

Detección de *Listeria* spp. en leche mediante un método de amplificación isotérmica

Detection of *Listeria* spp. in milk using an isothermal amplification method

Angela P. Mendoza Valerio¹, Sheila A. Martínez Zavala², José E. Barboza Corona^{1,2*}

¹Universidad de Guanajuato, División de Ciencias de la Vida, Departamento de Alimentos. Ex Hacienda El Copal carretera Irapuato-Silao, Irapuato Km 9, 36500 ²Universidad de Guanajuato, División de Ciencias de la Vida, Posgrado en Bio-ciencias. Ex Hacienda El Copal carretera Irapuato-Silao, Irapuato Km 9, 36500.
ap.mendozavalerio@ugto.mx¹, sheimtz92@gmail.com², josebar@ugto.mx^{1,2}

Resumen

La Listeriosis es una enfermedad transmitida por alimentos (ETA) causada por *Listeria monocytogenes* que puede provocar grandes cuadros clínicos. Los alimentos contaminados incluyen leche sin pasteurizar, carne y pescado crudos. En México, la falta de estadísticas limita el control epidemiológico, a diferencia de Estados Unidos, donde la listeriosis es la tercera causa de muerte por ETA, subrayando la necesidad de detección eficaces. Los métodos tradicionales requieren hasta 4 días para obtener resultados, mientras que técnicas moleculares como la PCR (reacción en cadena de la polimerasa) y LAMP (amplificación isotérmica mediante bucle) ofrecen resultados rápidos y específicos. En este trabajo se desarrolló un método de detección visual basado en LAMP para la detección de *L. monocytogenes* y *L. innocua* en leche utilizando oligonucleótidos que amplifican para la región V2-V3 del ADNr 16S. La amplificación se realizó utilizando el reactivo WarmStart Colorimetric (New England Biolabs), se determinó que la temperatura óptima de reacción es 64.1°C, y la detección puede ser visualizada desde los 60 min. Al desarrollar curvas de calibración para *L. monocytogenes* y *L. innocua* e inocular artificialmente con 1X10⁹ UFC/mL leche pasteurizada y cruda, se detectó la presencia de *Listeria* spp. utilizando como templado un protocolo de extracción sencillo basado en la disrupción celular por ebullición.

Palabras clave: *Listeria monocytogenes*; listeriosis; amplificación isotérmica, LAMP.

1. Introducción

Listeria monocytogenes es una bacteria que provoca listeriosis en personas, se manifestó a inicios de 1980 como un patógeno emergente de enfermedades transmitidas por alimentos (ETA), desde esa fecha se han reportado importantes brotes con *L. monocytogenes* en Europa y Estados Unidos (Schlech et al. 1983). Esto ha permitido la realización de estudios epidemiológicos para determinar la prevalencia del patógeno y su forma de transmisión, según la CDC (Centers for Disease Control and Prevention) representa la tercera causa de muerte por enfermedades transmitidas por alimentos o intoxicación alimentaria en Estados Unidos (Cartwright et al. 2013). En México no hay estudios epidemiológicos de incidencia de listeriosis, por lo que no hay información suficiente para el control de la enfermedad, y sobre la presencia de *L. monocytogenes* en los alimentos son escasos. Por lo que es una necesidad que el sector salud y la industria alimentaria implementen un marco legal para la detección del patógeno, lo cual conlleve al control de este en México. La listeriosis humana es una enfermedad con tasa de mortalidad alta (20 a 30%), que incluye padecimientos severos como la meningitis, septicemias y abortos; afecta principalmente a personas inmunocomprometidas e inmunodeficientes, así como a embarazadas, ancianos y niños (Zunabovic et al. 2011). *Listeria monocytogenes* tiene la capacidad de formar biopelículas, proliferar en temperaturas de refrigeración, resistir pH extremo y altos niveles de sal. Las vacas pueden ser portadores asintomáticos y alojar el patógeno en la ubre, esto puede conducir a la excreción de bacterias durante el ordeño, contaminando la leche y, por consecuencia, productos lácteos (Jaramillo-Bedoya et al. 2021).

La leche de vaca es un alimento básico en la alimentación de las personas, principalmente por su alto valor nutricional. De acuerdo con cifras del Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera (SIAP), la producción nacional de leche de vaca fue de 13 millones 239 mil 779 toneladas en 2021, lo cual representó un aumento de 2.3 por ciento con relación al 2020, en el cual se produjeron 12 millones 943 mil 123 toneladas y un consumo per cápita de 124.3 litros (De Agricultura y Desarrollo Rural, 2021). La composición química de la leche varía dependiendo de varios factores, tales como la raza de la vaca, del cuidado, la alimentación que se suministra, así como las condiciones de higiene durante el ordeño (Agudelo & Bedoya, 2005). La leche por ser un alimento muy completo y rico en nutrientes es un medio de cultivo ideal para el crecimiento de microorganismos, y su calidad higiénica puede verse afectada por bacterias patógenas que pueden provenir por vía endógena o vía exógena. Dentro de los factores de contaminación por vía endógena se

encuentra el ordeñar vacas enfermas, con manifestaciones clínicas o subclínicas donde la leche puede venir contaminada con microorganismos patógenos tales como *Listeria monocytogenes* y *Staphylococcus aureus*. En cuanto a los factores de contaminación exógena, se pueden incluir las condiciones presentes en el entorno al momento del ordeño, por ejemplo, las heces del animal, el medio ambiente, los utensilios usados durante el proceso de ordeño. Una vez extraída la leche, el producto puede presentar contaminación en el almacenamiento, transporte y comercialización del producto (Aguilera-Becerra et al., 2014).

En este sentido, *L. monocytogenes* es uno de los microorganismos patógenos con gran interés para el sector salud, ya que en situaciones extremas puede ocasionar la muerte (Moshtaghi, 2007). *L. monocytogenes* es un bacilo corto, grampositivo, no esporulado, móvil, aerobio, capaz de crecer en condiciones microaerofílicas, es catalasa positiva y oxidasa negativa. En agar sangre presenta una morfología con colonias puntiformes, circulares, lisas y translúcidas de color azul grisáceo con una zona discreta de beta hemólisis (NOM-143-SSA1-1995). Debido a lo anterior *L. monocytogenes* debe estar ausente en los alimentos, por lo cual es importante detectarlo a tiempo para evitar la enfermedad. Se han reportado diferentes métodos, tales como las pruebas microbiológicas en alimentos a partir de medios de enriquecimiento con la capacidad para crecer en presencia de ciertos nutrientes, sales, químicos o antibióticos, así como la realización del aislamiento de la bacteria. La desventaja de estos métodos tradicionales es que para la detección de *Listeria spp.* se requieren hasta 4 días para obtener resultados. Los métodos de detección moleculares tales como el PCR (reacción en cadena de la polimerasa) y método LAMP (Amplificación isotérmica mediada por bucle) son métodos rápidos y específicos que pueden permitir la detección de este microorganismo. La efectividad de LAMP se basa en el diseño de oligonucleótidos que deben ser muy específicos. A diferencia de PCR, LAMP requiere de 4 a 6 oligonucleótidos y en la amplificación de ácidos nucleicos en condiciones isotérmicas (Muñiz, 2018). Los productos amplificados por LAMP pueden ser detectados por una gran diversidad de métodos como inspección visual, electroforesis en gel de agarosa (AGE), colorimetría, detección electroquímica, y métodos de tiras reactivas inmunocromatográficas (ICT) (Zhang et al., 2014). Los métodos de visualización comúnmente utilizados para una detección rápida son los agentes colorimétricos y los ICS, ya que son métodos sencillos que no involucran de equipo sofisticado.

