

**UNIVERSIDAD POLITÉCNICA SALESIANA
SEDE QUITO**

**CARRERA:
INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA DE LOS RECURSOS NATURALES**

**Trabajo de Titulación previo a la obtención del título de:
INGENIERAS EN BIOTECNOLOGÍA DE LOS RECURSOS NATURALES**

**TEMA:
DETERMINACIÓN DE *Listeria* spp. MEDIANTE PCR EN TIEMPO
REAL EN MUESTRAS DE LECHE CRUDA, RECOLECTADAS EN LA
PROVINCIA DE PICHINCHA.**

**AUTORAS:
MARÍA ALEXANDRA CABRERA RODRÍGUEZ
PRISCILA KARINA VALLADARES TORRES**

**TUTORA:
VIVIANA PAMELA CHILUISA UTRERAS**

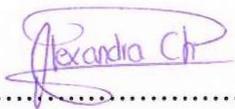
Quito, abril de 2016

Cesión de derechos de autor

Nosotras, María Alexandra Cabrera Rodríguez, con documento de identificación N° 0302201157 y Priscila Karina Valladares Torres, con documento de identificación N° 1713957585, manifestamos nuestra voluntad y cedemos a la Universidad Politécnica Salesiana la titularidad sobre los derechos patrimoniales en virtud de que somos autoras del trabajo de titulación titulado: “Determinación de *Listeria* spp. mediante PCR en Tiempo Real en muestras de leche cruda, recolectadas en la provincia de Pichincha”, mismo que ha sido desarrollado para optar por el título de: Ingeniera en Biotecnología de los Recursos Naturales, en la Universidad Politécnica Salesiana, quedando la Universidad facultada para ejercer plenamente los derechos cedidos anteriormente.

En la aplicación a lo determinado en la Ley de Propiedad Intelectual, en nuestra condición de autoras nos reservamos los derechos morales de la obra antes citada. En concordancia, suscribimos este documento en el momento que hacemos entrega del trabajo final en formato impreso y digital a la Biblioteca de la Universidad Politécnica Salesiana.

Quito, 12 de abril de 2016



.....
María Alexandra Cabrera Rodríguez

CI: 0302201157



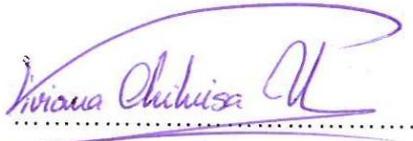
.....
Priscila Karina Valladares Torres

CI: 1713957585

Declaratoria de coautoría de la docente tutora

Yo, Viviana Pamela Chiluisa Utreras, declaro que bajo mi dirección y asesoría fue desarrollado el tema de trabajo, realizado por, María Alexandra Cabrera Rodríguez y Priscila Karina Valladares Torres, obteniendo un producto que cumple con todos los requisitos estipulados por la Universidad Politécnica Salesiana, para ser considerados como trabajo final de titulación.

Quito, 12 de abril de 2016



Viviana Pamela Chiluisa Utreras

Dedicatoria

A Dios, por darnos la fortaleza y dedicación para cumplir nuestros objetivos planteados, porque gracias a Él estamos cumpliendo una de nuestras metas.

María Alexandra Cabrera Rodríguez

Priscila Karina Valladares Torres

A mis abuelitas Enriqueta y Genoveva, que desde el cielo sé que me guían por el buen camino para ser una persona exitosa.

A mis padres, por todo el apoyo brindado durante esta etapa de vida, porque gracias a sus valores impartidos pude culminar una de las etapas de mi vida.

A mis hermanos Daniela y Santiago, por apoyarme en cada momento de mi vida y por enseñarme que con perseverancia se puede cumplir las metas y objetivos planteados.

María Alexandra Cabrera Rodríguez

A mis padres por brindarme el aliento y apoyo para culminar esta carrera, gracias a sus deseos para mi futuro y consejos, culmina esta etapa.

A mis abuelitos, que siendo su primera nieta, han puesto todo su corazón en inculcarme valores para ser la persona que soy ahora y sobre todo a mi hermano que es una de las razones por las que he terminado esta etapa, gracias por darme el aliento para seguir cuando estaba a punto de rendirme, para ti es mi esfuerzo.

Priscila Karina Valladares Torres

Agradecimientos

A la Ingeniera Viviana Chiluisa por el apoyo incondicional tanto a nivel académico como personal y por los conocimientos brindados para el desarrollo del proyecto.

A la Dr. Nancy Bonifaz, Ing. Daniel Acurio y a nuestra amiga, Stephanie Moncayo por la contribución prestada para la elaboración del proyecto.

A la Universidad Politécnica Salesiana por formarnos con buenos valores y por los conocimientos impartidos para ser buenas profesionales aptas para enfrentar los problemas de la vida cotidiana.

A los Laboratorios de Ciencias de la Vida de la Universidad Politécnica Salesiana, por permitirnos hacer uso de las instalaciones y su amable acogida.

Índice

Introducción	1
Capítulo 1.....	5
Marco conceptual.....	5
1.1. Descripción de la Provincia de Pichincha y los cantones Pedro Moncayo, Cayambe y Quito.....	5
1.2. Leche.....	6
1.2.1. La producción de leche en el Ecuador.	6
1.2.2. Propiedades físicas, químicas y aporte nutricional.....	7
1.2.3. Composición microbiológica.	8
1.2.4. Calidad de la leche.	8
1.3. Higiene en el ordeño.....	9
1.4. Almacenamiento y transporte de leche cruda.	10
1.5. Tamaño de la Unidad Productiva Agropecuaria (UPA).....	11
1.6. Raza de ganado bovino productor de leche más utilizada en la sierra ecuatoriana: Holstein.....	11
1.7. Género <i>Listeria</i>.....	12
1.7.1. Taxonomía.	12
1.7.2. Características generales.....	12
1.7.3. Listeriosis.	15

1.7.4. Epidemiología.....	15
1.8. Métodos moleculares.....	16
1.9. Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).....	17
1.10. PCR en Tiempo Real.....	18
1.10.1. Etapas de la PCR.....	19
1.10.2. Sistema de detección usado en la PCR en Tiempo Real.....	23
1.10.2.1. Sondas específicas.....	23
1.10.2.2. Sondas de Hibridación.....	23
1.10.3. Controles para la PCR en Tiempo Real.....	24
Capítulo 2.....	25
Materiales y métodos.....	25
2.1. Elección y obtención de la muestra.....	26
2.2. Toma de muestras de leche.....	27
2.3. Extracción de ácidos nucleicos.....	28
2.4. Cuantificación de ADN.....	30
2.5. Técnica de PCR en Tiempo Real.....	31
2.6. Unidad experimental.....	32
2.7. Análisis estadístico.....	32
2.8. Variables.....	34

Capítulo 3.....	35
Resultados y discusión	35
3.1. Extracción de ADN total.....	35
3.2. Cuantificación de ácidos nucleicos.....	35
3.3. Determinación de ausencia o presencia de <i>Listeria</i> spp. por PCR en Tiempo Real.....	36
Conclusiones	46
Recomendaciones	47
Referencias.....	48

Índice de figuras

Figura 1. Mapa político de la provincia de Pichincha.....	5
Figura 2. Etapas de la PCR en Tiempo Real.....	19
Figura 3. Etapa de desnaturalización.	20
Figura 4. Etapa de hibridación.	21
Figura 5. Curva de amplificación en el canal de fluorescencia 640.....	37
Figura 6. Curva de amplificación en el canal de fluorescencia 705.....	38

Índice de tablas

Tabla 1. Localización de las haciendas productoras escogidas y cantidad de muestras tomadas en cada una.....	25
Tabla 2. Promedios de concentraciones de ADN total en ng/ml.....	36

Índice de anexos

Anexo 1. Toma y almacenamiento de muestra.....	60
Anexo 2. Reactivos, etapa y muestras resultantes de la extracción de ADN.	61
Anexo 3. Equipo Qubit® para cuantificación y reactivos utilizados.....	63
Anexo 4. Reactivos de foodproof® Listeria Genus Detection Kit (Kit de amplificación de Listeria spp. para PCR en Tiempo Real) y Termociclador LightCycler® 2.0. ...	64
Anexo 5. Programación del equipo para la amplificación de ADN según las especificaciones del inserto.	65
Anexo 6. Resultados de Ausencia/Presencia de Listeria spp. obtenidos por PCR en Tiempo Real.	68

Resumen

La presente investigación se basó en la aplicación de la Reacción en Cadena de la Polimerasa en Tiempo Real (RT-PCR), para la determinación de la presencia del género *Listeria* en leche cruda. En Ecuador, sobre todo en la provincia de Pichincha, los estudios sobre esta bacteria son escasos y en leche cruda, prácticamente inexistentes. La producción de leche es una de las principales actividades ganaderas de la provincia y se hace indispensable el estudio de este producto. Siendo todos los cantones que conforman Pichincha, productores de leche, se escogió al azar tres de ellos que son Cayambe, Quito y Pedro Moncayo, para la recolección de muestras.

La aplicación de la técnica de PCR en Tiempo Real, en la detección de microorganismos y sobre todo en bacterias en alimentos, se basa en tres aspectos fundamentales: su sensibilidad, especificidad y capacidad de procesamiento de grandes cantidades de muestras, con ella es posible detectar pequeñas cantidades de microorganismos patógenos, lo que no es posible con métodos convencionales, es por eso que es ideal para detectar *Listeria* spp. en leche cruda.

En este estudio, se determinó 1 positivo de un total de 60 muestras, que representa el 1.6% de *Listeria* spp. en leche cruda de tres haciendas de Pichincha, estos resultados, de acuerdo a los análisis estadísticos realizados con la prueba de Kruskal – Wallis, demuestran que en la provincia, se encuentra presente la bacteria en leche cruda, pero en cantidades no representativas.

Palabras clave: *Listeria*, PCR en Tiempo Real, Leche Cruda, Pichincha.

Abstract

This research is based on the application of the Real Time Polymerase Chain Reaction (PCR) to determine the presence of *Listeria* genus in raw milk. In Ecuador, especially in the province of Pichincha, studies on these bacteria are scarce and practically nonexistent in raw milk. Milk production is one of the main livestock activities in the province, which is why the study of this product is essential. Being all cantons of this province, milk producers, three of them were randomly selected to collect samples which are Cayambe, Quito and Pedro Moncayo.

The application of the technique of Real Time PCR in the detection of microorganisms and especially bacteria in food is based on three fundamental aspects: its sensitivity, specificity and ability to process large quantities of samples, it is possible to detect small amounts of pathogens, which is not possible with conventional methods, is why it is ideal for detecting *Listeria* spp. in raw milk.

In this study, one positive of a total of 60 samples was determined, representing 1.6% of *Listeria* spp. in raw milk from three farms of Pichincha. These results, according to the statistical analysis performed with Kruskal – Wallis test, show that the bacteria is present in raw milk but not in representative quantities.

Key words: *Listeria*, Real Time PCR, Raw Milk, Pichincha.

Introducción

La industria lechera en la provincia de Pichincha constituye una fuente principal para la economía y contribuye a la soberanía del país, pues este es uno de los productos de abastecimiento que abarca toda la población, incluso teniendo un excedente de 200 000 litros al día (EL TELÉGRAFO, 2013). La leche es un producto tradicional, que da ingresos constantes que han ido creciendo en los últimos años, aumentando la fuente de ingresos de los agricultores. La producción de esta en la Sierra, es la más abundante a nivel nacional con 76,79% de la producción total del país, en el año 2013. La provincia de Pichincha produce 970 516 L/año (INEC, 2011) (Mera, 2014).

La falta de implementación de buenas prácticas de manufactura en industrias lácteas en la provincia de Pichincha, representa un gran problema para la salud del consumidor, debido a que el escaso control sanitario en la producción, limita que se obtengan productos de buena calidad (Torres, 2009).

Dentro de los análisis de la leche cruda se incluye la evaluación microbiológica, que constituye uno de los parámetros de clasificación de este producto. Eliminar microorganismos patógenos, causantes de enfermedades transmitidas por alimentos (ETA), requiere de procedimientos adecuados de inspección sanitaria, por lo que se requieren de métodos efectivos y rápidos para la identificación y detección de bacterias patógenas causantes de graves daños a los seres humanos, especialmente los recién nacidos, mujeres embarazadas y ancianos (Rojas & González, 2006).

Las técnicas de identificación basadas en el cultivo y las características fenotípicas de las bacterias, requieren de trabajos minuciosos y muy laboriosos, además demandan largos

periodos de tiempo para obtener resultados, por lo que no resulta viable cuando se analizan alimentos perecederos como son la leche y demás productos lácteos (Ramírez, Morón, Alfieri, & Gamboa, 2010). La aplicación de métodos como la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) es de gran ayuda, debido a que permite obtener un control más eficiente del proceso de producción y tomar decisiones a corto plazo, pues con este método de identificación se puede detectar la presencia de microorganismos aun cuando se encuentren pequeñas cantidades de los mismos (Mera, 2014).

La enfermedad es producida por una anomalía en el estado normal de funcionamiento del cuerpo humano, es una señal clara de que hay una alteración en el estado de bienestar físico, mental o social del individuo (Mera, 2014). El género *Listeria* colabora con el estado de enfermedad al ser un género bacteriano, que se encuentra en el ambiente que puede contaminar varios alimentos sea a partir de su origen, o por los manipuladores de los mismos, uno de estos alimentos susceptibles de contaminación es la leche cruda que en la provincia de Pichincha se produce de forma industrial y artesanal (Mena, 2010) (Mera, 2014).

