



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

ACTA DE IDÓNEA COMUNICACIÓN DE RESULTADOS

No. 00168

Matrícula: 2142800040

DISEÑO Y APLICACIÓN DE UN SISTEMA DE DETECCIÓN BASADO EN PCR PARA EL GÉNERO *Listeria*.

En la Ciudad de México, se presentaron a las 12:00 horas del día 11 del mes de octubre del año 2016 en la Unidad Iztapalapa de la Universidad Autónoma Metropolitana, los suscritos miembros del jurado:

DR. FRANCISCO JOSE FERNANDEZ PERRINO
M. EN C. ABRAHAM IZCOATL ACATZI SILVA
DR. LUIS GERARDO TREVIÑO QUINTANILLA

siendo el primero asesor del alumno y lector el segundo, de la Idónea Comunicación de Resultados, se reunieron a evaluar la presentación cuya denominación aparece al margen, para la obtención del diploma de:

ESPECIALIZACION EN BIOTECNOLOGIA

DE: SAID EFREN NUÑEZ ARMENTA

y de acuerdo con el artículo 79 fracción II del Reglamento de Estudios Superiores de la Universidad Autónoma Metropolitana, los miembros del jurado resolvieron:

APROBAR

Acto continuo, se comunicó al interesado el resultado de la evaluación y, en caso aprobatorio, le fue tomada la protesta.



SAID EFREN NUÑEZ ARMENTA
ALUMNO

REVISÓ

LIC. JULIO CESAR DE LARA ISASSI
DIRECTOR DE SISTEMAS ESCOLARES

DIRECTORA DE LA DIVISIÓN DE CBS

DRA. EDITH PONCE ALQUICIRA

ASESOR

DR. FRANCISCO JOSE FERNANDEZ PERRINO

ASESOR

M. EN C. ABRAHAM IZCOATL ACATZI SILVA

LECTOR

DR. LUIS GERARDO TREVIÑO QUINTANILLA

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA



Casa abierta al tiempo

***“DISEÑO Y APLICACIÓN DE UN SISTEMA DE DETECCIÓN
BASADO EN PCR PARA el género Listeria”***

P R E S E N T A

Biol. Said Efren Nuñez Armenta

DIRECTOR

Dr. Francisco José Fernández Perrino

CO-DIRECTOR

M.C. Abraham Itzcoatl Acatzi Silva

17 de febrero de 2016

UNIVERSIDAD AUTONOMA METROPOLITANA



**“DISEÑO Y APLICACIÓN DE UN SISTEMA DE DETECCIÓN BASADO EN PCR PARA EL
GÉNERO *Listeria*”**

T E S I S

Para obtener el grado de
Especialista en Biotecnología

P R E S E N T A

Said Efren Nuñez Armenta

DIRECTOR

Dr. Francisco José Fernández Perrino

CO-DIRECTOR

M.C. Abraham Itzcoatl Acatzi Silva

Febrero de 2016

“La Especialización en Biotecnología de la Universidad Autónoma Metropolitana está incluida en el Programa Nacional de Posgrados de Calidad (PNPC) del CONACYT, con la referencia 001467”

México D.F. a 24 de febrero del 2016

El jurado designado por la
División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la Unidad Iztapalapa aprobó la idónea
comunicación de resultados

**“DISEÑO Y APLICACIÓN DE UN SISTEMA DE DETECCIÓN BASADO EN PCR PARA EL
GÉNERO *Listeria*”**

Que presentó

Said Efren Nuñez Armenta

Comité Tutorial:

Director: Dr. Francisco José Fernández Perrino

Co-Director: M.C. Abraham Itzcoatl Acatzi Silva

Jurado:

Lector: Dr. Luis Gerardo Treviño Quintanilla

RESUMEN

La Listeriosis es una enfermedad de origen alimentario de carácter grave, pero de baja frecuencia, que causa la muerte hasta en un 30% de los casos. La bacteria responsable, *Listeria monocytogenes* se encuentra ampliamente distribuida en la naturaleza donde puede sobrevivir por largos periodos de tiempo. El mayor peligro como fuente de contagio para el hombre son los alimentos, listos para el consumo, especialmente los que se conservan refrigerados por periodos prolongados. En la industria alimentaria el patógeno sobrevive, a los procesos de limpieza e higienización, por su capacidad de formar biopelículas sobre superficies de trabajo y equipos, contaminando los alimentos que allí se procesan. Como una medida para el control del desarrollo de *L. monocytogenes* en los alimentos y en el ambiente donde se procesan los alimentos, se ha estudiado el uso de productos innovadores provenientes de plantas y de origen microbiano para eliminar al patógeno.

El género *Listeria* se divide en seis especies (*Listeria monocytogenes*, *L. ivanovii*, *L. innocua*, *L. welshimeri*, *L. seeligeri*, y *L. grayi*), donde sólo *L. monocytogenes* es patógena para el hombre. Es una bacteria Gram positiva, aerobia o anaerobia facultativa, móvil a 25 °C e inmóvil a 37 °C, capaz de sobrevivir a temperaturas extremas entre 1 °C y 45 °C con un óptimo a 37 °C. Se le considera un patógeno psicrótrofo, es decir, capaz de desarrollarse a temperaturas de refrigeración, lo cual le diferencia de otras bacterias patógenas como *Salmonella* o *Staphylococcus aureus*, que su crecimiento es inhibido a bajas temperaturas. En cuanto al pH, se desarrolla en un rango entre 4.4 y 9.4, crece en presencia de un 10% de NaCl y sobrevive, en presencia de esta sal, en un rango de 16 a 20%. Se encuentra ampliamente distribuida tanto en el ambiente terrestre (suelo, plantas, ensilaje, materia fecal, aguas residuales), en el ambiente acuícola y también en lugares donde se procesan alimentos. En plantas de producción de alimentos puede encontrarse en el suelo, aguas estancadas, equipos de procesamiento, cintas transportadoras, cámaras de frío y túneles de congelación, entre otros. Su crecimiento en este entorno se ve favorecido por la alta humedad y la presencia de nutrientes. Este patógeno, a pesar de no formar endosporas, es capaz de sobrevivir por largos periodos de tiempo en el medio ambiente, en las plantas procesadoras de alimentos y al interior de los refrigeradores domésticos. *L. monocytogenes* es un residente intestinal temporal en el ser humano ya que del 5% al 10% de la población en algún momento es portadora, sin presentar los síntomas. *L. monocytogenes* ha sido aislada de alimentos sin procesar como leche, carne y vegetales y de alimentos procesados

como quesos suaves, helado, mantequilla, carne cruda, carne procesada, pescado crudo y ahumado en frío. A pesar de encontrarse con frecuencia en alimentos crudos, los casos de listeriosis generalmente se relacionan con aquellos alimentos listos para el consumo, los que se conservan refrigerados por un periodo prolongado de tiempo o con los contaminados post procesamiento térmico.

Para este estudio se diseñaron 6 juegos de oligonucleotidos para la detección de las 6 especies del género *Listeria* empleando la técnica de PCR multiplex en tiempo Real. Para el desarrollo de los oligonucleotidos se empleó el gen que codifica para la proteína p60 de *Listeria* que ha sido clonado y secuenciado. Debido a su posible papel en la invasión, el gen fue nombrado *iap* (*gen de virulencia*) ya que es una proteína asociada a la invasión.

Las secuencias para el diseño de los oligonucleotidos y las sondas se obtuvieron de la base de datos del National Center for Biotechnology Information (NCBI) y se diseñaron empleando software libre de la página <https://www.idtdna.com/site> y se verificaron por PCR *in silico* y PCR- Punto fina.

Para la evaluación de los oligonucleotidos diseñados se emplearon 51 cepas, 33 pertenecientes al género *Listeria*, 14 de *Escherichia coli*, 2 de *Citrobacter*, 1 de *Salmonella* y 1 de *Shigella*; Provenientes de la colección ATCC y cepas aisladas de muestras de productos vegetales e identificadas empleado el equipo VITECK 2 Compact de Biomerieux. (ver tabla 4)

Los resultados obtenidos fueron satisfactorios al detectar al organismo para el que fueron diseñados cada par de oligonucleotidos, lo que demuestra que la técnica de PCR es confiable en la detección e identificación del género *Listeria*, lo que permitiría a su vez reducir el tiempo de análisis en comparación con los métodos convencionales.

Abstrac

The Listeriosis is an alimentary sickness, with low frequency that may cause terrible medical diseases in a 30% of all the cases. The main bacteria is the *Listeria monocytogenes*, which has a high distribution in the nature where it can survive for a long period of time. The higher risk to be in touch for human race are all the food products, especially all those refrigerated under low degrees.

In the food industry, the strain can survive in all cleaning and healthy procedures, cause it has a particular way to build a biofilm under the work surfaces and equipments, polluting the processed food.

As a security way to control the growth of *Listeria monocytogenes* in processed foods and in the environment where food is processed, it has been studied the use of innovative products from plant and microbial origin to eliminate the pathogen.

The listerie gender is divided in 6 species (*Listeria monocytogenes*, *L. ivanovii*, *L. innocua*, *L. welshimeri*, *L. seeligeri*, y *L. grayi*), where only the *Listeria monocytogenes* is a pathogenic strain for all humans. Is a Gram negative, facultative aerobic or anaerobic bacteria, mobile at 25°C and immobile at 37°C, it can survive at extreme temperaturas between 1°C and 45°C increasing at 37°C. it is considered as a psicotrofic pathogen, that has the posibilitiity to survive in cooling temperatures.

However, the pH, is developed in a range between 4.4 and 9.4, it grows in a 10% of NaCl and can survive between 16% and 20% of this element. It can be found in a high percent at the terrestrial environment (soil, plants, waste water, stool), underwater environment and places where food is procesed.

In food production plants can be found in soil, stagnant water processing equipment, conveyors, cold storage and freezing tunnels, among others. It development in this climate is favored by high humidity and the presence of nutriments. Even the pathogen doesn't produce endosporas, has the capability to survive for a long period of time at the environment, food production plants and inside of domestic freezers. *L. monocytogenes* is a temporary resident intestinal in humans, because the 5% and 10% of the population at some point is a carrier, without symptoms. *L. monocytogenes* has been isolated in non-processed food like milk, raw meat, processed meat, raw and cold smoking fish.

Even though to find it with high frequency in raw foods, all cases of *Listeria* generally al related with all whose are ready to consume, refrigerated food for long periods of time or all whose are Contaminated thermal post-processes.

For this attachment, were designed 6 kinds of oligonucleotides to detect the 6 species of listeria gender, using the PCR multiplex in Real Time technique. For the development of

oligonucleotides, was used the gene that codify the p60 listeria protein that has been cloned and sequenced. Due to at its possibility of invasion, the gene was called *iap*, because it's a protein associated with invasion.

The sequences to design oligonucleotides and probes were taken from the NCBI data base and were designed using a free software from the page <https://www.idtdna.com/site>, and verified by PCR *in silico* and PCR.

The designed oligos evaluation were employed 51 strains, 33 belongs to *Listeria* gender, 14 from *Escherichia coli*, 2 from *Citrobacter*, 1 of *Salmonella* and 1 of *Shigella* ; all of them from ATCC collection and strains isolated from samples of plant products and identified the VITECK 2 Compact employee of Biomerieux equipment.

The final results were satisfactory detecting the organism who it has been designed each one of all the oligos, so it says that the PCR technique is trustworthy identifying and detecting the gender of *Listeria*, which would reduce the analysis time instead of the conventional methods.

INDICE

1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1, Enfermedades transmitidas por los alimentos	1
1.2. Características generales del género <i>Listeria</i>	2
1.3 Virulencia	4
1.4 PCR tiempo real.....	6
1.5 PCR multiplex	7
2. ANTECEDENTES Y JUSTIFICACIÓN.....	7
3. HIPÓTESIS	8
4. OBJETIVOS	8
5. METODOLOGÍA.....	8
5.1 Diseño de cebadores	8
5.2 Análisis de los oligonucleótidos y sondas	20
5.3 Síntesis de oligonucleótidos.....	28
5.4 PCR <i>in silico</i>	30
5.5 PCR de punto final.....	34
5.6 Estandarización de la técnica de PCR-TR Multiplex.	35
5.7 Inclusividad y exclusividad	36
6. RESULTADOS	36
7. Conclusiones.....	39
8. Referencias	40

1. INTRODUCCIÓN

1.1, Enfermedades transmitidas por los alimentos

Las enfermedades transmitidas por los alimentos (ETA) se producen por la ingestión de alimentos y/o bebidas contaminados con microorganismos patógenos, que afectan a la salud del consumidor en forma individual o colectiva. Sus síntomas más comunes son diarreas y vómitos, pero también se pueden presentar otros, como choque séptico, hepatitis, cefaleas, fiebre, visión doble, etcétera.

Hasta la fecha se han descrito más de 250 ETA. La mayoría son infecciones ocasionadas por distintas bacterias, virus y parásitos. Entre las bacterias comúnmente reconocidas como causantes de ETA se encuentran especies de los géneros *Campylobacter* y *Salmonella*, *Listeria monocytogenes* y la cepa O157:H7 de la enterobacteria *Escherichia coli*. A largo plazo, algunas de estas enfermedades pueden conducir a otros padecimientos; por ejemplo, es posible que una infección con la cepa O157:H7 de *Escherichia coli* provoque el síndrome hemolítico urémico (SHU), con secuelas de insuficiencia renal crónica.

La conservación y descontaminación inadecuadas de los alimentos pueden permitir el crecimiento de patógenos, originando enfermedades que causan morbilidad y mortalidad importantes. La mayoría de los brotes de este tipo de enfermedades se debe a una manipulación y/o preparación inadecuadas a nivel del consumidor y afectan a un pequeño número de personas. Ocasionalmente se presentan brotes más amplios, que afectan a muchos individuos, y son principalmente debidos a la rotura en las cadenas de seguridad en las plantas de procesamiento y distribución de los alimentos. Sin embargo, muchos brotes de este tipo de enfermedades no se registran como tales porque no se establece la conexión entre el alimento y la enfermedad.

En los alimentos frescos, además de microorganismos no patógenos pueden estar presentes microorganismos patógenos. Para detectar patógenos importantes en los alimentos, como *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella*, *Staphylococcus* y *Clostridium botulinum*, el cultivo convencional es considerado el método de referencia. Sin embargo, esta técnica presenta desventajas, como una baja sensibilidad y el tiempo necesario, a menudo demasiado

extenso, para la obtención de un resultado. Por otro lado, el aislamiento por cultivo no asegura que el microorganismo aislado posea los determinantes de virulencia necesarios para producir infección y enfermedad en un hospedero susceptible (IAEA, 2005). Por ello, últimamente se han desarrollado métodos de diagnóstico rápido que no requieren cultivar al patógeno. En estos casos, para identificar la contaminación en alimentos y en otros productos (ya sea por toxinas o por patógenos) se usan pruebas moleculares e inmunológicas. Uno de las técnicas diagnósticas más utilizadas es la reacción en cadena de la polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés), que permite la detección de microorganismos en los alimentos en mucho menor tiempo, si se compara con las técnicas de cultivo convencional.