Actualmente se han desarrollado diferentes métodos LAMP para detectar *L. monocytogenes*, sin embargo, todos ellos están basados en la amplificación de genes de virulencia como el gen *hly A* que codifica para la Listeriolisina O (Tang et al., 2011; Shang et al., 2012; Wang et al., 2012; Fiore et al., 2023), el gen *actA* que codifica para el gen de polimerización de actina (Feng et al., 2018) y gen *mpl* para la síntesis de una metaloproteasa (Busch et al., 2022). En este trabajo nuestro objetivo fue desarrollar un método rápido y sencillo para detectar *Listeria spp.* en leche mediante un método de amplificación isotérmica, así como determinar las condiciones óptimas para llevar a cabo la amplificación. Los oligonucleótidos fueron diseñados a partir de las regiones V2-V3 del ADNr 16S, de tal forma que la amplificación permite detectar *L. monocytogenes* y *L. innocua*, principales listerias contaminantes en los alimentos.

2. Metodología

2.1 Cepas bacterianas e identificación microbiológica

Dos cepas de *Listeria* fueron empleadas para este estudio: *Listeria innocua* ATCC 15303 y *Listeria monocytogenes* ATCC3309. Las cepas bacterianas fueron crecidas en medio selectivo Oxford agar base (Condalab, Madrid España) y medio de cultivo infusión cerebro corazón [BHI, (BD BIOXON, Estado de México, México)], y las colonias fueron analizadas mediante la tinción de Gram y prueba de la catalasa. Para la prueba de catalasa se utilizó un cultivo puro, el cual fue emulsificado, y se empleó una gota de solución de peróxido al 3%. La tinción de gram se realizó de acuerdo con lo descrito por el proveedor (Golden Bell, CAT82000).

2.2 Diseño de primers para la reacción de LAMP

Se diseñaron 5 oligonucleótidos de las secuencias del gen 16S ADNr en la región v2-v3. La amplificación isotérmica se empleó usando cepas de *L. innocua* ATCC 15303 y *L. monocytogenes* ATCC3309. La reacción LAMP fue específica para las cepas de referencia. Las secuencias de los oligonucleótidos se muestran en la Tabla 1 y Figura 1 y 2.

Tabla 1. Oligonucleótidos y secuencia para *Listeria innocua* y *Listeria monocytogenes*.

| Oligonucleótidos | Secuencia (5'→3') | Posición en el gen 16S (<i>Listeria innocua</i>) | Posición en el gen 16S (<i>Listeria monocytogenes</i>) |
|------------------|---------------------------|---|---|
| LF | TGCCTGTAAGTTGGGGATAACT | 69-90 | 130-151 |
| B3 | AGTTGGTAGGGTAATGGCCT | 195-214 | 255-274 |
| F3 | CAAAGTTAGTGGCGGACGG | 29-47 | 90-108 |
| BIP | GCTATCGCTTACAGATGGGC | 159-178 | 219-238 |
| FIP | ACTCCGGGAAACCGGGGCTAATACC | 88-112 | 149-173 |

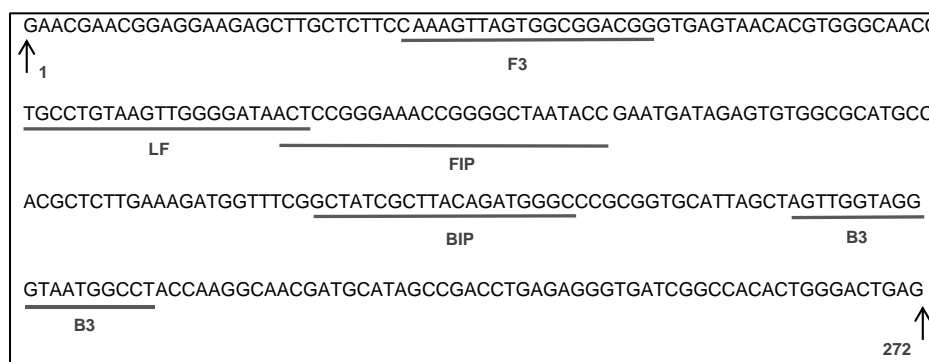


Figura 1. Posición de los oligonucleótidos F3, LF, FIP, BIP, B3 en las regiones V2-V3 del ADNr 16S de *L. innocua*.

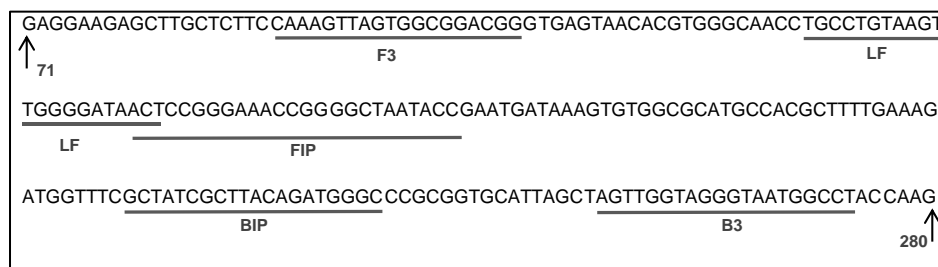


Figura 2. Posición de los oligonucleótidos F3, LF, FIP, BIP, B3 en las regiones V2-V3 del del ADNr 16S de *L. monocytogenes*.

2.3 Reacción colorimétrica de LAMP

Para la mezcla de reacción de LAMP se utilizó el reactivo WarmStart Colorimetric LAMP 2X Mix (New England Biolabs, Ipswich, MA, EEUU). Cada reacción isotérmica se realizó en un volumen final de 10 µL conteniendo 0.4 µM de los oligonucleótidos FIP y BIP, 0.05 µM de los oligonucleótidos F3 y B3, 0.1 µM del oligonucleótido LF, y 5 µL del master mix de WarmStart Colorimetric con la polimerasa Bst 2.0 WarmStart® y rojo fenol para la detección del pH de los productos LAMP. Las reacciones que contenían 0.5 µL de ADN templado o agua estéril como control negativo, se colocaron en un termociclador para la amplificación isothermal. La temperatura de reacción se optimizó en un rango de 64 a 67°C durante un lapso de 30 a 120 min. Los tubos con la mezcla de reacción fueron monitoreados para detectar un cambio de color (de rosa a amarillo indicó una reacción positiva) inmediatamente después de la terminación de la reacción.

2.4 Curvas de calibración de *Listeria innocua* en medio selectivo Oxford y medio convencional.

Para determinar la cantidad de biomasa presente en los cultivos y realizar la inoculación artificial en leche, se realizaron diluciones seriadas utilizando un factor de dilución 10. Esto permitió obtener una curva de calibración de las unidades formadoras de colonias por mililitro (UFC/mL) y la densidad óptica a 600 nm (OD600). Se inoculó una colonia aislada de *L. innocua* o *L. monocytogenes* en 10 mL de medio Caldo Soya Trypticaseína (TSB) y se incubó a 37°C durante 18±2 horas en agitación constante. El inóculo se diluyó varias veces para obtener cinco puntos de OD600 entre 0.01 y ~0.6, culminando en una dilución 1X10⁻⁶. Posteriormente, se esparcieron 100 µL de cada dilución sobre placas de Petri con medio sólido BHI y medio sólido Oxford, y se incubaron a 37°C de forma invertida durante 18 a 24 horas. Después del periodo de crecimiento, se examinaron las placas y se contaron aquellas que tienen entre 30 y 300 colonias por placa. El ensayo se realizó por triplicado, con dos ensayos independientes. Las colonias contadas se promediaron y multiplicaron por el factor de dilución para obtener las UFC/mL. Los resultados se graficaron y se aplicó una regresión lineal para obtener la ecuación final.

