

Caracterización genotípica de las cepas bacterianas obtenidas a partir de queso de hoja usando PCR en Tiempo Real

Genotypic characterization of bacterial strains obtained from leaf cheese using real-time PCR

Nadia Catalina Alfonso Vargas¹, Astrid Maribel Aguilera Becerra², Martin Orlando Pulido Medellín³, Luis Miguel Borrás Sandoval⁴, Claudia Patricia Jaimes Bernal⁵

Resumen

Introducción. Las enfermedades transmitidas por alimentos afectan la salud pública y la productividad económica. **Objetivo.** Caracterizar genotípicamente cepas bacterianas aisladas de muestras de queso de hoja de la región de la Hoya del río Suárez, Colombia, mediante la técnica de PCR en Tiempo Real (qPCR) para la detección de genes específicos de virulencia. **Materiales y métodos.** Se analizaron un total de 58 cepas bacterianas (15 cepas de *Salmonella* sp., 15 de *E. coli*, 8 de *S. aureus* y 20 de *Listeria* sp.), aisladas previamente de muestras de queso de hoja de la región de la Hoya del río Suárez, Colombia. Se efectuó la extracción de ADN genómico y la caracterización genotípica se realizó mediante qPCR utilizando primers para los genes *eaeA*, *nucA*, *hlyA* e *invA*, respectivamente. **Resultados.** La estandarización de la metodología fue exitosa, alcanzando una alta eficiencia y linealidad. En relación con la amplificación en las muestras, demostró ser altamente efectiva, 73,3% de cepas de *E. coli* fueron positivas para el gen *eaeA*, 100% de cepas de *S. aureus* para *nucA*, 100% de cepas de *Listeria* sp. Las modificaciones puntuales observadas en la curva de melting podrían sugerir la existencia de posibles variantes alélicas en estas cepas. Sin embargo, la ausencia de amplificación del gen *invA* en las 15 cepas de *Salmonella* sp. indica la necesidad de una futura evaluación molecular exhaustiva de estos aislamientos.

1 GRUPO DE INVESTIGACIÓN GRIBAC. UNIVERSIDAD DE BOYACÁ. Tunja, Colombia.
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6388-5796>
Scholar Google: <https://scholar.google.com/citations?hl=pt-BR&user=0WXjOIQAAAAJ>

2 GRUPO DE INVESTIGACIÓN GRIBAC. UNIVERSIDAD DE BOYACÁ. Tunja, Colombia.
ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-2892-6916>

3 GRUPO DE INVESTIGACIÓN GIDIMEVETZ UNIVERSIDAD PEDAGÓGICA Y TECNOLÓGICA DE COLOMBIA. Tunja, Colombia.
ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-4989-1476>

4 GRUPO DE INVESTIGACIÓN GIBNA. UNIVERSIDAD PEDAGÓGICA Y TECNOLÓGICA DE COLOMBIA. Tunja, Colombia.
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-3284-027X>

5 GRUPO DE INVESTIGACIÓN GRIBAC. UNIVERSIDAD DE BOYACÁ. Tunja, Colombia.
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-8034-190X>

Correspondencia: ncalfonso@uniboyaca.edu.co

Conclusión. Se logró estandarizar y caracterizar genotípicamente de forma exitosa tres de los cuatro patógenos evaluados mediante qPCR, validando la metodología para la detección de factores de virulencia en aislamientos bacterianos provenientes de queso de hoja.

Palabras clave: contaminación alimentaria (D005506), ADN bacteriano (D004269), Reacción en Cadena en Tiempo Real de la Polimerasa (D060888).

Abstract

Introduction. Foodborne diseases affect public health and economic productivity. **Objective.** To genotypically characterize bacterial strains isolated from queso de hoja (peeling cheese/soft white cheese wrapped in leaves) samples from the Hoya del río Suárez region, Colombia, using Real-Time PCR (qPCR) for the detection of specific virulence genes. **Materials and Methods.** A total of 58 bacterial strains (15 *Salmonella* sp. strains, 15 *E. coli*, 8 *S. aureus*, and 20 *Listeria* sp.), previously isolated from queso de hoja samples from the Hoya del río Suárez region, Colombia, were analyzed. Genomic DNA extraction was performed, and genotypic characterization was conducted using qPCR with primers for the *eaeA*, *nucA*, *hlyA*, and *invA* genes, respectively. **Results.** The standardization of the methodology was successful, achieving high efficiency and linearity. Regarding amplification in the samples, it proved to be highly effective: 73.3% of *E. coli* strains were positive for the *eaeA* gene, 100% of *S. aureus* strains for *nucA*, and 100% of *Listeria* sp. strains for *hlyA*. The specific modifications observed in the melting curve could suggest the existence of possible allelic variants in these strains. However, the absence of *invA* gene amplification in the 15 *Salmonella* sp. strains indicates the need for a future exhaustive molecular evaluation of these isolates. **Conclusion.** The methodology was successfully standardized and genotypically characterized for three out of four pathogens evaluated by qPCR, validating the methodology for the detection of virulence factors in bacterial isolates from leaf cheese.

Keywords: food contamination (D005506), bacterial DNA (D004269), Real-Time Polymerase Chain Reaction (D060888).

Introducción

Las enfermedades transmitidas por alimentos constituyen un problema grave de salud pública global que afecta no sólo la salud individual, sino también la productividad económica de comunidades, regiones y países (1). Se estima que cada año alrededor de 600 millones de personas caen enfermas por consumir alimentos contaminados, lo cual deriva en cientos de miles de muertes, costos elevados de atención médica, pérdida de jornadas laborales, deterioro del turismo, reducción de la confianza en los productos alimenticios y barreras al comercio internacional (2). Particularmente en los países de ingresos bajos y medios, el impacto económico asociado a las enfermedades alimentarias puede ascender a decenas de miles de millones de dólares al año, considerando tanto los costos sanitarios directos como las pérdidas en productividad y en acceso a mercados (3).

En este contexto, los quesos artesanales, especialmente los elaborados con leche cruda o procesadas bajo condiciones que no cumplen completamente buenas prácticas de manufactura (BPM), representan un riesgo biológico significativo (4). Las condiciones de ordeño, el manejo del agua, la higiene de los utensilios y de los ambientes de producción, así como los procesos de maduración, son factores críticos que pueden favorecer la proliferación de microorganismos indicadores de contaminación o

patógenos como *Escherichia coli*, *Salmonella* spp., *Listeria monocytogenes* y *Staphylococcus aureus* (5).

Para mitigar estos riesgos, es indispensable la implementación de BPM, controles sanitarios adecuados y regulaciones eficaces (6). Pero también, lo es la capacidad de detectar y caracterizar rápidamente los patógenos implicados, lo cual no siempre es factible con los métodos clásicos de cultivo, debido al tiempo que consumen, la necesidad de condiciones específicas y que algunos microorganismos pueden estar presentes en bajas concentraciones o de forma viable pero no cultivable (7).

Consecuentemente, las técnicas moleculares se establecen como herramientas específicas y sensibles para la identificación y caracterización de microorganismos (7). Entre ellas, la reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa (qPCR o PCR en Tiempo Real cuantitativa) permite una identificación específica, sensible y relativamente rápida de microorganismos patógenos, incluso cuando están en bajas concentraciones o en matrices complejas como el queso. Estudios recientes han utilizado qPCR o multiplex qPCR para detectar simultáneamente *Salmonella* spp., *E. coli* O157, *L. monocytogenes* y *S. aureus* en alimentos, mostrando una alta correlación con métodos de cultivo, alta eficiencia, límites de detección bajos y ventaja en términos de tiempo (8).

Por lo que la aplicación de buenas prácticas en la producción artesanal, junto con técnicas moleculares modernas como la qPCR para vigilancia microbiológica, es esencial para reducir los riesgos que los quesos artesanales representan tanto para la salud pública como para la economía local y nacional (9). La aplicación de estas herramientas permite detectar patógenos oportunamente, prevenir brotes, proteger consumidores y mantener la viabilidad productiva y comercial de los productores artesanales (10). Hasta la fecha no se encuentran estudios que representen análisis de quesos artesanales provenientes de la hoya del río Suárez en los que se evidencie el uso de qPCR. El objetivo del presente trabajo es caracterizar genotípicamente cepas bacterianas aisladas de muestras de queso de hoja de la región de la Hoya del río Suárez, Colombia, mediante la técnica de PCR en Tiempo Real (qPCR) para la detección de genes específicos de virulencia.

