Listeria monocytogenes en Colombia: Caracterización Molecular por RAPD y Secuenciación del gen *actA*

MAYRA VIVIANA MEDRANO MEDINA

TRABAJO DE GRADO

Presentado como requisito para optar al título de

Magíster en Microbiología

UNIVERSIDAD DE LOS ANDES

Facultad de Ciencias Biológicas

Bogotá D. C

2006

Listeria monocytogenes en Colombia: Caracterización Molecular por RAPD y Secuenciación del gen *actA*

MAYRA VIVIANA MEDRANO MEDINA

Maria Consuelo Vanegas, M. Sc
Directora

Silvia Restrepo, Ph. D
Co-directora

UNIVERSIDAD DE LOS ANDES
Facultad de Ciencias Biológicas
Bogotá D. C
2006

AGRADECIMIENTOS

Gracias a mis padres por el amor y apoyo incondicional a través de todo este proceso.

A Hans, por creer en mí y apoyarme en todas las cosas que involucraron la culminación de este trabajo.

Gracias a Lina González y Juliana Martínez por la amistad sincera y el apoyo que recibí durante el desarrollo de este trabajo.

A mi directora Maria Consuelo Vanegas, por abrirme las puertas del LEMA, por las múltiples enseñanzas y por su constante apoyo y compañía en la realización de este estudio.

A Silvia Restrepo, mi codirectora, por el apoyo incondicional y colaboración en los aspectos bioinformaticos y en todo lo relacionado con los análisis de los resultados.

A Leonardo Mariño, por su tiempo, dedicación y enseñanzas que hicieron posible la culminación de este estudio.

A Daniel Matute y Camilo Salazar por el tiempo dedicado y el apoyo recibido en el análisis de los datos.

Al Laboratorio de Ecologia Microbiana y Alimentos LEMA de la Universidad de los Andes, por proveer el espacio y los materiales para el desarrollo experimental de este estudio.

Al National Center for Biotechnology Information, por abrir sus puertas y proveer las herramientas bioinformáticas que permitieron realizar los analisis de los resultados de este trabajo.

Al Grupo de Microbiologia del Instituto Nacional de Salud y al Grupo de Microbiología de la Fundación Santa Fe de Bogota, por la amable donación de las cepas clínicas.

A la Secretaria Distrital de Salud de Bogotá y al Instituto Nacional de Vigilancia de Medicamentos y Alimentos, por serotipificar los aislamientos bacterianos utilizados en este estudio.

Al Comité de Investigaciones de la Facultad de Ciencias de la Universidad de los Andes, por la financiación parcial del presente estudio.

CONTENIDO

1. INTRODUCCIÓN……7

2. JUSTIFICACIÓN……...10

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo general……12

3.2 Objetivos específicos……12

4. MARCO TEORICO

4.1 *Listeria monocytogenenes*

4.1.1 Taxonomía……...13

4.1.2 Características Fisiológicas……14

-Características Microscópicas…...……....14

-Características de Crecimiento……..14

-Diferenciación de otras especies....……...……15

4.1.3 Hábitat y Ecología……17

-Generalidades……...17

-Animales……17

-Aguas……17

-Ambientes naturales……18

-Alimentos……..18

-Plantas Procesadoras y Biopelículas……..19

4.1.4 Resistencia a antibióticos……..……20

4.1.5 Patogénesis……21

4.1.6 Determinantes Moleculares……..…….25

-Regulon PrfA……..26

-Internalina……..27

-Ami……..27

-p60……...……27

-FbpA……...……27

-LLO……28

-ActA……28
-Fosfolipasas……28
4.2 Listeriosis Humana……..29
4.3 Epidemiología……..31
4.4 Amplificación Azarosa de DNA Polimórfico (RAPD)……..33
4.5 Secuenciación ……..35
4.6 Tipificación de *L. monocytogenes*……..……38
4.7 Fundamentos de Filogenia y Análisis de Secuencias……40
-Método Neighbor-Joining de Saitou y Nei……..……40
-Estadísticas F……..40
-Diversidad y Neutralidad……..41
5. MATERIALES Y METODOS
5.1 Aislamientos de *Listeria monocytogenes*……42
5.2 Extracción de ADN……..44
5.3 Cuantificación de ADN……...44
5.4 Preservación de ADN……..44
5.5 Amplificación Azarosa de ADN Polimorfico-RAPD……44
5.5.1 Oligonucleotidos……44
5.5.2 Condiciones de la reacción de RAPD…..……...……44
5.5.3 Interpretación de resultados RAPD…….……45
5.6 PCR gen *actA*……46
5.6.1 Oligonucleotidos……46
5.6.2 Condiciones de la Reacción de PCR……46
5.7 Purificación y Secuenciación de Productos……..…47
5.7.1 Purificación y verificación de los productos de PCR……..…47
5.7.2 Secuenciación del extremo 3’ del gen *actA*……..47
5.7.3 Determinación de la secuencia esperada por PCR del gen *actA*…...47
5.7.3.1 Obtención de la secuencia del genoma de *L. monocytogenes*..47
5.7.3.2 Obtención de la secuencia del gen *actA*……48
5.7.3.3 Ubicación del gen *actA* en las secuencias de referencia *L. monocytogenes* EGD-e y 4b……..……48

5.7.3.4 Construcción del mapa plantilla de restricción del fragmento esperado de PCR……..……....48

5.7.4 Análisis de Secuencias y obtención de secuencia consenso……48

5.8 Análisis Filogenético……49

5.8.1 Obtención de secuencias previamente reportadas…..……...…...49

5.8.2 Alineamiento de Secuencias y construcción de árboles filogenéticos.50

6. RESULTADOS Y DISCUSION

6.1 Extracción y Cuantificación de ADN……51

6.2 Amplificación Azarosa de ADN Polimórfico-RAPD……...……51

6.2.1 Reacción de RAPD……51

6.2.2 Caracterización molecular por RAPD……53

6.3 PCR gen *actA*……...60

6.3.1 Amplificación de fragmento *actA* por PCR……60

6.4 Análisis Secuenciación de los Productos……61

6.4.1 Ubicación del gen *actA* y oligonucleotidos en las secuencias de referencia *L. monocytogenes* EGD-e y 4b…….……...……..…61

6.4.2 Construcción del mapa plantilla del fragmento esperado de PCR...…..62

6.4.3 Análisis de Secuencias y obtención de secuencia consenso……..64

6.4.4 Análisis Filogenético……....65

6.4.5 Análisis del Alineamiento de ADN……...……..68

7. CONCLUSIONES……...……73

8. RECOMENDACIONES……...……...……76

9. REFERENCIAS……..……77

10. ANEXO 1. Secuencias consenso del extremo 3' del gen *actA* para 37 aislamientos colombianos de *L. monocytogenes*.……89

1. INTRODUCCIÓN

Listeria monocytogenes es una bacteria intracelular adquirida por el consumo de alimentos contaminados, está ampliamente distribuida en la naturaleza, es resistente a condiciones ambientales adversas y a condiciones de refrigeración por lo cual es una amenaza en alimentos refrigerados (Muñoz & Díaz, 1998; Low & Donachie, 1997; Inoue, Katagiri, Terao & Maruyama,, 2001). Este patógeno emergente causa una enfermedad llamada listeriosis, que involucra complicaciones muy serias como meningitis, septicemia e infecciones perinatales (Lawrence & Gilmour, 1991) y afecta principalmente a personas inmunocomprometidas, mujeres embarazadas, recién nacidos, y ancianos (Doyle, Beuchat & Monthville, 2001). La listeriosis, ha surgido como una enfermedad muy importante de origen alimentario en las últimas dos décadas; el primer brote estudiado, ocurrió en 1981 en Nueva Escocia, Canadá, por ensalada de repollo contaminada y desde entonces son varios los reportes de casos y brotes de esta enfermedad en todo el mundo (Lawrence & Gilmour, 1991). Esta enfermedad es de gran importancia a nivel mundial debido a su alta tasa de mortalidad de alrededor del 30%, que alcanza hasta un 70% en casos de meningitis, 50% en casos de septicemia y hasta un 80% en casos de infecciones perinatales o neonatales (US Food And Drug Administration Bacteriological Analytical Manual [BAM], 2006).

En cuanto a Colombia, existe poca documentación acerca de la listeriosis, pero se sabe que en alimentos es frecuente y que es una preocupación constante en las plantas procesadoras de alimentos. Se ha determinado que la frecuencia de este microorganismo en quesos y leche no pasteurizada distribuida en Boyacá es alta, 29,6% y 16% respectivamente (Rueda, 2005). Igualmente, se ha aislado de derivados cárnicos crudos y alimentos RTE (Por sus siglas en inglés RTE Ready to Eat Products), incluyendo jamones y chorizos en Bogotá (24%) (Vanegas, Vega, Martínez, Forero & Casas, 2005). Esta enfermedad no es de notificación obligatoria en nuestro país, lo cual dificulta la obtención de datos epidemiológicos concretos y confiables. Adicionalmente son pocos los reportes de la listeriosis en Colombia, existen algunas publicaciones de hospitales notificando casos de listeriosis (Sánchez, Castillo & Ortega, 2001; Jesam, Cádiz, Céspedes & Ramírez., 2005).

Se conoce acerca de los factores de virulencia y de los mecanismos de patogenicidad de *Listeria monocytogenes* gracias a los estudios con técnicas moleculares, que han permitido obtener mayor información acerca de este patógeno. Los análisis genéticos de *L. monocytogenes* han determinado diversidad, patrones de dispersión y filogenia entre los genotipos circulantes (Wiedmann, Bruce, Keating, Jonson, McDonough & Batt, 1997; Yoshida, Takeuchi, Sato & Hirai, 1999; Wulff, Gram, Ahrens & Fonnesbech, 2006). Particularmente, la técnica de RAPD (De las siglas en inglés, Randomly Amplified Polymorphic DNA), es una variación de la técnica reacción en cadena de la polimerasa (PCR) que ha sido ampliamente utilizada en estudios de caracterización molecular de *L. monocytogenes* (Inoue et al., 1991).

Esta técnica es una herramienta útil en el análisis del genoma de bacterias, ya que puede emplearse para identificar patógenos, para estudios de trazabilidad y también para determinar la ocurrencia de cepas particulares o tipos (McPherson & Moller, 2000). La información que esta técnica brinda es muy valiosa, ya que aporta información acerca de la diversidad y distribución de este patógeno así como información epidemiológica. Igualmente la secuenciación es una herramienta molecular muy poderosa para establecer relaciones filogenéticas entre organismos de una misma especie y son varias las publicaciones de *L. monocytogenes* que emplean esta técnica. Los estudios realizados con genes de virulencia han aportado información valiosa acerca de la estructura poblacional de *L. monocytogenes*. Rasmussen, Skouboe, Dons, Rossen y Olsen (1995) demostraron que *L. monocytogenes* puede ser clasificada en tres tipos de secuencia diferentes representado tres linajes evolutivos, con base en las diferencias de los genes *actA, iap* y *hly*. Wiedmann et al. (1997) reportó que este organismo también puede ser dividido en 3 linajes basado en el análisis de genes de virulencia incluyendo los genes *hly* y *actA*. El gen *actA* de *L. monocytogenes* es el responsable de la dispersión célula a célula de la bacteria, es altamente polimórfico a nivel nucleotidico y puede ser útil en la diferenciación de aislamientos de *L. monocytogenes* (Cai et al., 2002). Las secuencias de *L. monocytogenes* disponibles en las bases de datos ofrecen una herramienta poderosa para desarrollar estudios moleculares, ya que ofrecen una base sólida de comparación. El genoma de *L. monocytogenes* ya se encuentra totalmente secuenciado, el cual ha sido utilizado en estudios de genómica comparativa entre diferentes serotipos (Nelson et al., 2004; Zhang, Bhushan, Jayarao & Knabel, 2004). Así mismo, se encuentran disponibles las secuencias de varios genes de virulencia, incluyendo *actA* (Por ejemplo, GenBank: DQ991975-DQ991993) los cuales pueden ser útiles en

estudios de genómica comparativa. Igualmente, se han comparado las secuencias provenientes de cepas epidémicas y no epidémicas para determinar diferencias moleculares entre las mismas (Doumith et al., 2004).

El propósito de este estudio fue determinar la diversidad y estructura filogenética de aislamientos de *Listeria monocytogenes* obtenidas a partir de alimentos, humanos y ambientes de plantas procesadoras de alimentos mediante RAPD y secuenciación parcial del gen de virulencia *actA*, con el fin de contribuir en el conocimiento de este patógeno en Colombia.

2. JUSTIFICACION

L. monocytogenes ha atraído la atención de entidades de salud y científicos en todo el mundo debido a la severidad de la listeriosis en los grupos de riesgo y a su alta tasa de mortalidad. Aunque esta enfermedad es poco frecuente comparada con otros patógenos transmitidos por alimentos tales como *Salmonella* spp, su importancia radica en el porcentaje de pacientes afectados que mueren a causa de esta infección. El Centro para el control de enfermedades de Estados Unidos (Centers for Disease Control and Prevention [CDC], 2006) estima que aproximadamente 2,500 personas adquieren listeriosis en Estados Unidos, de las cuales 500 mueren (CDC, 2006). Se tienen datos concretos acerca de este patógeno en países desarrollados como Estados Unidos, Canadá y Francia, donde se ha incluido en los programas de vigilancia epidemiológica. Sin embargo en Colombia se conocen pocos datos epidemiológicos de *L. monocytogenes* debido a varios factores: no es una enfermedad de notificación obligatoria, el periodo de incubación puede tardar meses y el diagnóstico de la enfermedad es difícil. En nuestro país existe un monitoreo de las enfermedades transmitidas por alimentos (ETAs) donde se ha determinado que durante los últimos cuatro años la notificación de casos de ETAs en el país ha ido en aumento. Por ejemplo, en el año 2000 se reportaron 2983 casos de ETAs y en el año 2001 el número de casos ascendió a 5423 (Sivigila, 2002). En el año 2005, se reportaron al Sistema Nacional de Vigilancia en Salud Pública -SIVIGILA un total de 7.941 casos de Enfermedades Transmitidas por Alimentos, lo que representa un incremento del 30.39% con respecto al año 2004, en el cual se reportaron 6.090 casos (Sivigila, 2006). Por lo anterior, son pocos los reportes de Listeriosis en Colombia. Quizás uno de los más conocidos fue presentado por Crespo, Castañeda, Vélez, Hoyos, López y Salazar (1999) en un hospital de tercer nivel en Cali (Valle), donde se reportaron 19 casos clínicos de listeriosis durante los años 1994-1999. Igualmente, algunas entidades de salud poseen reportes de casos aislados de listeriosis, especialmente en mujeres embarazadas.

Debido a la importancia de esta bacteria y a los grupos de riesgo, los países desarrollados han dedicado grandes esfuerzos para obtener la mayor cantidad de información posible sobre *L. monocytogenes,* estudiando diversos aspectos y características de esta bacteria. La biología molecular, es una herramienta que puede emplearse con múltiples propósitos para obtener información que le

permita al personal de la salud, la industria y a los científicos de nuestro país conocer más acerca de este patógeno. Por lo anterior existen numerosos estudios sobre *L. monocytogenes* en el mundo entero y el descubrimiento de tres linajes evolutivos ha permitido comprender la estructura filogenética de esta bacteria. Varios estudios han demostrado la alta diversidad que se encuentra entre los miembros de esta especie, diversas técnicas de tipificación molecular han reflejado diferencias en la virulencia y estructura poblacional y también han aportado información epidemiológicamente útil acerca de la distribución de *L. monocytogenes*.

Un buen punto de partida para avanzar en el conocimiento de *L. monocytogenes* en nuestro país es determinar la diversidad y estructura filogenética de esta bacteria estudiando cepas nativas y compararla con la estructura encontrada en países desarrollados por diversas técnicas moleculares, incluyendo RAPD y secuenciación de genes de virulencia. La industria de alimentos es una de las fuentes económicas más importantes para Colombia, e invertir en su mejoramiento se traduce en calidad de los productos para su comercialización y en salud para los consumidores de los mismos. *L. monocytogenes* se encuentra con frecuencia en las plantas procesadoras de alimentos debido a su habilidad para formar biopelículas resistentes y a su crecimiento a temperaturas de refrigeración. Por esta razón, se incluyeron no solamente aislamientos humanos y de alimentos, sino también de plantas procesadoras de alimentos Este estudio es el primero en Colombia en su tipo; el análisis de aislamientos provenientes de alimentos, plantas procesadoras de alimentos y humanos utilizando técnicas como RAPD y secuenciación es el primer acercamiento para determinar la diversidad, los genotipos que circulan en nuestro medio y la estructura filogenética de estos aislamientos.

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GENERAL

- Determinar la diversidad y estructura filogenética de aislamientos de *Listeria monocytogenes* obtenidas a partir de alimentos, humanos y ambientes de plantas procesadoras de alimentos mediante RAPD y secuenciación parcial del gen de virulencia *actA*.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Tipificar 38 cepas colombianas de *Listeria monocytogenes* empleando dos oligonucleotidos mediante la técnica de RAPD.

- Determinar las relaciones filogenéticas de 38 aislamientos de *L. monocytogenes* mediante secuenciación del extremo 3' del gen *actA*.

- Determinar si las cepas circulantes en Colombia se agrupan de la misma forma que la reportada en otros estudios y si existen linajes adicionales a los reportados previamente utilizando herramientas de genómica comparativa, basado en las variaciones en los nucleótidos del gen *actA*.

- Determinar diferencias a nivel molecular que puedan ser útiles en estudios posteriores.

4. MARCO TEORICO

4.1 *Listeria monocytogenes*

4.1.1 Taxonomía

Listeria monocytogenes fue descrita por primera vez en 1926 por Murray *et al* quien la llamó *Bacterium monocytogenes* debido a la monocitocis que se originaba al infectar conejos y conejillos de indias. Un año más tarde, fue renombrada *Listerella hepatolytica* por Pirie, y recibió su actual nombre en 1940 (Farber & Peterkin, 1991). Desde entonces la posición taxonómica de los miembros de éste género han cambiado varias veces. La clasificación tradicional se basa en estudios genéticos y de algunas propiedades biológicas como son la actividad hemolítica, capacidad de virulencia y producción de ácido a partir de la degradación de azúcares (Ralovich, 1991; Low & Donachie, 1997).

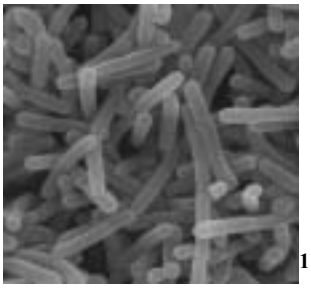
Actualmente el género *Listeria* pertenece al Dominio Eubacteria, filo Firmicutes (sinónimo de grupo de *Clostridium* firmicutes), clase *Bacilli*, Orden *Bacillales* y familia *Listeriaceae* (Nacional Center for Biotechnology Information, Taxonomy, 2006). Pertenece a la sub-división de *Clostridium* junto con *Staphylococcus, Streptococcus, Lactobacillus* y *Brochothrix,* lo cual explica los hallazgos de varios estudios que sugieren que ocurren transferencias genéticas entre *Listeria, Bacillus y Streptococcus.* La posición taxonómica también sustenta la ocurrencia de reacciones inmunológicas cruzadas entre *Listeria, Streptococcus, Staphylococcus* y *Lactobacillus* (Jay, Loessner & Golden, 2005).

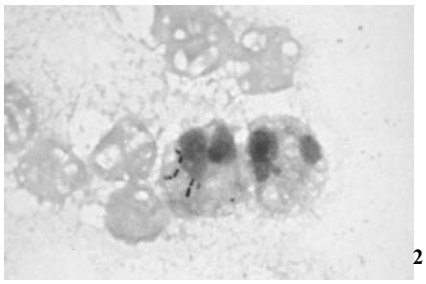
Este género posee seis especies reconocidas, las cuales se han determinado con base en análisis de enzimas multiloculares, hibridación DNA-DNA y secuenciación del rRNA 16S: *L. monocytogenes*, *L. innocua, L. ivanovii, L. welshimeri, L. seeligeri* y *L. grayi* (*L. murrayi* fue incluida recientemente en esta especie) (Doyle, Beuchat & Monthville, 2001). Los resultados de estudios previos indican que las seis especies pueden dividirse en dos líneas de descendencia y sugieren que *Listeria monocytogenes*, *L. innocua* y *L. ivanovii* son fenotípicamente muy similares, mientras que *L. grayi* y *L. murrayi* son distintas. Actualmente se considera *L. grayi* como especie y *L. murrayi* sub-especie de ésta (Feresu & Jones, 1988; Muñoz y Díaz, 1998).

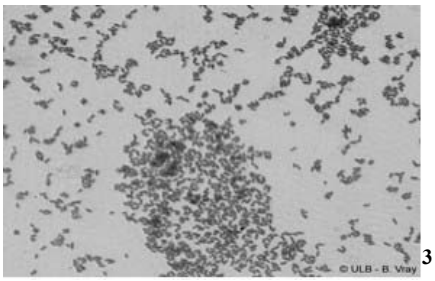
4.1.2 Características Fisiológicas

Características microscópicas

Listeria monocytogenes es un bacilo o cocobacilo gram positivo (Figura 1), pleomórfico, con extremos redondeados cuyo tamaño es de 0.5-2.0 micras de largo por 0.5 micras de ancho (Muñoz & Díaz; 1998). Es un patógeno intracelular que tiene la capacidad de adaptarse a condiciones extremas, incluyendo bajas temperaturas y altas concentraciones de sal, a pesar de no poseer cápsula ni ser esporulada (Doumith et al., 2004, Mead et al., 1999).


[1]


[2]



[3]

FIGURA 1. ***Listeria monocytogenes*****. Izquierda.** Micrografía Electrónica**. Centro.** Se observa *L. monocytogenes* fagocitada por los neutrófilos intracelularmente. **Derecha.** Coloración de Gram

Respecto a la organización microscópica, se puede presentar en diferentes formas: solos, en parejas, cadenas cortas y a veces en forma de V o de Y. En cultivos viejos puede observarse como gram negativa (Pascual, 1989).

Características de Crecimiento

Esta bacteria es aerobia y anaerobia facultativa, mótil vía flagelos peritricos (Figura 2), que se presenta mejor a temperaturas de 20-25°C, y puede ser imperceptible a temperaturas de 37°C.

[1] Imagen tomada de http://biology.kenyon.edu/Microbial_Biorealm/bacteria/gram-positive/listeria/listeria.htm Febrero 4 de 2006 10:29 a.m
[2] Imagen tomada de http://www.yamagiku.co.jp/pathology/case/case100.htm Febrero 4 de 2006, 10:32 a.m
[3] Imagen tomada de http://www.arches.uga.edu/~kherr14/lister.html Febrero 4 de 2006, 10:35 a.m

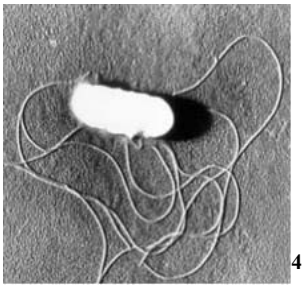
 [4]

FIGURA 2. Flagelos peritricos de *L. monocytogenes*

L. monocytogenes tiene un amplio rango de temperaturas de crecimiento que varía entre 1°C y 45°C, con una temperatura óptima entre 30-37°C (Walter, Archers & Banks, 1990). Con respecto al pH se ha visto que es capaz de desarrollarse en un rango de 4.1 a 9.6; sin embargo se han reportado aislamientos con supervivencia por fuera de este rango (Muñoz & Díaz; 1998).

Diferenciación de otras especies

La diferenciación de especie se fundamenta en las características fisiológicas de esta bacteria: pruebas bioquímicas y pruebas de virulencia (tabla 1).

Especie	Beta Hemólisis[a]	Reducción de Nitrato	Producción de ácido			Virulencia a Ratón
			Manitol	Ramnosa	Xilosa	
L. monocytogenes	+	-	-	+	-	+
L. ivanovii	+	-	-	-	+	+
L. innocua	-	-	-	V	-	-
L. welshimeri	-	-	-	V	+	-
L. seeligeri	+	-	-	-	+	-
L. grayi	-	V	+	V	-	-

[a] Sangre de Cordero

V= Variable

TABLA 1. Diferenciación de especies de *Listeria*

Adicionalmente *Listeria monocytogenes* produce catalasa, no posee citocromo oxidasa, Voges Proskauer y Rojo de metilo positivo, no produce sulfuros ni indol a partir de la degradación del triptófano, no puede reducir nitratos y se caracteriza por hidrolizar la esculina a esculetina (Figura

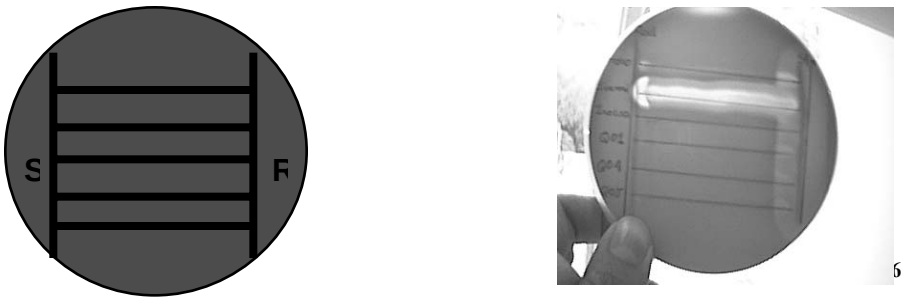
[4] Imagen tomada de http://www.arches.uga.edu/~kherr14/lister.html Febrero 4 de 2006, 10:50 a.m

3). En este hecho se fundamentan los medios de cultivo selectivos y diferenciales para esta bacteria. Las colonias bacterianas son pequeñas, cremosas, levemente aplanadas y color blanco lechoso (Gray & Killinger, 1966). Cuando son iluminadas oblicuamente por luz blanca las colonias muestran un color característico azul verdoso; ésta es la técnica de iluminación de Henry.

[5]

FIGURA 3. *L. monocytogenes* en Agar Oxford. La coloración negra de las colonias se debe a complejos de hierro (III) con esculetina.

La hemólisis de *Listeria monocytogenes* se intensifica con la B- hemolisina de *Staphylococcus aureus* estableciendo una cabeza de flecha formada en el punto en que el factor y la hemolisina se encuentran; por ésta razón la prueba de CAMP (Christie-Atkins-Munch-Peterson) es recomendada para su identificación por la Administración de Medicamentos y Alimentos de Estados Unidos (FDA) y el Instituto Nacional de Vigilancia de Medicamentos y Alimentos de Colombia (Figura 4).



[6]

FIGURA 4. Prueba de CAMP. Izquierda. Se siembra verticalmente con un asa un cultivo overnight de *S. aureus* (S) y al otro lado paralelamente se siembra *Rhodococcus equi* (R). En el centro, sin tocar S ni R, se colocan horizontalmente el control de *L. monocytogenes* y las cepas a evaluar. **Derecha.** Se observa la cabeza de flecha cerca al cultivo de *S. aureus* caracetístico de *L. monocytogenes*.

[5] Fotografía del Laboratorio de Ecología Microbiana de Alimentos LEMA, Universidad de los Andes.
[6] Fotografía del Laboratorio de Ecología Microbiana de Alimentos LEMA, Universidad de los Andes.

4.1.3 Hábitat y Ecología

Generalidades

Listeria monocytogenes es un patógeno de amplia distribución, debido principalmente a dos propiedades: es capaz de sobrevivir durante largos periodos de tiempo en muchos medios diferentes y es un organismo psicrótrofo (Doyle, Beuchat & Monthville, 2001). Debido a estas propiedades tan especiales, un alimento se puede contaminar en cualquier punto de la cadena alimentaria y el método de preservación en frío no lo detiene. Se encuentra en el suelo, el polvo, el agua, los alimentos ensilados, las aguas residuales, el forraje, el fango, los abonos naturales y las aguas de los ríos, así como en el intestino del hombre y animales (Muñoz & Díaz, 1998). También se ha aislado de material vegetal en descomposición, alimentos para consumo humano (principalmente carnes y sus derivados, productos lácteos y vegetales), alimentos para animales y desechos de los mataderos (Jay, James, Loessner, Martin, Golden & David, 2005).