2.5 Extracción de ADN en muestras de leche para utilizarse como templado en las reacciones de LAMP

Debido a la diversidad en la composición de la leche, se evaluaron cuatro métodos de extracción de ADN para la detección de *Listeria spp.* en muestras de leche pasteurizada y leche cruda inoculadas artificialmente con *Listeria innocua*. Los métodos evaluados fueron:

2.5.1 Disrupción por ebullición a partir de muestras diluidas. Las diluciones se realizaron conforme a lo descrito por la NOM-110-SSA-1994. De estas diluciones se tomaron 500 µL y se pasaron a tubos Eppendorf, se incubaron a 100°C por 10 minutos y centrifugaron a 10,000 rpm por 3 min. El sobrenadante fue utilizado como templado para la detección en la reacción LAMP.

2.5.2 Extracción con buffer KCl. Se utilizó el protocolo propuesto por Kaclikova et al. (2003). Se centrifugó por 4 minutos 1 mL de leche inoculada artificialmente a 10,000 rpm, la fase lipídica fue eliminada con un hisopo y el sobrenadante con ayuda de una micropipeta. Se lavó el pellet con 1 mL de NaCl 0.85% y se resuspendió en 200 µL de tampón KCl (Tris-HCl 20 mM, pH 8.0 y KCl 50 mM), para posteriormente incubarse a 100°C por 25 min y se centrifugó a 16000 g por 10 min. El sobrenadante fue recuperado en otro tubo y almacenado a -20°C.

2.5.3 Extracción PBS + Tween 20. Se utilizó el protocolo propuesto por Longhi et al (2003). Se centrifugó por 4 minutos 1 mL de leche inoculada artificialmente a 10,000 rpm, la fase lipídica fue eliminada con un hisopo y el sobrenadante con ayuda de una micropipeta. Se lavó el pellet dos veces con 1 mL de PBS 1X (pH 7.4) centrifugando 4 min a 10,000 rpm. Posteriormente, se resuspendió en 100 µL de PBS + Tween 20 0.05% y fue incubado a 100°C por 10 minutos y se centrifugó durante 3 min a 10,000 rpm para recuperar el sobrenadante en otro tubo

2.5.4 Extracción con solventes orgánicos. Para la extracción de ADN con solventes orgánicos se evaluaron a su vez diferentes protocolos con solventes como tiocinato de guanidina-fenol, fenol-cloroformo, PBS y KCl. i) *Extracción con tiocinato de guanidina-fenol.* Para la extracción se utilizó el reactivo TRI Reagent® (ABP Biosciences) y 1 mL de muestra de leche, siguiendo el procedimiento propuesto por el proveedor (T9424, Sigma-Aldrich). ii) *Extracción con buffer de lisis PKS-SDS-Tritón y fenol-cloroformo.* Se utilizó el protocolo propuesto por Marianelli et al. (2008) con algunas modificaciones. Se mezclaron 500 µL de la muestra de leche con 500 µL de NaCl al 0.9%. La mezcla se centrifugó durante 3 minutos a 10,000 rpm, se removió la fase lipídica con un hisopo estéril y se eliminó el sobrenadante con ayuda de una micropipeta. A continuación, se añadieron 500 µL de muestra a 400 µL de la solución de lisis (2% Tritón-X 100, 1% SDS, 100 mM NaCl, 10 mM TrisHCl, pH 8.0) y 5 µL de proteinasa K (20 mg/mL). La mezcla se incubó durante 2 horas a 50°C. Posteriormente, se incubó en hielo durante 5 minutos, se agregó 1 mL de NaCl 1.5 M y se agitó en un vórtex. Se realizó un lavado con una solución fenol-cloroformo-alcohol isoamílico 25:24:1, mezclando durante 30 segundos y centrifugando durante 4 minutos a 12,000 rpm. Después la fase acuosa se transfirió a otro tubo, y se repitió el paso anterior. Se añadió 1 mL de etanol al 70%, se mezcló y se centrifugó a 3500 rpm durante 10 minutos. Finalmente, se descartó el sobrenadante, los tubos se dejaron secar y el pellet resultante se resuspendió en 25 µL de agua destilada estéril. iii) *Extracción con buffer de lisis PKS-SDS y fenol-cloroformo.* Se utilizó el protocolo propuesto por Volk et al. (2014) con algunas modificaciones. Se tomó 1 mL de la muestra de leche y se centrifugó durante 2 min a 6,708 x g. La fase lipídica fue removida con un hisopo estéril, y el sobrenadante se eliminó con ayuda de una micropipeta. A continuación, se añadieron 500 µL de NaCl 0.9% a la muestra, se mezclaron en vortex durante 30 s, y se centrifugó nuevamente durante 2 min a 6708 x g. Al pellet resultante se le añadieron 500 µL del buffer TENS (10 mM TrisHCl pH 8.0, 1 mM EDTA, 100 nM NaCl, 0.5% SDS, y 25 mg/mL proteinasa K), se mezcló durante 30 segundos y se incubó a 50°C durante 3 horas. Tras la digestión de las proteínas, se añadieron 500 µL de una mezcla fenol:cloroformo:alcohol

isoamílico (25:24:1). Las muestras se mezclaron durante 30 segundos y se centrifugaron durante 4 min a 12,000 rpm. La fase acuosa se transfirió a otro tubo y se repitió el proceso. Las muestras se mezclaron y centrifugaron durante 2 min a 12,000 xg, la fase acuosa se transfirió a un nuevo tubo. Luego, se añadieron 50 µL de acetato de sodio 3 M y 400 µL de isopropanol, se mezclaron por inversión y se incubaron durante 30 minutos a -20°C. Finalmente, se descartó el sobrenadante, los tubos se dejaron secar y el pellet resultante se resuspendió en 25 µL de agua destilada estéril.

2.6 Evaluación del ADN extraído.

La concentración y calidad de ADN total fue evaluado en un micro espectrofotómetro (Nanodrop™ Lite, ThermoScientific) a 260 y 280 nm (Sambrook, 2001). Además, las muestras se visualizaron por electroforesis en gel de agarosa al 1% (p/v) para lo cual se tomaron 5 µL de ADN. Como buffer de corrida se usó TAE 1X (40 mM Tris-acetato, 1 mM EDTApH 8 ± 0.2) y los geles se tiñeron con de bromuro de etidio. La separación se realizó a 120V y los geles se observaron en luz ultravioleta utilizando el transiluminador FBTI-88. Como marcador de peso molecular se emplearon 2 µL del marcador 1 kb Plus Ladder (Invitrogen).

3. Resultados y discusión

3.1 Cepas bacterianas e identificación microbiológica

Para cotejar algunas de las características de *L. innocua* ATCC 15303 y *L. monocytogenes* ATCC3309, estas fueron sometidas a la prueba de catalasa y tinción de gram. Los resultados se muestran en la Tabla 2.

