2
Volumen final	50	25	16.69	20	50	19.69	20
Muestra utilizada	ADN a 30 ng/ml						
Repeticiones	3x						
Primer	LM y MAR				LM		

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25

**Figura 1.** Amplificación de los productos de PCR de los protocolos P7 a P10 usando los marcadores LM y MAR.

En el ensayo # 5 (Cuadro 13), se utilizó ambos marcadores, LM y MAR. El protocolo base, P14, se modificó según el último protocolo amplificado que fue P10. Desde P14 a P16 se usó 1 μ l de dNTP's con $MgCl_2$, los primers se redujeron de 1.5 μ l a 1.3 μ l y 1 μ l, respectivamente. Desde P17 a P19 los dNTP's y el $MgCl_2$ se usaron en forma dividida, los primers se disminuyeron de 2 μ l a 1.5 μ l y 1.3 μ l. Para los seis protocolos se empleó 0.25 μ l de Taq polimerasa. Sólo los protocolos con el marcador MAR amplificaron la banda respectiva de 453 pb.

En el ensayo #6 (Cuadro 13) sólo se probó el marcador LM. El protocolo base fue el protocolo P6 que resultó positivo para este primer con la menor cantidad de reactivos. Se obtuvieron P21 y P22 disminuyendo los dNTP's con $MgCl_2$ de 9 μ l a 6 μ l, los primers se redujeron de 1.25 μ l a 1 μ l y la Taq polimerasa se disminuyó de 0.5 μ l a 0.4 μ l y 0.3 μ l. Sólo amplificó P6 en la respectiva banda de 702 pb.

Cuadro 13. Protocolos realizados en los ensayos #5 y #6 para los primers LM y MAR.

Reactivos (μ l)	Ensayo #5						Ensayo # 6		
	P14	P15	P 16	P17	P18	P19	P6	P21	P 22
	1x	1x	1x	1x	1x	1x	1x	1x	1x
dd H2O	9.75	10.15	8.75	9.75	10.75	11.15	27	13.6	12.7
Buffer 5x (PROMEGA)	3	3	3	4	5	5	6	3	2
dNTP's				3	2	2			
$MgCl_2$	1	1	1	1	1	1	9	6	6
Primer A	1.5	1.3	1	2	1.5	1.3	1.25	1	1
Primer B	1.5	1.3	1	2	1.5	1.3	1.25	1	1
Taq-polimerasa	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.5	0.4	0.3
MM	17	15	17	22	22	22	45	25	23
ADN puro	5	5	5	3	3	3	5	5	5
Volumen final	22	20	22	25	25	25	50	30	28
Muestra utilizada	ADN a 30 ng/ml								
Repeticiones	3x								
Primer	LM y MAR						LM		

Se realizó la electroforesis de los protocolos que amplificaron las bandas esperadas con la menor cantidad de reactivos. Se utilizó gel de agarosa al 1.2% en TBE 0.5X teñido en solución 1:10 bromuro de etidio en agua destilada. El marcador LM con el protocolo P6 amplificó una banda de 702 pb y el marcador MAR con el protocolo P16 amplificó una banda de 453 pb. Se utilizó ADN de *L. monocytogenes* a 30 ng/ml y ADN de *E. coli* ATCC 25922 como control negativo. Las muestras se colocaron en la siguiente manera: celda 1: escalera molecular 100 pb (PROMEGA), celdas 2,3 y 4: protocolo P6 con el marcador LM, celdas 4 y 6: *E. coli* ATCC 25922 como control negativo para el marcador

LM, celdas 7-9: protocolo P16 con marcador MAR, celdas 10 y 11: *E. coli* ATCC 25922 como control negativo para el marcador MAR, celdas 12-14: protocolo P16 con el marcador MAR (Figura 2).