Animales

Se han detectado 42 especies domésticas de animales portadoras de *L. monocytogenes*, así como mamíferos silvestres, aves, peces, moscas y crustáceos. Los animales pueden adquirir esta bacteria a partir de diversas fuentes, siendo los alimentos y materia fecal las principales. Se ha reportado que entre el 11 y el 52% de los animales son portadores sanos y en un estudio de una línea de sacrificio se determinó que el 45% de los cerdos poseen *L. monocytogenes* en las amígdalas y que el 24% de las reces vacunas la tienen en los ganglios retro-faríngeos (Buncié, 1991 y Skovgaard & Norrung, 1989).

Aguas

Se han detectado distintas especies de *Listeria* en cuerpos de agua; agua de la superficie de canales y lagos, zanjas y aguas con desembocadura al mar en Holanda, efluentes de agua dulce que desembocan en bahía de California y también en aguas residuales (Colburn, Kaysner, Abeyta & Wekell, 1990; Guenich, Muller, Schrettenbrunner & Seeliger, 1985; Dijkstra, 1982). Se sabe que las plantas de alfalfa y otros vegetales cultivados en tierras tratadas con lodo de aguas residuales también se encuentran contaminadas (Ai-Ghazali & Ai-Azawi, 1990).

Ambientes Naturales

Este patógeno ha sido aislado de diferentes ambientes desde hace varios años, incluso desde la década de los sesentas. En 1960 se documentó el papel del ensilado como una fuente de transmisión de enfermedad animal (Husu, Seppänen, Sivelä & Rauramaa, 1990) y en 1968 se obtuvieron aislamientos de vegetación natural en descomposición (Weis & Seeliger, 1975).

Alimentos

L. monocytogenes se encuentra en una amplia variedad de alimentos procesados y frescos; es capaz de sobrevivir y multiplicarse en diversas materias primas alimenticias, incluyendo alimentos de los frigoríficos (Pinner et al., 1992). Los que se han asociado con mayor frecuencia a la listeriosis son leches crudas, carnes y sus derivados, empanadas, embutidos, pollo y sus derivados, helados, quesos, ensaladas frescas y hortalizas (Jay et al., 2005). Debido a su ubicuidad, *L. monocytogenes* puede estar presente en una amplia variedad de alimentos (Guerra & De Almeida, 2004), particularmente en alimentos listos para el consumo, (RTE por sus siglas en Inglés Ready to Eat), como jamones, salchichas etc (Murphy, Hanson, Fese, Jhonson, & Scott, 2005; Norton, McCamey, Gall, Scarlett, Boor & Wiedmann, 2001; Barmpalia et al., 2004). Estos alimentos son de alto consumo en nuestra sociedad, especialmente los derivados lácteos y cárnicos. Las fuentes de contaminación de los productos lácteos es principalmente la contaminación de la leche fresca, la cual se puede contaminar por los piensos, eliminación fecal por vacas portadoras sanas y por el ambiente de la granja (Doyle, Beuchat & Monthville, 2001). Los quesos, especialmente los blandos son de gran interés, porque presentan una frecuencia de contaminación que varía entre el 2 y el 10%, donde las poblaciones varían desde 10 hasta 10^7 ufc/g. El pH de estos quesos, permite el crecimiento de *L. monocytogenes* hasta alcanzar poblaciones importantes (Rueda, 2005). En mariscos crudos y listos para comer, junto con los derivados del pescado puede encontrarse hasta en un 25% (Farber, 1991). Igualmente, las aves de corral (pollo listo para comer, pre-cocido, refrigerado o congelado) están contaminadas alcanzando hasta un 60% de muestras contaminadas en algunas investigaciones (Doyle, Beuchat & Monthville, 2001).

En cuanto a Colombia, en estudios anteriores se ha determinado que la incidencia de este microorganismo en quesos y leche no pasteurizada distribuidos en Boyacá es alta (Rueda, 2005). Se ha encontrado una alta incidencia también en derivados cárnicos crudos y RTE incluyendo jamones y chorizos en Bogotá (Vanegas et al., 2005).

Plantas Procesadoras y Biopelículas

En las plantas de procesamiento de alimentos *L. monocytogenes* generalmente ingresa por contaminación cruzada; por medio de la tierra en los zapatos y vestidos de los operarios, en el equipo de transporte, por medio de animales que excretan esta bacteria en heces o que poseen la piel o superficie del cuerpo contaminada, a través de vegetales crudos y materias primas crudas de origen animal y en una menor proporción por medio de portadores humanos sanos (que representan aproximadamente entre el 2 y el 6%) (Doyle, Beuchat & Monthville, 2001). Su crecimiento en las plantas de alimentos es favorecido por la humedad elevada y la disponibilidad de nutrientes; por lo tanto es frecuentemente detectada en zonas húmedas, en los residuos y en el equipo de tratamiento de aguas (Cox et al., 1989).

Las biopelículas se originan por la unión de las bacterias a superficies como utensilios, cuartos de almacenamiento, mesones y equipos y son una fuente potencial de contaminación que puede llevar a la descomposición de los alimentos o a la transmisión de enfermedades. Se han encontrado bipeliculas en la carne, en dispersores de aire, en plantas procesadoras de cárnicos y lácteos, principalmente en ubicaciones húmedas tales como sifones de agua (Wong, 1998; Jeong & Frank, 1994. Incluso con buenos programas de limpieza y desinfección algunas bacterias pueden permanecer y multiplicarse en las superficies (Austin & Berferon, 1995; Czechowski, 1990). *Listeria monocytogenes* es capaz de adherirse a varios tipos de superficies incluyendo vidrio, acero inoxidable, polipropilento, teflón y caucho, con la formación de fibras de adhesión (Herald & Zottola, 1988). También puede adherirse a otros materiales hidrofóbicos e hidrofílicos formando biopelículas resistentes a compuestos químicos empleados comúnmente como son el cloro, yodo, ácido aniónico y compuestos de amonio cuaternario (Frank & Koffi, 1990**;** Lee & Frank, 1990**;** Ronner & Wong, 1993; Blackman & Frank, 1996).

Aunque se han hecho avances muy importantes en la estructura y diseño de las plantas procesadoras de alimentos, así como en los procedimientos de limpieza y desinfección, se cree que *L. monocytogenes* seguirá siendo introducida a los ambientes donde los alimentos están expuestos para procedimientos de procesamiento y empaque (Tompkin, 2002; Zhao, Doyle & Zhao, 2004).

4.1.4 Resistencia a antibióticos

Debido a la severidad de la listeriosis, la recuperación del paciente depende entre varios factores, del tratamiento antibiótico elegido. La alta frecuencia de cepas resistentes de *L. monocytogenes* a antibióticos de uso clínico hace que cada vez se estudien más los mecanismos de resistencia y alternativas para el tratamiento de la listeriosis. Anteriormente se pensaba que *Listeria monocytogenes* era uniformemente susceptible a los antibióticos activos frente a bacterias gram positivas (Poyart-Salmeron, Carlier, Trieu-Cuot, Courtieu & Courvalin, 1990). Sin embargo desde 1988 se han aislado varias cepas a partir de alimentos o casos esporádicos de listeriosis, que son resistentes a uno o más antibióticos (Charpentier, Gerbaud & Courvalin., 1995), lo cual ha aumentado la preocupación de la comunidad médica. El uso de los antibióticos con fines terapéuticos en medicina veterinaria ha sido un factor contribuyente para el desarrollo de la resistencia a antibióticos de este patógeno (Franco, Quinto, Fente, Rodríguez, Domínguez & Cepeda, 1994). Se ha demostrado el papel de los plásmidos y los transposones en la resistencia a antibióticos, metales, antisépticos, desinfectantes y colorantes (Charpentier, Gerbaud & Courvalin., 1995, Flamm, Hinrichs & Thomashow, 1984; Lemaitre, Echchannaoui, Michaut, Divies & Rousset. 1998).

En un estudio realizado en España en el Instituto de Productos Lácteos, se evaluó la sensibilidad de 28 aislamientos de *L. monocytogenes* obtenidos de quesos a varios antibióticos. El cloranfenicol, la kanamicina, estreptomicina, neomicina y gentamicina mostraron una eficacia débil frente a los aislamientos y todos los aislamientos fueron resistentes a la fosfomicina (Margolles, Mayo & De Los Reyes, 2001). En Italia se realizó un estudio donde se evaluó la sensibilidad de 148 cepas de *L. monocytogenes* obtenidas de alimentos frente a antibióticos utilizados comúnmente en medicina veterinaria y humana. En general, todas las cepas fueron resistentes a la fosfomicina, lincomicina y flumequina. La resistencia de este patógeno a fosfomicina es bien conocida y ha sido empleado comercialmente en los medios selectivos para aislarlo (Aureli et al., 2003).

4.1.5 Patogénesis

Listeria monocytogenes es una bacteria virulenta, facultativa intracelular que es capaz de invadir y multiplicarse en diferentes tipos de células del hospedero, especialmente en macrófagos, enterocitos y hepatocitos, causando listeriosis animal y humana (Cossart & Kocks, 1994). Esta bacteria puede infectar animales de laboratorio y células mamíferas en cultivos de tejidos, puede crecer con facilidad en medios de cultivo y permite su manipulación genética para estudiar sus mecanismos de patogenicidad (Doyle, Beuchat & Monthville, 2001). Se han realizado varios estudios para dilucidar los mecanismos de patogenicidad de esta bacteria, pero la pato-fisiología de las infecciones por *L. monocytogenes* en humanos y animales se entiende muy poco todavía (Vázquez-Boland et al., 2001).

Debido a que la ingestión de alimentos contaminados es la principal fuente de infección tanto en casos esporádicos y epidémicos, se cree que el tracto gastrointestinal es el primer sitio de entrada de esta bacteria al hospedero (Pinner et al., 1992). La infección comienza aproximadamente 20 horas después de la ingestión de alimentos altamente contaminados en casos de gastroenteritis (Dalton, et al., 1997), mientras que el periodo de incubación para la afección invasiva es generalmente mucho más largo, alrededor de 20 a 30 días (Riedo et al., 1994). El periodo de incubación inusualmente largo requerido por esta bacteria para desarrollar infección sistémica sintomática después de la exposición oral es confuso e indica que la colonización de tejidos por parte de *L. monocytogenes* involucra una fase subclínica silenciosa y por esta razón muchos de los eventos y mecanismos involucrados aún se desconocen (Vázquez-Boland et al., 2001). Se han documentado periodos de incubación largos en animales tanto para enfermedad gastrointestinal como invasiva (Vázquez-Boland et al., 1996). Las cepas con serotipo 4b causan más del 50% de los casos de listeriosis en el mundo, pero las cepas con los grupos antigénicos 1/2 (1/2a; 1/2b y 1/2c) predominan en alimentos (Boerling & Piffaretti, 1991). Esto sugiere que las cepas serovar 4b están más adaptadas a los tejidos de hospederos mamíferos que las cepas del serogrupo 1/2. La dosis infectiva mínima no ha sido determinada, pero altos números de *L. monocytogenes* en alimentos son responsables de los casos epidémicos y esporádicos de listeriosis (aproximadamente sobre 10^6), lo que sugiere que es alta (Vázquez-Boland et al., 2001). Se sabe que la dosis infecciosa de *L. monocytogenes* depende de varios factores que incluyen el estado inmunológico del hospedero y los factores de virulencia de la bacteria. Por esta razón existen estudios que sugieren que las cantidades de *L. monocytogenes* en el

alimento contaminado responsable de casos esporádicos de origen alimentario, superan las 100ufc/g pero el tiempo transcurrido entre el consumo y el análisis microbiológico puede permitir la multiplicación o muerte de la bacteria, por ende la dosis infectiva es desconocida (Doyle, Beuchat & Monthville, 2001). Sin embargo, debido a que la dosis infecciosa depende de los factores mencionados anteriormente, existe una norma de cero tolerancia en alimentos listos para el consumo en Estados Unidos y en Colombia se controla su presencia en las plantas procesadoras de alimentos permanentemente. Esta normatividad también esta establecida en los países desarrollados, como Estados Unidos y Canadá.

La infección experimental de roedores con *L. monocytogenes* ha sido muy utilizada para dilucidar el proceso de infección así como para estudiar la inmunidad celular (Jay et al., 2005). *L. monocytogenes* ingresa al hospedero por el consumo de alimentos contaminados (animales infectados por vía oral en el modelo murino) y antes de llegar al intestino, debe luchar con el ambiente hostil del estómago (Figura 5), incluyendo la acción destructiva de los ácidos estomacales, los cuales se sabe que eliminan cierta cantidad de bacterias exitosamente (Schuchat et al., 1992). Existe controversia acerca del punto de entrada; algunos estudios sugieren que son las células epiteliales mientras que otros sugieren que las células M existentes en las placas de Peyer; este punto aún debe ser esclarecido (Doyle, Beuchat & Monthville, 2001). El paso inicial de colonización de tejidos por *L. monocytogenes* es rápido. La translocación de la bacteria por el intestino ocurre sin la formación de lesiones histológicas aparentes en los ratones (Marco et al., 1992). En el intestino, *L. monocytogenes* se adhiere a la mucosa intestinal y luego la invade, posteriormente la bacteria es englobada por los macrófagos, donde puede sobrevivir y multiplicarse antes de diseminarse por las vías linfática y sanguínea hacia el hígado y el bazo, en donde la mayoría de su población es eliminada. Una vez que *L. monocytogenes* ha entrado a la célula hospedera, lisa la membrana vacuolar por medio de una potente toxina formadora de poros llamada listeriolisina O (LLO), la cual promueve el escape de este patógeno antes de que ocurra la fusión del fagolisosoma (Dubail & Berche, 2000). Además de esta toxina también intervienen otros factores en el proceso: la fosfolipasa C fosfatidilinositol-específica (PI-PLC) y la ClpC ATPasa -un miembro de la familia Clp-ATPasa de proteínas que interviene en el escape del fagosoma en los macrófagos. *L. monocytogenes* también produce catalasa y superóxido dismutasa, dos enzimas protectoras de la oxidación fagolisosómica. Una vez que el fagosoma se lisa la bacteria es liberada al citosol, en

donde se multiplica con un tiempo de generación de 50 minutos (una alta velocidad de crecimiento para un patógeno intracelular) (Cossart & Lecuit, 1998; Decatur & Portnoy, 2000).

Algunas bacterias sobreviven e infectan a las células adyacentes provocando cuadros sistémicos, es así que los dos tipos de células hospederas que resultan críticas en el proceso infectivo son los macrófagos y los hepatocitos (Robbins, Barth, Marquis, Hostos, Nelson & Theriot, 1999).
Para infectar células adyacentes, *L. monocytogenes* tiene la capacidad de dispersarse célula-célula gracias a que durante el proceso de internalización, la superficie bacteriana adsorbe varios filamentos cortos de actina (situados originalmente en la membrana de la célula hospedera), debido a la afinidad de la proteína bacteriana ActA por la actina. La proteína ActA está distribuida polarmente en *L. monocytogenes* de tal forma que este patógeno presenta estructuras (actínicas) parecidas a la cola de un cometa. Por lo tanto, la polimerización de la actina aporta la fuerza locomotora para que este patógeno transite en el ambiente intracelular (Cameron & Footer, 1999; Cicchetti, Maurer, Wagener & Kocks, 1999).

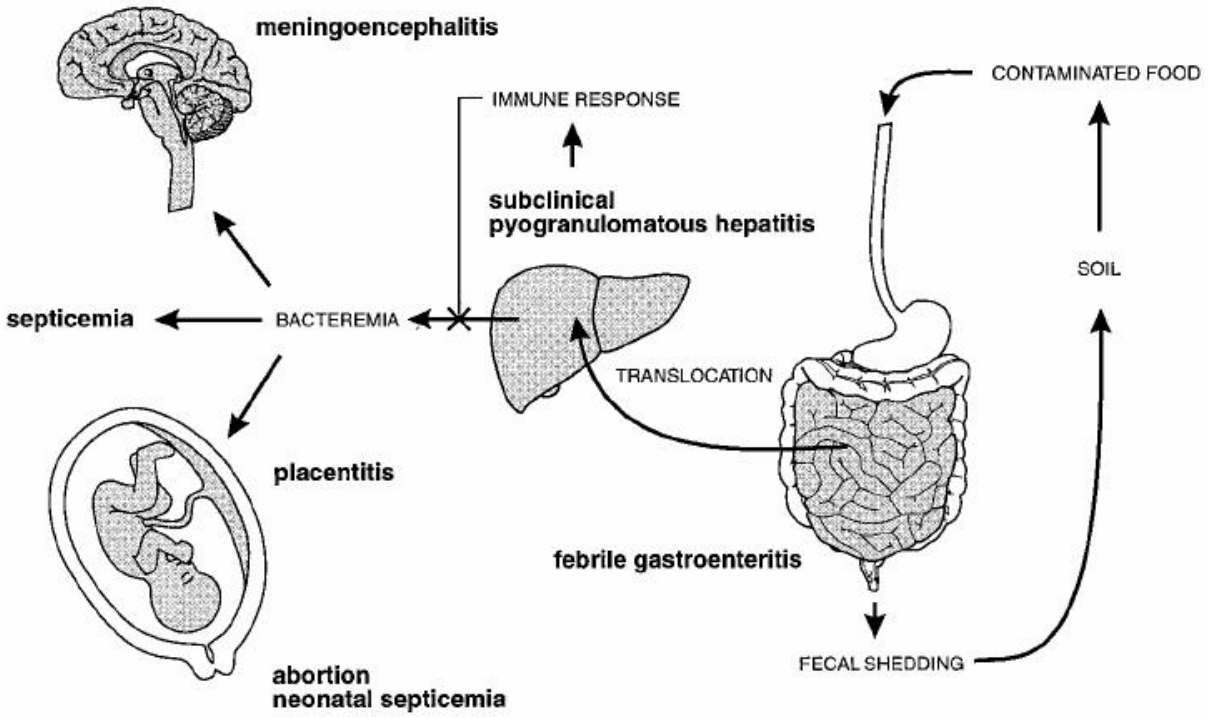


FIGURA 5. Representación esquemática de la patofisiología de infección por *Listeria*. Imagen tomada de Vázquez-Boland et al., 2001.

En la fase inicial de la infección, los hepatocitos infectados son atacados por los neutrófilos y los fagocitos mononucleares, que son los responsables del control y resolución de la enfermedad (Jay et al., 2005). Dependiendo del nivel de respuesta de las células T al comienzo de la infección o si la respuesta inmune celular del hospedero falla en controlar la multiplicación y dispersión de *L. monocytogenes*, esta puede repetir el proceso infectivo y ocurrir una diseminación sistémica por medio del torrente sanguíneo al cerebro o hacia la placenta. La infección sistémica puede terminar en diversos síndromes clínicos, incluyendo aborto, septicemia y afecciones del cerebro (Tabla 2). Por lo tanto la infección no esta restringida al sitio de entrada de la bacteria, ya que implica la multiplicación en diversos tipos de células, invasión y diseminación de la misma (Doyle, Beuchat & Monthville, 2001).

Síndrome clínico	Hospedero: gravedad
Infecciones durante el embarazo	Mujeres embarazadas: enfermedad febril a enfermedad severa
Granulomatosis infantiséptica	Neonatos: infección intraútero/grave, enfermedad temprana
Septicemia	Neonatos o adultos: enfermedad moderada a severa
Meningoencefalitis, cerebritis, romboencefalitis	Neonatos o adultos: enfermedad moderada a severa
Infecciones focales*	Adultos o niños: por contacto directo o bacteriemia.

TABLA 2. Síndromes clínicos y gravedad en hospederos de la listeriosis.

*Incluye infecciones cutáneas, oculares, endocarditis, hepatitis, osteomielitis, abscesos cerebrales y hepáticos, peritonitis y gastroenteritis.

Tomado de "La listeriosis humana y el ciclo infectivo asociado a su agente etiológico". Raúl Garza-Velasco*, Teresa Silva-Monzuazo* y Luciano Hernández-Gómez. Departamento de Biología, Facultad de Química, UNAM

4.1.6. Determinantes Moleculares

Existen varios genes involucrados en la adhesión e invasión de las células eucarióticas por *L. monocytogenes*, así como otros involucrados en la vida intracelular de este patógeno (Figuras 6 y 7). A continuación se describirán brevemente cada uno de ellos.

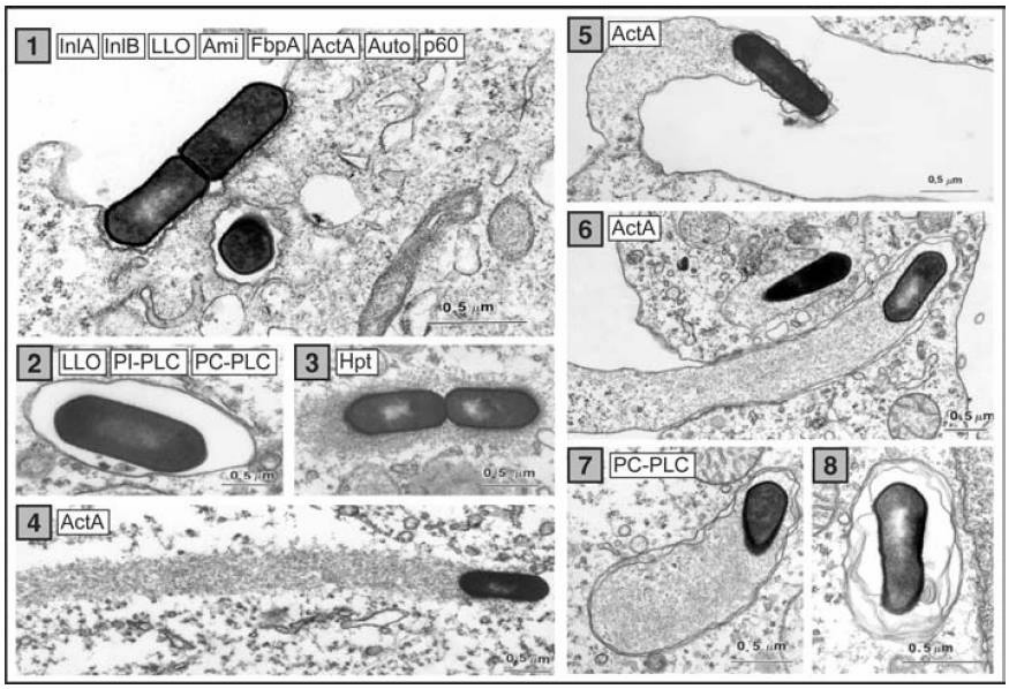


FIGURA 6. El ciclo de infección *Listeria monocytogenes*. Micrografía electrónica muestran los pasos sucesivos de adhesión: entrada (1), lisis de la vacuola (2), multiplicación intracelular (3), movimientos intracelulares (4), dispersión célula-célula (5-6), formación (7) y lisis (8). Imagen tomada de Dussurget et al, 2004.

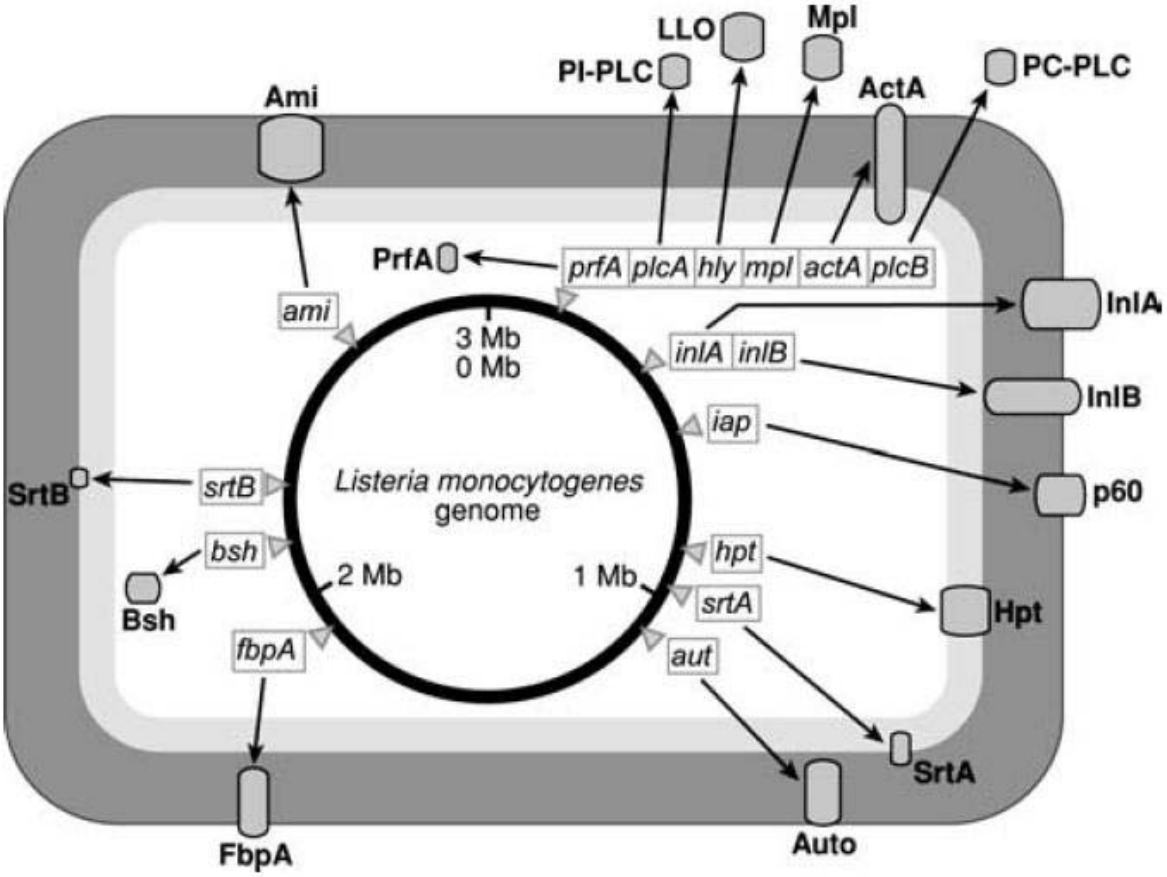


FIGURA 7. Representación esquemática de los genes y productos de *Listeria monocytogenes*. La línea gris delgada representa la membrana, y la línea gris oscura gruesa representa la pared celular. Se muestra la posición de los genes de virulencia en el cromosoma de *L. monocytogenes* y la ubicación de los productos de los genes en los diferentes compartimientos celulares (citosol, membrana, pared y espacio extracelular. Imagen tomada de Dussurget et al., 2004.

Regulon PrfA

Los genes de virulencia más importantes en *L. monocytogenes* (*pfrA, plcA, hly, mpl, actA, plcB, inl* y *hpt*) están regulados por el activador transcripcional PrfA, la cual es una proteína de 233 aminoácidos (Mengaud, Dramsi, Gouin, Vasquez-Boland, Milon & Cossart, 1991). *prfA* es el segundo gen del operon *plcA-prfA* cuyo promotor primario es regulado por *prfA*, por lo tanto este gen activa su propia síntesis (Doyle, Beuchat & Monthville, 2001).

Internalina

Las internalinas A y B (InlA e InlB, respectivamente) fueron los primeros factores identificados como mediadores en la invasión de células hospederas y están codificadas en genes cromosomales en el mismo operón (Dramsi, Biswasi, Maguin, Braun, Mastroeni & Cossart, 1995). Esta proteína pertenece a la familia de las internalinas, las cuales se caracterizan por tener repeticiones ricas en leucina (Gaillard, Berche, Frehel, Gouine, & Cossart, 1991). Es una molécula formada por 800 aminoácidos, cuyo receptor es la E-cadherina, una molécula de adhesión, que es una glicoproteina transmembranal ubicada en la membrana de las células mamíferas y que permiten la adhesión célula-célula (Dussurget, Pizano-Cerda & Cossart, 2004). El gen *inlA* forma parte de una familia de varios genes y le confiere la capacidad invasora a *L. innocua*. El gen *inlB* participa en la entrada en los hepatocitos *in vitro*, codifica para una proteína de superficie que tiene una papel secundario en la entrada de *L. monocytogenes* en las células epiteliales, pero primordial en la invasión de los hepatocitos (Doyle, Beuchat & Monthville, 2001).