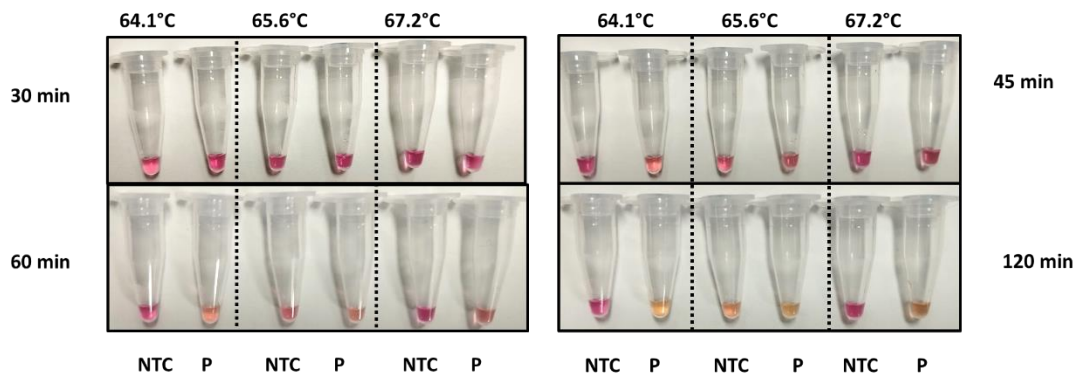
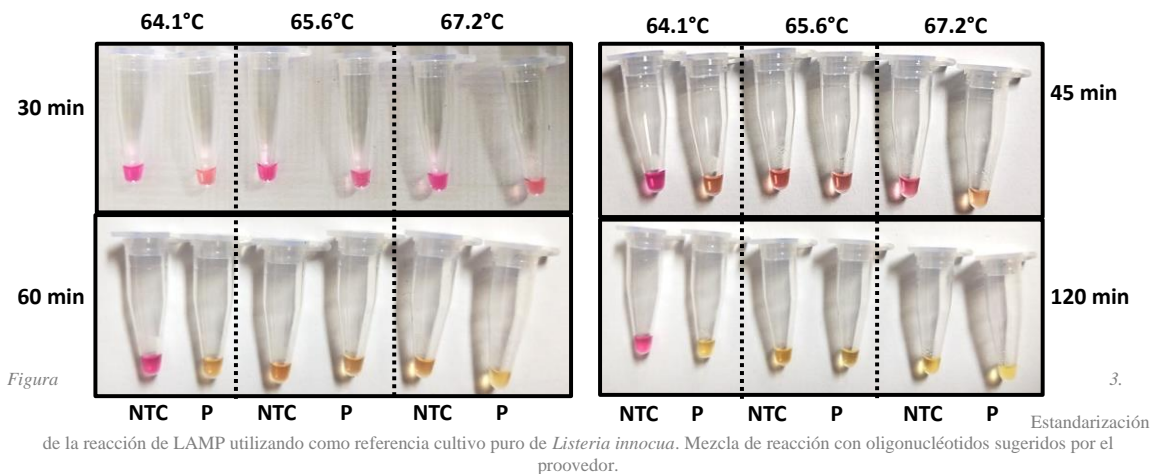
Tabla 2. Identificación microbiológica de Listeria spp.

| Prueba microbiológica | <i>Listeria innocua</i> | <i>Listeria monocytogenes</i> |
|-----------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|
| Prueba de catalasa | Positiva | Positiva |
| Tinción gram | Gram positivas, bacilos cortos | Gram positivas, bacilos cortos |
| Identificación morfológica | Colonias negras con halo negro | Colonias negras con halo negro |

Las especies de *Listeria* son catalasa positiva, lo cual pudo ser comprobado al realizar la prueba para *L. innocua* y *L. monocytogenes*. Según la NOM-143-SSA1-1997 en el punto 9.2.2 se establece que al realizar el ensayo, ambas producen la formación inmediata de burbujas indica que la prueba es positiva. La prueba funciona para detectar la enzima catalasa, que está presente en la mayoría de los microorganismos que poseen citocromos. Las bacterias que sintetizan catalasa hidrolizan el peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno gaseoso que se libera en forma de burbujas (Fernández et al. 2010). La tinción gram nos permite dividir a las bacterias en dos grandes grupos taxonómicos: Gram positivas y Gram negativas, según sea su comportamiento frente a la tinción.

3.2 Estandarización de la reacción de LAMP

El reactivo comercial WarmStartColorimetric RT-LAMP 2X Master Mix (M1800S, New England Biolabs) contiene dos enzimas, una transcriptasa reversa y una polimerasa extremadamente termoestable (Bst 2.0). La temperatura y tiempo de reacción fueron optimizados para la detección de *Listeria* spp. evaluando tres temperaturas diferentes (64.1°C, 65.6°C y 67.2°C) durante 120 min con cultivos bacterianos puros de *L. innocua*, así como dos concentraciones diferentes de oligonucleótidos en una relación 1:8:2 (F3:B3, FIP, BIP:LF). El cambio de coloración en la reacción de rosa a amarillo indicó una amplificación positiva. El ensayo de LAMP fue exitoso para todas las temperaturas evaluadas, sin embargo, el comportamiento de las reacciones para cada temperatura fue diferente (Figura 3 y 4). A 64.1°C el comportamiento de las reacciones permanece constante durante los 120 min, contrario a lo observado a 65.6 y 67°C, donde los controles negativos (muestra sin ADN) se tornan de color amarillo ámbar difícilmente de contrastar con la muestra positiva cuando la cantidad de oligonucleótidos utilizada es la indicada por el proveedor (Figura 3). Este comportamiento ha sido reportado previamente por Thi et al. (2020) y Raddatz et al. (2023) en ensayos utilizando el mismo reactivo, donde a partir de los 35 min reportan que el control negativo frecuentemente se vuelve amarillento y al ser visualizado en geles de agarosa se genera un patrón de bandeo diferente a su control positivo, causado por productos de amplificación falsos. Al disminuir cuatro veces la concentración de oligonucleótidos indicada por el proveedor (0.4 µM de los oligonucleótidos FIP y BIP, 0.05 µM de los oligonucleótidos F3 y B3, 0.1 µM del oligonucleótido LF) el comportamiento fue estable hasta los 120 min a 64.1°C y 67.2°C (Figura 4).



Por lo tanto, la temperatura de reacción determinada como óptima fue de 64.1°C, donde el cambio de coloración en la reacción permanece constante hasta los 120 minutos (Figura 3).

3.3 Curvas de calibración de *Listeria* en medio selectivo y convencional

A partir de la relación entre la densidad óptica a 600 nm y la cantidad de unidades formadoras de colonias, se obtuvieron curvas de calibración que permitieron inocular artificialmente la leche en cantidades definidas. Las curvas de calibración

presentaron una tendencia lineal, lo que permitió obtener una ecuación de la recta y con ello se determinó las UFC/mL en función de las lecturas de OD600 las cuales se muestran en la siguiente Tabla 3 y Figuras 5 y 6.

Tabla 3. Ecuación de las curvas de calibración de UFC/mL para *Listeria spp.* en diferentes medios de cultivo.

| Microorganismo | Medio de cultivo | Ecuación | Valor R |
|-------------------------------|------------------|----------------------------------|---------|
| <i>Listeria innocua</i> | Agar base Oxford | $y = 3 \times 10^{-10} + 0.0184$ | 0.9895 |
| | BHI | $y = 3 \times 10^{-10} + 0.0232$ | 0.9721 |
| <i>Listeria monocytogenes</i> | Agar base Oxford | $y = 5 \times 10^{-10} + 0.0834$ | 0.8942 |

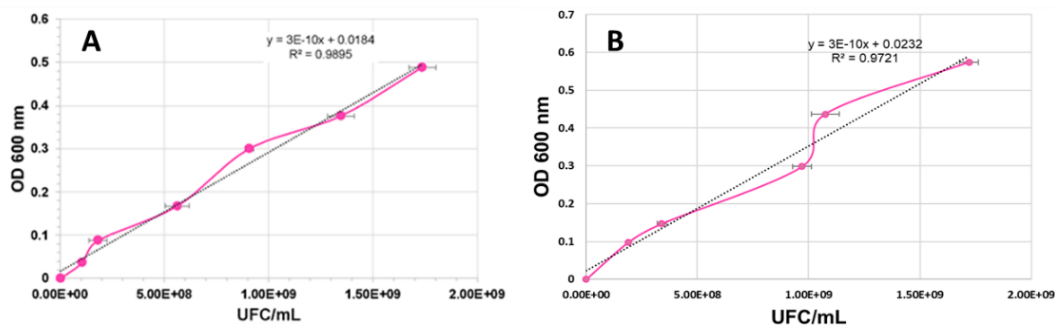


Figura 5. Curva de calibración entre la relación de UFC/mL y densidad óptica. A: Curva de calibración de *Listeria innocua*, en medio BHI. B: Curva de calibración de *Listeria innocua* en medio Oxford.