El género *Listeria* está conformado por las siguientes especies: *L.monocytogenes*, *L. ivanovii*, *L. seligeri*, *L. welshimeri*, *L. innocua*, *L. grayi*, y *L. dentrificans*, De ellas, únicamente *L. monocytogenes* se asocia a enfermedades humanas y *L. ivanovii* a enfermedades animales (Albarracín, Poutou, & Carrascal , 2008). La colonización de este microorganismo en el hombre, produce una infección bacteriana que puede infectar a varias células del organismo pero principalmente a las del tracto gastrointestinal, pues coloniza al intestino y puede cruzar la barrera intestinal, propagándose a las barreras hematoencefálica y en caso de embarazo materno-fetal. Esta infección no es muy común y afecta, sobre todo, a personas inmunodeprimidas (Sánchez & Palencia, 2010).

Los estudios sobre *Listeria* spp., tanto en Pichincha como el Ecuador, son escasos y en leche cruda casi inexistentes, por lo que se quiere constatar si en el país, existe riesgo con este microorganismo, que al ser patógeno, ocasiona peligros para el consumidor ecuatoriano, sobre todo en leche cruda, que se consume o utiliza sin ningún tratamiento previo (Mera, 2014).

Por estas razones en la investigación nos trazamos como objetivo general, determinar *Listeria* spp. mediante PCR en Tiempo Real en muestras de leche cruda, recolectadas en la provincia de Pichincha, pues este género bacteriano está presente en la producción tanto industrial como artesanal de leche cruda, debido a la falta de control microbiológico por parte de los productores de leche, por su presencia en otras provincias del país en productos derivados de la leche, cárnicos y embutidos. Se requiere determinar si la bacteria se encuentra presente en la provincia de Pichincha, en leche cruda. Para cumplir con la investigación se deberán, obtener muestras de leche cruda en 3 haciendas medianas productoras de leche de la provincia de Pichincha para la extracción de ácidos nucleicos mediante la utilización de un kit de purificación, cuantificar los ácidos nucleicos totales, con la finalidad de determinar la concentración de ADN presente en todas las muestras recolectadas mediante la técnica de Qubit 2.0 Fluorometer® y, determinar la ausencia o presencia de *Listeria* spp. en las muestras extraídas de leche cruda mediante la técnica de PCR en Tiempo Real.

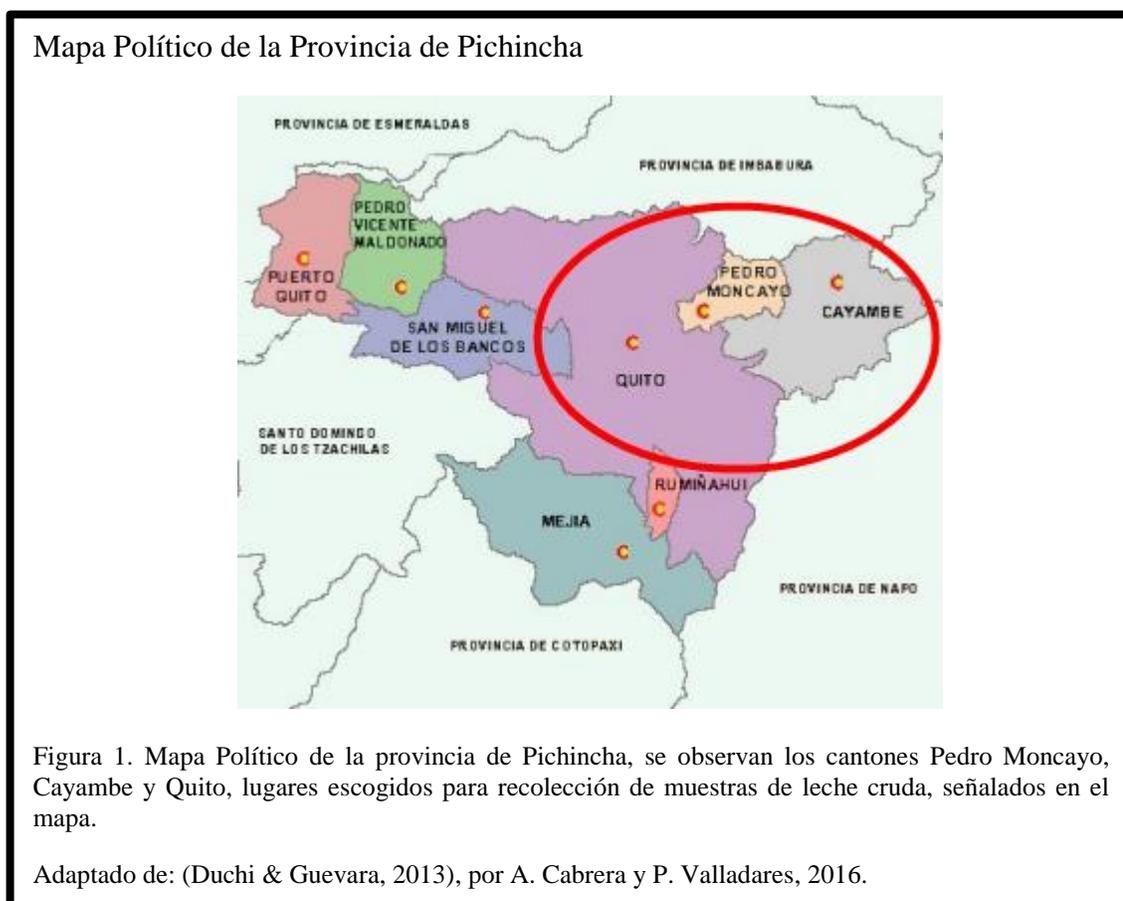
Para ello se establece que las muestras de leche cruda de tres haciendas de la provincia de Pichincha no presentan *Listeria* spp. determinadas por PCR en Tiempo Real, como hipótesis nula y como hipótesis alternativa se establece que al menos una muestra de leche

cruda de una hacienda de la provincia de Pichincha presenta *Listeria* spp. determinada mediante PCR en Tiempo Real.

Capítulo 1.

Marco conceptual

1.1. Descripción de la Provincia de Pichincha y los cantones Pedro Moncayo, Cayambe y Quito.



En esta investigación se toma la provincia de Pichincha como objeto de estudio, al ser la producción de leche una de las más altas del país. Es una de las 24 provincias que conforman la República del Ecuador y se encuentra ubicada al norte en la región Sierra,

cuenta con 8 cantones con grandes extensiones agrícolas y pecuarias cuyos productos son principalmente, para el consumo nacional. Entre los ocho cantones, se encuentran, Pedro Moncayo, Cayambe y Quito, que se ubican al norte de la provincia, como se observa en la figura 1, con temperaturas que oscilan entre los 3 °C hasta los 18° C y altura aproximada de 1730 m. s. n. m. para Pedro Moncayo y 2800 m. s. n. m. para Cayambe y Quito. Todos los cantones de la provincia producen leche en diferente medida y a pesar de que la crianza de ganado bovino se limita a un 4.23%, la producción de leche es eficaz, pues se producen 628.029 litros mensuales de los cuales, Quito produce 287.500 litros, Cayambe 88.000 y Pedro Moncayo 14.100 (Asociación de Municipalidades Ecuatorianas, 2015) (Cisneros & Machuca, 2014) (Pedro Moncayo GAD Municipal, 2014).

1.2.Lече.

La leche es un líquido blanco, opaco, de sabor ligeramente dulce que está compuesta principalmente por agua, iones (sal, minerales y calcio), carbohidratos (lactosa), materia grasa y proteína que proporciona nutrientes esenciales a la dieta humana (Cacuango & Santafé, 2011) (FAO, 2014) (Valencia, 2009).

1.2.1. La producción de leche en el Ecuador.

Según el INEC en la Encuesta de Superficie y Producción Agropecuaria Continua (2013), la producción de leche en el Ecuador es alta siendo la Sierra la región de mayor producción con un 76,79% seguido de la Costa con el 15,35% y la región Oriental con 7,86%. Del grupo de provincias de la Sierra, la de mayor aporte a la producción sigue

siendo Pichincha con un 20%, a pesar de haber reducido su participación en 5 puntos desde 1974 en el que aportaba con el 25% (INEC, 2013) (Vera, 2005).

El uso y destino de la producción lechera en el país tiene un comportamiento regular. Según estimaciones del Ministerio de Agricultura y Ganadería, entre un 25% y un 32% de la producción bruta se destina a consumo de terneros (autoconsumo) (Flores, 2009). La disponibilidad de leche cruda para consumo humano e industrial representa alrededor del 75% de la producción bruta. La leche fluida disponible se destina en un 25% para elaboración industrial (19% leche pasteurizada y 6% para elaborados lácteos), 75% entre consumo y utilización de leche cruda (39% en consumo humano directo y 35% para industrias caseras de quesos frescos), y aproximadamente un 1% se comercia con Colombia en la frontera (Vera, 2005).

1.2.2. Propiedades físicas, químicas y aporte nutricional.

- Contiene 87% de agua, el resto constituye el extracto seco que representa 130 gramos por litro.
- 3 a 4% del contenido sólido en grasas.
- 3.5% de proteínas entre las que predomina la caseína con el 80% del total y algunas enzimas.
- 5% de lactosa responsable del sabor ligeramente dulce.
- Componentes minerales (Ca, Na, K, Mg, Cl) en forma de sales inorgánicas en menos del 0.5%. Se destaca de estos minerales el Calcio que se encuentra en

proporción de 0.12 por 100 g de leche (Cacuango & Santafé, 2011) (Valencia, 2009).

El pH de la leche es ligeramente ácido entre 6.6 y 6.8. La acidez de la leche dada por la cantidad de ácido láctico es de 0.14 a 0.16% y su viscosidad es 1.85 y 2.15 cp (Cacuango & Santafé, 2011).

1.2.3. Composición microbiológica.

La leche es un alimento susceptible de contaminación, que siendo recolectada incluso asépticamente y procediendo de un animal sano, contiene siempre células, que pueden ser de dos tipos:

- Células procedentes de la sangre y de la glándula mamaria del animal que son variadas y numerosas.
- El segundo grupo son los microorganismos diversos que se encuentran en el pezón.

La leche contiene normalmente no sólo microorganismos que ya poseía al salir de la mama, sino los procedentes de contaminaciones diversa que tienen lugar en el curso de las manipulaciones de que debe ser objeto (Vera, 2005).

1.2.4. Calidad de la leche.

El estado sanitario de la leche es un factor de calidad importante. Por un lado depende del estado sanitario del animal, por otro lado depende de los residuos de medicamentos

suministrados a las vacas para controlar parásitos o infecciones. La higiene de la leche constituye otro factor importante, esta depende de la higiene del personal de ordeño, de las buenas prácticas de ordeño (lavado, presellado, secado, y sellado de ubres), de la correcta y mínima manipulación de la leche, de la temperatura y recipiente de conservación y del transporte (Valencia, 2009) (Vera, 2005).

La leche contaminada es un vehículo de transmisión de enfermedades, siendo las vacas o los ganaderos, y personas que manipulan la leche, la fuente de contaminación más importante. Si bien, en otras ocasiones, la contaminación viene producida por falta de higiene, poca limpieza de las vacas, del medio ambiente, de los sistemas de ordeño, conducciones de leche, ollas o sistemas de refrigeración (Alvarado, 2012) (Vera, 2005).

1.3. Higiene en el ordeño.

Según la norma INEN CPE INEN-CODEX 57:2013: Higiene para la leche y los productos lácteos (2013), el ordeño se debe realizar de tal manera que se reduzca al mínimo la posibilidad de contaminación con prácticas apropiadas de saneamiento e higiene personal tomando en cuenta también la temperatura de transporte y almacenamiento.

El personal debe contar con los conocimientos necesarios en sanidad animal y medicamentos, fabricación de piensos, gestión de rebaños, ordeño higiénico, almacenamiento, manipulación, recolección y transporte de la leche y los peligros de contaminación sean microbiológicos, químicos o físicos con las medidas de control pertinentes (INEN, 2013).

En el anexo 1 de la misma norma, se detallan las *Directrices para la Producción Primaria de Leche* donde se destaca el punto 3.2.4 del ordeño higiénico que menciona que el ordeño debe realizarse en condiciones higiénicas, que incluirán:

- La adecuada higiene personal de quienes realizan el ordeño;
- La limpieza de las ubres, tetillas, ingles y abdomen del animal;
- El empleo de recipientes/equipos de ordeño limpios y desinfectados; y
- Evitar cualquier daño al tejido de la tetilla/ ubre.

Los animales de ordeño deben mantenerse tan limpios como sea posible. Antes del ordeño, las tetillas deberían estar limpias. El ordeñador debe supervisar, con medios apropiados, que la leche parezca normal, por ejemplo, observando detenidamente las condiciones de los animales de ordeño, examinando la leche de cada animal en busca de indicadores organolépticos o fisicoquímicos, y recurriendo al registro e identificación de los animales tratados (INEN, 2013).

1.4. Almacenamiento y transporte de leche cruda.

La leche debe ser utilizada a las dos horas que siguen del ordeño, si es necesario el almacenamiento de la misma, se debe mantener a una temperatura igual o inferior a 6 °C si se recoge diariamente o a una temperatura igual o inferior a 4 °C si no se recoge diariamente, tanto en transporte como en almacenamiento para evitar la proliferación de microorganismos no deseados (INEN, 2013).