Materiales y métodos

Diseño/Tipo de Estudio

Muestreo:

Se utilizaron un total de 58 cepas bacterianas, aisladas previamente de muestras de queso de hoja de la región de la cuenca del río Suárez, Colombia. La selección incluyó: 15 cepas de *Salmonella sp.*, 15 de *E. coli*, 8 de *S. aureus* y 20 de *Listeria sp.*

Reactivación de las cepas: se inocularon los microorganismos en caldo BHI, posteriormente se incubaron a 37°C por 24 horas. A partir del crecimiento en el medio BHI se repicaron en agar MacConkey. Se confirmó morfología por medio de la coloración de Gram y finalmente se repicaron en Agar Nutritivo.

Extracción de ADN genómico bacteriano:

Para efectuar la extracción de ADN empleando el siguiente procedimiento: se partió de 3 ml de caldo BHI de cada una de las cepas, se adicionaron 600 ul de solución de lisis nuclear, se incubaron a 80°C por 5 minutos, se adicionaron 3 ul de RNAsa y se incubaron a 37°C por 15 minutos. Luego de ello se adicionaron 200 ul de solución de precipitación de proteínas y se mezclaron en el vórtex por 20 segundos. Se incubaron por 5 minutos a -20°C, se centrifugaron a 13000 rpm por 3 minutos. Se adicionaron 600 ul de isopropanol. Se volvió a centrifugar a 13000 rpm por 2 minutos. Se descartó el sobrenadante y se adicionaron 600 ul de etanol, se realizó la última centrifugación a 13000 rpm por 2 minutos. El pellet se dejó secar durante toda la noche. Finalmente, se adicionaron 50 ul de Solución de Rehidratación de ADN para su posterior uso.

Evaluación de la integridad del ADN:

La calidad y concentración de la muestra se determinó empleando el espectrofotómetro NanoDrop™ 2000c (Thermo Scientific,

USA). Adicionalmente, el material genético fue evaluado mediante electroforesis en gel de agarosa al 1,0% a 80 voltios por 45 minutos y fue visualizado con SyberSafe 1,0 mg/ml (Invitrogen, USA) en un transiluminador UltraSlim Led Illuminator (ABM), para su registro.

Caracterización genotípica de las cepas bacterianas usando PCR en Tiempo Real:

Para la caracterización genotípica de las cepas bacterianas empleando la técnica

de PCR en Tiempo Real, se utilizó BrightGreen 2X qPCR MasterMix - ROX (ABM), en un volumen total de 20 ul por reacción, la cual contenía 1X qPCR MasterMix, 10 ng/uL de ADN, 10 pmol/uL de cada uno de los primers y 6 ul de agua destilada estéril. Los primers empleados fueron (Tabla 1):

Tabla 1. Primers empleados para la caracterización genotípica de las cepas en estudio.

Microorganismo	Gen blanco	Secuencia de Oligonucleótidos	Tamaño (pb)	Referencia
<i>Listeria monocytogenes</i>	<i>hly</i>	F: 5'CATTAGTGGAAAAGATGGAATG3' R: 5'GTATCCTCCAGAGTGATCGA3'	730	Kim <i>et al.</i> , (2014) (11).
<i>Salmonella</i> sp.	<i>invA</i>	F: 5'TATCGCCACGTTCTGGGCAA3' R: 5'TCGCACCGTCAAAGGAACC3'	284	Rahn <i>et al.</i> , (1992) (12).
<i>Escherichia coli</i>	<i>eaeA</i>	F: 5GTGGCGAATACTGGCGAGACT3' R: 5'CCCCATTCITTTTCACCGTCG3'	890	Kargar <i>et al.</i> , (2015) (13).
<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>nucA</i>	F: 5'GCGATTGATGGTGATACGGTT3' R: 5'AGCCAAGCCTTGACGAACATAAGC3'	276	Merchan <i>et al.</i> , (2021) (14)

Las condiciones térmicas de amplificación se describen a continuación (Tabla 2):

Tabla 2. Condiciones de PCR para la amplificación de los genes seleccionados.

Gen blanco	Desnaturalización inicial	Desnaturalización	Alineamiento	Extensión	Ciclos	Curva de disociación
<i>hly</i>	95°C x 2 min	95°C x 15 seg	60°C x 1 min	72°C x 30 seg	30	Kim <i>et al.</i> , (2014) (11).
<i>invA</i>	94°C x 1 min	95°C x 15 seg	56°C x 2 min	72°C x 3 min	30	Rahn <i>et al.</i> , (1992) (12).
<i>eaeA</i>	95°C x 20 seg	95°C x 15 seg	58°C x 40 seg	72°C x 5 min	30	Kargar <i>et al.</i> , (2015) (13).
<i>nucA</i>	95°C x 2 seg	95°C x 15 seg	58°C x 40 seg	72°C x 2 min	30	Merchan <i>et al.</i> , (2021) (14)

Para ejecutar este proceso se emplearon como controles positivos las cepas de *Escherichia coli* ATCC®259228™, *Listeria monocytogenes* ATCC®15313™, *Salmonella* sp (aislada a partir de muestras clínicas y caracterizada en estudios previos) y *Staphylococcus aureus* ATCC®29213™.

Resultados

Extracción de ADN de las cepas bacterianas obtenidas de queso fresco de hoja: a partir de las cepas bacterianas aisladas de queso de hoja de la región de la cuenca del río Suárez, Colombia. Se extrajo ADN de

15 cepas de *Salmonella* sp., 15 cepas de *E. coli*, 8 cepas de *S. aureus* y 20 cepas de *Listeria* sp. La caracterización de género bacteriano fue efectuada por PCR Convencional.

El material genético extraído se analizó mediante electroforesis de gel de agarosa (Figura 1). Los resultados confirmaron una extracción de ADN adecuada a partir de las cepas bacterianas aisladas de quesos. Esto evidencia la calidad del método de extracción empleado, para lo cual se utilizó el Kit Wizard® Genomic DNA Purification Kit Promega.

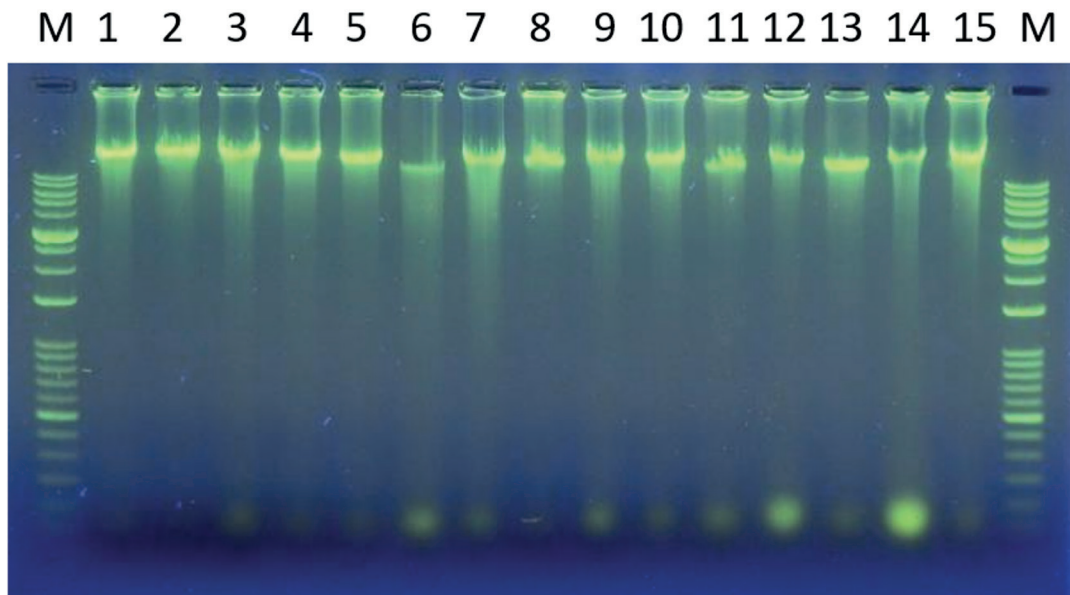


Figura 1. Electroforesis de la extracción de ADN de cepas aisladas de quesos artesanales de hoja molidos empleando el Wizard® Genomic DNA Purification Kit de Promega.

Nota: Pozos de 1 a 15 cepas de *E. coli* aisladas a partir de quesos frescos de hoja. M: Marcador.