El crecimiento en cajas de medio BHI agar y medio agar base Oxford, mostró un crecimiento similar. Este resultado podría esperarse, ya que al ser un monocultivo no tiene competencia por otros microorganismos. La principal diferencia en estos dos medios es que el medio Oxford se trata de un medio selectivo para *Listeria spp.* tiene un sistema indicador de esculina y hierro férrico para el aislamiento y diferenciación de *Listeria spp.* ya que hidroliza la esculina. Además, en el medio Oxford permite inhibir bacterias gramnegativas, la mayoría de grampositivas se suprimen, aunque algunos estafilococos coagulasa negativos pueden aparecer como colonias de esculina negativa (Oxford agar, 2003).

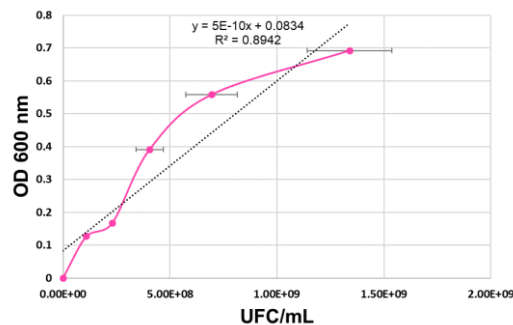


Figura 6. Curva de calibración entre

óptica de *Listeria monocytogenes* en medio Oxford.

la relación de UFC/mL y densidad

Aunque el medio agar base Oxford es el más utilizado para la detección por contaminación de *Listeria monocytogenes*, la principal limitación es la incapacidad para diferenciar *L. monocytogenes* y *L. innocua*, por lo que esto ha llevado a desarrollar medios cromogénicos que sí son capaces de diferenciarlas, como ALOA (Agar *Listeria* según Ottaviani y Agosti) y CHROMagar™ *Listeria spp.* (Law et al., 2015).

3.4 Evaluación del método LAMP para la detección de *Listeria monocytogenes* en muestras de leche

A partir de las curvas de calibración se inoculó artificialmente con 1×10^9 UFC/mL leche entera pasteurizada y se evaluó la detección de *Listeria spp.* por el método de LAMP. En primera instancia, se optó en utilizar como templado de la reacción de LAMP ADN extraído por ebullición, sin embargo, la primera prueba realizada mostró un cambio de color a amarillo de manera inmediata presentando un falso positivo (Figura 7A). Por lo que se realizaron diluciones previas a la ebullición de acuerdo con la NOM-110-SSA-1994.

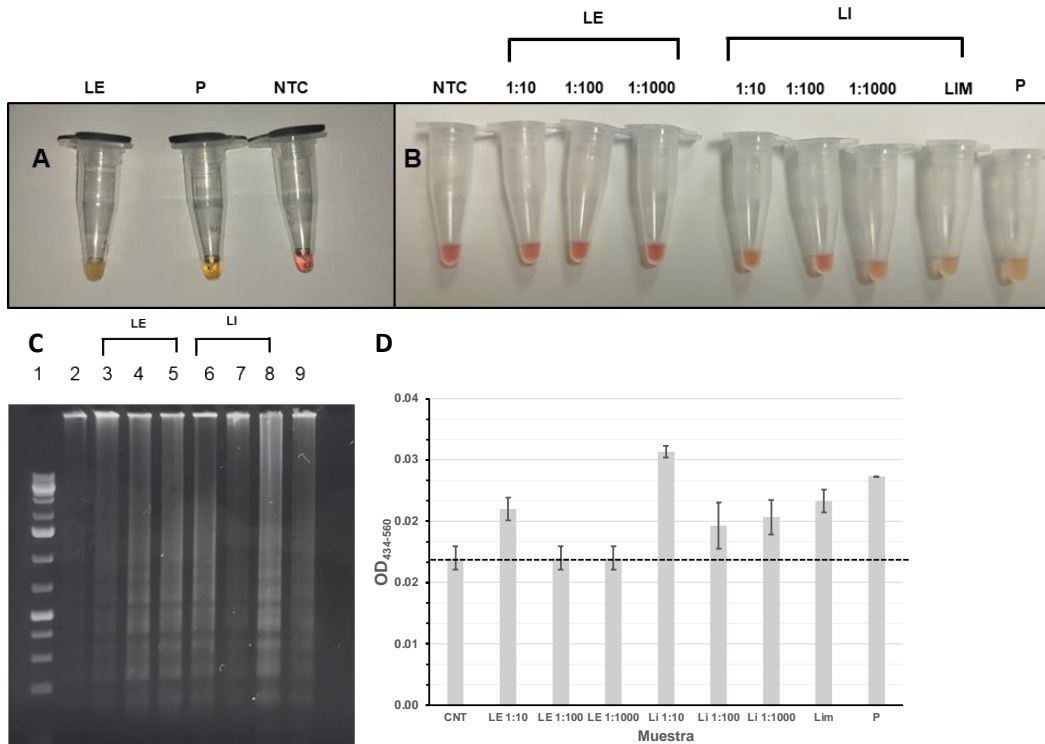


Figura 7. Ensayo del método LAMP. A) Reacción LAMP en muestra directa de leche pasteurizada. NTC: Control negativo, P: positivo, LE: muestra de leche entera pasteurizada. B) Reacción LAMP en diluciones de leche. NTC: Control negativo; LE: Leche entera pasteurizada; LI: Leche entera pasteurizada e inoculada artificialmente; 1:10: Dilución 1:10; 1:100: Dilución 1:100; 1:1000: Dilución 1:1000. LIM: Muestra de leche de ADN con disrupción por ebullición; P: Positivo de *Listeria innocua*. C) Muestras de ADN observadas en electroforesis. LE: Leche entera pasteurizada e inoculada artificialmente; 1: Marcador de peso molecular de 1 kb Plus (Invitrogen); 2: Control negativo; 3: Dilución 1:10; 4: Dilución 1:100; 5: Dilución 1:1000; 6: Dilución 1:10; 7: Dilución 1:100; 8: Dilución 1:1000; 9: Muestra de leche de ADN con disrupción por ebullición. C) Cuantificación del color. La línea punteada representa el umbral del control negativo.