Por su parte, entre los factores limitantes de la PCR están las numerosas sustancias inhibitorias que pueden encontrarse en la matriz del alimento. Además, la detección del ADN de un patógeno en el alimento no asegura la viabilidad del mismo en la muestra al momento del análisis, lo que representa una desventaja con respecto al cultivo convencional (Pouch-Downes e Ito, 1998; Vantarakis y col., 2000; González y Rojas, 2005).

1.2. Características generales del género *Listeria*

El género *Listeria* está compuesto por bacterias gram positivas con bajo contenido en G+C, y está estrechamente relacionado con los géneros *Bacillus*, *Clostridium*, *Enterococcus*, *Streptococcus* y *Staphylococcus*. Son bacilos aerobios o anaerobios facultativos, no esporulados, no encapsulados, catalasa positiva y móviles entre 10 y 25°C.

Listeria ha sido aislada de diferentes muestras ambientales, como suelo, agua, efluentes, de una gran variedad de alimentos y de heces humanas y animales. El hábitat natural de estos microorganismos es probablemente la materia orgánica vegetal en descomposición, y los ruminantes domésticos contribuyen al mantenimiento de *Listeria* spp. en el ambiente rural a través de un ciclo continuo de enriquecimiento oral-fecal (Fenlon, 1999). La amplia distribución de *Listeria monocytogenes* se debe a la capacidad de sobrevivir en diferentes medios durante períodos de tiempo prolongados.

El género *Listeria* comprende seis especies: *L. monocytogenes*, *L. ivanovii*, *L. seeligeri*, *L. innocua*, *L. welshimeri* y *L. grayi*. Las dos especies potencialmente patógenas son *L. monocytogenes* y *L. ivanovii*. *L. monocytogenes* no fue considerado un patógeno animal hasta fines de la década del 70 del siglo pasado, aunque a principios de los años 80 emergió como uno de los patógenos humanos de origen alimentario más importante. A partir de ese momento, la literatura sobre *Listeria* comenzó a incrementarse y a partir de 1983 una serie de brotes epidémicos humanos en Norteamérica y Europa establecieron claramente a la listeriosis como una infección alimentaria grave (Bille, 1990). Los alimentos más frecuentemente asociados con brotes y con alto nivel de riesgo son quesos y productos lácteos, patés y salchichas, pescados ahumados, ensaladas y en general productos industrializados, refrigerados, listos para el consumo, sin requerimientos de cocción o calentamiento previo (Farber y Peterkin, 1991). Los alimentos se pueden contaminar en cualquier eslabón de la cadena productiva, así como también durante el almacenamiento en frío. En la actualidad se estima que *L. monocytogenes* es la principal causa de muerte originada por bacterias de origen alimentario en USA: aproximadamente se registran 2500 casos de listeriosis humana por año, incluyendo 500 muertes (Mead y col., 2006).

El genoma de *L. monocytogenes* es circular, de 2.944.528 pb, con un promedio de G+C de 39%. Se han identificado 2853 genes, sin embargo no se conoce la función del 35.3% de los mismos. En el caso de *L. innocua*, posee un único genoma circular de 3.011.209 pb con un contenido promedio de G+C del 37%. Dentro del género *Listeria*, estas dos especies presentan alto grado de similitud en la secuencia del ARNr 16S, siendo las de mayor cercanía taxonómica (Von Both y col., 1999).

Además de estos dos patógenos, como se comentó anteriormente hay cuatro especies no patógenas de *Listeria*: *L. ivanovii*, *L. welshimeri*, *L. seeligeri* y *L. grayi*. Los análisis filogenéticos, basados en los genes 16S y 23S y los genes *iap*, *prs*, *vcIA*, *vcIB* y *ldh* indican que *L. innocua* está altamente relacionada con *L. monocytogenes*. El segundo grupo incluye a *L. ivanovii* junto con *L. seeligeri*, mientras que *L. welshimeri* está un poco más alejada. *L. grayi* parece estar muy distante de estos dos grupos (Hain y Steinweg, 2006).

L. ivanovii posee un cromosoma circular de 2.928.879 pares de bases, con un contenido de G+C promedio de 7,1%. *L. ivanovii* contiene seis operones completos de ARNr, genes que codifican 2.782 proteínas y 67 genes de ARNt. El genoma de *L. ivanovii* contiene 86

pseudogenes, de los cuales 37 se truncan y 53 son interrumpidos por mutaciones de cambio. Las células de *L. ivanovii* son cortas (0.4-0.5 × 0.5-2 µm), coco-bacilos móviles. Sus colonias son de 0.5 a 1.5 mm de diámetro y aparecen de un color azul grisáceo. *L. ivanovii* es un anaerobio facultativo que obtiene ATP por respiración aeróbica cuando el oxígeno está presente, pero también es capaz de realizar fermentación. *L. ivanovii* es catalasa positiva y tiene la capacidad de fermentar diversos hidratos de carbono, tales como glucosa, lactosa, trehalosa y glicerol, entre otros (Karunasagar, 1992).

Las células de *L. seeligeri* son pequeñas (0.4 a 0.8 por 0.5 a 2,5 µm), bacilos gram-positivos móviles a 28°C por medio de flagelos periticos. Las colonias de la bacteria, en agar triptosa, son pequeñas (de 1 a 2 mm de diámetro después de 1 ó 2 días de incubación a 37°C), regulares y suaves, con un color azul-verdoso cuando son examinadas con luz transmitida de forma oblicua (Rocourt y Grimont, 1983).

L. welshimeri fue aislada por primera vez de plantas en descomposición. Al igual que otras especies de *Listeria*, *L. welshimeri* es una bacteria pequeña (0.5 a 2 µm). Son bacilos gram-positivos, no formadores de esporas y móviles por debajo de 30°C, por medio de flagelos periítricos. El crecimiento a bajas temperaturas (4 °C) se da después de los 5 días (Rocourt y Grimont, 1983).

L. grayi presenta unos determinantes de patogenicidad comunes con las otras especies, como su capacidad de adhesión a células epiteliales, presencia de enzimas antioxidantes y de proteínas citotóxicas, aunque no presenta listerolisina O. La acción de esta proteína se sustituye por el defecto de la inmunidad celular producido por la diabetes, algo que es agravado por la faringoamigdalitis vírica, que contribuye a desequilibrar el estado de base del paciente. Todos estos factores pueden contribuir al desarrollado de infección ótica bacteriana (Fajardo Olivares, 2008).

1.3 Virulencia

Los genes de virulencia de *Listeria* spp. se organizan dentro de unidades genéticas conocidas como islas de patogenicidad (PAIs). Las PAIs son adquiridas por la bacteria por mecanismos de transferencia horizontal de información genética, algunas veces como parte

de un elemento móvil genético, por lo cual son importantes en la evolución de la virulencia bacteriana.

Seis de los factores de virulencia responsables del parasitismo intracelular de *L. monocytogenes* (*prfA*, *plcA*, *hly*, *mpl*, *actA* y *plcB*) están organizados en una isla cromosomal de 9 kpb conocida como grupo de genes de virulencia PrfA dependiente o isla 1 de patogenicidad de *Listeria* (LIPI-1) (Figura 1).

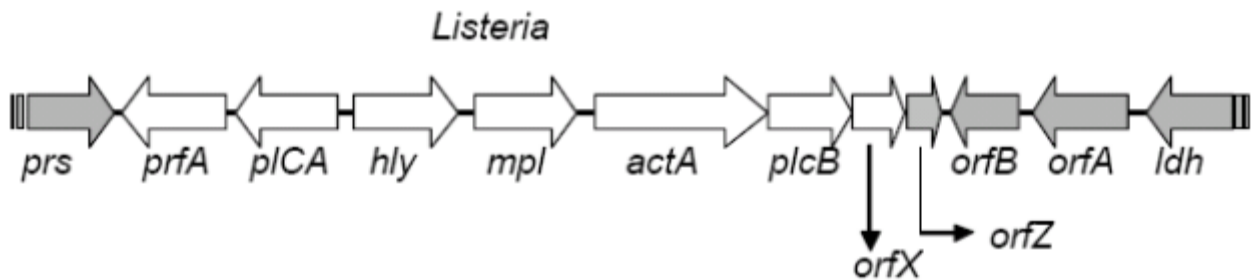


Figura 1. Organización transcripcional y física del grupo de genes de virulencia (LIPI-1) de *Listeria monocytogenes*.

El locus de virulencia está formado por tres unidades transcripcionales (Figura 1). La posición central está ocupada por el monocistrón *hly*, que codifica para la Listeriolisina O requerida para la ruptura de la vacuola fagocítica y la liberación de la bacteria dentro del citoplasma. Corriente abajo del monocistrón *hly*, y en el mismo sentido de transcripción, se encuentra el operón lecitinasa (de 5.7 kpb) que comprende tres genes: *mpl*, *actA* y *plcB* y tres pequeños marcos de lectura abiertos (ORFs) adicionales. El gen *actA* codifica para la proteína ActA, el gen *plcB* para la fosfolipasa C fosfatidilcolina específica (PC-PLC) y el gen *mpl* codifica para la proteasa, la cual procesa extracelularmente el propéptido inactivo de la PC-PLC.

El gen que codifica para la proteína p60 de *Listeria* ha sido clonado y secuenciado. Debido a su posible papel en la invasión, el gen fue nombrado *iap* (proteína asociada a la invasión). El gen *iap* codifica un polipéptido de 484 aminoácidos que contiene una secuencia señal de 27 aminoácidos y produce un polipéptido maduro de 47.5 kDa. El análisis de la secuencia de aminoácidos deducida mostró que p60 es una proteína básica (punto isoeléctrico de 9.3) y contiene un dominio que consiste en 19 repeticiones de Thr-Asn. La hibridación de ADN y los estudios inmunológicos han permitido encontrar genes relacionados con *iap* y proteínas

relacionadas con p60 en todas las cepas de *Listeria* ensayadas. La expresión de *iap* se controla a nivel postranscripcional (Wuenschel y col., 1993).

1.4 PCR tiempo real

La reacción en cadena de la polimerasa, cuyas iniciales en inglés son PCR ("polymerase chain reaction"), es una técnica que fue desarrollada por Kary Mullis a mediados de los años 80. Con esta metodología se pueden producir en el laboratorio múltiples copias de un fragmento de ADN específico, incluso en presencia de millones de otras moléculas de ADN. Como su nombre indica, se basa en la actividad de la enzima ADN polimerasa que es capaz de fabricar una cadena de ADN complementaria a otra ya existente. Sus únicos requerimientos son que existan nucleótidos en el medio, materia base para fabricar el ADN (los nucleótidos de adenina, timina, citosina y guanina), y una pequeña cadena de ADN que pueda unirse a la molécula que queremos copiar para que sirva como cebadora (el cebador, en inglés "primer").

La sensibilidad de la técnica de PCR es muy alta pero presenta algunos inconvenientes, como son: que no es una técnica cuantitativa y una relativamente alta probabilidad de obtener falsos positivos por contaminación. Para solventar este último problema se ha de optimizar la secuencia de los cebadores, así como la temperatura precisa para que estos se unan al ADN en la localización correcta y realizar una adecuada manipulación de los reactivos. Por otra parte para solventar el problema de la cuantificación se han generado unas variaciones sobre el esquema inicial de la PCR, dando lugar a lo que se conoce como PCR cuantitativa o PCR en tiempo real.

La clave en la PCR cuantitativa es la posibilidad de detectar en tiempo real la amplificación de nuestro genoma de interés. Para llevar a cabo esta detección existen varios métodos pero casi todos basados en la utilización de otro fragmento de ADN (sonda) complementario a una parte intermedia del ADN que queremos amplificar. Esta sonda lleva adherida una molécula fluorescente y otra molécula que inhibe esta fluorescencia ("quencher"), de tal forma que sólo cuando la sonda es desplazada de su sitio por acción de la ADN polimerasa la molécula fluorescente se libera de la acción del "quencher" y emite fluorescencia al ser

iluminada con un láser. La cuantificación de la fluorescencia emitida durante cada ciclo de la PCR será proporcional a la cantidad de ADN que se está amplificando. En general para que sea válida esta técnica requiere realizar en paralelo una curva patrón en las mismas condiciones para conocer la cantidad total de ADN que se está amplificando.

1.5 PCR multiplex

En años recientes se han presentado variantes de la PCR, entre las que destacan la PCR en tiempo real y la PCR múltiple, en ambas el fundamento de la técnica es el mismo que la presentada anteriormente denominada PCR de punto final. En el caso de una PCR múltiple, lo que se persigue es amplificar simultáneamente en un único tubo distintas secuencias específicas o secuencias blanco o dianas, lo cual necesariamente implica que los reactivos mezclados y el programa utilizado sean suficientes y adecuados para permitir la detección de cada diana y no inhibir la de las demás. Con este fin, algunos parámetros, como la concentración de magnesio y de primers, y el tipo y la cantidad de ADN polimerasa, pueden ajustarse experimentalmente. Para otros, en cambio, debe realizarse un diseño exhaustivo previo. En el caso de los cebadores y el programa de temperaturas utilizado, es necesario tener en cuenta varias premisas: a) escoger o diseñar oligonucleótidos que no interaccionen entre sí, es decir, que no formen dímeros; b) que tengan temperaturas de alineamiento similares; c) que cada pareja amplifique una única secuencia diana, y d) usar fluoróforos que emitan señal a distintas longitudes de onda para separarlos y diferenciarlos tras la amplificación. En cuanto a la calidad y cantidad de ADN molde, por supuesto debemos intentar partir de la concentración menor posible y con ausencia de sustancias inhibitoras que puedan interferir en la reacción. Para ello, los protocolos de purificación variarán en función del tipo de muestra de partida. La PCR múltiple se proyecta como una herramienta de diagnóstico muy útil en el futuro inmediato.

2. ANTECEDENTES Y JUSTIFICACIÓN

La identificación de *L. monocytogenes* se realiza por métodos convencionales, los cuales requieren cerca de 10 días para desarrollarse; sin embargo, en la industria de alimentos estos métodos no permiten tomar decisiones rápidas, lo que causa un incremento en el costo

del producto final por los períodos largos de cuarentena antes de su liberación. Por este motivo, son importantes las técnicas rápidas y sensibles como la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), que permitan detectar este patógeno en muestras de origen vegetal, para llevar un control más eficiente del proceso de producción, monitorear las prácticas de limpieza e higiene y tomar decisiones a corto plazo.

Actualmente existen kits comerciales que realizan la detección del género *Listeria* con una alta confiabilidad, sin embargo, estos kits se comercializan a precios altos, por lo que los costos de análisis se incrementan. Por este motivo, surge la necesidad de diseñar pruebas moleculares rápidas basadas en PCR que puedan reemplazar el uso de kits y disminuir los costos de dichos análisis.

3. HIPÓTESIS

La utilización de secuencias de genes característicos del género *Listeria* permitirán diseñar un protocolo rápido y económico para la detección de este género bacteriano por medio de la técnica de PCR.