La calidad y concentración de las muestras de ADN se evaluaron utilizando el espectrofotómetro NanoDrop™ 2000c

(Thermo Scientific, USA). Los resultados confirmaron que tanto la calidad como la concentración de las extracciones fueron

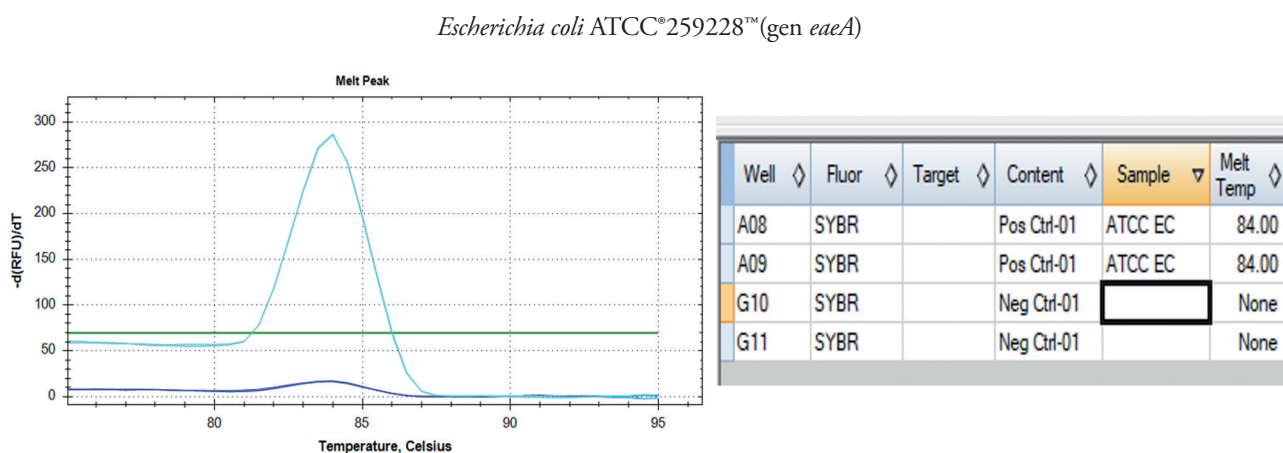
óptimas. Posteriormente, se prepararon las soluciones de trabajo de cada muestra de ADN ajustando la concentración final a 10 ng/ul para los análisis posteriores.

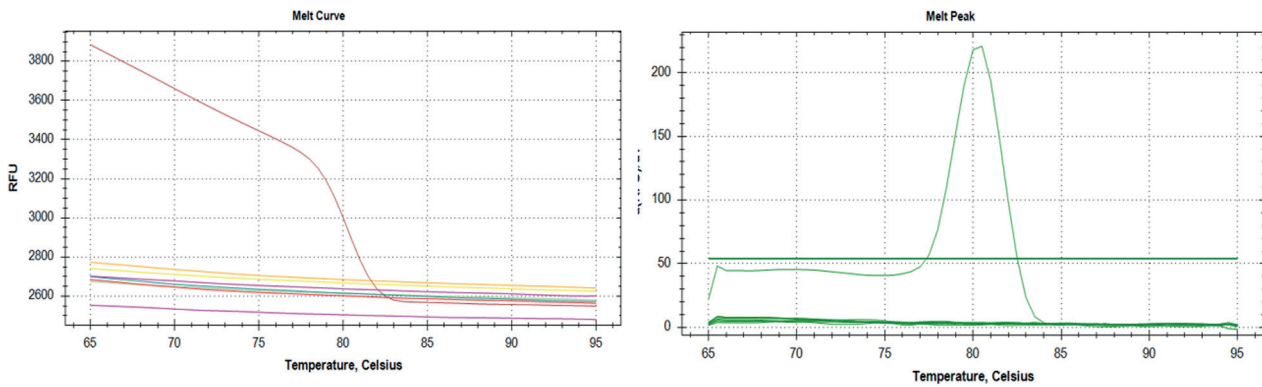
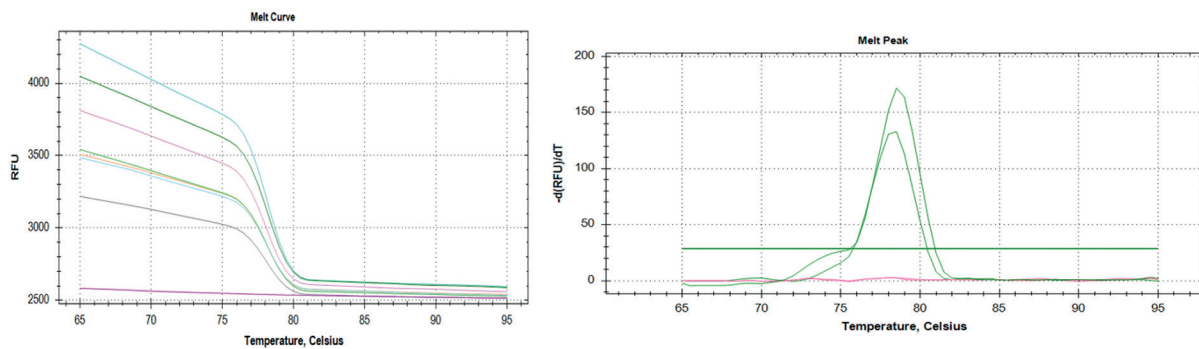
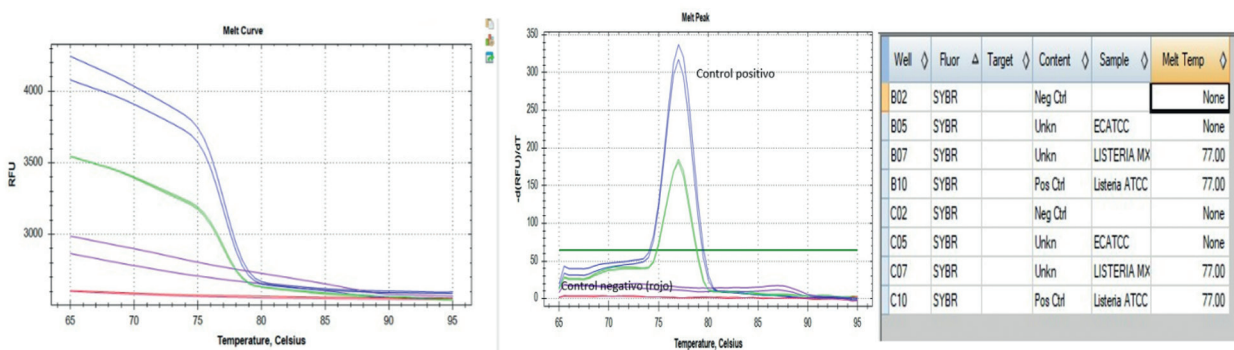
Estandarización y caracterización genotípica de las cepas bacterianas obtenidas a partir de queso de hoja usando PCR en Tiempo Real: inicialmente, se procedió a estandarizar las reacciones de PCR en Tiempo Real y los protocolos de amplificación basados en la literatura (11, 12, 13). Para la estandarización de los genes que codifican para *hlyA*, *invA*, *eaeA* y *nucA* fueron empleadas cepas control de *Escherichia coli* ATCC®259228™, *Listeria monocytogenes* ATCC®15313™, *Salmonella* sp caracterizada en estudios previos, aislada a partir de muestras clínicas y *Staphylococ-*

cus aureus ATCC®29213™, cuyo material genético fue extraído por medio del Kit de Promega ®.

El límite de detección fue determinado utilizando el *Threshold* (Ct), superior a 35 la reacción se consideraba como negativa para los genes *hlyA*, *invA*, *eaeA* y *nucA*. Por el contrario, un número inferior a 35 se consideró como un resultado positivo. El análisis de la curva de disociación (T_m) de los genes evaluados mostró una temperatura constante de 84°C para *E. coli* ATCC®259228™(gen *eaeA*), 80.5°C para *Salmonella* sp (gen *invA*), 79°C para *S. aureus* ATCC®29213™ (gen *nucA*) y 77°C para *L. monocytogenes* ATCC®15313™ (gen *hlyA*) (Figura 2).

Figura 2. Estandarización de la reacción de PCR en Tiempo Real en ADN de *Escherichia coli* ATCC®259228™(gen *eaeA*), *Salmonella* sp (gen *invA*) *S. aureus* ATCC®29213™ (gen *nucA*) y *L. monocytogenes* ATCC®15313™(gen *hlyA*).