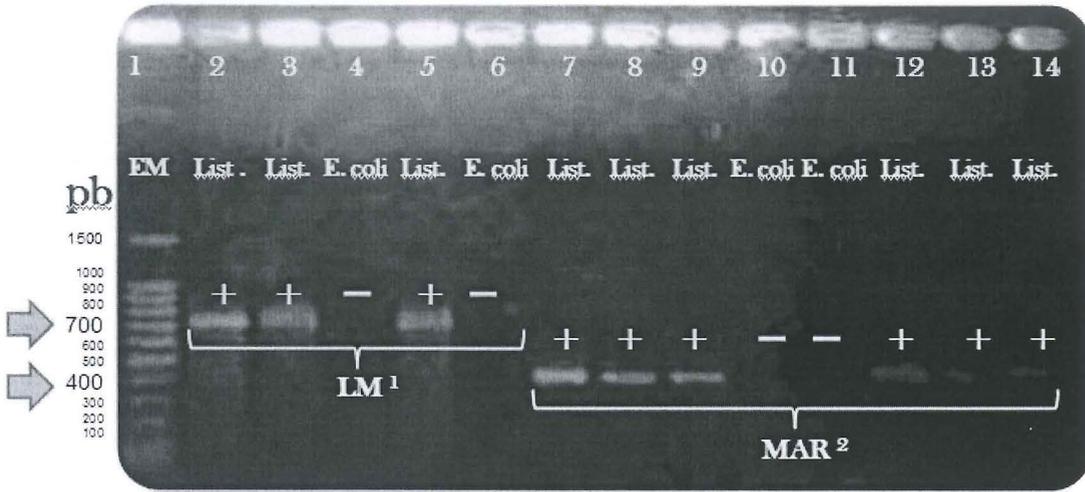


Figura 2. Amplificación de los productos de PCR de los protocolos P6 para el marcador LM y P16 para el marcador MAR.

Se validó el protocolo P6 para el marcador LM utilizando alimentos intencionalmente inoculados, ADN de *L. monocytogenes* a 30 ng/ml y ADN de *E. coli* O157:H7 como control negativo. Se realizó electroforesis en gel de agarosa al 1.2% en TBE 0.5X teñido en solución 1:10 bromuro de etidio en agua destilada. Las muestras se ubicaron de la siguiente manera: celda 1: escalera molecular 100 pb (PROMEGA), celdas 2-9: protocolo P6 con el marcador LM que amplifica una banda de 702 pb, celda 10: *E. coli* O157:H7 como control negativo, celdas 11-13: carne, leche y lechuga contaminadas con *L. monocytogenes* e incubadas por 24 horas (Figura 3).

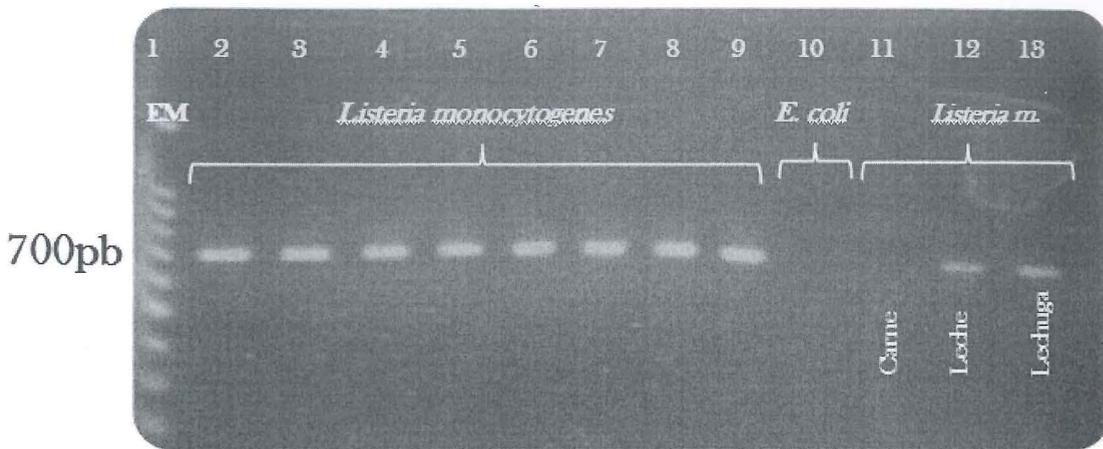


Figura 3. Validación del protocolo P6 para el marcador LM con alimentos intencionalmente inoculados.

