



Universidad de la República, Facultad de Ciencias

Tesina de la Licenciatura en Bioquímica

Caracterización de aislamientos de *Listeria monocytogenes*, presencia de mutaciones sin sentido en el gen de la Internalina A y su relación con la formación y resistencia de biofilms al ácido láctico.

Laboratorio de Alimentos y Nutrición, Instituto Polo Tecnológico de Pando,
Facultad de Química, UdelaR.

Ileana Suarez

Tutora: Dra. Caterina Rufo, Ph.D.

Cotutora: Dra. Giannina Brugnini

Montevideo, Uruguay

Marzo 2024

Agradecimientos

Agradezco a las integrantes del Laboratorio de Alimentos y Nutrición del Instituto Polo Tecnológico de Pando quienes me abrieron las puertas para realizar este proyecto y brindaron su apoyo.

Agradezco a las evaluadoras del proyecto por su gran disposición

Agradezco a todas aquellas personas que me acompañaron y aconsejaron en este recorrido, sin ellas no hubiera sido posible cumplir esta meta:

A mi familia

A mis amigos y facu-amigos

A todos mis mentores

Agradezco a todos aquellos que permitieron la realización de este proyecto:

A la Universidad de la República

A todos los profesores y funcionarios de la Facultad de Ciencias, UdelaR

Al Instituto de Higiene, UdelaR

A los organizadores y evaluadores del premio de Apoyo a proyectos de Investigación para estudiantes de grado (APIPE) de la Sociedad Uruguaya de Microbiología.

Resumen

Listeria monocytogenes es el agente causal de la enfermedad grave listeriosis. Dado que la caracterización de cepas en circulación es importante para las investigaciones epidemiológicas, el objetivo de este trabajo consistió en caracterizar seis aislamientos de *L. monocytogenes* identificados como L100A1 y L101B2 provenientes de carne vacuna, L200 y L201 de carne de cerdo y P20 y P24 de carne aviar. Se identificaron sus serotipos mediante métodos moleculares y se estudió su capacidad de formar biofilms y la resistencia de los mismos frente al ácido láctico (1 % durante 5 min) mediante el ensayo en placas de microtitulación a 37 °C y 20 °C. Además, se analizó la secuencia del gen de la Internalina A para identificar la presencia de mutaciones de codón de terminación prematura, factor que puede disminuir su virulencia y favorecer su persistencia en el ambiente. Durante el estudio se utilizaron como referencia las cepas ATCC® 19111, ATCC® 13932 y dos cepas donadas por el Instituto de Higiene (CC1/2b y CC1/2c). Se determinó que los aislamientos L100A1, L200 y L201 pertenecen al serotipo 4b; L101B2 y P24 pertenecen al serotipo 1/2a y P20 al 1/2b. Los aislamientos estudiados pertenecen a los serotipos comúnmente hallados en alimentos y casos clínicos y presentaron diferente capacidad para formar biofilms. L101B2 y P20 formaron biofilm a 37 °C y 20°C, mientras que L200 y L201 formaron biofilm solo a 20 °C. El biofilm formado por la cepa L200 a 20°C fue el único significativamente ($p < 0,05$) sensible al ácido láctico. La resistencia de los biofilms al ácido láctico puede ser preocupante ya que el ácido láctico es utilizado actualmente como antimicrobiano en la industria cárnica. A su vez los seis aislamientos tienen la secuencia completa de la Internalina A la cual se asocia con su potencial patogénico.

Palabras clave; *Listeria monocytogenes*, internalina A, biopelículas (biofilms).

Tabla de contenidos

1. Introducción.....	1
1.1 Listeriosis humana.....	1
1.2 <i>Listeria monocytogenes</i>.....	2
1.3 Virulencia.....	5
1.3.1 Ciclo infeccioso intracelular.....	5
1.3.2 Genes de virulencia.....	9
1.3.3 Estructura de las internalinas.....	11
1.3.4 Codones de STOP prematuros (PMSC, premature stop codon).....	13
1.4 Formación de biofilms.....	14
1.4.1 Resistencia a ácidos orgánicos de <i>Listeria</i> y su biofilm.....	17
1.5 Objetivos general y específicos.....	19
1.5.1 Objetivo general.....	19
1.5.2 Objetivos específicos.....	20
1.6 Estrategia.....	20
1.6.1 Aislamientos y cepas de referencia.....	20
1.6.2 Caracterización molecular.....	21
1.6.2.1 Confirmación de género y especie a nivel molecular.....	21
1.6.2.2 Serotipificación molecular por PCR.....	21
1.6.3 Análisis del gen de virulencia <i>inlA</i>	22
1.6.4 Evaluación de la formación de biofilms.....	23
1.6.5 Evaluación de la resistencia de biofilms.....	23
2. Materiales y métodos.....	24
2.1 Aislamientos y cepas de referencia.....	24
2.2 Caracterización molecular.....	24
2.2.1 Confirmación de género y especie a nivel molecular.....	24
2.2.2 Serotipificación molecular por PCR.....	26
2.3 Análisis del gen de virulencia <i>inlA</i>	27
2.4 Evaluación de la formación de biofilms.....	29
2.5 Evaluación de la resistencia de biofilms.....	30
2.6 Análisis estadístico.....	31
3. Resultados y discusión.....	32
3.1 Caracterización molecular.....	32
3.1.1 Confirmación de género y especie a nivel molecular.....	32
3.1.2 Serotipificación molecular por PCR.....	34
3.2 Análisis del gen de virulencia <i>inlA</i>	36
3.3 Evaluación de la formación de biofilms.....	38
3.4 Evaluación de la resistencia de biofilms.....	43
3.5 Resumen de resultados.....	45

4. Conclusiones.....	46
5. Bibliografía.....	49
6. Lista de abreviaturas.....	63
7. Anexo.....	64
Anexo 1. Secuencias del gen <i>inIA</i> obtenidas para las diferentes cepas.....	64
Anexo 2. Secuencias proteicas de la InIA obtenidas para las diferentes cepas.....	69

1. Introducción

La incidencia de enfermedades causadas por alimentos contaminados y su mortalidad es una amenaza constante para la salud pública, estas se denominan enfermedades transmitidas por alimentos (ETAs). De acuerdo a los datos presentados por la Organización Mundial de la Salud (OMS) en 2015, se estima que, a nivel mundial, anualmente, 600 millones de personas contraen ETAs y 420.000 son causa de muerte (Havelaar et al., 2015). Los peligros que originan una ETA pueden ser de diversos tipos, sin embargo, este trabajo se centra sobre *Listeria monocytogenes*, el agente bacteriano causante de la enfermedad grave listeriosis humana.

1.1 Listeriosis humana

La listeriosis humana es una infección rara pero potencialmente muy grave causada por *Listeria monocytogenes*. La infección está asociada a una mortalidad de hasta el 30 %, incluso cuando se administra un tratamiento antimicrobiano adecuado. Adicionalmente, la listeriosis humana es una enfermedad subdiagnosticada en sus etapas iniciales, dificultando la efectividad de los tratamientos (Lecuit, 2007). de Noordhout et al., (2014) estimaron que la listeriosis afectó a 23.150 personas y causó 5.463 muertes en 2010 a nivel mundial. En Uruguay en el año 2016 hubo un aumento de casos de listeriosis invasiva, y se reportaron 13 casos, de los cuales 4 fueron letales (MSP, 2017)

La patogenicidad de *L. monocytogenes*, es decir, su capacidad para infectar el huésped y causar enfermedad se debe a que puede adherirse, invadir y multiplicarse dentro de células fagocíticas y una amplia variedad de células no fagocíticas como los enterocitos, hepatocitos, fibroblastos, células endoteliales y células dendríticas (Gilot et al., 1999). Además, *L. monocytogenes* es capaz de atravesar las tres barreras fisiológicas presentes en los seres humanos: intestinal, hematoencefálica y placentaria. Al ser ingerida por la vía oral, atraviesa la barrera intestinal y es traslocada al interior del órgano en pocos minutos, demostrando que el cruce de la barrera intestinal ocurre en ausencia de replicación intraepitelial. En el epitelio intestinal, y particularmente en las células caliciformes, *L.*

monocytogenes es translocada directamente a la lámina propia, donde las bacterias se diseminan sistémicamente a través de la linfa y la sangre, alcanzando el bazo y el hígado (Nikitas, 2011).

En el hígado, *L. monocytogenes* es capaz de infectar los hepatocitos. Las células de Kupffer, logran eliminar la mayoría de las bacterias por su actividad fagocítica; desarrollan la inmunidad adaptativa induciendo la proliferación dependiente de antígenos de linfocitos T citotóxicos contra los hepatocitos infectados e inducen la secreción de citoquinas quimioatrayentes de neutrófilos (Ebe et al., 1999). El pasaje de *L. monocytogenes* de hepatocito a hepatocito, a través de un ciclo infeccioso intracelular que abordaremos más adelante, genera un foco de infección en el que la bacteria se disemina sin entrar en contacto con los mecanismos de la inmunidad humoral (Edelson & Unanue, 2000).

La bacteria puede causar bacteriemia prolongada y asintomática hasta atravesar la barrera hematoencefálica y placentaria mediante mecanismos que aún no están completamente dilucidados. Al alcanzar el cerebro y la placenta, la infección puede resultar en meningitis o encefalitis principalmente en pacientes inmunocomprometidos, abortos en mujeres embarazadas o infecciones generalizadas en recién nacidos, razón por la cual *L. monocytogenes* es considerada una bacteria oportunista (Lecuit, 2007).

1.2 *Listeria monocytogenes*

L. monocytogenes es una especie del género *Listeria*, pertenece al reino Bacteria, phylum Firmicutes, clase Bacilli, orden Bacillales, familia Listeriaceae. Basándose en los resultados de la secuenciación del gen que codifica para la subunidad 16S del ácido ribonucleico (ARN) ribosomal, *Listeria* spp. presentan gran homología con los géneros *Bacillus* y *Staphylococcus* (Vos et al., 2011).

Hasta el momento se han identificado 17 especies dentro del género *Listeria*: *L. monocytogenes*, *L. innocua*, *L. ivanovii* (con dos subespecies *ivanovii* y *londoniensis*), *L. welshimeri*, *L. seeligeri*, *L. grayi*, *L. marthii*, *L. rocourtiae*, *L. floridensis*, *L. weihenstephanensis*, *L. fleischmannii* (con una subespecie

coloradonensis), *L. aquatica*, *L. cornellensis*, *L. newyorkensis*, *L. booriae*, *L. riparia*, y *L. grandensis* (Orsi & Wiedmann, 2016). De ellas sólo *L. monocytogenes* y *L. ivanovii* son potencialmente patógenas siendo *L. monocytogenes* un patógeno humano y animal y *L. ivanovii* patógena para animales, principalmente ovinos y bovinos (Schmid et al., 2005).

L. monocytogenes es una bacteria ampliamente extendida en el medio ambiente y uno de los principales patógenos intracelulares transmitidos por los alimentos. Es no esporulada, con forma de bacilos cortos Gram-positivos. Es anaerobia facultativa, catalasa positiva, oxidasa negativa. Es un microorganismo psicrotrofo con un crecimiento óptimo entre 30 y 37 °C y capaz de crecer entre -1.5 y 45 °C, en un rango de pH de 4.4 a 9.4 y en elevadas presiones osmóticas con concentraciones de hasta 10 % NaCl, por lo que es halotolerante. Demuestra una motilidad de volteretas característica cuando el organismo es incubado entre los 20 a 25 °C debido a la presencia de flagelos polares anclados a la superficie celular (Doyle et al., 2001; Farber & Peterkin, 1991; ICMSF, 1996; Nychas et al., 2008). Es capaz de formar biofilms de multicapa pudiendo adherirse y permanecer en superficies (Blackman & Frank, 1996).

Las cepas de *L. monocytogenes* se agrupan en 13 serotipos (1/2a, 1/2b, 1/2c, 3a, 3b, 3c, 4a, 4ab, 4b, 4c, 4d, 4e y 7) y el serotipo 4h recientemente descrito por Yin, 2019, de acuerdo a los antígenos somáticos basados, en parte, en la sustitución del ácido teicoico por ribitol (factor O) y los antígenos de flagelos (factor H) (Vos et al., 2011).

L. monocytogenes forma una población estructurada en cuatro linajes divergentes basados en su variación génica designados como I, II, III y IV. Los linajes de *L. monocytogenes* representan características ecológicas, genéticas y fenotípicas distintas, que parecen afectar su capacidad para transmitirse a través de los alimentos y causar enfermedades humanas. El linaje I agrupa a los serotipos 1/2b, 3b, 4b, 4d, y 4e; el linaje II contiene a los serotipos 1/2a, 1/2c, 3a y 3c; y el linaje III incluye a los serotipos 4a y 4c. Este último se subdivide en tres subgrupos, el IIIA (serotipos 4a y 4c), el IIIC (serotipo 4c) y el IIIB reconocido recientemente como linaje IV que incluye el serotipo 7 y los serotipos atípicos 4a, 4b y 4c) (Ward

et al., 2008; Liu, 2013). El linaje III suele tener serotipos de características atípicas y muy escasas en alimentos y muestras clínicas, aunque se han aislado con cierta frecuencia en animales. En estudios filogenéticos recientes de *L. monocytogenes*, se ha demostrado que el linaje IV, conformado por los serotipos pertenecientes al subgrupo IIIB, es genéticamente diferente al linaje III y está asociado con aislamientos humanos, de animales y de alimentos (Orsi et al., 2011; Ward et al., 2008).

Se ha determinado que todos los casos clínicos de listeriosis están vinculados con aislados pertenecientes al linaje I y II, entre ellos, sólo 4 serotipos (1/2a, 4b, 1/2b, 1/2c) son los responsables de más del 98 % de los casos reportados de listeriosis en humanos y son aproximadamente el 98 % de las cepas aisladas de humanos y alimentos (Doumith et al., 2004; Jacquet et al., 2002). Adicionalmente, las cepas de *L. monocytogenes* pertenecientes al serotipo 4b se asocian con el 50 % de los brotes de listeriosis, mientras que cepas del serotipo 1/2a son las más frecuentemente encontradas en alimentos (Burall et al., 2017; Maury et al., 2016). Sumado a esto, Bosilevac et al., (2007) reportaron que un 5 % de las cepas de *L. monocytogenes* aisladas de carne uruguaya pertenecían al serotipo 1/2a, un 38 % al serotipo 4b, un 29 % al serotipo 1/2c y 28 % al serotipo 1/2b, lo que sugiere que estos serotipos son frecuentes en el ambiente frigorífico nacional.

Listeria spp. se han aislado de una diversidad de fuentes ambientales, incluidos suelo, vegetación, agua, efluentes, una gran variedad de alimentos y las heces de humanos y animales. Se cree que el hábitat natural de estas bacterias es la materia vegetal en descomposición, en la que viven como saprofitos. Los rumiantes domesticados cumplen un papel clave en el mantenimiento de *Listeria* spp. en el medio rural a través de un continuo ciclo de enriquecimiento fecal-oral. En los animales, la mayor parte de las infecciones son subclínicas por lo que no presentan enfermedad, pero puede producirse enfermedad invasiva esporádicamente o en forma de brote (Dhama et al., 2015)(Barbuddhe & Chakraborty, 2009). En consecuencia, la materia prima utilizada en la elaboración de alimentos procesados industrialmente y también las plantas de producción son susceptibles de contaminación tanto por *L. monocytogenes* como por sus otras especies.

La principal vía de transmisión en humanos es el consumo de alimentos contaminados (Barbuddhe & Chakraborty, 2009). La contaminación de estos alimentos es posible debido a la gran capacidad del microorganismo de sobrevivir y replicarse en diversos ambientes. La presencia de *L. monocytogenes* en la industria es una gran preocupación ya que es capaz de permanecer y multiplicarse en ambientes extremos como los que a menudo se emplean para disminuir las cargas microbianas en los alimentos y las instalaciones. Además, su habilidad para adaptarse a diferentes condiciones de estrés dificulta ampliamente su control, pudiendo volverse endémica en los entornos de producción de alimentos (Pasquali et al., 2018).

Datos epidemiológicos indican que ciertos productos alimenticios tienen más probabilidades de estar asociados con brotes de listeriosis que otros. Se han destacado los alimentos con ingredientes crudos o que se comen crudos, productos no sujetos a un proceso listericida y productos que tienen una vida útil prolongada bajo temperaturas de refrigeración que permiten el crecimiento del patógeno. También se encuentra en alimentos que están destinados a ser consumidos sin cocción adicional, es decir, los alimentos listos para consumir. A pesar de que los alimentos crudos son susceptibles de contaminación por *L. monocytogenes*, particularmente, las carnes crudas no se consideran de alto riesgo de causar listeriosis ya que ante una cocción adecuada el patógeno puede ser eliminado. Sin embargo, las carnes crudas o cocinadas insuficientemente pueden servir como fuente de contaminación cruzada de productos destinados a ser consumidos sin tratamiento térmico. La contaminación cruzada, en conjunto con una limpieza y saneamiento inadecuados, se han reconocido como las principales fuentes de contaminación posterior al procesamiento de productos cárnicos listos para el consumo (Farber & Peterkin, 1991).

1.3 Virulencia

1.3.1 Ciclo infeccioso intracelular

L. monocytogenes es una especie de patógenos intracelulares, que al ingresar en el hospedero de forma primaria a través del intestino cumple con un ciclo

infeccioso intracelular mediante el cual invade y se desarrolla en el interior de las células hospederas no fagocíticas y fagocíticas no listericidas (incapaces de combatir a la bacteria). Este ciclo presenta características comunes entre los diversos tipos celulares, y se observa una representación esquemática del mismo en la figura 1.

El ciclo comienza con la invasión del patógeno, en células fagocíticas es un proceso pasivo mediado por el sistema del complemento, sin embargo, en células no fagocíticas primero se da la adhesión del patógeno a la superficie celular, la subsecuente invasión es posible debido a un mecanismo tipo “zipper” o cremallera, en el cual un ligando de la bacteria interactúa con una molécula de superficie de las células hospederas no fagocíticas que actúan como receptores y están involucradas en la adhesión celular y la activación de la maquinaria del citoesqueleto de la célula hospedera. La interacción impulsa la extensión de la membrana alrededor de la bacteria al inducir rearrreglos locales de actina del citoesqueleto y otras señales (Drevets & Bronze, 2008; Pizarro-Cerdá & Cossart, 2018).

L. monocytogenes reconoce varios tipos de receptores eucariotas. Entre ellos se encuentran: la glicoproteína transmembrana E-cadherina que es reconocida por un factor de virulencia de *L. monocytogenes* denominado internalina A (InIA). Esta es una de las proteínas de superficie requeridas para la invasión al interior de las células no fagocíticas, junto con ella actúa la internalina B (InIB) que reconoce la proteína del sistema del complemento C1q (gC1q-R) y al receptor Met (Pizarro-Cerdá & Cossart, 2018).

Luego de la adhesión se dan mecanismos de cascadas de señales que conllevan a la polimerización de los filamentos de actina del citoesqueleto de la célula hospedera. Este proceso es fundamental para la internalización e invasión de *L. monocytogenes* ya que la formación de una red de actina empuja la membrana plasmática en mayor medida alrededor de la bacteria facilitando la invasión al formar una vesícula fagocítica alrededor de la bacteria (Pizarro-Cerdá & Cossart, 2018). Los principales factores de virulencia implicados en la invasión celular y responsables de la activación de la cascada son la InIA e InIB, que

durante el proceso de adhesión sufren modificaciones post-traduccionales junto con sus receptores E-cadherina y Met.

Por un lado, la proteína transmembranal E-cadherina es una glicoproteína que contiene cinco dominios extracelulares de cadherina y un dominio citoplasmático dependiente de calcio. La interacción InIA/E-cadherina se da por la interacción del dominio de repetición rica en leucina (LRR) de la proteína InIA con el receptor, es especie específica y activa una compleja vía de señalización que se activa en forma de cascada y conduce a la reorganización del citoesqueleto de actina (Lecuit et al., 1999; Mengaud et al., 1996). Por otro lado, Met, el principal receptor de señalización de la inIB, es un receptor transmembrana con un dominio intracelular con acción tirosina kinasa. La interacción inIB/Met produce la autofosforilación transitoria de Met que lleva mediante una cascada de señales a la reorganización del citoesqueleto de actina en la célula huésped (Shen et al., 2000). Si bien, la InIA le confiere a *L. monocytogenes* un tropismo más reducido, el receptor Met es expresado ubicuamente, permitiendo que *L. monocytogenes* sea internalizada en una gran variedad de células eucariotas humanas (Pizarro-Cerdá & Cossart, 2018; Vera et al., 2013).

Cabe destacar que *L. monocytogenes* posee numerosos genes que codifican para este tipo de proteínas de adherencia necesarias para la invasión y/o entrada de *L. monocytogenes* a la célula eucariota. Entre ellas se encuentran, la proteína de superficie ActA, otras proteínas perteneciente a la familia de las internalinas, la inIE, inIG e inIH, varias autolisinas (Ami y Auto), las proteína asociadas a invasión, alcohol acetaldehído deshidrogenasa (Lap) y proteína de unión a fibronectina (FbpA) (Pizarro-Cerdá & Cossart, 2018).

La etapa de invasión culmina con la formación de la vesícula fagocítica en el interior de las células hospederas con la bacteria embebida en ella. Las condiciones fisicoquímicas que presenta la vesícula no le permiten a la bacteria multiplicarse, pero inducen la secreción de una citolisina sulfhidrilo activada, codificada por el gen *hly*, la Listeriolisina O (LLO). LLO es capaz de formar poros en la membrana de la vesícula, permitiendo que *L. monocytogenes* escape hacia el citosol en un proceso denominado evasión de la vesícula fagocítica. Esta acción de

LLO se ve aumentada por la acción de dos fosfolipasas C (PLC), la fosfatidilcolina-PLC (PC-PLC), codificadas por *plcB* que cliva fosfatidilcolina (PC) de las membranas biológicas y fosfatidilinositol-PLC (PI-PLC), codificadas por *plcA* que reconoce como sustrato al fosfatidilinositol (PI) para producir diacilglicerol (DAG). De esta forma, la bacteria logra permeabilizar las membranas al crear poros grandes clivando completamente los principales fosfolípidos de la membrana de la vesícula fagocítica. Este mecanismo está implicado tanto en el escape de la vesícula fagocítica como en la propagación de célula a célula, que explicaremos más adelante (Poussin & Goldfine, 2005). Durante este proceso es necesaria la acción de la metaloproteasa Mpl, codificada por el gen *mpl* ya que permite la activación de la PC-PLC (Alvarez & Agaisse, 2016; Pizarro-Cerdá & Cossart, 2018).

Una vez libre en el citosol, *L. monocytogenes* expresa los genes para adquirir los nutrientes necesarios para la multiplicación intracelular. Luego de la multiplicación intracelular, se activa la proteína bacteriana ActA. Esta proteína está polarmente distribuida e induce la polimerización de los filamentos de actina del citoesqueleto celular sobre un polo de la bacteria. La formación de una estructura semejante a una cola de cometa facilita el desplazamiento de la bacteria, este movimiento genera una protrusión que es fagocitada por las células adyacentes permitiendo la invasión a células vecinas. De esta forma la bacteria se disemina sin exponerse a la respuesta inmune humoral del hospedero. Esta vacuola de doble membrana generada en la célula adyacente tras la fagocitosis se lisa por las fosfolipasas PC-PLC, PI-PLC y la listeriolisina LLO, y se genera un nuevo ciclo de infección intracelular (Pizarro-Cerdá & Cossart, 2018).

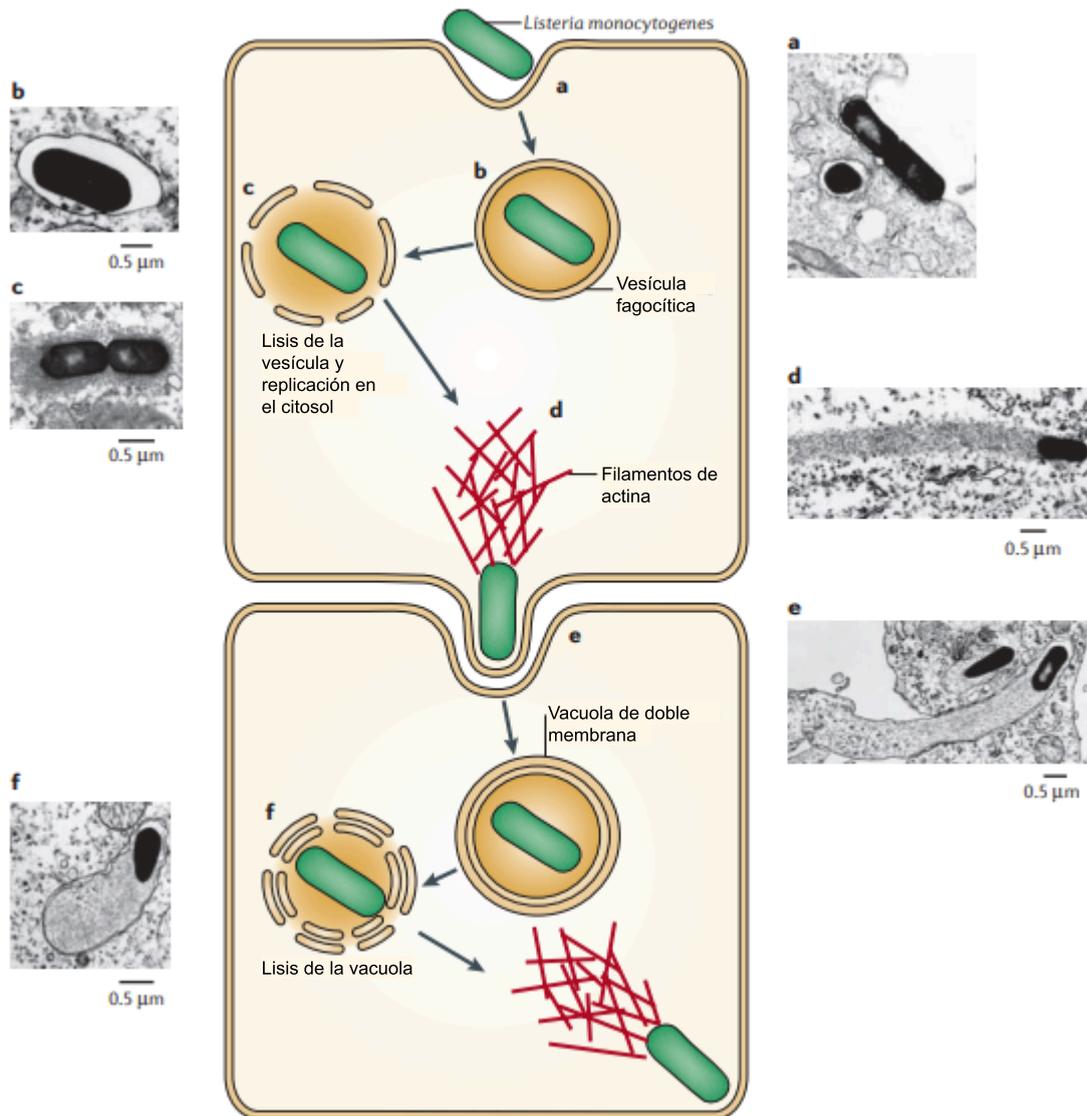


Figura 1. Representación esquemática y micrografías electrónicas del ciclo infeccioso intracelular de *Listeria monocytogenes*. a) *L. monocytogenes* induce su entrada en la célula hospedera, mediante interacciones ligando-receptor b) Las bacterias se internalizan en una vesícula fagocítica. c) Evasión de la vesícula fagocítica. d) Las bacterias se liberan en el citoplasma, donde se multiplican y comienzan a polimerizar los filamentos de actina, como se observa por la presencia de las colas de actina características. e) La polimerización de actina genera una protrusión en la membrana plasmática que es fagocitada por las células adyacentes permitiendo la invasión a células vecinas. f) Al entrar en la célula vecina, las bacterias se encuentran en una vacuola de doble membrana, de la que pueden escapar y continuar el ciclo. Adaptado de Hamon et al., (2006).