4. OBJETIVOS

- Diseñar oligonucleótidos para una reacción de PCR en Tiempo Real que permita identificar de forma directa genes asociados a las seis especies del género *Listeria* (*L. monocytogenes*, *L. innocua*, *L. ivanovii*, *L. seeligeri*, *L. welshimeri* y *L. grayi*).
- Optimizar las condiciones de la reacción de PCR.
- Validar experimentalmente el método ¿mediante que pruebas?

5. METODOLOGÍA

5.1 Diseño de cebadores

Para el diseño de oligonucleótidos se eligió como objetivo el gen *iap*, caracterizado para todos los miembros del género *Listeria* (Bubert y col., 1999). Se ha observado que todas las

secuencias de genes *iap* presentan conservados los extremos, mientras que las regiones internas son especie-específicas. El gen *iap* de *L. monocytogenes* codifica la principal proteína p60 extracelular, que ha demostrado ser básicamente una mureína hidrolasa esencial, requerida para la separación del tabique en una etapa tardía de la división celular (Wuenscher y col., 1993). Además, la proteína p60 de *L. monocytogenes* juega un papel en la adhesión de este organismo a ciertas células eucariotas y confiere protección inmune a los ratones después de la infección con este patógeno (Bubert y col., 1992).

Se buscó en la base de datos del National Center for Biotechnology Information (NCBI, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) las secuencias de los genes *iap* de cada una de las seis especies de *Listeria*. Las secuencias se descargaron en formato FASTA y fueron analizadas en el software libre BioEdit para encontrar la secuencia consenso. Las secuencias obtenidas fueron las siguientes:

Para *L. innocua*

```
ACAATTTAACCACTGATAAAATCGTACCAGGTCAAAAACACTACAAGTAAACGAGGTTGCT
ACTGAAGAAAAAGCAGAGAAATCTGTTAGCGCAACTTGGCTTAATGTACGTTCTGGCGCT
GGAGTTGACCACAGCATTCTTACTTCCATTAAGGTGGAACATAAGTAACTGTTGAAACA
ACAGAATCAAACGGTTGGCACAAAATTACTTACAATGATGGAAAACTGGTTACGTTAAC
GGTAAATACTTAACAGACAAAGCAACTAGCACTCCAGTTGTTAAACAAGAAGTGAAAAA
GAAACGACACAACAAGTTAAACCTGCTACAGAAGCAAAAACAGAAG
```

Para *L. grayi*

```
GGAATAGCTGTCACAGCATTGCTGCTCCATCGGTTGTCTCAGCAAATACAGTGGTTGT
CGCATCTGGTGATACACTTTGGGGGATCGCTTCCAAAACACTGGTACTACCGTTGACCAAC
TAAAACAACCTCAATAAACTTGACTCTGATAGAATCGTACCGGGACAAAATTAACAATCAA
AGAAGTAGCTGCTCAAAAAGTAGAAAAATCTGTTAGTGCAACATGGCTGAATGTTGCTCA
TGCTCCTGACGCAAATGAAAAAATACTTACTTCCCTAAAAGGCCGTACAGTTGTCAAAGT
AGAAAGTTCTGAAGCTAATGGTTGGAACAAGATCTCTTTTGACAATGGTAAAACCTGGTTA
TGTAACCGGAAAATACTTATCTGACGCAAAAAGTCGCTGCTCCTGTGCTTACGAAAGCAGT
GACCCACAAAGCAGAAGCAAAAGTCGCTGCTACTTCGACACACGCAGTTAAAGTGGATA
CGAACGCTTCTACTTACAAAGTAAAAGCGGGTGATACGATCTGGGCTTTATCTGTCAAAT
ATGGCGTTCCTGTTCAAAAATTGATCGAATGGAATAATCTTTCTTCTTCTTCGATCTATGT
TGGTCAAACGATCGCAGTAAAAGAAGCGGCTGCTAAAGCTGCTCCAACAACACTGTA AAC
AAGCCGCTCCTGCTAAAGTCGCTCCGAAACAAGAAGTGAAGCAAACAGCACCGGCTAAA
CAAGAACAAGCAAAACCGGCTGCTAAAGAAACAGTGAAACCAGCTGTTTCCAAGCCAAA
AGCAGCTACACCAGCCCC
```

Para *L. monocytogenes*

GATACTCTTTGGGGTATCGCACAAAGTAAAGGGACTACTGTTGACGCAATTA AAAAAGCA
AACAAATTTAACAAACAGATAAAATCGTACCAGGTCAAAAATTACAAGTAAATAATGAGGTTG
CTGCTGCTGAAAAACAGAGAAATCTGTTAGCGCAACTTGGTTAAACGTCCGTAGTGGC
GCTGGTGTGATAACAGTATTATTACGTCCATCAAAGGTGGAACAAAAGTAACTGTTGAA
ACAACCGAATCTAACGGCTGGCACAAAATTACTTACAACGATGGAAAACTGGTTTCGTT
AACGGTAAATACTTAACTGACAAAGCAGTAAGCACTCCAGTTGCACCAACACAAGAAGTG
AAAAAAGAACTACTACTCAACAAGCTGCACCTGCTGCAGAAACAAAACCTGAAGTAAAA
CAAACCTACACAAGCAACTACACCTGCGCCTAAAGTAGCAGAAACGAAAGAACTCCAGT
AGTAGATCAAATGCTACTACACACGCTGTCAAAGCGGTGACACTATTTGGGCTTTATC
CGTAAATACGGTGTTCCTGTTCAAGACATTATGTCATGGAATAATTTATCTTCTTCTTA
TTTATGTAGGTCAAAGCTTGCTATTAACAAAACCTGCTAACACAGCTACTCCAAAAGCAG
AAGTGAAAACGGAAGCTCCAGCAGCTGAAAAACAAGCAGCTCCAGTAGTTAAAGAAAAT
ACTAACACAAATACTGCTACTACAGAGAAAAAAGAAACAGCAACGCAACAACAACAGCA
CCTAAAGCACCAACAGAAGCTGCAAACCCAGCTCCTGCACCATCTACAAACACAAATGC
TAATAAACGAATACTAATAC

Para *L. ivanovii*

TCTGTTACTGCTACTTGGTTGAATGTACGTTCTGGCGCTGGAGTTGATAACAGTATCGTC
ACTTCTTTAAAAGGTGGCACGAAAGTAACTGTTGAATCTACGGAAGCAAATGGCTGGAAC
AAAATTTTCATATGGCGAAGGAAAAACTGGTTATGTTAATGGCAAATACTTAGGTA
GTAACAAGTGCCCCTGCACCAGAAGTAAAAGAAGAAACA
ACTACTCAAGCGCAAGCGGC
ACCTGCTGCTGAAACGAAACCAGAAGTAAAACAATCTACACCAGCAACTGTTCTTCCTAA
AGCGGAAACAAAAACAGAACTCCTGCTGTAGATACA
ACTGCTTCAACATA
CACTGTTAA
AAGTGGTGACACAATTTGGGCATTATCCAGTAAATATGGCACTTCTGTTCAAAACATAAT
GTCATGGAATAATTTATCTTCTTCTTCTATTTATGTAGGACAAGTTCTTGCTGTTAAACAG
GAAGCTGCTAAA
ACTGCTTCACCAA
AAGCGGAAGTCAAACAGCTGA
AAAACAAGTATCTGCTCCAGTAGTAAAAGAAA
ACTCAA
ACTACAACAGCGAAAAA
AGA
AGTTACACCTCAAAAACA
AAACAATACACAAGCACCGGCACAAGCTGCAAACCCAGCCC
CTGCCCTGCTCCA
ACTGTTAACACTAACGCTTCTTCTTACACAGTAAA
AAGCGGCGACA
CTTTAAGCAA
AATGCTACAACATTTGGA
ACTACAGTTTCCAAA
ATTAAGCACTTAATGG
CTTAAATAGTGATAACCTTCAAGTTGGACAAGTGTAAAAGTAAAAGGTACAGTACCAAC
TGCTAATACAAACAGTAATAGCAATGC

Para *L. seeligeri*

ATGAATATGAAAAAGCAACTATCGCGGCTACAGCCGGATTGCGGTTACAGCATTTCG
TGCTCCAACATCGCATCCGCAAGCACTGTAGTAGTTGAAGCTGGAGATACTCTTTGGG
GTATTGCTCAAGATAATGGCACAACCTGTTGACGCATTAATAAGCTAACAACTAACAA
CTGATAAAATTGTACCTGGTCAAAAATTACAAGTAAGTACGAGGTAGCGAGCGAAAAACAG
AGAAATCTGTTAGCGCAACTTGGTTAAACGTACGTTTCAGGCGCTGGAGTTGATAACAGTA
TTGTCACTTCTTTAAAAGGTGGCACTAAAGTAAGTGTGAATCTACAGAAGCAAATGGCT
GGAACAAAATCACTTATGGTGAAGGAAAAACAGGCTACGTTAATGGCAAATACTTAGGTA
ATGCTGTAACAAGTGCTCCGTCTGCTACACCAGAAGTTAAACAAGAGGAACTACACAA
GCGGCTCCTGCTCAACAACTAAAACAGAAGTTAAACAAGCTACACCAGCAGCAACTAC
TGAAAAAGATGCAGTAGAACTAAAACAACCTGCTCCTGCGGTAGATACAAATGCAACAAC
TCATACCGTTAAAAGTGGCGATACAATTTGGGCATTATCCGTTAATACGGCGCTTCTGT
TCAAGACCTAATGTCATGGAATAATTTATCTTCTTCTTCTATTTATGTGGGTCAAAATATC
GCAGTAAAACAAAGTGCTGCTAAAACACTGCTCCAAAAGCTGAAGCCAAAACAGAAGC
TCCAGCAGCAGAAAAACAAACAGCTGCACCAGTAGTAAAAGAAA

Para *L. welshimeri*

GCTACTTGGTTAAATGTTTCGTTCTGGTGCTGGAGTTGACAATAGTATTGTTACTTCCCTAA
AAGGCGGTACAAAAGTAAGTGTGCAAGCAGCTGAATCTAATGGCTGGAATAAAATTTCTT
ATGGCGAAGGAAAAACTGGTTATGTTAATGGCAAATACTTAGGTGATGCTGTGACAAGTG
CTCCTGTTGCTAAACAAGAAGTAAAACAAGAAACGACAAAACAACTGCACCTGCTGCAG
AACTAAAACAGAAGTGAACAATCAACACCTGCCCTACTGCTCCAAAAGCAGCGGAA
ACTAAAACAGCACCAGTAGTAGATACTAATGCTACTACTCATACTGTAAAAAGCGGTGAC
ACAATTTGGGCGTTATCCGTTAATACGGCGCTTCAGTTCAAGATTTAATGTCATGGAAT
AATTTATCTTCTTCTTCTATTTATGTAGGACAAAAAATTGCTGTTAAACAAGCGCTGCTA
AACTGCTGCTCCAAAAGCAGAAGT

Una vez obtenida la secuencia consenso, se empleó el software en línea de Integrated DNA Technologies (<http://www.idtdna.com/primerquest/Home/Index>) para hacer el diseño de los oligonucleótidos y la sonda. Se obtuvieron cinco opciones para cada una de estas secuencias. A cada secuencia de oligonucleótido obtenida se le hizo un alineamiento, empleando la herramienta Basic Local Alignment SearchTool (BLAST) del NCBI. Con base

en los resultados obtenidos se seleccionaron las siguientes secuencias de oligonucleótidos y sondas:

Para *L. innocua*

Opción 1

Parameter Set: RT-qPCR (Primers with Probe)

Sequence Name: Sequence 1

Amplicon Length: 99

Forward lin01F **GTAAACGAGGTTGCTACTGAAGA (Sense)**

Probe lin01P **TGGCTTAATGTACGTTCTGGCGCT (Sense)**

Reverse lin01R **AGTAAGAATGCTGTGGTCAACT (AntiSense)**

```
AACAATTTAACCACTGATAAAATCGTACCAGGTCAAAAACCTACAAGGTAAACGAGGTTGCT  
ACTGAAGAAAAAGCAGAGAAATCTGTTAGCGCAACTTGGCTTAATGTACGTTCTGGCGCT  
GGAGTTGACCACAGCATTCTTACTTCCATTAAAGGTGGAACCTAAAGTAACTGTTGAAACA  
ACAGAATCAAACGGTTGGCACAATACTTACAATGATGGAAAACTGGTTACGTTAAC  
GGTAAATACTTAACAGACAAAGCAACTAGCACTCCAGTTGTTAAACAAGAAGTGAAAAAA  
GAAACGACACAACAAGTTAAACCTGCTACAGAAGCAAAAACAGAAG
```

En este caso la sonda es complementaria con *L. ivanovii*. Sin embargo, los oligonucleótidos no son complementarios con ninguna otra especie del género *Listeria*.

Opción 2

Parameter Set: RT-qPCR (Primers with Probe)

Sequence Name: Sequence 1

Amplicon Length: 112

Forward lin02 F **CGCAACTTGGCTTAATGTACG (Sense)**

Probe lin02P **CGCTGGAGTTGACCACAGCATTCT (Sense)**

Reverse lin02R **GTGCCAACCGTTTGATTCTG (AntiSense)**

AACAATTTAACCACTGATAAAATCGTACCAGGTCAAAAACCTACAAGTAAACGAGGTTGCT
ACTGAAGAAAAAGCAGAGAAATCTGTTAG**CGCAACTTGGCTTAATGTACGTTCTGGCGCT**
GGAGTTGACCACAGCATTCTTACTTCCATTAAGGTGGAACCTAAAGTAACTGTTGAAACA
ACAGAATCAAACGGTTGGCACAAAATTACTTACAATGATGGAAAACTGGTTACGTTAAC
GGTAAATACTTAAACAGACAAAGCAACTAGCACTCCAGTTGTTAAACAAGAAGTGAAAAA
GAAACGACACAACAAGTTAAACCTGCTACAGAAGCAAAAACAGAAG

Para este caso el oligonucleótido Forward complementaria con *L. monocytogenes*.