Ami

Ami es una amidasa de 917 aminoácidos, es una autolisina involucrada en adhesión que además de tener una actividad lítica en las paredes de *L. monocytogenes* está implicada en la adhesión a células blanco y su dominio de anclaje en la pared celular es suficiente para restaurar la adhesión en los mutantes *ami*. Sin embargo, la significancia de autolisinas con propiedades adhesivas no es clara (Dussurget, Pizano-Cerda & Cossart, 2004).

p60

Esta proteína extracelular de 60 kDa es una hidrolasa de pared celular involucrada en virulencia codificada en el gen cromosomal *iap* (del ingles, invasion-associated protein). Esta proteína esencial tiene actividad bacteriolítica, pero el papel exacto en la invasión aun no es claro; se cree que influye principalmente en la entrada en los fibroblastos (Doyle, Beuchat & Monthville, 2001, Dussurget, Pizano-Cerda & Cossart, 2004).

FbpA

Esta proteína de superficie multifuncional es muy parecida a las fibronectinas de unión PavA de *Streptococcus pneumoniae*. Carece de un péptido señal típico, está expuesta en la superficie

bacteriana y contribuye en la adherencia. También parece modular los niveles de LLO e InlB en el estado post-transcripcional, lo cual sugiere que podría actuar como una chaperona molecular previniendo la degradación de algunas proteínas de virulencia (Dramsi & Cossart, 1998).

LLO

Esta toxina activada por tiol formadora de poros también es una molécula de señalización muy potente. Es miembro de la familia de citolisinas, es secretada y está involucrada en el escape de las vacuolas primarias y secundarias. Solamente es activa en las membranas que tienen colesterol, probablemente actuando como un receptor en la membrana, incluyendo los eritrocitos. El locus que contiene el transposon es un gen estructural llamado *hly* (Doyle, Beuchat & Monthville, 2001).

ActA

ActA es la proteína de superficie responsable de la motilidad de *L. monocytogenes* basada en actina. Después de la lisis de la vacuola, las bacterias en el citosol inducen la polimerización de los filamentos de actina que promueven el movimiento intracelular y la dispersión célula-célula. Es una proteína de 639 aminoácidos que presenta un péptido señal en el dominio amino-terminal y un motif transmembranal en el extremo carboxi-terminal que ancla a molécula a la superficie bacteriana. Tiene una distribución polar que facilita a formación de la cola de cometa característica (Dussurget, Pizano-Cerda & Cossart, 2004). Está codificada por el gen *actA*, un gen altamente polimórfico que ha sido utilizado para determinar relaciones evolutivas entre miembros de esta especie (Cai et al., 2002).

Fosfolipasas

Además de LLO, *L. monocytogenes* produce también otras hemolisinas llamadas fosfolipasa C fosfatidilinositol-especifica (PI-PLC) y fosfolipasa C fosfatidilcolina-especifica (PC-PLC). Se ha demostrado que PC-PLC no es específica para fosfatidilcolina. Estas fosfolipasas actúan desestabilizando las membranas de las células hospederas mediante la hidrólisis de lípidos membranales como PI y PC. La PC-PLC también es conocida como lecitinasa (Jay et al., 2005).

4.2 Listeriosis Humana

La listeriosis afecta principalmente a adultos inmunosuprimidos, mujeres embarazadas, fetos y recién nacidos (Muñoz & Díaz, 1998). En el adulto la enfermedad se manifiesta como bacteriemia y meningoencefalitis, predominando en pacientes con SIDA, cáncer, diabetes, cirrosis y transplantes. Las manifestaciones primarias de la listeriosis en el ser humano son infecciones del sistema nervioso central, siendo la meningitis la más común. Se caracteriza por diversos síntomas graves en los diferentes grupos de riesgo. Varios estudios epidemiológicos indican que los grupos de riesgo son principalmente mujeres embarazadas, niños recién nacidos o en periodo neonatal, adultos con sistema inmune deprimido y los ancianos (Rocourt, 1994).

Las mujeres embarazadas también manifiestan propensión a padecer bacteriemia por este microorganismo; la patología suele presentarse durante el tercer trimestre de la gestación, cursando como un simple cuadro similar a la gripa (Figura 8).

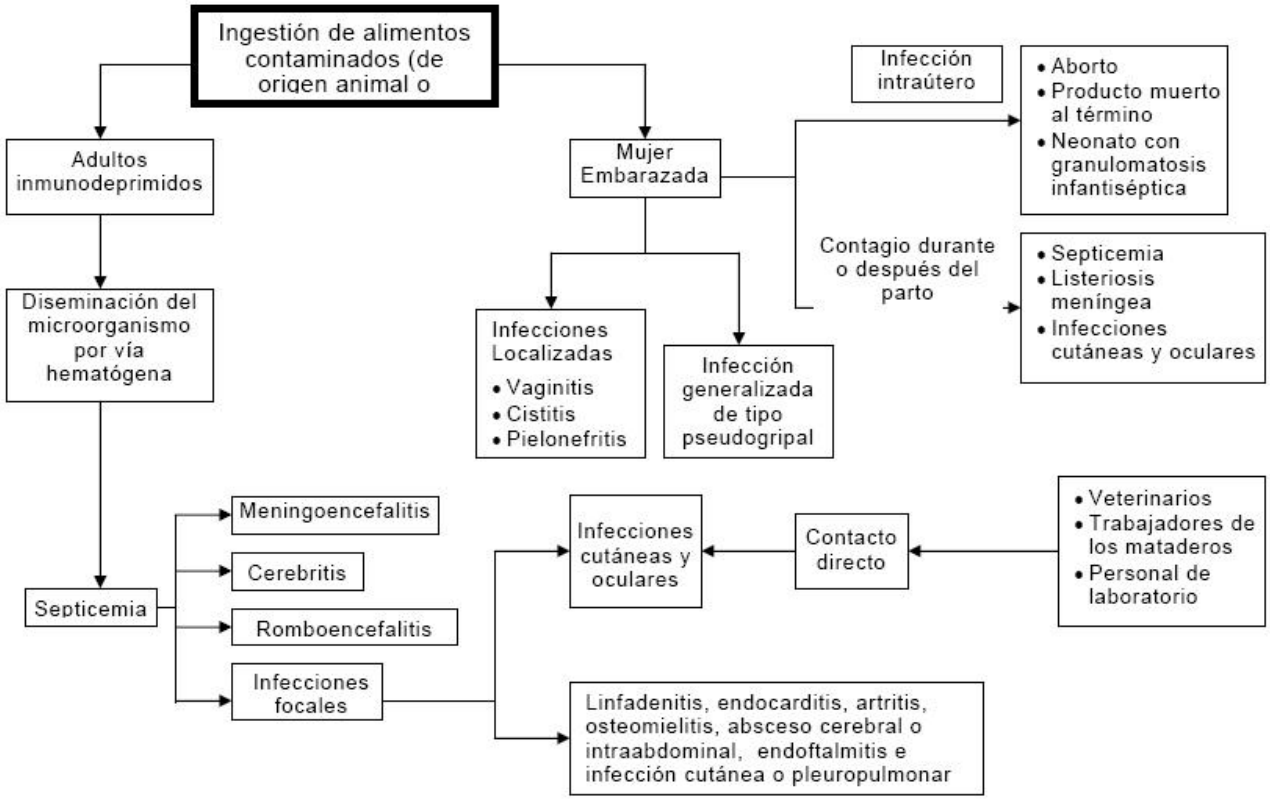


FIGURA 8. Curso de la Listeriosis. Tomado de "La listeriosis humana y el ciclo infectivo asociado a su agente etiológico". Raúl Garza-Velasco*, Teresa Silva-Monzuazo* y Luciano Hernández-Gómez. Departamento de Biología, Facultad de Química, UNAM

La infección no es comúnmente fatal para la madre, pero en ausencia de la terapia adecuada, ocurren la amniotitis y la infección fetal; que puede desencadenar abortos o partos prematuros de neonatos con granulomatosis infantil séptica. Cuando los afectados sobreviven, frecuentemente quedan con serias secuelas incurables en el sistema nervioso central, afectando funciones psico motrices

.

Finalmente, las infecciones focales (oftalmías, abscesos cerebrales, cuadros cutáneos, afecciones pleuropulmonares, etc.) ocurren en raras ocasiones, después de la listeriemia o de la granulomatosis infantil séptica (Dorozinsky, 2000). Esta enfermedad es de gran importancia a nivel mundial, porque tiene una tasa de mortalidad del alrededor del 30%, alcanzando hasta un 70% en casos de meningitis, 50% en casos de septicemia y hasta un 80% en casos de infecciones perinatales o neonatales (BAM, 2006).

4.3 Epidemiología

La distribución de *L. monocytogenes* es mundial, y se han presentado reportes de listeriosis tanto en países desarrollados como en países en vía de desarrollo. La mayor parte de las infecciones son de origen alimentario, y los alimentos principalmente implicados son la ensalada de col, quesos suaves, carne de aves, salchicha de pavo, champiñones, leche y lengua de cerdo en jalea (Acheson, 2005).

La listeriosis ha surgido como una enfermedad muy importante de origen alimentario en las últimas dos décadas; el primer brote estudiado, ocurrió en 1981 en Nueva Escocia, Canadá, por ensalada de repollo contaminada que comprendió 41 casos: en la granja productora se habían registrado varios casos de listeriosis en ovejas, cuyo estiércol se empleó para fertilizar la col (Lawrence & Gilmour, 1991). Luego en Estados Unidos (Massachussets) se reportó un brote en 1983 debido al consumo de una marca específica de leche pasteurizada, gracias a este incidente se determinó que aunque la pasteurización elimina al microorganismo, los productos alimenticios se pueden contaminar posteriormente (Fleming et al., 1985). Dos años mas tarde, en Los Angeles ocurrió un brote donde 142 personas fueron afectadas, de las cuales 45 murieron debido al consumo de queso estilo mexicano contaminado (Acheson, 2000). También se presentó un brote en Suiza entre los años 1983-1987 asociado al consumo de queso fresco contaminado (Low & Donachie, 1997). En 1992 se presento una gran epidemia en Francia con 279 enfermos, 63 muertes y 20 abortos debido a contaminación cruzada entre los utensilios y los alimentos, ligado a lengua de cerdo (Dorozynski, 2000). Entre 1998 y 1999 se reportó un brote de listeriosis humana con 25 casos en Finlandia debido al consumo de mantequilla contaminada, donde 6 personas murieron. 20 personas sufrieron sepsis, 4 presentaron meningoencefalitis y una persona manifestó abscesos en el hígado. En Francia en el 2000 se reporto un brote con 25 personas afectadas, de las cuales 7 fallecieron debido a contaminación cruzada ya que los cuchillos utilizados para rebanar carne de cerdo habían sido empleados previamente en otros productos. En el año 2002, se presentó un brote en Estados Unidos involucrando nueve estados con 54 personas afectadas, donde 8 murieron y 3 muertes fetales ocurrieron (CDC, 2006).

Desde la década de los 80 se han reportado numerosos casos y brotes de listeriosis; particularmente en Estados Unidos cerca del 99% de los casos reportados han sido transmitidos por alimentos. Diferentes estudios han reportado a los RTE como un vehiculo frecuente en la transmisión de *L.*

monocytogenes, específicamente en Estados Unidos hay reportes de brotes multiestatales relacionados con el consumo de salchichas tipo "Frankfurters", jamón de pavo y cerdo entre otros. En otros países como Portugal han encontrado que cerca del 15% de los RTE están contaminados con *L. monocytogenes* (Escartin, 2000). Este patógeno cada vez cobra mayor importancia en epidemiología y salud pública, y es así que esta bacteria es la responsable en Estados Unidos de aproximadamente 2500 casos cada año, es decir 7 casos por millón de habitantes y 500 muertes al año (Varma et al., 2004).

En Colombia existen pocos datos disponibles de la listeriosis; quizás el estudio epidemiológico más conocido reporta que durante el periodo de 1994-1999 se presentaron un total de 19 casos clínicos de listeriosis humana; 10 en adultos inmunosuprimidos, 2 en mujeres embarazadas, 6 en neonatos y 1 caso en una adolescente de 12 años (Crespo et al., 1999). Sin embargo, a pesar de la poca disponibilidad de datos epidemiológicos, se sabe que *L. monocytogenes* es una bacteria frecuente en los alimentos que circulan en nuestro país. En un estudio realizado en Bogotá, se determinó la presencia de *L. monocytogenes* en 70 muestras de cárnicos procesados como chorizo, longaniza, butifarra y morcilla provenientes de supermercados y plazas de mercado. Se encontró una frecuencia total de 12.85% de muestras positivas, con una mayor frecuencia en longaniza 7.14%, seguido en chorizo 4.28% y en butifarra 1.43%. (Vanegas, Martínez & Botina, 2006). En otro estudio realizado en Bogotá, se estimó que la prevalencia de *L. monocytogenes* en pollo procesado en la zona sur-occidental de la ciudad, también es alta: 16.3% en pechuga, 14.9% en pierna y 11.6% en perniles, con un análisis de 255 muestras en total (Carrascal, Correa & Fonseca, 2005). Adicionalmente, existen casos ocasionales reportados de manera aislada por algunas entidades de salud, y el laboratorio de referencia nacional del Instituto Nacional de Salud recibe aislamientos clínicos de *L. monocytogenes*. Por lo anterior no se sabe si la listeriosis es una enfermedad rara en Colombia o poco documentada.

4.4 Amplificación Azarosa de DNA Polimórfico (RAPD)

Las técnicas moleculares se han desarrollado notablemente en los últimos años, lo que las hace una herramienta confiable y rápida de análisis. Una de las técnicas más empleadas mundialmente es la reacción en cadena de la polimerasa, donde se emplean dos oligonucleótidos con secuencia específica para obtener millones de copias de un segmento blanco del ADN (McPherson & Moller, 2000). Esta técnica se basa en varios ciclos de amplificación y variación de temperatura, donde ocurren pasos de denaturación (94°C), anillaje (55°C) y elongación del material genético (72°C). Como producto final se obtienen millones de copias del segmento deseado. Existen numerosas variaciones de esta técnica, entre ellas la amplificación azarosa de ADN polimorfico (Randomly Amplified Polymorphic DNA; RAPD). Esta técnica está basada en el PCR tradicional, es un método de fingerprinting genómico rápido y sencillo útil en el análisis genómico de bacterias y hongos. Puede identificar la presencia de cepas particulares o patotipos en un medio específico, gracias al empleo de un oligonucleótido de secuencia arbitraria que inicialmente se anilla a sitios donde la correspondencia es imperfecta. Por lo tanto se trabaja en condiciones de baja astringencia para el anillaje (37-50°C), luego es incrementada (55°C) para aumentar la especificidad y minimizar los errores (McPherson & Moller, 2000), de esta forma se obtienen productos de diferente tamaño molecular lo cual se traduce en patrones de bandeo que se interpretan como una huella digital genética para cada cepa. Los tipos similares tendrán el mismo patrón de bandeo (Figura 9).

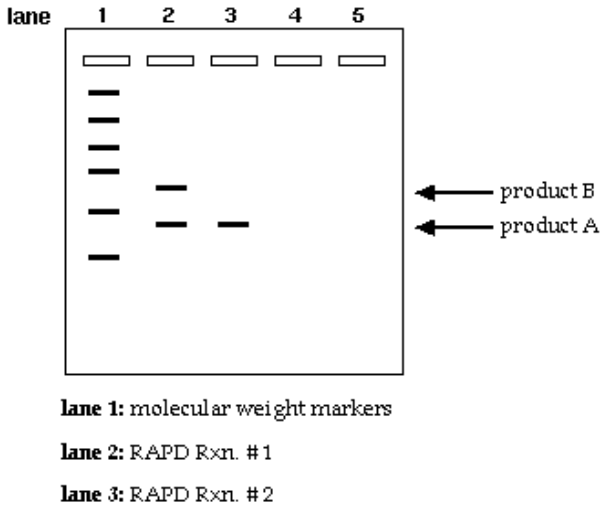


Figura 9. Patrones de bandeo de los productos amplificados. Se observa que el microorganismo 2 es un tipo diferente al microorganismo 3. Imagen tomada de http://avery.rutgers.edu/WSSP/StudentScholars/project/archives/onions/rapd.html

Cada vez son más los estudios con técnicas moleculares para obtener un mejor conocimiento de *L. monocytogenes* y sus factores de virulencia. Recientemente se han hecho análisis genéticos de *L. monocytogenes* para determinar diferentes genotipos (Yoshida et al., 1999).

Particularmente para *Listeria monocytogenes*, son numerosos los estudios empleando RAPD con diferentes propósitos, especialmente en plantas procesadoras de alimentos. En un estudio realizado en Dinamarca en plantas de pescadería (Wulff et al., 2006), se logró determinar que cepas de *L. monocytogenes* que están cercanamente relacionadas a nivel genético pueden estar especialmente adaptadas para colonizar las diferentes superficies o pueden ser especialmente resistentes a procedimientos de limpieza y desinfección gracias a la tipificación por RAPD.

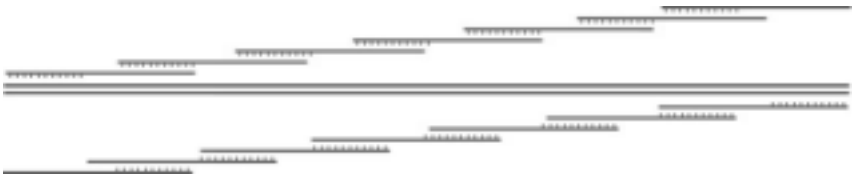
Esta técnica también ha sido empleada para determinar relaciones epidemiológicas analizando aislamientos clínicos y de alimentos. Leite *et al* 2006, realizó una caracterización molecular empleando RAPD para determinar si brotes de listeriosis presentados durante un periodo de tiempo específico en Portugal estaban relacionados con el consumo de queso. Se analizaron aislamientos de *L. monocytogenes* de los quesos y de los pacientes afectados y aunque se encontró una alta diversidad molecular entre los aislamientos de *L. monocytogenes* (se detectaron un total de 18 tipos de RAPD), los patrones de las cepas clínicas fueron diferentes a las de los quesos demostrando que no había relación epidemiológica entre las mismas.

4.5 Secuenciación

Existen varias técnicas de secuenciación de genomas completos y gracias al esfuerzo conjunto de varios científicos e instituciones, hoy en día está disponible el genoma totalmente secuenciado de muchos organismos incluyendo bacterias. Particularmente para *L. monocytogenes*, se han secuenciado varios aislamientos completamente y estas secuencias se encuentran disponibles en las bases de datos publicas como GenBank (Números de acceso NC002973 y NC003210).

Una de las técnicas de secuenciación más conocidas es el Whole Shotgun Sequencing (figura 10), la cual ha sido empleada para secuenciar el genoma de varios microorganismos, incluyendo bacterias. En esta técnica, la secuencia del genoma completo es generada empleando lecturas pareadas de los extremos a partir de plásmidos, cosmidos o BACS y luego son reorganizados buscando fragmentos sobrelapantes, que una vez ensamblados se obtiene la secuencia del genoma completo. A continuación se presenta un esquema:

FIGURA 10. Whole Shotgun Sequencing. Tomado de http://nema.cap.ed.ac.uk/teaching/genomics/Genomics3.html



Se corta el genoma y se subclona en un vector. Se muestrea aleatoriamente la librería de los subfragmentos y se generan varias lecturas. Estas se organizan en *contigs* y una vez ensamblados se obtiene la secuencia completa (esto incluye cerrar *gaps*).

1. Cortar el DNA 2. Clonar en Vector Universal 3. Secuenciar Clones

4. Organizar en Contigs, cerrar gaps y ensamblar.

La secuenciación de genes es mucho más simple, debido a que son de un tamaño considerablemente menor, no es necesario utilizar las técnicas que requieren un ensamblaje a no ser que sea un gen bastante grande. Cuando se desea secuenciar un producto de PCR, se utilizan los mismos oligonucleótidos que fueron empleados para obtener la amplificación del fragmento. Los secuenciadores actuales están basados en el método de Sanger, pero adicionando un marcador químico a cada ddNTP, el cual emite fluorescencia cuando es excitado por un láser, con un colorante diferente que permite diferenciar cada ddNTP. Las lecturas varían entre 500 y 700 nucleótidos y la secuencia se presenta en forma de un cromatograma, donde se diferencian las bases con colores diferentes, la intensidad de la señal luminosa (altura del pico) y la base que el programa asigna a cada pico o posición (figura 11).

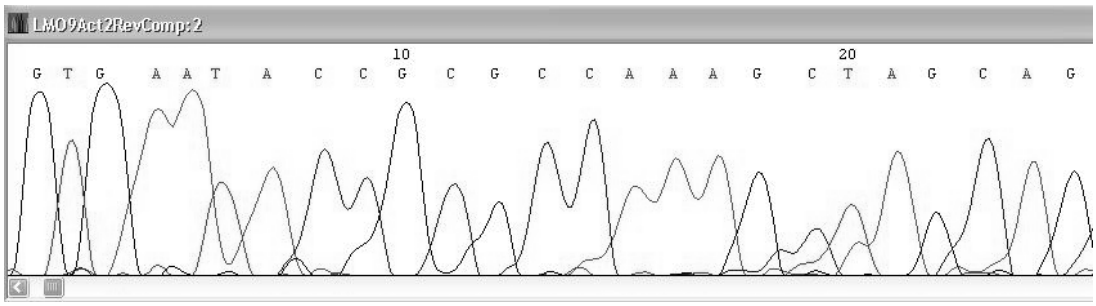


FIGURA 11. Cromatograma de una secuencia del fragmento *actA* de *L. monocytogenes*

Debido a que *L. monocytogenes* comprende un grupo diverso de cepas, las técnicas de tipificación para rastrear cepas individuales involucradas en brotes de listeriosis y para estudiar la epidemiología y la genética poblacional, es fundamental e integral para controlar y prevenir la listeriosis. La tipificación basada en secuenciación, es un método altamente sensible, que tiene un

alto poder discriminatorio y posee buena reproducibilidad (Liu, 2006). Por esta razón, cada día son más los estudios que emplean la secuenciación de uno o mas genes de virulencia con el fin de caracterizar *L. monocytogenes*. Estas técnicas están reemplazando a la tipificación fenotípica (Wiedman, 2002). La obtención de secuencias de ADN parciales o totales a partir de genes bacterianos de diferentes aislamientos, aporta datos discretos, no ambiguos y aporta información que puede ser empleada con fines epidemiológicos y filogenéticos (Cai et al., 2002). Varios genes de virulencia han sido empleados para tipificar aislamientos de *L. monocytogenes*, incluyendo *hly, actA, inlA, sigB, prs, recA* y regiones intergenicas como *plcA-hly* y *hly-mpl*. La secuenciación de los genes completos o fracciones parciales, ha permitido dilucidar la estructura filogenética de *L. monocytogenes*. Quizás uno de los primeros estudios que empleó este acercamiento fue desarrollado por Rasmussen et al. (1991), quien pudo determinar que los aislamientos de *L. monocytogenes* se pueden clasificar dentro de dos tipos o grupos diferentes de acuerdo a la secuencia del gen de la listeriolisina. Desde entonces, son numerosos los estudios que emplean esta técnica de tipificación en todo el mundo.

4.6 Tipificación de *L. monocytogenes*

L. monocytogenes puede ser separada por reacciones de serotipificación en al menos doce serotipos diferentes (1/2a, 1/2b, 1/2c, 3a, 3b, 3c, 4a, 4b, 4c, 4d, 4e, y 7) debido a los antígenos somático (O) y flagelar (H) (Schonberg et al., 1996; Kathariou, 2002). Sin embargo, solamente cuatro de estos serotipos (1/2a, 1/2b, 1/2c and 4b) han sido reportados como causantes de una gran mayoría de casos de listeriosis humana, siendo el serotipo 4b el mas comúnmente implicado en casos esporádicos y brotes de listeriosis. Los serotipos 1/2b y 1/2a parecen ser recuperados a partir de alimentos con mayor frecuencia (Piffaretti et al., 1989; Wiedmann et al., 1997; Wiedmann, 2002).

A pesar que *L. monocytogenes* es considerado un patógeno, esta especie comprende un grupo diverso de cepas con virulencia variable; mientras que muchas cepas tienen potencial patogénico y pueden causar enfermedad y / o muerte, otras tienen una capacidad limitada para establecer un proceso infectivo exitoso y por ende son relativamente avirulentas (Barbour, Rampling & Hormaeche, 2001**;** Liu, Ainsworth, Austin & Lawrence, 2003). Se ha demostrado que los niveles de expresión de los genes de virulencia difieren estadísticamente entre cepas clínicas y no clínicas (Werbrouck et al., 2006), lo cual podría explicar la ocurrencia relativamente baja de esta enfermedad.

Varios estudios de tipificación sugieren que *L. monocytogenes* puede ser dividida en al menos tres linajes evolutivos diferentes (I, II and III). Los linajes I y II fueron identificados inicialmente por electroforesis enzimática multilocular por Piffaretti et al. (1989), fueron confirmados subsecuentemente por secuenciación parcial de un gen de virulencia por Rasmussen *et al,* (1991), y el linaje III fue evidenciado por primera vez unos años después por Rasmussen *et al* (1995), mediante el análisis de las secuencias parciales de los genes *flaA, iap* y *hly*. Wiedmann *et al* (1997) demostró que *L. monocytogenes* también puede ser dividida en tres linajes con diferencias en potencial patogénico utilizando ribotipificación y polimorfismos de genes de virulencia basado en los genes *hly*, *inlA* y *actA*. La ribotipificación automatizada y tipificación por PCR-RFLP (PCR-Restriction Fragment Length Polymorphism) de los genes de virulencia *actA* y *hly* han sido

demostrados como técnicas útiles para la caracterización genética de aislamientos de *L. monocytogenes* a partir de casos de listeriosis de humanos y animales (Jeffers, Bruce, McDonough, Scarlett, Boor & Wiedmann, 2001). Estos hallazgos han sido confirmados en otros estudios por diversas técnicas, incluyendo secuenciación de genes de virulencia donde se ha determinado que el linaje I incluye a la mayoría de aislamientos epidémicos, el linaje II contiene principalmente aislamientos de alimentos y el linaje III contiene aislamientos poco frecuentes que comprenden el 15% de las cepas clínicas de animales y unos pocos de humanos (Piffaretti et al., 1989; Rasmussen, Beck, Olsen, Dons & Rossen, 1991; Rasmussen et al., 1995; Wiedmann et al., 1997; Vines & Swaminathan, 1998; Wiedmann, 2002; Keto-Timonen, Autio & Korkeala, 2003; Doumith et al., 2004; Ward, Gorski, Borucki, Mandrell, Hitchins & Pupedis, 2004; Nightingale, Windham & Wiedmann, 2005; Zhou & Jiao, 2005; Roberts, Nightingale, Jeffers, Fortes, Kongo & Wiedmann, 2006).

4.7 Fundamentos de Filogenia y Análisis de Secuencias

Los métodos más frecuentemente utilizados para la construcción de árboles filogenéticos pueden clasificarse en dos categorías: métodos fenéticos basados en distancias y métodos cladísticos basados en caracteres. El primero emplea la distancia pareada o disimilitud entre dos genes y contruye el árbol a partir de la matriz de distancia resultante; el segundo evalúa todos los posibles árboles y encuentra aquel que optimiza la evolución. Entre los métodos basados en distancia más populares están Unweighted Pair Group Method With Arithmetic Mean (UPGMA) y Neighbor-Joining (DeSalle, Giribeth & Wheeler, 2002). Los métodos de distancia comprimen la información de la secuencia en un solo número y las dos secuencias con la distancia más corta son consideradas como taxones cercanamente relacionados (Hoang, 2005)

Método Neighbor-Joining de Saitou y Nei

El método Neighbor-joining (Saitou & Nei, 1987) provee un algoritmo aproximado para encontrar el árbol más corto, es decir con el menor número de pasos evolutivos. Este método combina la rapidez computacional con un resultado único, por lo cual es un método ampliamente utilizado. Las ventajas de este método son: la rapidez, por lo cual es útil para analizar conjuntos de datos grandes; calcula la longitud de la rama y permite corregir secuencias múltiples. Entre las desventajas de éste método se encuentran que se obtiene un único árbol y comprime la información de la secuencia (Hoang, 2005).