1.5. Tamaño de la Unidad Productiva Agropecuaria (UPA).

Una Unidad Productiva Agropecuaria (UPA) es una extensión de tierra de 500 m² o más, dedicada total o parcialmente a la producción agropecuaria, considerada como una unidad económica (SINAGAP, 2012). Estas se encuentran divididas en pequeñas, medianas y grandes de las cuales el 75% de la producción de leche se le atribuye a las UPAs pequeñas y medianas. Se consideran UPAs pequeñas aquellas que tienen una extensión de menos de 1 ha hasta menos de 20 ha, UPAs medianas de 20 a menos de 100 ha y grandes las que su extensión supera las 100 ha (Vera, 2005).

1.6. Raza de ganado bovino productor de leche más utilizada en la sierra ecuatoriana: Holstein.

El ganado lechero Holstein domina la industria de producción lechera en la mayoría de las regiones del mundo, tanto que 9 de cada 10 productores mantienen esta raza para la producción de leche, esto se debe a que en promedio producen 26 litros de leche por vaca al día, además el mayor retorno económico sobre el costo de alimentación, mérito genético sin igual, y la alta flexibilidad a una gama amplia de condiciones ambientales y su vida productiva promedio es de 4 a 6 años (Vera, 2005).

1.7. Género *Listeria*.

Género de bacterias gram-positivas anaerobias facultativas, que tiene especies como *Listeria monocytogenes*, esta causa una enfermedad en el hombre que es la Listeriosis (Jay, 2000).

1.7.1. Taxonomía.

Pertenece al dominio *Bacteria*, filo *Firmicutes*, clase *Bacilli*, Orden *Bacillales*, Familia *Listeriaceae* y género *Listeria* que comprende las siguientes seis especies: *L. monocytogenes*, *L. ivanovii*, *L. seeligeri*, *L. welshimeri*, *L. innocua* y *L. grayi*. Únicamente *L. monocytogenes* se asocia a enfermedades humanas y *L. ivanovii* a enfermedades animales (Mena, 2010) (Ryser & Marth, 2007) (Sánchez & Palencia, 2010).

Su nombre surge de un acuerdo de varios científicos que describieron el género, que luego de haber pasado por varias denominaciones, fue nombrado como *Listeria* (Jay, 2000) (Ryser & Marth, 2007).

1.7.2. Características generales.

Son bacterias gram-positivas con bordes redondeados que pueden o no presentar flagelos y su motilidad depende de la temperatura en la que se encuentren, sus requerimientos nutricionales son típicos de cualquier bacteria gram-positiva. Son bacterias productoras de ácido láctico a partir de glucosa aunque pueden utilizar otros carbohidratos complejos (Jay, 2000).

Su crecimiento se da a pH de rango 6-8 y a concentraciones altas de sal (mayor que 10 %) (Camacho, Albarracín, & Sarmiento, 2007) (Jay, 2000). No comprende más de dos especies patógenas que infectan los alimentos usualmente por contaminación previa a nivel de las plantas, pues su hábitat primario es el suelo y vegetación en descomposición. La prevalencia del género en el suelo depende de la misma microbiota con la que comparte el alimento, fauna, composición del suelo, temperatura, pH, humedad y supervivencia de la misma cepa (Linke, y otros, 2014).

Listeria es un género que crece generalmente a temperatura de 8°C aunque puede soportar temperaturas variables, pero en su crecimiento también influye la altura encontrando representantes de este género en abundancia en altitudes de 0 a 500 m. s. n. m., pues mientras va aumentando la altura las probabilidades de supervivencia del género disminuye. El suelo óptimo de crecimiento de la bacteria es una mezcla de arena y humus y se multiplica en épocas húmedas del año, tiene capacidades de supervivencia más cortas en suelos arcillosos y se cree que disminuye su población cuando no existe vida humana o animal en su lugar de crecimiento (Albarracín, Poutou, & Carrascal, 2008) (Linke, y otros, 2014) (Volokhov, Rasooly, Chumakov, & Chizhikov, 2002). A congelación parece causar un efecto perjudicial menor en el organismo, aunque generalmente no sobrevive a pasteurización o tratamientos térmicos equivalentes (Camacho, Albarracín, & Sarmiento, 2007).

El género *Listeria* comparte algunas características genéticas independientemente de si la especie es patógena o no, esto permite que se pueda identificar de manera más fácil, por medio de regiones de algunos genes compartidos, a todo el género completo, sobre

todo en alimentos donde puede haber más de una especie y en pequeñas cantidades (Linke, y otros, 2014).

Se hace indispensable identificar genes, que son comunes en todas las especies, como el 23S de rARN, gen altamente conservado, del cual se pueden extraer primers que sirvan para identificar a todas las especies de *Listeria* (Linke, y otros, 2014) (Paillard, y otros, 2003). Otro gen que comparte la especie es *iap* (invasion-associated protein) que codifica para una proteína extracelular denominada p60, que tiene que ver con las características de virulencia pero que es común también en las especies no patógenas. Se cree que contribuye a que la bacteria ataque a las células fagocíticas, trabajando conjuntamente con el gen *hly*, que se encuentra en *L. monocytogenes* y *L. ivanovii*, como parte de los componentes que causan la enfermedad, sin embargo, *hly* no se encuentra en algunas especies de *Listeria* como *L. grayi* o *L. seeligeri*, (Ryu, y otros, 2013) (Volkhov, Rasooly, Chumakov, & Chizhikov, 2002).

Así también, el gen *prs* que codifica una proteína de 318 aminoácidos que es similar a la secuencia del fosforibosil pirofosfato (PRPP) sintetasa, enzima que es constituyente de las rutas biosintéticas, que conducen a los nucleótidos de purina y pirimidina, además de aminoácidos como histidina, triptófano, y NAD, cumple una función indispensable, lo que hace que el gen *prs* se encuentre en todas las especies de *Listeria* (Gouin, Mengaud, & Cossart, 1994).

1.7.3. Listeriosis.

El manual MERCK (citado por Tipán, 2012) define la listeriosis como una “infección bacteriana esporádica que afecta a una amplia variedad de animales, entre los que incluyen las aves y los seres humanos. Aunque presenta una distribución mundial, es más frecuente en climas fríos y templados”.

1.7.4. Epidemiología.

Aún no se ha resuelto el punto básico acerca de si *L. monocytogenes* surge primero del suelo o se origina en los animales, que excretan las bacterias en sus heces. Se considera en la actualidad que el hábitat primario de la misma es el suelo y los vegetales en descomposición, en los que se puede desarrollar en forma saprófita. Es un microorganismo de amplia distribución por lo que contamina frecuentemente los alimentos durante su producción o procesamiento (Jay, 2000).

La infección se adquiere generalmente mediante la ingesta de alimentos contaminados, aunque no siempre puede identificarse la fuente y también se puede adquirir por contacto directo con el animal infectado, especialmente durante el parto. La mayoría de los casos se asocian a la ingestión de carne, pescado y vegetales crudos y lácteos no pasteurizados; también se han descrito brotes con distintas preparaciones de quesos, embutidos, patés, helados y, en general, productos refrigerados, sin requerimientos de cocción o calentamiento previo al consumo (Mateos, 2002) (Jay, 2000) (Ryser & Marth, 2007) (Sánchez & Palencia, 2010).

Los recién nacidos habitualmente adquieren la infección por vía vertical, a través de la placenta o del canal del parto infectado. *Listeria* afecta en mayor medida a los extremos de edad de la vida, embarazadas y personas con algún tipo de inmunodepresión, fundamentalmente celular, o enfermedad debilitante. En realidad, suele considerársele un patógeno oportunista (Mateos, 2002) (Jay, 2000) (Ryser & Marth, 2007) (Sánchez & Palencia, 2010).

Es probable que los seres humanos al tener contacto diario con este microorganismo, se conviertan en portadores fecales, provocando de esta manera un problema mayor para la salud pública. La amplia distribución de *Listeria monocytogenes* se debe a la capacidad de sobrevivir durante períodos de tiempo prolongados en diferentes medios (Mena, 2010).

Modo de acción del microorganismo: Después de la ingestión del alimento contaminado con *L. monocytogenes*, la bacteria pasa directamente al estómago y cruza la barrera intestinal, donde penetra y se multiplica. Luego son transportadas por la sangre a los ganglios linfáticos mesentéricos, el bazo y el hígado. Después de que entra en la célula, la bacteria se desplaza tempranamente desde el fagosoma, se multiplica en el citosol de la célula huésped, y luego se mueve a través de ella (Instituto Nacional de Salud de Colombia, 2010).

1.8. Métodos moleculares.

Los métodos moleculares se basan en el estudio de ADN y ARN, lo que constituye una de las aportaciones microbiológicas que mayor beneficio han brindado, debido a que gracias a estas técnicas, se ha podido identificar reservorios y mecanismos de transmisión

de patógenos, evolución genética de poblaciones microbianas, patogénesis y, además ha permitido comparar la composición de los ácidos nucleicos de dos o más microorganismos (Coll, Coque, Domínguez, Vázquez, & Vila, 2005) (Orbera, 2004).

Con anterioridad estos estudios se basaban en las características fenotípicas de los microorganismos, que implicaban trabajo laborioso, complejo y largos periodos de tiempo (Orbera, 2004). En la actualidad los métodos más utilizados son Southern Blot, Northern Blot, PCR, Fish, Secuenciación para ADN, RT-PCR y Microarray, este último es el menos utilizado pero en el futuro tendrá gran utilidad para el desarrollo de avances científicos (Pere, Coque, Domínguez, Vázquez, & Vila, 2005).

La ventaja de estos métodos moleculares es la estabilidad que presentan los marcadores genéticos utilizados y la posibilidad de aplicar a varios géneros y especies de microorganismos (Coll, Coque, Domínguez, Vázquez, & Vila, 2005) (Farfán, 2002).

1.9. Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).

La técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa, cuyas iniciales en inglés son PCR ("Polymerase Chain Reaction"), fue desarrollada por Kary Mullis en el año 1983. La PCR tiene la ventaja de producir múltiples copias de ADN, a pesar de la existencia de millones de otras moléculas del mismo. La enzima ADN polimerasa tiene un papel importante en este proceso, debido a que es capaz de fabricar una cadena de ADN complementaria a otra ya existente, que permite la amplificación del ADN. Los requerimientos para fabricar una cadena es que existan nucleótidos (adenina, timina, citosina y guanina) y una cadena de ADN para que el cebador (primer) se pueda unir para que genere una copia idéntica a

la original (Cortazar & Silva, 2004) (Luque & Herraéz, 2000) (Palacios, y otros, 2008) (Rodríguez, y otros, 2009).

La técnica del PCR convencional presenta una gran desventaja en relación a la técnica de PCR en Tiempo Real debido a que no es una técnica cuantitativa, además esta puede dar falsos positivos por causa de la contaminación del ADN. Para evitar estos problemas, se ha debido optimizar el proceso y la manipulación de los diferentes materiales y reactivos para obtener mejores resultados (Asamblea mundial OIE, 2008).

1.10. PCR en Tiempo Real.

La PCR en Tiempo Real fue desarrollada por Higuchi y colaboradores, en 1992, esto ocurrió al videgrabar en tiempo real la incorporación de bromuro de etidio al ADN durante cada ciclo de la PCR realizada bajo luz UV (Tamay de Dios, Ibarra, & Velasquillo, 2013).

En la técnica del PCR en Tiempo Real la amplificación y la detección, intervienen en un solo paso, esto no ocurre en la PCR convencional por lo que la detección se realiza al final de la reacción utilizando por lo general el gel de agarosa para observar los resultados. En la figura 2 se pueden observar las tres etapas de la PCR en Tiempo Real, según Tiempo y Temperatura (Aguilera, Ruiz, Rocha, Pineda, & Chánez, 2014) (García, González, & Martín, 2007).

Etapas de la PCR en Tiempo Real

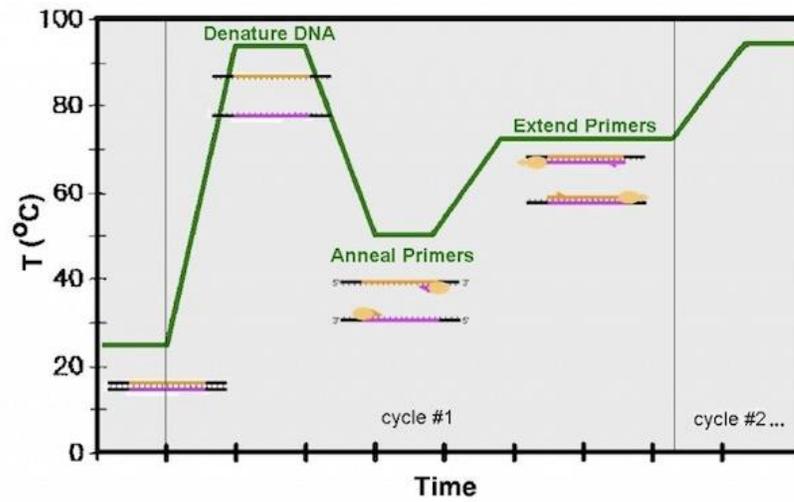


Figura 2. Representación esquemática de las etapas de la PCR en Tiempo Real según Tiempo y Temperatura.

Tomado de: (Carr, 2014), *The Polymerase Chain Reaction (PCR)*.

1.10.1. Etapas de la PCR.

a) Primera etapa del PCR: Desnaturalización o Melting.

La fase de desnaturalización consiste en la separación de la doble hélice formando dos hebras de ADN, como se puede observar en la figura 3, esto ocurre cuando se produce un aumento de la temperatura que oscila entre 80 y 97°C , mediante una incubación breve ($30 - 120$ s). El tiempo dependerá de la cantidad de G-C, ya que si esta relación es alta, el tiempo para romper los tres enlaces con respecto a las bases A-T es más alta (Echeverría, 2014) (Luque & Herraéz, 2000) (Tamay de Dios, Ibarra, & Velasquillo, 2013).