Para *L. grayi*

Opción 1

Parameter Set: RT-qPCR (Primers with Probe)

Sequence Name: Sequence 1

Amplicon Length: 137

Forward Igr01F **CCATCGGTTGTCTCAGCAAATA (Sense)**

Probe Igr01P **AGTGTATCACCAGATGCGACAACCAC (AntiSense)**

Reverse Igr01R **TGTCCCGGTACGATTCTATCA (AntiSense)**

GGAATAGCTGTCACAGCATTGCTGCT**CCATCGGTTGTCTCAGCAAATACAGTGGTTGT**
CGCATCTGGTGATACACTTTGGGGGATCGCTTCCAAAACCTGGTACTACCGTTGACCAAC
TAAACAACCTCAATAAACTTGACTCT**TGATAGAATCGTACCGGGACA**AAAATTAACAATCAA
AGAAGTAGCTGCTCAAAAAGTAGAAAAATCTGTTAGTGCAACATGGCTGAATGTTTCGTC
TGCTCCTGACGCAAATGAAAAATACTTACTTCCCTAAAAGGCCGTACAGTTGTCAAAGT
AGAAAGTTCTGAAGCTAATGGTTGGAACAAGATCTCTTTTGACAATGGTAAAACCTGGTTA
TGTAACCGGAAAATACTTATCTGACGCAAAAGTCGCTGCTCCTGTTCGTTACGAAAGCAGT
GACCCACAAAGCAGAAGCAAAAGTCGCTGCTACTTCGACACACGCAGTTAAAGTGGATA
CGAACGCTTCTACTTACAAAGTAAAAGCGGTGATACGATCTGGGCTTTATCTGTCAAAT
ATGGCGTTCCTGTTCAAAAATTGATCGAATGGAATAATCTTTCTTCTTCTTCGATCTATGT
TGGTCAAACGATCGCAGTAAAAGAAGCGGCTGCTAAAGCTGCTCCAACAACCTGTA AAC
AAGCCGCTCCTGCTAAAGTCGCTCCGAAACAAGAAGTGAAGCAAACAGCACCGGCTAAA
CAAGAACAAGCAAACCGGCTGCTAAAGAAACAGTGAAACCAGCTGTTTCCAAGCCAAA
AGCAGCTACACCAGCCCC

Opción 2

Parameter Set: RT-qPCR (Primers with Probe)

Sequence Name: Sequence 1

Amplicon Length: 145

Forward Igr02F **GGTGATACGATCTGGGCTTTAT (Sense)**

Probe Igr02P **CGATCTATGTTGGTCAAACGATCGCAGT (Sense)**

Reverse Igr02R **CAGTTGTTGGAGCAGCTTTAG (AntiSense)**

GGAATAGCTGTCACAGCATTGCTGCTCCATCGGTTGTCTCAGCAAATACAGTGGTTGT
CGCATCTGGTGATACACTTTGGGGGATCGCTTCCAAAAGTGGTACTACCGTTGACCAAC
TAAACAACACTCAATAAACTTGACTCTGATAGAATCGTACCGGGACAAAAATTAACAATCAA
AGAAGTAGCTGCTCAAAAAGTAGAAAAATCTGTTAGTGCAACATGGCTGAATGTTTCGTCA
TGCTCCTGACGCAAATGAAAAATACTTACTTCCCTAAAAGGCCGTACAGTTGTCAAAGT
AGAAAGTTCTGAAGCTAATGTTTGAACAAGATCTCTTTTGACAATGGTAAAAGTGGTTA
TGTAACCGGAAAATACTTATCTGACGCAAAAGTCGCTGCTCCTGTCGTTACGAAAGCAGT
GACCCACAAAGCAGAAGCAAAAGTCGCTGCTACTTCGACACACGCAGTTAAAGTGGATA
CGAACGCTTCTACTTACAAAGTAAAAAGC**GGTGATACGATCTGGGCTTTAT**CTGTCAAAT
ATGGCGTTCCTGTTCAAAAATTGATCGAATGGAATAATCTTTCTTCTTCTT**CGATCTATGT**
TGGTCAAACGATCGCAGTAAAAGAAGCGGCTG**CTAAAGCTGCTCCAACA**ACTGTAAAAC
AAGCCGCTCCTGCTAAAGTCGCTCCGAAACAAGAAGTGAAGCAAACAGCACCGGCTAAA
CAAGAACAAGCAAACCGGCTGCTAAAGAAACAGTGAAACCAGCTGTTTCCAAGCCAAA
AGCAGCTACACCAGCCCC

Para *L. monocytogenes*

Opción 1

Parameter Set: RT-qPCR (Primers with Probe)

Sequence Name: Sequence 1

Amplicon Length: 117

Forward Imo01F **CAGTTGCACCAACACAAGAAG (Sense)**

Probe Imo01P **ACTACTCAACAAGCTGCACCTGCT (Sense)**

Reverse Imo01R **CTTTAGGCGCAGGTGTAGTT (AntiSense)**

GATACTCTTTGGGGTATCGCACAAAGTAAAGGGACTACTGTTGACGCAATTA AAAAAGCA
ACAATTTAACAACAGATAAAATCGTACCAGGTCAAAAATTACAAGTAAATAATGAGGTTG
CTGCTGCTGAAAAACAGAGAAATCTGTTAGCGCAACTTGGTTAAACGTCCGTAGTGGC
GCTGGTGTGATAACAGTATTATTACGTCCATCAAAGGTGGAACAAAAGTAACTGTTGAA
ACAACCGAATCTAACGGCTGGCACAAAATTACTTACAACGATGGAAAACTGGTTTCGTT
AACGGTAAATACTTAACTGACAAAGCAGTAAGCACTC**CAGTTGCACCAACACAAGAAGTG**

AAAAAAGAACTACTACTCAACAAGCTGCACCTGCTGCAGAAACAAAACTGAAGTAAAA
CAAACACTACACAAGCAACTACACCTGCGCCTAAAGTAGCAGAAACGAAAGAACTCCAGT
AGTAGATCAAATGCTACTACACACGCTGTCAAAGCGGTGACACTATTTGGGCTTTATC
CGTAAAATACGGTGTTTCTGTTCAAGACATTATGTCATGGAATAATTTATCTTCTTCTTA
TTTATGTAGGTCAAAGCTTGCTATTAACAAACTGCTAACACAGCTACTCCAAAAGCAG
AAGTGAAAACGGAAGCTCCAGCAGCTGAAAAACAAGCAGCTCCAGTAGTTAAAGAAAAT
ACTAACACAAATACTGCTACTACAGAGAAAAAAGAAACAGCAACGCAACAACAAACAGCA
CCTAAAGCACCAACAGAAGCTGCAAACCAGCTCCTGCACCATCTACAAACACAAATGC
TAATAAAACGAATACTAATAC
Opción 2

Parameter Set: RT-qPCR (Primers with Probe)

Sequence Name: Sequence 1

Amplicon Length: 144

Forward Imo01F ATCTAACGGCTGGCACAAA (Sense)

Probe Imo02P CTTGTGTTGGTGCAACTGGAGTGC (AntiSense)

Reverse Imo02R GGTGCAGCTTGTTGAGTAGTA (AntiSense)

GATACTCTTTGGGGTATCGCACAAAGTAAAGGGACTACTGTTGACGCAATTA AAAAAGCA
ACAATTTAACAAACAGATAAAAATCGTACCAGGTCAAAAATTACAAGTAAATAATGAGGTTG
CTGCTGCTGAAAAACAGAGAAATCTGTTAGCGCAACTTGGTTAAACGTCCGTAGTGGC
GCTGGTGTGATAACAGTATTATTACGTCCATCAAAGGTGGAACAAAAGTAACTGTTGAA
ACAACCGAATCTAACGGCTGGCACAAAATTACTTACAACGATGGAAAACTGGTTTCGTT
AACGGTAAATACTTAACTGACAAAGCAGTAA GCACTCCAGTTGCACCAACACAAGAAGTG
AAAAAAGAACTACTACTCAACAAGCTGCACCTGCTGCAGAAACAAAACTGAAGTAAAA
CAAACACTACACAAGCAACTACACCTGCGCCTAAAGTAGCAGAAACGAAAGAACTCCAGT
AGTAGATCAAATGCTACTACACACGCTGTCAAAGCGGTGACACTATTTGGGCTTTATC
CGTAAAATACGGTGTTTCTGTTCAAGACATTATGTCATGGAATAATTTATCTTCTTCTTA
TTTATGTAGGTCAAAGCTTGCTATTAACAAACTGCTAACACAGCTACTCCAAAAGCAG
AAGTGAAAACGGAAGCTCCAGCAGCTGAAAAACAAGCAGCTCCAGTAGTTAAAGAAAAT
ACTAACACAAATACTGCTACTACAGAGAAAAAAGAAACAGCAACGCAACAACAAACAGCA
CCTAAAGCACCAACAGAAGCTGCAAACCAGCTCCTGCACCATCTACAAACACAAATGC
TAATAAAACGAATACTAATAC

Para *L. ivanovii*

Opción 1

Parameter Set: RT-qPCR (Primers with Probe)

Sequence Name: Sequence 1

Amplicon Length: 109

Forward liv01F GCTGAAACGAAACCAGAAGTAAA (Sense)

Probe liv01P CCAGCAACTGTTCTTCCTAAAGCGGA (Sense)

Reverse liv01R CAGTGTATGTTGAAGCAGTTGTATC (AntiSense)

TCTGTTACTGCTACTTGGTTGAATGTACGTTCTGGCGCTGGAGTTGATAACAGTATCGTC
ACTTCTTTAAAAGGTGGCACGAAAGTAACTGTTGAATCTACGGAAGCAAATGGCTGGAAC
AAAATTTTCATATGGCGAAGGAAAACTGGTTATGTTAATGGCAAATACTTAGGTA
GTAACAAGTGCCCCTGCACCAGAAGTAAAAGAAGAAACA
ACTACTCAAGCGCAAGCGGC
ACCTGCTGCTGAAACGAAACCAGAAGTAAAACAATCTACA
CCAGCAACTGTTCTTCCTAAAGCGGA
AACAAAAACAGAAACTCCTGCTGTA
GATACA
ACTGCTTCAACATACACTGTTAA
AAGTGGTGACACAATTTGGGCATTATCCAGTAAATATGGCACTTCTGTTCAAAACATAAT
GTCATGGAATAATTTATCTTCTTCTTCTATTTATGTAGGACAAGTTCTTGCTGTTAAACAG
GAAGCTGCTAAA
ACTGCTTCACCAAAGCGGAAGTGAAAACGGAAGCTCCAACAGCTGA
AAAACAAGTATCTGCTCCAGTAGTAAAAGAAAATACTCAA
ACTACAACAGCGAAAAAAGA
AGTTACACCTCAAAACAAACAAATACACAAGCACC
GGCACAAGCTGCAAAACCAGCCC
CTGCCCTGCTCCA
ACTGTTAACACTAACGCTTCTTCTTACACAGTAAA
AGCGGCGACA
CTTTAAGCAAAATTGCTACAACATTTGGA
ACTACAGTTTCCAAAATTAAGCACTTAATGG
CTTAAATAGTGATAACCTTCAAGTTGGACAAGTGT
TAAAAGTAAAAGGTACAGTACCAAC
TGCTAATACAAACAGTAATAGCAATGC

Opción 2

Parameter Set: RT-qPCR (Primers with Probe)

Sequence Name: Sequence 1

Amplicon Length: 81

Forward liv02F GAAACA
ACTACTCAAGCGCAAG (Sense) 214 236 22 62 45.5

Probe liv02P ACCTGCTGCTGAAACGAAACCAGA (Sense) 240 264 24 68 50

Reverse liv02R AAGAACAGTTGCTGGTGTAGAT (AntiSense) 273 295 22 62 40.9

TCTGTTACTGCTACTTGGTTGAATGTACGTTCTGGCGCTGGAGTTGATAACAGTATCGTC
ACTTCTTTAAAAGGTGGCACGAAAGTAACTGTTGAATCTACGGAAGCAAATGGCTGGAAC
AAAATTTTCATATGGCGAAGGAAAACTGGTTATGTTAATGGCAAATACTTAGGTA
GTAACAAGTGCCCCTGCACCAGAAGTAAAAGAAGAAACA
ACTACTCAAGCGCAAGCGGC
ACCTGCTGCTGAAACGAAACCAGAAGTAAAACA
ATCTACACCAGCAACTGTTCTTCCTAA
AGCGGAAACAAAAACAGAAACTCCTGCTGTAGATA
CAACTGCTTCAACATACACTGTTAA
AAGTGGTGACACAATTTGGGCATTATCCAGTAAATATGGCACTTCTGTTCAAAACATAAT
GTCATGGAATAATTTATCTTCTTCTTCTATTTATGTAGGACAAGTTCTTGCTGTTAAACAG
GAAGCTGCTAAA
ACTGCTTCACCAAAGCGGAAGTGAAAACGGAAGCTCCAACAGCTGA

AAAACAAGTATCTGCTCCAGTAGTAAAAGAAAATACTCAAACACTACAACAGCGAAAAAAGA
AGTTACACCTCAAAAACAAACAAATACACAAGCACCGGCACAAGCTGCAAAACCAGCCC
CTGCCCTGCTCCAACCTGTTAACACTAACGCTTCTTCTTACACAGTAAAAAGCGGCGACA
CTTTAAGCAAATTGCTACAACATTTGGAACACTACAGTTTCCAAAATTAAGCACTTAATGG
CTTAAATAGTGATAACCTTCAAGTTGGACAAGTGTTAAAAGTAAAAGGTACAGTACCAAC
TGCTAATACAAACAGTAATAGCAATGC

Para *L. seeligeri*

Opción 1

Parameter Set: RT-qPCR (Primers with Probe)

Sequence Name: Sequence 1

Amplicon Length: 129

Forward Ise01F ACCAGCAGCAACTACTGAAA (Sense)

Probe Ise01P TGCTCCTGCGGTAGATACAAATGCA (Sense)

Reverse Ise01R GCGCCGTATTTAACGGATAATG (AntiSense)

ATGAATATGAAAAAGCAACTATCGCGGCTACAGCCGGGATTGCGGTTACAGCATTGCT
TGCTCCAACCTATCGCATCCGCAAGCACTGTAGTAGTTGAAGCTGGAGATACTCTTTGGG
GTATTGCTCAAGATAATGGCACAACCTGTTGACGCATTAATAAAAAAGCTAACAACTAACAA
CTGATAAAATTGTACCTGGTCAAAAATTACAAGTAACTGAGGTAGCGAGCGAAAAACAG
AGAAATCTGTTAGCGCAACTTGGTTAAACGTACGTTTCAGGCGCTGGAGTTGATAACAGTA
TTGTCACTTCTTTAAAAGGTGGCACTAAAGTAACTGTTGAATCTACAGAAGCAAATGGCT
GGAACAAAATCACTTATGGTGAAGGAAAAACAGGCTACGTTAATGGCAAATACTTAGGTA
ATGCTGTAACAAGTGCTCCGTCTGCTACACCAGAAGTTAAACAAGAGGAAACTACACAA
GCGGCTCCTGCTCAACAAACTAAAACAGAAGTTAAACAAGCTACACCAGCAGCAACTAC
TGAAAAGATGCAGTAGAACTAAAACAACCTGCTCCTGCGGTAGATACAAATGCAACAAC
TCATACCGTTAAAAGTGGCGATACAATTTGGGCATTATCCGTTAATAACGGCGCTTCTGT
TCAAGACCTAATGTCATGGAATAATTTATCTTCTTCTTCTATTTATGTGGGTCAAATATC
GCAGTAAAACAAAGTGCTGCTAAAACACTGCTCCAAAAGCTGAAGCCAAAACAGAAGC
TCCAGCAGCAGAAAAACAAACAGCTGCACCAGTAGTAAAAGAAA

En este caso, el oligonucleótido reverse complementaría con *L. welshimeri*. Sin embargo, el oligonucleótido forward y la sonda no complementaría con ninguna otra especie del género *Listeria*.