Estadísticas F

Las estadísticas F diseñadas por Sewell Wrigth (1965) permiten determinar la frecuencia de ocurrencia de flujo genético y subdivisión poblacional, entre otros. Estos son unos de los factores más importantes que forman la estructura genética de las poblaciones. El índice de fijación (Fst), es uno de los valores más importantes, ya que permite medir la cantidad de flujo genético entre sub-poblaciones, donde altos valores de Fst indican bajos niveles de flujo genético, siendo 1 un aislamiento genético total (Page & Holmes, 1998). Existen varias formas de calcular los valores Fst, uno de los cuales es aplicar Análisis de Varianza a datos de secuencia, donde se pueden calcular

estos valores basados en información de secuencia o haplotipos. Actualmente existen programas de análisis de secuencias que estiman este índice incluyendo DNAsp (DeSalle, Giribeth & Wheeler, 2002).

Diversidad y Neutralidad

Aunque existen varias pruebas para evaluar la neutralidad de las mutaciones, los más comunes utilizan datos de nucleótidos de secuencia. La estadística D de Tajima permite evaluar la neutralidad de mutaciones utilizando secuencias (polimorfismos) pertenecientes a una especie. Para los datos de secuencia de DNA, una medida del polimorfismo dentro de una población dada es el número promedio de diferencias nucleotídidicas por sitio entre dos secuencias. Esta medida es llamada Diversidad Nucleotídica (Nei & Li, 1979) y está denotada por π (Graur & Li, 2000). Bajo la teoría neutral, la variación genética esperada por nucleótido está basado en el estimador θ, el cual puede estimarse utilizando el número de sitios segregantes S o el número promedio de diferencias pareadas π, entre las secuencias analizadas. Mientras que S examina el número de sitios polimórficos, π evalúa la frecuencia de alelos mutantes en la población. Si la evolución es neutral, entonces los estimados basados en S y π arrojan el mismo valor θ. Tajima propuso que la diferencia (D) entre los estimados de θ basados en S y π pueden servir para probar la neutralidad de las mutaciones, donde D=0 es neutralidad (Page & Holmes, 1998). Entre otros estadísticos que permiten evaluar neutralidad, se encuentran los valores D y F de Fu y Li, los cuales se interpretan de manera similar (Fu & Li, 1993).

Una medida de variabilidad genética es la diversidad génica, también conocida como diversidad haplotítica (H_d), y es calculada a partir de los alineamientos de DNA en programas como DNAsp. Su valor puede encontrarse entre 0 y 1, donde 0=diversidad baja o inexistente y 1=diversidad máxima (Graur & Li, 2000).

5. MATERIALES Y METODOS

5.1 Aislamientos de *Listeria monocytogenes*

Para la realización de este estudio, se emplearon 38 aislamientos de *Listeria monocytogenes* obtenidos en estudios anteriores, y donados por instituciones de salud. Estos aislamientos hacen parte del cepario del Laboratorio de Ecología Microbiana y Alimentos (LEMA), donde se llevó a cabo el desarrollo experimental del presente trabajo. Los aislamientos de origen clínico fueron donados por el grupo de Microbiología del Instituto Nacional de Salud (INS) y por la Fundación Santafé de Bogotá (FSF), los cuales también se confirmaron por PCR en el LEMA. Todas las cepas fueron identificadas por microbiología tradicional y fueron confirmadas por PCR del gen de la listeriolisina O (*hly*). A continuación se presenta una tabla con las cepas empleadas; la cepa control fue *L. monocytogenes* ATCC 7644. Todos los aislamientos fueron mantenidos a -70ºC en caldo Infusión Cerebro Corazón (BHI-siglas en inglés para Brain Heart Infusión, Oxoid, Bansistoke, Reino Unido) con glicerol y en Agar Sangre (Sharlau Chemie, Barcelona, España) a 4°C.

Tabla3. Aislamientos de *L. monocytogenes* empleadas para este estudio.

Codigo	Origen	Fuente	Serotipo	Fecha Aislamiento
LMO6	Leche Cruda	LEMA	4b	Marzo, 2003
LMO7	Queso Fresco	LEMA	4b	Marzo, 2003
LMO48	Jamón plaza	LEMA	4e	Febrero 16, 2004
LMO49	Jamón plaza	LEMA	4a	Febrero 16, 2004
LMO50	Jamón plaza	LEMA	ND	Febrero 16, 2004
LMO52	Jamón supermercado	LEMA	4a	Febrero 2, 2004
LMO53	Jamón supermercado	LEMA	3b	Febrero 2, 2004
LMO54	Jamón supermercado/LEMA	LEMA	ND	Febrero 2, 2004
LMO55	Jamón supermercado	LEMA	4a	Febrero 2, 2004
LMO76	Leche Cruda	LEMA	4a	Mayo 25, 2004
LMO77	Leche Cruda	LEMA	4b	Mayo 31, 2004
LMO79	Leche Cruda	LEMA	4b	Junio 7,2004
LMO94	Báscula para pollo-Planta C	LEMA	4a	Junio, 2005
LMO95	Peto de operaria-Planta C	LEMA	4a	Junio, 2005
LMO111	Pared cuarto frío-Planta F	LEMA	4a	Junio, 2005
LMO172	Tejido Piel	FSF	ND	Octubre, 2005
LMO174	Pollo crudo	LEMA	1/2a	Enero, 2006
LMO175	Hemocultivo	LEMA	4b	Enero, 2006
LMO176	Liquido cefalorraquídeo	INS	4b	Junio 24, 1998
LMO177	Liquido cefalorraquídeo	INS	4b	Agosto 3, 1998
LMO178	Liquido cefalorraquídeo	INS	4b	Agosto 3, 1998
LMO179	Liquido cefalorraquídeo	INS	4b	Agosto 10, 1998
LMO180	Liquido cefalorraquídeo	INS	1/2b	Diciembre 14, 1998
LMO181	Liquido cefalorraquídeo	INS	4b	Enero 1, 1999
LMO182	Liquido cefalorraquídeo	INS	4b	Enero 29, 1999
LMO183	Liquido cefalorraquídeo	INS	4b	Octubre 17, 2000
LMO184	Liquido cefalorraquídeo	INS	4b	Octubre 17, 2000
LMO185	Liquido cefalorraquídeo	INS	1/2a	Octubre 17, 2000
LMO186	Hemocultivo	INS	4b	Septiembre 24, 2004
LMO187	Hemocultivo	INS	1/2b	Octubre 15, 2004
LMO188	Liquido cefalorraquídeo	INS	4b	Abril 13, 2005
LMO189	Liquido cefalorraquídeo	INS	4b	Junio 2, 2005
LMO190	Liquido pleural	INS	4b	Junio 2, 2005
LMO191	Hemocultivo	INS	1/2a	Octubre 2, 2005
LMO192	Hemocultivo	INS	4b	Noviembre 24, 2005
LMO193	Hemocultivo	INS	4b	Noviembre 24, 2005
LMO194	Hemocultivo	INS	4b	Enero 2, 2006
LMO195	Materia Fecal	INS	1/2a	Enero 16, 2006

ND: No Determinado

INS: Instituto Nacional de Salud

FSF: Fundación Santa Fe de Bogota

LEMA: Laboratorio de Ecología Microbiana y Alimentos

5.2 Extracción de ADN

Se realizaron cultivos de 18h a 37°C en caldo BHI y se realizó la extracción a partir de 1ml del caldo utilizando el estuche para Aislamiento de ADN procariótico ProDNA 2003 (Corporación Corpogen, Bogotá, Colombia), siguiendo las instrucciones del fabricante. El ADN se resuspendió en 50 µl de solución de resuspensión del estuche.

5.3 Cuantificación de ADN

Se resuspendieron 15 µl de la solución de ADN en 285 µl de solución de resuspensión (Buffer TE, factor de dilución 20) en una celda de cuarzo y se realizaron lecturas a 260, 280 y 320 nm para determinar la pureza y cantidad de ADN utilizando el espectrofotómetro (Biomate 3, Thermospectronic, Rochester NY, USA). La pureza se estimó mediante la razón A_{260}/A_{280}.

5.4 Preservación de ADN

El ADN fue ajustado a una concentración de 25 ng/µl, se distribuyó en alícuotas de trabajo de 60 ul y se conservó a -20°C hasta su uso.

5.5 Amplificación Azarosa de ADN Polimorfico-RAPD

5.5.1 Oligonucleótidos

Se utilizaron dos oligonucleótidos de 10 pares de bases Sintetizados por IDT (Integrated ADN Technologies, Inc, Coralville, IA, USA): HLWL-74 (5'-ACG TAT CTG C-3') el cual ha sido reportado previamente (Lawrence & Gilmour, 1991; Lawrence, Harvey & Gilmour, 1993) como exitoso para caracterizar aislamientos de *L. monocytogenes* mediante la técnica de RAPD y un oligonucleótido arbitrario de 10 pb (5' -GAG CTC GTG T-3') reportado por la Unidad de Servicio de Ácidos Nucleicos y Proteína de la Universidad British Columbia como estándar para reacciones de RAPD (Nucleic Acid Protein Service Unit, 2006).

5.5.2 Condiciones de la reacción de RAPD

El cicloutilizado fue modificado en el laboratorio con base en varios protocolos reportados en la literatura (Inoue et al., 2001**;** Yoshida et al., 1999**;** McPherson & Moller, 2000; Lawrence, Harvey &

Gilmour, 1993) con modificaciones utilizando un termociclador Gene Cycler™ (Bio-Rad Laboratories, Inc. USA). A continuación se describe cada componente del ciclo:

Perfil de amplificación: Denaturación inicial 94°C por 5 minutos, seguido por 30 ciclos de 94°C por 30 segundos, 37°C por 45 segundos, 72°C por 1 minuto y un ciclo final a 72°C por 5 minutos.

Reacción: El volumen final de reacción fue de 25 µl conteniendo: 0.1 U/µl Taq Polimerasa, 3 mM $MgCl_2$, 1X Buffer PCR (Reactivos del estuche TucanTaq; Corporación Corpogen. Bogotá Colombia), 0.2 mM de cada dNTP (Promega Corporation, Madison USA), 1.5 µM de oligonucleótido y 50 ng de ADN. Cada reacción se realizó dos veces para cada aislamiento y cada oligonucleótido. En todas las reacciones se incluyó un control negativo para cada oligonuecleótido (agua libre de nucleasa en vez de ADN).

Visualización de los productos: Los productos de amplificación se separaron por electroforesis convencional en geles de agarosa al 1%, en Buffer TBE 1X utilizando el ADN de fago λ digerido con EcoRI+HindIII (Promega Corporation, Madison, USA) como marcador de peso molecular. Para visualizar los patrones de bandeo, se realizó una tinción en piscina de bromuro de etidio (0.5 mg/ml) durante 45 minutos y luego se visualizaron los productos en el transiluminador ChemiDoc XRS system (Bio-rad Laboratorios Inc. USA).

5.5.3 Interpretación de resultados RAPD

Se analizaron los datos de manera independiente para cada oligonucleótido mediante el programa Quantity One de Bio-rad y SYN-TAX (2000). Se construyó una matriz binaria (1=banda presente, 0= banda ausente) para construir un dendrograma empleando el programa SYN-TAX (2000), con la herramienta de agrupación jerárquica y el coeficiente de correlación de Jaccard independientemente para cada oligonucleótido.

Los porcentajes de similitud se obtuvieron de acuerdo a los resultados del dendrograma, el cual refleja el valor de disimilaridad entre los aislamientos. Se consideró un linaje cuando la disimilaridad fue superior a 0,75 (75%), de acuerdo a los reportes de la literatura (Mereghetti et al, 2002).

5.6 PCR gen *actA*

5.6.1 Oligonucleótidos

Se utilizaron los oligonucleótidos 01 y 02 de 24 y 21 pares de bases respectivamente, sintetizados por IDT (Integrated ADN Technologies, Inc. 1710 Commercial Park. Coralville, IA 5224. United States of America); 01: 5'-GCTGATTTAAGAGATAGAGGAACA-3') y 02: 5'-TTTATGTGGTTATTTGCTGTC-3' los cuales han sido reportados previamente para amplificar un fragmento de 827 pb (Zhou, Jiao & Wiedmann, 2005), el cual incluye el extremo 3' del gen *actA* de *L. monocytogenes*.

5.6.2 Condiciones de la Reacción de PCR

Se utilizó una modificación del ciclo reportado por Zhou et al. (2005) utilizando el termociclador Gene Cycler™ (Bio-Rad Laboratories, Inc. USA). A continuación se describe brevemente cada paso del ciclo:

Perfil de amplificación: Denaturación inicial 94°C por 2 minutos, seguido por 35 ciclos de 94°C por 1 minuto, anillaje 50°C por 1 minuto y extensión a 72°C por 1 minuto y un ciclo final a 72°C por 10 minutos.

Reacción: El volumen final de reacción fue de 50 µl conteniendo: 25µl de PCR GoTaq Green Master Mix (Promega Corporation, Madison, USA), 3 µl de cada primer a 10µM, 17 µl de agua libre de nucleasa y 50 ng de ADN. La cepa empleada como control positivo fue *L. monocytogenes* ATCC 7644 y agua libre de nucleasa en vez de ADN como control negativo.

Visualización de los productos: Se tomó una alícuota de 3 µl del producto de PCR y se separaron los productos en un gel de agarosa al 2% tenido con bromuro de etidio a una concentración final de 0.5 mg/ml. Luego se realizó electroforesis tradicional durante 60min a 80 V y 400 mA, se empleó el marcador de peso molecular 50pb-step ladder (Promega Corporation, Madison, USA).Se visualizaron los productos empleando el transiluminador Chemidoc XRS system (Bio-Rad Laboratories, Inc, USA).

5.7 Purificación y Secuenciación de Productos

5.7.1 Purificación y verificación de los productos de PCR

Los 47 µl restantes se mantuvieron a 4°C por un periodo no mayor a 1 hora hasta el procedimiento de limpieza. Se purificaron los productos de PCR utilizando el kit Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega Corporation, United States of America), siguiendo las instrucciones del fabricante. Con el fin de verificar la calidad del producto purificado, nuevamente se tomó una alícuota de 2 µl del producto limpio de PCR, y se corrió en un gel de agarosa al 2% tenido con bromuro de etidio a una concentración final de 0.5 mg/ml por electroforesis tradicional durante 60min a 80 V y 400 mA. Se empleó el marcador de peso molecular 50pb-step ladder (Promega Corporation, Madison, USA). Se visualizaron los productos empleando el transiluminador Chemidoc XRS system (Bio-Rad Laboratories, Inc, USA).

5.7.2 Secuenciación del extremo 3' del gen *actA*

Cada producto se secuenció en las dos direcciones utilizando el kit DYEnamic ET Dye Terminator Kit (Amersham Biosciences, Sunnyvale, CA, USA) con las cantidades apropiadas de cada oligonucleótido y DNA templado, de acuerdo a las indicaciones del fabricante. Se utilizó el secuenciador MegaBACE™ DNA Analysis System (Amersham Biosciences, CA, USA). Todas las reacciones de secuenciación fueron llevadas a cabo en BioMol Ltda. (Bogotá, Colombia).

5.7.3 Determinación de la secuencia esperada por PCR del gen *actA*

Con el fin de tener una base de comparación para la revisión y corrección de secuencias de ADN, se utilizaron secuencias previamente reportadas para predecir la secuencia esperada mediante la amplificación del fragmento del gen *actA*.

5.7.3.1 Obtención de la secuencia del genoma de *L. monocytogenes*

El genoma de *L. monocytogenes* ya se encuentra totalmente secuenciado, y está disponible en la base de datos GenBank (http://ncbi.nlm.nih.gov/Genbank/index.html).

Se tomaron dos genomas de *L. monocytogenes* como referencia:

- *Listeria monocytogenes* cepa 4b F2365, Numero de acceso GenBank: NC_002973
- *Listeria monocytogenes* cepa EGD-e, Numero de acceso GenBank: NC_003210

5.7.3.2 Obtención de la secuencia del gen *actA*

Se tomó la secuencia completa del gen *actA* de *L. monocytogenes* depositada en GenBank, con numero de acceso DQ054585.

5.7.3.3 Ubicación del gen *actA* en las secuencias de referencia *L. monocytogenes* EGD-e y 4b

Utilizando la herramienta Blast 2 Sequences de NCBI (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/bl2seq/wblast2.cgi) se alineó cada cepa de referencia con la secuencia del gen *actA* con el fin de determinar la ubicación del gen dentro de cada cepa. Se anotaron las posiciones en el genoma y luego se alinearon estos fragmentos con la secuencia de los oligonucleotidos, con el fin de extraer el fragmento que se esperaba amplificar por PCR.

5.7.3.4 Construcción del mapa plantilla del fragmento esperado de PCR

Una vez se obtuvo el fragmento esperado dentro de cada cepa, se construyó un mapa con la herramienta GCG-Lite - DNA Sequence Analysis (National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA) con el respectivo marco de lectura. De esta forma se pudieron predecir las regiones de polimorfismo dentro del fragmento obtenido por PCR.

5.7.4 Análisis de Secuencias y obtención de secuencia consenso

Se obtuvieron las secuencias directo y reverso para el extremo 3' del gen *actA* de cada aislamiento. Se analizaron los cromatogramas utilizando el programa ChromasPro v1.33 (Technelysium Pty Ltd, Helensvale, Australia) y se corrigieron ensamblando las secuencias directo y reverso. El cromatograma, la traducción a proteína y la secuencia esperada de referencia se tuvieron en cuenta para la corrección. Utilizando el programa BioEdit v. 7.0.5.3 (Hall, 1999) se obtuvo una secuencia consenso corregida para cada aislamiento (excepto LMO187, la cual tuvo que descartarse). Cada secuencia consenso fue sometida a BlastX, con el fin de verificar que no hubieran errores en la secuencia de proteína y que efectivamente correspondía a *L. monocytogenes* gen *actA*. Estas secuencias fueron depositadas en GenBank, con los números de acceso [EF012651-EF012652, EF012658-EF012664, EF012666-EF012671, EF012678- EF012699].

5.8 Análisis Filogenético

5.8.1 Obtención de secuencias previamente reportadas

Se obtuvieron las 15 secuencias del gen *actA* previamente reportadas por Cai et al. (2002), las cuales se encuentran disponibles en la base de datos GenBank. En la Tabla 4 se muestran las secuencias obtenidas, con el respectivo número de acceso.

Tabla 4.

Secuencias de *L. monocytogenes* previamente reportadas utilizadas en este estudio.

GenBank Numero de Acceso	**Cepa**	**Origen**	**Linaje**
AF497169	FSLc1117	Humano	II
AF497170	FSLw1110	Desconocido	III
AF497171	FSLw1111	Desconocido	III
AF497172	FSLj1022	Humano	II
AF497173	FSLj1038	Humano	I
AF497174	FSLj2039	Pavo	I
AF497175	FSLj2045	Oveja	I
AF497176	FSLj1047	Humano	II
AF497177	FSLj1051	Humano	I
AF497178	FSLj1158	Cabra	III
AF497179	FSLj2003	Vaca	II
AF497180	FSLj2017	Vaca	II
AF497181	FSLj2064	Vaca	I
AF497182	FSLj2068	Caballo	III
AF497183	FSLx1002	Alimento	III

5.8.2 Alineamiento de Secuencias y Análisis Filogenético

Se alinearon las 37 secuencias de amino ácidos obtenidas para el extremo 3' del gen *actA* con las 15 secuencias reportadas por Cai et al. (2002) utilizando el programa ClustalX v1.81 (Thompson, Gibson, Plewniak, Jeanmougin, & Higgins, 1997). Se construyeron árboles filogenéticos (bootstrap neighbor-joining method) utilizando N (Numero de permutaciones) = 1000 que emplea el algoritmo descrito por Saitou y Nei, 1987 y un método para estimar valores de confianza para el agrupamiento de un árbol. El árbol se visualizó con el programa MEGA 3.1 (Kumar, Tamura & Kai, 2004).

Igualmente, se alinearon las secuencias de DNA de los aislamientos analizados y las secuencias reportadas por Cai *et al* (2002) utilizando ClustalX. El programa DnaSP v 4.10.8 (Rozas & Rozas, 1999**;** Rozas, Sánchez, Messeguer & Rozas, 2003) se utilizó para realizar análisis del alineamiento de DNA incluyendo diversidad haplotidica (Hd), diversidad nucleotidica Pi (π) y theta (θ) (Nei, 1987). La prueba D de Tajima (Tajima, 1989), se utilizó para inferir selección natural a partir de los datos de polimorfismo de DNA, y también se calcularon los índices D y F de Fu y Li (Fu & Li, 1993). Se estimó la varianza entre los tres linajes calculando los valores Fst (Índice de Fijación) (Hudson, Slatkin & Maddison, 1992). Adicionalmente se utilizó el método coalescente para detectar recombinación empleando el programa LDHat v2.0 (McVean, Awadalla & Fearnhead, 2001), calculando el estimador de recombinación ρ (Rho) y el de diversidad θ para cada linaje y se construyó una red para inferir filogenia y buscar evidencia de recombinación mediante el programa Network v4.2 (Bandelt, Forster & Rholf, 1999) a partir del alineamiento de DNA.

6. RESULTADOS Y DISCUSION

6.1 Extracción y Cuantificación de ADN

Como se mencionó anteriormente, se empleó la razón A_{260nm}/A_{280nm} para estimar la pureza del DNA. Los ácidos nucleicos tienen su pico de absorbancia a 260 nm, con una razón 260/280 de 1.8 para el DNA, lo cual indica un alto grado de limpieza y bajo contenido proteico (University of Pennsylvania, Template Preparation and Purification, 2006). En general, la razon A_{260nm}/A_{280nm} osciló entre 1.7 y 1.8 para todas las extracciones (datos no mostrados), lo cual refleja un bajo contenido proteico. Todas las extracciones que arrojaron un valor por debajo de 1.7 para esta relación fueron descartadas y se repitieron.

6.2 Amplificación Azarosa de ADN Polimórfico-RAPD

6.2.1 Reacción de RAPD

De acuerdo a la metodología descrita en la sección de materiales y métodos, se encontró que la calidad y cantidad del ADN es fundamental para obtener patrones de bandeo de RAPD reproducibles, ya que la presencia de altas cantidades de proteína o cantidades inferiores a 25ng de ADN en las reacciones puede alterar drásticamente la resolución de las bandas obtenidas. Por esta razón, una estandarización previa de la técnica con una cantidad y calidad específica de ADN, asegura la reproducibilidad de las reacciones.

Se obtuvieron bandas claras y reproducibles en los 38 aislamientos analizados, por los dos oligonucleótidos empleados. La reproducibilidad de las reacciones de RAPD se evaluó realizando dos ensayos independientes para cada aislamiento y cada oligonucleótido y solamente se tuvieron en cuenta aquellas bandas que se presentaron consistentemente en las dos reacciones independientes con intensidad clara. No se detectaron productos de amplificación en los controles negativos, lo que confirma la ausencia de contaminaciones. La figura 12 muestra algunos de los patrones de RAPD de aislamientos de alimentos y plantas de alimentos y la figura 13 de alimentos y muestras clínicas, utilizando los dos oligonucleótidos.

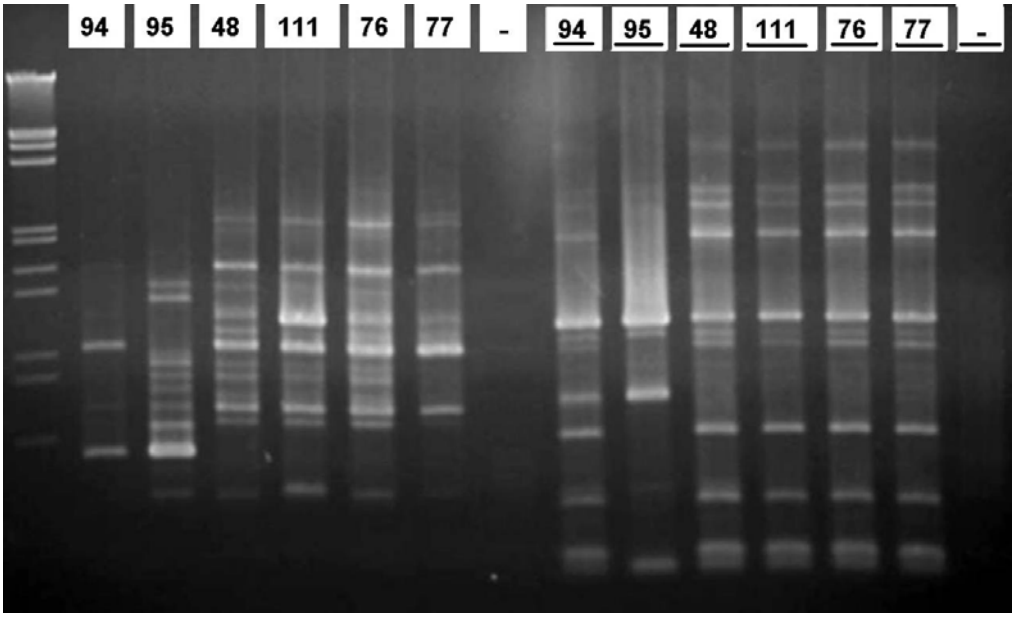


Figura 12. Patrones de RAPD de aislamientos de *L. monocytogenes* de muestras de alimentos y plantas de alimentos. **Carril 1:** Marcador de peso molecular, Digerido de fago λ con EcoRI+HindIII (Promega). **Carriles 2-8:** Oligonucleótido HLWL-74 **Carriles 9-14:** Oligonucleótido Arbitrario.

Nota: Los números corresponden a los códigos de las cepas, el signo – indica el control negativo.

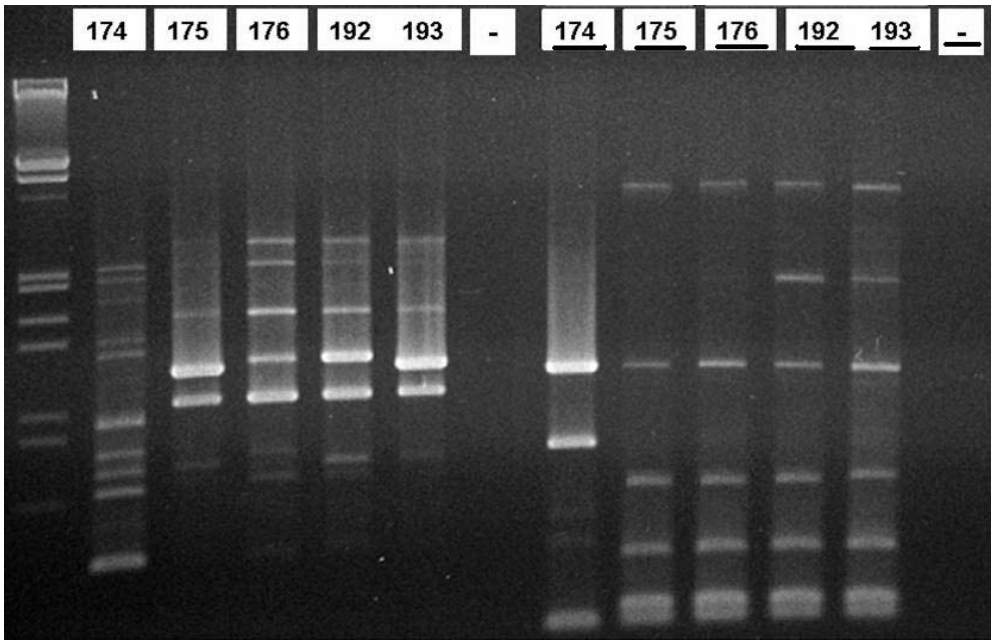


Figura 13. Patrones de RAPD de aislamientos de *L. monocytogenes* de muestras clinicas y de alimentos. **Carril 1:** Marcador de peso molecular, Digerido de fago λ con EcoRI+HindIII (Promega). **Carriles 2-6:** Oligonucleótido HLWL-74 **Carriles 8-12:** Oligonucleótido Arbitrario.