1.3.2 Genes de virulencia

Las diferentes cepas de *L. monocytogenes* se caracterizan por ser muy heterogéneas en cuanto a su virulencia. Gran parte de las cepas presentan

diversos factores de virulencia que se ven involucrados en los pasos del ciclo infeccioso intracelular y que en conjunto son capaces de producir una alta mortalidad, sin embargo, también existen otras cepas que son avirulentas e incapaces de establecer una infección dentro del hospedero (Olier et al., 2002).

Los factores de virulencia se encuentran codificados a nivel cromosómico en *L. monocytogenes* organizados en islas de patogenicidad (PAIs) a lo largo del cromosoma, denominadas Islas de patogenicidad de *Listeria*, por sus siglas en inglés (LIPI-1, LIPI-2 y LIPI-3). Adicionalmente, se han descrito diversos plásmidos en la especie, entre ellos, plásmidos de resistencia a antibióticos, plásmidos de resistencia a metales pesados y recientemente un potencial plásmido de virulencia (Hacker et al., 1997; Lebrun et al., 1994; Poyart-Salmeron et al., 1990).

LIPI-1, es una isla de patogenicidad de 9 Kb que se encuentra insertada en los cromosomas de todas las cepas de la especie *L. monocytogenes* y *L. ivanovii* pero no está presente en los genomas de las especies no patogénicas de *Listeria* como *L. innocua* y *L. welshimeri*, con excepción de *L. seeligeri* en la que se encuentra pero en forma inactiva. La isla proporciona a la bacteria las herramientas necesarias para invadir un nuevo nicho ya que contiene los genes de virulencia *prfA*, *plcA*, *hly*, *mpl*, *iap*, *prs*, *actA* y *plcB* (Vázquez-Boland et al., 2001).

LIPI-3, o clúster de listeriolisinas S (LLS) es una isla de patogenicidad responsable de un aumento de la virulencia en ciertas cepas de *L. monocytogenes* pertenecientes al linaje I (Cotter et al., 2008).

Otro conjunto de islas de patogenicidad presentes en *Listeria* spp. son aquellas que contienen a los miembros de la familia multigénica de las internalinas. Los genes de internalinas se encuentran organizados en clústeres de dos o más genes, exceptuando la *inIc* e *inIF* que se encuentran individualmente en el cromosoma. En *L. monocytogenes* se han identificado diversos genes que codifican internalinas asociadas a la superficie bacteriana, *inIE*, *inIG*, *inIH*, *inIA* e *inIB* distribuidos en dos clústers por un lado *inIG*, *inIH* e *inIE* y por otro la *inIA* e *inIB* (Dramsi et al., 1997; Engelbrecht et al., 1996).

1.3.3 Estructura de las internalinas

Las internalinas dentro de la familia de internalinas comparten una arquitectura modular común con una secuencia señal amino-terminal y dominios LRR que pueden variar de 3 a 28 repeticiones. Los miembros de esta familia pueden clasificarse en tres tipos representados esquemáticamente en la figura 2, dos de acuerdo a sus dominios carboxi-terminal de unión a la superficie bacteriana LPXTG y GW o WxL y por otro lado las internalinas secretadas (Bierne et al., 2007).

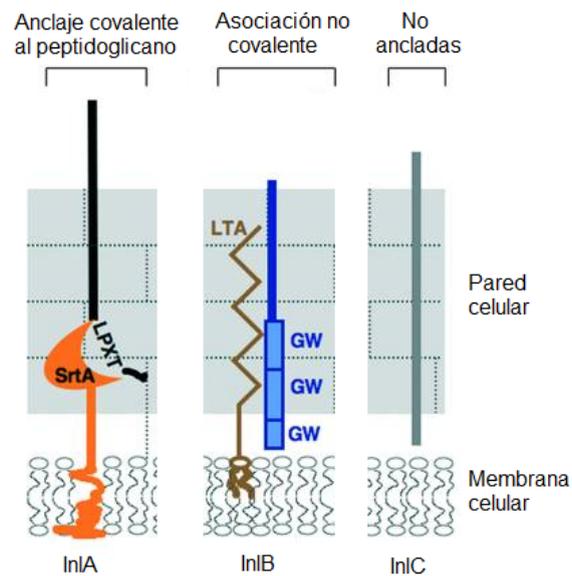


Figura 2. Tres tipos de internalinas que se encuentran en *L. monocytogenes*. Se presenta un ejemplo de cada tipo. Sortasa A (SrtA), Ácido lipoteicoico (LTA). Adaptado de Bierne & Cossart, (2007).

La InIA está incluida dentro de las internalinas de tipo LPXTG. Éstas poseen una señal de clasificación carboxilo-terminal característica que dirige el anclaje mediante enlace covalente al peptidoglicano de las bacterias Gram-positivas. Esta señal consta de un motivo LPXTG, seguido de un dominio hidrófobo de unos 20 aminoácidos (aa) y una cola de residuos cargados positivamente (Fischetti et al., 1990). La señal de clasificación es el sustrato de una transpeptidasa unida a la membrana, la sortasa A (SrtA), que escinde el motivo LPXTG entre los residuos de treonina y glicina (TG), y une el grupo carboxilo de la treonina a los precursores de la pared celular. Las internalinas de tipo GW o WxL en donde se incluye la InIB, poseen una región carboxilo-terminal que le permite asociarse de forma no

covalente a la superficie bacteriana al interactuar con las moléculas de ácido lipoteicoico (LTA). Esta región contiene tres módulos GW altamente conservados de 80 aminoácidos entre los que se encuentra el dipéptido de glicina y triptófano. Finalmente, las internalinas secretadas engloban a las internalinas de menor tamaño que no presentan un dominio de anclaje a la pared celular como la inIC (Bierne et al., 2007).

Con respecto a los dominios LRR, están compuestos por 22 residuos de los cuales 7 corresponden a leucinas o isoleucinas que componen el núcleo interno hidrofóbico de la proteína. La superficie de este dominio proteico expone aminoácidos aromáticos favorables para la unión de ligandos. Específicamente, la InIA presenta aminoácidos aromáticos dispuestos en hojas beta en las regiones expuestas del dominio LRR para unirse a su ligando, la E-cadherina humana (Mengaud et al., 1996). Del mismo modo, una cadena de cinco residuos de aminoácidos aromáticos expuestos en la superficie de las regiones LRR son críticos para la unión de inIB a su receptor celular Met (Machner et al., 2003). El conjunto de dominios LRR se encuentra flanqueado por dos dominios conservados. Hacia la región amino-terminal luego de la secuencia señal, presenta una pequeña cápside de hélice alfa y hacia la región carboxi-terminal se encuentra el dominio inter-repeat (IR). Este último está estructuralmente relacionado con los dominios de inmunoglobulinas y es necesario para lograr un correcto plegamiento de la región LRR. De esta forma, las regiones LRR e IR son necesarias y suficientes para la invasión celular (Freiberg et al., 2004).

Los dominios LRR son codificados por secuencias de ácido desoxirribonucleico (ADN) repetitivas y por tanto son naturalmente propensas a la recombinación. Esto sugiere que la gran diversidad de genes de internalinas en el cromosoma de *Listeria* es el resultado de la duplicación de genes y reordenamientos intragénicos e intergénicos (Glaser et al., 2001). Además, se sugiere que la conservación de tal repertorio de homólogos de internalinas en el genoma da lugar a una amplia diversidad de interacciones proteína-proteína específicas, a través de la gran variedad de regiones expuestas de los motivos LRR disponibles (Marino et al., 2000).

1.3.4 Codones de STOP prematuros (PMSC, premature stop codon)

Se han identificado mutaciones sin sentido sobre el gen que codifica para la InIA que conducen a una proteína trunca, estas se denominan codones stop prematuros, (PMSC, por sus siglas en inglés). El gen *inIA* posee 2400 pares de bases (pb) y codifica para una proteína de 800 aminoácidos. (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/985151>). Hasta el momento se han identificado 33 tipos de mutaciones PMSC que codifican para internalinas con longitudes de entre 4 a 699 aa. (<https://bigsdbs.pasteur.fr/listeria/>; accedido el 29 de Marzo del 2023).

La proteína InIA trunca es secretada en lugar de estar anclada a la membrana y está relacionada con una atenuación de la virulencia del patógeno ya que presenta una capacidad reducida para invadir células epiteliales de intestino humano in vitro (Nightingale et al., 2008; Su et al., 2019). Es así que PMSCs en el gen *inIA* son observables mayoritariamente en los aislados relacionados a los alimentos, pero son poco comunes en casos clínicos de listeriosis (Nightingale et al., 2008). En la misma línea, estudios epidemiológicos mostraron que la proteína InIA juega un papel clave en la listeriosis humana, ya que el 96 % de las cepas provenientes de casos clínicos expresaban el largo completo, y solo se expresaba un 65 % en los casos provenientes de alimentos. De las cepas estudiadas, las 110 pertenecientes al serotipo 4b (linaje I) y las 84 pertenecientes al serotipo 1/2b (linaje I) expresaron la InIA de largo completo. Además, el serotipo 4b fue más frecuente entre las cepas clínicas que entre las alimentarias. Las cepas atenuadas o no virulentas estarían predominantemente asociadas con el serotipo 1/2c (linaje II) provenientes principalmente de alimentos, ya que ninguna de las estudiadas expresó la internalina de largo completo. Con respecto al serotipo 1/2a (linaje II) la expresión de internalina fue heterogénea pero la internalina truncada se encontró con mayor frecuencia en cepas alimentarias que en cepas clínicas (Jacquet et al., 2004).

Otros investigadores observaron tolerancia al frío, a la sal y al ácido en aislados de *L. monocytogenes* que presentaban una secuencia de codificación de longitud completa de la InIA (Hingston et al., 2017). Por otro lado autores reportan que la

presencia de la proteína trunca puede influir en la producción de biofilms más resistentes (Franciosa et al., 2009; Piercey et al., 2016).

Estas características pueden explicar la mayor persistencia de algunos serotipos en entornos de elaboración y producción de alimentos. Por un lado, los serotipos 4b y 1/2b tendrían una mayor tolerancia al frío, a la sal y al ácido ya que presentan una secuencia de codificación de longitud completa de la InIA. Por otro lado, los serotipos 1/2c y 1/2a quienes presentan en mayor medida el gen para la proteína trunca InIA podrían formar biofilms más resistentes.

1.4 Formación de biofilms

La capacidad de formar biofilms que presenta *L. monocytogenes* frente a condiciones de estrés le otorga protección contra una variedad de factores físicos, químicos y mecánicos, como los rayos ultravioleta, los metales tóxicos, los ácidos, la desecación, la salinidad, los antimicrobianos y tolera mejor las altas concentraciones de desinfectantes y sanitizantes (Flemming et al., 2016; Hall-Stoodley et al., 2004; Pan et al., 2006). Por otro lado, las superficies de las maquinarias y utensilios utilizados en la industria alimentaria, junto con la materia orgánica residual de procesos de limpieza y desinfección inadecuados, proporcionan los nutrientes necesarios y las condiciones propicias para la proliferación y supervivencia de microorganismos convirtiéndose en una fuente de contaminación para los productos alimenticios (Srey et al., 2013).

Los biofilms bacterianos son comunidades formadas por microorganismos adheridos unos a otros y a una superficie de forma irreversible, embebidos en una matriz extracelular de producción propia compuesta principalmente por polisacáridos, proteínas, ADN extracelular y canales de agua. Estas comunidades surgen por un cambio en el estilo de vida de las bacterias unicelulares nómades o planctónicas, a un estado pluricelular sedentario en el que desarrollan atributos fisiológicos y genéticos diferentes. Es así, que se dan variaciones en su metabolismo, tasa de crecimiento y transcripción génica como parte de una estrategia de supervivencia que la bacteria desarrolla frente a la presencia de un ambiente inhóspito (Blackman & Frank, 1996; Donlan, 2002).

Las características de este proceso de desarrollo varían entre las diferentes especies bacterianas pero ciertos autores coinciden en un modelo para la formación de biofilms adecuado para diferentes grupos de especies. La formación de biofilms en asociación con las superficies consta básicamente de cinco pasos que conforman un ciclo. Ver representación esquemática en la figura 3 (Donlan, 2002; Lasa, 2006; Renier et al., 2011):

1. Aproximación y adhesión reversible.
2. Adhesión irreversible y producción de sustancias poliméricas extracelulares (EPS),
3. Desarrollo temprano de la arquitectura del biofilm.
4. Maduración del biofilm, formación de canales para el flujo de nutrientes y excreciones.
5. Dispersión celular, con la subsiguiente colonización de otras superficies

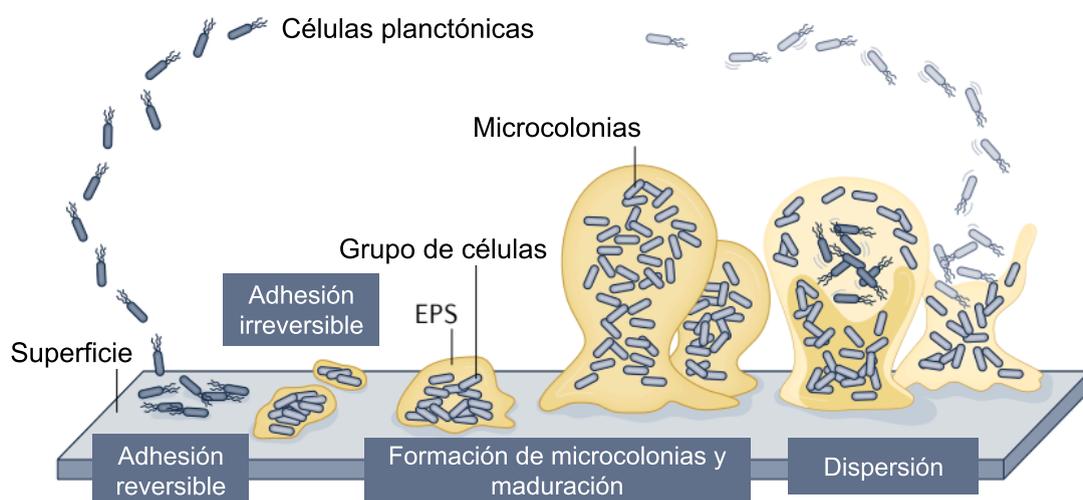


Figura 3. Modelo conceptual de la formación de un biofilm como un proceso de desarrollo. El mismo consta de cinco etapas: (1) adhesión reversible; (2) adhesión irreversible y comienzo de la producción de exopolisacáridos; (3) formación de microcolonias; (4) maduración; (5) dispersión celular. Tomado de Sauer et al., (2022).

El proceso de formación del biofilm inicia con la aproximación y adhesión de las células bacterianas planctónicas de forma reversible a una superficie sólida abiótica. En el caso de las especies bacterianas móviles, como lo es *L. monocytogenes*, los elementos motiles como el flagelo son la fuerza impulsora que contribuye a contrarrestar las fuerzas de repulsión entre las bacterias y la superficie

(Farber & Peterkin, 1991). También se demostró que en *L. monocytogenes*, las proteínas de membrana juegan un rol esencial en la adherencia primaria a la superficie (Renier et al., 2011).

Los encuentros iniciales con una superficie generalmente conducen a una adherencia transitoria que puede dar como resultado una asociación de superficie estable y un cambio fisiológico hacia el desarrollo de biofilms, o un regreso al estado planctónico. Durante la adherencia transitoria si las condiciones extracelulares e intracelulares favorecen la formación de biofilms, comienza la segunda etapa, en la que se pierde la motilidad, las bacterias comienzan a producir una matriz extracelular que las mantiene unidas entre ellas y favorece la adhesión a la superficie volviéndola irreversible (Kolter, R & E. P. Greenberg, 2006).

Esta matriz se forma por la secreción de sustancias poliméricas extracelulares (EPS por sus siglas en inglés) que en *L. monocytogenes* están compuestas por polisacáridos principalmente ácido teicoico, ADN extracelular y proteínas (Brauge et al., 2016; Harmsen et al., 2010). Las EPS forman una red tridimensional que interconecta e inmoviliza las células en el biofilm, las protege frente a agresiones externas, media la adhesión celular a la superficie y provee de estabilidad mecánica al biofilm. Además, funciona como un sistema digestivo externo que mantiene los nutrientes disueltos y las enzimas extracelulares cercanas a las células para que se utilicen como fuentes de nutrientes y energía favoreciendo la proliferación celular (Flemming et al., 2016). Como resultado de la agregación y el crecimiento simultáneo de numerosas células luego de la unión irreversible, se da la formación de microcolonias.

La maduración del biofilm es el paso en el que se convierte en una estructura organizada. La estructura de los biofilms de *L. monocytogenes* se caracterizan por ser multicapas organizadas tridimensionalmente en forma de hongo con canales y poros bien distribuidos, aunque también pueden producirse escasos agregados de células o una monocapa bacteriana. Esto depende de una multitud de parámetros como, la cepa, el tipo de superficie y otras condiciones ambientales, como el pH, el medio y la temperatura, sistema de cultivo, entre otros (Renier et al., 2011).

De acuerdo a la evidencia obtenida, en el modelo de organización de biofilms de tipo hongo, en los tallos se forman poros y espacios intersticiales por el que discurren canales de agua facilitando el transporte de materia. Para adquirir esta forma se propone que el crecimiento celular en la periferia es rápido y que el crecimiento en el interior es lento (Chmielewski & Frank, 2003). Durante esta etapa también se desarrollan dos sistemas de comunicación célula-célula, el sistema autoinductor 2 LuxS y el sistema de señalización quorum sensing cuando las bacterias se encuentran en altas densidades de población celular. Este mecanismo se basa en la producción y liberación de moléculas señal denominadas autoinductores (Renier et al., 2011).

Finalmente, la dispersión, es el último paso en el ciclo de formación de los biofilms y permite a las células revertir a su forma de vida planctónica. Este se explica como un proceso activo en el que las células se desprenden de la comunidad hacia el medio, lo que les permite alcanzar nuevos nichos (Donlan, 2002; Sauer et al., 2022).

En relación a la proteína InIA trunca mencionada anteriormente, un trabajo realizado por Franciosa et al., (2009) sugirió que la forma trunca de la proteína favorece el desarrollo de biofilms más gruesos y resistentes. Esto podría deberse a que la proteína trunca, que es secretada al medio extracelular en lugar de estar anclada a la membrana, puede incorporarse a la matriz extracelular que conforma el biofilm. De igual manera, los estudios de Piercey et al., (2016) mostraron que los mutantes de transposones que contenían un gen de internalina A interrumpido formaban biofilms más gruesos en relación con el tipo salvaje. Estos datos se complementan con los resultados obtenidos por Di Ciccio et al., (2022) en el que se asociaron mayores niveles de formación de biofilms con la presencia de la proteína InIA trunca en conjunto con la Isla de supervivencia al estrés 1 y el gen de estrés *arsD*.

1.4.1 Resistencia a ácidos orgánicos de *Listeria* y su biofilm

La aplicación de ácidos orgánicos ha sido propuesta como estrategia para reducir los niveles bacterianos en carne. De todos los ácidos orgánicos evaluados

en la literatura, el ácido acético y el láctico son los más aceptados. Como antimicrobianos naturales, los ácidos orgánicos, incluido el ácido láctico (AL), pueden usarse para prevenir el crecimiento de patógenos en una variedad de alimentos listos para el consumo (RTE) y son fácilmente aplicables a superficies de productos frescos y carnes (Wang et al., 2014).

El mecanismo de acción de los ácidos orgánicos depende de la capacidad del ácido no dissociado para penetrar a través de la membrana celular y dissociarse dentro de la bacteria causando una disminución en el pH interno, que puede interrumpir la producción de adenosín trifosfato (ATP), la síntesis de ARN, la replicación del ADN y el crecimiento celular (Rajkovic et al., 2010). El AL específicamente es un ácido orgánico débil con un pKa = 3,85 a 25 °C, bajo peso molecular (PM = 90,80) y un carbono asimétrico en la ubicación α de la función carboxílica (Wang et al., 2014).

El uso de AL como antimicrobiano fue aprobado principalmente para disminuir la contaminación por *Escherichia Coli* O157:H7 y *Salmonella*. Estados Unidos permitió su uso en carne desde 1999, en cambio la Unión Europea lo aprobó en 2013 (Koohmaraie et al., 2005; Diario Oficial de la Unión Europea, 2013). Se conoce que *L. monocytogenes* es sensible al AL in vitro, demostrándose que frente a cepas aisladas de frigoríficos nacionales, la concentración mínima inhibitoria fue 0,3 % en TSB (por sus siglas en inglés, Tryptic Soy Broth) suplementado con extracto de levadura al 0,6 % (TSB-YE) y la concentración mínima bactericida 0.7 % (Brugnini et al., 2018). Si bien la aplicación de AL se aplica en la actualidad de manera rutinaria en canales y cortes en establecimientos frigoríficos a nivel mundial, es necesario también una rutina de limpieza y desinfección de las superficies de maquinaria y utensilios utilizados en la industria. Como se mencionó anteriormente estas superficies son propicias para la proliferación y supervivencia de microorganismos que pueden formar biofilms y convertirse en una fuente de contaminación para los productos alimenticios (Srey et al., 2013).

Durante la utilización de AL como antimicrobiano se han observado diferentes niveles de reducción de *L. monocytogenes* asociados con diversos factores como la variabilidad en la sensibilidad entre cepas y las distintas formas de aplicación de

AL (Bucur et al., 2018). Por esta razón en este proyecto se busca evaluar posibles diferencias en la resistencia de los biofilms formados por las diferentes cepas seleccionadas circulantes en Uruguay.

Yang et al., (2009) clasificó la eficacia de diversos desinfectantes frente a biofilms maduros (de más de 7 días), siendo el AL (0.18 %, pH 3.0) el más eficaz frente al hipoclorito de sodio (0.0095 %, pH = 7.81) y diferentes soluciones de amonio cuaternario (3 % - 0.010 %, pH = 11.46 - 6.24). Cuando se aplicó AL en concentraciones de 0,5 y 2,0 % a pH = 2 a células de *L. monocytogenes* formadoras de biofilms en cloruro de polivinilo y acero inoxidable, hubo reducciones del número de células sobrevivientes del biofilm en todos los tiempos de tratamiento (5, 15 y 30 segundos). Además, proponen que los biofilms bacterianos podrían ser más susceptibles al calor u otros químicos antimicrobianos luego de ser tratados con AL lo que sugiere al AL como un buen método de control de biofilms en las superficies de la industria alimentaria (Ban et al., 2012).

Por otro lado, los métodos actuales de higienización de instalaciones alimentarias presentan algunos inconvenientes bien conocidos, como la posible toxicidad de los residuos de los agentes antimicrobianos, o el fomento de resistencia a estos agentes en los microorganismos transmitidos por los alimentos, (Purkrtová et al., 2010). Por lo tanto, la investigación de nuevas sustancias para la desinfección de biofilms es un área de gran interés y la creciente percepción negativa de los consumidores contra los productos químicos sintéticos y artificiales han desplazado este foco de investigación hacia el desarrollo de desinfectantes y antimicrobianos alternativos, respetuosos con el medio ambiente y que los consumidores perciben como “naturales” (Giaouris et al., 2014).

1.5 Objetivos general y específicos

1.5.1 Objetivo general

Dado que la caracterización de cepas en circulación es importante para las investigaciones epidemiológicas de *L. monocytogenes*, el objetivo de este trabajo consiste en caracterizar un conjunto de seis aislamientos de *L. monocytogenes*

provenientes de muestras cárnicas extraídas de distintos establecimientos de Uruguay (Brugnini et al., 2018, 2021). Evaluar la presencia de mutaciones de codón de terminación prematuros en el gen de la internalina A y su posible relación con la capacidad de las cepas de formar biofilms y la resistencia de los mismos al ácido láctico.

1.5.2 Objetivos específicos

1. Caracterizar a nivel molecular los aislamientos de *Listeria monocytogenes* de carne de vaca, cerdo y pollo del laboratorio de alimentos y nutrición del Instituto polo Tecnológico de Pando: Confirmación de género y especie mediante rt-PCR (reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real, por sus siglas en inglés), serotipificación molecular por PCR multiplex (reacción en cadena de la polimerasa, por sus siglas en inglés).
2. Estudiar el gen *inIA*: evaluar la presencia de PMSCs.
3. Evaluar la capacidad de formación de biofilms de las diferentes cepas y la resistencia de los mismos al AL como antimicrobiano.