Etapa de desnaturalización de la PCR

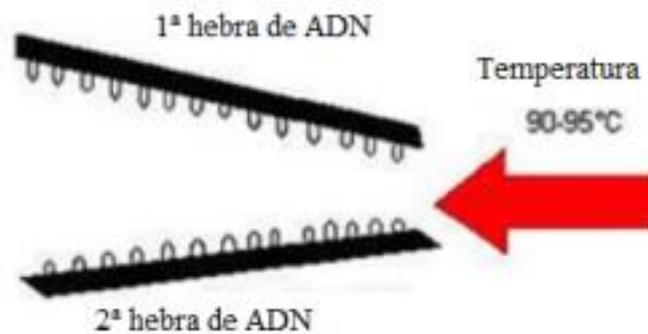


Figura 3. Desnaturalización de la hélice de ADN, misma que se separa en dos hebras para permitir la unión de los cebadores y la acción de la enzima, acciones que ocurren en las etapas posteriores de la PCR en Tiempo Real.

Tomado de: (Pérez, 2012), *Una técnica revolucionaria, PCR*.

b) Segunda etapa de la PCR: Hibridación o Annealing.

En la fase de hibridación se da la unión o rehibridación de las cadenas de ADN, esto ocurre a una temperatura que oscila entre 50 a 65 °C, que se mantiene entre 10 y 120 segundos, como se puede ver en la figura 4. En este proceso se produce una reducción de la temperatura de forma que permita la hibridación de las hebras sencillas del ADN de interés con los oligos cebadores y se forme nuevamente una molécula de ADN bicatenario (Echeverría, 2014) (Luque & Herraéz, 2000).

Etapa de Hibridación

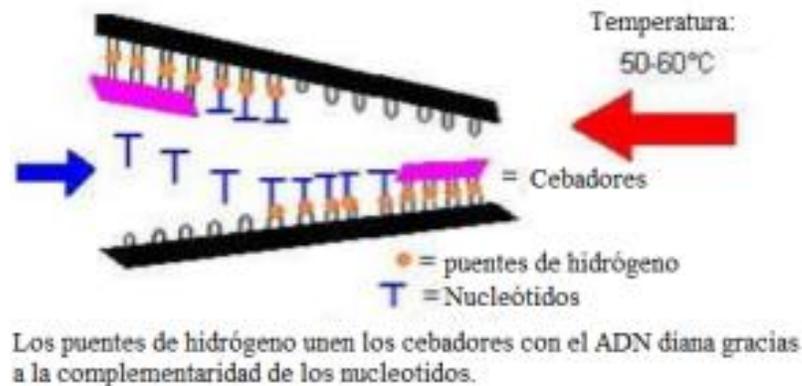


Figura 4. Unión de los cebadores a las hebras separadas de ADN, se comienza a dar la replicación de la cadena molde por acción de la Taq Polimerasa que une a los nucleótidos por medio de puentes de hidrógeno, formando una nueva cadena complementaria a la original.

Tomado de: (Pérez, 2012), *Una técnica revolucionaria, PCR*.

c) Tercera etapa de la PCR: Extensión

En la etapa de la extensión, la Taq polimerasa actúa sobre el complejo templado-primers, aumentando su velocidad de manera rápida, debido a su función catalítica. Una vez que los primers han formado los primeros enlaces con la hebra de ADN, se lleva la muestra a una temperatura que oscila entre 72 a 75 °C, durante 1 a 3 minutos en la que la ADN polimerasa termoestable va a elongar los cebadores empleando como molde ambas hebras originales. La replicación transcurre en dirección de 5'– 3', a partir del extremo 3' OH de cada cebador, empleando como sustrato los cuatro dNTPs, hasta terminar la lectura del molde o hasta que se comience una nueva etapa de desnaturalización (Cerna, Cerna, & Guapillo, 2014) (Luque & Herraéz, 2000) (Tamay de Dios, Ibarra, & Velasquillo, 2013).

Además de las 3 etapas de cada ciclo, se añade una etapa previa en la que se utilizan temperaturas altas para inactivar proteasas y nucleasas de la muestra, además que se asegura que exista una desnaturalización completa del ADN de partida. En la etapa final se realiza una prolongación de la última elongación, para permitir que se completen todos los fragmentos (Luque & Herraéz, 2000).

La PCR en Tiempo Real ha sido utilizada para la detección de patógenos de origen alimentario, este proceso es efectivo debido a su sensibilidad, especificación y detección temprana (Echeverría, 2014) (Palomino & González, 2014).

La especificidad puede verse afectada por la contaminación de la muestra, lo que provoca falsos negativos, de igual forma la contaminación con inhibidores (ácidos húmicos, polifenoles, carbohidratos, etanol, etc) de la enzima polimerasa puede ocasionar también falsos negativos. Sin embargo esto se puede solucionar incorporando siempre controles positivos. La contaminación de la muestra con otro ADN o ARN, puede dar falsos positivos por lo que es recomendable que se incorpore un control negativo para un mayor control (Rodríguez, y otros, 2009).

Los reactivos que se utilizan en la PCR en Tiempo Real son los mismos que se utilizan en la convencional; la enzima, dNTPs, Mg^{+} , el buffer y el sistema reportero de fluorescencia para detectar los productos amplificados, los cuales, se venden juntos en una solución conocida como Master mix (Tamay de Dios, Ibarra, & Velasquillo, 2013).

Los termocicladores que se usan en la PCR en Tiempo Real presentan un lector de fluorescencia, que permite medir la fluorescencia que emiten las muestras que se amplifiquen (Tamay de Dios, Ibarra, & Velasquillo, 2013).

1.10.2. Sistema de detección usado en la PCR en Tiempo Real.

Los sistemas de detección por fluorescencia utilizados en la PCR en Tiempo Real son de dos tipos: agentes intercalantes y sondas específicas para fragmentos del ADN, es decir, que solo emite la fluorescencia cuando se ha amplificado el fragmento de ADN de interés (Aguilera, Ruiz, Rocha, Pineda, & Chánez, 2014) (Costa, 2004).

1.10.2.1. Sondas específicas.

Las sondas específicas pueden ser de tres tipos: sondas de hidrólisis, sondas de hibridación y sondas de horquilla. Son sondas marcadas con dos tipos de fluorocromos que son el aceptor y el receptor. Estas se basan en el principio de FRET (*Flourescence Resonance Energy Transfer*, por sus siglas en inglés), en la que la sonda lleva adherida una molécula fluorescente y otra molécula que inhibe esta fluorescencia (quencher), de tal forma que se transfiere energía de un donador fluorescente a un aceptor o quencher para que se pueda generar la señal. Para ello existen dos pruebas basadas en la hidrólisis y por hibridación (Palacios, y otros, 2008) (Tamay de Dios, Ibarra, & Velasquillo, 2013).

1.10.2.2. Sondas de Hibridación.

Este proceso de hibridación se utiliza para identificar varias especies de forma rápida, debido a que por el método tradicional, supone varias semanas (Pinilla, Cubillos, & Rodríguez, 2008).

Las sondas de hibridación están conformadas por dos sondas. Si está hibridada no va emitir fluorescencia a una temperatura de 55 °C, esta libera fluorescencia en la fase de

desnaturalización, la cual se encuentra a una temperatura de 95 °C (Pinilla , Cubillos , & Rodríguez, 2008).

1.10.3. Controles para la PCR en Tiempo Real.

Por lo general la PCR contiene un control interno que asegura la confiabilidad de los resultados, debido a que identifica falsos negativos. En la actualidad se utilizan como controles internos, plásmidos que contienen secuencias de organismos distantes filogenéticamente. La longitud del templado debe ser mayor a la longitud del templado del ADN blanco. Además en la PCR en Tiempo Real existe un control positivo que permite verificar si existe o no la presencia del microorganismo. Para el control negativo, por lo general, se utiliza agua o buffer (Pinilla , Cubillos , & Rodríguez, 2008).

Capítulo 2.

Materiales y métodos

La investigación se llevó a cabo en los Laboratorios de Ciencias de la Vida de la Universidad Politécnica Salesiana de Quito con muestras de leche que se obtuvo de tres haciendas productoras de la provincia de Pichincha.

Tabla 1. Localización de las haciendas productoras escogidas y cantidad de muestras tomadas en cada una.

Hacienda	Localización	Cantidad de muestras
A	Chillogallo	20
B	Cayambe	20
C	Tabacundo	20

Nota: Elaborado por A. Cabrera y P. Valladares.

Se determinaron los siguientes atributos para esta investigación:

- Tipo de muestreo: Se seleccionó aleatoriamente vacas de raza Holstein de las tres haciendas escogidas.
- Selección del tamaño de muestra: Se tomó en cuenta los siguientes parámetros:
 - Número de establecimientos: Se escogió tres haciendas productoras de leche cruda de la provincia de Pichincha.
 - Número de muestras por establecimiento: Se recolectó de cada lugar veinte muestras de leche cruda.

- Intervalo de toma de muestras: Se tomó tres muestra por cada hacienda y por semana.
- Número de ensayos por muestra: 1 ensayo.
- Número de análisis por ensayo: 2 análisis, cuantificación y determinación de presencia o ausencia de *Listeria* spp.
- Número de repeticiones: 20 repeticiones por establecimiento.

2.1. Elección y obtención de la muestra.

Se tomó en cuenta: la raza del ganado (Holstein) al ser la más común para la producción de leche en el Ecuador, el nivel aséptico (medio a bajo), número de cabezas de ganado bovino, la alimentación y los diferentes cuidados del animal en el ordeño (Vera, 2005).

Para la obtención de las muestras de leche se escogió tres haciendas productoras de diferentes sectores de la provincia de Pichincha, las mismas que fueron determinadas aleatoriamente así como las tres regiones de la provincia, tomando en cuenta un rango de 20 a menos de 100 hectáreas de extensión.

La Hacienda A ubicada en Chillogallo, cantón Quito, cuya propiedad cuenta con 38 cabezas de ganado bovino, productores de leche de las razas Normando, Bombalier, Brownsuiz y Holstein, cuenta con 14 Ha para la producción de leche y 8 Ha para el pastoreo. La venta de leche es una de las actividades principales por lo que cuentan con ordeño mecánico.

La Hacienda B ubicada en el cantón Cayambe, cuenta con 28 cabezas de ganado de raza Holstein, la venta de leche es su principal actividad, el ordeño lo realizan por medio de ordeño mecánico.

La Hacienda C ubicada en la parroquia Tabacundo, cantón Pedro Moncayo, posee 56 cabezas de ganado en ordeño de raza Holstein. Su principal actividad es la venta de leche, cuya producción es de aproximadamente 44 litros por cabeza de ganado al día.

2.2. Toma de muestras de leche.

La muestra se tomó en hora de ordeño normal, a última hora de la tarde, con la ayuda del personal de la hacienda sin interrumpir la rutina de ordeño diaria, como se observa en el anexo 1a.

El equipamiento de toma de muestras para examen se encontraba limpio y estéril, por lo que se utilizó frascos de polipropileno de 250 ml, para la recolección de muestra de este estudio (INEN, 2014).

El método preciso de toma de muestras y la masa o volumen de producto que se recoge varía en función de la naturaleza del producto y del propósito para el que se necesitan las muestras. Al necesitar 1 ml de la muestra para la extracción de ADN, se tomó máximo 200 ml, esto permitió una adecuada mezcla del contenido antes del análisis, evitando la formación de mantequilla durante el transporte, que se realizó en un cooler (Anexo 1b), para mantener la muestra en un lugar oscuro hasta que se pudo almacenar en refrigeración; la temperatura adecuada para la conservación de la muestra fue de menos de 5°C, la cual

se controló mediante un termómetro calibrado (Lozano, Saz, Teruel, & Virto, 2008) (INEN, 2014). La toma y transporte de muestra se puede apreciar los anexos 1a y 1b.

2.3. Extracción de ácidos nucleicos.

En el anexo 2a se observan los reactivos del Foodproof Sample preparation Kit II (Kit de extracción de ADN), utilizados en esta investigación.

Se desinfectó la cámara de flujo y los materiales a utilizarse con luz UV durante 30 minutos y después se limpió la superficie con DNA decontaminant para eliminar todos los residuos de ADN que se encuentren en la misma.

Se prepararon todos los reactivos del Foodproof Sample preparation Kit II (Kit de extracción de ADN) en el interior de la cámara de flujo.

Para la extracción de ácidos nucleicos se utilizó el protocolo de BIOTECON Diagnostics que detalla la utilización de un tubo colector de 1.5 ml en el que se colocó 1 ml de muestra para una posterior centrifugación a 8 000 x g (10 000 rpm). Luego se procedió a la remoción del sobrenadante, se resuspendió el pellet en 200 µl de buffer de lisis, para liberar el ADN del núcleo celular.

Se agregó a la preparación 10 µl de la solución de lisozima, que aseguró la ruptura total de la pared celular bacteriana al hidrolizar los enlaces glucosídicos del peptidoglicano presente en la misma (INVITRIA, 2015), se incubó a 37 °C por 10 minutos, se añadió 200 µl de binding buffer, mezclando uniformemente, permitiendo que el ADN se adhiera a la columna para ser extraído. Se añadió 40 µl de la solución de trabajo proteinasa K que

eliminó residuos de proteínas contaminantes. Se mezcló bien y se incubó a 72°C por 10 minutos. Se incorporó 100 µl de etanol al 95%, se homogenizó y centrifugó a 12 000 x g (12 500 rpm aproximadamente) por 15 segundos para precipitar el ADN, pues en la presencia de cationes, el etanol induce un cambio estructural en moléculas de ADN que hace que se junten y precipiten fuera de la solución, también eliminando posibles sales contaminantes solubles en etanol (Gaikwad, 2015).