Salmonella sp (gen *invA*)*S. aureus* ATCC®29213™ (gen *nucA*)*L. monocytogenes* ATCC®15313™ (gen *hlyA*)

Fuente: Autores

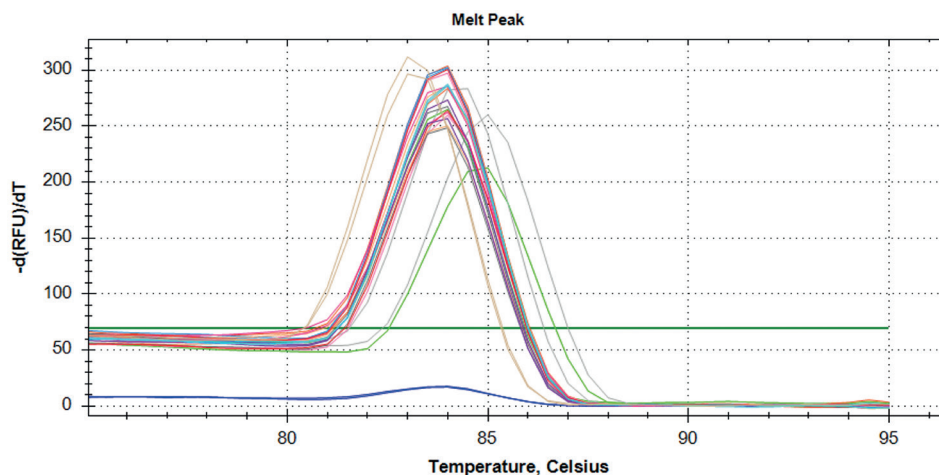
Posteriormente, fueron procesadas las muestras de ADN de las bacterias aisladas del queso de hoja por duplicado. En general, los criterios de calidad de todos los genes evaluados fueron el control negati-

vo con un Ct superior a 38 y como control positivo un Ct menor a 30, el rango de eficiencia estuvo entre 90 y 110, la correlación entre el Ct y el número de copias de cada gen generó una recta con un R^2 de 0.98.

En las 15 cepas de *E. coli* en las cuales se emplearon los primers del gen *eaeA*, el análisis de la curva de disociación (T_m) mostró una temperatura del producto de 84°C

en 73,3% (n=11) (Figura 3). Sin embargo, se evidenció una modificación en la T_m de 83°C y 83,5°C en 20% (n=3) y 6% de las muestras no generó ninguna lectura (n=1).

Figura 3. Procesamiento de las cepas de *E. coli* aisladas de queso fresco de hoja por medio de PCR en Tiempo Real.

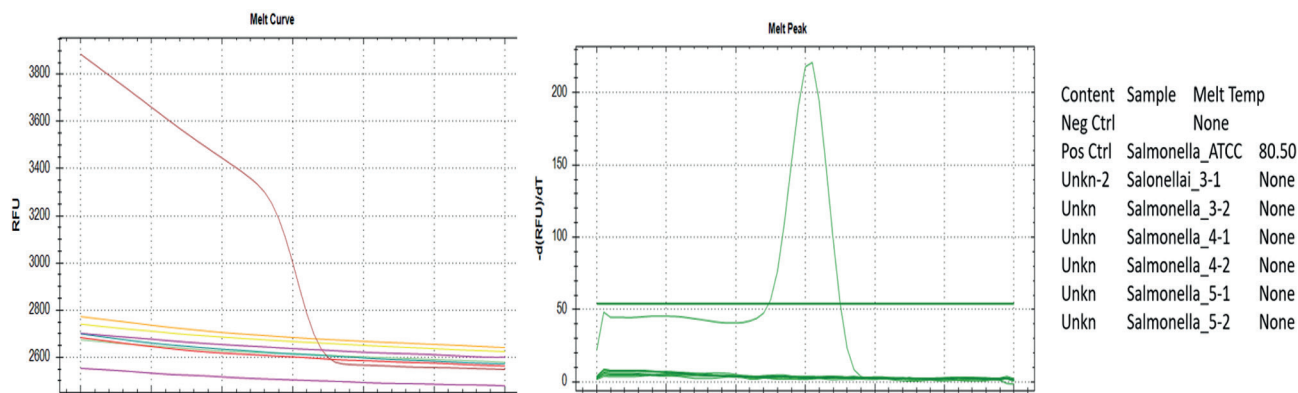


Fuente: Autores

En las 15 cepas de *Salmonella sp* en las cuales se emplearon los primers del gen *inv* en el análisis de la curva de disociación (T_m) se observó una temperatura del producto de 80,5°C en el control positivo. Sin embargo,

el 100% (n=15) cepas fueron negativas (Figura 4). Dada la negatividad se hace necesario realizar una re-caracterización (como la secuenciación) para confirmar su verdadera especie en próximas investigaciones.

Figura 4. Procesamiento de las cepas de *Salmonella sp.* aisladas de queso de hoja por medio de PCR en Tiempo Real.

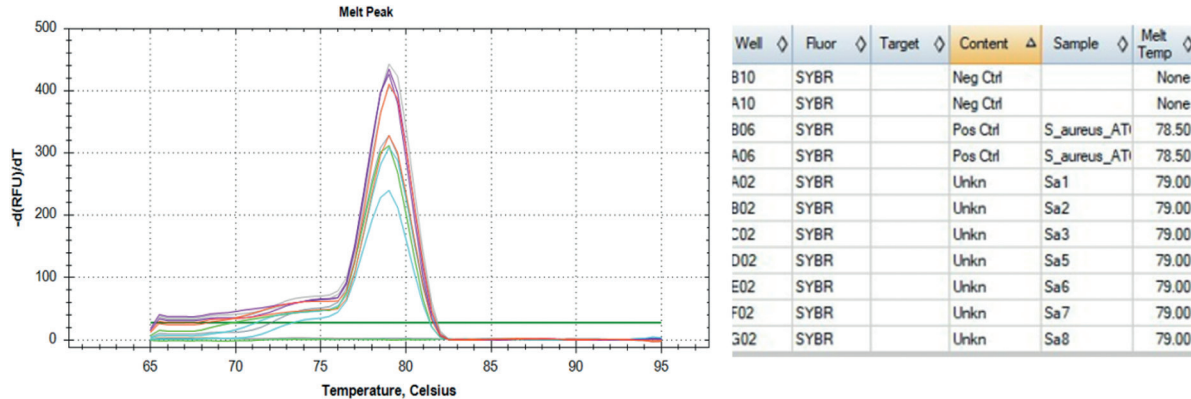


Fuente: Autores

En las 8 cepas de *S. aureus* en las cuales se emplearon los primers del gen *nucA*, al analizar la curva de disociación (T_m) se obser-

vó una temperatura del producto de 79°C en 100% de las cepas (Figura 5).

Figura 5. Procesamiento de las cepas de *S. aureus* aisladas de queso fresco de hoja por medio de PCR en Tiempo Real.

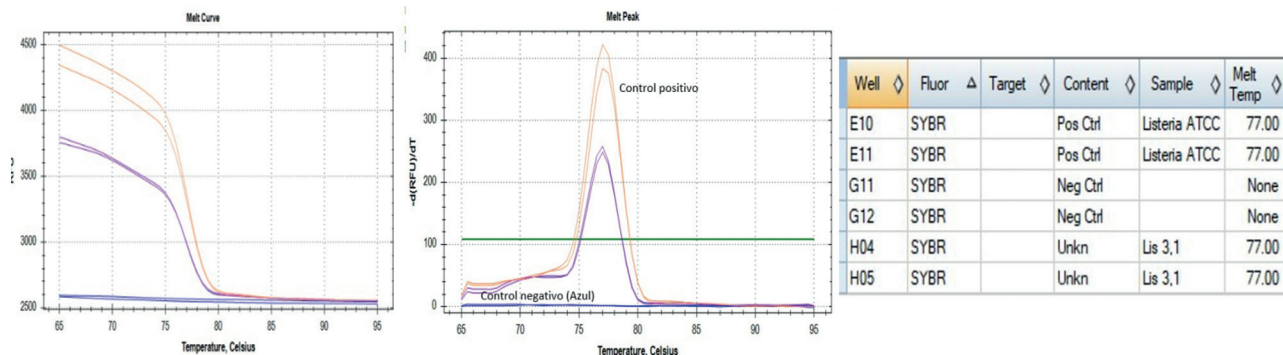


Fuente: Autores

En las 20 cepas de *Listeria sp* en las cuales se emplearon los primers del gen *hlyA*, al analizar la curva de disociación (T_m) se

observó una temperatura del producto de 77°C en 100% de las muestras procesadas (Figura 6).