1.6 Estrategia

1.6.1 Aislamientos y cepas de referencia

Los aislamientos almacenados en el laboratorio de alimentos y nutrición del Instituto Polo Tecnológico de Pando fueron tomados de productos cárnicos de diferentes establecimientos. Dos aislados de carne de cerdo aislados en febrero del 2019, denominados L200 y L201, dos aislados en agosto del 2014 de carne vacuna denominados L101B2 y L100A1 y dos aislados en febrero del 2019 de carne de pollo denominados P20 y P24 (Brugnini et al., 2018; Rodriguez & Brugnini, 2019). Además, se utilizaron dos cepas donadas por el Instituto de Higiene, una del serotipo 1/2b y otra del serotipo 1/2c, denominadas en este estudio, CC1/2b y CC1/2c, respectivamente. Finalmente se utilizaron tres cepas registradas en el ATCC® (por sus siglas en inglés, American Type Culture Collection) como referencia para los distintos estudios. Las cepas de *L. monocytogenes* ATCC® 19111 del serotipo 1/2a, aislada de aves de corral y ATCC® 13392 del serotipo 4b,

aislada de fluido espinal de niño con meningitis y la cepa de *Salmonella enterica* ATCC® 14028.

1.6.2 Caracterización molecular

1.6.2.1 Confirmación de género y especie a nivel molecular

Para la confirmación de género y especie a nivel molecular se realizó un ensayo rt-PCR, empleando el fluorocromo de unión inespecífica a la doble hebra de ADN, SYBR®Green. De acuerdo a lo reportado por Barbau-Piednoir et al., (2013) se trata de una combinación de ensayos cualitativos de detección por rt-PCR. En un primer nivel se detecta la presencia de cualquier bacteria perteneciente al género *Listeria* (*L. monocytogenes*, *L. ivanovii*, *L. seeligeri*, *L. welshimeri* y *L. innocua*), exceptuando las bacterias de la especie *L. grayi*, que difiere significativamente de *L. monocytogenes* a nivel genético (Schmid et al., 2005). En un segundo nivel permite detectar la presencia de la especie *L. monocytogenes*.

Para el primer nivel de detección, un gen presente en todas las especies del género *Listeria* fue considerado. Con los pares de cebadores *prs-2-deg* (F) y (R), se evalúa la presencia del gen de expresión constitutiva *prs* que flanquea el clúster de virulencia presente en la isla de patogenicidad LIPI-1 (Schmid et al., 2005). Para el segundo nivel de detección, se evalúa la presencia del gen *hly* con los pares de cebadores *hlyA-146-deg-tronc* (F) y (R). *hly* es el gen que codifica para un factor de virulencia específico de la especie *L. monocytogenes* previamente mencionado (Vázquez-Boland et al., 2001).

Este ensayo presenta ciertas ventajas, ya que, los cuatro pares de cebadores son utilizados bajo las mismas condiciones de PCR y es posible realizarlos simultáneamente. Además, los cuatro genes seleccionados están presentes en una sola copia en el genoma de *Listeria* y cada uno de ellos da como resultado una única banda del tamaño y secuencia esperado.

1.6.2.2 Serotipificación molecular por PCR

La serotipificación molecular se realiza por técnicas basadas en ensayos de PCR multiplex tiempo final descrita por (Doumith et al., 2004). Esta se basa en la detección por PCR de cinco regiones específicas del genoma de *L. monocytogenes*, tras la detección de estas regiones las cepas pueden clasificarse en cinco diferentes serogrupos moleculares como se indica en la tabla 1.

Tabla 1. Distribución de 12 serotipos de *L. monocytogenes* en los serogrupos moleculares y sus regiones amplificadas.

Serotipos	Serogrupo molecular	Regiones amplificadas
1/2a, 3a	II.a	<i>prs</i> , <i>lmo0737</i> ,
1/2c, 3c	II.b	<i>prs</i> , <i>lmo0737</i> , <i>lmo1118</i>
4b, 4d, 4e	I.a	<i>prs</i> , ORF2819, ORF2110
1/2b, 3b, 7	I.b	<i>prs</i> , ORF2819,
4a, 4c	III	<i>prs</i>

Los serotipos 4ab y 4h no se incluyen en la clasificación en serogrupos moleculares descrita por Doumith et al., (2004).

De acuerdo a Doumith et al., (2004), con este método y considerando que los serotipos 1/2a, 4b, 1/2b y 1/2c son los más abundantes (aproximadamente 98 %) de los aislados de origen humano y alimentario, es posible inferir que un aislamiento perteneciente a los serogrupos moleculares II.a, II.b, I.a o I.b corresponderá al serotipo 1/2a, 1/2c, 4b o 1/2b, respectivamente (Jacquet et al., 2002).

1.6.3 Análisis del gen de virulencia *inIA*

Para el análisis del gen de la proteína InIA se realiza la secuenciación del gen completo *inIA*. Como lo indican Magagna et al., (2022) y Gelbíčová et al., (2015), se utilizan tres pares de cebadores que dividen el gen en tres regiones. Al reensamblar las secuencias obtenidas es posible obtener la secuencia completa del gen *inIA* de todos los serotipos pertenecientes a los linajes I y II. Esto es sumamente relevante ya que como se mencionó anteriormente todos los casos clínicos de listeriosis están vinculados con aislados pertenecientes a estos linajes (Jacquet et al., 2002). Además, con la secuenciación es posible identificar los 33

tipos de mutaciones de PMSC actualmente descritas (<https://bigsddb.pasteur.fr/listeria/>; consultado el 27 de febrero de 2024).

1.6.4 Evaluación de la formación de biofilms

La cuantificación de biofilms se realizaba anteriormente con un método basado en el cultivo de biofilms en la pared de un tubo de ensayo y posterior detección por tinción para determinar de forma cualitativa mediante la percepción del observador la formación de biofilms. Actualmente se utilizan otros métodos entre los cuáles el ensayo en placa de microtitulación es el mayormente utilizado ya que, por un lado, la adhesión y formación del biofilm se realiza sobre una superficie de poliestireno, similar a potenciales superficies de contacto con alimentos y, por otro lado, permite evaluar la adhesión celular de múltiples cepas y múltiples condiciones de crecimiento dentro de un mismo experimento. Este método se clasifica como estático o cerrado ya que el suministro de nutrientes se limita a las condiciones inicialmente proporcionadas y consiste en cultivar biofilms en placas de microtitulación, realizar su tinción con cristal violeta y solubilizar el colorante unido para cuantificarlo mediante la lectura de absorbancia. La principal desventaja de este método es que es una cuantificación indirecta ya que se utiliza como indicador de la cantidad de biomasa de biofilm formado la cantidad de cristal violeta unido y luego solubilizado en la solución de decoloración (Stepanović et al., 2007).

En este ensayo, la capacidad de formación de biofilms se evaluó en dos condiciones diferentes. Por un lado, se evaluó la formación a 37 °C durante 24 horas de incubación, es decir en condiciones óptimas de crecimiento y por otro lado a 20 °C durante 48 horas de incubación, es decir, temperaturas próximas a las temperaturas de trabajo en establecimientos elaboradores de alimentos.

1.6.5 Evaluación de la resistencia de biofilms

La mayoría de las investigaciones sobre la resistencia a antimicrobianos y desinfectantes de los biofilms formados por *L. monocytogenes* se realizan mediante formatos estáticos en placas de microtitulación. En este proyecto se evaluó la capacidad antimicrobiana del AL frente a biofilms formados por aislamientos de *L. monocytogenes*. Para ello se compararon estadísticamente las

biomasas de biofilm formadas sin la aplicación de antimicrobiano (ver sección 1.6.4) con la biomasa de biofilms remanente luego de aplicar el antimicrobiano al 1 % durante 5 minutos al biofilm ya formado.

2. Materiales y métodos

2.1 Aislamientos y cepas de referencia

Los aislamientos de *Listeria monocytogenes* L100A1, L101B2, L200, L201, P20 y P24, las cepas de referencia ATCC® 19111, ATCC® 13932 y ATCC® 14028 y las dos cepas donadas por el Instituto de Higiene CC1/2b y CC1/2c se mantuvieron conservados en stocks a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ de TSB-YE (composición en un litro de medio: Triptona (digerido pancreático de caseína) 17,0 g, Soytona (digerido péptico de soja) 3,0, glucosa 2,5 g, cloruro de sodio 5,0 g, fosfato dipotásico 2,5 g, pH $7,3 \pm 0,2$ a $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ suplementado al 0,6 % con extracto de levadura) y glicerol al 20 %. Previo a la realización de cada experimento, cada cepa se activó al transferir 0,1 mL del stock a 10 mL de medio TSB-YE e incubación a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 18 horas.

2.2 Caracterización molecular

2.2.1 Confirmación de género y especie a nivel molecular

La confirmación de género y especie de los aislamientos a nivel molecular se realizó mediante una PCR a tiempo real de acuerdo a lo descrito por Barbau-Piednoir et al., (2013). A partir de un cultivo en medio TSB-YE incubado a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 18 horas para alcanzar fase estacionaria, se extrajo el ADN genómico de todos los aislamientos de *Listeria* utilizando el kit Mericon™ DNA Bacteria Plus Kit (Qiagen) de acuerdo con las recomendaciones del fabricante. Se midió la concentración de ADN extraído usando un espectrofotómetro NanoDrop™ Lite de Thermo Scientific™ según las recomendaciones del fabricante.

Para la PCR a tiempo real se utilizaron los pares de cebadores prs-2(F) y prs-2-deg(R) para identificar *Listeria* spp. y el par hlyA-146-deg-tronc(F) y (R) para identificar *L. monocytogenes*, ver tabla 2 (Barbau-Piednoir et al., 2013). Se utilizó un termociclador Rotor-Gene Q con el siguiente programa térmico: un paso de activación de la ADN polimerasa durante 3 minutos a $98\text{ }^{\circ}\text{C}$ seguido de 30 ciclos de amplificación de 15 segundos a $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ (paso de desnaturalización) y 1 minuto a $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ (paso de hibridación y extensión) adquiriendo los datos en el canal verde (Ex

470 nm- Det 510 nm). La reacción se realizó en un volumen final de 25 µL, con 2µL de 25 ng/µL de ADN extraído, 1X SsoAdvanced™ Universal SYBR®Green Supermix de Biorad, 800 nM y 400 nM de cada cebador prs-2 y hlyA-146, respectivamente. Luego de la amplificación se realizó el análisis de la temperatura de disociación de los productos de amplificación mediante la curva de disociación (melting) aumentando gradualmente la temperatura de 60 a 95 °C en 20 minutos (\pm 0,6 °C/20 segundos) utilizando el termociclador Rotor-Gene Q de Qiagen.

Se incluyeron como control negativo de *Listeria* spp. una cepa de *Salmonella enterica* ATCC® 14028, como control positivo para *L. monocytogenes* las cepas ATCC® 19111 y un control "sin molde" (NTC) para evaluar la formación de dímeros de cebadores o la amplificación no específica.

Se consideraron dos criterios para la interpretación de los resultados, el ciclo de umbral (C_t , por sus siglas en inglés) y la temperatura de disociación del amplicón (T_m , por sus siglas en inglés). Debido a que es un ensayo cualitativo se considera como positivo una señal de amplificación de carácter exponencial por encima del límite de detección (umbral) y que presenta un único pico en el análisis de la curva de disociación de las muestras, es decir, un único valor de T_m cuyo valor puede variar según el serotipo como se muestra en la tabla 2.

Tabla 2. Secuencias de cebadores utilizadas para los dos niveles de detección, género *Listeria* y especie *monocytogenes*, con sus respectivos tamaños y T_m del amplicón.

Especie objetivo	Nombre del cebador	Secuencia de cebadores (5' - 3')	Tamaño amplicón (pb)	T_m
<i>Listeria</i> (excepto <i>L. grayi</i>)	prs-2-F	ATTTTCTCGCTAAATTCTAATCGTG	60	71.5 °C
	prs-2-R-deg	CAATACCWACTTCTTTTCGCAATCT C		
<i>L. monocytogenes</i>	hlyA-146-de g-tronc-F	AAATCTGTCTCAGGYGATGT	103	73.5 – 74 °C <i>L. monocytogenes</i> 1/2a, 1/2c, 3a, 3c, 4a, 4d y 4e
	hlyA-146-R	CGATGATTTGAACTTCATCTTTTGC		75 °C <i>L. monocytogenes</i> 1/2b, 3b, 4b y 4c

En nombre del cebador se especifica F= Forward y R= Reverse. Bases canónicas: A = Adenina, C = Citosina, G = Guanina, T = Timina. Bases degradadas: Y = Pirimidinas (C o T), V = No T (A, C o G), R = Purinas (A o G) S = Strong (C o G). Adaptado de Barbau-Piednoir et al., (2013).

2.2.2 Serotipificación molecular por PCR

La serotipificación de los aislamientos a nivel molecular se realizó mediante un ensayo de PCR multiplex a tiempo final, según el método reportado por Doumith et al., (2004) dirigido a los genes: *prs*, *ORF2110*, *ORF2819*, *Imo1118* e *Imo0737*.

Inicialmente, se extrajo el ADN genómico de la misma forma que en el punto 2.2.1. La PCR se realizó con un paso inicial de desnaturalización a 95 °C durante 3 minutos; 35 ciclos de 94 °C por 0,40 minutos (desnaturalización), 53 °C por 1,15 minutos y 72 °C por 1,15 minutos (hibridación y extensión, respectivamente); y un paso final de extensión de 72 °C durante 7 minutos en un termociclador Eppendorf 5331 MasterCycler® Gradient Thermal Cycler. La reacción se realizó en un volumen final de 50 µL, con 2µL de 25 ng/uL de ADN extraído, 0,2 mM de dNTPs (desoxirribonucleótidos trifosfatos), 2,5 U NZYtaq II DNA polymerase de NZYtech, 1X Reaction Buffer de NZYtech, 0,25 mM MgCl₂ y el mix de cebadores preparado de acuerdo a las concentraciones especificadas en tabla 3.

Se incluyeron como control negativo de *Listeria*. spp una cepa de *Salmonella enterica* ATCC® 14028, como control positivo para los cuatro primeros serogrupos moleculares II.a, II.b, I.a y I.b (ver tabla 1) las cepas de *L. monocytogenes* ATCC® 19111 serotipo 1/2a, CC1/2c serotipo 1/2c, ATCC® 13932 serotipo 4b y CC1/2b serotipo 1/2b, respectivamente. Además, se añadió un control "sin molde" (NTC) y un blanco de extracción con buffer de lisis (B).

Tabla 3. Secuencias de los cebadores, tamaños de amplicón y concentraciones utilizadas en la reacción de PCR.

Gen objetivo	Secuencia cebador (5'-3')	Tamaño de amplicón (pb)	Concentración final
<i>Imo1118</i>	F: AGGGGTCTTAAATCCTGGAA R: CGGCTTGTTCCGGCATACTTA	906	1,5 uM
<i>Imo0737</i>	F: AGGGCTTCAAGGACCTTACCC R: ACGATTTCTGCTTGCCATTC	691	1 uM
ORF2110	F: AGTGGACAATTGATTGGTGAA R: CATCCATCCCTTACTTTGGAC	597	1 uM
ORF2819	F: AGCAAAATGCCAAAACCTCGT R: CATCACTAAAGCCTCCCATTTG	471	1 uM
<i>prs</i>	F: GCTGAAGAGATTGCGAAAGAAG R: CAAAGAAACCTTGGATTTGCGG	370	0,2 uM

En la secuencia del cebador se especifica F= Forward y R= Reverse. Bases canónicas: A = Adenina, C = Citosina, G = Guanina, T = Timina.

Los productos de PCR se visualizaron tras una electroforesis en gel de agarosa al 2 % en buffer TAE 1X (Tris-acetato de 0,04 M, EDTA 1 mM, pH 8,0) previamente teñido con SYBR™ Safe DNA Gel Stain 10.000X. Los productos de PCR se sembraron con Thermo Scientific™ 6X DNA Loading Dye y se utilizó el marcador de peso molecular de AccuRuler 100 bp Plus DNA Ready-to-Use Ladder. El gel fue visualizado bajo luz ultravioleta en un transiluminador UV Transilluminator de Cleaver Scientific Inc.

2.3 Análisis del gen de virulencia *inIA*

Inicialmente, se extrajo el ADN genómico de la misma forma que en el punto 2.2.1. El análisis del gen de virulencia *inIA* se realizó mediante la secuenciación de los productos de PCR del gen que codifica para la proteína InIA utilizando tres pares de cebadores diseñados por Magagna et al., (2022) y Gelbíčová et al., (2015), utilizando el ADN genómico obtenido de la misma forma que en el punto 2.2.1.

Para la PCR a tiempo final se aplicó el siguiente programa térmico: un paso de desnaturalización de 3 minutos a 95 °C seguido de 35 ciclos de amplificación de 30 segundos a 94 °C (paso de desnaturalización), 90 segundos a 55 °C (paso de hibridación) y 90 segundos a 72 °C (paso de extensión) y un paso final de

extensión a 72 °C por 10 minutos en un termociclador Eppendorf 5331 MasterCycler® Gradient Thermal Cycler.

Las reacciones se realizaron en un volumen final de 25 µL, con 2µL de 100 ng/uL de ADN extraído, 0,2 mM de dNTPs, 5 U NZYtaq II DNA polymerase de NZYtech, 1X Reaction Buffer de NZYtech y 500 nM de cada cebador de la región correspondiente como se observa en la tabla 4. La concentración de cloruro de magnesio fue ajustada para lograr la especificidad de reacción adecuada en las diferentes regiones del gen. Por ello, la concentración final de cloruro de magnesio fue de 1,5 mM para las regiones 1 y 3 y de 2 mM para la región 2. En cada corrida se incluyó un control "sin molde" (NTC).

Tabla 4. Secuencia de los cebadores utilizados para amplificar las tres regiones del gen *inIA*

Región del gen	Secuencia cebador (5'-3')	Posición (pb)	Tamaño del amplicón (pb)
1	F: GATATCACTAAACGGCTCC R: TAGTTTTGTTAGACCCGACA	(-170)–872	1042
2	F: TAAATCGGCTAGAACTATCCA R: GTCAATAAATTCCCAGCTTC	497–1540	1043
3	F: YTATACCTTTAVCCAAYCTG R: TTCAYTTTGTGTCACRSATC	1410–(+218)	1208

En la secuencia del cebador se especifica F= Forward y R= Reverse. Bases canónicas: A = Adenina, C = Citosina, G = Guanina, T = Timina. Bases degradadas: Y = Pirimidinas (C o T), V = No T (A, C o G), R = Purinas (A o G) S = Strong (C o G). Adaptado de Magagna et al., (2022) (pares de cebadores 1 y 2) y Gelbíčová et al., (2015) (par de cebadores 3).

El largo de los productos de PCR se verificó mediante una electroforesis en gel de agarosa al 1.2 % en buffer TAE 1X (Tris-acetato de 0,04 M, EDTA 1 mM, pH 8,0) pre teñido con SYBR™ Safe DNA Gel Stain 10.000X. Los productos de PCR se sembraron con Thermo Scientific™ 6X DNA Loading Dye y se utilizó el marcador de peso molecular de Thermo Scientific™ GeneRuler 1kb DNA Ladder. El gel fue visualizado bajo luz ultravioleta en un transiluminador UV Transilluminator de Cleaver Scientific Inc.

Previo a la secuenciación, se realizó la purificación de los productos de PCR con el kit DNA Clean & Concentrator®-25 de ZymoResearch para eliminar remanentes

de cebadores, ADN genómico y otros residuos de reacción que pudieran dañar la calidad del ADN obtenido. Posteriormente se enviaron a secuenciar los productos de PCR mediante el servicio de secuenciación por electroforesis capilar (CES, por sus siglas en inglés) o Sanger de Macrogen, cada producto de PCR fue secuenciado en sentido directo (5' - 3') e inverso (3' - 5') con los cebadores forward y reverse, respectivamente, ver tabla 4.

Después de la secuenciación, las seis secuencias de cada muestra se depuraron, alinearon y ensamblaron en un único contig de más de 2400 pb con el software BioEdit versión 7.1.1 usando la secuencia tipo del gen *inIA* como plantilla con número de acceso MG922918.1 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/MG922918.1>). Luego de identificar los marcos abiertos de lectura (ORFs, por sus siglas en inglés) se analizaron las secuencias proteicas obtenidas en busca de PMSCs utilizando el software BioEdit versión 7.1.1.

2.4 Evaluación de la formación de biofilms

La evaluación de la capacidad de formación de biofilm para cada cepa se realizó mediante el método de cultivo en placa de microtitulación. Se realizaron tres réplicas independientes por cepa. En cada réplica las cepas se analizaron por triplicado (tres pocillos por cepa). Para ello se partió de un cultivo en medio TSB-YE incubado a 37 °C durante 18 hs para alcanzar la fase estacionaria. Se realizó una dilución de cada cultivo en medio BHI (por sus siglas en inglés, Brain Heart Infusion, composición en un litro de medio: sólidos de infusión cerebral 12,5 g, sólidos de infusión de corazón de res 5,0 g, peptona proteasa 10,0 g, glucosa 2,0 g, cloruro de sodio 5,0 g, fosfato disódico 2,5 g, pH 7,4 ± 0,2 a 25 °C) para alcanzar una concentración de 1.5×10^8 unidades formadoras de colonias/ml de la cual se transfirieron 100 uL a tres pocillos de una placa de microtitulación de poliestireno estéril. En la placa de microtitulación se añadieron 150 uL de agua destilada estéril en los pocillos sobrantes para evitar la pérdida por evaporación y los efectos de borde de placa. Además, se añadió un blanco por triplicado de medio BHI sin inocular. La absorbancia del blanco se tomó como basal y fue restada a cada valor experimental.

Las placas se incubaron a 37 °C y 20 °C por 24 y 48 horas respectivamente y la densidad óptica se midió en un Lector de placas, Multiskan EX, Thermo Scientific a 620 nm. Luego se removió el medio de los pocillos y tras enjuagar los pocillos tres veces con 150 uL de agua destilada estéril se dejó secar la placa en posición invertida durante 45 minutos.

Para la tinción se agregó 150 uL de cristal violeta al 0.6 % en cada pocillo. Se incubó la placa a temperatura ambiente durante 45 minutos y se enjuagaron los pocillos tres veces con 150 uL de agua destilada estéril para eliminar el colorante no unido. Finalmente, se agregan 200 uL de etanol al 95 % a cada pocillo para solubilizar el cristal violeta y se incubó durante 30 minutos a 4 °C. Para medir la densidad óptica se transfieren 200 uL de cada pocillo a una nueva placa de microtitulación y se mide la absorbancia a 620 nm en un lector de placas de microtitulación.

Para la interpretación de los resultados se definió un valor de corte por densidad óptica (DO), denominado DOc, este se definió como el valor de la media de los blancos más tres desviaciones estándar por encima de los mismos.

De esta manera las cepas fueron clasificadas como (Stepanović et al., 2007):

- no formadoras de biofilm ($DO \leq DOc$)
- débiles formadoras de biofilm ($DOc < DO \leq 2x DOc$)
- formadoras moderadas de biofilm ($2x DOc < DO \leq 4x DOc$)
- fuertes formadoras de biofilm ($4x DOc < DO$)

2.5 Evaluación de la resistencia de biofilms

El AL al 1 % se preparó a partir de una solución concentrada de AL al 85 % mediante una serie de diluciones con material aforado. Finalmente, se tituló con una solución estándar de hidróxido de sodio 0.1 M para conocer su concentración exacta y se registró el valor de pH = 2,41.

Para evaluar la resistencia de los biofilms, los mismos se formaron de la misma forma que en el punto 2.4 pero previo al paso de tinción con cristal violeta se

realizó la aplicación del ácido láctico. Para ello se agregaron 100 uL de la solución ácido láctico al 1 %, dejando un tiempo de contacto de 5 minutos. Luego se enjuaga tres veces en 150 µl de agua destilada estéril para eliminar el ácido láctico y se deja secar las placas en posición invertida durante 45 minutos. Para finalizar se prosigue con la aplicación del cristal violeta hasta la medida de absorbancia en el lector de placas de microtitulación.

2.6 Análisis estadístico

Las pruebas realizadas en las secciones 2.5 y 2.6 se realizaron en tres ensayos independientes con tres réplicas para cada ensayo. El análisis estadístico de los resultados obtenidos fue realizado empleando la prueba ANOVA, SC tipo 1, LSD Fisher, mediante el software InfoStat versión 2020e con la finalidad de determinar diferencias significativas ($p < 0,05$).

3. Resultados y discusión

3.1 Caracterización molecular

3.1.1 Confirmación de género y especie a nivel molecular

En las figuras 4.A y 4.B se muestran los resultados obtenidos de la rt-PCR realizada utilizando los pares de cebadores prs-2 (figura 4.A) y hlyA-146 (figura 4.B) en las que se observa una señal de amplificación positiva de carácter exponencial por encima del valor umbral para todos los aislamientos de *Listeria monocytogenes* y para el control positivo ATCC® 19111. Para la cepa control ATCC® 14028 utilizada como control negativo y el control NTC se observa una señal bajo el límite de detección durante todos los ciclos. En las figuras 4.C y 4.D se observa que la señal obtenida para todas los aislamientos de *Listeria* y el control positivo ATCC® 19111 utilizando los pares de cebadores prs-2 (figura 4.C) y hlyA-146 (figura 4.B) presenta un único pico por curva, indicando la presencia de un único producto de PCR con T_m de 76,75 °C (figura 4.C) y de 80,50 y 79,75 °C (figura 4.D) confirmando que los aislamientos corresponden a la especie *Listeria monocytogenes* (Barbau-Piednoir et al., 2013).

Además, en la figura 4.D, obtenida mediante amplificación con el par de cebadores hlyA-146 se observa que, los aislamientos se separaron en dos grupos con T_m diferentes, 80,50 y 79,75 °C. Los aislamientos L100A1, P20, L200 y L201 presentan una T_m mayor y según Barbau-Piednoir et al., (2013) corresponden a aislados de *L. monocytogenes* del grupo de serotipos 1/2b, 3b, 4b o 4c mientras que los aislamientos L101B2, P24 y el control positivo ATCC® 19111 que presentan una T_m menor corresponderían a aislados de *L. monocytogenes* del grupo de serotipos 1/2a, 1/2c, 3a, 3c, 4a, 4d o 4e, en donde efectivamente el control positivo ATCC® 19111 pertenece al serotipo 1/2a.