Se validó el protocolo P16 para el marcador MAR utilizando alimentos intencionalmente inoculados, ADN de *L. monocytogenes* a 30 ng/ml y ADN de *E. coli* O157:H7 como control negativo. Se realizó electroforesis en gel de agarosa al 1.2% en TBE 0.5X teñido en solución 1:10 bromuro de etidio en agua destilada. Las muestras se ubicaron de la siguiente manera: celda 1: escalera molecular 100 pb (PROMEGA), celdas 2-9: protocolo P16 con el marcador MAR que amplifica una banda de 453 pb, celda 10: *E. coli* O157:H7 como control negativo, celdas 11-13: carne, leche y lechuga contaminadas con *L. monocytogenes* e incubadas por 24 horas (Figura 4).

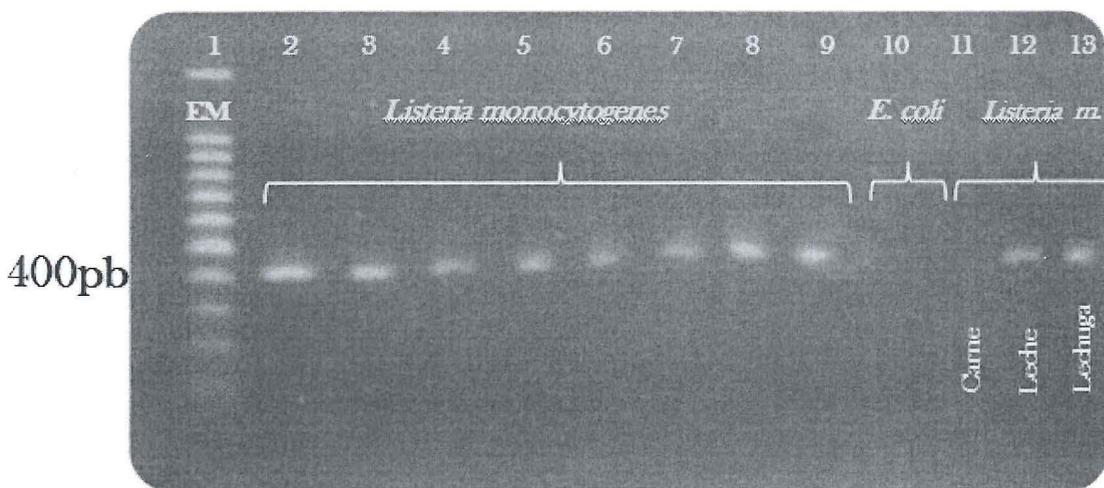


Figura 4. Validación del protocolo P16 para el marcador LM con alimentos intencionalmente inoculados.

5. CONCLUSIONES

- El buffer de lisis con Proteinasa K permitió la obtención de ADN de *Listeria monocytogenes* a partir de cultivos puros.
- El buffer PEX permitió la extracción de ADN de *Escherichia coli* O157:H7 y *Escherichia coli* ATCC 25922 que fueron usados como controles negativos en la PCR de los marcadores LM y MAR.
- Se establecieron protocolos para la detección de *Listeria monocytogenes* optimizando el uso de reactivos para los marcadores LM y MAR que identifican los genes *hlyA* e *iap* de *L. monocytogenes*, respectivamente.
- Se validó los protocolos para los primers LM y MAR con muestras de leche y lechuga inoculadas con *Listeria monocytogenes* e incubadas por 24 horas a 37 °C.

6. RECOMENDACIONES

- Optimizar protocolos de extracción de ADN en alimentos.
- Aplicar los protocolos obtenidos en un muestreo aleatorio en supermercados y otras plazas distribuidoras de alimentos.
- Optimizar protocolos de detección molecular para otras bacterias patógenas de alimentos.
- Realizar un análisis de costos de los reactivos y materiales para implementar diagnóstico molecular en el laboratorio de microbiología de la carrera de Agroindustria Alimentaria..
- Validar la PCR realizada mediante la inoculación de *L. monocytogenes* en medios de cultivo selectivos.