Se retiró el sobrenadante y se colocó en el tubo de columna, se centrifugó a 5 000 x g por 1 minuto para descartar lo que se almacena en el tubo de colección. Se añadió 450 µl de Wash Buffer al tubo filtro, se centrifugó a 5 000 x g (8 000 rpm aproximadamente) por 1 minuto y se descartó nuevamente lo almacenado en el tubo colector, se repitió el lavado con el buffer para eliminar los reactivos anteriores del ADN y luego se centrifugó a 13000 x g o máxima velocidad por 10 s. posteriormente se insertó el tubo filtro en un tubo colector de 1.5 ml, se adicionó en el tubo filtro 50 µl de Elution Buffer, previamente calentado a 70 °C, y se mantuvo a temperatura ambiente de 1 a 2 minutos, se realizó una centrifugación a 5 000 x g (8 000 rpm aproximadamente) por 1 minuto y se desechó el tubo filtro. El Elution Buffer ayudó a filtrar el ADN, contenido en el filtro del tubo de columna, al tubo colector para tener aproximadamente 50 µl de muestra para el posterior análisis. Los anexos 2b y 2c demuestran una etapa de la extracción y las muestras obtenidas de ADN total respectivamente.

2.4. Cuantificación de ADN.

En el equipo Qubit 2.0 Fluorometer®, que se observa en el anexo 3a, se realizó la cuantificación de ADN.

Se prepararon los reactivos necesarios para la cuantificación que se observan en el anexo 7. La Working Solution se elaboró según especificaciones del mismo equipo, es decir, se añadió 1 µl de Qubit® Reagent que permite la fluorescencia de la muestra siempre que esta se adhiera a la molécula (THERMO FISHER, 2015), y 199 µl de Qubit® Buffer, ambos reactivos por cada muestra y estándar.

Se adicionó la Working Solution en tubos Qubit® con 10 µl por cada muestra y estándar, protegidos de la luz, para evitar que los reactivos se degraden.

Se colocó los tubos en el vórtex por 2 o 3 segundos y se incubó por 2 minutos a temperatura ambiente, antes de la lectura.

Se dio lectura primero el tubo que contiene el estándar inferior y después el que contiene el estándar superior para establecer los límites de lectura dentro de la curva para el análisis de las muestras.

Cada muestra fue leída determinando la cuantificación de las mismas en ng/ml y la configuración del equipo según el volumen de muestra tomado.

2.5. Técnica de PCR en Tiempo Real.

Para la preparación de las muestras a amplificar se utilizó el protocolo foodproof® *Listeria* Genus Detection Kit cuyos reactivos se pueden apreciar en el anexo 4a.

Para la elaboración de la Master Mix, en un tubo colector de 1.5 µl, se añadieron 13 µl de foodproof *Listeria* Genus Master Mix que contenía primers preparados, una sonda de hibridación específica para ADN de *Listeria*, y un control interno específico para *Listeria* spp. para evitar resultados inválidos. Se agregó 1 µl de foodproof *Listeria* Genus Enzyme Solution que contiene Taq ADN polimerasa, y 1 µl de foodproof *Listeria* Genus Internal Control, el cual se amplifica junto con la muestra si esta es positiva bajo las mismas condiciones. Cuando la muestra no es amplificada, el control interno lo es por lo que se elimina la posibilidad de falsos negativos (BIOTECON Diagnostics, 2007) (Tamay de Dios, Ibarra, & Velasquillo, 2013).

Esto se preparó por cada reacción, más dos reacciones adicionales para cubrir los controles, positivo y negativo.

Se tomó 15 µl de la Master Mix por capilar y se adicionó 5 µl de la muestra de ADN, sellando el capilar después.

Para el control negativo se añadió 15 µl de la Master Mix y 5 µl de Agua grado PCR y para el control positivo, la misma cantidad de Master Mix y 5 µl de foodproof *Listeria* Genus Control Template, que contiene una solución de ADN plásmido estable, perteneciente a *Listeria* spp. que garantiza su amplificación positiva.

Se colocó los capilares en los adaptadores de la centrífuga, que se encontraban en el bloque frío, y se centrifugó a 700 x g o 3 000 rpm por 5 segundos.

Al LightCycler® 2.0, que se observa en el anexo 4b, se transfirieron los capilares y se programó el equipo según especificaciones del foodproof *Listeria* Genus Detection kit como se indica en el anexo 5.

2.6. Unidad experimental.

Tubo de 1,5 ml que contiene 50 µl de ADN total extraído de leche cruda.

2.7. Análisis estadístico.

Los métodos estadísticos utilizados para este estudio fueron Shapiro-Wilks y Kruskal-Wallis, realizados por medio de herramientas de análisis de datos a través del programa estadístico INFOSTAT.

➤ Shapiro-Wilks.

Este test determina si una muestra de tamaño n procede de una población con distribución normal.

La prueba de Shapiro-Wilks presenta dos hipótesis.

Ho: Los datos de la muestra tienen una distribución normal.

Ha: Los datos de la muestra NO tienen distribución normal (Rial & Varela, 2008) (Yáñez, 2010).

El estadístico de la prueba se denomina W, que se calcula mediante la siguiente fórmula:

$$W = \frac{1}{D} \left[\sum_{i=1}^k a_i (x^{(n-i+1)} - x^{(i)}) \right]^2$$

Tomado de: (Yáñez, 2010)

La decisión final de la prueba está dada por la comparación del valor de alfa obtenido, la muestra no es normal cuando el alfa calculado es menor a 0.05 (Rial & Varela, 2008) (Yáñez, 2010).

➤ Kruskal-Wallis.

Es una prueba no paramétrica que consiste en probar si un grupo de datos proviene de la misma población o si poseen medianas similares o no.

Presenta dos hipótesis:

Ho: Los grupos contrastados tienen medianas estadísticamente similares.

Ha: El valor de la mediana de al menos uno de los grupos de datos es diferente a la de los otros grupos.

El estadístico de la prueba es H y se calcula de la siguiente manera:

$$H = \frac{12}{N(N + 1)} \sum \frac{R_i^2}{n_i} - 3(N + 1)$$

Tomado de: (Yáñez, 2010)

La decisión final de la prueba está dada por la comparación del H calculado con el alfa escogido ($p < 0.05$), se acepta la hipótesis alternativa si H tiene una probabilidad asociada menor al alfa escogido (Yáñez, 2010).

2.8. Variables.

➤ Variable dependiente:

Presencia o ausencia de *Listeria* spp. en muestras de leche cruda: Determinación por medio de la extracción de ADN, cuantificación y posterior amplificación de las muestras mediante PCR en Tiempo Real.

➤ Variable independiente:

Muestras de leche cruda de las 3 haciendas productoras.

Capítulo 3.

Resultados y discusión

3.1. Extracción de ADN total.

La obtención de los ácidos nucleicos se realizó por medio de un kit de extracción comercial específico para bacterias. Las técnicas convencionales de extracción de ADN requieren laborioso trabajo y gasto de tiempo, demandan pasos complicados que pueden llevar a falsos negativos, más aún si la extracción es de varias especies bacterianas contenidas en una misma muestra de alimento. Las técnicas de extracción con un kit comercial, han resultado ser más efectivas que las convencionales por su alta especificidad, sensibilidad y rapidez. Con ellas se puede obtener un ADN de alta calidad con poca probabilidad de degradación. Es necesario realizar una extracción de ADN libre de sustancias inhibitorias como proteínas, que alteran los resultados de la amplificación por PCR en Tiempo Real. En este estudio se obtuvieron 60 extracciones exitosas, 20 por cada hacienda evaluada. Todas las muestras presentaron ADN, lo que se corroboró con la cuantificación para su posterior amplificación (Acevedo, Navarro, Constantino, Gil, & Benavides, 2007) (Amagliani, Giammarini, Omiccioli, Brandi, & Magnani, 2007).

3.2. Cuantificación de ácidos nucleicos.

La cuantificación se llevó a cabo mediante la técnica de Qubit 2.0 Fluorometer®, dando como resultado lo siguiente:

Tabla 2. Promedios de concentraciones de ADN total en ng/ml.

HACIENDAS	REPETICIONES	PROMEDIOS (ng/ml)
Hacienda A	20	3,43E+03
Hacienda B	20	2,84E+03
Hacienda C	20	2,25E+03

Nota: Elaborado por A. Cabrera y P. Valladares, 2015.

En este estudio se pudo determinar que las 60 muestras cuantificadas, presentaron ADN. En la tabla 2, se aprecia el promedio de ADN total extraído de leche cruda por hacienda.

La cuantificación se llevó a cabo con el fin de determinar que la extracción de ADN fue exitosa para realizar la amplificación posterior, sin embargo, no determina la presencia de *Listeria*, pues este patógeno puede presentarse en leche cruda inclusive a bajas concentraciones de ADN (Schöbitz, Marín, Horzella, & Carrasco, 2001).

3.3. Determinación de ausencia o presencia de *Listeria* spp. por PCR en Tiempo Real.

Una vez comprobado que existía suficiente concentración de ADN después de la extracción del mismo de muestras de leche cruda de tres haciendas de la provincia de Pichincha, se realizaron nueve corridas de las cuales se destaca una de la que se obtuvo lo siguiente:

Curva de Amplificación en el canal de fluorescencia 640

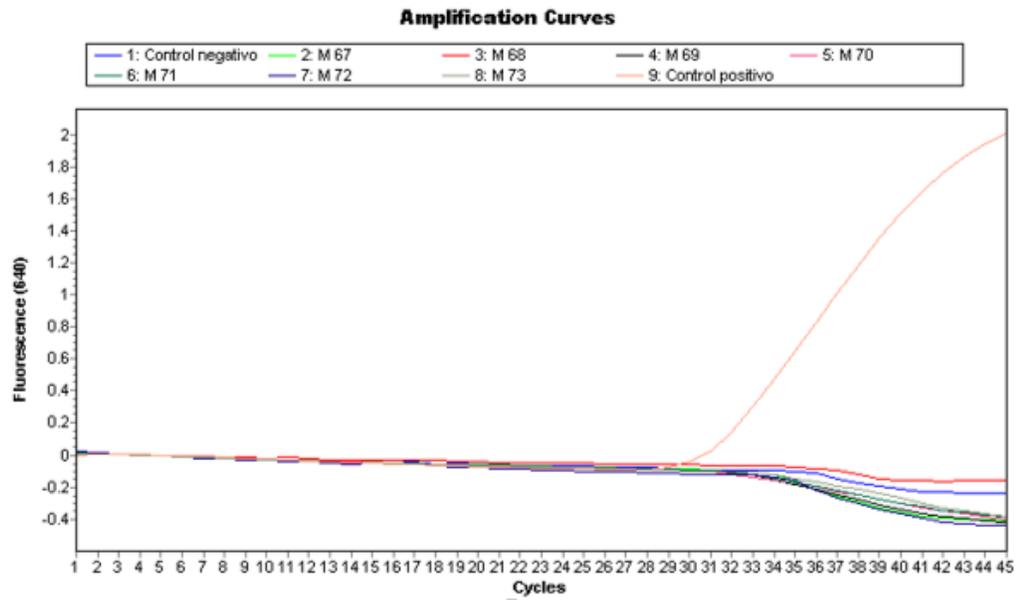


Figura 5. Curva de Amplificación en el canal de fluorescencia 640, y ciclos de la PCR en Tiempo Real vs. Fluorescencia.

Elaborado por A. Cabrera y P. Valladares, 2015.

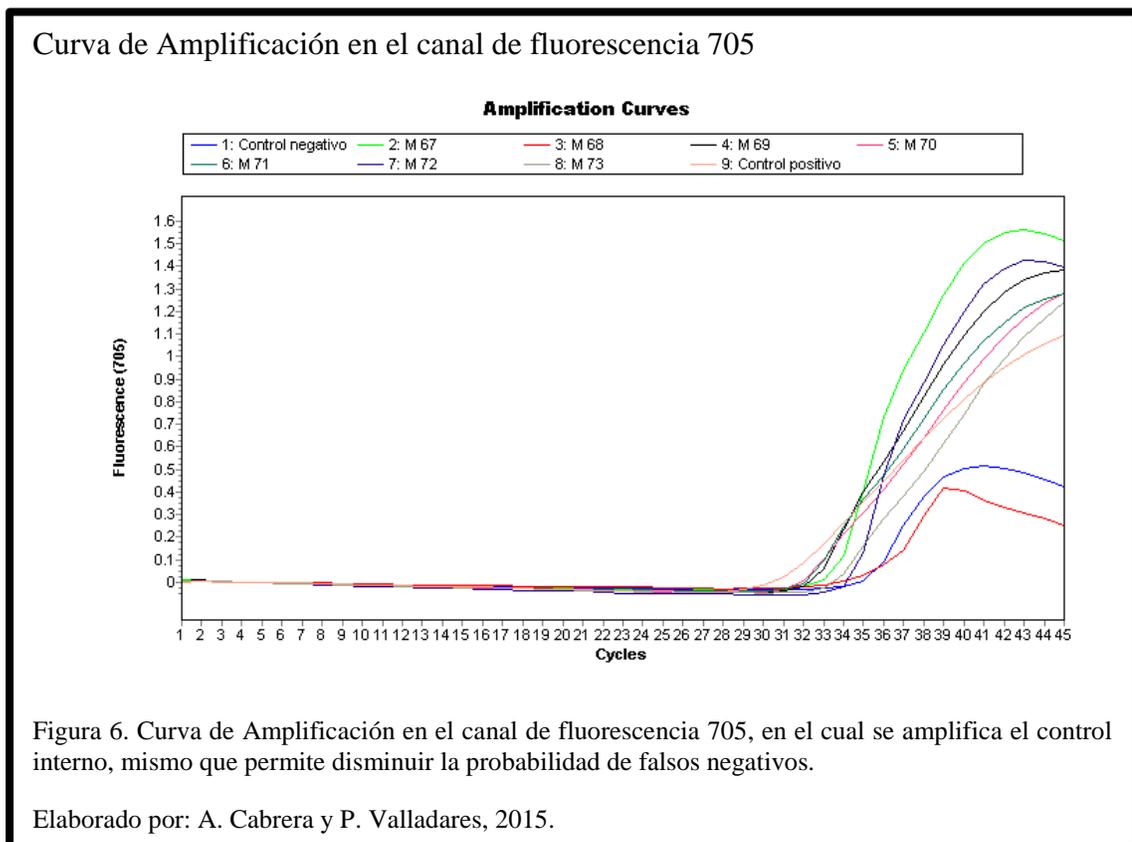
En la figura 5, se puede visualizar que en el eje de las ordenadas se expresa la fluorescencia que detecta el termociclador y en el eje de las abscisas se expresa el número de ciclos de la PCR en Tiempo Real.