Nota: Los números corresponden a los códigos de las cepas, el signo – indica el control negativo

Con el oligonucleótido HLWL-74 se obtuvieron 11 bandas claras y reproducibles donde 9 (81,81% polimorfismo), bandas fueron altamente polimórficas entre los aislamientos analizados.
Con el oligonucleótido arbitrario se obtuvieron 14 bandas de las cuales 12 (85,71% polimorfismo) fueron altamente polimórficas. Se observó una gran diversidad de los patrones de bandeo de las cepas analizadas, lo cual puede reflejar variaciones a nivel genético y por consiguiente puede representar cambios en las características fenotípicas y/o ecológicas de las bacterias. Debido a la alta diversidad de las cepas analizadas, no fue posible determinar una relación directa entre las cepas circulantes en alimentos y las cepas clínicas.

6.2.2 Caracterización molecular por RAPD

Con el oligonucleótido HLWL-74, se observaron dos linajes superiores (I y II) y los 38 aislamientos formaron un total de 20 grupos menores. El Linaje I agrupó 35 aislamientos y se subdividió en dos grupos: A, el cual a su vez se dividió en dos grupos menores (1 y 2) y B, el cual se dividió en dos grupos menores (3 y 4) (Figura 14). Todos los aislamientos clínicos, exceptuando LMO 172 se agruparon bajo este linaje. Los aislamientos de origen alimentario se encontraron en su mayoría en el sub-grupo 1, exceptuando las cepas LMO95, LMO174, LMO6 y LMO7 las cuales no presentaron una relación específica de origen (peto de operaria, pollo, leche y queso respectivamente). El sub-grupo 2 está formado exclusivamente por cepas de origen clínico, agrupándose 14 de los 22 (63,64%) aislamientos clínicos analizados y el sub-grupo 3 está formado por un aislamiento de origen ambiental (LMO95) y uno alimento (LMO174, pollo).

El linaje II agrupó 3 aislamientos y se subdividió en dos grupos: C (LMO6 y LMO7 aislados de lácteos) y D (aislamiento LMO 172 de tejido de pie infectado), los cuales presentaron un porcentaje de disimilitud del 75% de disimilitud con respecto a los otros aislamientos.

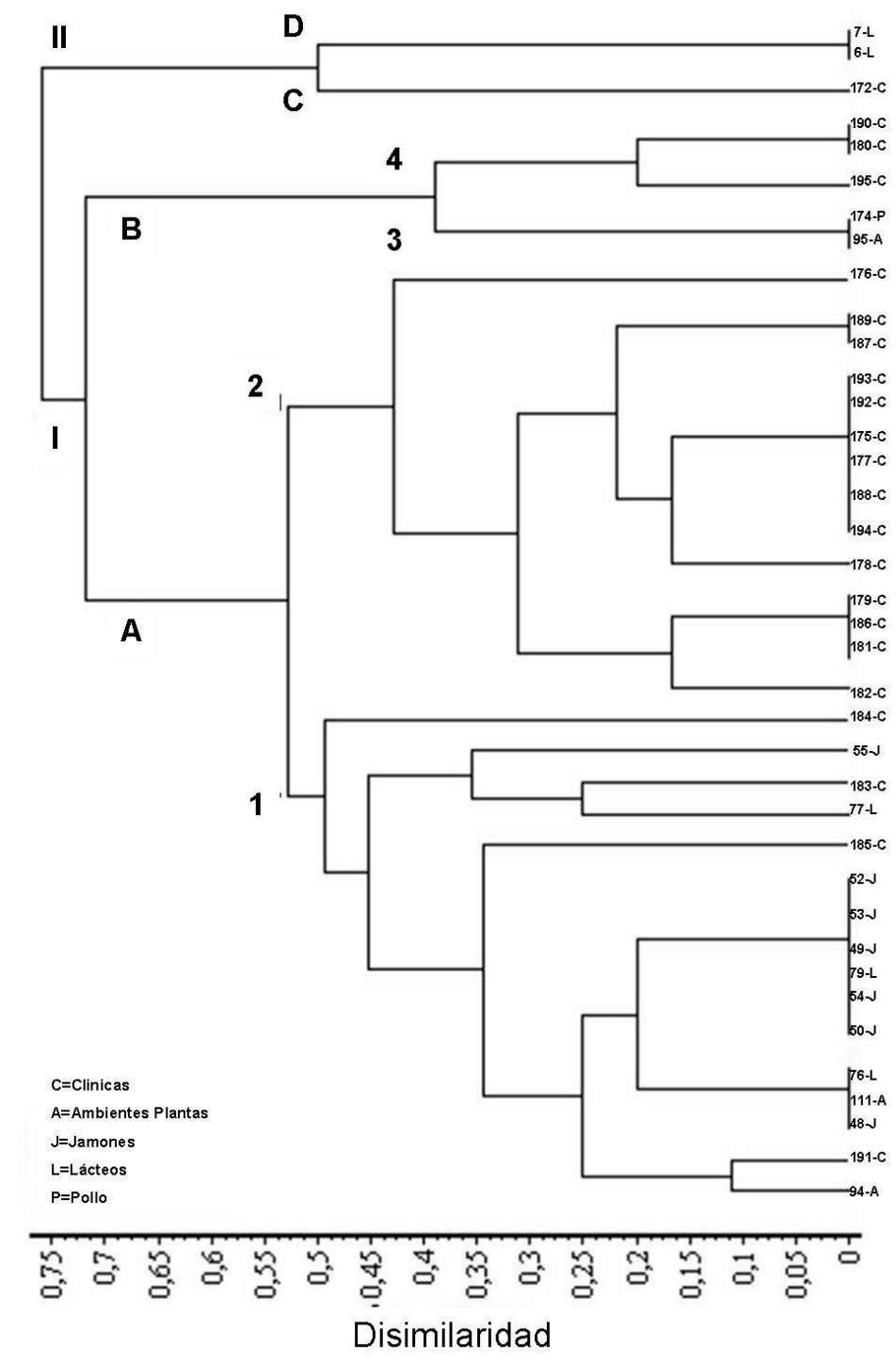


Figura 14. Dendrograma de 38 cepas de *L. monocytogenes* analizadas por RAPD utilizando el oligonucleótido HLWL-74. El numero corresponde al código del aislamiento y la letra al origen (p.e, 7-L corresponde a LMO7 de Lácteo).

Con el oligonucleótido arbitrario, se observaron dos linajes superiores (I y II) y los 38 aislamientos formaron un total de 19 grupos menores. El Linaje I agrupó 32 aislamientos y se subdividió en dos grupos: A, el cual a su vez se dividió en dos grupos menores (1 y 2) y B, el cual se dividió en dos grupos menores (3 y 4) (Figura 15). La mayoría de los aislamientos clínicos, se agruparon bajo este linaje, pero con un menor porcentaje (77,27%) al observado con el oligonucleótido HLWL-74, encontrándose 15 de las 22 cepas clínicas bajo el sub-grupo 1 (68,18%), así como la mayoría de los aislamientos de origen alimentario. El sub-grupo 2 está formado exclusivamente por aislamientos de lácteos (LMO6 y LMO7), el aislamiento LMO174 es el único miembro del sub-grupo 4 y se encontró más cercanamente relacionado a los clínicos.

El linaje II agrupó 6 aislamientos y se subdividió en dos grupos: C, el cual se subdividió a su vez en 5 (formado exclusivamente por aislamientos clínicos, LMO191, LMO180, LMO185 y LMO190 y 6 (LMO174) y D (LMO176). Los seis aislamientos presentaron un 75% de disimilitud con respecto a los otros analizados.

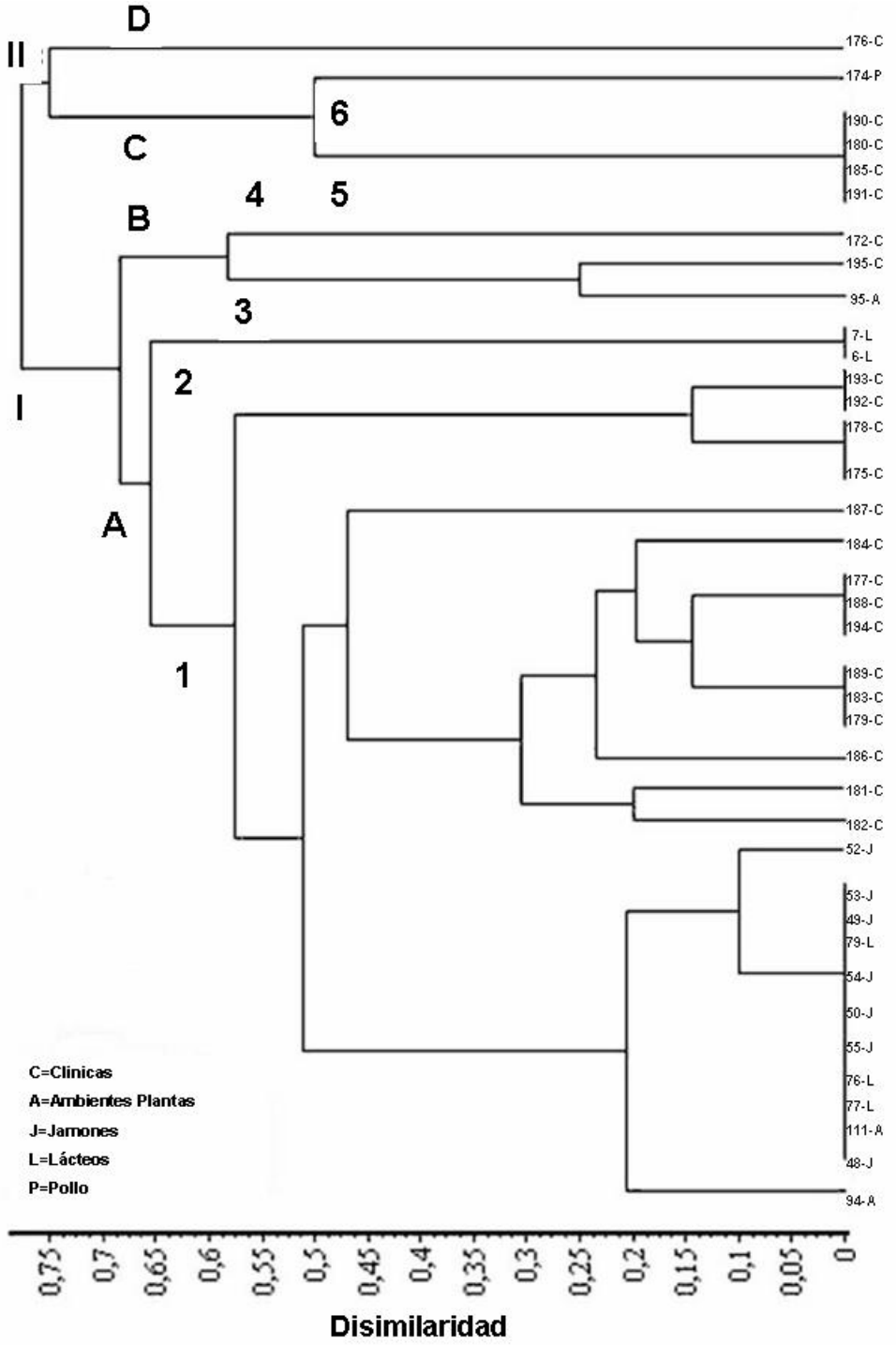


Figura 15. Dendrograma de 38 cepas de *L. monocytogenes* analizadas por RAPD utilizando el oligonucleótido arbitrario. El numero corresponde al código del aislamiento y la letra al origen (p.e, 7-L corresponde a LMO7 de Lácteo).

Los resultados del agrupamiento de las cepas clínicas obtenido en los dendrogramas obtenidos por ambos oligonucleótidos sugieren que éstas son genéticamente distintas a las cepas de alimentos, y por esta razón se agrupan más cercanamente entre sí que con las cepas de origen alimentario. Así, el sub-grupo 2 del dendrograma utilizando el oligonucleótido HLWL-74 está formado exclusivamente por cepas de origen clínico, agrupándose 14 de los 22 (63,64%) aislamientos clínicos analizados. De manera similar, 17 de los 22 (77,27%) aislamientos clínicos se encuentran dentro del linaje I dentro del dendrograma utilizando el oligonucleótido arbitrario. Este resultado es importante ya que según esto las cepas de *L. monocytogenes* que causan infección humana en Colombia son diferentes a las que contaminan los alimentos de acuerdo a sus tipos de RAPD. Entonces, ¿cual es el verdadero origen de la listeriosis en Colombia? Es difícil responder esta pregunta debido a que estos resultados deben ser considerados como preliminares y es necesario realizar estudios que involucren un mayor número de cepas y obtener aislamientos con relación epidemiológica. Sin embargo es importante tener en cuenta que debido al largo periodo de incubación de la bacteria es muy difícil realizar trazabilidad hasta el alimento una vez se detecta la listeriosis en un paciente (para un paciente es difícil recordar lo que comió con exactitud un mes o más tiempo atrás). Es por esto que el monitoreo constante en los alimentos y la tipificación de estos aislamientos puede ofrecer respuestas concretas, creando una base de comparación sólida entre los tipos clínicos y los de alimentos.

Los resultados obtenidos por RAPD muestran que existe diversidad molecular entre las cepas de *L. monocytogenes* presentes en plantas procesadoras de alimentos y alimentos y muestra una relación más lejana de las cepas clínicas, lo cual es visible con ambos oligonucleótidos. Estas diferencias a nivel molecular pueden reflejar diferencias adaptativas entre las distintas cepas y explicar aspectos como resistencia y características propias de cada cepa. La variabilidad genética entre aislamientos de *L. monocytogenes* de diferentes fuentes ha sido estimada por RAPD, particularmente en Noruega se realizó un estudio que comprendió 432 aislamientos de *L. monocytogenes* provenientes de alimentos, muestras clínicas humanas, de animales y ambientes de plantas procesadoras de alimentos con el fin de determinar las relaciones genéticas y la diversidad de las cepas (Martinez et al., 2003). Gracias al estudio se pudo determinar que una misma planta de alimentos poseía una gran variabilidad de cepas de *L. monocytogenes*, lo cual sugiere contaminación de diferentes orígenes y concuerda con los resultados de este estudio.

En cuanto a los aislamientos ambientales se encontró que cepas provenientes de una misma planta de alimentos poseen patrones de bandeo distintos, por lo tanto no fue posible establecer algún tipo de relación entre las mismas. Sin embargo, esta técnica puede ser útil para establecer puntos de contaminación cruzada entre las superficies de los equipos y los alimentos debido a la presencia de cepas con patrones específicos de RAPD en ambas fuentes (Aguado, Vitas & García-Jalon, 2004).

En comparación con otras técnicas, RAPD ha mostrado tener una alto poder discriminatorio, buena reproducibilidad y es menos costosa que otras técnicas empleadas para tipificación de patógenos, especialmente al compararlo con técnicas como ribotipificación, serotipificación, electroforesis enzimática multilocular, análisis por enzimas de restricción y fagotipificación (Boerling, Bannerman, Ischer, Rocourt & Bille, 1995). Adicionalmente, se ha demostrado que ciertos tipos de RAPD pueden tener características especificas (inherentes o adquiridas) que les permite persistir en el ambiente de procesamiento de alimentos (Wulff et al., 2006). Esta técnica también es útil para rastrear la dispersión de cepas de *L. monocytogenes* (Cocolin, Stella, Nappi, Bozetta, Cantoni & Comi, 2005). Por lo anterior y de acuerdo a los resultados obtenidos empleando esta técnica en este estudio RAPD es útil para estudiar la diversidad de aislamientos de *L. monocytogenes*.

La técnica de RAPD ha sido utilizada universalmente en estudios epidemiológicos de *L. monocytogenes* (Inoue et al., 2001) junto con otras técnicas como electroforesis en campo pulsado (PFGE-Pulsed Field Gel Electrophoresis) y polimorfismos en la longitud de fragmentos de restricción (RFLP-Restriction Fragment Length Polymorphisms) entre otras. Algunos autores reportan que la técnica de RAPD es de baja reproducibilidad, y por ende no debe ser utilizada en estudios de caracterización molecular (Penner et al., 1993; Wang, Wayne, Taricani, Buckinham & Sandham, 1993). Sin embargo, en este estudio se obtuvo una buena reproducibilidad (todos los aislamientos se analizaron 2 veces en reacciones independientes por cada oligonucleótido para asegurar la reproducibilidad en los patrones de bandeo y en ambas reacciones se obtuvieron patrones idénticos con pequeñas variaciones en la resolución de algunas bandas de muy baja intensidad que no se tuvieron en cuenta para la construcción de las matrices) lo cual asegura una mayor precisión en los resultados obtenidos y apoya los hallazgos reportados por otros autores (Lawrence & Gilmour, 1991; Yoshida et al., 1999; Dhanashree, Otta & Karunasagar, 2003). Esta técnica puede emplearse en futuros estudios para caracterizar molecularmente las cepas de *L. monocytogenes* circulantes tanto en alimentos como en clínica, que generen datos epidemiológicos que puedan ser

utilizados para profilaxis y control de la listeriosis. Es muy importante realizar estudios epidemiológicos acerca de *L. monocytogenes* ya que este patógeno puede convertirse en un problema serio de salud pública para nuestra población, especialmente debido a la entrada de nuevas cepas al país a través del Tratado de Libre Comercio (TLC). Con este tratado, se favorecerá la exportación de productos alimenticios a Estados Unidos, así como la importación de productos a Colombia. Al permitir el ingreso masivo de alimentos al país, se está permitiendo indirectamente la entrada de bacterias, dentro de las cuales podría encontrarse *L. monocytogenes*. Por lo tanto, esto podría convertirse en una fuente importante de variantes no nativas de esta bacteria, lo que podría favorecer el flujo genético entre cepas originando nuevas capacidades de virulencia y supervivencia. Es un hecho, que para poder exportar algunos productos alimenticios van a exigir la detección de patógenos de acuerdo al tipo de producto incluyendo *L. monocytogenes* y para efectos de control interno el seguimiento y trazabilidad de éste patógeno será fundamental. El empleo de técnicas de tipificación tales como RAPD permite realizar trazabilidad en la industria de alimentos desde la materia prima hasta el producto terminado, como una herramienta de aseguramiento de la calidad y por ende proteger la salud de los consumidores.

6.3 PCR gen *actA*

6.3.1 Amplificación de fragmento *actA* por PCR

Todos los aislamientos presentaron una banda de 827pb correspondiente a un fragmento del gen *actA* de *L. monocytogenes*, después de las reacciones de amplificación y también de las reacciones de limpieza del DNA. Todas las cepas utilizadas en este estudio se confirmaron como *Listeria monocytogenes* detectando el gen de virulencia *actA* (Figura 16).

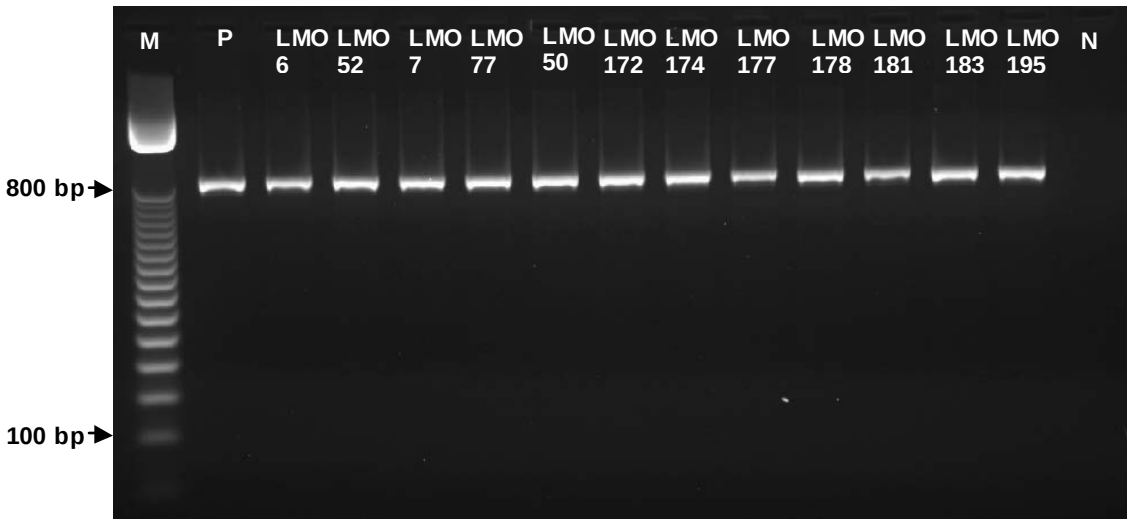


Figura 16. Amplificación del gen *actA* por PCR de aislamientos colombianos de *L. monocytogenes*. M: Marcador de peso molecular (50bp DNA Step Ladder, Promega Corporation); P: Control Positivo, *L. monocytogenes* ATCC 7644; N: Control negativo (Agua libre de nucleasa en vez de DNA).

6.4 Análisis Secuenciación de los Productos

6.4.1 Ubicación del gen *actA* y oligonucleotidos en las secuencias de referencia *L. monocytogenes* EGD-e y 4b

- En la cepa *L. monocytogenes* EGD-e, el gen *actA* está ubicado entre las posiciones 209488 y 211386. Los oligonucleótidos están ubicados en las siguientes posiciones: **Directo** 210745-210768 y **Reverso** 211551-211571. El símbolo * representa el fin del gen, codón de parada.
    - >gi|16802048:210745-211571 *Listeria monocytogenes* EGD-e, complete genome
    - **GCTGATTTAAGAGATAGAGGAACA**GGAAAACACTCAAGAAATGCGGGT
      TTTTTACCATTAAATCCGTTTGCTAGCAGCCCGGTTCCTTCGTTAAGTCCA
      AAGGTATCGAAAATAAGCGCACCGGCTCTGATAAGTGACATAACTAAAA
      AAACGCCATTTAAGAATCCATCACAGCCATTAAATGTGTTTAATAAAAAA
      ACTACAACGAAAACAGTGACTAAAAAACCAACCCCTGTAAAGACCGCAC
      CAAAGCTAGCAGAACTTCCTGCCACAAAACCACAAGAAACCGTACTTAG
      GGAAAATAAAACACCCTTTATAGAAAAACAAGCAGAAACAAACAAGCAG
      TCAATTAATATGCCGAGCCTACCAGTAATCCAAAAAGAAGCTACAGAGA
      GCGATAAAGAGGAAATGAAACCACAAACCGAGGAAAAAATGGTAGAGG
      AAAGCGAATCAGCTAATAACGCAAACGGAAAAAATCGTTCTGCTGGCAT
      TGAAGAAGGAAAACTAATTGCTAAAAGTGCAGAAGACGAAAAAGCGAA
      GGAAGAACCAGGGAACCATACGACGTTAATTCTTGCAATGTTAGCTATTG
      GCGTGTTCTCTTTAGGGGCGTTTATCAAAATTATTCAATTAAGAAAAAAT
      AATTAA*AAACACAGAACGAAAGAAAAAGTGAGGTGAATGATATGAAAT
      TCAAAAAGGTGGTTCTAGGTATGTGCTTGATCGCAAGTGTTCTAGTCTTTC
      CGGTAACGATAAAAGCAAATGCCTGTTGTGATGAATACTTACAAACACCC
      GCAGCTCCGCATGATATT**GACAGCAAATTACCACATAAA**

- En la cepa *L. monocytogenes* 4b, el gen *actA* está ubicado entre las posiciones 214849 y 216642. Los oligonucleótidos están ubicados en las siguientes posiciones: **Directo** 216001-216024 y **Reverso** 216807-216827. El símbolo * representa el fin del gen, codón de parada.
    - >gi|85700163:216001-216827 *Listeria monocytogenes* str. 4b F2365, complete genome
    - **GCTGATTTAAGAGATAGAGGAACA**GGAAAACACTCAAGAAATGCGGGT TTTTTACCATTAAATCCGTTTACTAGCAGCCCGGTTCCTTCGTTAAGTCCA AAGGTATCGAAAATAAGCGCGCCGGCTCTGATAACTGACATAACTAAAA AAGCACCATTTAAAAATCCGCCACAGCCATTAAATGTGTTTAACAAAAAA ACTACAACGAAAACAGCACCAAAAAAAATAACCCCTGTGAATACCGCGC CAAAGCTAGCAGCACTTCCTATCACGAAAGCGCAAGAAACTGCGCTTGG GGAAAATAAAGCACCATTTATAGAAAAACAAGCAGAGACAAACAATCGG CCAATTGATATGCCGAGCCTACCAGTAATCCAAAAAGAAGTTACAGAAA GAAATAAAGAGGAAATGAAACCGCAAACCGAGGAAAAAGTGGTAGGAG AAAGCGAACCAGCTAATAATGTGAACGGAAAAAAACGTTCTGCTGGCAT TGAAGAAGGAAAATTAATTGCTAAAAGTGCAGAAGACGAAAAAGCAAA AGAAGAACCAGTGAACCATACGACGTTAATTCTTGCCATGTTAGCTATTG GCGTGTTCTCTTTAGGAGCGGTTATCAAAATCATTCAATTAAGAAAAAAT AGTT*GAAGACGCAGAATGAAAGAAAAAGTGAGGTGAGTGATGTGAAGT TCAAAAAAGTGGTTCTAGGTATGTGCTTGACCGCAAGTGTTCTAGTCTTTC CTGTAACGATAAAAGCAAGTGCCTGTTGTGATGAATATCTAAAGCCCCCC GCAGCTCCGCATGATATT**GACAGCAAATTACCGCATAAA**

6.4.2 Construcción del mapa plantilla del fragmento esperado de PCR

En la figura 17 se muestra el mapa plantilla para cada cepa secuenciada de referencia. Los aminoácidos polimórficos (determinados por diferencias en aminoácidos entre las dos cepas) se encuentran en color verde. El oligonucleótido reverso esta en morado. En estos sitios se esperaba encontrar polimorfismo entre los aislamientos de *L. monocytogenes* analizados en este estudio. Con ayuda de este mapa, se pudieron corregir los cromatogramas de ADN obtenidos para los aislamientos.