Figura 6. Procesamiento de las cepas de *Listeria sp.* aisladas de queso fresco de hoja por medio de PCR en Tiempo Real.



Fuente: Autores

En la tabla 3 se presentan las frecuencias de cada uno de los microorganismos positivos aislados en el presente estudio.

Tabla 3. Frecuencia asilamientos positivos.

Microorganismo	Frecuencia Positivos/ %
<i>Escherichia coli</i>	11 (73.3%)
<i>Salmonella sp</i>	0 (0%)
<i>S. aureus</i>	15 (100%)
<i>L. monocytogenes</i>	20 (100%)

Fuente: Autores

Discusión

La relevancia de los hallazgos moleculares de este estudio debe analizarse a la luz de la normativa sanitaria colombiana, específicamente aquella que establece los criterios microbiológicos de inocuidad para productos lácteos como el queso. Actualmente, el Instituto Colombiano de Normas Técnicas (NTC750) establece límites estrictos para la presencia de patógenos en productos listos para el consumo (15). El requisito fundamental es la ausencia de microorganismos altamente peligrosos como *Salmonella sp* y *Listeria monocytogenes*. La detección de genes de virulencia específicos para *S. aureus* (*nucA*), *E. coli* patógena (*eaeA*) y *Listeria sp.* (*hlyA*) en este estudio evidenciaron la presencia de *Listeria monocytogenes*, *S. aureus* y *E. coli*; por lo que ninguno de los quesos evaluados cumpliría con la normatividad vigente para Colombia.

Los procesos de identificación microbiana clásicos requieren un mínimo de cinco días para establecer la presencia de contami-

nación microbiana y diez días adicionales para la identificación de la especie como en el caso de *L. monocytogenes* (17). Por lo que es indispensable el uso de técnicas rápidas y sensibles como lo son la PCR y la PCR en Tiempo Real, las cuales permiten la detección directamente en el alimento y en los microorganismos aislados y permiten llevar un control eficiente en los procesos de producción, así como de las prácticas de higiene y agilizan la toma de decisiones en la industria (17).

Para poder ejecutar adecuadamente estas técnicas es necesario obtener un material genético de calidad y en concentración adecuada (18). Asimismo, el ADN extraído debe estar libre de proteínas y detritos celulares; por lo que este paso es de gran relevancia y debe seleccionarse el mejor método de extracción, dentro de la gran variedad disponible en el mercado (19, 20). Además, los diversos métodos de extracción deben analizarse y ajustarse de acuerdo con las características de cada muestra, ya que generan resultados variables en cuanto a la eficiencia en la obtención de ADN

a partir de diferentes matrices alimentarias (21). Esto debido a la presencia de ciertos compuestos en el alimento como fenoles, glucógeno, grasas y otras sustancias orgánicas que pueden actuar como inhibidores de la extracción y de la PCR, dando como resultado falsos negativos (22).

En el proceso de estandarización de la extracción de ADN a partir de muestras de queso fresco de hoja, se evidenció una gran dificultad para la obtención de un buen rendimiento de ADN, dado que en la totalidad de ensayos realizados no se pudo obtener una muestra adecuada de ADN. Lo que concuerda con lo reportado por Canales et al., 2022 en donde la presencia de grasa dificulta la obtención de ADN a partir de este tipo de productos lácteos (23). Esto debido a que el ADN queda retenido en la matriz proteica en conjunto con vitaminas, minerales y parte del agua, lo que hace que los ácidos nucleicos queden contenidos dentro del cuajo, por lo que la obtención de un lisado homogéneo es complejo, dando como resultado un bajo rendimiento en la pureza y cantidad de ADN extraído (24). Esto se asocia con los resultados del análisis químico de los quesos frescos de hoja, en donde los porcentajes de grasa estuvieron en un rango entre 5.1% - 14.3%, así como los de proteína cruda 12.6% - 22.6%, afectando el rendimiento en la extracción.

Por su parte la extracción de ADN a partir de las cepas bacterianas obtenidas de queso

fresco de hoja empleando el Wizard® Genomic DNA Purification Kit de Promega presentó excelentes resultados, con rendimientos de extracción óptimos y buena calidad de ADN. Lo que concuerda con el estudio de Abed (2013) en cultivos de *Lactobacillus* sp aislados de productos lácteos, en donde se confirmó la extracción de ADN genómico empleando el mismo kit de extracción, con niveles elevados de pureza y concentración del producto (25).

De la misma forma en *E. coli* el uso de este kit de extracción en muestras de queso fresco presentó una óptima calidad, sin presencia de contaminantes como proteínas y ARN (26, 27). Asimismo, en *Salmonella* sp, el uso de este kit permitió la obtención de un ADN de alta pureza y calidad (28). Igualmente, para *S. aureus* se presentó un buen rendimiento de la extracción de ADN, lo que contrasta por lo reportado por Abbas y Nasser en 2016, donde la extracción presentó una mayor resistencia a la lisis celular, debido a la alta presencia de peptidoglucano en la pared celular por lo que la pureza y rendimiento fueron menores a otros kits de extracción empleados (29). Sin embargo, Salauddin y colaboradores en 2020 aislaron y extrajeron ADN con bastante éxito de cepas provenientes de leche, lo que le permitió su adecuada identificación (30). En *Listeria* sp. el rendimiento de la extracción por medio del kit generó buenos resultados, lo que es similar a los resultados de Ahmed en 2019, donde se

extrajo ADN de buena calidad a partir de cepas de *L. monocytogenes* aisladas de alimentos procesados, permitiendo posteriormente llevar a cabo técnicas de identificación molecular de forma efectiva (31).

En relación a la estandarización y ejecución de la técnica de PCR en Tiempo Real en cepas bacterianas obtenidas a partir de queso fresco de hoja, fueron empleados protocolos previamente estandarizados y adaptados al material genético obtenido en el estudio (11, 12, 13). Esta técnica es una modificación de la PCR convencional, en la que son empleados fluorocromos que permiten hacer el seguimiento de la reacción en Tiempo Real. La química empleada en este estudio fue el SyBER Green, el cual es un intercalante fluorescente inespecífico que al interactuar con el ADN emite una señal fluorescente proporcional a la cantidad de ADN amplificado (32). La sensibilidad de la técnica depende de la especificidad, la secuencia y la temperatura de anillamiento de los primers (33).

Se han cuantificado múltiples patógenos empleando la técnica de PCR en Tiempo Real. En Japón, en el año 2013 fueron analizadas un total de 126 muestras de quesos artesanales, identificando la presencia de tres patógenos *L. monocytogenes*, *E. coli* patógena y *Salmonella* sp., mediante el uso de PCR en Tiempo Real, se detectaron coliformes en 25 muestras (19,8%), solo una muestra amplifica para el gen *ipaH*, lo que

sugiere una contaminación con *E. coli* enteroinvasiva o con *Shiguelia* sp (34). Así como es reportado en un estudio realizado por Soto-Varela y colaboradores en 2018, en donde detectaron la presencia de *Salmonella* spp. y *Listeria* spp en muestras de queso artesanal costeño fresco (35, 36). Estos resultados coinciden con los obtenidos en este estudio, si bien no se parte de la matriz proteica del queso para la obtención del ADN, sí se realiza la estandarización y ejecución de la técnica a partir del ADN de los aislamientos originarios de dicha matriz, obteniendo una alta eficiencia en la amplificación y la especificidad de los primers seleccionados.

En otro estudio, se realizó un ensayo con PCR en Tiempo Real para la detección simultánea de *E. coli* O157:H7, *Salmonella* spp., *S. aureus* y *L. monocytogenes* en alimentos sujetos a congelación. Para la amplificación se emplearon iniciadores específicos para el gen *Stx2a* presente en *E. coli* O157:H7, iniciadores para amplificar el gen *invA* de *Salmonella* spp, para *S. aureus* se amplificó el gen Cap8A-B y para *L. monocytogenes* el gen *hlyA*, los cuales fueron sensibles y específicos (37). Estos hallazgos son similares a los obtenidos en el presente estudio, indicando que el gen seleccionado para la detección de *L. monocytogenes* es específico del microorganismo y puede ser empleado en el estudio de diversas matrices alimentarias.