302704

7. BIBLIOGRAFÍA

Aznar, R.; Alarcón B. 2001. On the specificity of PCR detection of *Listeria monocytogenes* in food: a comparison of published primers (en línea). Systematic and Applied Microbiology. Consultado 26 set. 2008. Disponible en: http://www.sciencedirect.com/science?_ob=ArticleURL&_udi=B7GVX-4DS35XW-62&_user=10&_rdoc=1&_fmt=&_orig=search&_sort=d&view=c&_version=1&_urlVersion=0&_userid=10&md5=ca0a442900c7c61251030f3f27264f15

CDC (Centers for Disease Control and Prevention). 2008. Listeriosis. (en línea). Atlanta, US. Consultado 23 oct. 2008. Disponible en: http://www.cdc.gov/nczved/dfbmd/disease_listing/listeriosis_gi.html

Beckers, HJ.; Bille, J.; Cox, LJ.; Gledel, J.; Hall, SM.; Kampelmacher, EH.; Rocourt, J.; Terplan. c 1990. Foodborne Listeriosis. 2 ed. Lancaster, Pennsylvania US, Technomic. 153 p.

Border, PM.; Howard, JJ.; Plastow, GS.; Siggins, KW. 1990. Detection of *Listeria* species and *Listeria monocytogenes* using polymerase chain reaction (en línea). Letters in Applied Microbiology. Consultado 26 set. 2008. Disponible en: <http://www3.interscience.wiley.com/journal/119377617/abstract>

Garza, R.; Silva, T.; Hernández, L. s.f. La listeriosis humana y el ciclo infeccioso asociado a su agente etiológico (en línea). UNAM. Consultado 20 oct. 2008. Disponible en: <http://depa.pquim.unam.mx/bacteriologia/pdfs/ART%20CDC-Listeria.pdf>

Guachambala, M. 2007. Identificación de biotipos A, B y Q de *Bemisia tabaci* y la especie *Trialeurodes vaporariorum*, en zonas de producción hortícola de Honduras (en línea). Tegucigalpa, HN, ESCUELA AGRÍCOLA PANAMERICANA. Consultado 15 oct. 2008. Disponible en: [http://zamo-oti-02.zamorano.edu/asp/getFicha.asp?glx=86538.glx&skin=&recnum=1&maxrecnum=1&searchString=\(%20MARCELINO%20and%20GUACHAMBALA\)%20and%20\(%20buscable%20S\)&orderBy=titulodisp\[a\]&pg=1&biblioteca=](http://zamo-oti-02.zamorano.edu/asp/getFicha.asp?glx=86538.glx&skin=&recnum=1&maxrecnum=1&searchString=(%20MARCELINO%20and%20GUACHAMBALA)%20and%20(%20buscable%20S)&orderBy=titulodisp[a]&pg=1&biblioteca=)

Hitchins, A. 1998. Bacteriological Analytical Manual: Detection and enumeration of *Listeria monocytogenes* in foods (en línea). 8 ed. s.l. FDA/Center for Food Safety & Applied Nutrition. Consultado 22 oct. 2008. Disponible en: <http://www.cfsan.fda.gov/~ebam/bam-10.html#authors>.

Holt, J.; Krieg, N.; Sneath, P.; Staley, J.; Williams, S. c 2000. *Bergey's manual of determinative bacteriology*. 9 ed. Baltimore, Maryland, US. Lippincott Williams & Wilkins. 787 p.

Invitrogen, 2008. Certificate Analysis. s.n.t. 3 p.

Karp, G. c 2006. *Biología celular y molecular: conceptos y experimentos*. Trad. por ME Martínez, I Vásquez. 4 ed. México, DF, McGraw Hill Interamericana. 897 p.

Manzano, M.; Comi, G. 1997. Method and relative primers to identify *Listeria monocytogenes* in an organic substrate (en línea). Consultado 3 set. 2008. Disponible en: <http://www.freepatentsonline.com/EP0805214A2.html>.

Oteo, J.; Alós, JI. s.f. *Listeria y listeriosis* (en línea). Control Calidad SEIMC. Consultado 22 oct. 2008. Disponible en: http://www.seimc.org/control/revi_Bacte/listeria.htm

PIF, 2008. Módulo de diagnóstico molecular: laboratorio de fitomejoramiento y biotecnología aplicada. Valle del Yeguaré, HN. EAP Zamorano. 19 p.