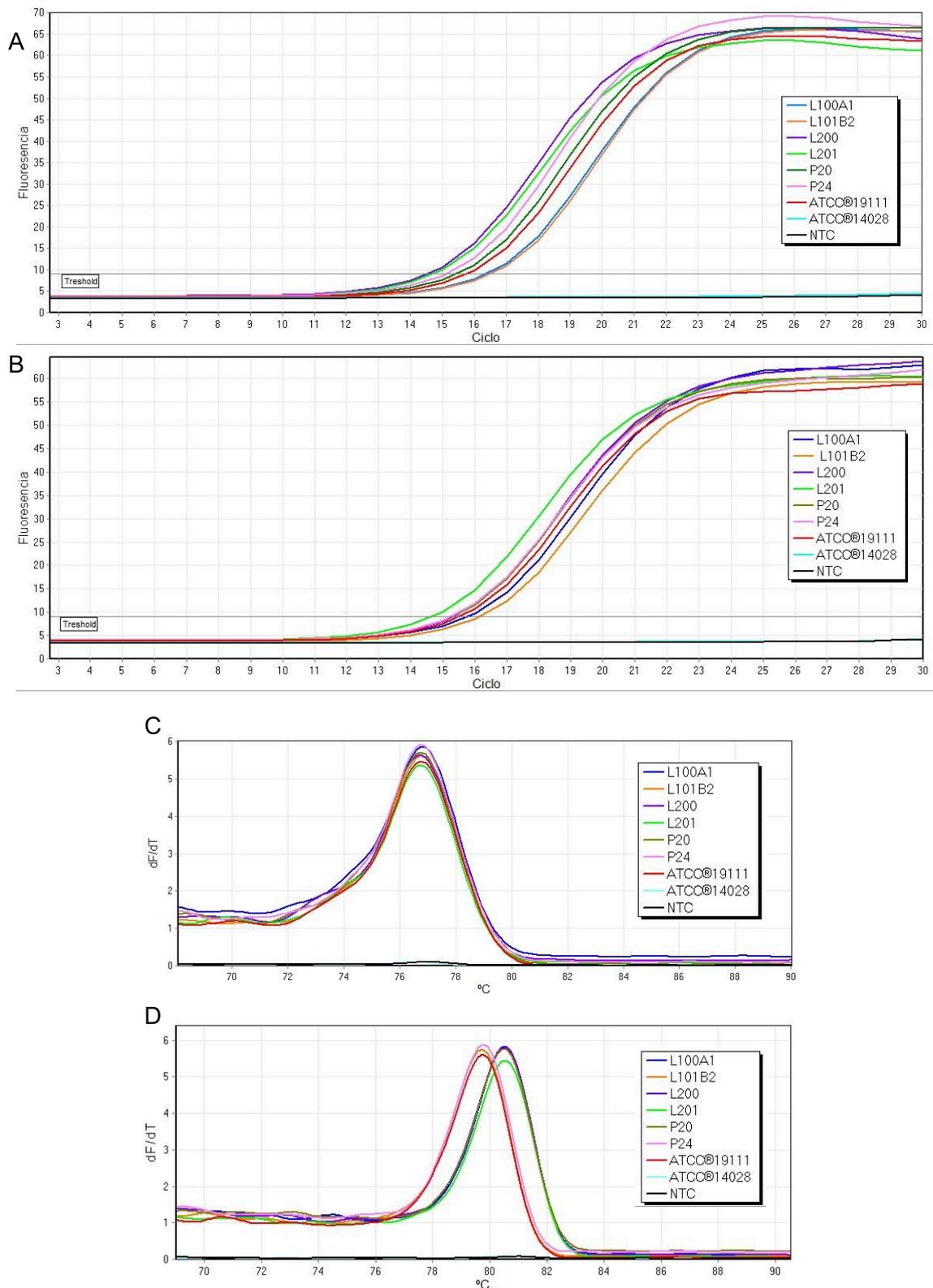


Figura 4. A y B. Señal de fluorescencia en función del número de ciclo para el producto de amplificación obtenido con el par de cebadores prs-2 (A) y hlyA-146 (B). Threshold = umbral C y D. Curvas de disociación (melting) como diferencia de fluorescencia medida sobre diferencia de temperatura en función de la temperatura para el producto de amplificación obtenido para los pares de cebadores prs-2 (C) y hlyA-146 (D).

Se observa que el valor específico de las T_m obtenidas con ambos pares de cebadores presenta un corrimiento de aproximadamente 5 °C respecto a los reportados por Barbau-Piednoir et al., (2013) y presentados en la Tabla 2. Este corrimiento puede deberse, en parte, a diferencias en la fuerza iónica del medio de reacción dadas por el uso de una PCR mastermix diferente a la utilizada por el autor.

En resumen, de acuerdo a los resultados observados podemos afirmar que los aislamientos L100A1, P20, L200 y L201 pertenecen al género *Listeria*, a la especie *L. monocytogenes* y al grupo de serotipos 1/2b, 3b, 4b y 4c, mientras que los aislamientos L101B2 y P24 pertenecen al género *Listeria*, a la especie *L. monocytogenes* y al grupo de serotipos 1/2a, 1/2c, 3a, 3c, 4a, 4d y 4e.

3.1.2 Serotipificación molecular por PCR

En la figura 5 se observa el gel de agarosa con las diferentes bandas correspondientes a los fragmentos obtenidos tras la PCR multiplex de Doumith et al., (2004). En primera instancia, los controles que se observan en los carriles NTC y B son los esperados ya que no se observan productos de PCR a excepción de una banda de tamaño menor a 100 pb que podría corresponderse con dímeros de cebadores, los cuales también se observan en los demás carriles. Los resultados obtenidos en los carriles correspondientes a las cepas control se visualizan en la sección derecha del gel en el siguiente orden, ATCC® 19111 (serotipo 1/2a), CC1/2b (serotipo 1/2b), CC1/2c (serotipo 1/2c) y ATCC® 13932 (serotipo 4b). Las bandas obtenidas son del tamaño esperado para cada serotipo reportado y concuerdan con el patrón de bandas indicado por Doumith et al., (2004) para cada serogrupo (Tabla 1 y 3). Además, para la cepa de *Salmonella* ATCC® 14028 (control negativo) no se observan bandas bien definidas como era esperado. En la sección izquierda del gel podemos observar el patrón de bandas obtenido para los diferentes aislados de *L. monocytogenes*. Los aislados L100A1, L200 y L201 presentan un patrón de bandas correspondiente al serogrupo I.a y coincide con el de la cepa de referencia ATCC® 13932 del serotipo 4b. El aislado P20 presenta un patrón de banda correspondiente al serogrupo I.b igual al de la cepa CC1/2b del serotipo 1/2b, mientras que los aislados L101B2 y P24 presentan

un patrón de banda correspondiente al serogrupo II.a e igual al de la cepa de referencia ATCC® 19111 del serotipo 1/2a.

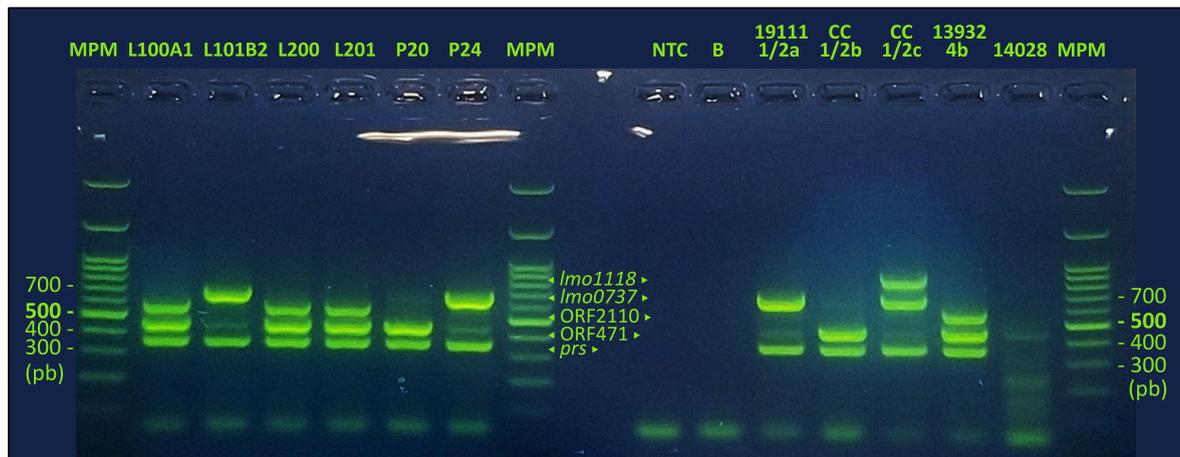


Figura 5. Electroforesis en gel de agarosa al 2 % de fragmentos de ADN generados por PCR multiplex. De izquierda a derecha: MPM (Marcador de peso molecular), Aislados L100A1, L101B2, L200, L201, P20, P24, MPM, control "sin molde" (NTC), blanco de extracción (B), cepa de referencia ATCC® 19111 serotipo 1/2a, CC1/2b, CC1/2c, cepa de referencia ATCC® 13932 serotipo 4b, control negativo Salmonella ATCC® 14028 y MPM. La ubicación de los genes correspondientes a los fragmentos amplificados se indica en el centro de la figura de acuerdo al tamaño de amplicón esperado y se indica el tamaño en pares de bases (pb) de algunas bandas relevantes del MPM en los bordes del gel.

La serotipificación molecular indica que L100A1, L200 y L201 pertenecen al serogrupo molecular I.a descrito por Doumith et al., (2004) que contiene los serotipos 4b, 4d y 4e, los aislados L101B2 y P24 pertenecen al serogrupo molecular II.a que contiene los serotipo 1/2a y 3a y el aislado P20 pertenece al serogrupo molecular I.b que contiene los serotipos 1/2b, 3b y 7. Sin embargo, debemos recordar que dentro de cada serogrupo los serotipos 1/2a, 4b, 1/2b y 1/2c son los más abundantes entre los aislados de origen humano y alimentario, por lo que podemos inferir que L100A1, L200 y L201 pertenecen al serotipo 4b, L101B2 y P24 pertenecen al serotipo 1/2a y P20 al serotipo 1/2b (Doumith et al., 2004).

Si bien el número de aislamientos analizados en este estudio es reducido, los datos obtenidos concuerdan con lo descrito por Bosilevac et al., (2007) y Braga et al., (2017) quienes reportaron la presencia de los serotipos 1/2a, 1/2b, 1/2c y 4b en aislados de carne y alimentos uruguayos respectivamente. Ambos trabajos encontraron que los serotipos 1/2b y 4b son los más abundantes, seguidos de 1/2a y 1/2c.

3.2 Análisis del gen de virulencia *inIA*

Los resultados de la amplificación por PCR de las tres regiones del gen *inIA* para los aislamientos estudiados y cepas de referencia se muestran en la Figura 6. Se obtuvieron productos de PCR de los tamaños esperados, 1042 pb para la región 1, 1043 para la región 2 y 1208 para la región 3 (Magagna et al., 2022).

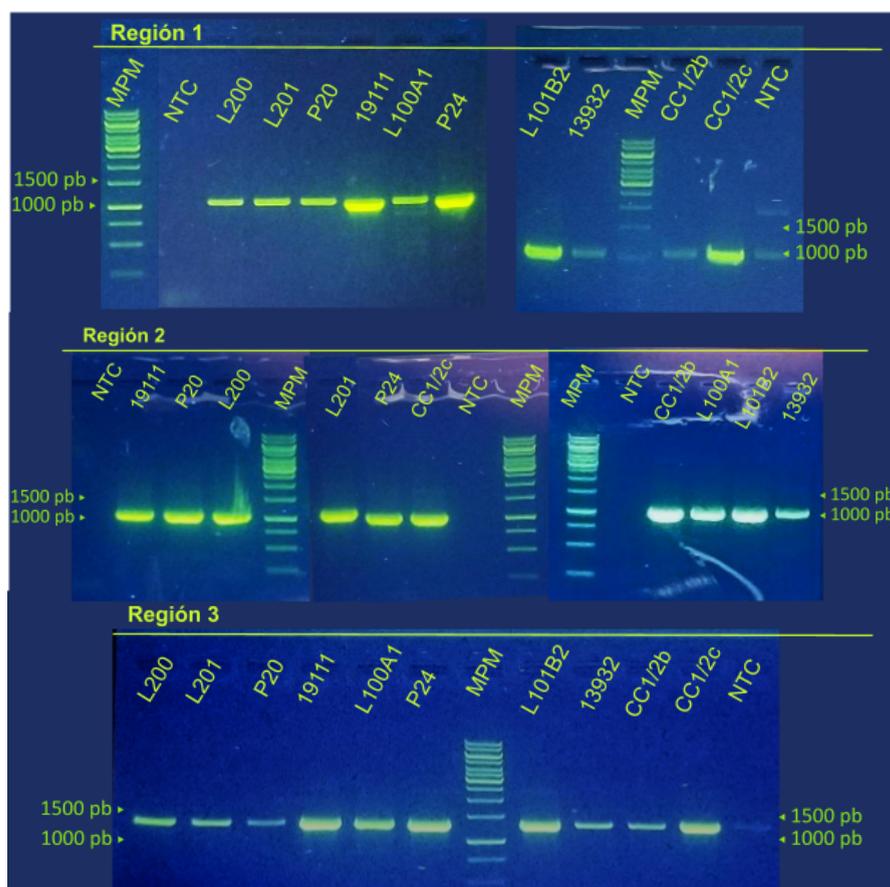


Figura 6. Gel de agarosa al 1,2 % sembrado con el producto de PCR obtenido tras la PCR descrita por Magagna et al., (2022) para las regiones 1, 2 y 3. NTC = control sin molde. MPM = Marcador de peso molecular 1kb, se indican la posición de las bandas de 1500 pb y 1000 pb en los bordes de cada gel.

Los productos de PCR para cada región se purificaron obteniéndose entre 27 y 50 ng/uL de ADN por reacción con una relación de absorbancia a 260 nm sobre 280 nm (A_{260}/A_{280}) de entre 1,76 y 1,85. Tras obtener las seis secuencias de cada cepa, se analizaron los cromatogramas obtenidos y se descartaron las secuencias de mala calidad. Estas fueron, la región 1 de la cepa L201 y la región 3 de las

cepas ATCC® 13932 y L100A1 que coinciden con extractos de ADN de baja concentración y/o relación A260/280.

Las secuencias con calidad adecuada se verificaron mediante la herramienta BLAST y todas arrojaron un porcentaje de homología entre 99,9 y 100 % con secuencias correspondientes al gen *inlA* de *Listeria monocytogenes*. Una vez confirmada su identidad las secuencias se depuraron, alinearon y ensamblaron en un único contig de 2400 pb con el software BioEdit versión 7.1.1 usando la secuencia tipo del gen *inlA* como plantilla con número de acceso MG922918.1. Las secuencias de nucleótidos ensambladas para cada aislamiento se muestran en el anexo 1. Las secuencias obtenidas presentaron un porcentaje de homología de entre 96 y 100 % con la secuencia tipo MG922918.1. Luego de identificar los ORFs se analizaron las secuencias proteicas obtenidas en busca de PMSCs. Las secuencias de aminoácidos para cada aislamiento se muestran en el anexo 2.

Las secuencias proteicas obtenidas presentaron un porcentaje de homología entre ellas de 97 y 100 %. Además, se observa que el codón de inicio de todas las secuencias codificantes para la proteína InlA es GTG, un codón de inicio presente en procariontes con una frecuencia levemente menor que el típico codón AUG y que lleva a variaciones en los niveles de expresión de la proteína a la que precede (Belinky et al., 2017).

La secuenciación del gen *inlA* reveló que las cepas L101B2, L200, P20, P24, y las de referencia CC1/2b, ATCC® 13932 y ATCC® 19111 presentan la secuencia completa de la proteína InlA con 800 aa y en la cepa CC1/2c se encontró una única mutación PMSC de tipo 11. Este PMSC se genera por la mutación de una guanina por una adenina en la posición 2054 del gen que provoca el cambio del aminoácido triptófano en el residuo 685 por un codón Stop (TAG). La presencia de esta mutación genera una proteína trunca de 684 aa en lugar de 800 aa.

Para el análisis de la cepa L201 fue necesario ensamblar un fragmento de la secuencia tipo con las secuencias obtenidas para las regiones 2 y 3, para poder identificar los ORFs de la secuencia y determinar que no existen mutaciones de tipo PMSC en las regiones analizadas (regiones 2 y 3). En el caso de la cepa

L100A1 se analizaron solo las secuencias disponibles, es decir, regiones 1 y 2, y no se encontraron mutaciones sin sentido en este fragmento, pero no es posible descartar la presencia de mutaciones sin sentido que se posicionan en la región faltante. Respecto a la cepa ATCC® 13932, se analizó la similitud de las secuencias obtenidas con la secuencia disponible en ATCC, al constatar un 100 % de homología se procedió a realizar el análisis con la secuencia completa del gen *inIA* en donde no se presentan mutaciones sin sentido.

Nuestros resultados son consistentes con los reportados por Jacquet et al., (2004) y Handa-Miya et al., (2007) en que todas las cepas de los serotipos 1/2b y 4b no presentaron ningún codón sin sentido en la secuencia del gen *inIA*. En cuanto a las cepas del serotipo 1/2a se han reportado PMSC en un 17 % (Jacquet et al., 2004) y 3 % (Handa-Miya et al., 2007) de las cepas estudiadas., en el presente trabajo las dos cepas 1/2a L101B2 y P24 no presentaron PMSC. Finalmente se encontró una mutación sin sentido en la cepa 1/2c, lo que también concuerda con lo presentado por Jacquet et al., (2004) quien reportó un 100 % de internalinas truncadas en los aislados del serotipo 1/2c, tanto clínicos como alimenticios.

Como se ha mencionado, la internalina A se puede utilizar como biomarcador para estratificar la virulencia de las diferentes cepas, esto se debe entre otros factores a que la expresión de la InIA de longitud completa está altamente asociada con cepas aisladas de casos clínicos. Los aislados clínicos que presentaron la internalina A completa fueron un 97 % para el serotipo 1/2a y un 100 % para los serotipos 1/2b y 4b (Jacquet et al., 2004). De esta forma, de acuerdo a los resultados obtenidos en nuestro estudio en donde encontramos que las cepas estudiadas poseen el gen que codifica para la proteína InIA de largo completo posiblemente no tendrían su potencial patogénico disminuido, siendo capaces de causar infección.

3.3 Evaluación de la formación de biofilms

Todos los aislamientos estudiados incluidas las cepas de referencia crecieron tanto a 37 °C, su temperatura óptima de crecimiento, como a 20 °C (Figuras 7.A y

7.B), mostrando diferencias significativas ($p < 0,05$) entre cepas (Figuras 7.A y 7.B). Comparando cada cepa según su condición de incubación podemos ver que P24, P20, CC1/2c, ATCC® 19111 y CC1/2b crecen significativamente ($p < 0,05$) menos a 37 °C por 24 hs que a 20 °C por 48 hs, mientras que L100A1, L101B2, L200, L201 y ATCC® 13932 no varían en su crecimiento entre las dos condiciones (Figura 8). En esta comparación se involucran dos factores que influyen en el crecimiento, ya que por un lado tenemos la temperatura de crecimiento y por otro el tiempo de incubación, sin embargo, las diferencias encontradas para P24, P20, y para las cepas de referencia CC1/2c, ATCC® 19111 y CC1/2b podrían indicar que son cepas mejor adaptadas a ambientes fríos.

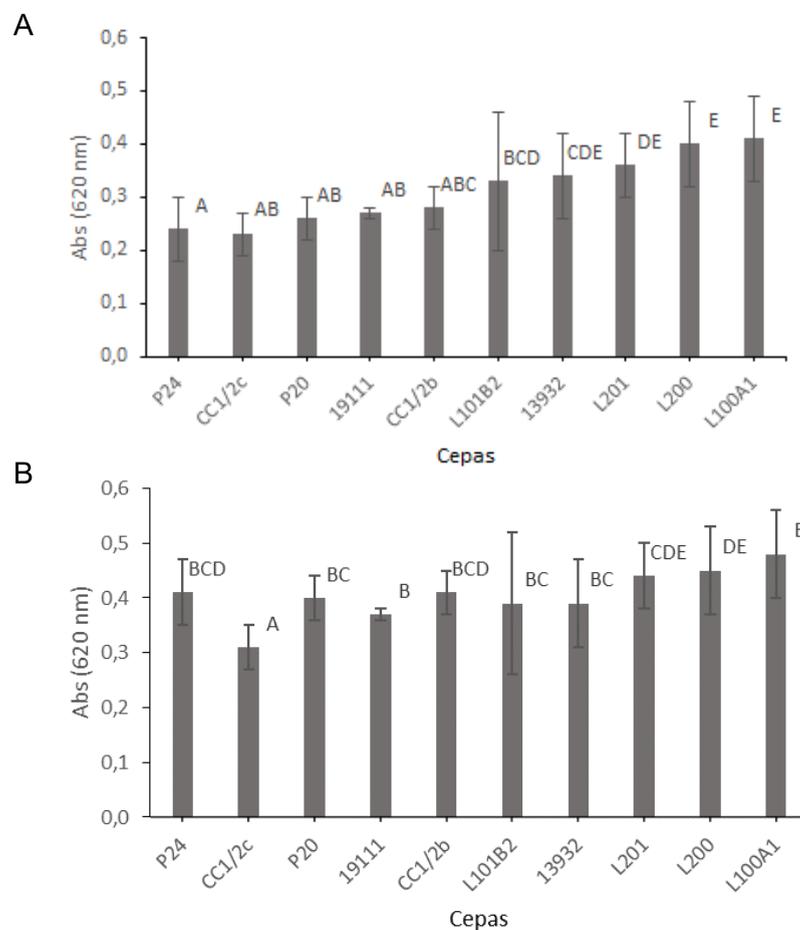


Figura 7. Gráfico de densidad óptica (abs a 620 nm) de las diferentes cepas tras incubación a 37 °C por 24 horas (A) y 20 °C por 48 horas (B). Se representa la media con su error estándar ($n = 3$). ^{ABCDE} Letras diferentes indican diferencia significativa ($p < 0,05$) entre cepas para una misma condición de crecimiento.

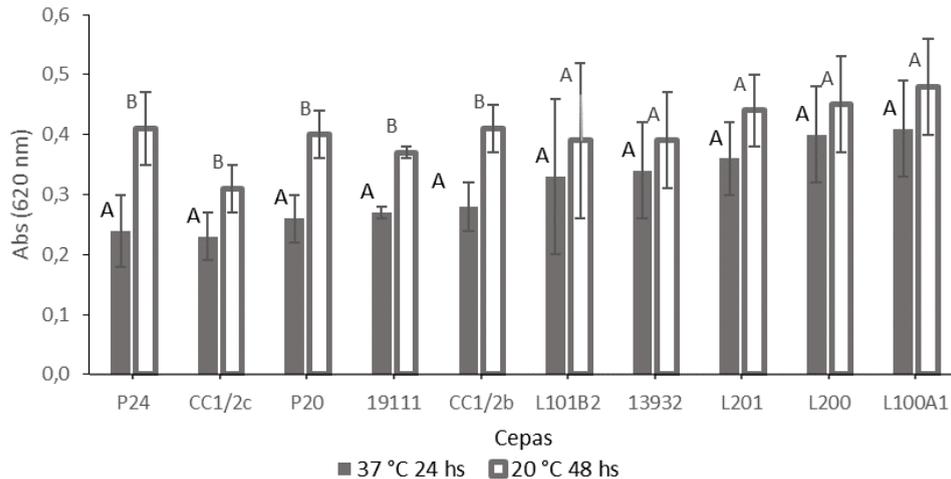


Figura 8. Gráfico de densidad óptica (abs a 620 nm) de las diferentes cepas tras incubación a 37 °C por 24 horas y 20 °C por 48 horas. Se representa la media con su error estándar (n = 3). ^{AB} Letras diferentes indican diferencia significativa (p < 0,05) entre condiciones de crecimiento para una misma cepa.

La capacidad de formar biofilm se determinó de acuerdo a los valores de corte calculados de acuerdo a lo descrito en la sección 2.3, indicando que las cepas con valores de absorbancia menores a 0,117 son no formadoras de biofilm; entre 0,117 y 0,234 son débiles formadoras; entre 0,234 y 0,468 son formadoras moderadas y mayor que 0,468 son formadoras fuertes.

Según la clasificación, cuando las cepas se incubaron a 37 °C por 24 hs se observa que L201, L100A1, P24, L200, ATCC® 13932 y CC1/2c no formaron biofilms, P20 y ATCC® 19111 fueron formadoras débiles y L101B2 y CC1/2b se clasificaron como formadoras moderadas de biofilm (Figura 9.A). Mientras que cuando las cepas se incubaron a 20 °C durante 48 hs L100A1, P24, ATCC® 13932, CC1/2c y ATCC® 19111 no formaron biofilms, los aislados L200, L201, P20 y L101/B2 se clasifican como formadoras débiles de biofilms, y CC1/2b como formadora moderada de biofilm (Figura 9.B).