Sin embargo, no se obtuvo amplificación para el gen *invA* en los aislamientos identificados presuntivamente como *Salmonella* sp. El gen empleado asociado a la virulencia de *Salmonella* sp., en relación a la invasión epitelial, no fue detectado en ninguna de las muestras aisladas (38). Esto se pudo ocasionar por el aislamiento en el medio Salmone-lla-Shigella, donde ambas bacterias pueden presentar colonias incoloras, ya que no fermentan lactosa (39, 40). La especificidad molecular con el gen empleado es bastante alta, ya que ha reportado estar presente en todas las cepas de *Salmonella* sp., aisladas (37). Por lo que se sugiere para futuros estudios caracterizar bioquímica y molecularmente las cepas de *Salmonella* sp. aisladas del queso, antes de dar paso a la detección por otras técnicas moleculares más avanzadas.

La detección simultánea de *L. monocytogenes*, *E. coli* O157:H7, *B. cereus*, *Salmonella* spp. y *S. aureus* en leche con bajo contenido de grasa, utilizando PCR en Tiempo Real y los iniciadores *actA*, *fliC*, *hbl*, *invA*, *ileS* respectivamente, fue efectiva. En este estudio, fueron amplificados con éxito los productos deseados sin la ocurrencia de bandas inespecíficas, de igual forma la amplificación fue obtenida a partir de 1 pg de ADN y se detectaron 10 células/mL (11, 41). Estos resultados se relacionan con el primer empleado para *E. coli* y se identifican genes alternativos para detectar cepas de relevancia patógena en alimentos. Además, este estudio aporta evidencia adicional respecto

al diseño y estandarización de los primers para detección de *S. aureus*, ya que han sido previamente empleados genes como *tuf*, otras secuencias del gen *nuc*, *comFA*, *entB*, *mecA*, *femA*, *femB*, *kan*, *sa422* entre otros (42, 43, 44).

Pocos estudios utilizando técnicas de PCR en Tiempo Real han sido reportados en Colombia. En 2012, fue realizado un trabajo cuyo objetivo fue determinar la prevalencia de *Salmonella* spp., *L. monocytogenes* y *E. coli* O157:H7 en leche cruda bovina del sistema de producción doble propósito, mediante técnicas microbiológicas convencionales y moleculares. En este estudio se concluyó que la PCR multiplex fue altamente sensible capaz de detectar 1 UFC/mL de leche, de cada microorganismo, además permitió la detección de estos microorganismos de manera simultánea reduciendo costos y tiempo de análisis. En cuanto a la prevalencia de los microorganismos, se evidenció un alto porcentaje de *E. coli* O157:H7 con 3.7%, *Salmonella* spp., con 0.82% y *L. monocytogenes* con el 0.3% de las muestras examinadas, en 600 fincas del sistema de producción de doble propósito (42, 43, 45). Igualmente, en el estudio realizado por Baquero en 2006, evidenció la prevalencia de *Listeria* spp en quesos artesanales distribuidos en una plaza de mercado en Cáqueza, Cundinamarca (47).

Los resultados obtenidos en el presente estudio evidenciaron una adecuada estandarización y adaptación, esto debido a que

contaron con una eficiencia en cada uno de los ensayos entre 90 y 110%. Asimismo, el coeficiente de determinación (R^2) fue de 0.98 indicando una buena eficiencia y linealidad de cada una de las reacciones. Lo que se relaciona a lo reportado por diversos autores que han informado resultados similares, como es el caso en donde validaron esta misma técnica para identificación bacteriana presentando una eficiencia del 93% y un R^2 de 0.99 (47,48). Igualmente, los resultados presentados por Leza-Leza en 2022, en donde optimizaron la técnica de qPCR para la detección de *Salmonella* sp, con una eficiencia del 103% y variación menor al 6% en repetibilidad y reproducibilidad (49). Asimismo, los controles negativos no mostraron señal de amplificación, mientras que los controles positivos arrojaron valores constantes, validando la ausencia de contaminación, así como la sensibilidad del sistema.

Además, el análisis de la curva de melting o disociación reveló un único pico definido para cada uno de los genes evaluados, sin presencia de picos inespecíficos o dímeros de cebadores, confirmando la especificidad del ensayo. Lo cual se ha reportado en otros estudios en donde el análisis detallado de la curva de melting, permiten detectar y ajustar la presencia de picos adicionales, mejorando así la fiabilidad cuantitativa del ensayo; asimismo, un único pico confirma la homogeneidad del producto y la ausencia de amplificación inespecífica (50, 51).

Sin embargo, en el presente estudio, se evidenció variación en la temperatura de la curva de melting en algunas muestras de *E. coli* de 84°C a 83°C y 83.5°C y de *S. aureus* 67°C y 79°C. Por otra parte, para *E. coli* se han reportado en diversos estudios esta situación; como en donde se analizó la curva de melting de alta resolución, donde se identificó la variación de la temperatura entre 84.6°C y 85.6°C, demostrando que estas pequeñas variaciones de temperatura permiten discriminar entre variantes alélicas de esta cepa bacteriana (52), lo que puede ser un hallazgo exploratorio que requiere confirmación. Asimismo, se ha reportado en otro estudio de Wang en 2017, en donde se observaron diferencias de temperatura de hasta 1°C entre genes amplificados en *E. coli*, reflejando la presencia de variantes en las secuencias genéticas (53).

Conclusiones

La estandarización y caracterización genotípica de las cepas mediante PCR en Tiempo Real fue efectiva. Los resultados para *E. coli* analizando el gen *eaeA*, para *S. aureus* analizando el gen *nucA* y para *Listeria* sp analizando el gen *hlyA* validaron la metodología de detección. Este éxito en la caracterización genotípica es un paso crucial para comprender la seguridad microbiológica en la producción de queso de hoja artesanal.

Financiación: Universidad de Boyacá y Universidad Pedagógica y Tecnológica de Colombia

Agradecimientos: Un especial agradecimiento a la Universidad de Boyacá y a la Universidad Pedagógica y Tecnológica de Colombia por el apoyo en esta investigación.

Conflictos de interés: No presentan ningún conflicto de intereses.

Referencias

- Chirino-Vega I, Flores-Pérez J, Gutiérrez-Cortés R. Inocuidad alimentaria y enfermedades transmitidas por alimentos (ETAS); sus efectos en la salud humana: una revisión. FI-ADMIN. 2024;1(1):50-65.
- World Bank. Food-borne Illnesses Cost US\$ 110 Billion Per Year in Low- and Middle-Income Countries [Internet]. Washington, DC: World Bank; 2018 Oct 23 [citado 2025 Oct 10]. Disponible en: <https://www.worldbank.org/en/news/press-release/2018/10/23/food-borne-illnesses-cost-us-110-billion-per-year-in-low-and-middle-income-countries>
- Grace D. Burden of foodborne disease in low-income and middle-income countries and opportunities for scaling food safety interventions. Food Security. 2023;15(6):1475–88. Disponible en: <https://link.springer.com/article/10.1007/s12571-023-01391-3>
- Pineda AP, Campos GZ, Pimentel-Filho NJ, Franco BDM, Pinto UM. Brazilian artisanal cheeses: diversity, microbiological safety, and challenges for the sector. Front Microbiol. 2021;12:732. Disponible en: <https://www.frontiersin.org/journals/microbiology/articles/10.3389/fmicb.2021.666922/full>
- Carneiro de Albuquerque TN, Campos GZ, d'Ovidio L. Unveiling Safety Concerns in Brazilian Artisanal Cheeses: A Call for Enhanced Ripening Protocols and Microbiological Assessments. Foods. 2024;13(11):1644. Disponible en: https://www.mdpi.com/2304-8158/13/11/1644?utm_source=chatgpt.com
- Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura, Organización Mundial de la Salud. Leche y productos lácteos. Segunda edición. Roma: FAO/OMS; 2011. Disponible en: <https://openknowledge.fao.org/server/api/core/bitstreams/0ea33d58-0d8a-4992-bc36-f7c222f3906d/content>
- Palomino-Camargo C, González-Muñoz Y. Técnicas moleculares para la detección e identificación de patógenos en alimentos: ventajas y limitaciones. Rev Peru Med Exp Salud Pública. 2014;31(3):535–46. Disponible en: <https://www.scielosp.org/pdf/rpmesp/2014.v31n3/535-546/es>
- Cestari MG, Otero M, Cárdenas L, Otero I. Estandarización de PCR múltiple para identificación simultánea de los patógenos E. coli, S. aureus y L. monocytogenes en queso blanco. Rev Fac Farmacia, UCV. 2024;87(3):209–22. Disponible en: https://www.researchgate.net/publication/386553370_Estandarizacion_de_PCR_multiple_para_identificacion_simultanea_de_los_patogenos_E_coli_S_aureus_y_L_monocytogenes_en_queso_blanco
- Enciso-Martínez Y, Rivera-Ortega AI. Aplicaciones de las técnicas moleculares en inocuidad alimentaria. CIENCIAUANL [Internet]. 2 de noviembre de 2023 [citado 10 de octubre de 2025];23(104):20-6. Disponible en: <https://cienciauanl.uanl.mx/ojs/index.php/revista/article/view/169>
- Yáñez, Edna, Salim Máttar, and Alba Durango. Determinación de Salmonella spp. por PCR en Tiempo Real y método convencional en canales de bovinos y en alimentos de la vía pública de Montería, Córdoba. Infectio 12.4 (2008): 246-253. Disponible en: http://www.scielo.org.co/scielo.php?pid=S0123-93922008000400003&script=sci_arttext
- Kim J-H, Rhim S-R, Kim K-T, Paik H-D, Lee J-Y. Simultaneous Detection of Listeria monocytogenes, Escherichia coli O157: H7, Bacillus cereus, Salmonella spp., and Staphylococcus aureus in Low-fatted Milk by Multiplex PCR. Korean Journal for Food Science of Animal Resources. 2014;34(5):717.