Opción 2

Parameter Set: RT-qPCR (Primers with Probe)

Sequence Name: Sequence 1

Amplicon Length: 105

Forward Ise02F **TGTAACAAGTGCTCCGTCTG (Sense)**

Probe Ise02P **AGCGGCTCCTGCTCAACAACTAA (Sense)**

Reverse Ise02R **GCTGGTGTAGCTTGTTTAACTTC (AntiSense)**

ATGAATATGAAAAAGCAACTATCGCGGCTACAGCCGGGATTGCGGTTACAGCATTTC
TGCTCCAACATCGCATCCGCAAGCACTGTAGTAGTTGAAGCTGGAGATACTCTTTGGG
GTATTGCTCAAGATAATGGCACAACCTGTTGACGCATTAAGCTAACAACTAACAA
CTGATAAAATTGTACCTGGTCAAAAATTACAAGTAAGTACGAGGTAGCGAGCGAAAAACAG
AGAAATCTGTTAGCGCAACTTGGTTAAACGTACGTTTCAGGCGCTGGAGTTGATAACAGTA
TTGTCACTTCTTTAAAAGGTGGCACTAAAGTAAGTGTGAATCTACAGAAGCAAATGGCT
GGAACAAAATCACTTATGGTGAAGGAAAAACAGGCTACGTTAATGGCAAATACTTAGGTA
ATGCT**TGTAACAAGTGCTCCGTCTG**CTACACCAGAAGTTAAACAAGAGGAACTACACAA
GCGGCTCCTGCTCAACAACTAAACA**GAAGTTAAACAAGCTACACCAGC**AGCAACTAC
TGAAAAAGATGCAGTAGAACTAAAACAACCTGCTCCTGCGGTAGATACAAATGCAACAAC
TCATACCGTTAAAAGTGGCGATAACAATTTGGGCATTATCCGTTAAATACGGCGCTTCTGT
TCAAGACCTAATGTCATGGAATAATTTATCTTCTTCTTCTATTTATGTGGGTCAAATATC
GCAGTAAAACAAAGTGCTGCTAAAACACTGCTCCAAAAGCTGAAGCCAAAACAGAAGC
TCCAGCAGCAGAAAAACAAACAGCTGCACCAGTAGTAAAAGAAA

En este caso el oligonucleótido forward es complementario un 75% con el de *L. monocytogenes*. Sin embargo, el oligonucleótido reverse y la sonda no son complementarios con ninguna otra especie del género *Listeria*.

Para *L. welshimeri*

Opción 1

Parameter Set: RT-qPCR (Primers with Probe)

Sequence Name: Sequence 1

Amplicon Length: 102

Forward Iwe01F **CAAGTGCTCCTGTTGCTAAAC (Sense)**

Probe Iwe01P **ACAACTGCACCTGCTGCAGAAAC (Sense)**

Reverse Iwe01R **GGGCAGGTGTTGATTGTTTC (AntiSense)**

GCTACTTGGTTAAATGTTTCGTTCTGGTGCTGGAGTTGACAATAGTATTGTTACTTCCCTAA
AAGGCGGTACAAAAGTAACTGTCTGAAGCAGCTGAATCTAATGGCTGGAATAAAATTTCTT
ATGGCGAAGGAAAACTGGTTATGTTAATGGCAAATACTTAGGTGATGCTGTGACAAGTG
CTCCTGTTGCTAAACAAGAAGTAAAACAAGAAACGACAAAACAACCTGCACCTGCTGCAG
AACTAAAACAGAAGTGAAACAATCAACACCTGCCCTACTGCTCCAAAAGCAGCGGAA
ACTAAAACAGCACCAGTAGTAGATACTAATGCTACTACTCATACTGTAAAAAGCGGTGAC
ACAATTTGGGCGTTATCCGTTAAATACGGCGCTTCAGTTCAAGATTTAATGTCATGGAAT
AATTTATCTTCTTCTTCTATTTATGTAGGACAAAAAATTGCTGTAAACAAGCGCTGCTA
AACTGCTGCTCCAAAAGCAGAAGT

En este caso la sonda es complementaria con la de *L. monocytogenes*. Sin embargo, los oligonucleótidos no son complementarios con ninguna otra especie del género *Listeria*.

Opción 2

Parameter Set: RT-qPCR (Primers with Probe)

Sequence Name: Sequence 1

Amplicon Length: 150

Forward lwe02F GGTGCTGGAGTTGACAATAGTA (Sense)

Probe lwe02P CGAAGCAGCTGAATCTAATGGCTGGA (Sense)

Reverse lwe02R CACAGCATCACCTAAGTATTTGC (AntiSense)

GCTACTTGGTTAAATGTTTCGTTCTGGTGCTGGAGTTGACAATAGTATTGTTACTTCCCTAA
AAGGCGGTACAAAAGTAACTGTCTGAAGCAGCTGAATCTAATGGCTGGAATAAAATTTCTT
ATGGCGAAGGAAAACTGGTTATGTTAATGGCAAATACTTAGGTGATGCTGTGACAAGTG
CTCCTGTTGCTAAACAAGAAGTAAAACAAGAAACGACAAAACAACCTGCACCTGCTGCAG
AACTAAAACAGAAGTGAAACAATCAACACCTGCCCTACTGCTCCAAAAGCAGCGGAA
ACTAAAACAGCACCAGTAGTAGATACTAATGCTACTACTCATACTGTAAAAAGCGGTGAC
ACAATTTGGGCGTTATCCGTTAAATACGGCGCTTCAGTTCAAGATTTAATGTCATGGAAT
AATTTATCTTCTTCTTCTATTTATGTAGGACAAAAAATTGCTGTAAACAAGCGCTGCTA
AACTGCTGCTCCAAAAGCAGAAGT

Para este caso el oligonucleótido reverse es complementaria con *L. seeligeri*. Sin embargo, el oligonucleótido forward y la sonda no son complementarios con ninguna otra especie del género *Listeria*.

5.2 Análisis de los oligonucleótidos y sondas

El análisis de sondas y oligonucleótidos se realiza para ver que si hay formación de dímeros y determinar qué combinación de oligonucleótidos y sondas son las más aptas para ser usados en la PCR multiplex para la diferenciación de las especies del género *Listeria*.

El análisis se realizó usando el software en línea de Integrated DNA Technologies anteriormente mencionado. Para considerar que un juego de oligonucleótidos y sonda es la mejor; considerando la formación de Hetero dímeros, tomando como aceptado un ΔG mayor a -9 kcal/mol, especificidad basado en la base de datos del NCBI.

Para *L. innocua*

Opción 1

Amplicon Length: 99

Forward lin01F GTAAACGAGGTTGCTACTGAAGA (Sense)

Probe lin01P TGGCTTAATGTACGTTCTGGCGCT (Sense)

Reverse lin01R AGTAAGAATGCTGTGGTCAACT (AntiSense)

Forward lin01F 5'- GTAAACGAGGTTGCTACTGAAGA -3'	Delta G: -6.9 kcal/mol Base Pairs: 4 5' GTAAACGAGGTTGCTACTGAAGA : : 3' TCGCGGTCTTGCATGTAATTCGGT
Probe lin01P 5'- TGGCTTAATGTACGTTCTGGCGCT -3' Maximum Delta G: -48.27 kcal/mol	
Forward lin01F 5'- GTAAACGAGGTTGCTACTGAAGA -3'	Delta G: -5.24 kcal/mol Base Pairs: 4 5' GTAAACGAGGTTGCTACTGAAGA 3' TCAACTGGTGTCGTAAGAATGA
Reverse lin01R 5'- AGTAAGAATGCTGTGGTCAACT -3' Maximum Delta G: -39.91 kcal/mol	
Probe lin01P 5'- TGGCTTAATGTACGTTCTGGCGCT -3'	Delta G: -5.12 kcal/mol Base Pairs: 4 5' TGGCTTAATGTACGTTCTGGCGCT : : : 3' TCAACTGGTGTCGTAAGAATGA
Reverse lin01R 5'- AGTAAGAATGCTGTGGTCAACT -3'	

Maximum Delta G: -48.27 kcal/mol	
----------------------------------	--

Opción 2

Amplicon Length: 112

Forward lin02 F **CGCAACTTGGCTTAATGTACG (Sense)**

Probe lin02P **CGCTGGAGTTGACCACAGCATTCT (Sense)**

Reverse lin02R **GTGCCAACCGTTTGATTCTG (AntiSense)**

Forward lin02 5'- CGCAACTTGGCTTAATGTACG -3'	Delta G: -6.84 kcal/mol Base Pairs: 5 5' CGCAACTTGGCTTAATGTACG
Probe lin02P 5'- CGCTGGAGTTGACCACAGCATTCT - 3' Maximum Delta G: -46.31 kcal/mol	3' TCTTACGACACCAGTTGAGGTCGC
Forward lin02 F 5'- CGCAACTTGGCTTAATGTACG -3'	Delta G: -10.11 kcal/mol Base Pairs: 5 5' CGCAACTTGGCTTAATGTACG
Reverse lin02R 5'- GTGCCAACCGTTTGATTCTG -3' Maximum Delta G: -40.83 kcal/mol	3' GTCTTAGTTTGCCAACCGTG
Probe lin02P 5'- CGCTGGAGTTGACCACAGCATTCT -3'	Delta G: -5.24 kcal/mol Base Pairs: 4 5' CGCTGGAGTTGACCACAGCATTCT :
Reverse lin02R 5'- GTGCCAACCGTTTGATTCTG -3' Maximum Delta G: -46.31 kcal/mol	3' GTCTTAGTTTGCCAACCGTG

Para *L. grayi*

Opción 1

Amplicon Length: 137

Forward Igr01F **CCATCGGTTGTCTCAGCAAATA (Sense)**

Probe Igr01P **AGTGTATCACCAGATGCGACAACCAC (AntiSense)**

Reverse Igr01R **TGTCCCGGTACGATTCTATCA (AntiSense)**

Forward Igr01F 5'- CCATCGGTTGTCTCAGCAAATA -3'	Delta G: -11.23 kcal/mol	Base Pairs: 7
--	--------------------------	---------------

Probe Igr01P 5'- AGTGTATCACCAGATGCGACAACCAC - 3' Maximum Delta G: -46.44 kcal/mol	5' CCATCGGTTGTCTCAGCAAATA :: : 3' CACCAACAGCGTAGACCACTAT GTGA
Forward Igr01F 5'- CCATCGGTTGTCTCAGCAAATA -3'	Delta -6.68 Base G: kcal/mol Pairs: 3
Reverse Igr01R 5'- TGTCCCGGTACGATTCTATCA -3' Maximum Delta G: -41.05 kcal/mol	5' CCATCGGTTGTCTCAGCAAATA : 3' ACTATCTTAGCATGGCCCTGT
Probe Igr01P 5'- AGTGTATCACCAGATGCGACAACCAC -3'	Delta -4.87 Base G: kcal/mol Pairs: 4
Reverse Igr01R 5'- TGTCCCGGTACGATTCTATCA -3' Maximum Delta G: -46.44 kcal/mol	5' AGTGTATCACCAGATGCGACA ACCAC : : : 3' ACTATCTTAGCATGGCCCTGT

Opción 2

Amplicon Length: 145

Forward Igr02F **GGTGATACGATCTGGGCTTTAT (Sense)**

Probe Igr02P **CGATCTATGTTGGTCAAACGATCGCAGT (Sense)**

Reverse Igr02R **CAGTTGTTGGAGCAGCTTTAG (AntiSense)**

Forward Igr02F 5'- GGTGATACGATCTGGGCTTTAT -3'	Delta G: -8.24 kcal/mol Base Pairs: 5 5' GGTGATACGATCTGGGCTTTAT : : 3' TGACGCTAGCAAACGATCGCAG C
Probe Igr02P 5'- CGATCTATGTTGGTCAAACGATCGCAG T -3' Maximum Delta G: -52.52 kcal/mol	
Forward Igr02F 5'- GGTGATACGATCTGGGCTTTAT -3'	Delta G: -4.74 kcal/mol Base Pairs: 3 5' GGTGATACGATCTGGGCTTTAT : : : 3' GATTTCGACGAGGTTGTTGAC
Reverse Igr02R 5'- CAGTTGTTGGAGCAGCTTTAG -3' Maximum Delta G: -40.71 kcal/mol	

Probe Igr02P 5'- CGATCTATGTTGGTCAAACGATCGCAG T -3'	Delta G: -3.9 kcal/mol Base Pairs: 3 5' CGATCTATGTTGGTCAAACGATCGCAGT : : : 3' GATTCGACGAGGTTGTTGAC
Reverse Igr02R 5'- CAGTTGTTGGAGCAGCTTTAG -3' Maximum Delta G: -52.52 kcal/mol	

Para *L. monocytogenes*

Opción 1

Amplicon Length: 117

Forward Imo01F CAGTTGCACCAACACAAGAAG (Sense)

Probe Imo01P ACTACTCAACAAGCTGCACCTGCT (Sense)

Reverse Imo01R CTTTAGGCGCAGGTGTAGTT (AntiSense)

Forward Imo01F 5'- CAGTTGCACCAACACAAGAAG -3'	Delta G: -7.05 kcal/mol Base Pairs: 4 5' CAGTTGCACCAACACAAGAAG ::: : ::: 3' TCGTCCACGTCGAACAACATCA
Probe Imo01P 5'- ACTACTCAACAAGCTGCACCTGCT -3' Maximum Delta G: -43.64 kcal/mol	
Forward Imo01F 5'- CAGTTGCACCAACACAAGAAG -3'	Delta G: -6.37 kcal/mol Base Pairs: 4 5' CAGTTGCACCAACACAAGAAG : : : : : 3' TTGATGTGGACGCGGATTTC
Reverse Imo01R 5'- CTTTAGGCGCAGGTGTAGTT -3' Maximum Delta G: -38.11 kcal/mol	
Probe Imo01P 5'- ACTACTCAACAAGCTGCACCTGCT -3'	Delta G: -13.06 kcal/mol Base Pairs: 7 5' ACTACTCAACAAGCTGCACCTGCT : : : 3' TTGATGTGGACGCGGATTTC
Reverse Imo01R 5'- CTTTAGGCGCAGGTGTAGTT -3' Maximum Delta G: -43.64 kcal/mol	

Opción 2

Amplicon Length: 144

Forward Imo01F ATCTAACGGCTGGCACAAA (Sense)

Probe Imo02P CTTGTGTTGGTGCAACTGGAGTGC (AntiSense)

Reverse lmo02R **GGTGCAGCTTGTGAGTAGTA (AntiSense)**

Forward lmo01F 5'- ATCTAACGGCTGGCACAAA -3'	Delta G: -7.19 kcal/mol Base Pairs: 5 5' ATCTAACGGCTGGCACAAA : 3' CGTGAGGTCAACGTGGTTGTGTTCC
Probe lmo02P 5'- CTTGTGTTGGTGCAACTGGAGTGC - 3' Maximum Delta G: -45.01 kcal/mol	
Forward lmo01F 5'- ATCTAACGGCTGGCACAAA -3'	Delta G: -6.69 kcal/mol Base Pairs: 4 5' ATCTAACGGCTGGCACAAA :: : 3' ATGATGAGTTGTTCCGACGTGG
Reverse lmo02R 5'- GGTGCAGCTTGTGAGTAGTA -3' Maximum Delta G: -37.61 kcal/mol	
Probe lmo02P 5'- CTTGTGTTGGTGCAACTGGAGTGC - 3'	Delta G: -7.05 kcal/mol Base Pairs: 4 5' CTTGTGTTGGTGCAACTGGAGTGC :: : : 3' ATGATGAGTTGTTCCGACGTGG
Reverse lmo02R 5'- GGTGCAGCTTGTGAGTAGTA -3' Maximum Delta G: -45.01 kcal/mol	