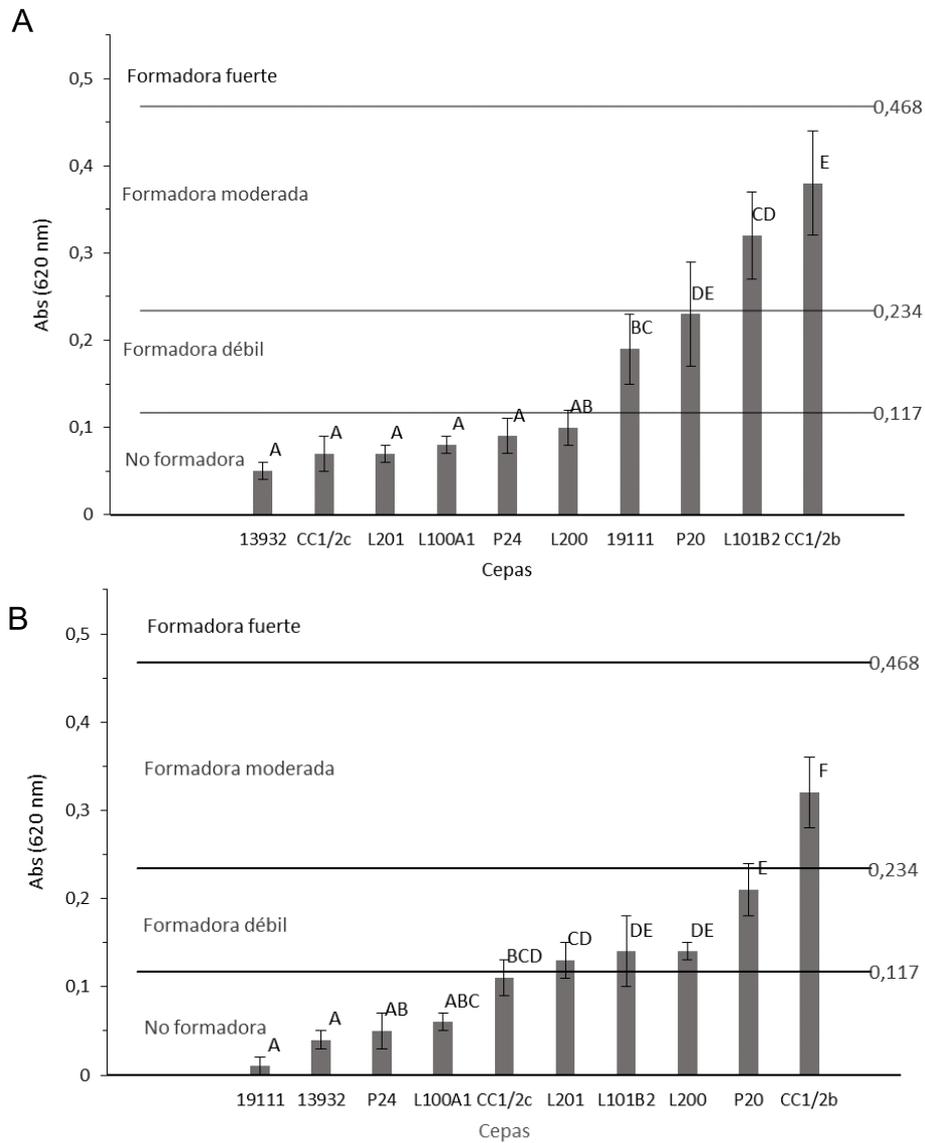


Figura 9. Gráfico de densidad óptica (abs a 620 nm) de la biomasa de biofilm formada tras incubación a 37 °C (A) por 24 horas y 20 °C por 48 horas (B). Líneas horizontales indican los valores de corte para los niveles de formación de biofilm. ^{ABCDEF} Letras diferentes indican diferencia significativa ($p < 0,05$) entre cepas para una misma condición de formación de biofilms.

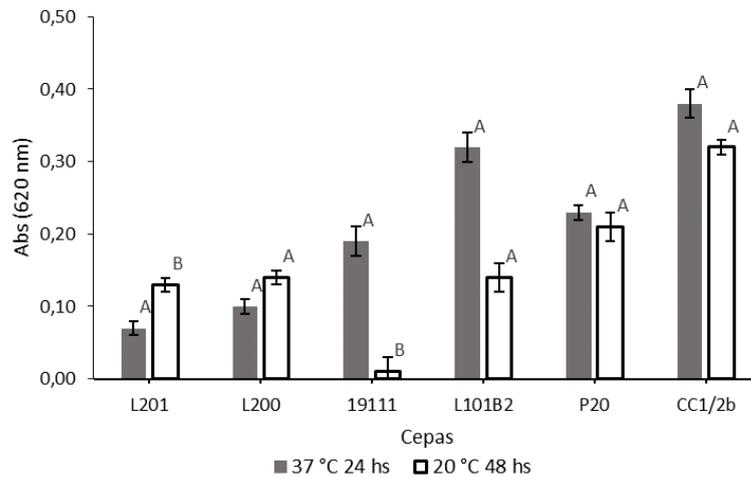


Figura 10. Comparación de biofilm para las cepas formadoras según temperatura de incubación. Se representa la media y el error estándar (n = 3). Letras diferentes indican diferencia significativa ($p < 0,05$) para una misma cepa entre condiciones de formación.

Al comparar cada cepa formadora de biofilm según la condición de crecimiento (figura 10) se observa una tendencia no significativa ($p > 0,05$) a formar menos biofilm a 20 °C durante 48 hs que a 37 °C durante 24 hs para las cepas L101B2, P20 y CC1/2B, y significativa ($p < 0,05$) para la cepa ATCC® 19111. Los aislados L201 y L200, ambos serotipos 4b presentan niveles de formación de biofilm bajos, y se observa una tendencia mayor a formar biofilms a 20 °C durante 48 hs siendo significativa ($p < 0,05$) sólo para L201.

Los factores que más influyen sobre la formación de biofilms de *Listeria monocytogenes* son la temperatura, el valor nutritivo del medio de cultivo y el serotipo (Kadam et al., 2013). Los resultados presentados en la bibliografía no siempre son concordantes, Poimenidou et al., (2016) mostró que todas las cepas estudiadas, de los serotipos 4b, 1/2a y 1/2c, formaban niveles más altos de biofilms luego de 72 hs de incubación en TSB a 20 °C que a 37 °C. Por el contrario, Barbosa et al., (2013), demostró que la producción de biofilms en superficies de poliestireno fue significativamente mayor a 37 °C que a 4 °C durante 24 horas. (Kadam et al., 2013), reporta que los serotipos 1/2b y 1/2a son siempre mejor formadores de biofilm que el serotipo 4b en medios nutritivos. Los resultados del presente trabajo, si bien refieren a pocos aislamientos, concuerdan parcialmente con lo reportado, sugiriendo que las cepas formadoras de biofilm forman más a 37

°C que a 20 °C, además que a 37 °C las cepas P20 (1/2B), L101B2 (1/2a) y CC1/2b, son formadoras débiles y moderadas mientras que la mayoría de las cepas del serotipo 4b son no formadoras. Las diferencias observadas con los distintos reportes pueden deberse en parte a las diferencias entre cepas que pueden ser más significativas que el factor serotipo (Kadam et al., 2013).

3.4 Evaluación de la resistencia de biofilms

En la figura 11 se observa la cantidad de biomasa de biofilm formada para las diferentes cepas formadoras de biofilms a 37 °C por 24 hs y 20 °C por 48 hs, cada una con su biomasa de biofilm remanente tras la aplicación de AL al 1 % durante 5 minutos. Se observan diferencias significativas ($p < 0,05$) para las cepas L200 (serotipo 4b) y CC1/2b únicamente a 20 °C por 48 hs, lo que indica cierta susceptibilidad de estas cepas al tratamiento con AL. El biofilm formado a 37 °C por 24 hs de las cepas L101B2, P20, CC1/2b y ATCC® 19111 presentan resistencia contra el tratamiento al igual que el formado por las cepas L101B2, L201 y P20 a 20 °C por 48 hs. Sin embargo, se observa una tendencia del AL a disminuir la biomasa de biofilm adherido a la superficie de poliestireno que no llega a ser significativa ($p > 0,05$).

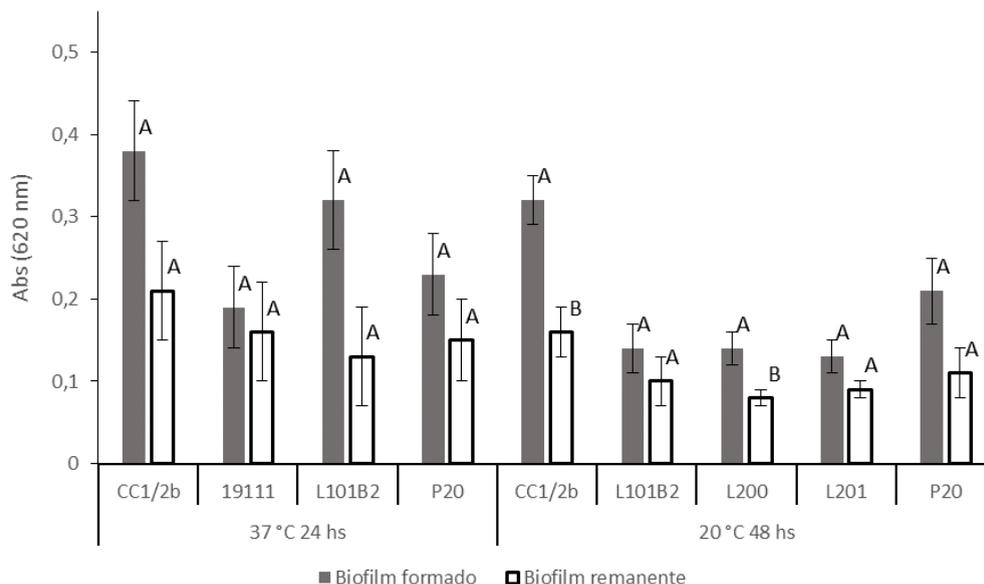


Figura 11 Gráfico de densidad óptica (abs a 620 nm) de la biomasa de biofilm formada y su remanente tras la aplicación de AL al 1 % durante 5 minutos. Se representa la media y el error estándar ($n = 3$). ^{AB} Letras diferentes indican diferencia significativa ($p < 0,05$) tras el tratamiento para una misma cepa en una misma condición.

Esta resistencia puede deberse a diversos factores, por un lado, los aislados de ambientes frigoríficos dado que ya han sido expuestos al AL podrían haber generado cierta resistencia a sucesivas exposiciones al AL (Koohmaraie et al., 2005; Yang et al., 2009). Por otro lado, la eficacia del AL puede verse disminuida debido al efecto protector de la matriz extracelular propia del biofilm que dificulta la difusión del AL hacia las células que lo componen. Adicionalmente, el estado fisiológico de las células que componen el biofilm es diferente al de las células planctónicas, lo que podría suponer un mecanismo de resistencia adicional de este tipo de biofilms hacia el AL, similar a la resistencia informada por (Pan et al., 2006) en biofilms de *L. monocytogenes* a desinfectantes a base de compuestos de amonio cuaternario y cloro (Purkrtová et al., 2010).

Por otro lado, la acción del AL depende no solo de la forma de aplicación del mismo, sino que también es cepa-dependiente. Por lo que las diferencias morfológicas y/o fisiológicas entre cepas generan variabilidad en la sensibilidad de la bacteria al desinfectante (Bucur et al., 2018). Si a esto se añaden los datos reportados por Kadam et al., (2013), en donde las diferencias en la capacidad de formación de biofilms se deben a diferencias entre cepas de *L. monocytogenes* y no solo a diferencias entre serotipos, podrían explicarse las diferencias observadas en la acción del AL como antimicrobiano en las cepas formadoras de biofilm estudiadas.

3.5 Resumen de resultados

Los resultados obtenidos tras la caracterización de las 10 cepas de *L. monocytogenes* involucradas en este estudio se presentan en la tabla 5.

Tabla 5. Resumen de los resultados obtenidos

Cepa	Serotipo	Linaje	Origen	PMSC ^a	Formadora de biofilms		Resistencia del biofilm al AL
					37 °C 24 hs	20 °C 48 hs	
L100A1	4b	I	Carne de vaca	No ¹	No	No	-
L101B2	1/2a	II	Carne de vaca	No	Moderada	Débil	Resistente
P20	1/2b	I	Carne de pollo	No	Débil	Débil	Resistente
P24	1/2a	II	Carne de pollo	No	No	No	-
L200	4b	I	Carne de cerdo	No	No	Débil	Sensible
L201	4b	I	Carne de cerdo	No ²	No	Débil	Resistente
CC1/2b	1/2b	I	-	No	Moderada	Moderada	Sensible a 20 °C
CC1/2c	1/2c	II	-	tipo 11	No	No	-
ATCC® 19111	1/2a	II	Aves de corral	No	Débil	No	Resistente
ATCC® 13932	4b	I	Fluido espinal de niño con meningitis	No	No	No	-

Se muestra serotipificación molecular y linaje asignado, origen del aislamiento, ^a presencia de codones de stop prematuros en el gen de la proteína internalina A, formación de biofilms a 37 °C por 24 hs y 20 °C por 48 hs y resistencia de los biofilm formados frente al tratamiento con AL al 1 % durante 5 minutos. ¹ no se encontraron en las regiones 1 y 2 del gen. ² no se encontraron en las regiones 2 y 3 del gen.

4. Conclusiones

Se logró caracterizar a nivel molecular el conjunto de seis aislamientos provenientes de muestras cárnicas de vaca, pollo y cerdo, extraídas de distintos establecimientos de Uruguay. Se confirma el género *Listeria* y la especie *monocytogenes* para todos los aislados y se identificaron sus serotipos, siendo los aislados de carne de vaca L100A1 y L101B2 serotipos 4b y 1/2a, respectivamente, los aislados de carne de pollo P20 y P24, serotipos 1/2b y 1/2a, respectivamente y los aislados de carne de cerdo L200 y L201, serotipos 4b ambos. Inicialmente estaba prevista la tipificación por PFGE (Electroforesis de campos pulsados) de los aislamientos que no se pudo realizar por fallas en el equipo, por lo tanto, queda pendiente la tipificación a nivel de cepa que podría ser realizada en un futuro ya sea por PFGE o por secuenciación de genoma completo.

A partir del análisis de la secuencia nucleotídica del gen *inlA*, se identificó la presencia de mutación de codón de terminación prematuro de tipo 11 en el gen de la internalina A únicamente en la cepa CC1/2c (Instituto de Higiene) generando una proteína trunca de 684 aminoácidos. Las cepas L101B2, L200, P20, CC1/2b, P24, ATCC® 13932 y ATCC® 19111 presentan la secuencia completa de la proteína InlA de 800 aa y no se hallaron mutaciones PMSC para las regiones analizadas de las cepas L100A1 y L201. La precisión de este análisis depende de la calidad de las secuencias de ADN obtenidas y de la tasa de error durante la secuenciación. En particular la secuenciación Sanger tiene una tasa de error de 0.001 % (Camargo et al., 2018) lo que sugiere que la mutación encontrada es real y no un artefacto metodológico. En cuanto a la calidad de las secuencias se obtuvieron algunos malos resultados y por eso hubo fragmentos que no se pudieron analizar. Estas secuencias de baja calidad posiblemente se debieron a que el ADN enviado a secuenciar fue insuficiente y/o de mala calidad provocadas por una purificación ineficiente de los productos de reacción de PCR (Crossley et al., 2020).

De acuerdo a lo presentado por Jacquet et al., (2004); Nightingale et al., (2008); Su et al., (2019) las cepas estudiadas que poseen el gen que codifica para la proteína InlA de largo completo posiblemente no tendrían su potencial patogénico disminuido, siendo capaces de causar infección. Esto debe evaluarse en ensayos

de invasión utilizando células como las Caco-2, línea celular similar a los enterocitos que se utiliza como modelo de barrera epitelial intestinal. Como perspectiva a futuro nos planteamos analizar los niveles de expresión del gen *inlA* mediante una rt-PCR cuantitativa de las diferentes cepas y evaluar la patogenicidad de las diferentes cepas de listeria monocytogenes, realizando el análisis de invasión de células Caco-2 (Pine et al., 1991).

Se evaluó la capacidad de formación de biofilms de las diferentes cepas y se encontró que las cepas P20, L101/B2 y CC1/2b de los serotipos 1/2a y 1/2b son formadoras débiles y moderadas de biofilm en ambas condiciones estudiadas con una tendencia no significativa ($p > 0,05$) a formar menores biofilms a 20 °C. Mientras que, la cepa ATCC® 19111 (serotipo 1/2a) solo es capaz de formar biofilms a 37 °C y los aislados L200 y L201 fueron las únicas del serotipo 4b capaces de formar biofilms y solamente a 20 °C. Aparte del efecto de la temperatura sobre la formación de biofilm se observan diferencias entre cepas sin embargo no se puede concluir debido al bajo número de cepas usadas en este estudio si esas diferencias se deben al serotipo o a diferencias entre cepas. Se observó sensibilidad al AL aplicado al 1 % durante 5 minutos únicamente sobre el biofilm formado a 20 °C por L200 (serotipo 4b) y CC1/2b, sin embargo, se observa una tendencia no significativa del tratamiento a disminuir la biomasa de biofilm adherido a la superficie de poliestireno. Se deberían ensayar concentraciones de AL mayores a 1 % y/o tiempos de exposición más prolongados.

Por otra parte, el método de estudio utilizado para el análisis de los biofilms presenta un error intrínseco grande que dificulta la reproducibilidad de los datos. Esto se debe a las características de la técnica, por un lado, implica numerosos pasos de manipulación que provocan diferencias entre las réplicas individuales de un mismo inóculo. Además, las condiciones estáticas de los medios en los pocillos de microtitulación, generan gradientes de oxígeno y nutrientes, por lo que dependiendo del microambiente en el pocillo individual se genera un desarrollo heterogéneo del biofilm que contribuye a la variabilidad del método. Adicionalmente, la utilización de cristal violeta como método de tinción agrega variación a los resultados, ya que el mismo se une a las células y los componentes de la matriz extracelular que conforman el biofilm, pero no discrimina entre células

viables adheridas al biofilm y células muertas que pudieran haber quedado atrapadas en la matriz tras la aplicación del antimicrobiano. Pequeñas diferencias en estos componentes se ven amplificadas por la unión del cristal violeta y contribuyen a la variabilidad de los resultados (Kragh et al., 2019).

En este trabajo fue necesario realizar por lo menos tres réplicas por cepa en cada placa de microtitulación, la cual también se realizó tres veces para cada condición de estudio. Aun así los errores asociados a las medidas son grandes y pueden impedir determinar diferencias significativas entre cepas y/o condiciones. Para mejorar estos resultados se plantea realizar un mayor número de réplicas y la utilización de técnicas alternativas en las que se realice el recuento de *L. monocytogenes* viables en biofilms (Kragh et al., 2019).

Adicionalmente, para encontrar una posible relación entre cepas y su capacidad de formar biofilms y resistir al ácido láctico se debería ampliar el rango de estudio adicionando un número mayor de ejemplares por serotipo y a su vez diseñando un tratamiento que genere mejores niveles de reducción ya sea aumentando el tiempo de contacto o la concentración del AL. En la misma línea, como perspectiva a futuro se plantea la evaluación de la capacidad de formación de biofilms en cupones. Estos son placas de poliestireno de alta densidad que se utilizan ampliamente en la industria para el transporte de las carnes por lo que están en contacto directo con el alimento crudo. Este experimento nos permitirá evaluar con mayor exactitud la capacidad formadora de biofilms de las diferentes cepas circulantes en el país (Yang et al., 2009).

En cuanto a la correlación entre la presencia de PMSC y la formación de biofilms los resultados obtenidos no son suficientes para concluir si la presencia de la proteína trunca puede influir en la producción de biofilms más resistentes como está reportado (Franciosa et al., 2009; Piercey et al., 2016). Contrariamente a lo reportado, en este estudio la única cepa CC1/2c portadora de PMSC no es formadora de biofilm en las condiciones ensayadas. Para mejorar el alcance del estudio y lograr inferir posibles relaciones entre la internalina y biofilms será necesario incluir un mayor número de aislados.

5. Bibliografía

- Alvarez, D. E., & Agaisse, H. (2016). The Metalloprotease Mpl Supports *Listeria monocytogenes* Dissemination through Resolution of Membrane Protrusions into Vacuoles. *Infection and Immunity*, *84*(6), 1806-1814.
<https://doi.org/10.1128/IAI.00130-16>
- Ban, G.-H., Park, S.-H., Kim, S.-O., Ryu, S., & Kang, D.-H. (2012). Synergistic effect of steam and lactic acid against *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella* Typhimurium, and *Listeria monocytogenes* biofilms on polyvinyl chloride and stainless steel. *International Journal of Food Microbiology*, *157*(2), 218-223.
<https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2012.05.006>
- Barbau-Piednoir, E., Botteldoorn, N., Yde, M., Mahillon, J., & Roosens, N. H. (2013). Development and validation of qualitative SYBR®Green real-time PCR for detection and discrimination of *Listeria* spp. And *Listeria monocytogenes*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *97*(9), 4021-4037.
<https://doi.org/10.1007/s00253-012-4477-2>
- Barbosa, J., Borges, S., Camilo, R., Magalhães, R., Ferreira, V., Santos, I., Silva, J., Almeida, G., & Teixeira, P. (2013). Biofilm Formation among Clinical and Food Isolates of *Listeria monocytogenes*. *International Journal of Microbiology*, *2013*, e524975. <https://doi.org/10.1155/2013/524975>
- Barbuddhe, S. B., & Chakraborty, T. (2009). *Listeria* as an Enteroinvasive Gastrointestinal Pathogen. En C. Sasakawa (Ed.), *Molecular Mechanisms of Bacterial Infection via the Gut* (Vol. 337, pp. 173-195). Springer Berlin Heidelberg.
https://doi.org/10.1007/978-3-642-01846-6_6
- Belinky, F., Rogozin, I. B., & Koonin, E. V. (2017). Selection on start codons in prokaryotes and potential compensatory nucleotide substitutions. *Scientific Reports*, *7*(1), 12422.
<https://doi.org/10.1038/s41598-017-12619-6>
- Bierne, H., & Cossart, P. (2007). *Listeria monocytogenes* Surface Proteins: From Genome Predictions to Function. *Microbiology and molecular biology reviews : MMBR*, *71*,

377-397. <https://doi.org/10.1128/MMBR.00039-06>

Bierne, H., Sabet, C., Personnic, N., & Cossart, P. (2007). Internalins: A complex family of leucine-rich repeat-containing proteins in *Listeria monocytogenes*. *Microbes and Infection*, 9(10), 1156-1166. <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2007.05.003>

Blackman, I. C., & Frank, J. F. (1996). Growth of *Listeria monocytogenes* as a Biofilm on Various Food-Processing Surfaces. *Journal of Food Protection*, 59(8), 827-831. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-59.8.827>

Bosilevac, J. M., Guerini, M. N., Brichta-Harhay, D. M., Arthur, T. M., & Koohmaraie, M. (2007). Microbiological Characterization of Imported and Domestic Boneless Beef Trim Used for Ground Beef†. *Journal of Food Protection*, 70(2), 440-449. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-70.2.440>

Braga, V., Vázquez, S., Vico, V., Pastorino, V., Mota, M. I., Legnani, M., Schelotto, F., Lancibidad, G., & Varela, G. (2017). Prevalence and serotype distribution of *Listeria monocytogenes* isolated from foods in Montevideo-Uruguay. *Brazilian Journal of Microbiology*, 48(4), 689-694. <https://doi.org/10.1016/j.bjm.2017.01.010>

Brauge, T., Sadovskaya, I., Faille, C., Benezech, T., Maes, E., Guerardel, Y., & Midelet-Bourdin, G. (2016). Teichoic acid is the major polysaccharide present in the *Listeria monocytogenes* biofilm matrix. *FEMS Microbiology Letters*, 363(2), fnv229. <https://doi.org/10.1093/femsle/fnv229>

Brugnini, G., Acquistapace, M. J., Rodríguez, S., & Rufo, C. (2018). Efecto de la aplicación de ácido láctico sobre *Listeria monocytogenes* en carne envasada al vacío en Uruguay. *INNOTEC*, 15, 7-14.