Se puede apreciar que las curvas tienen tendencia negativa y no presentan forma específica. El control positivo cuyo *crossing point* (CP), se empezó a dar en el ciclo 30, muestra una curva diferente a las de las demás muestras.

Las curvas observadas en la figura 5, se obtuvieron en el canal de fluorescencia 640, para corroborar la validez de estas, se realizó la corrida a la par en el canal de fluorescencia

705, pues el kit utilizado presentaba un control interno elaborado para amplificarse en este canal de fluorescencia, como se puede observar en la figura 6.

El kit utilizado presenta este control interno para prevenir falsos positivos o falsos negativos al realizar la corrida (Tamay de Dios, Ibarra, & Velasquillo, 2013). Una de las muestras resultó positiva, a pesar de que emitió una señal débil, debido a la baja concentración de ADN de *Listeria* spp. en la muestra, esto conlleva de igual manera a que la muestra no haya presentado una curva de amplificación adecuada.



Los datos obtenidos, que se aprecian en el anexo 6 que muestran la amplificación, siendo el 0 ausencia y el 1 presencia de *Listeria* spp. fueron analizados mediante el

programa estadístico INFOSTAT con la prueba de Shapiro-Wilks para determinar la normalidad de los datos, arrojando un resultado del estadístico de la prueba $W = 0.15$ con un alfa de 0.0001 que es menor al alfa escogido 0.05 por lo que se acepta la hipótesis alternativa que dice que los datos no presentan una distribución normal, con este resultado se pueden aplicar pruebas no paramétricas, pues los datos no cumplen con los requisitos supuestos para aplicar estadística paramétrica (Pagano, 2011) (Yáñez, 2010).

En este estudio se escogió la Prueba de Kruskal Wallis arrojando los siguientes resultados:

Los resultados obtenidos con la Prueba de Kruskal Wallis dieron un H igual a 0.10 y p igual a 0.3679, valores que presentan una probabilidad asociada mayor al alfa escogido 0.05, aceptando así la hipótesis nula que menciona que, las muestras de leche cruda de tres haciendas de la provincia de Pichincha no presentan *Listeria* spp. determinadas por PCR en Tiempo Real, sobre la hipótesis alternativa que dice que, al menos una hacienda productora de la provincia de Pichincha difiere en la ausencia o presencia de *Listeria* spp. en leche cruda. Esto se debe a que las medianas son estadísticamente similares (Pagano, 2011).

La PCR en Tiempo Real, en la detección de microorganismos y sobre todo en bacterias en alimentos se basa en tres aspectos fundamentales: su sensibilidad, especificidad y capacidad de procesamiento de grandes cantidades de muestras. La Reacción en Cadena de la Polimerasa presenta varios métodos establecidos que permiten detectar hasta niveles muy bajos de bacterias y otros microorganismos, esto es porque con esta técnica se pueden amplificar fragmentos pequeños de ADN en los alimentos (Rojas & González, Detección

e Identificación de Bacterias Causantes de Enfermedades Transmitidas por Alimentos mediante la Reacción en Cadena de la Polimerasa, 2006), con esta premisa se aplica la técnica de PCR en Tiempo Real en muestras de leche cruda para determinar la presencia o ausencia del género *Listeria*, el cual presenta especies tanto inofensivas como patógenas, estas últimas contando aún con un mínimo número de UFC, son peligrosas no sólo para evaluar la seguridad microbiana de leche cruda que en muchas zonas del país se toma directamente de los recipientes de recolección o que es utilizada para realizar otros derivados como quesos, sino también para la evaluación cuantitativa de los riesgos de este patógeno (Camacho, Albarracín, & Sarmiento, 2007) (Quero, Santovito, Visconti, & Fusco, 2014).

La ausencia de *Listeria* spp. en leche cruda se debe a varios factores como composición del suelo, tipo de alimentación del ganado, condiciones ambientales, higiene del ordeño y comportamiento bacteriano.

Las fuentes de *Listeria* spp. en leche cruda provienen de contaminación fecal y del medio ambiente durante el ordeño, almacenamiento y transporte, los animales infectados o enfermos y la mala calidad del ensilaje (Rahimi, Momtaz, Behzadnia, & Baghbadorani, 2014). Los suelos son un factor determinante en la calidad de la leche, sobre todo en la presencia de bacterias patógenas que escalan al pasto que consume el ganado. En nuestro país el alimento del ganado se basa en plantas forrajeras, las cuales no presentan problema de crecimiento debido a que la humedad, sobre todo en la provincia de Pichincha, es suficiente todo el año. Los ganaderos previenen problemas de sequía conservando el forraje que existe en exceso en épocas de lluvia, para épocas críticas como los largos

veranos, esto previene que el animal contraiga enfermedades bacterianas, como el caso de listeriosis (McLaughlin, Casey, Cotter, Gahan, & Hill, 2011).

Cuando existe escases de alimento para el ganado, se acude a otro tipo de forraje como el bagazo de la caña de azúcar, que provee los nutrientes necesarios. Esto no significa que en la biota del suelo no se encuentren algunas especies de *Listeria*, pero por la competencia existente entre la misma y otras especies bacterianas, es escasa su presencia en el forraje (Alba, Pastos y Forrajes, 2012).

Un animal requiere cantidades relativamente grandes de fósforo, potasio, calcio, magnesio, que obtiene de los forrajes cultivados en suelos ricos en estos nutrientes, por lo que a pesar de la existencia de bacterias patógenas en el suelo, el animal no contrae enfermedades pues satisface sus necesidades nutricionales (Alba, 2012) (McLaughlin, Casey, Cotter, Gahan, & Hill, 2011). En las haciendas evaluadas, se corroboró que la alimentación del ganado era una prioridad pues a pesar de que el estudio fue realizado en época de sequía, el ganado se encontraba en buenas condiciones de salud, debido a que la alimentación no variaba por épocas por las reservas de forraje, además de complementar su dieta con balanceados y minerales.

Otro factor que afecta el crecimiento de *Listeria* spp. es la competencia que se da con microorganismos propios de la leche y otros microorganismos patógenos, que hacen más difícil su supervivencia, debido a que debe competir por nutrientes con otras especies con un tiempo de duplicación más corto, como las coliformes o las bacterias ácido lácticas, estas últimas se alimentan de lactosa provocando su rápido crecimiento y acidificando la leche rápidamente, lo que afecta el crecimiento de *Listeria* (Camacho, Albarracín, &

Sarmiento, 2007) (Ramírez, Rosas, Velásquez, Ulloa, & Arce, 2011) (Schöbitz, Marín, Horzella, & Carrasco, 2001). Además se ha comprobado que estas bacterias tienen sustancias que inhiben la acción del patógeno, una de las sustancias es la bacteriocina que tiene acción bactericida sobre receptores específicos de las células y una capacidad de acción específica, estas son especialmente estudiadas por su acción contra los géneros de *Listeria* causantes de enfermedades, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella*, entre otras (Ramírez, Rosas, Velásquez, Ulloa, & Arce, 2011) (Suárez, De Francisco, & Beirao, 2008). También puede atribuirse al posible efecto inhibitorio de ácidos grasos propios de la leche, Gallegos y col (2007), determinan que los ácidos láurico, linoléico y linolénico a pH 5 ± 0.2 son fuertemente bactericidas, provocando la ruptura de la membrana celular, así también, los ácidos grasos saturados pueden provocar lisis bacteriana por cambios en la fluidez de la membrana lipídica, provocando la muerte automática de la bacteria, esto se debe a que *Listeria* spp. tiene la capacidad de multiplicarse a valores de pH no menores a 4.4 lo que dificulta su crecimiento con bacterias ácido lácticas que soportan pH de 3.2 (Ramírez, Rosas, Velásquez, Ulloa, & Arce, 2011). En este estudio las muestras de leche se mantuvieron a una temperatura de 4 °C o menos, lo que pudo contribuir a la inhibición del crecimiento de *Listeria*, debido a que en condiciones de pH ácido, sal y competencia microbiana, no crece por debajo de esta temperatura (ACSA, 2010) (Gallegos, y otros, 2007) (Schöbitz, Marín, Horzella, & Carrasco, 2001).

Según Camacho y col (2007), cuando no se realizan prácticas adecuadas de limpieza en el ordeño, *Listeria* forma biopelículas sobre superficies inertes como en sistemas mecánicos de ordeño, tanques colectores y pezoneras que se utilizan para más de un animal, pues las vacas sanas se exponen a los organismos presentes en la leche proveniente

de ubres de otras vacas infectadas (Ruegg, 2004). El lavado y desinfección son procesos que van vinculados con la higiene del ordeño, inclusive parte del bombeo de la leche al tanque de almacenamiento va por tubería cerrada por lo que es indispensable un buen ciclo de lavado y desinfección para evitar que se forme la biopelícula de *Listeria*. Por esta razón en las tres haciendas evaluadas en este estudio se evidenció poca presencia de *Listeria* debido al uso de un sellador de pezones a base de yodo. Este elemento tiene características germicidas pues forma complejos surfactantes que eliminan a los patógenos causantes de mastitis, como *Listeria monocytogenes* (Camacho, Albarracín, & Sarmiento, 2007) (Ruegg, 2004).

La higiene en el ordeño no solo se limita a los equipos sino también al animal, Reneau (citado por Ruegg, 2004), menciona que las vacas con patas y ubres sucias, tienen mayor prevalencia de mastitis subclínica, que es la enfermedad más común que provoca *Listeria monocytogenes* en bovinos. En el Ecuador la norma INEN de la Higiene para la Leche y Productos Lácteos (2013), obliga a todos los productores de leche a regirse a la limpieza de las ubres, tetillas, ingles y abdomen del animal para un ordeño en condiciones higiénicas; así también el lavado y desinfección adecuados de los tanques y pezoneras. Esto contribuyó a la poca presencia de *Listeria* en esta investigación, pues las haciendas visitadas cumplían con la higiene básica para el ordeño (Ruegg, 2004).

En el análisis por PCR en Tiempo Real, se obtuvo un positivo en 60 muestras analizadas, lo que representa el 1.6% de presencia de *Listeria* spp en leche cruda. Estos resultados concuerdan con estudios previos de la presencia de esta bacteria en leche realizados en Irán, donde la prevalencia de *Listeria* en leche es de 7,3%, es decir, 19 muestras infectadas de un total de 85, así también Moshtaghi y Mohamadpour (2008),

demuestran que de 500 muestras, 11 de ellas presentaron *Listeria* que equivale al 2,2% (Rahimi, Momtaz, Behzadnia, & Baghbadorani, 2014).

En Sudamérica se han evidenciado estudios de presencia de *Listeria* spp. en leche cruda como en Colombia donde Rueda (2005), señala presencia del 22,2% y un 2% en leche pasteurizada. En este país la incidencia alcanza el 34%. En Chile, Schöbitz y col (2001) señalan que los análisis de leche cruda de 50 muestras arrojaron que la presencia de *Listeria* spp. es de 22%, es decir, 11 muestras de las analizadas. Los estudios de *Listeria* spp. en leche cruda son limitados pero en derivados como el queso y yogurt se evidencia la presencia de la bacteria. Ramírez y col (2010) se refieren a queso blanco criollo, donde obtuvo presencia en 8 de 30 muestras analizadas en Venezuela, así también en Argentina, Mengoni y Apraiz (2008), señalan que de 68 muestras de queso analizadas, en una se detectó presencia de *Listeria*.

En nuestro país existen escasos estudios sobre *Listeria* spp., sin embargo, Mena (2010), evalúa la prevalencia de la bacteria en yogurt por medio de PCR en Tiempo Real y reporta que de 100 muestras, 4 resultaron positivas.

Los resultados negativos encontrados en la presente investigación, demostraron que en las tres haciendas existe una baja incidencia de *Listeria* spp, por las condiciones higiénicas, de suelo, alimentación y salud animal en las que se manejan, por lo que el nivel de contaminación de leche cruda es bajo a pesar de estar poco tecnificadas y ser de baja producción. La técnica de PCR en Tiempo Real permitió detectar concentraciones bajas de *Listeria* spp. en un período de tiempo corto, obteniendo un positivo en 60 muestras

analizadas, por lo tanto, con esto se comprueba que en la provincia de Pichincha se encuentra presente la bacteria en leche cruda en cantidades no representativas.