El ensayo de LAMP se realizó utilizando como control negativo leche entera pasteurizada sin inocular y leche entera pasteurizada inoculada con 1×10^9 UFC/mL de *L. monocytogenes*. En los controles negativos se observó un ligero cambio de color para las diluciones 1:10 y 1:100, sin embargo en la muestra 1:1000 permaneció con una tonalidad similar al control negativo de reacción (NTC). Las muestras de leche inoculadas artificialmente presentaron un cambio de color similar a sus controles negativos, sin embargo, en la dilución 1:1000 el cambio fue más evidente en contraste con su control negativo (Figura 7B). Adicionalmente, se evaluó extraer ADN con el método disrupción por ebullición pero realizando un pretratamiento adicional, en esta muestra se observó un color más parecido al positivo, que era lo que se esperaba. Para corroborar los resultados se visualizaron en un gel de agarosa al 2% (Figura 7C) y cuantificaron en un espectrofotómetro (Figura 7D). En la figura 7C se observa un bandeo comprobando que las muestras presentaron amplificación, aunque en las muestras de leche sin inocular también se observaron. En este ensayo se incubó durante dos horas para detectar un mejor cambio de coloración. Sin embargo como se mencionó en el punto anterior, puede haber el error de falsos positivos al incrementar el tiempo de incubación, en este sentido la muestra que mejores resultados dio fue el diluir la muestra de leche 1:1000 y la utilización de un pretratamiento para la extracción del ADN. Para optimizar el proceso se evaluaron diferentes métodos de extracción de ADN.

3.4 Extracción de ADN en muestras de leche para utilizarse como templado en las reacciones de LAMP

La leche tiene diferencias en la composición tanto químicas como microbiológicas que afectan en el proceso de extracción de ADN y evaluación por el método LAMP, por lo que se evaluaron dos tipos de leche: leche entera pasteurizada y leche cruda. Para la leche entera pasteurizada se utilizó leche de la marca comercial Lala (LE), y para la leche cruda, se

utilizaron dos muestras de leche cruda una perteneciente a un punto de venta en Salamanca (LB1) y la otra en un punto de venta en Irapuato (LB2). A estas muestras, se les inoculó artificialmente *Listeria innocua* para posteriormente extraer ADN y evaluar diferentes protocolos de extracción en las muestras. En la tabla 4 se muestran los valores de concentración y pureza del ADN aislado utilizando los protocolos mencionados anteriormente. Además, las muestras de ADN se observaron en un gel de agarosa al 1% para corroborar su integridad (Figura 8).

Tabla 4. Comparación de diferentes métodos de extracción de ADN de leche entera pasteurizada y leche cruda.

| Método | Referencia | Tipo de leche | Concentración (ng/μL) | Pureza A260/280 | Tiempo de extracción | Detección por LAMP |
|---------------------------------|-------------------------|---------------|-----------------------|-----------------|----------------------|--------------------|
| Ebullición con agua | Shao et al. 2011 | LE | 278.8 ± 2.3 | 1.23 ± 0.01 | 10 min | SI |
| Tiocinato de guanidina - fenol | Sigmaaldrich 2021 | LE | 1.30 ± 1.13 | 1.31 ± 0.27 | 1 h | NO |
| PKS-SDS-Tritón fenol-cloroformo | Marianelli et al. 2008* | LE | 30.45 ± 18.3 | 1.71 ± 0.17 | 2 h | SI |
| | | LB1 | 231.7 ± 67.3 | 1.85 ± 0.03 | | SI |
| | | LB2 | 58.8 | 1.83 | | SI |
| PKS-SDS fenol-cloroformo | Volk et al. 2014* | LE | 31 | 1.73 | 2 h | SI |
| | | LB1 | 67.35 ± 0.35 | 1.84 ± 0.03 | | NC |
| Buffer KCl | Kacilkova et al. 2003 | LE | 766.4 ± 137.89 | 0.85 ± 0.04 | 1 h | NO |
| | | LB1 | 445.9 ± 218.78 | 0.77 ± 0.01 | | NO |
| PBS + Tween 20 | Longhi et al. 2003 | LE | 264.8 ± 22.20 | 0.93 ± 0.09 | 1h | SI |
| | | LB1 | 252.2 ± 95.18 | 1.01 ± 0.18 | | SI |

LE: Leche entera pasteurizada, LB1: Leche cruda de Salamanca, LB2: Leche cruda de Irapuato. * Protocolo fenol-cloroformo y PKS-SDS-Tritón 100X con modificación en el tiempo de incubación respecto a la fuente original. NC: no contundente.

Los protocolos de extracción que mostraron una mayor concentración fueron aquellos basados en la disrupción de la pared celular por ebullición, ya sea con agua, Buffer KCl o PBS+Tween 20. Sin embargo, la pureza obtenida fue muy baja (menor a 1.0) y, al ser visualizados en gel de agarosa al 1%, no se observó una banda definida (Figura 8). Esta es una característica común de los protocolos basados en calentamiento, que, aunque son de bajo costo, el ADN extraído puede resultar inestable por la presencia de enzimas que pueden degradarlo (Elizaquivel y Aznar, 2008). Para el aislamiento de ADN de leche entera pasteurizada y leche cruda, los protocolos de extracción con fenol-cloroformo presentaron la mayor pureza (mayor a 1.7) corroborando su integridad al ser visualizados en gel de agarosa. En contraste, la extracción con tiocinato de guanidina - fenol produjo una menor cantidad de ADN (1.3 ng/μL), el cual no pudo ser visualizado en gel de agarosa. A pesar de ser laboriosos y emplear compuestos tóxicos, los protocolos de extracción basados en solventes orgánicos siguen siendo el método de elección para el aislamiento de ADN de todo tipo de muestras, incluidas la leche (Pokorska et al. 2016). Cabe destacar que los protocolos de extracción basados por ebullición con Buffer KCl o PBS+Tween han sido empleados exitosamente en matrices cárnicas para la detección de *Listeria monocytogenes* por técnicas moleculares como PCR. Para la detección de microorganismos presentes en leche por el método LAMP se han utilizado kits comerciales para la detección de *Pseudomonas fluorescens* (Bu et al., 2022) y extracciones donde requieren una mezcla de diversas enzimas como proteinasas, lizosimas, mutanolisinas, lisostafina, entre otras (Griffioen et al., 2020) para detectar *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus aureus* y *Streptococcus* spp. Específicamente para *Listeria monocytogenes* Wang et al. (2016) ha reportado la detección de 200 cfu/mL en leche cruda mediante el aislamiento por ebullición con solución de lisis (20 mM Tris-HCl, 2 mM EDTA y 1.2% Tritón X-100) utilizando LAMP-PAGE.

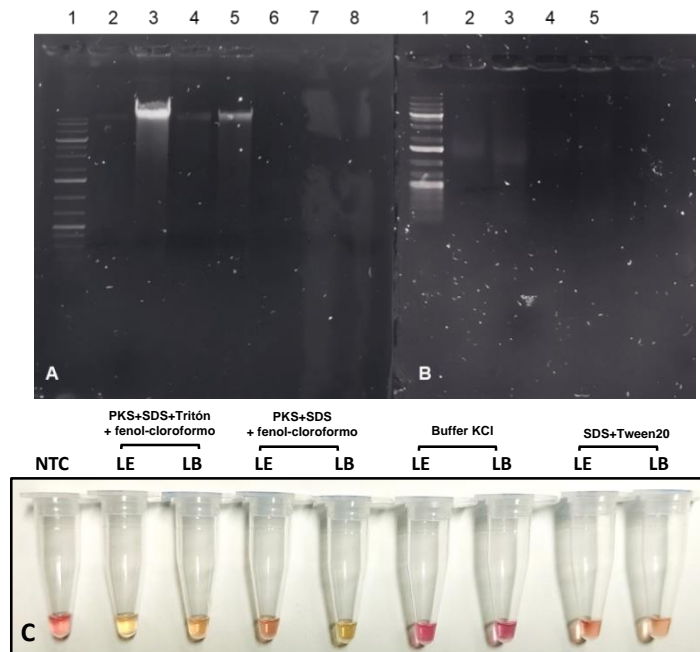


Figura 8. Muestras de ADN observadas en electroforesis. A) Extracción de ADN Gel A: 1: Marcador de peso molecular de 1 kb Plus (Invitrogen); 2: Leche Entera pasteurizada protocolo PKS-SDS-Tritón; 3: Leche cruda protocolo PKS-SD-TritónS; 4: Leche entera pasteurizada extraída por protocolo propuesto por Volk et al. 2014; 5: Leche bronca de Salamanca pasteurizada extraída por protocolo propuesto por Volk et al. 2014; 6: Dilución 1:10; 7: Dilución 1:100; 8: Dilución 1:1000. B) Extracción de ADN Gel B: 1: Marcador de peso molecular; 2: Leche entera pasteurizada protocolo KCl; 3: Leche bronca protocolo KCl; 4: Leche entera protocolo PBS- SDS; 5: Leche cruda protocolo PBS-SDS. C) Reacción de LAMP para los diferentes protocolos de extracción de ADN.