Para *L. ivanovii*

Opción 1

Amplicon Length: 109

Forward liv01F **GCTGAAACGAAACCAGAAGTAAA (Sense)**

Probe liv01P **CCAGCAACTGTTCTTCCTAAAGCGGA (Sense)**

Reverse liv01R **CAGTGATGTTGAAGCAGTTGTATC (AntiSense)**

Forward liv01F 5'- GCTGAAACGAAACCAGAAGTAAA -3'	Delta -6.69 Base G: kcal/mol Pairs: 4
Probe liv01P 5'- CCAGCAACTGTTCTTCCTAAAGCGGA - 3' Maximum Delta G: -51.04 kcal/mol	5' GCTGAAACGAAACCAGAAGTAAA 3' AGGCGAAATCCTTCTTGTCAACGACC
Forward liv01F 5'- GCTGAAACGAAACCAGAAGTAAA -3'	Delta -4.74 Base G: kcal/mol Pairs: 3 5' GCTGAAACGAAACCAGAAGTAA

Reverse liv01R 5'- CAGTGTATGTTGAAGCAGTTGTATC -3' Maximum Delta G: -41.85 kcal/mol	A :: : :: 3' CTATGTTGACGAAGTTGTATGTGAC
Probe liv01P 5'- CCAGCAACTGTTCTTCCTAAAGCGGA -3'	Delta -8.79 Base G: kcal/mol Pairs: 6 5' CCAGCAACTGTTCTTCCTAAAGCGGA
Reverse liv01R 5'- CAGTGTATGTTGAAGCAGTTGTATC -3' Maximum Delta G: -51.04 kcal/mol	: : : : 3' CTATGTTGACGAAGTTGTATGTGAC

Opción 2

Amplicon Length: 81

Forward liv02F **GAAACA**ACTACTCAAGCGCAAG (Sense)

Probe liv02P **ACCTGCTGCTGAAACGAAACCAGA** (Sense)

Reverse liv02R **AAGAACAGTTGCTGGTGTAGAT** (AntiSense)

Forward liv02F 5'- GAAACA ACTACTCAAGCGCAAG -3'	Delta G: -5.09 kcal/mol Base Pairs: 3 5' GAAACA ACTACTCAAGCGCAAG : :: : 3' AGACCAAAGCAAAGTCGTCGTCCA
Probe liv02P 5'- ACCTGCTGCTGAAACGAAACCAGA -3' Maximum Delta G: -46.77 kcal/mol	
Forward liv02F 5'- GAAACA ACTACTCAAGCGCAAG -3'	Delta G: -7.04 kcal/mol Base Pairs: 4 5' GAAACA ACTACTCAAGCGCAAG : :: 3' TAGATGTGGTCGTTGACAAGAA
Reverse liv02R 5'- AAGAACAGTTGCTGGTGTAGAT -3' Maximum Delta G: -40 kcal/mol	
Probe liv02P 5'- ACCTGCTGCTGAAACGAAACCAGA -3'	Delta G: -7.96 kcal/mol Base Pairs: 5 5' ACCTGCTGCTGAAACGAAACCAGA : : : 3' TAGATGTGGTCGTTGACAAGAA
Reverse liv02R 5'- AAGAACAGTTGCTGGTGTAGAT -3' Maximum Delta G: -46.77 kcal/mol	

Para *L. seeligeri*

Opción 1

Amplicon Length: 129

Forward Ise01F ACCAGCAGCAACTACTGAAA (Sense)

Probe Ise01P TGCTCCTGCGGTAGATACAAATGCA (Sense)

Reverse Ise01R GCGCCGTATTTAACGGATAATG (AntiSense)

Forward Ise01F 5'- ACCAGCAGCAACTACTGAAA -3'	Delta G: -6.69 kcal/mol Base Pairs: 4 5' ACCAGCAGCAACTACTGAAA : 3' ACGTAAACATAGATGGCGTCCTCGT
Probe Ise01P 5'- TGCTCCTGCGGTAGATACAAATGCA -3' Maximum Delta G: -48.33 kcal/mol	
Forward Ise01F 5'- ACCAGCAGCAACTACTGAAA -3'	Delta G: -3.89 kcal/mol Base Pairs: 3 5' ACCAGCAGCAACTACTGAAA : : 3' GTAATAGGCAATTTATGCCGCG
Reverse Ise01R 5'- GCGCCGTATTTAACGGATAATG - 3' Maximum Delta G: -44.55 kcal/mol	
Probe Ise01P 5'- TGCTCCTGCGGTAGATACAAATGCA -3'	Delta G: -6.75 kcal/mol Base Pairs: 3 5' TGCTCCTGCGGTAGATACAAATGCA : : 3' GTAATAGGCAATTTATGCCGCG
Reverse Ise01R 5'- GCGCCGTATTTAACGGATAATG - 3' Maximum Delta G: -48.33 kcal/mol	

Opción 2

Amplicon Length: 105

Forward Ise02F TGTAACAAGTGCTCCGTCTG (Sense)

Probe Ise02P AGCGGCTCCTGCTCAACAACTAA (Sense)

Reverse Ise02R GCTGGTGTAGCTTGTTTAACTTC (AntiSense)

Forward Ise02F 5'- TGTAACAAGTGCTCCGTCTG -3'	Delta G: -6.68 kcal/mol Base Pairs: 3 5' TGTAACAAGTGCTCCGTCTG
Probe Ise02P	

5'- AGCGGCTCCTGCTCAACAAACTAA -3' Maximum Delta G: -47.59 kcal/mol	<pre> ::: : 3' AATCAAACAACCTCGTCCTCGGCGA </pre>
Forward Ise02F 5'- TGTAACAAGTGCTCCGTCTG -3'	Delta G: -8.78 kcal/mol Base Pairs: 6
Reverse Ise02R 5'- GCTGGTGTAGCTTGTTTAACTTC -3' Maximum Delta G: -40.19 kcal/mol	<pre> 5' TGTAACAAGTGCTCCGTCTG : : 3' CTTCAATTTGTTTCGATGTGGTTCG </pre>
Probe Ise02P 5'- AGCGGCTCCTGCTCAACAAACTAA -3'	Delta G: -7.18 kcal/mol Base Pairs: 5
Reverse Ise02R 5'- GCTGGTGTAGCTTGTTTAACTTC -3' Maximum Delta G: -47.59 kcal/mol	<pre> 5' AGCGGCTCCTGCTCAACAAACTAA : : : : 3' CTTCAATTTGTTTCGATGTGGTTCG </pre>

Para *L. welshimeri*

Opción 1

Amplicon Length: 102

Forward Iwe01F **CAAGTGCTCCTGTTGCTAAAC (Sense)**

Probe Iwe01P **ACAAACTGCACCTGCTGCAGAAAC (Sense)**

Reverse Iwe01R **GGGCAGGTGTTGATTGTTTC (AntiSense)**

Forward Iwe01F 5'- CAAGTGCTCCTGTTGCTAAAC -3'	Delta G: -6.44 kcal/mol Base Pairs: 4
Probe Iwe01P 5'- ACAAAGTGCACCTGCTGCAGAAAC -3' Maximum Delta G: -45.33 kcal/mol	<pre> 5' CAAGTGCTCCTGTTGCTAAAC :: : : 3' CAAAGACGTCGTCCACGTCAAACA </pre>
Forward Iwe01F 5'- CAAGTGCTCCTGTTGCTAAAC -3'	Delta G: -6.62 kcal/mol Base Pairs: 4
Reverse Iwe01R 5'- GGGCAGGTGTTGATTGTTTC -3' Maximum Delta G: -38.19 kcal/mol	<pre> 5' CAAGTGCTCCTGTTGCTAAAC : : 3' CTTTGTTAGTTGTGGACGGG </pre>
Probe Iwe01P 5'- ACAAAGTGCACCTGCTGCAGAAAC -3'	Delta G: -13.06 kcal/mol Base Pairs: 7
Reverse Iwe01R	<pre> 5' ACAAAGTGCACCTGCTGCAGAAAC ::: : 3' CTTTGTTAGTTGTGGACGGG </pre>

5'- GGGCAGGTGTTGATTGTTTC -3' Maximum Delta G: -45.33 kcal/mol	
--	--

Opción 2

Amplicon Length: 150

Forward lwe02F GGTGCTGGAGTTGACAATAGTA (Sense)

Probe lwe02P CGAAGCAGCTGAATCTAATGGCTGGA (Sense)

Reverse lwe02R CACAGCATCACCTAAGTATTTGC (AntiSense)

Forward lwe02F 5'- GGTGCTGGAGTTGACAATAGTA -3'	Delta G: -6.69 kcal/mol Base Pairs: 4 5' GGTGCTGGAGTTGACAATAGTA
Probe lwe02P 5'- CGAAGCAGCTGAATCTAATGGCTGGA - 3' Maximum Delta G: -51.02 kcal/mol	3' AGGTCGGTAATCTAAGTCGACGAAGC
Forward lwe02F 5'- GGTGCTGGAGTTGACAATAGTA -3'	Delta G: -8.65 kcal/mol Base Pairs: 5 5' GGTGCTGGAGTTGACAATAGTA :
Reverse lwe02R 5'- CACAGCATCACCTAAGTATTTGC -3' Maximum Delta G: -40.22 kcal/mol	3' CGTTTATGAATCCACTACGACAC
Probe lwe02P 5'- CGAAGCAGCTGAATCTAATGGCTGGA -3'	Delta G: -6.69 kcal/mol Base Pairs: 4 5' CGAAGCAGCTGAATCTAATGGCTGGA : :
Reverse lwe02R 5'- CACAGCATCACCTAAGTATTTGC -3' Maximum Delta G: -51.02 kcal/mol	3' CGTTTATGAATCCACTACGACAC

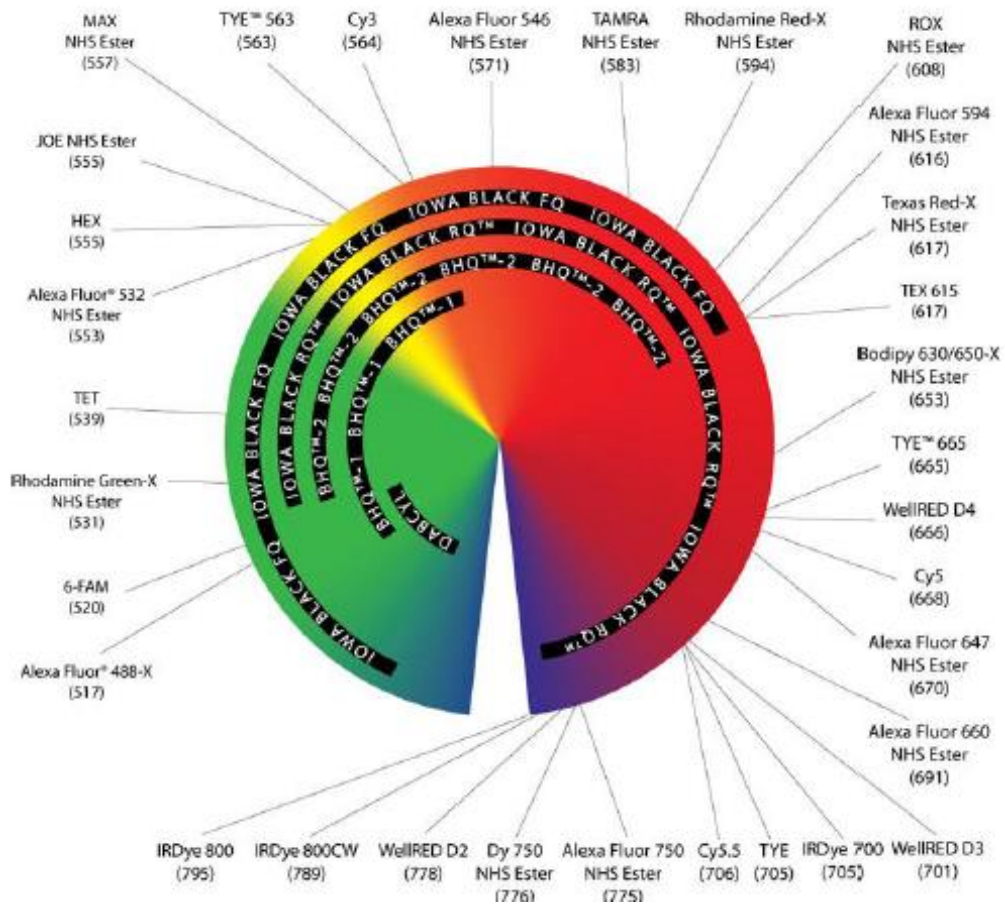
5.3 Síntesis de oligonucleótidos

Para fines prácticos la PCR-TR Multiplex se realizó en dos etapas divididas en Mix1 y Mix2; el Mix 1 puede detectar a *L. innocua*, *L. monocytogenes* y *L. invanovii* y el Mix2 puede detectar *L. grayi*, *L. seeligeri* y *L. welshimeri*. Usando como fluoróforos el FAM, TET y Cy5 en ambos Mix.