Conclusiones

Se logró extraer ADN total de todas las muestras recolectadas, con el kit comercial utilizado, debido a su alta especificidad, sensibilidad y rapidez, evitando la degradación y contaminación del ADN.

Se cuantificaron las muestras, con el fin de determinar si existía ADN en las mismas, esto para aplicar la PCR en Tiempo Real, sin embargo, la concentración de ADN no determina la presencia de *Listeria*.

La PCR en Tiempo Real permitió detectar concentraciones bajas de *Listeria* spp. en un período de tiempo corto, obteniendo un positivo en 60 muestras analizadas, lo que demuestra que esta técnica es adecuada para acortar el proceso de detección y obtener resultados verdaderos aún con poco material genético en las muestras.

Con la presente investigación se determinó que en la provincia de Pichincha, no existen cantidades representativas de *Listeria* spp. en leche cruda, por las condiciones higiénicas, de suelo, alimentación y salud animal en las que se manejan las tres haciendas escogidas, por lo que el nivel de contaminación de leche cruda es bajo a pesar de estar poco tecnificadas y ser de baja producción, sin embargo, la escases de la bacteria no significa del todo seguridad microbiana de leche cruda, pues la bacteria puede convertirse en un problema alimentario grave.

Recomendaciones

En el almacenamiento de las muestras de leche cruda, es recomendable que no se mantenga a menos de 4 °C, para evitar que se inhiba el crecimiento de *Listeria* spp.

En el Ecuador no existen investigaciones de la presencia de *Listeria* spp. en leche cruda, por lo que es crucial que se realicen estudios sobre este microorganismo en más provincias del país abarcando tipos de haciendas, diferentes a las escogidas para este estudio.

La técnica de PCR en Tiempo Real es un proceso muy efectivo, debido a su alta sensibilidad, especificidad y rapidez, por lo que se sugiere que se realicen investigaciones que permitan un mejor control de patógenos alimentarios y otros estudios basados en la identificación de ADN.

Referencias

Acevedo, F., Navarro, L., Constantino, L., Gil, Z., & Benavides, P. (2007). Método rápido y económico para la extracción de ADN genómico en la broca del café y su uso en PCR. *Cenicafé*, 58(2), 134-141.

ACSA. (2010). *Riesgos emergentes de Listeria*. Recuperado el 16 de Diciembre de 2015, de Agencia Catalana de Seguridad Alimentaria:
http://www.gencat.cat/salut/acsa/html/es/dir1599/acsabrief/acsabrief12-2010listeria_es.pdf

Aguilera, P., Ruiz, M., Rocha, M., Pineda, B., & Chánez, M. (2014). *PCR en Tiempo Real*. Recuperado el 16 de diciembre de 2015, de INECC:
<http://www2.inecc.gob.mx/publicaciones/libros/710/pcrtiempo.pdf>

Alba, F. (2012). *Pastos y Forrajes*. Recuperado el 14 de diciembre de 2015, de Agronómico Salesiano de Paute:
<http://www.agronomicosalesianopaute.edu.ec/des/modulos?download=32:ejq111>

Albarracín, Y., Poutou, R., & Carrascal, A. (2008). *Listeria spp.*, y *L. monocytogenes* en leche cruda de cabra. *Revista MVZ Córdoba*, 13(2), 1326-1332.

Alvarado, Y. (2012). *Evaluación de los análisis físico-químicos de la leche de los diferentes hatos bovinos del cantón Daule (Tesis de pregrado)*. Universidad de Guayaquil, Guayaquil.

Amagliani, G., Giammarini, C., Omiccioli, E., Brandi, G., & Magnani, M. (2007). Detection of *Listeria monocytogenes* using a commercial PCR kit and different DNA extraction methods. *Food Control*, 18(9), 1147-1142.

doi:10.1016/j.foodcont.2006.06.012

Asamblea mundial OIE. (2008). *Bioteología para el diagnóstico de las enfermedades infecciosas y el desarrollo de Vacunas*. Recuperado el 03 de junio de 2015, de OIE sobre animales terrestres:
http://web.oie.int/esp/normes/mmanual/pdf_es_2008/1.01.07.%20Bioteolog%C3%ADa%20en%20el%20diagn%C3%B3stico.pdf

Asociación de Municipalidades Ecuatorianas. (2015). *Cantón Cayambe*. Recuperado el 13 de diciembre de 2015, de AME: www.ame.gob.ec/

BIOTECON Diagnostics. (2007). foodproof *Listeria* Genus Detection Kit - Hybridization Probes (LC 1.x, 2.0). *BIOTECON Diagnostics*.

Cacuango, E., & Santafé, E. (2011). *Evaluación de Queso fresco elaborado con dos contenidos de humedad, dos métodos de salado, empacados al vacío utilizando dos espesores de envases (Tesis de pregrado)*. Universidad Técnica del Norte, Ibarra.

Camacho, A., Albarracín, Y., & Sarmiento, P. (2007). Incidencia de *Listeria monocytogenes* en leche de vaca expandida en el Municipio de Pamplona, Colombia. *BISTUA*, 5(2), 49-57.

Carr, S. (2014). *The Polymerase Chain Reaction (PCR)*. Recuperado el 28 de mayo de 2015, de Mun: http://www.mun.ca/biology/scarr/PCR_simplified.html

Cerna, J., Cerna, F., & Guapillo, M. (2014). Taq polimerasa: De los geiseres a la ciencia. *Temas de Ciencia y Tecnología*, 18(54), 52-57. Obtenido de Taq polimerasa: De los geiseres a la ciencia.

Cisneros, E., & Machuca, R. (2014). *Estructuración de un modelo de encadenamiento productivo para la producción y comercialización de los productos derivados de la leche en la provincia de Pichincha, cantón Mejía (Tesis de pregrado)*. Universidad Politécnica Salesiana, Quito.

Coll, P., Coque, M., Domínguez, M., Vázquez, J., & Vila, J. (2005). *Métodos Moleculares de Tipificación Epidemiológica en Bacteriología*. Recuperado el 23 de noviembre de 2015, de Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica:

<https://www.seimc.org/contenidos/documentoscientificos/procedimientosmicrobiologia/seimc-procedimientomicrobiologia18.pdf>

Cortazar, A., & Silva, E. (2004). *Métodos físico- químicos, PCR*. Recuperado el 02 de noviembre de 2015, de UNAM: <http://www.ibt.unam.mx/computo/pdfs/met/pcr.pdf>

Costa, J. (2004). Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en Tiempo Real. *Enfermedades Infecciosas Microbiología Clínica*, 22(5), 299-305.

Duchi, T., & Guevara, V. (2013). *Análisis de los Factores que determinan la Sostenibilidad y Sustentabilidad de la Economía Social y Solidaria para la Industrialización y Comercialización de la Leche y sus derivados en los cantones de Los Bancos, Pedro Vicente Maldonado y Puerto Quito*. Universidad Politécnica Salesiana, Quito.

Echeverría, A. (2014). *Determinación mediante PCR en Tiempo Real de Salmonella sp. y ADNr 16S bacteriano en Muestras de Alimentos de los Establecimientos adyacentes a la Universidad Politécnica Salesiana Quito, sector El Girón (Tesis de pregrado)*. Universidad Politécnica Salesiana, Quito.

EL TELÉGRAFO. (11 de Septiembre de 2013). *Producción lechera mueve \$700 millones al año*. Recuperado el 16 de Marzo de 2015, de El telégrafo: <http://www.telegrafo.com.ec/economia/item/produccion-lechera-mueve-700-millones-al-ano.html>

FAO. (2014). *Composición de la Leche*. Recuperado el 27 de mayo de 2015, de Fao: Producción y productos lácteos: <http://www.fao.org/agriculture/dairy-gateway/leche-y-productos-lacteos/composicion-de-la-leche/es/#.VWy3bVJrat8>

Farfán, M. (2002). *Estudio de la Estructura Genética de Poblaciones de Vibrio Cholerae (Tesis de Doctorado)*. Universidad de Barcelona, Barcelona.

Flores, N. (2009). *Proyecto para la Instalación de una Planta Procesadora de Lácteos en la Parroquia Machachi, cantón Mejía*. Escuela Politécnica del Ejército , Quito.

Gaikwad, A. (10 de octubre de 2015). *DNA extraction: Comparison of methodologies*. Recuperado el 16 de noviembre de 2015, de National Bureau of Plant Genetic Resources: http://www.nbpgr.ernet.in/Portals/6/DMX/GENOMIC_RESOURCES/DNA%20extraction-Comparison%20of%20methodologies.pdf

Gallegos, J., Arrieta, G., Salim Máttar, M., Poutou, R., Trespalacios, A., & Carrascal, A. (2007). Frecuencia de *Listeria* spp., en Quesos Colombianos Costeños. *Revista MVZ Córdoba*, 12(2), 996-1012.

García, T., González, I., & Martín, R. (2007). PCR en Tiempo Real para la Detección Cuantitativa de ADN Bovino en Piensos Vegetales. *Complutense de Ciencias Veterinarias*, 1(2).

Gouin, E., Mengaud, J., & Cossart, P. (1994). The Virulence Gene Cluster of *Listeria monocytogenes* is also Present in *Listeria ivanovii*, an Animal Pathogen, and *Listeria seeligeri*, a Nonpathogenic Species. *Infection and Immunity*, 64(8), 3550-3553. doi:0019-9567/94/\$04.00+0

INEC. (2011). *Censo Nacional Agropecuario*. Recuperado el 16 de marzo de 2015, de INEC: <http://www.ecuadorencifras.gob.ec/censo-nacional-agropecuario/>

INEC. (2013). *Encuesta de Superficie y Producción Agropecuaria Continua*. Recuperado el 27 de mayo de 2015, de Instituto Nacional de Estadística y Censo: http://www.ecuadorencifras.gob.ec/documentos/web-inec/Estadisticas_agropecuarias/espac/espac%202013/InformeejecutivoESPAC2013.pdf

INEN. (2013). *Higiene para la leche y productos lácteos*. Recuperado el 30 de septiembre de 2015, de Instituto Ecuatoriano de Normalización: <http://normaspdf.inen.gob.ec/pdf/cpe/Codex/CODEX-57-UNIDO.pdf>

INEN. (2014). *Leche y productos lácteos. Directrices para la toma de muestras (ISO 707:2008 IDT)*. Recuperado el 15 de julio de 2015, de Instituto Ecuatoriano de

Normalización: http://www.normalizacion.gob.ec/wp-content/uploads/downloads/2014/NORMAS_2014/ACO/17122014/nte-inen-iso-707-ext.pdf

Instituto Nacional de Salud de Colombia. (2010). *Identificación de Riesgos Biológicos Asociados al Consumo de Leche Cruda Bovina en Colombia*. Recuperado el 27 de mayo de 2015, de Instituto Nacional de Salud de Colombia: <http://www.minsalud.gov.co/sites/rid/Lists/BibliotecaDigital/RIDE/IA/INS/Er-peligros-biologicos-en-leche.pdf>

INVITRIA. (2015). *Lysozyme*. Recuperado el 10 de noviembre de 2015, de Invitria: <https://www.invitria.com/cell-culture-products-types/lysozyme/>

Jay, J. (2000). *Modern Food Microbiology* (Sexta ed.). Las Vegas, Nevada, USA: Aspen Publishers.

Linke, k., Rücker, I., Brugger, K., Karpiskova, R., Walland, J., Muri-Klinger, S., . . . Stessl, M. (2014). Reservoirs of *Listeria* Species in Three Environmental Ecosystems. *Applied and Environmental Microbiology*, 80(18), 5583–5592. doi:10.1128/AEM.01018-14

Lozano, M., Saz, A., Teruel, J., & Virto, F. (2008). *Desinfección del pezón y ordeño del ganado vacuno*. Recuperado el 20 de junio de 2015, de Orientación a la profesión: http://www.orientacionalaprofesion.com/_veterinaria/pdf/Rum-Limpieza%20y%20desinfeccion%20de%20pezones%20en%20vacas.pdf

Luque, J., & Herraéz, A. (2000). *Biología molecular e Ingeniería Genética*. España: Elseiver.

Mateos, S. (2002). *Listeriosis*. Recuperado el 27 de mayo de 2015, de OPS/OMS Uruguay: <http://www.bvsops.org.uy/pdf/listeria.pdf>

McLaughlin, H., Casey, P., Cotter, J., Gahan, C., & Hill, C. (2011). Factors affecting survival of *Listeria monocytogenes* and *Listeria innocua* in soil samples. *Archives of Microbiology*, 193(11), 775-785. doi:10.1007/s00203-011-0716-7

Mena, M. (Diciembre de 2010). *Evaluación de la prevalencia de Listeria monocytogenes en productos lácteos y embutidos en tres mercados de la ciudad de Quito mediante la técnica de la Reacción en Cadena de la Polimerasa en Tiempo Real (Tesis de pregrado)*. Universidad Pontificia Católica del Ecuador, Quito.

Mera, P. (2014). *Evaluación de la calidad de leche mediante citometría de flujo, proveniente de bovinos de la parroquia de Machachi, provincia de Pichincha (Tesis de pregrado)*. Escuela Superior Politécnica del Ejército, Quito.

Orbera, T. (2004). Métodos moleculares de identificación de levaduras de interés biotecnológico. *Revista Iberoamericana de Micología*, 21(1), 15-19.

Pagano, R. (2011). *Estadística para las ciencias del comportamiento*. (Novena ed., Vol. I). México D.F, México: CENGAGE learning.