Poutou, R.; Burbano, M.; Sierra, S.; Torres, K.; Carrascal, AK.; Mercado, M. 2005. Estandarización de la extracción de ADN y validación de la PCR múltiple para detectar *Listeria monocytogenes* en queso, leche, carne de res y pollo (en línea). Revista de la Facultad de Ciencias. Consultado 3set. 2008. Disponible en: <http://redalyc.uaemex.mx/redalyc/src/inicio/ArtPdfRed.jsp?iCve=49910207>

Promega. 2005. Usage information. Madison, US. Promega Corporation. 2 p.

Stansfield, W. c1992. *Genética*. Trad. por P Ramos. 3ed. México, DF, Editora Latinoamericana. 574 p.

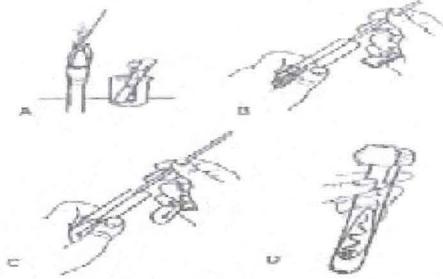
Valadez, E.; Kahl, G. 2000. *Huellas de ADN en genomas de plantas: teoría y protocolos de laboratorio*. México, DF, Mundi-Prensa. 147 p.

Viklund, A. c2007. El ADN mitocondrial. (en línea). Consultado 21 oct. 2008. Disponible en: http://www.evolutionibus.info/adn_mit.html

8. ANEXOS

Anexo 1. Siembra por estría en tubos con medio sólido inclinado

Con el asa de siembra se añade al tubo una cantidad de muestra realizando movimientos ascendentes en zig-zag. Este método es utilizado para conservar cepas durante largos periodos, así como para la realización de ciertas pruebas bioquímicas.



Anexo 2. Preparación de Agar de soya tríptica (Difco modificado)

- 1.- Suspender 40 g del polvo en 1L de agua destilada y desionizada
- 2.- Dejar reposar por 5 min
- 3.- Calentar la solución a 70° C durante 5 min, agitando frecuentemente para disolver completamente el polvo.
- 4.- Aforar la mezcla a 1 litro utilizando un balón volumétrico a una concentración final de 4%.
- 5.- Distribuir la solución en 2 frascos de erlenmeyer de 500 ml.
- 6.- Autoclavar a 125°C durante 20 min

Anexo 3. Siembra de muestra líquida en placa con asa de Digrafsky

Consiste en distribuir la muestra de manera uniforme por la superficie del medio de cultivo contenido en la placa. Para ello adicionamos al medio sólido un inóculo líquido con la pipeta graduada, y posteriormente se extiende con el asa de Digrafsky. Se utiliza para el recuento de viables y antibiogramas.

Anexo 4. Aislamiento en estría múltiple (técnica de rayado)

1. Tomar el inóculo y depositarlo en el extremo superior. Extender en la parte superior solamente.
2. Flamear y girar ligeramente la placa continuando con el proceso anterior.
3. Repetir la operación 4 o 5 veces. El resultado son colonias cada vez más separadas como consecuencia de que cada vez se va arrastrando y separando más la muestra.



Anexo 5. Preparación BBL™ Extracto de carne de vacuno en polvo (Difco modificado)

1. Suspender 0.72g del polvo en 36ml de agua destilada y desionizada
2. Dejar reposar por 5 min
3. Calentar la solución a 70° C durante 5 min, agitando frecuentemente para disolver completamente el polvo.

Anexo 6. Cuantificación de ADN

1. Colocar 2 ml de buffer de cuantificación en un recipiente cúbico (*cuvette*) limpio y calibrar el fluorómetro a cero.
2. Agregar 2 µl de muestra de ADN al buffer cuantificador.
3. Mover ligeramente el cubo para mezclar la muestra.
4. Colocar el cubo en la celda del fluorómetro y leer la concentración de ADN en ng/ml.
5. Vaciar el cubo, enjuagarlo con agua destilada, y airearlo un poco, antes de colocar la siguiente muestra.

Anexo 7. Dilución de ADN (15, 20, 25 y 30 ng/ml) por el método de la de la Universidad de Wisconsin, UW – Madison (modificado).