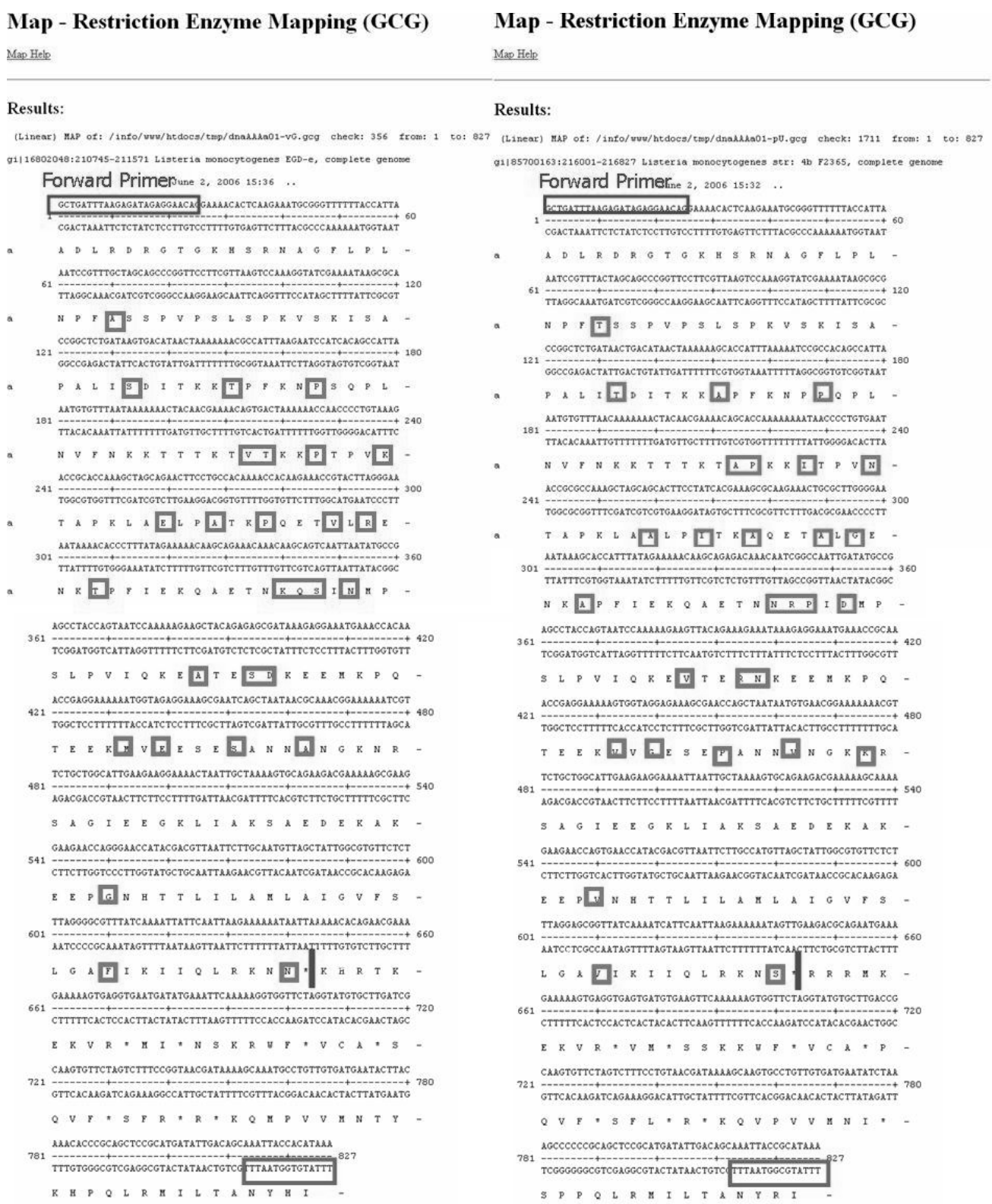


Figura 17. Mapa plantilla del fragmento del gen *actA* para las cepas de referencia *L. monocytogenes* EGD-e (Izquierda) y 4b (Derecha).

Para cada producto, se obtuvieron dos secuencias correspondientes a cada oligonucleótido, es decir se obtuvieron secuencias en dos sentidos; los cromatogramas fueron visualizados y corregidos con el programa ChromasPro v1.33, visualizando no solamente la secuencia en nucleótidos, sino también la secuencia en aminoácidos. En general se obtuvo una buena calidad de las secuencias de ADN ya que los picos de intensidad en los cromatogramas fueron bastante claros. Todas las secuencias requirieron corrección de errores pequeños como el que se ilustra en la figura 18, donde se puede observar la presencia de una timina (T) cuando la adenina (A) es la base que tiene una mayor señal. En este caso se eliminó la timina verificando que el código de aminoácidos concordara con la secuencia esperada de acuerdo al mapa plantilla construido con las cepas de referencia.

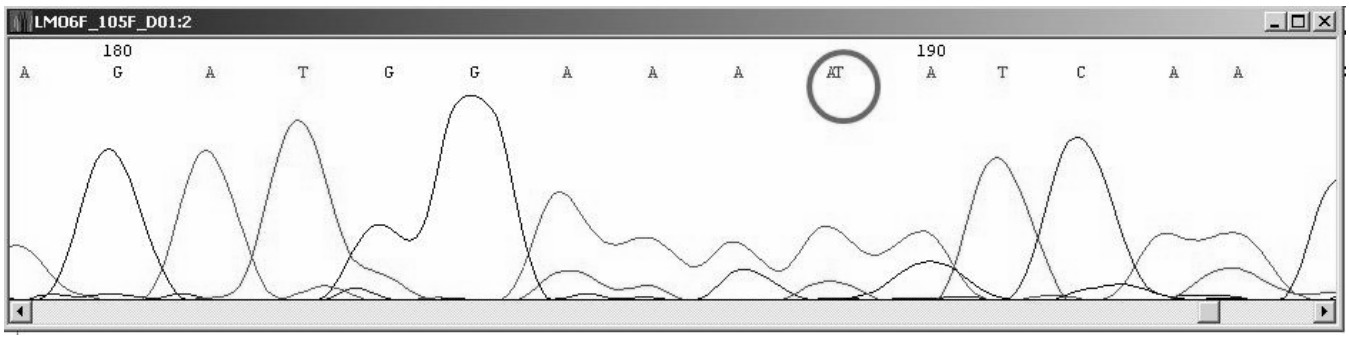


Figura 18. Cromatograma del aislamiento LMO6, utilizando el oligonucleótido 01 (Forward).

Un buen análisis filogenético basado en secuenciación depende de la calidad de los productos de secuenciación que se obtengan, por lo tanto es fundamental construir un mapa plantilla de la secuencia que se espera. Durante el proceso de secuenciación el software del secuenciador asigna las bases de acuerdo a los picos de fluorescencia. En principio se asume que las bases se asignan a intervalos regulares, pero a veces las bases son asignadas muy pronto o no son asignadas. Esto da origen a inserciones y/o deleciones (INDEL) fantasmas, lo cual va a interferir significativamente en el alineamiento y en el análisis filogenético (Attwood & Parry, 2002). Con ayuda del mapa plantilla se pueden realizar las correcciones pertinentes en las secuencias sin introducir errores arbitrarios, codones de parada inexistentes o alterar significativamente la secuencia proteínica.

6.4.3 Análisis de Secuencias y obtención de secuencia consenso

Se obtuvieron un total de 37 secuencias consenso, debido a que las secuencias del aislamiento LMO187 (clínico) tenían muy baja calidad y por tal razón tuvieron que ser descartadas. Las

secuencias consenso fueron traducidas a proteína para realizar los análisis filogenéticos (Ver Anexo 1).

6.4.4 Análisis Filogenético

Se construyó un árbol filogenético empleando la técnica Bootstrap Neighbor-Joining con las secuencias proteícas del extremo 3' de los 37 aislamientos Colombianos de *L. monocytogenes* y las 15 secuencias previamente reportadas por Cai *et al.* (2002). Se encontraron tres linajes evolutivos lo que coincide con lo reportado en la literatura (Rasmussen et al., 1995; Wiedmann et al., 1997; Zhou et al., 2005; Zhou & Jiao, 2005) (Figura 19).

Respecto al linaje I, se encontró una distribución distinta de las cepas colombianas según los reportes en la literatura. El linaje I contiene principalmente aislamientos epidémicos donde los serotipos 1/2a, 1/2b y 4b son responsables por el 98% de los casos documentados de listeriosis, siendo el 4b el más común (Wiedmann, 2002; Liu et al., 2005) y los serotipos 1/2a y 1/2b están asociados a alimentos (Gilbreth et al., 2005). Inesperadamente, 30 de los 37 aislamientos analizados en este estudio se encontraron dentro de este linaje, de los cuales 19 fueron identificados como serotipo 4b, 6 fueron serotipo 4a, 1 serotipo 3b y 1 serotipo 4e. Respecto al origen de las cepas, el 76.19% de los aislamientos humanos (16/21), 92.31% de los aislamientos de alimentos (12/13) y el 66.66% de los aislamientos de plantas procesadoras (2/3) se encontraron dentro del linaje I. El único aislamiento de alimento que no se agrupó dentro de este linaje fue LMO174, proveniente de pollo crudo, a diferencia de todos los aislamientos de lácteos y productos cárnicos. Esta distribución atípica de los aislamientos humanos es un hallazgo muy importante ya que a pesar de encontrarse las divisiones filogenéticas previamente reportadas, un alto porcentaje de asilamientos humanos se clasifican dentro del linaje de cepas epidémicas, incluso las cepas de alimentos contrario a los reportes de la literatura.

Solamente 7 aislamientos se agruparon dentro del linaje II, el cual contiene solamente un aislamiento de alimento (LMO174, pollo), cinco aislamientos clínicos (LMO180, líquido cefalorraquídeo; LMO185 líquido cefalorraquídeo, LMO190, líquido pleural; LMO191, hemocultivo y LMO195, materia fecal, así como uno de planta procesadora (LMO95) aislado de un peto de una operaria. Esto representa el 18.91% (7/37) de las cepas colombianas estudiadas. Varios autores han reportado que el linaje II contiene principalmente aislamientos de alimentos;

particularmente el 60% de los aislamientos de alimentos de Estados Unidos pertenecen a este linaje (Wiedmann et al., 1997; Wiedmann, 2002, Zhou & Jiao, 2005). Sin embargo, solamente 1 de los 13 aislamientos colombianos de alimentos (7.69%) pertenecen a este linaje lo cual refleja una distribución distinta a la descrita previamente. En cuanto a los serotipos de las cepas analizadas dentro de este linaje, los resultados concuerdan con lo reportado en la literatura, ya que este linaje comprende principalmente aislamientos de los serotipos 1/2a, 1/2c y 3a (Nadon, Woodward, Young, Rodgers & Wiedmann, 2001) y todas las cepas del serotipo 1/2a se agruparon dentro del linaje II.

Ninguna de las cepas colombianas perteneció al linaje III. Estudios previos sugieren que las cepas agrupadas dentro del linaje III son poco comunes en los asilamientos de alimentos, tienen varias características fenotípicas atípicas y ribotipos únicos, pero representan aproximadamente el 15% de los aislamientos clínicos de animales (Cai et al., 2002; Jeffers et al., 2001; Roberts et al., 2006). Por lo anterior, se podría explicar que ninguno de los aislamientos analizados se encontrara dentro de este linaje, debido a que estas cepas son poco comunes y a que no se incluyeron aislamientos de animales en este estudio. Este linaje comprende principalmente cepas de los serotipos 4a y 4c pero contrario a lo descrito en la literatura, ninguna de las siete cepas Colombianas con serotipo 4a se agruparon dentro de este linaje; la mayoría (6) se agruparon en el linaje I. Nuevamente, esto refleja una distribución distinta de *L. monocytogenes* en Colombia.

Zhang et al. (2003) encontró que las filogenias inferidas empleando métodos de alta y baja resolución así como multiloculares y genómicos son concordantes, ya que los tres linajes se han descrito por diversas técnicas lo cual apoya los resultados obtenidos en este estudio. Los resultados obtenidos a partir de la secuenciación parcial del gen *actA* sugieren que las cepas colombianas de *L. monocytogenes* pueden tener una distribución diferente y aunque la estructura filogenética sigue las descripciones previas una gran mayoría de cepas se agruparon dentro del linaje I, el cual según varios autores contiene cepas relacionadas a listeriosis humana. Los serotipos más comunes de este linaje son los 1/2b, 3b, 3c y 4b (Nightingale et al., 2005) y 19 de los aislamientos analizados pertenecen al serotipo 4b. Estos hallazgos sugieren una prevalencia de este serotipo en nuestro medio, especialmente porque se seleccionaron las cepas aleatoriamente y las reacciones de serotipificación se realizaron hacia el final del estudio.

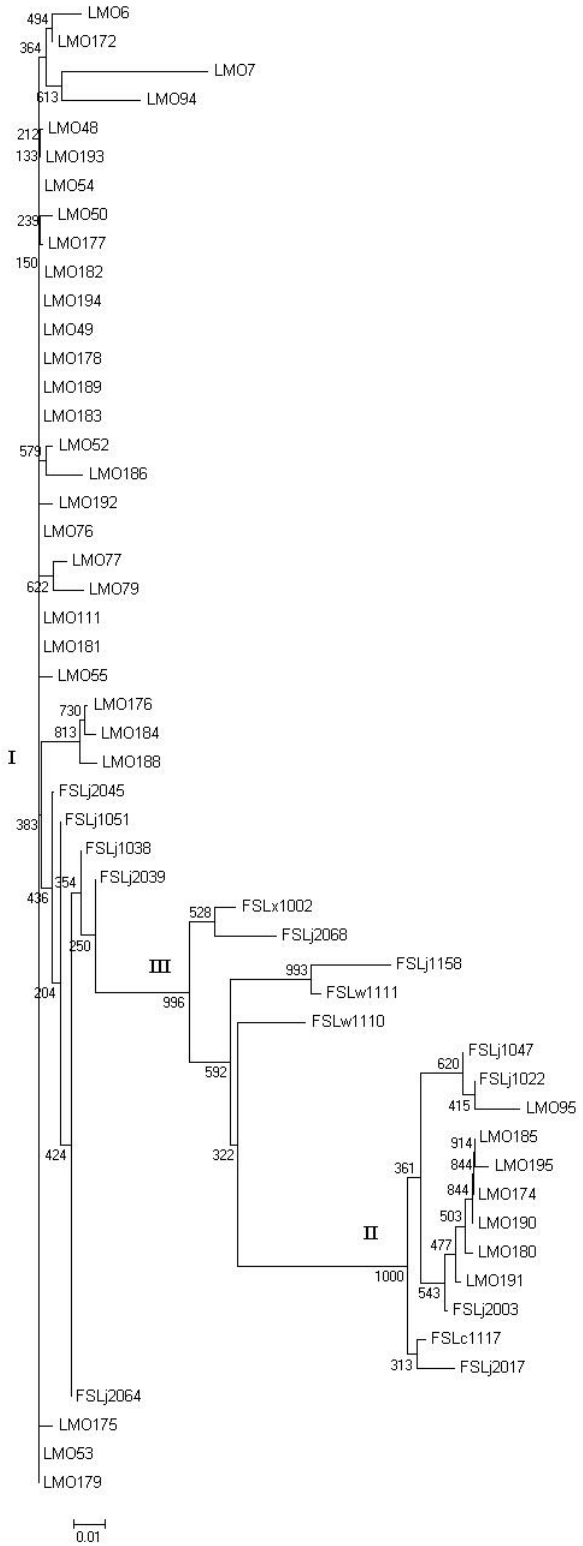


Figura 19. Árbol filogenético de 37 aislamientos colombianos de *L. monocytogenes*. Los códigos de los aislamientos corresponden a la tabla 1 y las designaciones F corresponden a las de Cai et al.., 2002 (Ejemplo, FSLj047 corresponde a una secuencia de dicho aislamiento reportada por Cai et al., (2002). El árbol se construyó con base en N=1000 permutaciones.

Se ha reportado previamente que puede existir una relación entre la distribución de linajes de *L. monocytogenes* de acuerdo a la región geográfica, en un estudio realizado en Estados Unidos que involucró 647 aislamientos de *L. monocytogenes* obtenidas de casos de listeriosis humana se encontró que los aislamientos pertenecientes a los linajes I y II fueron significativamente más comunes en la ciudad de New York y Ohio, que en Michigan y el estado de New York (Sauders et al., 2006). Esto resalta la importancia de realizar estudios que involucren un alto número de aislamientos obtenidos de diferentes regiones del país, con el fin de determinar si en Colombia existe una distribución específica de *L. monocytogenes* por regiones de acuerdo a los linajes evolutivos y comprender la distribución de esta bacteria en nuestro país.

6.4.5 Análisis del alineamiento de ADN

El análisis de polimorfismo de ADN reveló 37 haplotipos (entendido como tipos de secuencias de ADN) con Hd=0,954 (σ_{Hd}: 0,00049 and σ^2_{Hd}=0,022) lo cual refleja el alto polimorfismo dentro del fragmento del gen *actA* secuenciado y alineado. Este polimorfismo también está apoyado por los parámetros de diversidad estimados π y θ (A partir de S, numero de sitios segregantes) (Nei, 1987) (π(S)=0,04905 y θ(S)= 0,04905). La diversidad haplotídica notoriamente alta sugiere que los aislamientos analizados constituyen un grupo altamente diverso, lo cual apoya los resultados obtenidos por RAPD donde se evidenció una gran diversidad. Nightingale et al (2005) estableció que la diversidad nucleotídica más alta entre los genes evaluados en su estudio fue para los genes *actA, ribC* y *purM* los cuales presentaron π(S)= >0.05, lo que concuerda con los resultados de este estudio, donde los valores π(S) y θ(S) fueron muy cercanos a 0.05.

Por otra parte, la prueba de neutralidad muestra que la presión de selección natural es neutral, debido a que los valores D de Tajima (D=-0.55399) y D de Fu y Li (D=-1.44119) así como el valor F de Fu y Li (F=-1.32148) no fueron estadísticamente significativos (P>0.10). Estos resultados coinciden con los obtenidos previamente los que se sugiere que el gen *actA* efectivamente evoluciona de manera neutral (Nightingale et al., 2005). La red construida con Network v4.2 confirmó la estructura filogenética altamente definida de los tres linajes y evidenció recombinación (flujo genético) lo cual es visible como la red entre los aislamientos del linaje I. No se evidenció flujo genético dentro de los linajes II y III, ni tampoco entre miembros pertenecientes a linajes

diferentes. (Figura 20). Como se observa en la figura 20, hay varios caminos para llegar a un aislamiento lo que evidencia la recombinación existente entre los aislamientos del linaje I analizados.

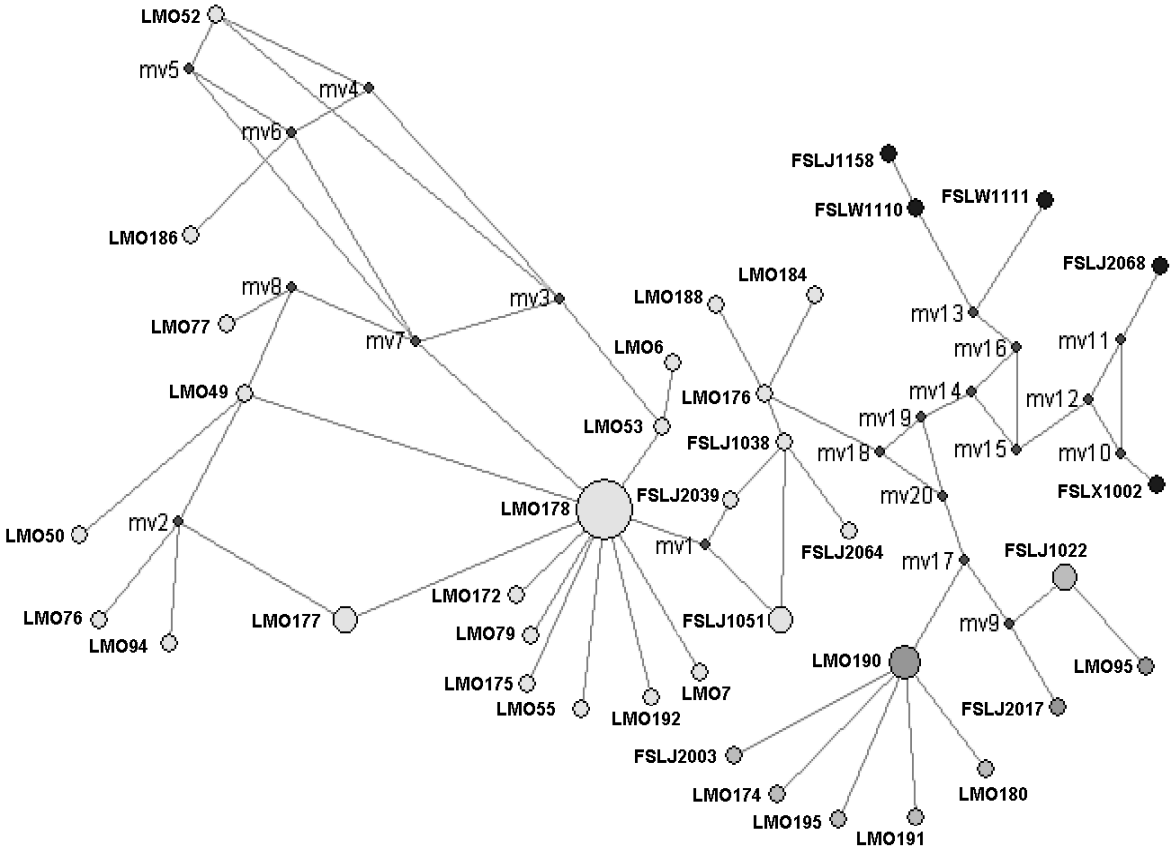


Figura 20. Red Filogenética de aislamientos colombianos y previamente secuenciados de *Listeria monocytogenes* empleando el programa Network v4.2 . El linaje I está en color amarillo, linaje II en verde y linaje III en azul, en rojo se presentan los pasos mutacionales. Dentro de los miembros del linaje I se observa una red inter-conectada que une a los aislamientos a partir de diferentes caminos de recombinación. Solamente algunos aislamientos se muestran para visualizar con mayor facilidad (Los círculos más grandes representan varios aislamientos).

En cuanto al análisis de polimorfismo de aminoácidos se encontraron 49 sitios polimórficos en un total de 202 aminoácidos comparados entre las secuencias alineadas. Esto representa un polimorfismo del 19.80%. Este porcentaje es similar al reportado por Cai et al. (2002) para este gen, quien reportó que el gen *actA* posee la mayor variabilidad de secuencia con un 14.3% de polimorfismo. Estos resultados sugieren un grupo de cepas colombianas de *L. monocytogenes*

altamente recombinante y diverso que puede ser clasificado en al menos dos líneas evolutivas donde se encuentran varias agrupaciones dentro de un mismo linaje.

Respecto a la comparación de los tres linajes, todos los valores Fst se encontraron por encima de 0.5 lo que refleja un flujo genético bajo o indetectable (Tabla 5) entre miembros pertenecientes a linajes diferentes. Estos valores varían entre 0 (no hay aislamiento genético entre las poblaciones) y 1 (hay un total aislamiento genético entre las poblaciones) (DeSalle et al, 2001). Se calculó igualmente la D de Tajima y la diversidad haplotídica (Hd) individualmente para cada linaje, junto con los estimadores θ y ρ (Tabla 6). Se encontró que para cada linaje existe una alta diversidad y podría haber una presión de selección no neutral entre los miembros del linaje I (D de Tarima estadísticamente significativa).

Tabla 5. Valores Fst para las comparaciones pareadas de los tres linajes de *Listeria monocytogenes*.

Clado 1	Clado 2	Fst
Linaje III	Linaje II	0.72185
Linaje III	Linaje I	0.56689
Linaje II	Linaje I	0.90428

Tabla 6. Valores de Diversidad Haplotídica, θ, Recombinación (ρ) y D de Tajima para cada linaje.

LINAJE	Hd	D de Tajima	θ	ρ
I	0.921	-2.11855 (S)	0.019484	0.04084967 (S)
II	0.939	-0.12163 (NS)	0.01082	1.6339×10^{-7} (NS)
III	1.000	0.44863 (NS)	0.04627	1.6339×10^{-7} (NS)

S: Estadísticamente significativa $P \leq 0.05$

NS: Estadísticamente no significativa $P > 0.05$

Los valores de Fst calculados se utilizaron para estimar la varianza genética entre los tres linajes los cuales evidenciaron tres grupos genéticamente aislados con poco o ningún flujo genético, lo que coincide con los resultados de la red filogenética. Se encontró una estructura genética altamente

definida dentro de los aislamientos de *L. monocytogenes* analizados. Los altos valores Fst son especialmente interesantes ya que usualmente se obtienen estos valores al comparar diferentes especies o sub-especies. Por lo tanto, surge la inquietud si realmente estos tres linajes pertenecen a una misma especie o son líneas evolutivas tan diferenciadas que deberían considerarse especies o sub-especies distintas. Sin embargo, esto es tan solo una hipótesis que debe ser evaluada utilizando análisis exhaustivos que involucren diferentes técnicas y un mayor número de cepas que aporten evidencia mediante la secuenciación de otros genes. En cuanto al análisis de recombinación, concuerda con los resultados obtenidos en la red filogenética ya que solamente se encontró evidencia de flujo genético estadísticamente significativa entre los miembros del linaje I. No se evidenció flujo genético entre los miembros de los otros dos linajes estudiados.

En general estos resultados sugieren que las cepas colombianas de *L. monocyotgenes* pueden tener un alto potencial epidémico: se sabe que las cepas serotipo 4b causan mas del 50% de los casos de listeriosis a nivel mundial (Schuchat et al., 1991) y el 54.05% (20/37) de las cepas analizadas fueron identificadas como serotipo 4b. Adicionalmente, el linaje I contiene principalmente aislamientos epidémicos y el 81.08% (30/37) de los aislamientos analizados fueron agrupados dentro de este linaje. Esta hipótesis está apoyada por el estudio realizado por Sauders et al., (2006) el cual reveló que aunque los casos de listeriosis son causados por un grupo diverso de ribotipos de acuerdo a la enzima *EcoRI*, específicamente los clones del linaje I causan un mayor número de casos de listeriosis que los pertenecientes a los otros dos linajes. Es interesante el hecho que todos los aislamientos de leches, quesos y jamones provenientes de supermercados y plazas de mercado fueron clasificados dentro del linaje I, ya que estos son alimentos que se consumen frecuentemente por parte de la población. Debido a que no se encontró relación alguna entre el origen específico de la cepa y el agrupamiento dentro del dendograma, sugiere que la estructura de *L. monocytogenes* se encuentra claramente definida en nuestro país y que la mayoría de aislamientos de *L. monocytogenes* presentes en nuestro medio pertenece a este linaje. La presencia de genes de virulencia como *hly* y *actA* son un indicio de la habilidad virulenta de los aislamientos analizados. Sin embargo, es necesario realizar ensayos de patogenicidad en modelos animales para establecer la verdadera habilidad patogénica de estos aislamientos.

La estructura filogenética encontrada entre las cepas nativas de *L. monocytogenes* analizadas en este estudio determinado por secuenciación parcial del gen *actA* despierta la inquietud de un

posible brote de listeriosis en nuestro país. Se sabe que esta bacteria se encuentra frecuentemente en los alimentos que consumen los colombianos al compararlo con la frecuencia encontrada en países desarrollados. Adicionalmente, la mayoría de aislamientos analizados pertenecen al linaje I el cual es característico de aislamientos epidémicos incluyendo los aislamientos clínicos analizados y alimentos. Este hecho, sumado a la creciente resistencia a antibióticos tanto en medicina veterinaria como humana, al desconocimiento de la enfermedad, a la ubicuidad del patógeno y a sus habilidades de resistencia y formación de biopelículas presenta un posible riesgo para la salud pública. Por esta razón se requieren más estudios abordando estos aspectos con el fin de determinar el verdadero riesgo de la listeriosis en Colombia. Los reportes poco frecuentes de listeriosis pueden ser explicados debido al diagnóstico erróneo (las manifestaciones clínicas de esta enfermedad pueden confundirse con otras afecciones), al desconocimiento por parte de la población colombiana de la existencia de este patógeno y un amplio sub-registro, lo cual evidencia la necesidad de establecer programas de vigilancia enfocados hacia la listeriosis.

7. CONCLUSIONES

- Los resultados obtenidos por RAPD muestran que existe una gran diversidad de polimorfismos de ADN entre las cepas de *L. monocytogenes* que circulan en Colombia, lo que podría reflejar diferencias a nivel fenotípico y en la virulencia de estas cepas.

- RAPD es una técnica reproducible y útil para determinar la diversidad molecular de *L. monocytogenes* siempre y cuando se trabaje con ADN de buena calidad.

- RAPD no debe ser utilizada para establecer la estructura filogenética de *L. monocytogenes* debido a que se basa en amplificaciones azarosas de ADN, mas no en genes específicos que puedan reflejar la historia evolutiva de la especie.

- Debido a la alta diversidad de las cepas analizadas, no se encontró una relación directa entre las cepas circulantes en alimentos y las cepas clínicas. Sin embargo, los dendrogramas sugieren que las cepas clínicas presentan diferencias frente a las cepas de alimentos y por ésta razón se agruparon más cercanamente entre sí que con las cepas de origen alimentario.

- Según el árbol filogenético Bootstrap Neighbor Joining construido con base en el alineamiento de las secuencias parciales de secuencias colombianas y previamente reportadas del gen de virulencia *actA*, existen tres linajes evolutivos para *L. monocytogenes*.