Una vez que se seleccionó una de las opciones de oligonucleótidos y sonda para cada una de las especies de *Listeria*, se solicitó la síntesis de estas con base en la siguiente tabla:

Opción	ID	Secuencia 5' - 3'	
2	Lin02 F	CGCAACTTGGCTTAATGTACG	MIX 1
	Lin02R	GTGCCAACCGTTTGATTCTG	
	Lin02P	FAM-CGCTGGAGTTGACCACAGCATTCT-MGB	
1	Lmo01F	ATCTAACGGCTGGCACAAA	
	Lmo02R	GGTGCAGCTTGTTGAGTAGTA	
	Lmo02P	TET-CTTGTGTTGGTGCAACTGGAGTGC-MGB	
2	Liv02F	GAAACAACACTCAAGCGCAAG	
	Liv02R	AAGAACAGTTGCTGGTGTAGAT	
	Liv02P	Cy5-ACCTGCTGCTGAAACGAAACCAGA-MGB	
2	Lgr02F	GGTGATACGATCTGGGCTTTAT	MIX 2
	Lgr02R	CAGTTGTTGGAGCAGCTTTAG	
	Lgr02P	FAM-CGATCTATGTTGGTCAAACGATCGCAGT-MGB	
1	Lse01F	ACCAGCAGCAACTACTGAAA	
	Lse01R	GCGCCGTATTTAACGGATAATG	
	Lse01P	TET-TGCTCCTGCGGTAGATACAAATGCA-MGB	
2	Lwe02F	GGTGCTGGAGTTGACAATAGTA	
	Lwe02R	CACAGCATCACCTAAGTATTTGC	
	Lwe02P	Cy5-CGAAGCAGCTGAATCTAATGGCTGGA-MGB	

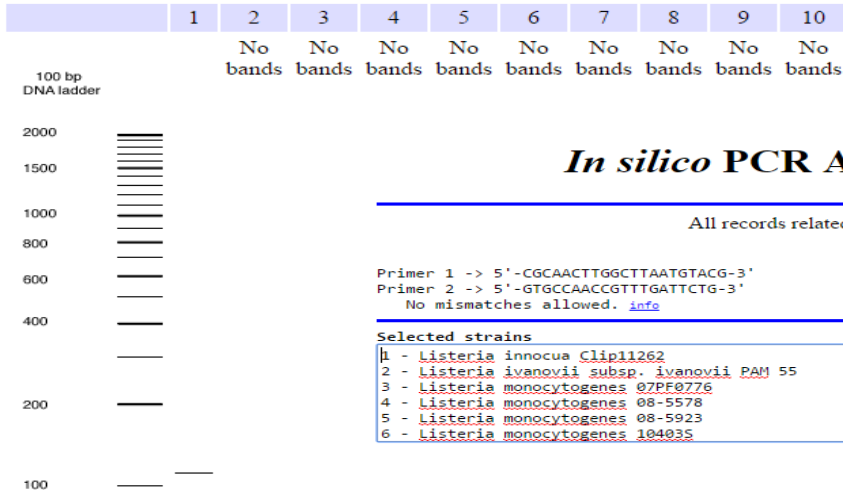
Las sondas fueron seleccionadas con base en la capacidad del equipo Smart Cycler II, el equipo se utilizó para realizar la estandarización de la PCR multiplex. Los fluoróforos a emplear (FAM, TET y Cy5), se seleccionaron con base en la siguiente imagen:



5.4 PCR *in silico*

Se realizó una simulación de la reacción de PCR en el sitio web <http://insilico.ehu.es/PCR/> empleando las secuencias de los oligonucleótidos que se sintetizaron y las secuencias del genero *Listeria* disponibles en este sitio web, para obtener más información de la eficiencia de estos. Los resultados obtenidos fueron las siguientes:

Para *L. innocua*



In silico PCR Amplification

All records related to this experiment will be removed from server after 72 h, or you may [delete](#) them now.

Primer 1 -> 5'-CGCAACTTGGCTTAATGTACG-3'
 Primer 2 -> 5'-GTGCCAACCGTTTGATTCTG-3'
 No mismatches allowed. [info](#)

Selected strains

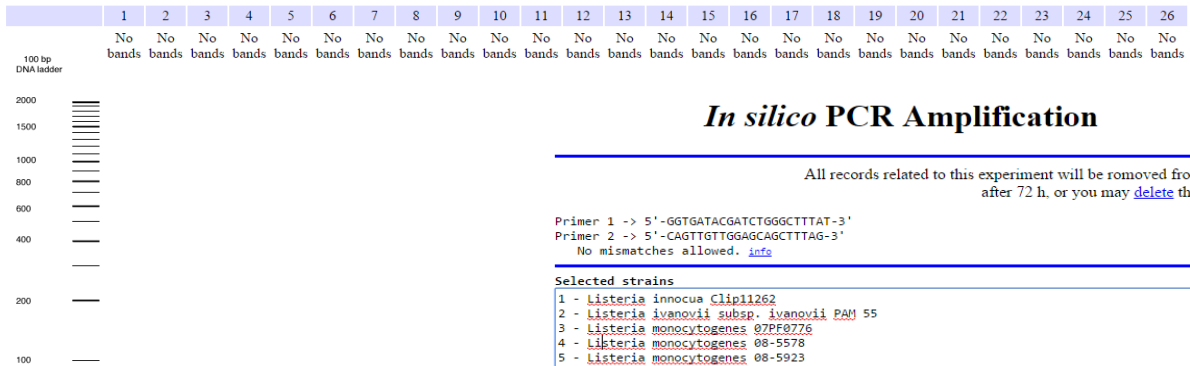
```

1 - Listeria innocua Clip11262
2 - Listeria ivanovii subsp. ivanovii PAM 55
3 - Listeria monocytogenes 07PF0776
4 - Listeria monocytogenes 08-5578
5 - Listeria monocytogenes 08-5923
6 - Listeria monocytogenes 104035
  
```

No. Bands (1)
[112](#)

La amplificación fue la esperada, y de igual forma no amplifica con ninguna otra especie del genero *Listeria*.

Para *L. grayi*



In silico PCR Amplification

All records related to this experiment will be removed from server after 72 h, or you may [delete](#) them now.

Primer 1 -> 5'-GGTGATACGATCTGGGCTTAT-3'
 Primer 2 -> 5'-CAGTTGTTGGAGCAGCTTAG-3'
 No mismatches allowed. [info](#)

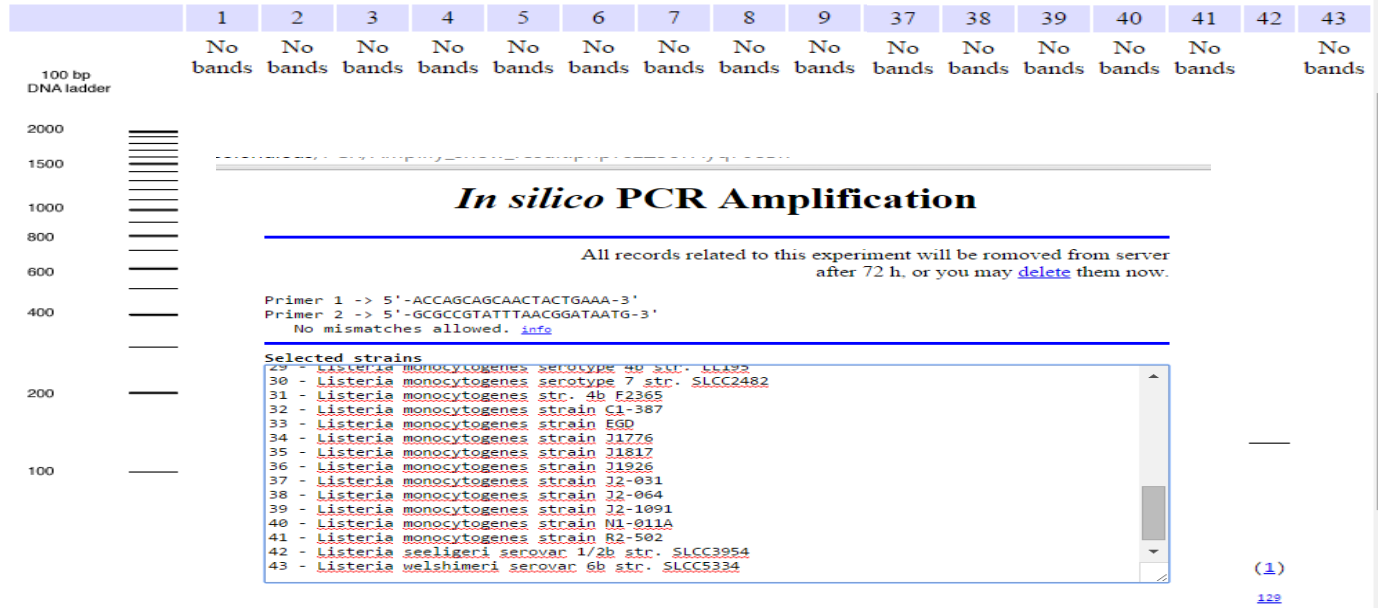
Selected strains

```

1 - Listeria innocua Clip11262
2 - Listeria ivanovii subsp. ivanovii PAM 55
3 - Listeria monocytogenes 07PF0776
4 - Listeria monocytogenes 08-5578
5 - Listeria monocytogenes 08-5923
6 - Listeria monocytogenes 104035
7 - Listeria monocytogenes ATCC 19117
8 - Listeria monocytogenes Clp81459
9 - Listeria monocytogenes E60
10 - Listeria monocytogenes FSL R2-561
11 - Listeria monocytogenes Finland 199
12 - Listeria monocytogenes HCC23
13 - Listeria monocytogenes J0161
14 - Listeria monocytogenes J1-220
15 - Listeria monocytogenes J1816
16 - Listeria monocytogenes L312
17 - Listeria monocytogenes L99
18 - Listeria monocytogenes La111
19 - Listeria monocytogenes M7
20 - Listeria monocytogenes N53-1
21 - Listeria monocytogenes SLCC2372
22 - Listeria monocytogenes SLCC2376
23 - Listeria monocytogenes SLCC2378
24 - Listeria monocytogenes SLCC2479
25 - Listeria monocytogenes SLCC2540
26 - Listeria monocytogenes SLCC2755
27 - Listeria monocytogenes SLCC5850
  
```

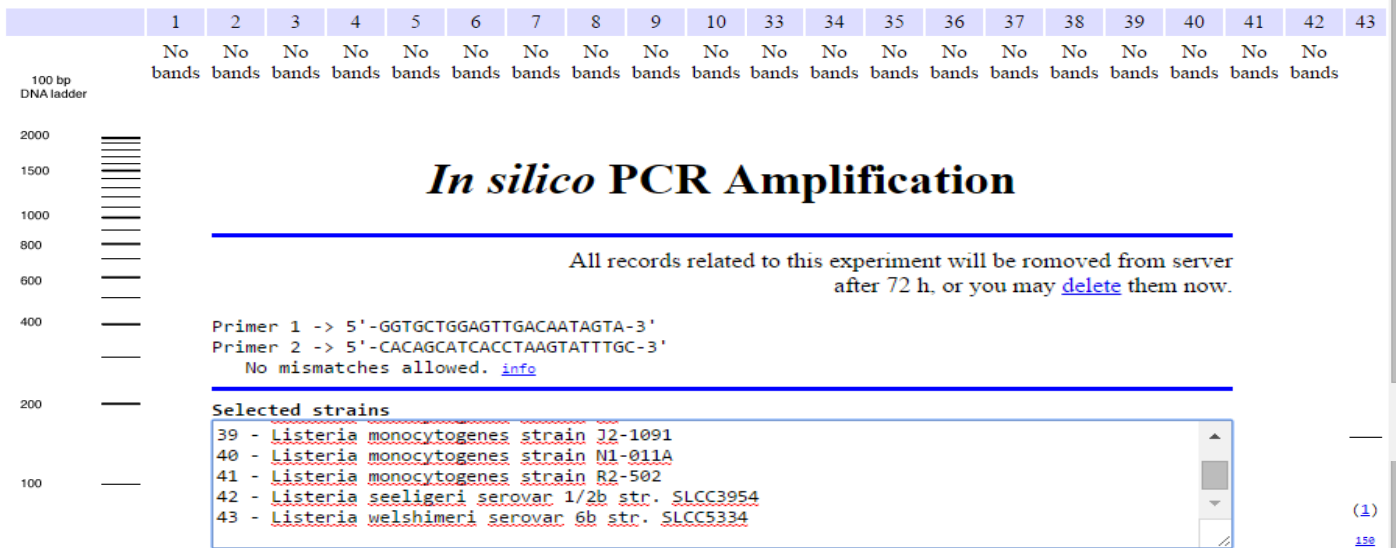

La amplificación fue la esperada con las especies de *Listeria ivanovii*, y de igual forma no amplifica con ninguna otra especie del genero *Listeria*.

Para *L. seeligeri*



La amplificación fue la esperada con las especies de *Listeria seeligeri*, y de igual forma no amplifica con ninguna otra especie del genero *Listeria*.

Para *L. welshimeri*



La amplificación fue la esperada con las especies de *Listeria welshimeri*, y de igual forma no amplifica con ninguna otra especie del genero *Listeria*.

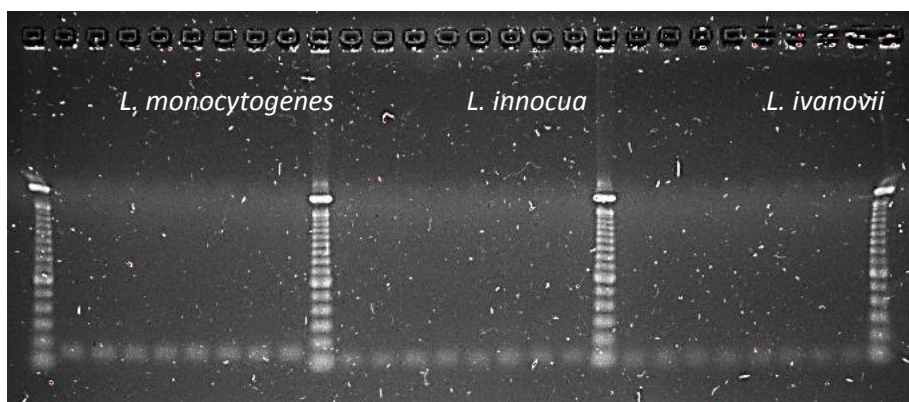
5.5 PCR de punto final

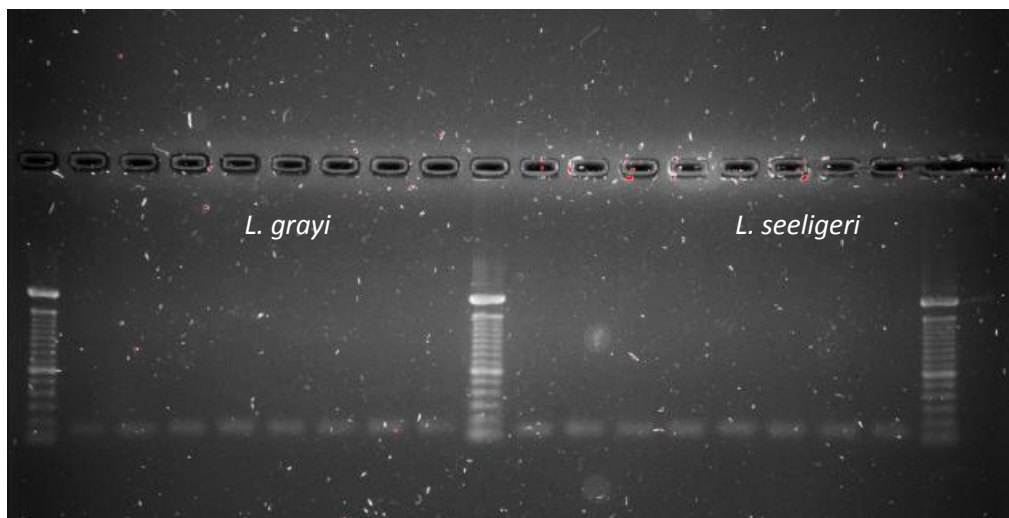
Se realizó esta prueba para verificar la temperatura óptima de los oligonucleótidos; usando las mismas condiciones de la química de PCR:

Tabla 1. Reacción de PCR punto final

Reactivo	Concentración por reacción
Hot Start Taq Polimerasa TaKaRa	1.5 U
dNTPs	200 μ M
MgCl ₂	4 mM
HEPES pH 8.0 \pm 0.1	25 mM
Oligonucleótido Forward	0.2 μ M
Oligonucleótido Reverse	0.2 μ M

Se usó un termociclador BIO-RAD, con una programación basada en la que se usaría para la reacción de PCR en tiempo real. Las temperaturas que se evaluaron fueron de 62, 61.5, 60.6, 59.3, 57.7, 56.3, 55.5 y 55°C. Los resultados obtenidos se observan en las siguientes imágenes:





5.6 Estandarización de la técnica de PCR-TR Multiplex.

Se realizó la hidratación de los oligonucleótidos y sondas para una concentración 100 nM, posteriormente se hicieron alícuotas con concentraciones de 10 nM. Para estandarizar la reacción de PCR-TR se empleó la mezcla de reactivos OmniMix HS preparada y dispensada, lista para su uso en reacciones de PCR suministrada en perlas; Las perlas se reconstituyeron con 50 μ L de agua destilada estéril, para obtener las siguientes concentraciones por reacción:

Tabla 2. Reacción de PCR Tiempo real

Reactivo	Concentración por reacción
Hot Start Taq Polimerasa TaKaRa	1.5 U
dNTPs	200 μ M
MgCl ₂	4 Mm
HEPES pH 8.0 \pm 0.1	25 mM
Oligonucleótido Forward	0.2 μ M
Oligonucleótido Reverse	0.2 μ M
Sonda	0.2 μ M

Primero se realizó la PCR por separado, con las concentraciones de reactivos anteriormente mencionadas y en las siguientes condiciones del termociclador:

Desnaturalización: 95°C durante 02:00 segundos con los ópticos desconectados.