Brugnini, G., Rodríguez, S., Rodríguez, J., & Rufo, C. (2021). Effect of UV-C Irradiation and Lactic Acid Application on the Inactivation of *Listeria monocytogenes* and Lactic Acid Bacteria in Vacuum-Packaged Beef. *Foods (Basel, Switzerland)*, 10(6), 1217. <https://doi.org/10.3390/foods10061217>

Bucur, F. I., Grigore-Gurgu, L., Crauwels, P., Riedel, C. U., & Nicolau, A. I. (2018). Resistance of *Listeria monocytogenes* to Stress Conditions Encountered in Food

- and Food Processing Environments. *Frontiers in Microbiology*, 9, 2700.
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02700>
- Burall, L. S., Grim, C. J., & Datta, A. R. (2017). A clade of *Listeria monocytogenes* serotype 4b variant strains linked to recent listeriosis outbreaks associated with produce from a defined geographic region in the US. *PLoS ONE*, 12(5), e0176912.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0176912>
- Camargo, A. C., Todorov, S. D., Chihib, N. E., Drider, D., & Nero, L. A. (2018). Lactic Acid Bacteria (LAB) and Their Bacteriocins as Alternative Biotechnological Tools to Control *Listeria monocytogenes* Biofilms in Food Processing Facilities. *Molecular Biotechnology*, 60(9), 712-726. <https://doi.org/10.1007/s12033-018-0108-1>
- Chmielewski, R. a. n., & Frank, J. f. (2003). Biofilm Formation and Control in Food Processing Facilities. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 2(1), 22-32. <https://doi.org/10.1111/j.1541-4337.2003.tb00012.x>
- Cotter, P. D., Draper, L. A., Lawton, E. M., Daly, K. M., Groeger, D. S., Casey, P. G., Ross, R. P., & Hill, C. (2008). Listeriolysin S, a Novel Peptide Haemolysin Associated with a Subset of Lineage I *Listeria monocytogenes*. *PLoS Pathogens*, 4(9), e1000144.
<https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000144>
- Crossley, B. M., Bai, J., Glaser, A., Maes, R., Porter, E., Killian, M. L., Clement, T., & Toohey-Kurth, K. (2020). Guidelines for Sanger sequencing and molecular assay monitoring. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation: Official Publication of the American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians, Inc*, 32(6), 767-775.
<https://doi.org/10.1177/1040638720905833>
- de Noordhout, C. M., Devleeschauwer, B., Angulo, F. J., Verbeke, G., Haagsma, J., Kirk, M., Havelaar, A., & Speybroeck, N. (2014). The global burden of listeriosis: A systematic review and meta-analysis. *The Lancet Infectious Diseases*, 14(11), 1073-1082. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(14\)70870-9](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(14)70870-9)
- Di Ciccio, P., Rubiola, S., Panebianco, F., Lomonaco, S., Allard, M., Bianchi, D. M., Civera, T., & Chiesa, F. (2022). Biofilm formation and genomic features of *Listeria*

- monocytogenes* strains isolated from meat and dairy industries located in Piedmont (Italy). *International Journal of Food Microbiology*, 378, 109784.
<https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2022.109784>
- División Epidemiología, Dirección General de la Salud, Ministerio de Salud. (2017). *Boletín epidemiológico Mayo 2017* (N° 1).
<https://www.gub.uy/ministerio-salud-publica/comunicacion/publicaciones/boletin-epidemiologico-mayo-2017>
- Donlan, R. M. (2002). Biofilms: Microbial life on surfaces. *Emerging Infectious Diseases*, 8(9), 881-890. <https://doi.org/10.3201/eid0809.020063>
- Doumith, M., Buchrieser, C., Glaser, P., Jacquet, C., & Martin, P. (2004). Differentiation of the major *Listeria monocytogenes* serovars by multiplex PCR. *Journal of Clinical Microbiology*, 42(8), 3819-3822. <https://doi.org/10.1128/JCM.42.8.3819-3822.2004>
- Doyle, M. E., Mazzotta, A. S., Wang, T., Wiseman, D. W., & Scott, V. N. (2001). Heat Resistance of *Listeria monocytogenes*. *Journal of Food Protection*, 64(3), 410-429. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-64.3.410>
- Dramsi, S., Dehoux, P., Lebrun, M., Goossens, P. L., & Cossart, P. (1997). Identification of four new members of the internalin multigene family of *Listeria monocytogenes* EGD. *Infection and Immunity*, 65(5), 1615-1625. <https://doi.org/10.1128/iai.65.5.1615-1625.1997>
- Drevets, D. A., & Bronze, M. S. (2008). *Listeria monocytogenes*: Epidemiology, human disease, and mechanisms of brain invasion. *FEMS Immunology & Medical Microbiology*, 53(2), 151-165. <https://doi.org/10.1111/j.1574-695X.2008.00404.x>
- Ebe, Y., Hasegawa, G., Takatsuka, H., Umezu, H., Mitsuyama, M., Arakawa, M., Mukaida, N., & Naito, M. (1999). The role of Kupffer cells and regulation of neutrophil migration into the liver by macrophage inflammatory protein-2 in primary listeriosis in mice. *Pathology International*, 49(6), 519-532. <https://doi.org/10.1046/j.1440-1827.1999.00910.x>
- Edelson, B. T., & Unanue, E. R. (2000). Immunity to *Listeria* infection. *Current Opinion in*

- Immunology*, 12(4), 425-431. [https://doi.org/10.1016/S0952-7915\(00\)00112-6](https://doi.org/10.1016/S0952-7915(00)00112-6)
- Engelbrecht, F., Chun, S. K., Ochs, C., Hess, J., Lottspeich, F., Goebel, W., & Sokolovic, Z. (1996). A new PrfA-regulated gene of *Listeria monocytogenes* encoding a small, secreted protein which belongs to the family of internalins. *Molecular Microbiology*, 21(4), 823-837. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.1996.541414.x>
- Farber, J. M., & Peterkin, P. I. (1991). *Listeria monocytogenes*, a food-borne pathogen. *Microbiological Reviews*, 55(3), 476-511.
- Fischetti, V. a, Pancholi, V., & Schneewind, O. (1990). Conservation of a hexapeptide sequence in the anchor region of surface proteins from Gram-positive cocci. *Molecular Microbiology*, 4(9), 1603-1605. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.1990.tb02072.x>
- Flemming, H.-C., Wingender, J., Szewzyk, U., Steinberg, P., Rice, S. A., & Kjelleberg, S. (2016). Biofilms: An emergent form of bacterial life. *Nature Reviews. Microbiology*, 14(9), 563-575. <https://doi.org/10.1038/nrmicro.2016.94>
- Franciosa, G., Maugliani, A., Scalfaro, C., Floridi, F., & Aureli, P. (2009). Expression of Internalin a and Biofilm Formation among *Listeria Monocytogenes* Clinical Isolates. *International Journal of Immunopathology and Pharmacology*, 22(1), 183-193. <https://doi.org/10.1177/039463200902200121>
- Freiberg, A., Machner, M. P., Pfeil, W., Schubert, W.-D., Heinz, D. W., & Seckler, R. (2004). Folding and Stability of the Leucine-rich Repeat Domain of Internalin B from *Listeria monocytogenes*. *Journal of Molecular Biology*, 337(2), 453-461. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2004.01.044>
- Gelbíčová, T., Koláčková, I., Pantůček, R., & Karpíšková, R. (2015). A novel mutation leading to a premature stop codon in *inlA* of *Listeria monocytogenes* isolated from neonatal listeriosis. *The New Microbiologica*, 38(2), 293-296.
- Giaouris, E., Heir, E., Hébraud, M., Chorianopoulos, N., Langsrud, S., Møretrø, T., Habimana, O., Desvaux, M., Renier, S., & Nychas, G.-J. (2014). Attachment and biofilm formation by foodborne bacteria in meat processing environments: Causes,

- implications, role of bacterial interactions and control by alternative novel methods. *Meat Science*, 97(3), 298-309. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2013.05.023>
- Gilot, P., André, P., & Content, J. (1999). *Listeria monocytogenes* Possesses Adhesins for Fibronectin. *Infection and Immunity*, 67(12), 6698-6701.
- Glaser, P., Frangeul, L., Buchrieser, C., Rusniok, C., Amend, A., Baquero, F., Berche, P., Bloecker, H., Brandt, P., Chakraborty, T., Charbit, A., Chetouani, F., Couvé, E., De Daruvar, A., Dehoux, P., Domann, E., Domínguez-Bernal, G., Duchaud, E., Durant, L., ... Cossart, P. (2001). Comparative Genomics of *Listeria* Species. *Science*, 294(5543), 849-852. <https://doi.org/10.1126/science.1063447>
- Hacker, J., Blum-Oehler, G., Mühldorfer, I., & Tschäpe, H. (1997). Pathogenicity islands of virulent bacteria: Structure, function and impact on microbial evolution. *Molecular Microbiology*, 23(6), 1089-1097. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.1997.3101672.x>
- Hall-Stoodley, L., Costerton, J. W., & Stoodley, P. (2004). Bacterial biofilms: From the Natural environment to infectious diseases. *Nature Reviews Microbiology*, 2(2), Article 2. <https://doi.org/10.1038/nrmicro821>
- Hamon, M., Bierne, H., & Cossart, P. (2006). *Listeria monocytogenes*: A multifaceted model. *Nature Reviews Microbiology*, 4(6), 423-434. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1413>
- Handa-Miya, S., Kimura, B., Takahashi, H., Sato, M., Ishikawa, T., Igarashi, K., & Fujii, T. (2007). Nonsense-mutated *inlA* and *prfA* not widely distributed in *Listeria monocytogenes* isolates from ready-to-eat seafood products in Japan. *International Journal of Food Microbiology*, 117(3), 312-318. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2007.05.003>
- Harmsen, M., Yang, L., Pamp, S. J., & Tolker-Nielsen, T. (2010). An update on *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation, tolerance, and dispersal. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, 59(3), 253-268. <https://doi.org/10.1111/j.1574-695X.2010.00690.x>

- Havelaar, A. H., Kirk, M. D., Torgerson, P. R., Gibb, H. J., Hald, T., Lake, R. J., Praet, N., Bellinger, D. C., de Silva, N. R., Gargouri, N., Speybroeck, N., Cawthorne, A., Mathers, C., Stein, C., Angulo, F. J., & Devleeschauwer, B. (2015). World Health Organization Global Estimates and Regional Comparisons of the Burden of Foodborne Disease in 2010. *PLoS Medicine*, *12*(12), e1001923.
<https://doi.org/10.1371/journal.pmed.1001923>
- Hingston, P., Chen, J., Dhillon, B. K., Laing, C., Bertelli, C., Gannon, V., Tasara, T., Allen, K., Brinkman, F. S. L., Truelstrup Hansen, L., & Wang, S. (2017). Genotypes Associated with *Listeria monocytogenes* Isolates Displaying Impaired or Enhanced Tolerances to Cold, Salt, Acid, or Desiccation Stress. *Frontiers in Microbiology*, *8*, 369. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00369>
- ICMSF. (1996). *Microorganisms in Foods 5-Microbiological specifications of food pathogens*. Blackie Academic & Professional.
<https://www.sciepub.com/reference/65967>
- Jacquet, C., Doumith, M., Gordon, J. I., Martin, P. M. V., Cossart, P., & Lecuit, M. (2004). A Molecular Marker for Evaluating the Pathogenic Potential of Foodborne *Listeria monocytogenes*. *The Journal of Infectious Diseases*, *189*(11), 2094-2100.
<https://doi.org/10.1086/420853>
- Jacquet, C., Gouin, E., Jeannel, D., Cossart, P., & Rocourt, J. (2002). Expression of ActA, Ami, InlB, and Listeriolysin O in *Listeria monocytogenes* of Human and Food Origin. *Applied and Environmental Microbiology*, *68*(2), 616-622.
<https://doi.org/10.1128/AEM.68.2.616-622.2002>
- Kadam, S. R., Den Besten, H. M. W., Van Der Veen, S., Zwietering, M. H., Moezelaar, R., & Abee, T. (2013). Diversity assessment of *Listeria monocytogenes* biofilm formation: Impact of growth condition, serotype and strain origin. *International Journal of Food Microbiology*, *165*(3), 259-264. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2013.05.025>
- Kolter, R., & E. P. Greenberg. (2006). Microbial sciences: The superficial life of microbes. *Nature*, *441*, 300-302.

- Koohmaraie, M., Arthur, T. M., Guerini, M. N., Shackelford, S., & Wheeler, T. (2005). Post-harvest interventions to reduce/eliminate pathogens in beef. *Meat Science*, *71*, 79-91.
- Kragh, K. N., Alhede, M., Kvich, L., & Bjarnsholt, T. (2019). Into the well—A close look at the complex structures of a microtiter biofilm and the crystal violet assay. *Biofilm*, *1*, 100006. <https://doi.org/10.1016/j.biofilm.2019.100006>
- Lasa, I. (2006). Towards the identification of the common features of bacterial biofilm development. *INTERNATIONAL MICROBIOLOGY*, *9*, 21-28.
- Lebrun, M., Audurier, A., & Cossart, P. (1994). Plasmid-borne cadmium resistance genes in *Listeria monocytogenes* are similar to *cadA* and *cadC* of *Staphylococcus aureus* and are induced by cadmium. *Journal of Bacteriology*, *176*(10), 3040-3048. <https://doi.org/10.1128/jb.176.10.3040-3048.1994>
- Lecuit, M. (2007). Human listeriosis and animal models. *Microbes and Infection*, *9*(10), 1216-1225. <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2007.05.009>
- Lecuit, M., Dramsi, S., Gottardi, C., Fedor-Chaiken, M., Gumbiner, B., & Cossart, P. (1999). A single amino acid in E-cadherin responsible for host specificity towards the human pathogen *Listeria monocytogenes*. *The EMBO Journal*, *18*(14), 3956-3963. <https://doi.org/10.1093/emboj/18.14.3956>
- Machner, M. P., Frese, S., Schubert, W.-D., Orian-Rousseau, V., Gherardi, E., Wehland, J., Niemann, H. H., & Heinz, D. W. (2003). Aromatic amino acids at the surface of InlB are essential for host cell invasion by *Listeria monocytogenes*. *Molecular Microbiology*, *48*(6), 1525-1536. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2003.03532.x>
- Magagna, G., Finazzi, G., & Filipello, V. (2022). Newly Designed Primers for the Sequencing of the *inlA* Gene of Lineage I and II *Listeria monocytogenes* Isolates. *International Journal of Molecular Sciences*, *23*(22), 14106. <https://doi.org/10.3390/ijms232214106>
- Marino, M., Braun, L., Cossart, P., & Ghosh, P. (2000). A framework for interpreting the leucine-rich repeats of the *Listeria internalins*. *Proceedings of the National Academy*

- of Sciences*, 97(16), 8784-8788. <https://doi.org/10.1073/pnas.97.16.8784>
- Maury, M. M., Tsai, Y.-H., Charlier, C., Touchon, M., Chenal-Francisque, V., Leclercq, A., Criscuolo, A., Gaultier, C., Roussel, S., Brisabois, A., Disson, O., Rocha, E. P. C., Brisse, S., & Lecuit, M. (2016). Uncovering *Listeria monocytogenes* hypervirulence by harnessing its biodiversity. *Nature Genetics*, 48(3), 308-313.
<https://doi.org/10.1038/ng.3501>
- Mengaud, J., Ohayon, H., Gounon, P., Mège, R.-M., & Cossart, P. (1996). E-Cadherin Is the Receptor for Internalin, a Surface Protein Required for Entry of *L. monocytogenes* into Epithelial Cells. *Cell*, 84(6), 923-932.
[https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)81070-3](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)81070-3)
- Nightingale, K. K., Ivy, R. A., Ho, A. J., Fortes, E. D., Njaa, B. L., Peters, R. M., & Wiedmann, M. (2008). inlA Premature Stop Codons Are Common among *Listeria monocytogenes* Isolates from Foods and Yield Virulence-Attenuated Strains That Confer Protection against Fully Virulent Strains. *Applied and Environmental Microbiology*, 74(21), 6570-6583. <https://doi.org/10.1128/AEM.00997-08>
- Nychas, G.-J. E., Skandamis, P. N., Tassou, C. C., & Koutsoumanis, K. P. (2008). Meat spoilage during distribution. *Meat Science*, 78(1-2), 77-89.
<https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2007.06.020>
- Olier, M., Pierre, F., Lemaître, J.-P., Divies, C., Rousset, A., & Guzzo, J. (2002). Assessment of the pathogenic potential of two *Listeria monocytogenes* human faecal carriage isolates The GenBank accession number for the sequence reported in this paper is AF468816. *Microbiology*, 148(6), 1855-1862.
<https://doi.org/10.1099/00221287-148-6-1855>
- Orsi, R. H., den Bakker, H. C., & Wiedmann, M. (2011). *Listeria monocytogenes* lineages: Genomics, evolution, ecology, and phenotypic characteristics. *International Journal of Medical Microbiology: IJMM*, 301(2), 79-96.
<https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2010.05.002>
- Orsi, R. H., & Wiedmann, M. (2016). Characteristics and distribution of *Listeria* spp.,

- including *Listeria* species newly described since 2009. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 100(12), 5273-5287. <https://doi.org/10.1007/s00253-016-7552-2>
- Pan, Y., Breidt, F., & Kathariou, S. (2006). Resistance of *Listeria monocytogenes* biofilms to sanitizing agents in a simulated food processing environment. *Applied and Environmental Microbiology*, 72(12), 7711-7717. <https://doi.org/10.1128/AEM.01065-06>
- Pasquali, F., Palma, F., Guillier, L., Lucchi, A., De Cesare, A., & Manfreda, G. (2018). *Listeria monocytogenes* Sequence Types 121 and 14 Repeatedly Isolated Within One Year of Sampling in a Rabbit Meat Processing Plant: Persistence and Ecophysiology. *Frontiers in Microbiology*, 9. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2018.00596>
- Piercey, M. J., Hingston, P. A., & Truelstrup Hansen, L. (2016). Genes involved in *Listeria monocytogenes* biofilm formation at a simulated food processing plant temperature of 15 °C. *International Journal of Food Microbiology*, 223, 63-74. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2016.02.009>
- Pine, L., Kathariou, S., Quinn, F., George, V., Wenger, J. D., & Weaver, R. E. (1991). Cytopathogenic effects in enterocytelike Caco-2 cells differentiate virulent from avirulent *Listeria* strains. *Journal of Clinical Microbiology*, 29(5), 990-996. <https://doi.org/10.1128/jcm.29.5.990-996.1991>
- Pizarro-Cerdá, J., & Cossart, P. (2018). *Listeria monocytogenes*: Cell biology of invasion and intracellular growth. *Microbiology Spectrum*, 6(6), 10.1128/microbiolspec.gpp3-0013-2018. <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.gpp3-0013-2018>
- Poimenidou, S. V., Chrysadaku, M., Tzakoniati, A., Bikouli, V. C., Nychas, G.-J., & Skandamis, P. N. (2016). Variability of *Listeria monocytogenes* strains in biofilm formation on stainless steel and polystyrene materials and resistance to peracetic acid and quaternary ammonium compounds. *International Journal of Food Microbiology*, 237, 164-171. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2016.08.029>

- Poussin, M. A., & Goldfine, H. (2005). Involvement of *Listeria monocytogenes* Phosphatidylinositol-Specific Phospholipase C and Host Protein Kinase C in Permeabilization of the Macrophage Phagosome. *Infection and Immunity*, 73(7), 4410-4413. <https://doi.org/10.1128/iai.73.7.4410-4413.2005>
- Poyart-Salmeron, C., Carlier, C., Trieu-Cuot, P., Courtieu, A. L., & Courvalin, P. (1990). Transferable plasmid-mediated antibiotic resistance in *Listeria monocytogenes*. *Lancet (London, England)*, 335(8703), 1422-1426. [https://doi.org/10.1016/0140-6736\(90\)91447-i](https://doi.org/10.1016/0140-6736(90)91447-i)
- Purkrtová, S., Turoňová, H., Pilchová, T., Demnerová, K., & Pazlarová, J. (2010). Resistance of *Listeria monocytogenes* biofilms to disinfectants 326. *Czech Journal of Food Sciences*, 28(4), 326-332. <https://doi.org/10.17221/153/2010-CJFS>
- Rajkovic, A., Tomic, N., Smigic, N., Uyttendaele, M., Ragaert, P., & Devlieghere, F. (2010). Survival of *Campylobacter jejuni* on raw chicken legs packed in high-oxygen or high-carbon dioxide atmosphere after the decontamination with lactic acid/sodium lactate buffer. *International Journal of Food Microbiology*, 140(2-3), 201-206. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2010.03.034>
- Renier, S., Hébraud, M., & Desvaux, M. (2011). Molecular biology of surface colonization by *Listeria monocytogenes*: An additional facet of an opportunistic Gram-positive foodborne pathogen. *Environmental Microbiology*, 13(4), 835-850. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2010.02378.x>
- Rodriguez, S., & Brugnini, G. (2019). "Aislamiento de *Listeria monocytogenes* y *Salmonella enterica* subsp. *Enterica* en pechugas de pollo". *Revista de carnes y alimentos*, 69, 16-21.
- Sauer, K., Stoodley, P., Goeres, D. M., Hall-Stoodley, L., Burmølle, M., Stewart, P. S., & Bjarnsholt, T. (2022). The biofilm life cycle: Expanding the conceptual model of biofilm formation. *Nature Reviews Microbiology*, 20(10), Article 10. <https://doi.org/10.1038/s41579-022-00767-0>
- Schmid, M. W., Ng, E. Y. W., Lampidis, R., Emmerth, M., Walcher, M., Kreft, J., Goebel, W.,

- Wagner, M., & Schleifer, K.-H. (2005). Evolutionary history of the genus *Listeria* and its virulence genes. *Systematic and Applied Microbiology*, 28(1), 1-18.
<https://doi.org/10.1016/j.syapm.2004.09.005>
- Shen, Y., Naujokas, M., Park, M., & Ireton, K. (2000). InlB-Dependent Internalization of *Listeria* Is Mediated by the Met Receptor Tyrosine Kinase. *Cell*, 103(3), 501-510.
[https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)00141-0](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)00141-0)
- Srey, S., Jahid, I. K., & Ha, S.-D. (2013). Biofilm formation in food industries: A food safety concern. *Food Control*, 31(2), 572-585.
<https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2012.12.001>
- Stepanović, S., Vuković, D., Hola, V., Bonaventura, G. D., Djukić, S., Ćirković, I., & Ruzicka, F. (2007). Quantification of biofilm in microtiter plates: Overview of testing conditions and practical recommendations for assessment of biofilm production by staphylococci. *APMIS*, 115(8), 891-899.
https://doi.org/10.1111/j.1600-0463.2007.apm_630.x
- Su, X., Cao, G., Zhang, J., Pan, H., Zhang, D., Kuang, D., Yang, X., Xu, X., Shi, X., & Meng, J. (2019). Characterization of internalin genes in *Listeria monocytogenes* from food and humans, and their association with the invasion of Caco-2 cells. *Gut Pathogens*, 11(1), 30. <https://doi.org/10.1186/s13099-019-0307-8>
- Unión Europea. Reglamento (UE) No 101/2013, § L 34/1 (2013).
- Vázquez-Boland, J. A., Kuhn, M., Berche, P., Chakraborty, T., Domínguez-Bernal, G., Goebel, W., González-Zorn, B., Wehland, J., & Kreft, J. (2001). *Listeria* Pathogenesis and Molecular Virulence Determinants. *Clinical Microbiology Reviews*, 14(3), 584-640. <https://doi.org/10.1128/cmr.14.3.584-640.2001>
- Vera, A., González, G., Domínguez, M., & Bello, H. (2013). Principales factores de virulencia de *Listeria monocytogenes* y su regulación. *Revista chilena de infectología*, 30(4), 407-416. <https://doi.org/10.4067/S0716-10182013000400010>
- Vos, P., Garrity, G., Jones, D., Krieg, N. R., Ludwig, W., Rainey, F. A., Schleifer, K.-H., & Whitman, W. B. (2011). *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology: Volume 3: The*

Firmicutes. Springer Science & Business Media.

Wang, C., Chang, T., Yang, H., & Cui, M. (2014). Surface physiological changes induced by lactic acid on pathogens in consideration of pKa and pH. *Food Control*, 46, 525-531.
<https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2014.06.024>

Ward, T. J., Ducey, T. F., Usgaard, T., Dunn, K. A., & Bielawski, J. P. (2008). Multilocus Genotyping Assays for Single Nucleotide Polymorphism-Based Subtyping of *Listeria monocytogenes* Isolates. *Applied and Environmental Microbiology*, 74(24), 7629-7642. <https://doi.org/10.1128/AEM.01127-08>

Yang, H., Kendall, P. A., Medeiros, L. C., & Sofos, J. N. (2009). Efficacy of sanitizing agents against *Listeria monocytogenes* biofilms on high-density polyethylene cutting board surfaces. *Journal of Food Protection*, 72(5), 990-998.
<https://doi.org/10.4315/0362-028x-72.5.990>

6. Lista de abreviaturas

ETAs - enfermedades transmitidas por alimentos

OMS - Organización Mundial de la Salud

ARN - Ácido ribonucleico

spp - especies

inI - internalina

LLO - Listeriolisina O

PLC - fosfolipasas C

PC-PLC - fosfatidilcolina-PLC

PI-PLC - fosfatidilinositol-PLC

DAG - diacilglicerol

LIPI - Islas de patogenicidad de *listeria*

LRR - repetición rica en leucina

aa - aminoácidos

IR - inter-repeat

ADN - Ácido desoxirribonucleico

PMSCs - Codones de STOP prematuros

pb - pares de bases

EPS - sustancias poliméricas extracelulares

RTE - alimentos listos para el consumo

ATP - adenosín trifosfato

PM - peso molecular

AL - ácido láctico

BHI - Brain Heart Infusión

TSB-YE - caldo triptico de soya, suplementado con extracto de levadura al 0,6 %

PCR - reacción en cadena de la polimerasa

rt-PCR - reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real

ATCC - American Type Culture Collection

C_t - ciclo umbral

T_m - temperatura de disociación

dNTPs - desoxirribonucleótidos trifosfato

CES - secuenciación de electroforesis capilar

ORFs - marco abierto de lectura

DO - densidad óptica

A260/280 - absorbancia a 260 nm sobre 280 nm

7. Anexo

Anexo 1. Secuencias del gen *inIA* obtenidas para las diferentes cepas

	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100	110	120	130	140
L101B2	GTGAGAAAAACGATATG	TGGTTGAAAAGTATACT	AGTAGCAATATAGTAT	TTTGGCAGTGGAGTAT	GGATTAAACCGAGTAA	CGGGACAAATGCTCAG	GAGCTACAAATTACCA	AGATACTCCTATTAA	TTCAGATTTTTA					
L100A1	GTGAGAAAAACGATATG	TGGTTGAAAAGTATACT	AGTAGCAATATAGTAT	TTTGGCAGTGGAGTAT	GGATTAAACCGAGTAA	CGGGACAAATGCTCAG	GAGCTACAAATTACCA	AGATACTCCTATTAA	TTCAGATTTTTA					
L201	gtgagaaaaaacgataat	ggtgaaaagtatactag	tagcaatattagat	tttggcagtgagat	gattaaacagagtaac	gggacaatgctcagg	cgctacaattacaaga	taactcttaatacag	attttta					
L200	GTGAGAAAAACGATATG	TGGTTGAAAAGTATACT	AGTAGCAATATAGTAT	TTTGGCAGTGGAGTAT	GGATTAAACCGAGTAA	CGGGACAAATGCTCAG	GAGCTACAAATTACCA	AGATACTCCTATTAA	TTCAGATTTTTA					
CC1/2c	GTGAGAAAAACGATATG	TGGTTGAAAAGTATACT	AGTAGCAATATAGTAT	TTTGGCAGTGGAGTAT	GGATTAAACCGAGTAA	CGGGACAAATGCTCAG	GAGCTACAAATTACCA	AGATACTCCTATTAA	TTCAGATTTTTA					
P20	GTGAGAAAAACGATATG	TGGTTGAAAAGTATACT	AGTAGCAATATAGTAT	TTTGGCAGTGGAGTAT	GGATTAAACCGAGTAA	CGGGACAAATGCTCAG	GAGCTACAAATTACCA	AGATACTCCTATTAA	TTCAGATTTTTA					
CC1/2b	gtgagaaaaaacgataat	ggtgaaaagtatactag	tagcaatattagat	tttggcagtgagat	gattaaacagagtaac	gggacaatgctcagg	cgctacaattacaaga	taactcttaatacag	attttta					
P24	GTGAGAAAAACGATATG	TGGTTGAAAAGTATACT	AGTAGCAATATAGTAT	TTTGGCAGTGGAGTAT	GGATTAAACCGAGTAA	CGGGACAAATGCTCAG	GAGCTACAAATTACCA	AGATACTCCTATTAA	TTCAGATTTTTA					
13932	GTGAGAAAAACGATATG	TGGTTGAAAAGTATACT	AGTAGCAATATAGTAT	TTTGGCAGTGGAGTAT	GGATTAAACCGAGTAA	CGGGACAAATGCTCAG	GAGCTACAAATTACCA	AGATACTCCTATTAA	TTCAGATTTTTA					
19111	GTGAGAAAAACGATATG	TGGTTGAAAAGTATACT	AGTAGCAATATAGTAT	TTTGGCAGTGGAGTAT	GGATTAAACCGAGTAA	CGGGACAAATGCTCAG	GAGCTACAAATTACCA	AGATACTCCTATTAA	TTCAGATTTTTA					
MG922918	GTGAGAAAAACGATATG	TGGTTGAAAAGTATACT	AGTAGCAATATAGTAT	TTTGGCAGTGGAGTAT	GGATTAAACCGAGTAA	CGGGACAAATGCTCAG	GAGCTACAAATTACCA	AGATACTCCTATTAA	TTCAGATTTTTA					