Paillard, D., Dubois, V., Duran, R., Nathier, F., Guittet, C., Caumette, P., & Quentin, C. (2003). Rapid Identification of *Listeria* Species by Using Restriction Fragment Length Polymorphism of PCR-Amplified 23S rRNA Gene Fragments. *Applied and*

Environmental Microbiology, 69(11), 6386–6392. doi:10.1128/AEM.69.11.6386-6392.2003

Palacios , A., Carrillo, D., Irizubieta, J., Boutou, S., Fleury, A., Labadie, D., & Chatonnet, P. (2008). *Las eficaces técnicas moleculares de identificación y cuantificación de las levaduras ecológicas*. Recuperado el 18 de diciembre de 2015, de http://www.labexcell.com/modules/publications/file/pcr_e_identificacion_de_levaduras_07.pdf

Palomino, C., & González, Y. (2014). Técnicas moleculares para la detección e identificación de patógenos en alimentos: ventajas y limitaciones. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública*, 31(3), 535-546.

Pedro Moncayo GAD Municipal. (2014). *Cantón Pedro Moncayo*. Obtenido de Cantón Pedro Moncayo: <http://www.pedromoncayo.gob.ec/index.php/component/contact/contact/1>

Pere, C., Coque, M., Domínguez, M., Vázquez, J., & Vila, J. (2005). *Métodos moleculares de tipificación epidemiológica y bacteriológica*. Recuperado el 28 de mayo de 2015, de Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica: <https://www.seimc.org/contenidos/documentoscientificos/procedimientosmicrobiologia/seimc-procedimientomicrobiologia18.pdf>

Pérez, A. (2012). *Una técnica revolucionaria, PCR*. Recuperado el 29 de mayo de 2015, de Le Cahier Michaelien: <https://lecahiermichaelien.wordpress.com/>

Pinilla , G., Cubillos , K., & Rodríguez, M. (2008). Bodas de plata de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR). *NOVA*, 6(9), 101-212.

Quero, G., Santovito, E., Visconti, A., & Fusco, V. (2014). Quantitative Detection of *Listeria monocytogenes* in Raw Milk and Soft Cheeses: Culture-independent versus liquid- and solid-based culture dependent Real Time PCR Approaches. *Food Science and Technology, ELSEVIER*(58), 11-20.

Rahimi, E., Momtaz, H., Behzadnia, A., & Baghbadorani, Z. (2014). Incidence of *Listeria* species in bovine, ovine, caprine, camel and water buffalo milk using cultural method and the PCR assay. *Asian Pacific Journal of Tropical Disease*, 50-53. doi:10.1016/S2222-1808(14)60313-3

Ramírez, J., Rosas, P., Velásquez, M., Ulloa, J., & Arce, F. (2011). Bacterias lácticas: Importancia en alimentos y sus efectos en la salud. *Revista Fuente, II*(7).

Ramírez, L., Morón, A., Alfieri, A., & Gamboa, O. (2010). Detección de *Listeria monocytogenes* en queso blanco criollo, mediante la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR). *ALAN (Archivos Latinoamericanos de Nutrición)*, 60(3). Obtenido de SCIELO.

Rial, A., & Varela, J. (2008). *Estadística Práctica para la Investigación en Ciencias de la Salud*. Netbiblo.

Rodríguez, R., Aguilar , C., Ayala, L., Rocha, J., Padilla, V., & Espinoza, T. (2009). Detección de microorganismos mediante métodos moleculares. *UADEC*, 1(1).

Rojas, R., & González, T. (2006). *Detección e Idetificación de Bacterias Causantes de Enfermedades Transmitidas por Alimentos mediante la Reacción en Cadena de la*

Polimerasa. Recuperado el 16 de marzo de 2015, de MEDIGRAPHIC:
<http://www.medigraphic.com/pdfs/bioquimia/bq-2006/bq062e.pdf>

Ruegg, P. (2004). *Manejo Hacia la Calidad de la Leche*. Recuperado el 13 de mayo de 2015, de Universidad de Wisconsin: http://milkquality.wisc.edu/wp-content/uploads/2011/09/managing-for-milk-quality_spanish.pdf

Ryser, E., & Marth, E. (2007). *Listeria, Listeriosis and Food Safety* (Tercera ed.). Boca Raton, Florida, USA: Taylor & Francis Group.

Ryu, J., Hong Park, S., Seok Yeom, Y., Shrivastav, A., Lee, S., Kim, Y., & Kim, H. (2013). Simultaneous Detection of *Listeria* species Isolated from Meat Processed Foods Using Multiplex PCR. *Food Control*(32), 659- 664.

Sánchez, B., & Palencia, E. (2010). *Infecciones por Listeria*. Recuperado el 16 de marzo de 2015, de FACMED:
http://www.facmed.unam.mx/deptos/microbiologia/pdf/Listerias_Medicine2010.pdf

Schöbitz, R., Marín, M., Horzella, M., & Carrasco, E. (2001). Presencia de *Listeria monocytogenes* en leche cruda y quesos frescos artesanales. *Agro Sur*, 29(2), 114-119.

SINAGAP. (06 de junio de 2012). *Censo Nacional Agropecuario*. Recuperado el 15 de octubre de 2015, de SINAGAP: <http://sinagap.agricultura.gob.ec/censo-nacional-agropecuario/24-iii-censo-nacional-agropecuario>

Suárez, H., De Francisco, A., & Beirao, L. (2008). Influencia de las bacteriocinas producidas por *Lactobacillus plantarum* LPBM10 sobre la vida útil de filetes del híbrido

de cachama *Piaractus brachypomus x Colossoma macropomum* empacado al vacío. *Vitae*, 15(1).

Tamay de Dios, L., Ibarra, C., & Velasquillo, C. (mayo-agosto de 2013). Fundamentos de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) y de la PCR en Tiempo Real. *Investigación en Discapacidad*, II(2), 70-78.

THERMO FISHER. (2015). *Qubit Assays*. Recuperado el 10 de noviembre de 2015, de THERMO FISHER: <https://www.thermofisher.com/ec/en/home/life-science/laboratory-instruments/fluorometers/qubit/qubit-assays.html>

Tipán, J. (2012). *Determinación del Mayor Índice de Listeria monocytogenes en Tres Etapas de Faenamiento de Bovinos en un Camal (Tesis de pregrado)*. Universidad Politécnica Salesiana, Cuenca.

Torres, L. (2009). *Estudio de Prefactibilidad para la Implementación de la Producción y Comercialización de Leche Cruda en la Finca "La Floresta" (Tesis de pregrado)*. Escuela Politécnica Nacional, Quito.

Valencia, S. (2009). *Diseño preliminar del plan HACCP para el Proceso de Elaboración del Queso Fresco Elaborado en la Planta Piloto de la Universidad de Camagüey (Título de pregrado)*. Universidad Técnica de Cotopaxi, Latacunga.

Vera, J. (2005). *Identificación y Evaluación de los factores que influyen en la calidad de leche de las fincas proveedores de la fábrica de quesos La Holandesa*. Escuela Superior Politécnica del Ejército, Quito.

Volokhov, D., Rasooly, A., Chumakov, K., & Chizhikov, V. (2002). Identification of *Listeria* Species by Microarray-Based Assay. *Journal of Clinical Microbiology*, 40(12), 4720–4728. doi:10.1128/JCM.40.12.4720-4728.2002

Yáñez, P. (2010). *Biometría y Bioestadística Fundamentales*. Autopublicación.

Anexos

Anexo 1. Toma y almacenamiento de muestra.

Anexo 1a.



Nota: Tomado por P. Valladares.

Anexo 1b.



Nota: Tomado por P. Valladares.

Anexo 2. Reactivos, etapa y muestras resultantes de la extracción de ADN.

Anexo 2a.



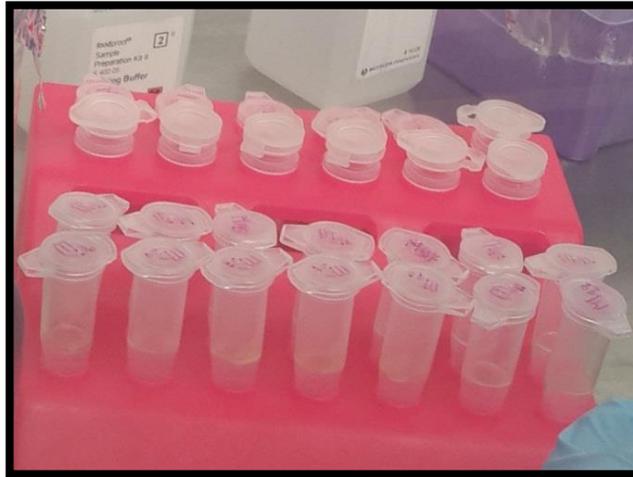
Nota: Tomado por P. Valladares.

Anexo 2b.



Nota: Tomado por P. Valladares.

Anexo 2c.



Nota: Tomado por P. Valladares.

Anexo 3. Equipo Qubit® para cuantificación y reactivos utilizados.

Anexo 3a.



Nota: Tomado por P. Valladares.

Anexo 3b.



Nota: Tomado por P. Valladares.

Anexo 4. Reactivos de foodproof® Listeria Genus Detection Kit (Kit de amplificación de Listeria spp. para PCR en Tiempo Real) y Termociclador LightCycler® 2.0.

Anexo 4a.



Nota: Tomado por P. Valladares.

Anexo 4b.



Nota: Tomado por P. Valladares.

Anexo 5. Programación del equipo para la amplificación de ADN según las especificaciones del inserto.

Pre-incubación (Prevención para la contaminación, activación de la Taq ADN polimerasa, desnaturalización del ADN molde)		
Programación/Datos de programación de los ciclos	Valor	
Ciclos	1	
Modo de análisis	None	
Temperaturas	Segmento 1	Segmento 2
Diana/Temperatura (°C)	40	95
Retención/Tiempo de incubación [h:min:s]	00:02:00	00:10:00
Velocidad de rampa/ Tasa de transición de temperatura [°C/s]	20	20
Diana secundaria/ Temperatura de la diana secundaria [°C]	0	0
Tamaño de paso [°C]	0.0	0.0
Retraso de paso [ciclos]	0	0
Modo de adquisición	None	None
Amplificación del ADN diana		

Programación/Datos de programación de los ciclos	Valor		
Ciclos	45		
Modo de análisis	Cuantificación		
Temperaturas	Segmento 1	Segmento 2	Segmento 3
Diana/Temperatura (°C)	95	59	72
Retención/tiempo de incubación [h:min:s]	00:00:00	00:00:30	00:00:05
Velocidad de rampa/tasa de transición de temperatura [°C/s]	20	20	20
diana secundaria/Temperatura de la diana secundaria [°C]	0	0	0
Tamaño de paso [°C]	0.0	0.0	0.0
Retraso de paso [ciclos]	0	0	0
Modo de adquisición	None	Single	None
Enfriamiento (del rotos y de la cámara)			
Programación/Datos de programación de los ciclos	Valor		
Ciclos	1		

Modo de análisis	None
Temperaturas	Segmento 1
Diana/Temperatura (°C)	40
Retención/Tiempo de incubación [h:min:s]	00:00:30
Velocidad de rampa/ Tasa de transición de temperatura [°C/s]	20
Diana secundaria/ Temperatura de la diana secundaria [°C]	0
Tamaño de paso [°C]	0.0
Retraso de paso [ciclos]	0
Modo de adquisición	None

Anexo 6. Resultados de Ausencia/Presencia de Listeria spp. obtenidos por PCR en Tiempo Real.

HACIENDAS	REPETICIONES	AUSENCIA/PRESENCIA
HACIENDA A	M 1	0
HACIENDA A	M 2	0
HACIENDA A	M 3	0
HACIENDA A	M 4	0
HACIENDA A	M 5	0
HACIENDA A	M 6	0
HACIENDA A	M 7	0
HACIENDA A	M 8	0
HACIENDA A	M 9	0
HACIENDA A	M 10	0
HACIENDA A	M 11	0
HACIENDA A	M 12	0
HACIENDA A	M 13	0
HACIENDA A	M 14	0
HACIENDA A	M 15	0
HACIENDA A	M 16	0
HACIENDA A	M 17	0
HACIENDA A	M 18	0
HACIENDA A	M 19	0
HACIENDA A	M 20	0
HACIENDA B	M 21	0
HACIENDA B	M 22	0
HACIENDA B	M 23	0
HACIENDA B	M 24	0
HACIENDA B	M 25	0
HACIENDA B	M 26	0
HACIENDA B	M 27	0
HACIENDA B	M 28	0
HACIENDA B	M 29	0
HACIENDA B	M 30	0
HACIENDA B	M 31	0

HACIENDA B	M 32	0
HACIENDA B	M 33	0
HACIENDA B	M 34	0
HACIENDA B	M 35	0
HACIENDA B	M 36	0
HACIENDA B	M 37	0
HACIENDA B	M 38	0
HACIENDA B	M 39	0
HACIENDA B	M 40	0
HACIENDA C	M 41	0
HACIENDA C	M 42	0
HACIENDA C	M 43	0
HACIENDA C	M 44	0
HACIENDA C	M 45	0
HACIENDA C	M 46	0
HACIENDA C	M 47	0
HACIENDA C	M 48	0
HACIENDA C	M 49	0
HACIENDA C	M 50	0
HACIENDA C	M 51	0
HACIENDA C	M 52	0
HACIENDA C	M 53	0
HACIENDA C	M 54	0
HACIENDA C	M 55	0
HACIENDA C	M 56	0
HACIENDA C	M 57	1
HACIENDA C	M 58	0
HACIENDA C	M 59	0
HACIENDA C	M 60	0