Hibridación: 35 ciclos a 95°C durante 00:10 segundos

60°C durante 00:30 segundos

72°C durante 00:20 segundos con ópticos activados

Extensión: 72°C durante 05:00 segundos.

Se utilizaron 2 µL de ADN para cada reacción; el ADN empleado para realizar las pruebas se obtuvo de cepas de la American Type Culture Collection (ATCC).

5.7 Inclusividad y exclusividad

Para realizar esta prueba se utilizaron 51 cepas de referencia de organismos tanto diana como no diana, con la finalidad de asegurar que amplifiquen los que deben amplificar y no amplifiquen los que no deben de amplificar, de acuerdo a la siguiente tabla:

Tabla 3. Reacción multiplex dividida en dos Mix's

Fluoróforo	Mix 1	Mix 2
FAM	<i>L. innocua</i>	<i>L. grayi</i>
TET	<i>L. monocytogenes</i>	<i>L. seeligeri</i>
Cy5	<i>L. ivanovii</i>	<i>L. welshimeri</i>

6. RESULTADOS

Los resultados obtenidos en la evaluación de la inclusividad y exclusividad empleando 51 cepas, 33 del género *Listeria* (organismos Diana), siguiendo las condiciones antes mencionadas se presentan a continuación:

Tabla 4. Resultados obtenidos por el Mix 1 y el Mix 2.

		Mix 1			Mix 2		
		FAM	TET	Cy5	FAM	TET	Cy5
1	<i>L. monocytogenes</i> 240	N/A	Detectado	N/A	N/A	N/A	N/A
2	<i>L. monocytogenes</i> 1543	N/A	Detectado	N/A	N/A	N/A	N/A
3	<i>L. monocytogenes</i> 1467	N/A	Detectado	N/A	N/A	N/A	N/A
4	* <i>L. innocua</i> 1498	Detectado	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
5	<i>L. monocytogenes</i> 1497	Inespecificidad	No detectado	N/A	N/A	N/A	N/A
6	<i>L. innocua</i> 1889	Detectado	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
7	<i>L. monocytogenes</i> 1888	N/A	Detectado	N/A	N/A	N/A	N/A
8	<i>L. innocua</i> 1603	Detectado	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
9	<i>L. monocytogenes</i> 1663	N/A	No detectado	N/A	N/A	N/A	N/A
10	<i>L. monocytogenes</i> 421	N/A	Detectado	N/A	N/A	N/A	N/A
11	<i>L. monocytogenes</i> 418	N/A	Detectado	N/A	N/A	N/A	N/A
12	* <i>L. monocytogenes</i> 19115	N/A	Detectado	N/A	N/A	N/A	N/A
13	<i>L. innocua</i> 33090	Detectado	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
14	<i>L. monocytogenes</i> 2410	Inespecificidad	No detectado	N/A	N/A	N/A	N/A
15	<i>L. monocytogenes</i> 2471	N/A	Detectado	N/A	N/A	N/A	N/A
16	<i>L. monocytogenes</i> 2474	N/A	Detectado	N/A	N/A	N/A	N/A
17	<i>L. monocytogenes</i> 2712	N/A	Detectado	N/A	N/A	N/A	N/A
18	<i>L. monocytogenes</i> 2801	N/A	Detectado	N/A	N/A	N/A	N/A
19	<i>L. monocytogenes</i> 2911	N/A	Detectado	N/A	N/A	N/A	N/A
20	<i>L. monocytogenes</i> 3221	N/A	Detectado	N/A	N/A	N/A	N/A
21	<i>L. monocytogenes</i> 3274	N/A	Detectado	N/A	N/A	N/A	N/A
22	<i>L. monocytogenes</i> 3246	N/A	Detectado	N/A	N/A	N/A	N/A
23	<i>L. welshimeri</i> 2804	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	Detectado
24	<i>L. innocua</i> 3278	Detectado	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
25	<i>L. innocua</i> 3348	Detectado	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
26	<i>L. innocua</i> 3349	Detectado	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
27	* <i>L. monocytogenes</i> 19114	N/A	No detectado	N/A	N/A	N/A	N/A
28	* <i>L. monocytogenes</i> 7644	N/A	Detectado	N/A	N/A	N/A	N/A
29	* <i>L. grayi</i> 19120	N/A	N/A	N/A	Detectado	N/A	N/A
30	* <i>L. ivanovii</i> 19119	N/A	N/A	Detectado	N/A	N/A	N/A
31	* <i>L. seeligeri</i> 35967	N/A	N/A	N/A	N/A	Detectado	N/A
32	<i>Escherichia coli</i> O26:H11	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
33	<i>Escherichia coli</i> O26:H	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
34	<i>Escherichia coli</i> O011K:H-	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
35	<i>Escherichia coli</i> O111CC:H-	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
36	<i>Escherichia coli</i> O111C:H8	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
37	<i>Escherichia coli</i> O11AC:H8	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
38	<i>Escherichia coli</i> O121:H19	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
39	<i>Escherichia coli</i> O157:H7	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
40	<i>Escherichia coli</i> O45:H10	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
41	<i>Escherichia coli</i> O45K:H10	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A

		Mix 1			Mix 2		
		FAM	TET	Cy5	FAM	TET	Cy5
42	<i>Escherichia coli</i> O103:H	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
43	<i>Escherichia coli</i> O103:H2	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
44	<i>Escherichia coli</i> O103:H25	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
45	<i>Escherichia coli</i> O145:H45	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
46	* <i>Citrobacter freundii</i> 8090	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
47	* <i>Citrobacter brakii</i> 51113	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
48	* <i>Salmonella enterica</i> Typhimurium	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
49	* <i>Shigella flexneri</i>	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
50	<i>L. welshimeri</i> 280	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	No detectado
51	* <i>L. welshimeri</i>	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	Detectado

* Cepas obtenidas de la colección ATCC

Detectado: resultado obtenido corresponde a lo esperado (Verdadero positivo)

No detectado: No hay amplificación, el resultado obtenido no corresponde lo esperado (Falso Negativo)

Inespecífico: La amplificación no corresponde a lo esperado. (Falso Positivo)

N/A: No hay amplificación, y corresponde a lo esperado (Verdadero negativo)

Evaluación del Método.

Los métodos cualitativos arrojan dos tipos de resultados, Positivo/Negativo o Presencia/Ausencia; por lo que se establece una tabla de Contingencias respecto al valor esperado y el valor obtenido.

Tabla 5. Tabla de Contingencias¹⁷

	Organismo Diana	Organismo No Diana	Total de Cepas
Resultado Positivo	Verdadero Positivo (VP)	Falso Positivo (FP)	Cepas Diana
Resultado Negativo	Falso Negativo (FN)	Verdadero Negativo (VN)	Cepas No Diana

Eficacia Relativa¹⁷(ER): Grado de correspondencia entre el resultado obtenido por el método a validar con las muestras inoculadas y las que no están inoculadas.

$$ER = \frac{VP + VN}{\text{Total de cepas}} \times 100$$

Especificidad Relativa¹⁷(ES): Capacidad del método para NO detectar al organismo diana cuando éste no está presente en la muestra.

$$ES = \frac{VN}{\text{Cepas No diana}} \times 100$$

Sensibilidad Relativa¹⁷(SR): Capacidad del método para detectar al organismo diana cuando éste se encuentra presente en la muestra.

$$SR = \frac{VP}{\text{Cepas Diana}} \times 100$$

Análisis de resultados:

Tabla 6. Tabla de Contingencias. Mix 1

	Organismo Diana	Organismo No Diana	51 Cepas
Resultado Positivo	24	2	26 Cepas Diana
Resultado Negativo	2	23	25 Cepas No Diana

Tabla 7. Tabla de Contingencias. Mix 2

	Organismo Diana	Organismo No Diana	51 Cepas
Resultado Positivo	4	0	5 Cepas Diana
Resultado Negativo	1	46	46 Cepas No Diana

Tabla 8. Porcentaje de Resultados obtenidos en ambos MIX de manera experimental.

Resultado Obtenidos en el MIX 1		Resultado Obtenidos en el MIX 2	
Analistas:	Total (%)	Analistas:	Total (%)
Eficacia Relativa (ER):	92,1568627	Eficacia Relativa (ER):	98,03921569
Especificidad Relativa (ES):	92	Especificidad Relativa (ES):	100
Sensibilidad Relativa (SR):	92,3076923	Sensibilidad Relativa (SR):	80

7. Conclusiones

Los oligonucleótidos diseñados para este ensayo de PCR- tiempo real permitieron detectar simultáneamente bacterias del género *Listeria*; el gen *iap* permite detectar e diferenciar a bacterias a: *Listeria monocytogenes*, *L. ivanovii*, *L. innocua*, *L. welshimeri*, *L. seeligeri*, y *L. grayi*. Este gen codifica para la formación de la proteína de superficie p60, que actúa como una hidrolasa murina, involucrada en la división celular, favoreciendo la adaptación y supervivencia de la célula bacteriana.

Los resultados obtenidos son satisfactorios, ya que en ambas mezclas se logró detectar a cada uno de los organismos para los cuales fueron diseñados los oligonucleótidos, tanto de manera teórica (bioinformática) como en la prueba experimental; usando las cepas de referencia. Sin embargo, se presentaron algunas inespecificidades y en algunos casos no se detectó al organismo diana, lo que en un determinado momento podría dar lugar a la aparición de falsos negativos o falsos positivos.

Por otro lado, esta técnica es un buen método alternativo para apoyar en la detección de *Listeria*, ya que tiene una alta confiabilidad y un tiempo de respuesta menor a los métodos convencionales, permitiendo dar una respuesta oportuna a los análisis realizados en laboratorio a bajos costos. Solo se encontró técnica de para la detección por PCR tiempo-real desarrollada kit's comerciales, incrementando excesivamente los costos de implementación.

8. Referencias

1. Bubert A, Kuhn M, Goebel W, Köhler S. 1992. Structural and functional properties of the p60 proteins from different *Listeria* species. *J. Bacteriol.* 174 (24):8166–8171.
2. Bubert A, Hein I, Rauch M, Lehner A, Yoon B, Goebel W, Wagner M. 1999. Detection and differentiation of *Listeria* spp. by a single reaction based on multiplex PCR. *Appl. Environ. Microbiol.* 65(10):4688-4692.
3. Fajardo Olivares M. 2008. Otitis media supurada por *Listeria gray*. *Sociedade Portuguesa de Pediatria.* 0873-9781/08/39-1/12:39(1)12-13
4. González T, Rojas R. 2005. Enfermedades transmitidas por alimentos y PCR: prevención y diagnóstico. *Salud Pública de México* 47:388-390.
5. Hain T, Steinweg C. 2006. Whole-genome sequence of *Listeria welshimeri* reveals common steps in genome reduction with *Listeria innocua* as compared to *Listeria monocytogenes*. *J. Bacteriol.* 188:7405-7415.
6. IAEA (International Atomic Energy Agency). 2005. Determination of human pathogen profiles in food by quality assured microbial assays. *Proceedings of a Final Research Coordination Meeting held in Mexico City, 2002.* IAEA-TECDOC-1431:83-95.
7. Karunasagar I. 1992. *Listeria ivanoviis* capable of cell-to-cell spread involving actin polymerization. *Infect. Immun.* 61:162-169.
8. Pouch-Downes F, Ito K. 1998. *Compendium of methods for the microbiological examination of food.* 4ta ed., Estados Unidos de Norteamérica: American PublicHealthAssociation (APHA).
9. Rocourt J., Grimont PAD. 1983. *Listeria welshimeri* sp. nov. and *Listeria seeligeri* sp. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 33:866-869.
10. Vantarakis A, Kamininou G, Venieri D, Papapetropoulou M. 2000. Development of a multiplex-PCR detection of *Salmonella* spp. and *Shigella* spp. in mussels. *Lett. Appl. Microbiol.* 31:105-109.
11. Wuenscher MD, Köhler S, Bubert A, Gerike U, Goebel W. 1993. The *iap* gene of *Listeria monocytogenes* is essential for cell viability, and its gene product, p60, has bacteriolytic activity. *J. Bacteriol.* 175:3491-3501.
12. Fenlon, D. R. 1999. *Listeria monocytogenes* in the natural environment. In: Ryser, E. T., and Marth, E. H. (eds.) *Listeria, listeriosis and food safety*, 2nd ed. Marcel.
13. Bille, J. 1990. Epidemiology of human listeriosis in Europe, with special reference to the Swiss outbreak, Pages 71-74 in A. J. Miller, J. L. Smith, and G. A. Somkuti, eds. *Topics in Industrial Microbiology: Foodborne Listeriosis*, Society for Industrial Microbiology.
14. Farber J. M., and P. I. Peterkin. 1991. *Listeria monocytogenes*, a food borne pathogen. *Microbiol Rev.* 55:476–511.

15. Mead, P. S., E .F. Dunne, L. Graves, M. Wiedmann, M. Patrick, S. Hunter, E. Salehi, F. Mostashari, A. Craig, P. Mshar, T. Bannerman, B. D. Sauders, P. Hayes, W. DeWitt, P. Sparling, P. Griffin, D. Morse, L. Slutsker, and B. Swaminathan for 34 the Listeria Outbreak Working Group. 2006. Nationwide outbreak of listeriosis due to contaminated meat. *Epidemiology Infection*. 134:744-751.
16. Von Both U, Otten S, Darbouche A, Domann E, Chakraborty T. Physical and Genetic Map of the *Listeria monocytogenes* EGD Serotype 1/2a Chromosome. *FEMS Microbiol Lett* 1999; 175: 281-289.
17. UNE-EN ISO 16140:2003, Microbiología de los alimentos para consumo humano y animal. Protocolo de validación de métodos alternativos (ISO 16140:2003).