Al visualizar las muestras en luz ultravioleta en el gel de agarosa se comprobó que a pesar de obtener grandes concentraciones en las extracciones de Buffer KCl o PBS+Tween 20, en el gel no son tan visibles las bandas de ADN, probablemente a la presencia de proteínas u otros componentes de la leche. En cambio, el método de extracción de ADN que mejor resultado mostró fue aquel basado en solventes orgánicos, ya que el protocolo PKS-SDS-Tritón+fenol-cloroformo y PKS-SDS+fenol cloroformo al analizarlos en el gel de agarosa al 1% la banda de ADN es visible (Figura 8A/B). La reacción de LAMP fue positiva para la extracción con fenol-cloroformo, sin embargo, utilizando como solución de lisis la pectinasa K con SDS y Tritón 100X (PKS+SDS+Tritón+fenol-cloroformo) los resultados son más contundentes (Figura 8C). La detección de *L. monocytogenes* por LAMP utilizando métodos de extracción con solventes orgánicos y kits comerciales son las que comúnmente se utilizan para obtener una mayor sensibilidad (Papatheodorou et al., 2021). Otra forma de extracción rápida y sencilla es el método de disrupción por ebullición que ha sido utilizado en diferentes matrices alimentarias (Cui et. al 2024), en nuestro estudio se observa que fueron positivos con la solución de lisis SDS+Tween 20 y agua (Figura 8C y Figura 7C). Sin embargo, en el protocolo de extracción con buffer KCl no se observó un cambio en la coloración de la reacción aun cuando las muestras de leche estaban inoculadas artificialmente con *L. monocytogenes*, incluso desde el primer momento las muestras se tornaron de un color más fucsia en comparación con el control negativo, indicando un posible cambio en el pH de la reacción ocasionado por el buffer KCl.

4. Conclusiones

En el presente estudio se evaluaron las condiciones óptimas para detectar *Listeria innocua* y *Listeria monocytogenes* en matrices alimentarias de leche pasteurizada y leche cruda utilizando un método de detección visual mediante una ampliación isotérmica. Las condiciones óptimas de reacción fueron a una temperatura de 67°C y un tiempo óptimo de 120 minutos. Además, se evaluaron distintos protocolos de extracción de ADN por solventes orgánicos y disrupción por ebullición con diferentes soluciones. El método donde más rápida y sencilla fue la detección de *Listeria spp.* fue ebullición con agua.

5. Agradecimientos

Angela P. Mendoza Valerio agradece el apoyo de la Dirección de Investigación de la Universidad de Guanajuato por la beca otorgada para realizar una estancia en el verano de Investigación. El proyecto contó con el apoyo financiero de IDEAS Guanajuato (proyecto IDEAGTO/CONV/119/2023) a JEBC.

6. Bibliografía/Referencias

- Agudelo, D.A.A., & Mejía, O.B. (2005). *Composición nutricional de la leche de ganado vacuno*. Revista Lasallista de Investigación, 2(1),: 38-42. ISSN: 1794-4449. Disponible en: <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=69520107>
- Aguilera-Becerra, A. M., Urbano-Cáceres, E. X., & Jaimes-Bernal, C. P. (2014). Bacterias patógenas en leche cruda: problema de salud pública e inocuidad alimentaria. *Ciencia y Agricultura/Ciencia y Agricultura*, 11(2), 83-93. <https://doi.org/10.19053/01228420.3860>
- Bu, Y., Qiao, W., Zhai, Z., Liu, T., Gong, P., Zhang, L., Hao, Y., & Yi, H. (2022). Establishment and Evaluation of a Loop-Mediated Isothermal Amplification Assay for Rapid Detection of *Pseudomonas fluorescens* in Raw Milk. *Frontiers In Microbiology*, 12. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.810511>
- Busch, A., Becker, A., Schotte, U., Plötz, M., & Abdulmawjood, A. (2022). Mpl-gene-based loop-mediated isothermal amplification assay for specific and rapid detection of *Listeria monocytogenes* in various food samples. *foodborne pathogens and disease*, 19(7), 463-472. <https://doi.org/10.1089/fpd.2021.0080>
- Cartwright, E. J., Jackson, K. A., Johnson, S. D., Graves, L. M., Silk, B. J., & Mahon, B. E. (2013). Listeriosis outbreaks and associated food vehicles, united states, 1998–2008. *emerging infectious diseases*, 19(1), 1-9. <https://doi.org/10.3390/foods13132143>.
- Cui, S., Wei, Y., Li, C., Zhang, Y., Peng, X., & Sun, F. (2024). Visual loop-mediated isothermal amplification (lamp) assay for rapid on-site detection of *Escherichia coli* O157:H7 in milk products. 2008. *Foods*, 13(13), 2143. <https://doi.org/10.3201/eid1901.120393>
- De Agricultura y Desarrollo Rural, S. (2021). *Convoca Agricultura a impulsar el consumo de leche en México*. Obtenido de gob.mx: <https://www.gob.mx/agricultura/prensa/convoca-agricultura-a-impulsar-el-consumo-de-leche-en-mexico>
- Elizaquível, P., & Aznar, R. (2008). Comparison of Four Commercial DNA Extraction kits for PCR detection of *Listeria monocytogenes*, *Salmonella*, *Escherichia coli* O157:H7, and *Staphylococcus aureus* in fresh, minimally processed vegetables. *Journal Of Food Protection*, 71(10), 2110-2114. <https://doi.org/10.4315/0362-028x-71.10.2110>
- Elizaquível, P., Aznar, R., & Sánchez, G. (2013). Recent developments in the use of viability dyes and quantitative PCR in the food microbiology field. *Journal of Applied Microbiology*, 116(1), 1-13. <https://doi.org/10.1111/jam.12365>
- Féandez, A., García, C., Saén, J. & Valdezate, S. (2010). Métodos de identificación bacteriana en el laboratorio de microbiología. Recomendaciones de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. Recuperado el 24 de julio de 2024, de: <https://www.seimc.org/documentos-cientificos/procedimientos-microbiologia/2a-edicion-2003-2022/page/3>
- Feng, J., Dai, Z., Tian, X., & Jiang, X. (2018). Detection of *Listeria monocytogenes* based on combined aptamers magnetic capture and loop-mediated isothermal amplification. *Food Control*, 85, 443-452. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2017.10.027>
- Fiore, A., Treglia, I., Ciccaglioni, G., Ortoffi, M. F., & Gattuso, A. (2023). Application of a Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP) Assay for the Detection of *Listeria monocytogenes* in Cooked Ham. *Foods*, 12(1), 193. <https://doi.org/10.3390/foods12010193>
- Griffioen, K., Cornelissen, J., Heuvelink, A., Adusei, D., Mevius, D., & Van Der Wal, F. J. (2020). Development and evaluation of 4 loop-mediated isothermal amplification assays to detect mastitis-causing bacteria in bovine milk samples. *Journal Of Dairy Science*, 103(9), 8407-8420. <https://doi.org/10.3168/jds.2019-18035>
- Jaramillo-Bedoya, E., Trujillo-Alzate, Y. A., & Ocampo-Ibáñez, I. D. (2021). surveillance of fresh artisanal cheeses revealed high levels of *Listeria monocytogenes* contamination in the department of Quindío, Colombia. *Pathogens*, 10(10), 1341. <https://doi.org/10.3390/pathogens10101341>