- Los aislamientos colombianos de *L. monocytogenes* presentan una distribución diferente a los reportes de la literatura y pueden clasificarse en al menos dos de los linajes evolutivos descritos ya que ningún aislamiento se clasificó dentro del linaje III. Contrario a lo descrito por varios autores la mayoría de los aislamientos de alimentos analizados no se agruparon dentro del linaje II, donde solamente se encontró 1 de los 13 aislamientos analizados de este origen obtenido de pollo crudo. El resto de los aislamientos de alimentos incluyendo quesos, leche y jamones, se encontraron dentro del linaje I.

- Algunas cepas colombianas tienen una clasificación distinta dentro de los linajes según sus serotipos: según la literatura el linaje I incluye los serotipos 1/2b, 4b, 3b y 4c, aunque la mayoría de aislamientos 4b y el 3b (LMO53) se agrupan dentro de este linaje, la cepa LMO 180 con serotipo 1/2b se encuentra dentro del linaje II. Todos los aislamientos serotipo 4a se encuentran dentro del linaje I y no dentro del III como lo reporta la literatura.

- De acuerdo a la literatura todos los aislamientos 1/2a se encuentran dentro del linaje II, el cual incluye principalmente serotipos 1/2a, 1/2c y 3a.

- Los resultados obtenidos del análisis filogenético sugieren que las cepas colombianas de *L. monocytogenes* tienen un alto potencial epidémico ya que el 81.08% de los aislamientos pertenecen al linaje I el cual contiene principalmente cepas de listeriosis humana epidémicas y virulentas, según varios autores. Por lo tanto, es necesario realizar análisis de patogenicidad de las cepas de *L. monocytogenes* utilizadas en este estudio para establecer el potencial epidémico real de las mismas.

- El serotipo mas frecuente entre las cepas colombianas de *L. monocytogenes* analizadas es el 4b con un 54.05%. Esto apoya la conclusión anterior, ya que más del 50% de los casos de listeriosis humana son causados por este serotipo y el hecho que se seleccionaron las cepas aleatoriamente sin conocer los serotipos descarta la posibilidad de un sesgo.

- Los valores Fst obtenidos en la comparación de las tres líneas evolutivas, junto con los resultados de recombinación y la red filogenética sugieren que el flujo genético entre las mismas es muy bajo lo cual reveló tres grupos con una estructura genética claramente definida. Esto sugiere que los tres linajes podrían constituir tres especies o sub-especies distintas. Sin embargo, esto debe estudiarse minuciosamente en futuros estudios.

- El análisis de ADN de las secuencias parciales de *actA* evidenció que los aislamientos de *L. monocytogenes* analizados constituyen un grupo altamente diverso, que presenta un alto polimorfismo dentro de las secuencias analizadas donde la presión de selección natural parece ser neutral.

- Existe recombinación entre los aislamientos de *L. monocytogenes* pertenecientes al linaje I, mas no dentro de los miembros pertenecientes a los linajes II y III.

- De acuerdo a los reportes previos de la literatura, se encontró que el gen *actA* es altamente polimórfico: se encontraron un total de 37 haplotipos de ADN y un polimorfismo de aminoácidos del 19.80%.

- La técnica de RAPD y la secuenciación parcial del gen *actA* de las cepas colombianas de *L. monocytogenes* analizadas en este estudio muestran una gran diversidad, así como no se encontró una tendencia de agrupamiento según origen.

- Estos resultados evidencian la necesidad de continuar investigando *L. monocytogenes* en Colombia y la importancia de conocer la epidemiología, distribución y dispersión de este patógeno en nuestro país.

8. RECOMENDACIONES

- Se sugiere el uso de la técnica de RAPD para futuros estudios que permitan caracterizar molecularmente las cepas de *L. monocytogenes*, para obtener información acerca de la diversidad, epidemiología, dispersión y trazabilidad de este patógeno.

- Con el fin de corregir adecuadamente las secuencias de ADN se debe construir un mapa plantilla de la secuencia del fragmento que se espera amplificar, basado en los genomas de la bacteria que se encuentren disponibles en las bases de datos públicas como GenBank.

- No se recomienda utilizar la técnica de RAPD para estudiar la filogenia de *L. monocytogenes,* para este propósito es mas recomendable emplear la secuenciación parcial del gen de virulencia *actA* o de otros genes que han sido reportados en la literatura previamente.

- Se sugiere a las autoridades competentes en salud pública en Colombia estudiar la posibilidad de establecer la listeriosis como una enfermedad de notificación obligatoria para obtener más información acerca de *L. monocytogenes* en Colombia.

- Así mismo, se debería incluir la listeriosis dentro de los programas de vigilancia epidemiológica del país y compartir esta información con la obtenida por otros países que vigilan esta enfermedad.

9. REFERENCIAS

1. Acheson D. (2000). Foodborne Listeriosis, *Clinical Infectious Diseases, 31, 770-775.*

2. Aguado, V., Vitas, A. I., Garcia-Jalon, I. (2004). Characterization of *Listeria monocytogenes* and *Listeria innocua* from a vegetable processing plant by RAPD and REA. *Int J Food Microbiol, 90, 341-347.*

3. Ai-Ghazali, M.R & Ai-Azawi, S.K. (1990). *Listeria monocytogenes* contamination of crops grown on soil treated with sewage sludge cake. J. Applied Bacteriol, 69, 462-474

4. Attwood T.K. & Parry-Smith D.J. (2002). Introducción a la Bioinformática. Prentice Hall, Madrid, España. Pg 84-100.

5. Aureli, P., Ferrini, A.M., Mannoni, V., Hodzic, S., Wedell-Weergaard, C. & Oliva B. (2003). Susceptibility of *Listeria monocytogenes* isolated from food in Italy to antibiotics**.** *Int J Food Microbiol, 83, 325-330.*

6. Austin, J. W. & Berferon, G. (1995). Development of bacterial biofilms in dairy processing lines. *J Dairy Res, 62, 509-519.*

7. Bandelt, H.J. & Dress, A.W. (1992). Split decomposition: a new and useful approach to phylogenetic analysis of distance data. *Mol Phylogenet Evol, 1, 242-252*

8. Bandelt, H.J., Forster, P. & Rohlf, A. (1999). Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Mol Biol Evol 16, 37-48.*

9. Barmpalia. I. M, Geornaras. I, Belk. K.E, Scanga. J.A, Kendall. P.A, Smith. G.C & Sofos. J.N. (2004). Control of *Listeria monocytogenes* on Frankfurters with Antimicrobials in the formulation and by Dipping in Organic Acid Solutions. *J Food Prot, 67, 2456-64.*

10. Barbour, A.H., Rampling, A. & Hormaeche, C.E. (2001). Variation in the infectivity of *Listeria monocytogenes* isolates following intragastric inoculation of mice. *Infection and Immunity 69, 4657-4660.*

11. BAM, Bacteriological Analytical Manual. *Listeria monocytogenes*. Recuperado el 4 de Febrero de 2006 11:58 a.m http://www.cfsan.fda.gov/~ebam/bam-10.html

12. Blackman, I. C. & Frank, J. F. (1996). Growth f *Listeria monocytogenes* as a Biofilm on Various Food-Processing surfaces. *J Food Prot. 59: 827-831.*

13. Boerlin, P., Bannerman, E., Ischer, F., Rocourt & J., Bille, J**.** (1995). Typing *Listeria monocytogenes*: a comparison of random amplification of polymorphic DNA with 5 other methods. *Res Microbiol, 146, 35-49.*

14. Boerlin, P. & Piffaretti, J.C. (1991). Typing of human, animal, food andenvironmental isolates of *Listeria monocytogenes* by multilocus enzyme elec-trophoresis. *Appl Environ Microbiol 57,1624–1629.*

15. Buncié, S. (1991). The incidence of *Listeria monocytogenes* in slaughtered animals, in meat,and in meat products in Yugoslavia. *Int J Food Microbiol, 12,173-180*

16. Cai, S., Kabuki, D.Y., Kuaye, A.Y., Cargioli, T.G., Chung, M.S., Nielsen, R. & Wiedmann, M. (2002). Rational design of DNA sequence-based strategies for subtyping *Listeria monocytogenes*. *Journal of Clinical Microbiology, 40, 3319-3325.*

17. Cameron L.A. & Footer M.J. (1999). Oudenaarden Van A. and Theriot J.A.: Motility of ActA protein-coated microspheres driven by actin polymerization, *Proc Natl Acad Sci, 196, 4908-4913.*

18. Carrascal A.K., Correa C.A. & Fonseca J.C. (2005). Prevalencia de *Listeria monocytogenes* en expendios de pollo procesado en la zona suroccidental de Bogotá, D.C. *Memorias VIII Congreso Latinoamericano de Microbiología e Higiene de Alimentos. Bogotá, Mayo 18-21 de 2005, pg 29.*

19. CDC, Centres for Disease Control and prevention, Recuperado el 23 de Septiembre de 2006, 3:10 p.m de http://www.cdc.gov/ncidod/dbmd/diseaseinfo?listeriosis_t.htm

20. Charpentier, E., Gerbaud,G. & Courvalin, P**.** (1994). Presence of the *Listeria* tetracycline resistance gene tet(S) in *Enterococcus faecalis*. *Antimicrob Agents Chemother, 38, 2330-2335*.

21. Charpentier, E., Gerbaud,G., Jacquet, C., Rocourt, J. & Courvalin, P. (1995) Incidence of antibiotic resistance in *Listeria* species. *J Infect Dis, 172, 277-281.*

22. Cicchetti G., Maurer P., Wagener P. & Kocks C. (1999). Actin and Phosphoinositide Binding by the ActA Protein of the Bacterial Pathogen *Listeria monocytogenes, J Biol Chem, 274, 33616-33626*

23. Cocolin, L., Stella, S., Nappi, R., Bozzetta, E., Cantoni, C. & Comi, G. (2005). Analysis of PCR-based methods for characterization of *Listeria monocytogenes* strains isolated from different sources. *Int J Food Microbiol, 103, 167-178.*

24. Colburn, K.G; Kaysner, C.A.; Abeyta, C.J. & Wekell, M.M. (1990) *Listeria* species in a California estuarine environment. *Appl. Environ. Micrbiol, 56, 2007-2011*

25. Cossart, P. & Kocks, C. (1994) The actin based motility of the facultative intracellular pathogen *Listeria monocytogenes***.** *Mol Microb, 13, 395-402*

26. Cossart P. & Lecuit M. (1998). Interactions of *Listeria monocytogenes* with mammalian cells during entry and actin-based movement: bacterial factors, cellular ligands and signaling, *EMBO, 17, 3797-3806.*

27. Cox, L.J; Kleiss, J.L.; Cordier, C.; Cordellana, P.; Konkel, C.; Pedrazzini, R.; Beumer, R. & Siebenga, A. (1989). *Listeria* spp. in food processing, non-food and domestic environments. *Food Microbiol, 6, 463-474.*

28. Crespo, M.; Velez, J.; Castañeda, C.; Hoyos, F.; López, M. & Salazar, J**.** (1999) Aislamiento de *Listeria monocytogenes* en un hospital de tercer nivel. *Colombia Médica, 30,89-90*

29. Czechowski, M. H. (1990). Bacterial attachment to buna-n gaskets in milk processing equipment. *Aust J Dairy Technol, 45, 113-114*

30. Dalton, C. B., Austin, C. C.; Sobel, J.; Hayes, P. S.; Bibb, W. F.; Graves, L. M.; Swaminathan, B.; Proctor, M. E. & Griffin, P. M. (1997). An outbreak of gastroenteritis and fever due to *Listeria monocytogenes* in milk. *N Engl J Med, 336, 100–105.*

31. Decatur A.L. & Portnoy D.A. (2000). A PEST-like Sequence in Listeriolysin O Essential for *Listeria monocytogenes* Pathogenicity. *Science, 290, 992-995.*

32. Desalle R., Giribet G., Wheeler W.C. (2001). Techniques in Molecular Systematics and Evolution. Birkhauser Verlag, Germany. Pg 166.

33. Dhanashree B., Otta S. K., Karunasagar I., & Karunasagar I. (2003). Typing of *Listeria monocytogenes* isolates by random amplification of polymorphic DNA. *Indian J Med Res, 117, 19-24.*

34. Dijkstra, R.G. (1982). The occurence of *Listeria monocytogenes* in surface water of canals and lakes, in ditches of one big polder and in the effluents and canals of a sewage treatment plant. *Zentralbl. Bakteriol. Hyg Abt J Orig Reihe B, 176, 202-205*

35. Dorozynski A.(2000). Seven die in French *Listeria* outbreak. *BMJ, 320, 601.*

36. Doumith, M., Cazalet, C., Simoes, N., Frangeul, L., Jacquet, C., Kunst, F., Martin, P., Cossart, P., Glaser, P. & Buchrieser, C. (2004). New aspects regarding evolution and virulence of *Listeria monocytogenes* revealed by comparative genomics and DNA arrays. *Infection and Immunity, 72, 1072-1083.*

37. Dramsi S., Biswas I., Maguin E., Braun L., Mastroeni P., & Cossart P. (1995). Entry of *Listeria monocytogenes* into hepatocytes requires expression of InlB, a surface protein of the internalin multigene family. *Mol. Microbiol, 16, 251–61*

38. Dramsi S. & Cossart P. (1998). Intracellular pathogens and the actin cytoskeleton. *Annu Rev Cell Dev Biol, 14, 137–66.*

39. Dubail I. & Berche P. (2000). The European *Listeria* Genome Consortium and Charbit A.: Listeriolysin O as a Reporter to Identify Constitutive and In Vivo-Inducible Promoters in the Pathogen *Listeria monocytogenes*. *Infec Immun, 68, 3242-3250.*

40. Doumith M., Cazalet C., Simoes N., Frangeul L. , Jacquet C. , Kunst F. , Martin P., Cossart P., Glaser P., & Buchrieser C. (2004). New Aspects Regarding Evolution and Virulence of *Listeria monocytogenes* Revealed by Comparative Genomics and DNA Arrays. *Infection and Immunity, 72, 1072-1083.*

41. Douglas R.**,** Borucki M. & Besser T. (2003). Mixed genome microarrays reveal multiple serotype lineage-specific differences among strains of *Listeria monocytogenes*. *J Clin Microbiol.* **2**: 632-639.

42. Doyle, M; Beuchat, L.R & Monthville, T. (2001). Microbiología de los alimentos: Fundamentos y Fronteras. Zaragoza España: Editorial Acribia; 2001. p 355-370

43. Dussurget O., Pizano-Cerda J. & Cossart P. (2004). Molecular determinants of *Listeria monocytogenes* virulence. *Annu Rev Microbiol, 58, 587-610.*

44. Escartin. F. E. (2000) Microbiología e Inocuidad de los Alimentos. Universidad Autónoma de Queretaro; pg 23,252, 240-3,252.

45. Farber, J.M**. (**1991). *Listeria monocytogenes* in fish products. *J Food Prot, 54, 922-934*

46. Farber, J. M. & Peterkin, P. I. (1991). *Listeria monocytogenes*, a Food-Borne Pathogen. *Micrbiol Rev, 55, 476-511.*

47. Feresu S.B. & Jones B. **(**1988). Taxonomic studies on *Brochothrix, Erysipelothrix, Listeria* and atypical lactobacilli. *J Gen Microbiol, 134, (5), 1165-83.*

48. Flamm, R. K., Hinrichs, D. J. & Thomashow, M. F. (1984). Introduction of pAMb into *Listeria monocytogenes* by conjugation and homology between native *Listeria monocytogenes* plasmids. *Infect Immun 44, 157-161*

49. Fleming, D. W., Cochi, S. L., Macdonald, D. K., *et al***. (**1985). Pasteurized milk as a vehicle of infection in an outbreak of listeriosis. *New England Journal of Medicine, 312, 404-7.*

50. Franco Abuin, C. M., Quinto Fernandez, E. J., Fente Sampayo, C., Rodriguez Otero, J. L., Dominguez Rodriguez, L. & Cepeda Saez, A. (1994). Susceptibilities of *Listeria* species isolated from food to nine antimicrobial agents. *Antimicrob Agents Chemother, 38, 1655-1657.*

51. Frank, J. F. & Koffi, R. A. (1990). Surface-adherent growth of *Listeria monocytogenes* is associated with increased resistance to surfactant sanitizers and heat. *J Food Prot, 53, 550-554.*

52. Fu ,Y.X. & Li ,W.H. (1993). Statistical tests of neutrality of mutations. *Genetics, 133, 693-709.*

53. Gaillard J.L, Berche P., Frehel C., Gouine & Cossart P. (1991). Entry of *L. monocytogenes* into cells is mediated by internalin, a repeat protein reminiscent of surface antigens from gram-positive cocci. *Cell, 65,1127–41*

54. Guerra, M.M. & Fernando De Almeida, B. (2004). Fontes de contaminacäo dos alimentos por *Listeria monocytogenes*. *Hig aliment, 18, 12-18.*

55. Gray, M. L. & Killinger, A. H. (1966). *Listeria monocytogenes* and Listeric infections. *Bacteriology Reviews, 30, 309-82*

56. Graur D. & Li W.H. **(**2000). Fundamentals of Molecular Evolution. Second Edition. Sinauer Associates, Inc, Publishers, USA. Pg 57-59.

57. Guenich, H. H; Muller, H. E.; Schrettenbrunner, A. & Seeliger, H. P. R**. (**1985). The occurrence of different *Listeria* species in municipal waster water. *Zentralbl Bakteriol Hyg Abt J Orig Reihe B, 181, 563-565*

58. Hall, T.A. (1999). BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl Acids Symp Ser, 41, 95-98*

59. Herald, P. J. & Zottola, E. A. (1988). Attachment of *Listeria monocytogenes* to stainless steel surfaces at various temperatures and pH values. *J Food Sci, 53, 1549-1552, 1562.*

60. Hoang Chinh. Methods for Constructing Phylogenetic Trees. Recuperado el 15 de Junio de 2006, 11:30 a.m de http://darwin.nmsu.edu/~molb470/fall2005/projects/hoang/methods.html

61. Hudson R. R, Slatkin M. & Maddison W. P**.** (1992). Estimation of levels of gene flow from DNA sequence data**.** *Genetics, 132, 583-589*

62. Huson, D.(1998). SplitsTree: analyzing and visualizing evolutionary data. *Bioinformatics, 14, 68–73.*

63. Husu, J. R., Seppänen, S. K; Sivelä. A & Rauramaa, A. L**. (**1990). Prevalence of *Listeria* species as related to chemical quality of farm-ensiled grass. *Grass Forage Sci, (45), 309-314.*

64. Inoue S, Katagiri K, Terao M. & Maruyama T**.** (2001). RAPD and *actA* gene-typing of *Listeria monocytogenes* isolates from human listeriosis, the intestinal content of cows and beef. *Microbiol Immunol, 45,127-33*

65. Jay, J.; Loessner, M. & Golden, D. (2005). Modern Food Microbiology. Springer Science + Business Media, Inc. USA. p591-617

66. Jeffers, G.T., Bruce, J.L., Mcdonough, P.L., Scarlett, J., Boor, K.J. & Wiedmann, M. (2001). Comparative genetic characterization of *Listeria monocytogenes* isolates from human and animal listeriosis cases. *Microbiology 147, 1095-1104.*

67. Jeong, D.K. & Frank, J.F. (1994). Growth of *Listeria monocytogenes* at 10ºC in biofilms with microorganisms isolated from meat and dairy processing environments. *J Food Prot, 57, 576-586*

68. Jesam, C., Cádiz, F., Céspedes, P. & Ramírez, C. (2005). Infección perinatal por Listeria monocytogenes: presentación de casos clínicos, ¿transmsión en la sala de atención inmediata?. *Bol Hosp. San Juan de Dios 52, 116-123.*

69. Kathariou, S**.** (2002). *Listeria monocytogenes* virulence and pathogenicity, a food safety perspective. *J Food Prot, 65, 1811-1829.*

70. Keto-Timonen R.O., Autio T.J. & Korkeala H.J. (2003). An improved amplified fragment length polymorphism (AFLP) protocol for discrimination of *Listeria* isolates. *Syst Appl Microbiol 26, 236-244.*

71. Kumar, S., Tamura, K. & Kai, M. (2004). MEGA3: Integrated software for molecular evolutionary genetics analysis and sequence alignment. *Briefings in Bioinformatics, 5, 150-163.*

72. Lawrence L. & Gilmour A. (1991). Characterization of *Listeria monocytogenes* isolated from poultry products and from the poultry-processing environment by random amplification of polymorphic DNA and multilocus enzyme electrophoresis. *Int J Food Microbiol, 12, 14-70.*

73. Lawrence L. M, Harvey J. & Gilmour A. (1993). Development of a random polymorphic DNA typing method for *Listeria monocytogenes*. *Appl Environ Microbiol, 59, 3117-19.*

74. Lee, S. H. & Frank, J. F. (1991). Inactivation of surface-adherent *Listeria monocytogenes* by hypochlorite and heat. *J Food Prot, 54, 4-6.*

75. Lemaitre, J. P., Echchannaoui, H., Michaut, G., Divies, C. & Rousset, A. (1998). Plasmid-mediated resistance to antimicrobial agents among listeriae. *J Food Prot, 61, 1459-1464.*

76. Liu, D**. (**2006). Identification, subtyping and virulence determination of *Listeria monocytogenes*, an important foodborne pathogen. *J Med Microbiol, 55, 645-659.*

77. Liu, D., Ainsworth, A.J., Austin, F.W. & Lawrence, M.L. (2003). Characterization of virulent and avirulent *Listeria monocytogenes* strains by PCR amplification of putative transcriptional regulator and internalin genes. *Journal of Medical Microbiology, 52, 1065-1070.*

78. Low J.C & Donachie W. (1997). A Review of *Listeria monocytogenes* and Listeriosis. *The Veterinary Journal, 153, 9-29*

79. Marco, A. J.; Prats, N.; Ramos; J. A. Briones, V.; Blanco, M.; Domínguez, L. & Domingo, M. (1992). A microbiological, histopathological and immuno-histological study of the intragastric inoculation of *Listeria monocytogenes* in mice. *J Comp Pathol, 107, 1–9.*

80. Margolles, A., Mayo, B., & De Los Reyes C. G. (2001). Susceptibility of *Listeria monocytogenes* and *Listeria innocua* strains isolated from short-ripened cheeses to some antibiotics and heavy metal salts. *Food Microbiology, 18, 67-73.*

81. Martinez, I., Rorvik, L.M., Brox, V., Lassen, J., Seppola, M., Gram, L. & Fonnesbech-Vogel, B. (2003). Genetic variability among isolates of *Listeria monocytogenes* from food products, clinical samples and processing environments, estimated by RAPD typing. *Int J Food Microbiol, 84, 285-297.*

82. Mcpherson M. J. & Moller, S. G. (2000). Pcr The Basics. United Kingdom, BIOS Scientific Publishers Limited, p 257-528

83. McVean, G.A.T.,Awadalla, P. & Fearnhead, P. (2001). A coalescent based method for detecting recombination from gene sequences. *Genetics 160, 1231-1241.*

84. Mead, P. S., L. Slutsker, V. Dietz, L. F. Mccaig, J. S. Bresee, C. Shapiro, P. M. Griffin, & R. V. Tauxe. (1999). Food-related illness and death in the United States. *Emerg Infect Dis, 5, 607–625.*

85. Mengaud J., Dramsi S., Gouin E., Vazquez-Boland J. A., Milon G. & Cossart P. (1991). Pleiotropic control of *Listeria monocytogenes* virulence factors by a gene that is autoregulated. *Mol Microbiol 5, 2273–83.*

86. Mereghetti L., Lanotte P., Savoye-Marczuc V., Marquet-Van Der Mee., Audurier A. & Quentin R. (2002). Combined Ribotyping and Random Multiprimer DNA Analysis To Probe the Population Structure of *Listeria monocytogenes. Appl Environ Microbiol, 68, 2849-2857.*

87. Muñoz Cajiao A. I. & Díaz Figueroa, G. Listeriosis: Monografía. Instituto Nacional de Vigilancia de Medicamentos y Alimentos, INVIMA. Bogotá, 1998.

88. Murphy. R.Y, Hanson. R.E, Feze.N, Johnson. N.R, Scott. L.L, & Duncan.L.K**.** (2005). Eradicating *Listeria monocytogenes* from Fully Cooked Franks by Using and Integrated Pasteurization-Packaging System. *J Food Prot, 68, 507-11.*

89. Murray, E. G. D., Webb, R. A. & Swann, M. B. R**. (**1926). A disease of rabbits characterized by large mononuclear leucocytosis, caused by a hitherto undescribed bacillus, *Bacterium monocytogenes* (n. sp.). *J Pathol Bacteriol, 29, 407-439.*

90. Nadon C.A., Woodward D.L., Young C., Rodgers F.G. & Wiedmann M. (2001). Correlations between molecular subtyping and serotyping of *Listeria monocytogenes*. *J Clin Microbiol, 39, 2704-2707.*

91. NCBI, *Listeria monocytogenes* Taxonomy. National Center for Biotechnology Information. Recuperado el 1 de Febrero de 2006 12:28 a.m de http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?mode=Info&id=176281&lvl=3&lin=f&keep=1&srchmode=1&unlock

92. Nei M. Molecular Evolutionary Genetics. Columbia University Press, New York, 1987.

93. Nelson K.E., Fouts D.E., Mongodin E. F., Ravel J., Deboy R. T., Kolonay J. F., Rasko D.A., *et al.* (2004). Whole genome comparisons of serotype 4b and 1/2a strains of the food-borne pathogen *Listeria monocytogenes* reveal new insights into the core genome components of this species. *Nucl Ac Res, 8, 2386-2395.*

94. Nightingale, K.K., Windham, K. & Wiedmann, M. (2005). Evolution and molecular phylogeny of *Listeria monocytogenes* isolated from human and animal listeriosis cases and foods. *Journal of Bacteriology, 187, 5537-5551.*

95. Norton. M.D, Mccamey. M, Gall.K.L, Scarlett. J.M, Boor. K.J. & Wiedmann.M. **(**2001**).** Molecular Studies on the Ecology of *Listeria monocytogenes* in the Smoked Fish Processings Industry. *Journal of Appl Environ Microbiol, 67,198-205*

96. Nucleic Acid Protein Service Unit, University of British Columbia (Canada). Recuperado el Junio de 22 de 2006 11:35 a.m http://www.michaelsmith.ubc.ca/services/NAPS/Primer_Sets/

97. Page R.D. & Holmes E. C. (1998). Molecular Evolution A Phylogenetic Approach. Blackwell Science Ltd, Paris, France. Pg 116-117, 242-243.

98. Pascual M. R**.** *Listeria monocytogenes*. Microbiología Alimentaria: detección de bacterias con significado higiénico sanitario. Madrid: Ministerio de Sanidad y Consumo, Instituto de Salud Carlos III; 1989 p 395-441

99. Pinner, R.W.; Schuchat, B.; Swaminathan, Pbs; Hayes, K. A.; Deaver, R.E.; Weaver, B.D.; Plikaytis, B.D.; Reeves, C.V. & Wenger, J.D. (1992). Role of foods in sporadic listeriosis. II. Microbiologic and epidemiologic investigation. *J Am Med Assoc, 267, 2046-2050*.