12. Rahn K, De Grandis S, Clarke R, McEwen S, Galan J, Ginocchio C, et al. Amplification of an *invA* gene sequence of *Salmonella typhimurium* by polymerase chain reaction as a specific method of detection of *Salmonella*. *Molecular and cellular probes*. 1992;6(4):271-9.
13. Kargar M, Homayoon M. Prevalence of shiga toxins (*stx1*, *stx2*), *eaeA* and *hly* genes of *Escherichia coli* O157:H7 strains among children with acute gastroenteritis in southern of Iran. *Asian Pacific journal of tropical medicine*. 2015;8(1):24-8. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1995764514601826>
14. Merchán N, Angarita M. Detección molecular de genes *nuc* y *coa* en *Staphylococcus* spp. causantes de mastitis bovina. *Agrociencia*. 2021;55(8):1-20.
15. Instituto Colombiano de Normas Técnicas y Certificación (ICONTEC). Norma Técnica Colombiana (NTC) 750: productos lácteos, queso. Bogotá, Colombia: ICONTEC; 2009.
16. Perilla R, Bubano M, Sierra S, Torres K, Carrascal A, Reyes M. Estandarización de la extracción de ADN y validación de la PCR múltiple para detectar *Listeria monocytogenes* en queso, leche, carne de res y pollo. *Univer Scient*. 2005; 10(2): 61-78. Disponible en: <https://ojspuj.repositoriodigital.com/index.php/scientarium/article/view/4981/3839>
17. Wan J, King K, Forsyth S, Coventry M. Detection of *Listeria monocytogenes* in salmon using the *Probelia* polymerase chain reaction system. *J food protect*. 2003; 66(3): 436-440. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0362028X22030769>
18. Torres Rosales, F. Técnicas y herramientas moleculares empleadas para la obtención de material genético. Trabajo de Servicio Social. México. Universidad Autónoma Metropolitana. 2021. Disponible en: <https://repositorio.xoc.uam.mx/jspui/bitstream/123456789/26292/1/cbs1973836.pdf>
19. Blanco-Jarvio A, Martínez A, Bautista A. Optimización de un protocolo de extracción de DNA total para la amplificación de marcadores moleculares funcionales específicos de organismos desnitrificantes. *CICIMAR Océánides*. 2014; 29(2): 37-44. Disponible en: https://dlwqtxts1xzle7.cloudfront.net/78396163/131-libre.pdf?1641710168=&response-content-disposition=inline%3B+filename%3DOptimizacion_De_Un_Protocolo_De_Extracci.pdf&Expires=1751865137&Signature=YHsSsoPZw4wA4vvOsO-GDRQfH8UPmb0KfLwCQwDHvq6WTCIcJQHQQQL-0TDe7JwaR3vgJVwkQqplpnCHuU0vxuuhz4KrCcXc8gYwGP7b-kSbY-x3kyNhiv9OIcZUINFB4-G0qMKSZf96Fz1C-T7J62LksTo8Ti3y83xoQZNasIvjMCwXlGvZ-NETcYRnArf9h6T7u8rRvrF8FpFmiqfEP8OIE0PB5MytCyO6cqLk4EDD-rBLvRdheA9oyLKOXIHpxT37gY2fwPEyiC-GFLKtva5hKu1yY2DXavNMI1dl-uCsq8luQLfyFK7ezoZpdk7z5MSdG1b7XS7ap--uxnhplwx__&Key-Pair-Id=APKAJLOHF5GGSLRBV4ZA
20. Ríos-Sánchez E, Calleros E, González-Zamora A, Rubio J, Martínez C, Martínez A, Pérez-Morales R. Análisis comparativo de diferentes métodos de extracción de DNA y su eficiencia de genotipificación en población mexicana. *Acta universitaria*. 2016; 26(4): 56-65. Disponible en: <https://www.scielo.org.mx/pdf/au/v26n4/2007-9621-au-26-04-00056.pdf>
21. Salazar-Moscoso Y, Martínez-Garro J, Guzmán-González P, Plese T. Extracción de ADN usando métodos mínimamente invasivos en *Xenarthra* orden Pilosa, una contribución a su conservación. *Actu Biol*. 2022; 44(116): e6. Disponible en: http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0304-35842022000100006&lng=en. Epub May 26, 2022. <https://doi.org/10.17533/udea.acbi.v44n116a06>
22. López L, Mejía C. Evaluación de métodos de extracción de ADN para detección de *Listeria monocytogenes* en productos cárnicos. *Revista MVZ Córdoba*. 2012; v. 17(3): 3169-3175. Disponible en: http://www.scielo.org.co/scielo.php?pid=S0122-02682012000300011&script=sci_arttext
23. Canales M, Baquero R, Bermejo D, Martínez A. Estandarización de un protocolo sencillo para la extracción de ADN a partir de quesos frescos, semi-curados y curados de cabra. *Archivos de zootecnia*. 2022; 71(275): 199-203.
24. Molina B, Polverino D, Minvielle C, Apezteguía M, Aguilar M, Basualdo A. Comparación de métodos de lisis y extracción de ADN de trofozoítos de *Giardia lamblia*. *Parasitología latinoamericana*. 2006. 61(3-4), 133-137. Disponible en: https://www.scielo.cl/scielo.php?pid=S0717-77122006000200006&script=sci_arttext&lng=en