	150	160	170	180	190	200	210	220	230	240	250	260	270	280	290
L101B2	CAGACGCAGCTC	TAGCGGAAAAATGA	AGACGGTCTTAGG	AAAAACGAATGTAA	CAGACACGGTCT	CGCAACGATTTAG	ACCAGTTACACCG	CTCAGGCAGATAG	ATTAGGATAAAA	CTATCGATGGAT	TGGAACTTGG	AATCTTGG	AATCTTGG	AATCTTGG	AATCTTGG
L100A1	CAGATACAGCTC	TAGCGGAAAAATGA	AGACGGTCTTAGG	AAAAACGAATGTAA	CAGACACGGTCT	CGCAACGATTTAG	ACCAGTTACACCG	CTCAGGCAGATAG	ATTAGGATAAAA	CTATCGATGGAT	TGGAACTTGG	AATCTTGG	AATCTTGG	AATCTTGG	AATCTTGG
L201	cagatacagctctagc	ggaaaaaatgaagac	ggcttaggaaaaacga	atgtaacagacacgg	ctcgcacaacgat	ttagaccagttacac	cgcttcagggcagat	agattagggaataa	aatctatcgatgg	attggaatactt	g	g	g	g	g
L200	CAGATACAGCTC	TAGCGGAAAAATGA	AGACGGTCTTAGG	AAAAACGAATGTAA	CAGACACGGTCT	CGCAACGATTTAG	ACCAGTTACACCG	CTCAGGCAGATAG	ATTAGGATAAAA	CTATCGATGGAT	TGGAACTTGG	AATCTTGG	AATCTTGG	AATCTTGG	AATCTTGG
CC1/2c	CAGATACAGCTC	TAGCGGAAAAATGA	AGACGGTCTTAGG	AAAAACGAATGTAA	CAGACACGGTCT	CGCAACGATTTAG	ACCAGTTACACCG	CTCAGGCAGATAG	ATTAGGATAAAA	CTATCGATGGAT	TGGAACTTGG	AATCTTGG	AATCTTGG	AATCTTGG	AATCTTGG
P20	CAGATACAGCTC	TAGCGGAAAAATGA	AGACGGTCTTAGG	AAAAACGAATGTAA	CAGACACGGTCT	CGCAACGATTTAG	ACCAGTTACACCG	CTCAGGCAGATAG	ATTAGGATAAAA	CTATCGATGGAT	TGGAACTTGG	AATCTTGG	AATCTTGG	AATCTTGG	AATCTTGG
CC1/2b	CAGATACAGCTC	TAGCGGAAAAATGA	AGACGGTCTTAGG	AAAAACGAATGTAA	CAGACACGGTCT	CGCAACGATTTAG	ACCAGTTACACCG	CTCAGGCAGATAG	ATTAGGATAAAA	CTATCGATGGAT	TGGAACTTGG	AATCTTGG	AATCTTGG	AATCTTGG	AATCTTGG
P24	CAGATACAGCTC	TAGCGGAAAAATGA	AGACGGTCTTAGG	AAAAACGAATGTAA	CAGACACGGTCT	CGCAACGATTTAG	ACCAGTTACACCG	CTCAGGCAGATAG	ATTAGGATAAAA	CTATCGATGGAT	TGGAACTTGG	AATCTTGG	AATCTTGG	AATCTTGG	AATCTTGG
13932	CAGATACAGCTC	TAGCGGAAAAATGA	AGACGGTCTTAGG	AAAAACGAATGTAA	CAGACACGGTCT	CGCAACGATTTAG	ACCAGTTACACCG	CTCAGGCAGATAG	ATTAGGATAAAA	CTATCGATGGAT	TGGAACTTGG	AATCTTGG	AATCTTGG	AATCTTGG	AATCTTGG
19111	CAGACGCAGCTC	TAGCGGAAAAATGA	AGACGGTCTTAGG	AAAAACGAATGTAA	CAGACACGGTCT	CGCAACGATTTAG	ACCAGTTACACCG	CTCAGGCAGATAG	ATTAGGATAAAA	CTATCGATGGAT	TGGAACTTGG	AATCTTGG	AATCTTGG	AATCTTGG	AATCTTGG
MG922918	CAGATACAGCTC	TAGCGGAAAAATGA	AGACGGTCTTAGG	AAAAACGAATGTAA	CAGACACGGTCT	CGCAACGATTTAG	ACCAGTTACACCG	CTCAGGCAGATAG	ATTAGGATAAAA	CTATCGATGGAT	TGGAACTTGG	AATCTTGG	AATCTTGG	AATCTTGG	AATCTTGG

	300	310	320	330	340	350	360	370	380	390	400	410	420	430
L101B2	AACTTAAACACAAATAA	TTTCAGCAATAACT	CACTTACGGATATA	AGCCACTTAAAGAT	TAACTAAGTTAG	TTGATTTTGTGAA	TAACTAAATCAAA	TAGCAGATATAA	CTCCGCTAGCTAA	TTTGACGAATCT	AACTTAACT	AACTTAACT	AACTTAACT	AACTTAACT
L100A1	AACTTAAACACAAATAA	TTTCAGCAATAACT	CACTTACGGATATA	AGCCACTTAAAGAT	TAACTAAGTTAG	TTGATTTTGTGAA	TAACTAAATCAAA	TAGCAGATATAA	CTCCGCTAGCTAA	TTTGACGAATCT	AACTTAACT	AACTTAACT	AACTTAACT	AACTTAACT
L201	aaactttaacacaaataa	atttcagcaataact	caacttacggatata	agccacttaagatt	aaacttaagttag	tttgatTTTTGTGAA	TAACTAAATCAAA	TAGCAGATATAA	CTCCGCTAGCTAA	TTTGACGAATCT	AACTTAACT	AACTTAACT	AACTTAACT	AACTTAACT
L200	AACTTAAACACAAATAA	TTTCAGCAATAACT	CACTTACGGATATA	AGCCACTTAAAGAT	TAACTAAGTTAG	TTGATTTTGTGAA	TAACTAAATCAAA	TAGCAGATATAA	CTCCGCTAGCTAA	TTTGACGAATCT	AACTTAACT	AACTTAACT	AACTTAACT	AACTTAACT
CC1/2c	AACTTAAACACAAATAA	TTTCAGCAATAACT	CACTTACGGATATA	AGCCACTTAAAGAT	TAACTAAGTTAG	TTGATTTTGTGAA	TAACTAAATCAAA	TAGCAGATATAA	CTCCGCTAGCTAA	TTTGACGAATCT	AACTTAACT	AACTTAACT	AACTTAACT	AACTTAACT
P20	AACTTAAACACAAATAA	TTTCAGCAATAACT	CACTTACGGATATA	AGCCACTTAAAGAT	TAACTAAGTTAG	TTGATTTTGTGAA	TAACTAAATCAAA	TAGCAGATATAA	CTCCGCTAGCTAA	TTTGACGAATCT	AACTTAACT	AACTTAACT	AACTTAACT	AACTTAACT
CC1/2b	AACTTAAACACAAATAA	TTTCAGCAATAACT	CACTTACGGATATA	AGCCACTTAAAGAT	TAACTAAGTTAG	TTGATTTTGTGAA	TAACTAAATCAAA	TAGCAGATATAA	CTCCGCTAGCTAA	TTTGACGAATCT	AACTTAACT	AACTTAACT	AACTTAACT	AACTTAACT
P24	AACTTAAACACAAATAA	TTTCAGCAATAACT	CACTTACGGATATA	AGCCACTTAAAGAT	TAACTAAGTTAG	TTGATTTTGTGAA	TAACTAAATCAAA	TAGCAGATATAA	CTCCGCTAGCTAA	TTTGACGAATCT	AACTTAACT	AACTTAACT	AACTTAACT	AACTTAACT
13932	AACTTAAACACAAATAA	TTTCAGCAATAACT	CACTTACGGATATA	AGCCACTTAAAGAT	TAACTAAGTTAG	TTGATTTTGTGAA	TAACTAAATCAAA	TAGCAGATATAA	CTCCGCTAGCTAA	TTTGACGAATCT	AACTTAACT	AACTTAACT	AACTTAACT	AACTTAACT
19111	AACTTAAACACAAATAA	TTTCAGCAATAACT	CACTTACGGATATA	AGCCACTTAAAGAT	TAACTAAGTTAG	TTGATTTTGTGAA	TAACTAAATCAAA	TAGCAGATATAA	CTCCGCTAGCTAA	TTTGACGAATCT	AACTTAACT	AACTTAACT	AACTTAACT	AACTTAACT
MG922918	AACTTAAACACAAATAA	TTTCAGCAATAACT	CACTTACGGATATA	AGCCACTTAAAGAT	TAACTAAGTTAG	TTGATTTTGTGAA	TAACTAAATCAAA	TAGCAGATATAA	CTCCGCTAGCTAA	TTTGACGAATCT	AACTTAACT	AACTTAACT	AACTTAACT	AACTTAACT

	440	450	460	470	480	490	500	510	520	530	540	550	560	570	580
L101B2	GGTTTGACTTTGTTCA	CAACTCAGATAAC	GATATAGACCCGCT	TAAAAATCTAAC	CAAAATTAATTCGG	CCTAGAACTATCTAG	TAAACAGATTAGT	GATATTAGTGC	GCTTTCAGGTTTAA	CTAACCTACAGCA	ATTAATCTTTTGG				
L100A1	GGTTTGACTTTGTTCA	CAACTCAGATAAC	GATATAGACCCGCT	TAAAAATCTAAC	CAAAATTAATTCGG	CCTAGAACTATCTAG	TAAACAGATTAGT	GATATTAGTGC	GCTTTCAGGTTTAA	CTAACCTACAGCA	ATTAATCTTTTGG				
L201	ggtttgactttgttcaaca	actcagataacggata	tagaccgcttaaaaaa	cttaaaatttaaat	tcggctagaaactat	ctagtaaacagattag	tgatattagtg	cgctttcaggttt	aaactaaatc	acagcaattat	cttttgg				
L200	GGTTTGACTTTGTTCA	CAACTCAGATAAC	GATATAGACCCGCT	TAAAAATCTAAC	CAAAATTAATTCGG	CCTAGAACTATCTAG	TAAACAGATTAGT	GATATTAGTGC	GCTTTCAGGTTTAA	CTAACCTACAGCA	ATTAATCTTTTGG				
CC1/2c	GGTTTGACTTTGTTCA	CAACTCAGATAAC	GATATAGACCCGCT	TAAAAATCTAAC	CAAAATTAATTCGG	CCTAGAACTATCTAG	TAAACAGATTAGT	GATATTAGTGC	GCTTTCAGGTTTAA	CTAACCTACAGCA	ATTAATCTTTTGG				
P20	GGTTTGACTTTGTTCA	CAACTCAGATAAC	GATATAGACCCGCT	TAAAAATCTAAC	CAAAATTAATTCGG	CCTAGAACTATCTAG	TAAACAGATTAGT	GATATTAGTGC	GCTTTCAGGTTTAA	CTAACCTACAGCA	ATTAATCTTTTGG				
CC1/2b	GGTTTGACTTTGTTCA	CAACTCAGATAAC	GATATAGACCCGCT	TAAAAATCTAAC	CAAAATTAATTCGG	CCTAGAACTATCTAG	TAAACAGATTAGT	GATATTAGTGC	GCTTTCAGGTTTAA	CTAACCTACAGCA	ATTAATCTTTTGG				
P24	GGTTTGACTTTGTTCA	CAACTCAGATAAC	GATATAGACCCGCT	TAAAAATCTAAC	CAAAATTAATTCGG	CCTAGAACTATCTAG	TAAACAGATTAGT	GATATTAGTGC	GCTTTCAGGTTTAA	CTAACCTACAGCA	ATTAATCTTTTGG				
13932	GGTTTGACTTTGTTCA	CAACTCAGATAAC	GATATAGACCCGCT	TAAAAATCTAAC	CAAAATTAATTCGG	CCTAGAACTATCTAG	TAAACAGATTAGT	GATATTAGTGC	GCTTTCAGGTTTAA	CTAACCTACAGCA	ATTAATCTTTTGG				
19111	GGTTTGACTTTGTTCA	CAACTCAGATAAC	GATATAGACCCGCT	TAAAAATCTAAC	CAAAATTAATTCGG	CCTAGAACTATCTAG	TAAACAGATTAGT	GATATTAGTGC	GCTTTCAGGTTTAA	CTAACCTACAGCA	ATTAATCTTTTGG				
MG922918	GGTTTGACTTTGTTCA	CAACTCAGATAAC	GATATAGACCCGCT	TAAAAATCTAAC	CAAAATTAATTCGG	CCTAGAACTATCTAG	TAAACAGATTAGT	GATATTAGTGC	GCTTTCAGGTTTAA	CTAACCTACAGCA	ATTAATCTTTTGG				

		1720	1730	1740	1750	1760	1770	1780	1790	1800	1810	1820	1830	1840	1850					
L101B2		TGAGAA	TGACGG	TGTAACA	CTCTCAA	CAGTAGAT	TATCAA	AGGCTT	GTTACA	GAACTT	TACACCAC	CAACAAA	GAAAGT	TATACT	TTCAAAG	CTGTATGACGCAAAAA	CTGTG	GTGACA	GTGGAT	TTTCGCA
L100A1		TGATAA	TGACGG	TGTAACA	CTCTCAA	CAGTAGAT	TATCAA	AGGCTT	GTTACA	GAACTT	TACACCAC	CAACAAA	GAAAGT	TATACT	TTCAAAG	CTGTATGACGCAAAAA	CTGTG	GTGACA	GTGGAT	TTTCGCA
L201		TGATAA	TGACGG	TGTAACA	CTCTCAA	CAGTAGAT	TATCAA	AGGCTT	GTTACA	GAACTT	TACACCAC	CAACAAA	GAAAGT	TATACT	TTCAAAG	CTGTATGACGCAAAAA	CTGTG	GTGACA	GTGGAT	TTTCGCA
L200		TGATAA	TGACGG	TGTAACA	CTCTCAA	-CAGTAGAT	TATCAA	AGGCTT	GTTACA	GAACTT	TACACCAC	CAACAAA	GAAAGT	TATACT	TTCAAAG	CTGTATGACGCAAAAA	CTGTG	GTGACA	GTGGAT	TTTCGCA
CC1/2c		TGATAA	TGACGG	TGTAACA	CTCTCAA	CAGTAGAT	TATCAA	AGGCTT	GTTACA	GAACTT	TACACCAC	CAACAAA	GAAAGT	TATACT	TTCAAAG	CTGTATGACGCAAAAA	CTGTG	GTGACA	GTGGAT	TTTCGCA
P20		TGATAA	TGACGG	TGTAACA	CTCTCAA	CAGTAGAT	TATCAA	AGGCTT	GTTACA	GAACTT	TACACCAC	CAACAAA	GAAAGT	TATACT	TTCAAAG	CTGTATGACGCAAAAA	CTGTG	GTGACA	GTGGAT	TTTCGCA
CC1/2b		TGATAA	TGACGG	TGTAACA	CTCTCAA	CAGTAGAT	TATCAA	AGGCTT	GTTACA	GAACTT	TACACCAC	CAACAAA	GAAAGT	TATACT	TTCAAAG	CTGTATGACGCAAAAA	CTGTG	GTGACA	GTGGAT	TTTCGCA
P24		TGATAA	TGACGG	TGTAACA	CTCTCAA	CAGTAGAT	TATCAA	AGGCTT	GTTACA	GAACTT	TACACCAC	CAACAAA	GAAAGT	TATACT	TTCAAAG	CTGTATGACGCAAAAA	CTGTG	GTGACA	GTGGAT	TTTCGCA
13932		tgataa	tgacgg	tgtaaca	ctctcaa	cagtagat	tatcaa	aggctt	gttaca	gaactt	taccac	caaaa	gaaagt	tatact	ttcaaag	ctgtatgacgcaaaaa	ctgtg	gtgaca	gtggat	tttcgca
19111		TGAGAA	TGACGG	TGTAACA	CTCTCAA	CAGTAGAT	TATCAA	AGGCTT	GTTACA	GAACTT	TACACCAC	CAACAAA	GAAAGT	TATACT	TTCAAAG	CTGTATGACGCAAAAA	CTGTG	GTGACA	GTGGAT	TTTCGCA
MG922918		TGAGAA	TGACGG	TGTAACA	CTCTCAA	CAGTAGAT	TATCAA	AGGCTT	GTTACA	GAACTT	TACACCAC	CAACAAA	GAAAGT	TATACT	TTCAAAG	CTGTATGACGCAAAAA	CTGTG	GTGACA	GTGGAT	TTTCGCA

		1860	1870	1880	1890	1900	1910	1920	1930	1940	1950	1960	1970	1980	1990												
L101B2		CTAGCA	AATGCT	GTCTAAA	CATCAC	CTTATATG	CCCAAT	TATAGG	CGCA	TAGCTATA	CAGCAA	CGT	TTGATGT	TATGAT	GATG	AAAA	TCAA	CGACTCA	AGCAGT	TAGACT	TCAA	GGACT	TTCTAAA	GAACT	CAAGG	CACCA	
L100A1		CTAGTA	AAGATG	CTGTAAAA	CATCAC	CTTATATG	CCCAAT	TATAGG	CGCA	TAGCTATA	CAGCAA	CGT	TTGATGT	TATGAT	GATG	AAAA	TCAA	CGACTCA	AGCAGT	TAGACT	TCAA	GGACT	TTCTAAA	GAACT	CAAGG	CACCA	
L201		ACTAGT	AAGATG	CTGTAAAA	CATCAC	CTTATATG	CCCAAT	TATAGG	CGCA	TAGCTATA	CAGCAA	CGT	TTGATGT	TATGAT	GATG	AAAA	TCAA	CGACTCA	AGCAGT	TAGACT	TCAA	GGACT	TTCTAAA	GAACT	CAAGG	CACCA	
L200		CTAGCA	AATGCT	GTCTAAAA	CATCAC	CTTATATG	CCCAAT	TATAGG	CGCA	TAGCTATA	CAGCAA	CGT	TTGATGT	TATGAT	GATG	AAAA	TCAA	CGACTCA	AGCAGT	TAGACT	TCAA	GGACT	TTCTAAA	GAACT	CAAGG	CACCA	
CC1/2c		CTAGTA	AAGATG	CTGTAAAA	CATCAC	CTTATATG	CCCAAT	TATAGG	CGCA	TAGCTATA	CAGCAA	CGT	TTGATGT	TATGAT	GATG	AAAA	TCAA	CGACTCA	AGCAGT	TAGACT	TCAA	GGACT	TTCTAAA	GAACT	CAAGG	CACCA	
P20		CGAGTA	AAGATG	CTGTAAAA	CATCAC	CTTATATG	CCCAAT	TATAGG	CGCA	TAGCTATA	CAGCAA	CGT	TTGATGT	TATGAT	GATG	AAAA	TCAA	CGACTCA	AGCAGT	TAGACT	TCAA	GGACT	TTCTAAA	GAACT	CAAGG	CACCA	
CC1/2b		CTAGTA	AAGATG	CTGTAAAA	CATCAC	CTTATATG	CCCAAT	TATAGG	CGCA	TAGCTATA	CAGCAA	CGT	TTGATGT	TATGAT	GATG	AAAA	TCAA	CGACTCA	AGCAGT	TAGACT	TCAA	GGACT	TTCTAAA	GAACT	CAAGG	CACCA	
P24		CTAGTA	AAGATG	CTGTAAAA	CATCAC	CTTATATG	CCCAAT	TATAGG	CGCA	TAGCTATA	CAGCAA	CGT	TTGATGT	TATGAT	GATG	AAAA	TCAA	CGACTCA	AGCAGT	TAGACT	TCAA	GGACT	TTCTAAA	GAACT	CAAGG	CACCA	
13932		ctagta	aagatg	ctgtaaaa	catcac	cttata	tatg	cccaat	tatagg	cgca	tagctata	cagcaa	cg	ttgatgt	tatgat	gatg	aaaa	tcaa	cgactca	agcag	tagact	tcaa	ggact	ttctaaa	gaact	caagg	cacca
19111		CTAGCA	AATGCT	GTCTAAAA	CATCAC	CTTATATG	CCCAAT	TATAGG	CGCA	TAGCTATA	CAGCAA	CGT	TTGATGT	TATGAT	GATG	AAAA	TCAA	CGACTCA	AGCAGT	TAGACT	TCAA	GGACT	TTCTAAA	GAACT	CAAGG	CACCA	
MG922918		CTAGCA	AATGCT	GTCTAAAA	CATCAC	CTTATATG	CCCAAT	TATAGG	CGCA	TAGCTATA	CAGCAA	CGT	TTGATGT	TATGAT	GATG	AAAA	TCAA	CGACTCA	AGCAGT	TAGACT	TCAA	GGACT	TTCTAAA	GAACT	CAAGG	CACCA	

		2000	2010	2020	2030	2040	2050	2060	2070	2080	2090	2100	2110	2120	2130								
L101B2		ACGAAA	GCCG	ATATACT	TTCAAAG	CTGTATGACG	AAAAAA	CAGATG	GAAAAA	TGGAT	TTTGGC	GACGATA	AAATGC	AGCAA	TGACAT	TACGCTGTACGCTCAAT	TTACG	AAAAA	TCCTGTG	CACC	ACCA	AC	
L100A1		ACAAAA	GCCG	ATATACT	TTCAAAG	CTGTATGACG	AAAAAA	CAGATG	GAAAAA	TGGAT	TTTGGC	GACGATA	AAATGC	AGCAA	TGACAT	TACGCTGTACGCTCAAT	TTACG	AAAAA	TCCTGTG	CACC	ACCA	AC	
L201		AACAAA	GCCG	GATATACT	TTCAAAG	TTGGTATGACG	AAAAAA	ACAGAT	GTA	AAAAAT	TGGAT	TTTGGC	GACGATA	AAATGC	AGCAA	TGACAT	TACGCTGTACGCTCAAT	TTACG	AAAAA	TCCTGTG	CACC	ACCA	AC
L200		ACGAAA	GCCG	ATATACT	TTCAAAG	CTGTATGACG	AAAAAA	CAGATG	GAAAAA	TGGAT	TTTGGC	GACGATA	AAATGC	AGCAA	TGACAT	TACGCTGTACGCTCAAT	TTACG	AAAAA	TCCTGTG	CACC	ACCA	AC	
CC1/2c		ACAAAA	GCCG	ATATACT	TTCAAAG	CTGTATGACG	AAAAAA	CAGATG	GAAAAA	TGGAT	TTTGGC	GACGATA	AAATGC	AGCAA	TGACAT	TACGCTGTACGCTCAAT	TTACG	AAAAA	TCCTGTG	CACC	ACCA	AC	
P20		ACAAAA	GCCG	ATATACT	TTCAAAG	CTGTATGACG	AAAAAA	CAGATG	GAAAAA	TGGAT	TTTGGC	GACGATA	AAATGC	AGCAA	TGACAT	TACGCTGTACGCTCAAT	TTACG	AAAAA	TCCTGTG	CACC	ACCA	AC	
CC1/2b		ACAAAA	GCCG	ATATACT	TTCAAAG	CTGTATGACG	AAAAAA	CAGATG	GAAAAA	TGGAT	TTTGGC	GACGATA	AAATGC	AGCAA	TGACAT	TACGCTGTACGCTCAAT	TTACG	AAAAA	TCCTGTG	CACC	ACCA	AC	
P24		acaaaa	gccg	atatact	ttcaaag	ctgtatgacg	aaaaaa	acagat	gta	aaaaat	tggat	tttggc	gacgata	aaatgc	agcaa	tgacat	tacgctgtacgctcaat	ttacg	aaaaa	tcctgtg	cacc	acca	ac
13932		acaaaa	gccg	atatact	ttcaaag	ctgtatgacg	aaaaaa	acagat	gta	aaaaat	tggat	tttggc	gacgata	aaatgc	agcaa	tgacat	tacgctgtacgctcaat	ttacg	aaaaa	tcctgtg	cacc	acca	ac
19111		ACGAAA	GCCG	ATATACT	TTCAAAG	CTGTATGACG	AAAAAA	CAGATG	GAAAAA	TGGAT	TTTGGC	GACGATA	AAATGC	AGCAA	TGACAT	TACGCTGTACGCTCAAT	TTACG	AAAAA	TCCTGTG	CACC	ACCA	AC	
MG922918		ACGAAA	GCCG	ATATACT	TTCAAAG	CTGTATGACG	AAAAAA	CAGATG	GAAAAA	TGGAT	TTTGGC	GACGATA	AAATGC	AGCAA	TGACAT	TACGCTGTACGCTCAAT	TTACG	AAAAA	TCCTGTG	CACC	ACCA	AC	