1. Agregar 100 μl de buffer TE 0.1 X + Tartrazine en platos con fondo redondeado (Microplate TM 96, Polypropylene, MJ Research, INC.).
2. Agregar el volumen inicial de la muestra de ADN extraído del medio de cultivo, estimado mediante la fórmula: $V_i = 3000 / C_i - 30$.

$$C_i * V_i = C_f * V_f$$

$$C_i * V_i = C_f (V_{TE} + V_i)$$

$$C_i * V_i = C_f * V_{TE} + C_f * V_i$$

$$C_i * V_i - C_f * V_i = C_f * V_{TE}$$

$$V_i (C_i - C_f) = C_f * V_{TE}$$

$$\text{Fórmula general de dilución ADN } V_i = (C_f * V_{TE}) / (C_i - C_f)$$

$$V_i = (30 * 100) / (C_i - 30)$$

$$\text{Fórmula dilución ADN (30 ng/ } \mu\text{l)} V_i = 3000 / (C_i - 30)$$

Donde:

V_i = Volumen del ADN Stock para adicionar a 100 μl de buffer TE para hacer una solución a 30 ng/ μl

C_i = concentración inicial (ng/ml)

V_i = volumen inicial (μl)

C_f = concentración final (ng/ml)

V_f = volumen final (μl)

V_{TE} = volumen de buffer TE (μl)

3. Cubrir las celdas del plato con tapa selladora, y almacenarlo en el congelador.
4. Repetir el proceso para las otras diluciones.

Anexo 8. Protocolo para extracción de ADN con Proteinasa K.

1. Moler fragmentos de hoja de aproximadamente 1 cm^2 (provenientes de material fresco y liofilizado), con un pistilo delgado en un tubo eppendorf y adicionar 100 μl del amortiguador de extracción.
2. Incubar la suspensión a 50 $^{\circ}\text{C}$ por una hora y diluir con 150 μl de agua bidestilada (el extracto puede congelarse a -80 $^{\circ}\text{C}$ en este estado).
3. Incubar 20 μl del extracto con 80 μl de ARNasa A (125 $\mu\text{g/ml}$ en agua bidestilada) y hervir en baño de agua por 5 minutos.
4. Enfriar a temperatura ambiente, remover 10 μl y diluir com 240 μl de agua bidestilada.
5. Remover 5 μl de este extracto y usarlo directamente para la PCR.

Anexo 9. Reactivos usados para la extracción de ADN de *Listeria monocytogenes*.

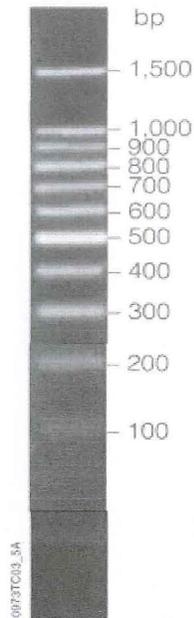
Concentración Inicial	Concentración Final	Volumen de 1ml
0.5M EDTA-8.0	0.5 mM	1 μ l
1M Tris-HCl pH-8.0	5 mM	5 μ l
Nonident P-40	0.50%	5 μ l
Proteinasa K	1.0 mg/ml	0.001 g
dH ₂ O		989.0 μ l
Total		1000 μ l

Fuente: Brown 2007 citado por Guachambala, 2007.

Anexo 10. Rehidratación de primers.

- Encontrar la concentración inicial de los primers en μ M:
 - Multiplicar el valor de OD por el valor de nanomol por OD, estos valores son característicos de cada primer. El valor resultante es la cantidad de nanomoles en el pellet del primer.
 - Este resultado dividir para el valor de μ g's (μ l de agua). Se obtienen nanomoles por μ l.
 - Convertir a picomoles/ μ l \approx μ M.
- Reemplazar en la ecuación $C_i V_i = C_f V_f$ para conocer el volumen inicial de primer rehidratado que se va depositar en 500 μ l de agua destilada y desionizada. Sabiendo que la concentración final buscada es de 1 μ M.

Anexo 11. Escalera molecular de 100 pb (PROMEGA, 2007).



Anexo 12. Preparación Difco™ Caldo Universal de Preenriquecimiento.

1. Suspender 38g del polvo en 1000ml de agua purificada. Mezclar completamente.
2. Autoclavar a 121°C por 15 min.