- Kaclíková, E., Pangallo, D., Drahovská, H., Oravcová, K., & Kuchta, T. (2003). Detection of *Listeria monocytogenes* in food, equivalent to EN ISO 11290-1 or ISO 10560, by a three-days polymerase chain reaction-based method. *Food Control*, 14(3), 175-179. [https://doi.org/10.1016/s0956-7135\(02\)00085-3](https://doi.org/10.1016/s0956-7135(02)00085-3).
- Longhi, C., Maffeo, A., Penta, M., Petrone, G., Seganti, L., & Conte, M. (2003). Detection of *Listeria monocytogenes* in Italian-style soft cheeses. *Journal Of Applied Microbiology*, 94(5), 879-885. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.2003.01921.x>
- Marianelli, C., Martucciello, A., Tarantino, M., Vecchio, R., Iovane, G., & Galiero, G. (2008). Evaluation of molecular methods for the detection of *Brucella* species in water buffalo milk. *Journal Of Dairy Science*, 91(10), 3779-3786. <https://doi.org/10.3168/jds.2008-1233>
- Moshtaghi H, M. A. (2007). Incidence of *Listeria* spp. in raw milk in Shahrekord, Iran. *Foodborne Pahog Dis*, 4(1):107-10.
- Muñiz, A. A. (2018). Métodos de detección y control de *Listeria monocytogenes* en la industria alimentaria. Obtenido de https://digibuo.uniovi.es/dspace/bitstream/10651/47625/3/TFM_AnaAlonsoMu%c3%bliz.pdf
- Papatheodorou, S.A., Halvatsiotis, P. & Houhoula, D. (2021). A comparison of different DNA extraction methods and molecular techniques for the detection and identification of foodborne pathogens. *AIMS Microbiology*, 7(3), 304-319. <https://doi.org/10.3934/microbiol.2021019>
- Pokorska, J., Kulaj, D., Dusza, M., Żychlińska-Buczek, J., & Makulska, J. (2016). New Rapid Method of DNA Isolation from Milk Somatic Cells. *Animal Biotechnology*, 27(2), 113-117. <https://doi.org/10.1080/10495398.2015.1116446>
- Raddatz, B. W., Rabello, F. J., Benedetti, R., Steil, G. J., Imamura, L. M., Kim, E. y. S., Santiago, E. B., Hartmann, L. F., Predebon, J. V., Delfino, B. M., Nogueira, M. B., Santos, J. S. D., Da Silva, B. G., Nicollete, D. R. P., De Almeida, B. M. M., Rogal, S. R., & Figueredo, M. V. M. (2023). Clinical Validation of a colorimetric Loop-Mediated Isothermal amplification using a portable device for the rapid detection of SARS-CoV-2. *Diagnostics*, 13(7), 1355. <https://doi.org/10.3390/diagnostics13071355>
- Sambrook, J., Fritsch, E. F., & Maniatis, T. (2001). Molecular Cloning: a Laboratory manual. <http://ci.nii.ac.jp/ncid/BB09365076>
- Schlech, W. F., Lavigne, P. M., Bortolussi, R. A., Allen, A. C., Haldane, E. V., Wort, A. J., Hightower, A. W., Johnson, S. E., King, S. H., Nicholls, E. S., & Broome, C. V. (1983). Epidemic Listeriosis-Evidence for Transmission by Food. *New England Journal of Medicine*, 308(4), 203-206. <https://doi.org/10.1056/nejm198310273080407>
- Secretaría de Salud. NOM-143-SSA1-1995. Método de prueba microbiológico para alimentos. Determinación de *L. monocytogenes*. México, D.F. Secretaría de Salud, 1995.
- Shan, X., Zhang, Y., Zhang, Z., Chen, M., Su, Y., Yuan, Y., Alam, M. J., Yan, H., & Shi, L. (2012). Rapid detection of food-borne *Listeria monocytogenes* by real-time quantitative loop-mediated isothermal amplification. *Food Science And Biotechnology/Food Science And Biotechnology*, 21(1), 101-106. <https://doi.org/10.1007/s10068-012-0012-6>
- Sigmaaldrich. (2021). Protocolo TRI Reagent®. En <https://www.sigmaaldrich.com/MX/es/technical-documents/protocol/protein-biology/protein-lysis-and-extraction/tri-reagent> (Catalog Number T9424). Recuperado 22 de julio de 2024, de <https://www.sigmaaldrich.com/MX/es/technical-documents/protocol/protein-biology/protein-lysis-and-extraction/tri-reagent>
- Thi, V. L. D., Herbst, K., Boerner, K., Meurer, M., Kremer, L. P., Kirrmaier, D., Freistaedter, A., Papagiannidis, D., Galmozzi, C., Stanifer, M. L., Boulant, S., Klein, S., Chlanda, P., Khalid, D., Miranda, I. B., Schnitzler, P., Kräusslich, H., Knop, M., & Anders, S. (2020). A colorimetric RT-LAMP assay and LAMP-sequencing for detecting SARS-CoV-2 RNA in clinical samples. *Science Translational Medicine*, 12(556). <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.abc7075>
- Volk, H., Piskernik, S., Kurinčič, M., Klančnik, A., Toplak, N., & Jeršek, B. (2014). Evaluation of different methods for DNA extraction from milk. *Journal of Food and Nutrition Research*. https://www.researchgate.net/profile/Anja_Klancnik/publication/259564066_Evaluation_of_different_methods_for_DNA_extraction_from_milk/links/02e7e5315f00b61d02000000.pdf
- Wachiralurpan, S., Sriyapai, T., Areekit, S., Sriyapai, P., Thongphueak, D., Santiwatanakul, S., & Chansiri, K. (2017). A one-step rapid screening test of *Listeria monocytogenes* in food samples using a real-time loop-mediated isothermal amplification turbidity assay. *Analytical Methods*, 9(45), 6403-6410. <https://doi.org/10.1039/c7ay01750b>

- Wang, D., Huo, G., Ren, D., & Li, Y. (2010). Development and evaluation of a loop-mediated isothermal amplification (lamp) method for detecting *Listeria monocytogenes* in raw milk. *Journal Of Food Safety*, 30(2), 251-262. <https://doi.org/10.1111/j.1745-4565.2009.00196.x>
- Zhang, X., Lowe, S. B., & Gooding, J. J. (2014). Brief review of monitoring methods for loop-mediated isothermal amplification (LAMP). *Biosensors & Bioelectronics/Biosensors & Bioelectronics (Online)*, 61, 491-499. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2014.05.039>
- Zunabovic, M., Domig, K. J., & Kneifel, W. (2011). Practical relevance of methodologies for detecting and tracing of *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat foods and manufacture environments – A review. *LWT*, 44(2), 351-362. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2010.08.005>