25. Abed T. Evaluation of methods for the extraction and purification of DNA of cultured *Lactobacillus* colony isolated from dairy products. *Int. J. Appl. Microbiol.* 2013; 1: 20-25.
26. Gupta N. DNA extraction and polymerase chain reaction. *J cyt.* 2019; 36(2): 116-117. Disponible en: https://journals.lww.com/jocy/fulltext/2019/36020/DNA_Extraction_and_Polymerase_Chain_Reaction.9.aspx
27. Saldaña, Antony. Grupos filogenéticos y diversidad genética de *Escherichia coli* aislada de quesos elaborados en el Departamento de Cajamarca. Tesis de pregrado. Perú. Universidad Nacional de Cajamarca. 2022. Disponible en: <http://190.116.36.86/bitstream/handle/20.500.14074/5174/Informe%20final%20de%20tesis-Tayca%20Salda%c3%b1a%20Wilfredo.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
28. Setiani N, Tritama E, Tresnawulansari A. Optimasi optical density(od) pada isolasi genom *Salmonella typhi* menggunakan genomic dna purification kit. *J Sains dan Teknologi Farmasi Indonesia.* 2021; 10(1); 35-43. Disponible en: https://www.researchgate.net/publication/367535387_OPTIMASI_OPTICAL_DENSITY_OD_PADA_ISOLASI_GENOM_Salmonella_typhi_MENGGUNAKAN_GENOMIC_DNA_PURIFICATION_KIT
29. Abbas H, Musawi I. Evaluation three methods of the extraction and purification of bacterial DNA of Gram positive and Gram negative bacteria. *World J Experiment Biosc.* ISSN: 2313-3937, 62-65, 2016. Disponible en: <https://wjebio.com/index.php/journal/article/view/85/62>
30. Salauddin M, Akter M, Hossain K, Nazir H, Noreddin A, El Zowalaty M. 2020. Molecular detection of multidrug resistant *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitis milk in Bangladesh. *Veterinary sciences*, 7(2), 36. Disponible en: <https://www.mdpi.com/2306-7381/7/2/36>
31. Ahmed M. The investigation of molecular characterization of presumptive *Listeria monocytogenes* isolates from a food-processing environment. *Iranian J Vet Res.* 2019; 20(1): 46-50. Disponible en: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC6509916/pdf/ijvr-20-046.pdf>
32. Yongsheng L, Xiaoyan, Z, Duyun Y. Molecular beacons: an optimal multifunctional biological probe. *Biochem Bioph Res Com.* 2008; 373(4): 457-461. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0006291X08009224>
33. Bassy O, Larigauderie G, Ortega M, Granja C, Cabria JC. Optimización y Validación de una PCR en Tiempo Real para la Rápida Identificación de *Bacillus thuringiensis*, Simulador de *Bacillus anthracis*. *Sanid. Mil.* 2018; 74(2): 84-89. Disponible en: http://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1887-85712018000200084&lng=es
34. Esho K, Enkhtuya B, Kusumoto A, Kawamoto K. Microbial assessment and prevalence of foodborne pathogens in natural cheeses in Japan. *BioMed res int.* 2013; (1): 1-6. Disponible en: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.1155/2013/205801>
35. Soto-Varela Z, Gutiérrez G, de Moya Y, Mattos R, Bolívar-Anillo H, Villarreal J. Detección molecular de *Salmonella* spp., *Listeria* spp. y *Brucella* spp. en queso artesanal fresco comercializado en Barranquilla: un estudio piloto. *Biomédica.* 2018; 38: 30-36. Disponible en: http://www.scielo.org.co/scielo.php?pid=S0120-41572018000600030&script=sci_arttext
36. Brooks J, Martinez B, Stratton J, Bianchini A, Krokstrom R, Hutkins R. Survey of raw milk cheeses for microbiological quality and prevalence of foodborne pathogens. *F Microb.* 2012; 31(2): 154-158. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0740002012000792>
37. Reis, A. Caracterização molecular dos mecanismos de resistência, perfil de virulência e diversidade genética de cepas de *Salmonella* Heidelberg. 2022. Tese de Doutorado. Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo. Disponible en: <https://docs.bvsalud.org/biblioref/2023/05/1428772/dissertacao-alex-final-alex-domingos-reis.pdf>
38. Chaudhuri S. Superiority of MacConkey's agar over *Salmonella-Shigella* agar for isolation of *Shigella dysenteriae* type 1 during an outbreak. *J Clin Microb.* 1990; 28(12): 2938-2940

39. Akter F, Shamimuzzaman M. Detection of *invA* gene by PCR and identification with susceptibility pattern evaluation by VITEK 2 of *Salmonella* isolates. *J App Biol Sc.* 2024; 18(3): 235–252.
40. Akutsu R, Botelho R, Camargo E, Sávio K, Araújo W. Adequacy of good manufacturing procedures in foodservice establishments. *Rev Nutri.* 2005; 18: 419-427. Disponible en: <https://www.scielo.br/j/rn/a/rS99Rx5FdZKGhbLBkX5FdvK/abstract/?lang=en>
41. Lai J. Development and evaluation of duplex MIRA-qPCR assay for simultaneous detection of *Staphylococcus aureus* and non-aureus staphylococci. *Microorganisms.* 2022; 10(9):1-14.
42. De Tomassi A, Reiter A, Reiger M, Rauer L, Rohayem R, mHülpüsch, C. Combining 16S sequencing and qPCR quantification reveals *Staphylococcus aureus* driven bacterial overgrowth in the skin of severe atopic dermatitis patients. *Biomolecules.* 2023; 13(7): 1-12.
43. Zhou B, Ye Q, Chen M, Li F, Xiang X, Shang Y, Wu Q. Novel species-specific targets for real-time PCR detection of four common pathogenic *Staphylococcus* spp. *Food Control.* 2022; 131: 108478. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0956713521006162>
44. Burbano E, Carrascal A, Mercado M, Poutou R. Validación de PCR para *Listeria monocytogenes* en Leches. *Normas y Calidad.* 2006; 57: 39-48. Disponible en: https://d1wqxts1xzle7.cloudfront.net/86083290/109-libre.pdf?1652826071=&response-content-disposition=inline%3B+filename%3DValidacion_de_PCR_para_Listeria_monocyto.pdf&Expires=1751914721&Signature=W88FesGCAHqziDWT5wc-Paoxaor3EIT5SHyyuoPhcvxOON56rdP-kpvrIjmSnEQGE Crsg8JGudJoNkUCOaJEN7xqbLUtn9KBGzUh9GUKhFeL671H-5G4ZF3g99sajtibhL99UcMO-5LfxrJgoHQukWSrngmSCVztVxxRZgxx5TFoka1bYGnrbPc80rJ2cwHk6-nf27qXuusAgJ3nmr6s8saBsFOIVQfBP-z4yWrKJpc1hvm4iBQBJ03nVUIRku4ZNYOD9zbqnJwjiZF2p4zCIY9I8HgPhFFQ-28QkrN0SBmMhqbQQO8P9ICzZfooue-oQktUwaSC8hGFpGRBkulOuQ__&Key-Pair-Id=APKAJLOHF5GGSLRBV4ZA
45. Medrano M, Restrepo S, Vanegas M. Tipificación molecular de *Listeria monocytogenes* aisladas de muestras clínicas y alimentos. *Biomédica.* 2006; 26(3): 442-450. Disponible en: http://www.scielo.org.co/scielo.php?pid=S0120-41572006000300014&script=sci_arttext
46. Urbano Cáceres EX, Aguilera Becerra AM, Jaimes Bernal CP. Determinación del perfil de susceptibilidad a antibióticos de *Listeria* sp. aisladas de leche cruda de vaca en Tunja. *Revista Investig. Salud Univ. Boyacá* [Internet]. 24 de julio de 2017 [citado 23 de octubre de 2025];4(1. Enero-Junio):38-52. Disponible en: <https://revistasdigitales.uniboyaca.edu.co/index.php/rs/article/view/195>
47. Baquero Acuña DM, Bernal González AM, Campuzano S. Determinación de *Listeria monocytogenes* en quesos blancos artesanales expendidos en la plaza de mercado de Cáqueza, Cundinamarca. *NOVA* [Internet]. 2006 Dec. 31 [cited 2025 Oct. 27];4(6). Available from: <https://revistas.universidadmayor.edu.co/index.php/nova/article/view/72>
48. Omiccioli E, Amagliani G, Brandi G, Magnani M. A new platform for Real-Time PCR detection of *Salmonella* spp., *Listeria monocytogenes* and *Escherichia coli* O157 in milk. *F microbiology.* 2009; 26(6): 615-622. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0740002009001026>
49. Leza-Leza T, Viquez-Ruiz E, Barquero-Calvo E, Sancho-Blanco C, Umaña-Castro R. Optimización de técnicas de PCR para la detección de *Salmonella enterica* (serotipo Gallinarum) en aves de corral de Costa Rica. *Cuadernos de Investigación UNED.* 2022; 14(1): e3831. Disponible en: http://www.scielo.sa.cr/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1659-42662022000100013&lng=en <http://dx.doi.org/10.22458/urj.v14i1.3831>.
50. Ruiz-Villalba A, Ruijter M, van den Hoff M. J. Use and misuse of Cq in qPCR data analysis and reporting. *Life.* 2021; 11(6): 496. Disponible en: <https://www.mdpi.com/2075-1729/11/6/496>
51. Untergasser A, Ruijter J, Benes V, van den Hoff M. Web-based LinRegPCR: application for the visualization and analysis of (RT)-qPCR amplification and melting data. *BMC bioinformatics.* 2021; 22(1): 398. Disponible en: <https://link.springer.com/article/10.1186/s12859-021-04306-1>

52. Harrison LB, Hanson ND. High-Resolution Melting Analysis for Rapid Detection of Sequence Type 131 *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2017; 24;61(6):e00265-17. doi: 10.1128/AAC.00265-17. PMID: 28416542; PMCID: PMC5444143.
53. Wang, W., Zijlstra, R.T. & Gänzle, M.G. Identification and quantification of virulence factors of enterotoxigenic *Escherichia coli* by high-resolution melting curve quantitative PCR. *BMC Microbiol* 17, 114 (2017). <https://doi.org/10.1186/s12866-017-1023-5>

© 2026 – Nadia Catalina Alfonso Vargas, Astrid Maribel Aguilera Becerra, Martin Orlando Pulido Medellin, Luis Miguel Borrás Sandoval, Claudia Patricia Jaimes Bernal.



This is an open access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). Use, distribution, or reproduction in other forums is permitted, provided that the original author and copyright owner are credited and the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution, or reproduction is permitted that does not comply with these terms.