		2140	2150	2160	2170	2180	2190	2200	2210	2220	2230	2240	2250	2260	2270																																			
L101B2		AACTGG	AGGGA	CACACCG	CTACAACA	AAATA	CGCGG	GAATACTACAC	CACTT	CCGCAA	ATATAC	CTGGA	AGCAGACATCTAA	CACATCA	CTGG	AATTCAGCCAGCACAACAAGTACAATGAACGCTTATGACC																																		
L100A1		AACTGG	AGGGA	CACACCG	CTACAACA	AAATA	CGCGG	GAATACTACAC	CACTT	CCGCAA	ATATAC	CTGGA	AGCAGACATCTAA	CACATCA	CTGG	AATTCAGCCAGCACAACAAGTACAATGAACGCTTATGACC																																		
L201		CAACTG	GAGGGA	CACACCG	CTACAACA	AAATA	CGCGG	GAATACTACAC	CACTT	CCGCAA	ATATAC	CTGGA	AGCAGACATCTAA	CACATCA	CTGG	AATTCAGCCAGCACAACAAGTACAATGAACGCTTATGACC																																		
L200		CAACTG	GAGGGA	CACACCG	CTACAACA	AAATA	CGCGG	GAATACTACAC	CACTT	CCGCAA	ATATAC	CTGGA	AGCAGACATCTAA	CACATCA	CTGG	AATTCAGCCAGCACAACAAGTACAATGAACGCTTATGACC																																		
CC1/2c		AACTGG	AGGGA	CACACCG	CTACAACA	AAATA	CGCGG	GAATACTACAC	CACTT	CCGCAA	ATATAC	CTGGA	AGCAGACATCTAA	CACATCA	CTGG	AATTCAGCCAGCACAACAAGTACAATGAACGCTTATGACC																																		
P20		AACTGG	AGGGA	CACACCG	CTACAACA	AAATA	CGCGG	GAATACTACAC	CACTT	CCGCAA	ATATAC	CTGGA	AGCAGACATCTAA	CACATCA	CTGG	AATTCAGCCAGCACAACAAGTACAATGAACGCTTATGACC																																		
CC1/2b		AACTGG	AGGGA	CACACCG	CTACAACA	AAATA	CGCGG	GAATACTACAC	CACTT	CCGCAA	ATATAC	CTGGA	AGCAGACATCTAA	CACATCA	CTGG	AATTCAGCCAGCACAACAAGTACAATGAACGCTTATGACC																																		
P24		CAACTG	GAGGGA	CACACCG	CTACAACA	AAATA	CGCGG	GAATACTACAC	CACTT	CCGCAA	ATATAC	CTGGA	AGCAGACATCTAA	CACATCA	CTGG	AATTCAGCCAGCACAACAAGTACAATGAACGCTTATGACC																																		
13932		aa	ctgg	aggg	aa	cact	ccgc	gact	acaaa	aa	atg	aggg	aa	cact	acac	caact	ccg	caaat	at	act	ctg	ga	agca	ac	ac	at	ctaa	ca	cat	ca	ctg	ga	at	tc	ag	ct	ag	ca	ca	ac	ag	taca	at	ga	ac	gc	ct	ta	tg	acc
19111		AACTGG	AGGGA	CACACCG	CTACAACA	AAATA	CGCGG	GAATACTACAC	CACTT	CCGCAA	ATATAC	CTGGA	AGCAGACATCTAA	CACATCA	CTGG	AATTCAGCCAGCACAACAAGTACAATGAACGCTTATGACC																																		
MG922918		AACTGG	AGGGA	CACACCG	CTACAACA	AAATA	CGCGG	GAATACTACAC	CACTT	CCGCAA	ATATAC	CTGGA	AGCAGACATCTAA	CACATCA	CTGG	AATTCAGCCAGCACAACAAGTACAATGAACGCTTATGACC																																		

	2280	2290	2300	2310	2320	2330	2340	2350	2360	2370	2380	2390	2400
L101B2	CTTATAATTCAA	AAGAAGCTTCA	TCCCTACA	ACTGGCGATAG	CGGATAATG	CGCTCTAC	CTTTGTTAG	GGTTATTAG	CAGTAGGAA	CTGCAATGG	CTTACTAAA	AAAGCGT	GTAGTAA
L100A1	CTTATAATTCAA	AAGAAGCTTCA	TCCCTACA	ACTGGCGATAG	CGGATAATG	CGCTCTAC	CTGTTGATAG	GATTGTTAG	CAGTAGGAA	CTGCAATGG	CTTACTAAA	AAAGCGT	GTAGTAA
L201	CCCTTATAAT	TCAAAGAAGCTT	CACTCCCTACA	ACTGGTGATAG	CGGATAATG	CGCTCTAC	CTGTTGA-TAG	GATTGTTAG	CAGTAGGAA	CTGCAATGG	CTTACTAAA	AAAGCGT	GTAGTAA
L200	CTTATAATTCAA	AAGAAGCTTCA	TCCCTACA	ACTGGCGATAG	CGGATAATG	CGCTCTAC	CTTTGTTAG	GGTTATTAG	CAGTAGGAA	CTGCAATGG	CTTACTAAA	AAAGCGT	GTAGTAA
CC1/2c	CTTATAATTCAA	AAGAAGCTTCA	TCCCTACA	ACTGGCGATAG	CGGATAATG	CGCTCTAC	CTTTGTTAG	GGTTATTAG	CAGTAGGAA	CTGCAATGG	CTTACTAAA	AAAGCGT	GTAGTAA
P20	CTTATAATTCAA	AAGCAGCTTCA	TCCCTACA	ACTGGTGATAG	CGGATAATG	CGCTCTAC	CTGTTGATAG	GATTGTTAG	CAGTAGGAA	CTGCAATGG	CTTACTAAA	AAAGCGT	GTAGTAA
CC1/2b	CTTATAATTCAA	AAGCAGCTTCA	TCCCTACA	ACTGGTGATAG	CGGATAATG	CGCTCTAC	CTGTTGATAG	GATTGTTAG	CAGTAGGAA	CTGCAATGG	CTTACTAAA	AAAGCGT	GTAGTAA
P24	GACCCTTATA	ATTCAAAA-GAAG	CTTCACTCCCTACA	ACTGGCGATAG	CGGATAATG	CGCTCTAC	CTTTGTTAG	GGTTATTAG	CAGTAGGAA	CTGCAATGG	CTTACTAAA	AAAGCAGT	GCTAGT
13932	cttataattcaa	aagaagcttca	tccctaca	actggtgatag	cgataatg	cgctctac	ctgttgatag	gattgtag	cagtaggaa	ctgcagtgg	cttactaaa	aaagc	cgtagt
19111	CTTATAATTCAA	AAGAAGCTTCA	TCCCTACA	ACTGGCGATAG	CGGATAATG	CGCTCTAC	CTTTGTTAG	GGTTATTAG	CAGTAGGAA	CTGCAATGG	CTTACTAAA	AAAGCGT	GTAGTAA
MG922918	CTTATAATTCAA	AAGAAGCTTCA	TCCCTACA	ACTGGCGATAG	CGGATAATG	CGCTCTAC	CTTTGTTAG	GGTTATTAG	CAGTAGGAA	CTGCAATGG	CTTACTAAA	AAAGCGT	GTAGTAA

Anexo 2. Secuencias proteicas de la InIA obtenidas para las diferentes cepas

						10	20	30	40	50	60	70	80	90	100	110	120																																																																																																							
L101B2:	1 to 2400:	Frame 1	800	aa	VR	KKR	V	V	L	K	S	I	L	V	A	I	L	V	F	G	S	G	V	I	N	T	S	N	G	T	N	A	Q	A	A	I	T	Q	D	T	P	I	N	Q	I	F	T	D	A	I	A	E	K	M	K	T	V	L	G	K	T	N	V	T	D	T	V	S	Q	T	D	L	D	Q	V	T	T	L	Q	A	D	R	L	G	I	K	S	I	D	G	L	E	Y	L	N	N	L	T	Q	I	N	F	S	N	N	Q	L	T	D	I	T	P	L	K	D	L	T	K		
L100A1:	1 to 1506:	Frame 1	502	aa	V	R	K	R	V	V	L	K	S	I	L	V	A	I	L	V	F	G	S	G	V	I	N	T	C	N	G	T	N	A	Q	A	A	I	T	Q	D	T	P	V	N	Q	I	F	T	D	A	I	A	E	K	M	K	T	V	L	G	K	T	N	V	T	D	T	V	S	Q	T	D	L	D	Q	V	T	T	L	Q	A	D	R	L	G	I	K	S	I	D	G	L	E	Y	L	N	N	L	T	Q	I	N	F	S	N	N	Q	L	T	D	I	T	P	L	K	D	L	T	K
L201:	1 to 2400:	Frame 1	800	aa	M	R	K	R	V	V	L	K	S	I	L	V	A	I	L	V	F	G	S	G	V	I	N	T	S	N	G	T	N	A	Q	A	A	I	T	Q	D	T	P	I	N	Q	I	F	T	D	A	I	A	E	K	M	K	T	V	L	G	K	T	N	V	T	D	T	V	S	Q	T	D	L	D	Q	V	T	T	L	Q	A	D	R	L	G	I	K	S	I	D	G	L	E	Y	L	N	N	L	T	Q	I	N	F	S	N	N	Q	L	T	D	I	T	P	L	K	D	L	T	K
L200:	1 to 2400:	Frame 1	800	aa	V	R	K	R	V	V	L	K	S	I	L	V	A	I	L	V	F	G	S	G	V	I	N	T	S	N	G	T	N	A	Q	A	A	I	T	Q	D	T	P	I	N	Q	I	F	T	D	A	I	A	E	K	M	K	T	V	L	G	K	T	N	V	T	D	T	V	S	Q	T	D	L	D	Q	V	T	T	L	Q	A	D	R	L	G	I	K	S	I	D	G	L	E	Y	L	N	N	L	T	Q	I	N	F	S	N	N	Q	L	T	D	I	T	P	L	K	D	L	T	K
CC1/2c:	1 to 2052:	Frame 1	684	aa	V	R	K	R	V	V	L	K	S	I	L	V	A	I	L	V	F	G	S	G	V	I	N	T	S	N	G	T	N	A	Q	A	A	I	T	Q	D	T	P	I	N	Q	I	F	T	D	A	I	A	E	K	M	K	T	V	L	G	K	T	N	V	T	D	T	V	S	Q	T	D	L	D	Q	V	T	T	L	Q	A	D	R	L	G	I	K	S	I	D	G	V	E	Y	L	N	N	L	T	Q	I	N	F	S	N	N	Q	L	T	D	I	T	P	L	K	N	L	T	K
P20:	1 to 2400:	Frame 1	800	aa	V	R	K	R	V	V	L	K	S	I	L	V	A	I	L	V	F	G	S	G	V	I	N	T	S	N	G	T	N	A	Q	A	A	I	T	Q	D	T	P	I	N	Q	I	F	T	D	A	I	A	E	K	M	K	T	V	L	G	K	T	N	V	T	D	T	V	S	Q	T	D	L	D	Q	V	T	T	L	Q	A	D	R	L	G	I	K	S	I	D	G	L	E	Y	L	N	N	L	T	Q	I	N	F	S	N	N	Q	L	T	D	I	T	P	L	K	D	L	T	K
CC1/2b:	1 to 2400:	Frame 1	800	aa	V	R	K	R	V	V	L	K	S	I	L	V	A	I	L	V	F	G	S	G	V	I	N	T	S	N	G	T	N	A	Q	A	A	I	T	Q	D	T	P	I	N	Q	I	F	T	D	A	I	A	E	K	M	K	T	V	L	G	K	T	N	V	T	D	T	V	S	Q	T	D	L	D	Q	V	T	T	L	Q	A	D	R	L	G	I	K	S	I	D	G	L	E	Y	L	N	N	L	T	Q	I	N	F	S	N	N	Q	L	T	D	I	T	P	L	K	D	L	T	K
P24:	1 to 2400:	Frame 1	800	aa	V	R	K	R	V	V	L	K	S	I	L	V	A	I	L	V	F	G	S	G	V	I	N	T	S	N	G	T	N	A	Q	A	A	I	T	Q	D	T	P	I	N	Q	I	F	T	D	A	I	A	E	K	M	K	T	V	L	G	K	T	N	V	T	D	T	V	S	Q	T	D	L	D	Q	V	T	T	L	Q	A	D	R	L	G	I	K	S	I	D	G	L	E	Y	L	N	N	L	T	Q	I	N	F	S	N	N	Q	L	T	D	I	T	P	L	K	D	L	T	K
13932:	1 to 2400:	Frame 1	800	aa	V	R	K	R	V	V	L	K	S	I	L	V	A	I	L	V	F	G	S	G	V	I	N	T	S	N	G	T	N	A	Q	A	A	I	T	Q	D	T	P	I	N	Q	I	F	T	D	A	I	A	E	K	M	K	T	V	L	G	K	T	N	V	T	D	T	V	S	Q	T	D	L	D	Q	V	T	T	L	Q	A	D	R	L	G	I	K	S	I	D	G	L	E	Y	L	N	N	L	T	Q	I	N	F	S	N	N	Q	L	T	D	I	T	P	L	K	D	L	T	K
19111:	1 to 2400:	Frame 1	800	aa	V	R	K	R	V	V	L	K	S	I	L	V	A	I	L	V	F	G	S	G	V	I	N	T	S	N	G	T	N	A	Q	A	A	I	T	Q	D	T	P	I	N	Q	I	F	T	D	A	I	A	E	K	M	K	T	V	L	G	K	T	N	V	T	D	T	V	S	Q	T	D	L	D	Q	V	T	T	L	Q	A	D	R	L	G	I	K	S	I	D	G	L	E	Y	L	N	N	L	T	Q	I	N	F	S	N	N	Q	L	T	D	I	T	P	L	K	D	L	T	K
MG922918:	1 to 2400:	Frame 1	800	aa	M	R	K	R	V	V	L	K	S	I	L	V	A	I	L	V	F	G	S	G	V	I	N	T	S	N	G	T	N	A	Q	A	A	I	T	Q	D	T	P	I	N	Q	I	F	T	D	A	I	A	E	K	M	K	T	V	L	G	K	T	N	V	T	D	T	V	S	Q	T	D	L	D	Q	V	T	T	L	Q	A	D	R	L	G	I	K	S	I	D	G	L	E	Y	L	N	N	L	T	Q	I	N	F	S	N	N	Q	L	T	D	I	T	P	L	K	D	L	T	K

						130	140	150	160	170	180	190	200	210	220	230	240	250	260																																																																																																																							
L101B2:	L	V	D	I	L	M	N	N	Q	I	A	D	I	T	P	I	A	N	L	T	N	L	T	G	L	T	F	N	N	Q	I	T	D	I	D	P	L	K	N	L	T	N	L	R	L	E	S	S	N	T	I	S	D	I	S	A	L	S	G	L	T	N	L	Q	L	S	F	G	N	Q	V	T	D	L	K	P	I	A	N	L	T	T	L	E	R	L	D	I	S	S	N	K	V	S	D	I	S	V	I	A	K	L	T	N	L	E	S	L	I	A	T	N	N	Q	I	S	D	I	T	P	L	G	I	L	T	N	L	D	E	L	S	L	N	G	N	Q	L	K
L100A1:	L	V	D	I	L	M	N	N	Q	I	A	D	I	T	P	I	A	N	L	T	N	L	T	G	L	T	F	N	N	Q	I	T	D	I	D	P	L	K	N	L	T	N	L	R	L	E	S	S	N	T	I	S	D	I	S	A	L	S	G	L	T	N	L	Q	L	S	F	G	N	Q	V	T	D	L	K	P	I	A	N	L	T	T	L	E	R	L	D	I	S	S	N	K	V	S	D	I	S	V	I	A	K	L	T	N	L	E	S	L	I	A	T	N	N	Q	I	S	D	I	T	P	L	G	I	L	T	N	L	D	E	L	S	L	N	G	N	Q	L	K
L201:	L	V	D	I	L	M	N	N	Q	I	A	D	I	T	P	I	A	N	L	T	N	L	T	G	L	T	F	N	N	Q	I	T	D	I	D	P	L	K	N	L	T	N	L	R	L	E	S	S	N	T	I	S	D	I	S	A	L	S	G	L	T	N	L	Q	L	S	F	G	N	Q	V	T	D	L	K	P	I	A	N	L	T	T	L	E	R	L	D	I	S	S	N	K	V	S	D	I	S	V	I	A	K	L	T	N	L	E	S	L	I	A	T	N	N	Q	I	S	D	I	T	P	L	G	I	L	T	N	L	D	E	L	S	L	N	G	N	Q	L	K
L200:	L	V	D	I	L	M	N	N	Q	I	A	D	I	T	P	I	A	N	L	S	N	L	T	G	L	T	F	N	N	Q	I	T	D	I	D	P	L	K	N	L	T	N	L	R	L	E	S	S	N	T	I	S	D	I	S	A	L	S	G	L	T	S	L	Q	L	S	F	G	N	Q	V	T	D	L	K	P	I	A	N	L	T	T	L	E	R	L	D	I	S	S	N	K	V	S	D	I	S	V	I	A	K	L	T	N	L	E	S	L	I	A	T	N	N	Q	I	S	D	I	T	P	L	G	I	L	T	N	L	D	E	L	S	L	N	G	N	Q	L	K
CC1/2c:	L	V	D	I	L	M	N	N	Q	I	A	D	I	T	P	I	A	N	L	T	N	L	T	G	L	T	F	N	N	Q																																																																																																												

	420	430	440	450	460	470	480	490	500	510	520	530	540	550
L101B2:	LNDQAWTNAFVNYKANVSI	IPNTVKNVTCALIAFATISD	GGSYAEPDITWNLPSYTN	EVSYTFNQSVTIGKGTTF	FSGTVTQPLKAIFNAKFF	HVDGKETTREVEAGNLL	TEFAKPVKEGHTFV	GWFLAQTGGTKWNF	STDKMPTN					
L100A1:	LNDQAWTNAFVNYKANVSI	IPNTVKNVTCALIAFATISD	GGSYAEPDITWNLPSYTN	EVSYTFNQSVTIGKGTTF	FSGTVTQPLKAIFNAKFF									
L201:	LNDQAWTNAFVNYKANVSI	IPNTVKNVTCALIAFATISD	GGSYAEPDITWNLPSYTN	EVSYTFNQSVTIGKGTTF	FSGTVTQPLKAIFNAKFF	HVDGKETTREVEAGNLL	TEFAKPVKEGHTFV	GWFLAQTGGTKWNF	STDKMPTN					
L200:	LNDQAWTNAFVNYKANVSI	IPNTVKNVTCALIAFATISD	GGSYAEPDITWNLPSYTN	EVSYTFNQSVTIGKGTTF	FSGTVTQPLKAIFNAKFF	HVDGKETTREVEAGNLL	TEFAKPVKEGHTFV	GWFLAQTGGTKWNF	STDKMPTN					
CC1/2c:	LNDQAWTNAFVNYKANVSI	IPNTVKNVTCALIAFATISD	GGSYTEPDITWNLPSYTN	EVSYTFNQSVTIGKGTTF	FSGTVTQPLKAIFN	KFFHVDGKETTREVEAGNLL	TEFAKPVKEGHTFV	GWFLAQTGGTKWNF	STDKMPTN					
P20:	LNDQAWTNAFVNYKANVSI	IPNTVKNVTCALIAFATISD	GGSYAEPDITWNLPSYTN	EVSYTFNQSVTIGKGTTF	FSGTVTQPLKAIFNAKFF	HVDGKETTREVEAGNLL	TEFAKPVKEGHTFV	GWFLAQTGGTKWNF	STDKMPTN					
CC1/2b:	LNDQAWTNAFVNYKANVSI	IPNTVKNVTCALIAFATISD	GGSYAEPDITWNLPSYTN	EVSYTFNQSVTIGKGTTF	FSGTVTQPLKAIFNAKFF	HVDGKETTREVEAGNLL	TEFAKPVKEGHTFV	GWFLAQTGGTKWNF	STDKMPTN					
P24:	LNDQAWTNAFVNYKANVSI	IPNTVKNVTCALIAFATISD	GGSYTEPDITWNLPSYTN	EVSYTFNQSVTIGKGTTF	FSGTVTQPLKAIFNAKFF	HVDGKETTREVEAGNLL	TEFAKPVKEGHTFV	GWFLAQTGGTKWNF	STDKMPTN					
13932:	LNDQAWTNAFVNYKANVSI	IPNTVKNVTCALIAFATISD	GGSYAEPDITWNLPSYTN	EVSYTFNQSVTIGKGTTF	FSGTVTQPLKAIFNAKFF	HVDGKETTREVEAGNLL	TEFAKPVKEGHTFV	GWFLAQTGGTKWNF	STDKMPTN					
19111:	LNDQAWTNAFVNYKANVSI	IPNTVKNVTCALIAFATISD	GGSYAEPDITWNLPSYTN	EVSYTFNQSVTIGKGTTF	FSGTVTQPLKAIFNAKFF	HVDGKETTREVEAGNLL	TEFAKPVKEGHTFV	GWFLAQTGGTKWNF	STDKMPTN					
MG922918:	LNDQAWTNAFVNYKANVSI	IPNTVKNVTCALIAFATISD	GGSYAEPDITWNLPSYTN	EVSYTFNQSVTIGKGTTF	FSGTVTQPLKAIFNAKFF	HVDGKETTREVEAGNLL	TEFAKPVKEGHTFV	GWFLAQTGGTKWNF	STDKMPTN					

	560	570	580	590	600	610	620	630	640	650	660	670	680	690	700
L101B2:	DINLNAQFSINSYIATF	ENDGVVTSQTVDYQGL	LQEPTEPTKEGYTFK	GWYLAKTGGDKWDF	ATSKMFAKNITLYA	QYSANSYIATFDV	DGKSTTC	AVDYQGLLKEPR	PTKAGYTFK	GWYDEKTDG	GKKWDF	ATDKMF	FANDITLYA		
L100A1:															
L201:	DIDLNAQFSINSYIATF	DNDGVVTSQTVDYQGL	LQEPTEPTKEGYTFK	GWYLAKTGGDKWDF	ATSKMFAKNITLYA	QYSANSYIATFDV	DGKSTTC	AVDYQGLLKEPR	PTKAGYTFK	GWYDEKTDG	GKKWDF	ATDKMF	FANDITLYA		
L200:	DINLNAQFSINSYIATF	DNDGVVTSQTVDYQGL	LQEPTEPTKEGYTFK	GWYLAKTGGDKWDF	ATSKMFAKNITLYA	QYSANSYIATFDV	DGKSTTC	AVDYQGLLKEPR	PTKAGYTFK	GWYDEKTDG	GKKWDF	ATDKMF	FANDITLYA		
CC1/2c:	DINLNAQFSINSYIATF	DNDGVVTSQTVDYQGL	LQEPTEPTKEGYTFK	GWYLAKTGGDKWDF	ATSKMFAKNITLYA	QYSANSYIATFDV	DGKSTTC	AVDYQGLLKEPR	PTKAGYTFK	GWYDEKTDG	GKK				
P20:	DIDLNAQFSINSYIATF	DNDGVVTSQTVDYQGL	LQEPTEPTKEGYTFK	GWYLAKTGGDKWDF	ATSKMFAKNITLYA	QYSANSYIATFDV	DGKSTTC	AVDYQGLLKEPR	PTKAGYTFK	GWYDEKTDG	GKKWDF	ATDKMF	FANDITLYA		
CC1/2b:	DIDLNAQFSINSYIATF	DNDGVVTSQTVDYQGL	LQEPTEPTKEGYTFK	GWYLAKTGGDKWDF	ATSKMFAKNITLYA	QYSANSYIATFDV	DGKSTTC	AVDYQGLLKEPR	PTKAGYTFK	GWYDEKTDG	GKKWDF	ATDKMF	FANDITLYA		
P24:	DINLNAQFSINSYIATF	ENDGVVTSQTVDYQGL	LQEPTEPTKEGYTFK	GWYLAKTGGDKWDF	ATSKMFAKNITLYA	QYSANSYIATFDV	DGKSTTC	AVDYQGLLKEPR	PTKAGYTFK	GWYDEKTDG	GKKWDF	ATDKMF	FANDITLYA		
13932:	DIDLNAQFSINSYIATF	DNDGVVTSQTVDYQGL	LQEPTEPTKEGYTFK	GWYLAKTGGDKWDF	ATSKMFAKNITLYA	QYSANSYIATFDV	DGKSTTC	AVDYQGLLKEPR	PTKAGYTFK	GWYDEKTDG	GKKWDF	ATDKMF	FANDITLYA		
19111:	DINLNAQFSINSYIATF	ENDGVVTSQTVDYQGL	LQEPTEPTKEGYTFK	GWYLAKTGGDKWDF	ATSKMFAKNITLYA	QYSANSYIATFDV	DGKSTTC	AVDYQGLLKEPR	PTKAGYTFK	GWYDEKTDG	GKKWDF	ATDKMF	FANDITLYA		
MG922918:	DINLNAQFSINSYIATF	ENDGVVTSQTVDYQGL	LQEPTEPTKEGYTFK	GWYLAKTGGDKWDF	ATSKMFAKNITLYA	QYSANSYIATFDV	DGKSTTC	AVDYQGLLKEPR	PTKAGYTFK	GWYDEKTDG	GKKWDF	ATDKMF	FANDITLYA		

	710	720	730	740	750	760	770	780	790	800
L101B2:	QFTKNFVAPPTTGGNT	PPPTNNGGNTPPSAN	IPGSNTSNTSGNSAST	STTMNAYDPYNSK	ASLPTTGSDSNALY	LLIGLLAVGTAMAL	TKKA	ASK		
L100A1:										
L201:	QFTKNFVAPPTTGGNT	PPPTNNGGNTPPSAN	IPGSNTSNTSGNSAST	STTMNAYDPYNSK	ASLPTTGSDSNALY	LLIGLLAVGTAV	ALTKKA	ASK		
L200:	QFTKNFVAPPTTGGNT	PPPTNNGGNTPPSAN	IPGSNTSNTSGNSAST	STTMNAYDPYNSK	ASLPTTGSDSNALY	LLIGLLAVGTAV	ALTKKA	ASK		
CC1/2c:										
P20:	QFTKNFVAPPTTGGNT	PPPTNNGGNTPPSAN	IPGSNTSNTSGNSAST	STTMNAYDPYNSK	ASLPTTGSDSNALY	LLIGLLAVGTAV	ALTKKA	ASK		
CC1/2b:	QFTKNFVAPPTTGGNT	PPPTNNGGNTPPSAN	IPGSNTSNTSGNSAST	STTMNAYDPYNSK	ASLPTTGSDSNALY	LLIGLLAVGTAV	ALTKKA	ASK		
P24:	QFTKNFVAPPTTGGNT	PPPTNNGGNTPPSAN	IPGSNTSNTSGNSAST	STTMNAYDPYNSK	ASLPTTGSDSNALY	LLIGLLAVGTAMAL	TKKA	ASK		
13932:	QFTKNFVAPPTTGGNT	PPPTNNGGNTPPSAN	IPGSNTSNTSGNSAST	STTMNAYDPYNSK	ASLPTTGSDSNALY	LLIGLLAVGTAV	ALTKKA	ASK		
19111:	QFTKNFVAPPTTGGNT	PPPTNNGGNTPPSAN	IPGSNTSNTSGNSAST	STTMNAYDPYNSK	ASLPTTGSDSNALY	LLIGLLAVGTAMAL	TKKA	ASK		
MG922918:	QFTKNFVAPPTTGGNT	PPPTNNGGNTPPSAN	IPGSNTSNTSGNSAST	STTMNAYDPYNSK	ASLPTTGSDSNALY	LLIGLLAVGTAMAL	TKKA	ASK		