100. Piffaretti, J.C., Kressebuch, H., Aeschbacher, M., Bille, J., Bannerman, E., Musser, J.M., Selander, R.K. & Rocourt, J. (1989). Genetic characterization of clones of the bacterium *Listeria monocytogenes* causing epidemic disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 86, 3818-3822.*

101. Penner Ga, Bush A, Wise R, Kim W, Domier L, Kasha K, *et al.* (1993). Reproducibility of random amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis among laboratories. *PCR Methods Appl, 2, 341-5.*

102. Poyart-Salmeron, C., Carlier, C., Trieu-Cuot, P., Courtieu, A. L. & Courvalin, P. (1990). Transferable plasmid-mediated antibiotic resistance in *Listeria monocytogenes*. *Lancet, 335, 1422-1426*

103. Ralovich, B. (1991). Meditation of the taxonomy of *Listeria*. *Acta Microbiol Hung, 38 2, 155-60.*

104. Rasmussen, O.F., Beck, T., Olsen, J.E., Dons, L. & Rossen, L. (1991). *Listeria monocytogenes* isolates can be classified into two major types according to the sequence of the listeriolysin gene. *Infection and Immunity,59, 3945-3951.*

105. Rasmussen, O.F., Skouboe, P., Dons, L., Rossen, L. & Olsen, J.E**.** (1995). *Listeria monocytogenes* exists in at least three evolutionary lines: evidence from flagellin, invasive associated protein and listeriolysin O genes. *Microbiology, 141, 2053-2061.*

106. Riedo, F. X.; Pinner, R. W.; De Lourdes Tosca, M.; Cartter, M. L.; Graves, L. M.; Reeves, M. W.; Weaver, R. E.; Plikaytis, B. D. & Broome, C. V. (1994). A point-source foodborne listeriosis outbreak: documented incubation period and possible mild illness. *J Infect Dis, 170, 693–696.*

107. Robbins J.R., Barth A.I., Marquis H., Hostos E.L., Nelson W.J. & Theriot J.A. (1999). *Listeria monocytogenes* Exploits Normal Host Cell Processes to Spread from Cell to Cell. *J Cell Biol, 146, 1333-1349.*

108. Roberts, A., Nightingale, K., Jeffers, G., Fortes, E., Kongo, J.M. & Wiedmann, M. (2006). Genetic and phenotypic characterization of *Listeria monocytogenes* lineage III. *Microbiology, 152, 685-693.*

109. Rocourt J. (1994). *Listeria monocytogenes*: the state of the science. *Dairy food and Environm Sanit, 14, 70-82.*

110. Ronner, A. & Wong, A. C. L**.** (1993). Biofilm development and sanitizer inactivation of *Listeria monocytogenes* and *Salmonella typhimurium* on stainless steel and Buna-N rubber. *J Food Prot, 56, 750-758.*

111. Rozas J. & Rozas R. (1999). DnaSP version 3: an integrated program for molecular population genetics and molecular evolution analysis**.** *Bioinformatics, 15, 174-175.*

112. Rozas J, Sánchez Del Barrio J. C., Messeguer X. & Rozas R. (2003). DnaSP, DNA polymorphism analyses by the coalescent and other methods. Bioinformatics, 19, 2496-2497.

113. Rueda, A. (2005). Detección de *Listeria monocytogenes* por PCR en Tiempo Real en Muestras de Leche Cruda Entera destinada para el Consumo Humano en Colombia**.** Tesis de Maestría en Microbiología. Universidad de los Andes.

114. Saitou N. & Nei M. (1987). The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol, 4, 406-425.*

115. Sánchez, E., Castillo, A. & Ortega, C. (2001). Infección perinatal por *Listeria*. Reporte de un caso. *Rev Coloma Obste Ginecol 52(2), 199-202.*

116. Sauders, B. D., Schukken Y., Kornstein, L., Reddy, V., Bannerman, T., Salehi, E., Dumas, N., Anderson, B., Massy, J. & Wiedmann, M. (2006). Molecular epidemiology and cluster analysis of human listeriosis cases in three U.S. states. *J Food Prot 69(7), 1680-1689.*

117. Schonberg, A., Bannerman, E., Courtieu, A.L., Kiss, R., Mclauchlin, J., Shah, S. & Wilhelms, D. (1996). Serotyping of 80 strains from the WHO multicentre international typing study of *Listeria monocytogenes*. *Int J Food Microbiol, 32, 279-287.*

118. Schuchat, A.; Deaver, K. A.; Wenger, J. D.; Plikaytis, B. D. ; Mascola, L.; Pinner, R. W.; Reingold, A. L.; Broome, C. V. & The Listeria Study Group. (1992). Role of foods in sporadic listeriosis. I. Case-control study of dietary risk factors. *J Am Med Assoc, 267, 2041–2045.*

119. Seeliger H. & Jones D. (1986). *Listeria.* Sneath PMA et. al editors. Bergey´s manual of determinative microbiology. 9th ed. Baltimore: Williams and Wilkins Co. p1235-1245.

120. Sivigila, 2002. Boletín Epidemiológico Semanal, Semana Epidemiológica No. 06 Febrero 03 a 09 de 2002. Recuperado el 15 de Enero de 2006, 10:45 a.m de http://www.col.ops-oms.org/sivigila/2002/BOLE06_02.pdf

121. Sivigila, 2006. Informe Enfermedades Transmitidas por Alimentos, Marzo 12 de 2006. Recuperado el 30 de Octubre de 2006, 4:45 p.m de http://www.mundoalimenticio.com/invima.htm

122. Skovgaard, N. & Norrung, B. 1989. The incidence of *Listeria* spp. In faeces of Danish pigs and in minced pork meat. *Int J Food Microbiol,* 8, 59-63

123. Tajima, F. (1989). Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis. *Genetics, 123,585-595*

124. Thompson, J.D., Gibson, T.J., Plewniak, F., Jeanmougin, F. & Higgins, D.G. (1997). The CLUSTAL_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Research, 25, 4876-4882.*

125. Tompkin, R. B. (2002). Control of *Listeria monocytogenes* in the food-processing environment. *J Food Prot, 65, 709-725.*

126. United States Food and Drug Administration, Bad Bug Book. *Listeria monocytogenes*. Recuperado el 21 de Noviembre de 2005, 9:55 a.m http://www.cfsan.fda.gov/~mow/chap6.html

127. University of Pennsylvania, Template Preparation and Purification, 2006. Recuperado el 18 de Julio de 2006, 8:45 a.m de http://www.med.upenn.edu/genetics/core-facs/dna-seq/services/temprep-instr.html

128. Vanegas M.C., Martinez A.J. & Botina B.L. (2006). Detección de *Listeria monocytogenes* en productos cárnicos distribuidos en Bogotá por PCR. *UDCA, En Revisión Editorial.*

129. Vanegas M.C, Vega C, Martinez A.J, Forero P. & Casas C. (2005). Aislamiento de *Listeria monocytogenes* a partir de cárnicos embutidos en supermercados y plazas de mercado de Bogotá. Memorias VIII Congreso Latinoamericano de Microbiología e Higiene de Alimentos. Bogotá, Mayo 18-21 de 2005, pg 27.

130. Varma JK, Samuel MC, Marcus R, Hoekstra M, Medus C, Segler SD, Anderson BJ, *et al.* (2004). Dietary and medical risk factors for sporadic *Listeria monocytogenes* infection: A FoodNet Case-Control Study - United States, 2000-2003. International Conference on Emerging Infectious Diseases, Atlanta GA.

131. Vázquez-Boland, J.A.; Gamallo, J. A.; Ripio, M. T.; Domínguez-Bernal, G.; Lara, M.; Vega, Y.; Mainar, R. C. & Suárez, M. (1996). Listeriosis animal: aspectos epidemiológicos y diagnósticos, implicaciones en salud pública, y situación en España. *Med Vet,* 13, 333–344.

132. Vázquez-Boland, J.A.; Kuhn, M.; Berche, P.; Chakraborty, T.; Domínguez-Bernal, G.; Goebel W.; Gonzalez-Zorn, B.; Wehland, J. & Kreft, J. (2001). *Listeria* Pathogenesis and Molecular Virulence Determinants. *Clin Microbiol Rev, 3, 584-640*

133. Vines A. & Swaminathan B. (1998). Identification and characterization of nucleotide sequence differences in three virulence-associated genes of *Listeria monocytogenes* strains representing clinically important serotypes. *Current Microbiology, 36, 309-318.*

134. Walker S., Archers J. & Banks J.G. (1990). Growth of *Listeria monocytogenes* at refrigeration temperatures. *J Applied Bacteriol, 68, 157-162*

135. Wang D., Wayne M.M.Y., Taricani M., Buckingam K. & Sandham H.J. (1993). Artifactual variation in randomly amplified polymorphic DNA banding patterns. *Biotechniques, 14, 214-8.*

136. Ward, T.J., Gorski, L., Borucki, M.K., Mandrell, R.E., Hutchins, J. & Pupedis, K**.** (2004). Intraspecific phylogeny and lineage group identification based on the *prfA* virulence gene cluster of *Listeria monocytogenes*. *Journal of Bacteriology, 186, 4994-5002.*

137. Weis, J. & Seeliger, H.P.R. (1975). Incidence of *Listeria monocytogenes* in nature. *Appl Microbiol, 30, 29-32.*

138. Werbrouck, H., Grijspeerdt, K., Botteldoorn, N., Van Pamel, E., Rijpens, N., Van Damme, J., Uyttendaele, M., Herman, L. &Van Coillie, E. (2006). Differential *inlA* and *inlB* expression and interaction with human intestinal and liver cells by *Listeria monocytogenes* strains of different origins. *Applied and Environmental Microbiology, 72, 3862-3871.*

139. Wiedmann, M., Bruce, J.L., Keating, C., Johnson, A.E., Mcdonough, P.L. & Batt, C.A. (1997). Ribotypes and virulence gene polymorphisms suggest three distinct *Listeria monocytogenes* lineages with differences in pathogenic potential. *Infect Immun, 65, 2707-2716.*

140. Wiedmann, M. (2002). Molecular subtyping methods for *Listeria monocytogenes*. *Journal of AOAC International, 85, 524-531.*

141. Wong, A. L. (1998). Biofilms in Food Processing Environments. *J Dairy Sci, 81, 2765-2770.*

142. Wulff, G., Gram, L., Ahrens, P. & Fonnesbech, B. (2006). One group of genetically similar *Listeria monoctogenes* strains frequently dominates ad persists in several fish slaughter and smokehouses. *Appl Environm Microbiol, 6, 4313-4322.*

143. Yoshida T., Takeuchi M., Sato M. & Hirai K. (1999). Typing *Listeria monocytogenes* by random amplified polymorphic DNA (RAPD) fingerprinting. *J Vet Med Sci, 61, 857-60*

144. Zhao, T., Doyle, M. P. & Zhao, P. **(**2004). Control of *Listeria monocytogenes* in a Biofilm by Competitive-exclusion microorganisms. *Appl and Environm Microbiol, 70, 3996-4003.*

145. Zhou, X. & Jiao, X. (2005). Molecular grouping and pathogenic analysis of *Listeria monocytogenes* of clinical and food origin. *Food Control, 16, 867-872.*

146. Zhou, X., Jiao, X. & Wiedmann, M. (2005). *Listeria monocytogenes* in the Chinese food system: strain characterization through partial *actA* sequencing and tissue-culture pathogenicity assays. *J Med Microbiol, 54, 217-224.*

10. ANEXO 1

Secuencias consenso del extremo 3' del gen *actA* obtenidas para 37 aislamientos colombianos de *L. monocytogenes*

>LMO6

SRNAGFLPLNPFTSSPVPLLTPKVPKISAPALITDITKKAPFKNPSQPLNVFNKKTTTKTAPKK
ITPVNTAPKLAALPITKAQETELGENKAPFIEKQAETNNRPIDMPSLPVIQKEVTERDKEEMK
PQTEEKVVGESEPANNVNGKKRSAGIEEGKLIAKSAEDEKAKEEPVNHTTLILAMLAIGVFS
LGAVIKIIQLRKNS

>LMO7

GKPSRNTGFLPLNPFTSSPVPSLTPKVTKISAPALITDITKKSTFKNPPQPLNVFNKKTTTKTA
PKNNPCEYRAKLAALPITKAQETELGENKAPFIEKQAETNNRPIDMPSLPVIQKEVTERNKE
EMKPQTEEKVVGESEPANNVNGKKRSAGIEEGKLIAKSAEDEKAKEEPVNHTTLILAMLAI
GVFSLGAVIKIIQLRKNS

>LMO48

GKKSRNAGFLPLNPFTSSPVPSLTPKVPKISAPALITDITKKAPFKNPPQPLNVFNKKTTTKTA
PKKITPVNTAPKLAALPITKAQETELGENKAPFIEKQAETNNRPIDMPSLPVIQKEVTERNKE
EMKPQTEEKVVGESEPANNVNGKKRSAGIEEGKLIAKSAEDEKAKEEPVNHTTLILAMLAI
GVFSLGAVIKIIQLRKNS

>LMO49

SRNAGFLPLNPFTSSPVPSLTPKVPKISAPALITDITKKAPFKNPPQPLNVFNKKTTTKTAPKK
ITPVNTAPKLAALPITKAQETELGENKAPFIEKQAETNNRPIDMPSLPVIQKEVTERNKEEMK
PQTEEKVVGESEPANNVNGKKRSAGIEEGKLIAKSAEDEKAKEEPVNHTTLILAMLAIGVFS
LGAVIKIIQLRKNS

>LMO50

SRNAGFLPLIPFTSSPVPSLTPKVPKISAPALITDITKKAPFKNPPQPLNVFNKKTTTKTAPKKI
TPVNTAPKLAALPITKAQETELGENKAPFIEKQAETNNRPIDMPSLPVIQKEVTERNKEEMK

PQTEEKVVGESEPANNVNGKKRSAGIEEGKLIAKSAEDEKAKEEPVNHTTLILAMLAIGVFS
LGAVIKIIQLRKNS
>LMO52
GKHSRNAGFLPLNPFTSSPVPSLTPKVPKISAPALITDITKKAPFKNPPQPLNVFNKKTTTKTA
PKKITPVDTAPKLAALPITKAQETELGENKAPFIEKQAETNNRPIDMPSLPVIQKEVTERNKE
EMKPQTEEKVVGESEPANNVNGKKRSAGIEEGKLIAKSAEDEKAKEEPVNHTTLILAMLAI
GVFSLGAVIKIIQLRKNS
>LMO53
SRNAGFLPLNPFTSSPVPSLTPKVPKISAPALITDITKKAPFKNPPQPLNVFNKKTTTKTAPKK
ITPVNTAPKLAALPITKAQETELGENKAPFIEKQAETNNRPIDMPSLPVIQKEVTERNKEEMK
PQTEEKVVGESEPANNVNGKKRSAGIEEGKLIAKSAEDEKAKEEPVNHTTLILAMLAIGVFS
LGAVIKIIQLRKNS
>LMO54
SRNAGFLPLNPFTSSPVPSLTPKVPKISAPALITDITKKAPFKNPPQPLNVFNKKTTTKTAPKK
ITPVNTAPKLAALPITKAQETELGENKAPFIEKQAETNNRPIDMPSLPVIQKEVTERNKEEMK
PQTEEKVVGESEPANNVNGKKRSAGIEEGKLIAKSAEDEKAKEEPVNHTTLILAMLAIGVFS
LGAVIKIIQLRKNS
>LMO55
KHSRNAGFLPLNPFTSSPVPSLTPKVPKISAPALITDITKKAPFKNPPQPLNVFNKKTTTKTAP
KKITPVNTAPKLAALPITKAQETELGENKAPFIEKQAETNNRPIDMPSLPVIQKEVTERNKEE
MKPQTEEKVVGESEPANNVNGKKRSAGIEEGKVIAKSAEDEKAKEEPVNHTTLILAMLAIG
VFSLGAVIKIIQLRKNS
>LMO76
KHSRNAGFLPLNPFTSSPVPSLTPKVPKISAPALITDITKKAPFKNPPQPLNVFNKKTTTKTAP
KKITPVNNTAPKLAALPITKAQETELGENKAPFIEKQAETNNRPIDMPSLPVIQKEVTERNKE
EMKPQTEEKVVGESEPANNVNGKKRSAGIEEGKLIAKSAEDEKAKEEPVNHTTLILAMLAI
GVFSLGAVIKIIQLRKNS
>LMO77
SRNAGFLPLNPFTSSPVPSLTPKVPKISAPALITDITKKAPFKNPPQPLNVFNKKTTTKTAPKK
ITPVNTAPKLAALPITKAQETELGENKAPFIEKQAETNKRPIDMPSLPVIQKEVTERIKEEMKP
QTEEKVVGESEPANNVNGKKRSAGIEEGKLIAKSAEDEKAKEEPVNHTTLILAMLAIGVFSL
GAVIKIIQLRKNS

>LMO79

KHSRNAGFLPLNPFTSSPVPSLTPKVPKISAPALITDITKKAPFKNPPQPLNVFNKKTTTKTAP
KKITPVNTAPKLAALPITKAQETELGENKAPFIEKQAETNKSAIDMPSLPVIQKEVTERNKEE
MKPQTEEKVVGESEPANNVNGKKRSAGIEEGKLIAKSAEDEKAKEEPVNHTTLILAMLAIG
VFSLGAVIKIIQLRKNS

>LMO94

SRNAGFLPLNPFASSPVPSLTPKVPKISAPALITDITKKTPFKNPSQPLNVFNKKTTTKTAPKK
NTPVNTAPKLAALPITKAQETELGENKAPFIEKQAETNNRPIDMPSLPVIQKEATERNKEEM
NPQTEEKSVGESEPANNVNGKKRSAGIEEGKLIAKSAEDEKAKEEPVNHTTLILAMLAIGVF
SLGAVIKIIQLRKNS

>LMO95

NSRNAGFLPLIPFASSPVPSLSPKVSKISAPALISDITKKTPFKNPSQPLNVFNKKTTTKTVTKK
PTPVKTAPKLAELPATKPQETVLRENKTPFIEKQAETNKQSINMPSLPVIQKEATESDKEEM
KPQTEEKMVEESESANNANGKNRSAGIEEGKLIAKSAEDEKAKEEPGNHTTLILAMLAIGVF
SLGAFIKIIQLRKNN

>LMO111

KHSRNAGFLPLNPFTSSPVPSLTPKVPKISAPALITDITKKAPFKNPPQPLNVFNKKTTTKTAP
KKITPVNTAPKLAALPITKAQETELGENKAPFIEKQAETNNRPIDMPSLPVIQKEVTERNKEE
MKPQTEEKVVGESEPANNVNGKKRSAGIEEGKLIAKSAEDEKAKEEPVNHTTLILAMLAIG
VFSLGAVIKIIQLRKNS

>LMO172

SRNAGFLPLNPFTSSPVPSLTPKVPKISAPALITDITKKAPFKNPSQPLNVFNKKTTTKTAPKK
ITPVNTAPKLAALPITKAQETELGENKAPFIEKQAETNNRPIDMPSLPVIQKEVTERNKEEMK
PQTEEKVVGESEPANNVNGKKRSAGIEEGKLIAKSAEDEKAKEEPVNHTTLILAMLAIGVFS
LGAVIKIIQLRKNS

>LMO174

SRNAGFLPLNPFISSPVPSLTPKVPKISAPALISDITKKAPFKNPSQPLNVFNKKTTTKTVTKKP
TPVKTAPKLAELPATKPQETVLRENKTPFIEKQAETNKQSINMPSLPVIQKEATESDKEEMK
PQTEEKMVEESESANNANGKNRSAGIEEGKLIAKSAEDEKAKEEPGNHTTLILAMLAIGVFS
LGAFIKIIQLRKNN

>LMO175

SRNAGFLPLNPFTSSPVPSLTPKVPKISAPALITDITKKAPFKNPPQPLNVFNKKTTTKTAPKK
ITPVNTAPKLAALPITKAQETELGENKAPFIEKQAETNNRPIDMPSLPVIQKEVTERNKEEMK
PQTEEKVVGESEPANNVNGKNRSAGIEEGKLIAKSAEDEKAKEEPVNHTTLILAMLAIGVFS
LGAVIKIIQLRKNS
>LMO176
NSRNAGFLPLNPFTSSPVPSLSPKVSKISAPALITDITKKAPFKNPPQPLNVFNKKTTTKTAPK
KITPVNTAPKLAALPITKAQETALGENKAPFIEKQAETNNRPIDMPSLPVIQKEVTERNKEEM
KPQTEEKVVGESEPANNVNGKKRSAGIEEGKLIAKSAEDEKAKEEPVNHTTLILAMLAIGVF
SLGAVIKIIQLRKNS
>LMO177
NSRNAGFLPLNPFTSSPVPSLTPKVPKISAPALITDITKKAPFKNPPQPLNVFNKKTTTKTAPK
KITPVNTAPKLAALPITKAQETELGENKAPFIEKQAETNNRPIDMPSLPVIQKEVTERNKEEM
KPQTEEKVVGESEPANNVNGKKRSAGIEEGKLIAKSAEDEKAKEEPVNHTTLILAMLAIGVF
SLGAVIKIIQLRKNS
>LMO178
SRNAGFLPLNPFTSSPVPSLTPKVPKISAPALITDITKKAPFKNPPQPLNVFNKKTTTKTAPKK
ITPVNTAPKLAALPITKAQETELGENKAPFIEKQAETNNRPIDMPSLPVIQKEVTERNKEEMK
PQTEEKVVGESEPANNVNGKKRSAGIEEGKLIAKSAEDEKAKEEPVNHTTLILAMLAIGVFS
LGAVIKIIQLRKNS
>LMO179
SRNAGFLPLNPFTSSPVPSLTPKVPKISAPALITDITKKAPFKNPPQPLNVFNKKTTTKTAPKK
ITPVNTAPKLAALPITKAQETELGENKAPFIEKQAETNNRPIDMPSLPVIQKEVTERNKEEMK
PQTEEKVVGESEPANNVNGKKRSAGIEEGKLIAKSAEDEKAKEEPVNHTTLILAMLAIGVFS
LGAVIKIIQLRKNS
>LMO180
SRNAGFLPLNPFMSSPVPSLTPKVPKISAPALISDITKKAPFKNPSQPLNVFNKKTTTKTVTKK
PTPVKTAPKLAELPATKPQETVLRENKTPFIEKQAETNKQSINMPSLPVIQKEATESDKEEM
KPQTEEKMVEESESANNANGKNRSAGIEEGKLIAKSAEDEKAKEEPGNHTTLILAMLAIGVF
SLGAFIKIIQLRKNN
>LMO181
SRNAGFLPLNPFTSSPVPSLTPKVPKISAPALITDITKKAPFKNPPQPLNVFNKKTTTKTAPKK
ITPVNTAPKLAALPITKAQETELGENKAPFIEKQAETNNRPIDMPSLPVIQKEVTERNKEEMK

PQTEEKVVGESEPANNVNGKKRSAGIEEGKLIAKSAEDEKAKEEPVNHTTLILAMLAIGVFS
LGAVIKIIQLRKNS
>LMO182
SRNAGFLPLNPFTSSPVPSLTPKVPKISAPALITDITKKAPFKNPPQPLNVFNKKTTTKTAPKK
ITPVNTAPKLAALPITKAQETELGENKAPFIEKQAETNNRPIDMPSLPVIQKEVTERNKEEMK
PQTEEKVVGESEPANNVNGKKRSAGIEEGKLIAKSAEDEKAKEEPVNHTTLILAMLAIGVFS
LGAVIKIIQLRKNS
>LMO183
SRNAGFLPLNPFTSSPVPSLTPKVPKISAPALITDITKKAPFKNPPQPLNVFNKKTTTKTAPKK
ITPVNTAPKLAALPITKAQETELGENKAPFIEKQAETNNRPIDMPSLPVIQKEVTERNKEEMK
PQTEEKVVGESEPANNVNGKKRSAGIEEGKLIAKSAEDEKAKEEPVNHTTLILAMLAIGVFS
LGAVIKIIQLRKNS
>LMO184
SRNAGFLPLNPFTSSPVPSLSPKVSKISAPALITDITKKAPFKNPPQPLNVFNKKTTTKTAPKKI
TPVNTAPKLAALPITKAQETALGENKAPFIEKQAETNNRPIDMPSLPVIQKEVTERNKEEMK
PQTEEKVVGESEPANNVNGKKRSAGIEEGKFIAKSAEDEKAKEEPVNHTTLILAMLAIGVFS
LGAVIKIIQLRKNS
>LMO185
RNAGFLPLNPFISSPVPSLTPKVPKISAPALISDITKKAPFKNPSQPLNVFNKKTTTKTVTKKP
TPVKTAPKLAELPATKPQETVLRENKTPFIEKQAETNKQSINMPSLPVIQKEATESDKEEMK
PQTEEKMVEESESANNANGKNRSAGIEEGKLIAKSAEDEKAKEEPGNHTTLILAMLAIGVFS
LGAFIKIIQLRKNN
>LMO186
HSRNAGFLPLNPFTSSPVPSLTPKVPKISAPALITDITKKAPFKNPPQPLNVFNKKTTTKTGAK
KITPVYTAPKLAALPITKAQETELGENKAPFIEKQAETNNRPIDMPSLPVIQKEVTERNKEEM
KPQTEEKVVGESEPANNVNGKKRSAGIEEGKLIAKSAEDEKAKEEPVNHTTLILAMLAIGVF
SLGAVIKIIQLRKNS
>LMO188
KHSRNAGFLPLNPFTSSPVPSLSPKVSKISAPALITDITKKAPFKNPPQPLNVFNKKTTTKTAP
KKITPVNTAPKLAALPITKAQETALGENKAPFIEKQAETNNRPIDMPSLPVIQKEVTERNKEE
MKPQTEEKVVGESEQANNVNGKKRSAGIEEGKLIAKSAEDEKAKEEPVNHTTLILAMLAIG
VFSLGAVIKIIQLRKNS

>LMO189

SRNAGFLPLNPFTSSPVPSLTPKVPKISAPALITDITKKAPFKNPPQPLNVFNKKTTTKTAPKK
ITPVNTAPKLAALPITKAQETELGENKAPFIEKQAETNNRPIDMPSLPVIQKEVTERNKEEMK
PQTEEKVVGESEPANNVNGKKRSAGIEEGKLIAKSAEDEKAKEEPVNHTTLILAMLAIGVFS
LGAVIKIIQLRKNS

>LMO190

SRNAGFLPLNPFISSPVPSLTPKVPKISAPALISDITKKAPFKNPSQPLNVFNKKTTTKTVTKKP
TPVKTAPKLAELPATKPQETVLRENKTPFIEKQAETNKQSINMPSLPVIQKEATESDKEEMK
PQTEEKMVEESESANNANGKNRSAGIEEGKLIAKSAEDEKAKEEPGNHTTLILAMLAIGVFS
LGAFIKIIQLRKNN

>LMO191

KHSRNAGFLPLNPFISSPVPSLTPKVPKISAPALISDITKKAPFKNPSQPLNVFNKKTTTKTVT
KKPTPVKTAPKLAELPATKAQETVLRENKTPFIEKQAETNKQSINMPSLPVIQKEATESDKE
EMKPQTEEKMVEESESANNANGKNRSAGIEEGKLIAKSAEDEKAKEEPGNHTTLILAMLAI
GVFSLGAFIKIIQLRKNN

>LMO192

KHSRNAGFLPLNPFTSSPVPSLTPKVPKISAPALITDITKKAPFKNPPQPLNVFNKKTTTKTAP
KKITPVNTAPKLAALPITKAQETELGENKAPFIEKQAETNNRPIDMPSLPVIQKEVTERNKEE
MKPQTEEKVVGESEPANNVNGKKRSAGIEEGKLIAKSAEDEKAEEEPVNHTTLILAMLAIG
VFSLGAVIKIIQLRKNS

>LMO193

RNAGFLPLNPFTSSPVPSLTPKVPKISAPALITDITKKAPFKNPPQPLNVFNKKTTTKTAPKKI
TPVNTAPKLAALPITKAQETELGENKAPFIEKQAETNNRPIDMPSLPVIQKEVTERNKEEMK
PQTEEKVVGESEPANNVNGKKRSAGIEEGKLIAKSAEDEKAKEEPVNHTTLILAMLAIGVFS
LGAVIKIIQLRKNS

>LMO194

SRNAGFLPLNPFTSSPVPSLTPKVPKISAPALITDITKKAPFKNPPQPLNVFNKKTTTKTAPKK
ITPVNTAPKLAALPITKAQETELGENKAPFIEKQAETNNRPIDMPSLPVIQKEVTERNKEEMK
PQTEEKVVGESEPANNVNGKKRSAGIEEGKLIAKSAEDEKAKEEPVNHTTLILAMLAIGVFS
LGAVIKIIQLRKNS

>LMO195

KNAGFLPLNPFISSPVPSLTPKVPKISAPALISDITKKAPFKNPSQPLNVFNKKTTTKTVTKKP
TPVKTAPKLAELPATKPQETVLRENKTPFIEKQAETNKQSINMPSLPVIQKEATESDKEEMK
PQTEEKMVEESESANNANGKNRSAGIEEGKLIAKSAEDEKAKEEPGNHTTLILAMLAIGVFS
LGAFIKIIQLRKNN