



CARACTERIZACION BIOQUIMICA, MOLECULAR Y DETERMINACION DE VIRULENCIA DE CEPAS DE *LISTERIA MONOCYTOGENES* EN PRODUCTOS AGROPECUARIOS CHILENOS

DOCTORADO EN CIENCIA, TECNOLOGIA Y GESTION ALIMENTARIA

Alumno: Ana Karina Peralta Madariaga
Directora: M^aAntonia Ferrús Pérez
Centro: Etsia.Dpto.Biotecnología
Universidad Politécnica de Valencia



FORMULARIO DEPÓSITO TESIS MÁSTER

AUTOR	1 ^{er} APELLIDO	2 ^o APELLIDO	NOMBRE	DNI/NIE												
	PERALTA	MADARIAGA	ANA KARINA	P 78020210												
DIRECTOR TESIS	1 ^{er} APELLIDO	2 ^o APELLIDO	NOMBRE													
	FERRÚS	PÉREZ	M ^a ANTONIA													
UNIVERSIDAD		MÁSTER														
UNIVERSIDAD POLITÉCNICA DE VALENCIA		GESTIÓN Y SEGURIDAD ALIMENTARIA														
TÍTULO DE LA TESIS																
CARACTERIZACION BIOQUIMICA, MOLECULAR Y DETERMINACION DE VIRULENCIA DE CEPAS DE <i>LISTERIA MONOCYTOGENES</i> EN PRODUCTOS AGROPECUARIOS CHILENOS																
RESUMEN	<p>Un total de 30 cepas de <i>L. monocytogenes</i> fueron aisladas de productos agropecuarios chilenos como vegetales congelados, alimentos frescos, carnes rojas, cecinas, pescados, condimentos y alimentos listos para su consumo durante los meses de Julio y Agosto del 2009.</p> <p>La caracterización bioquímica y molecular de las cepas se realizó por perfil bioquímico, PCR y determinación del gen de virulencia <i>lmo2821</i>. El 100% de las cepas aisladas e identificadas por método bioquímico según protocolo estándar recomendado por la Norma ISO 11290-1:1996, fueron confirmadas también como <i>L. monocytogenes</i> por análisis de PCR. De ellas el 93,3% presentaban la secuencia específica del gen de virulencia <i>lmo2821</i>.</p>															
	<p>A total of 30 strains of <i>L. monocytogenes</i> were isolated from Chilean agricultural products such as frozen vegetables, fresh foods, red meat, cured meat, fish, spices and food ready for consumption during the months of July and August 2009. The biochemical and molecular characterization of strains was performed by biochemical profile, PCR and determination of virulence gene <i>lmo2821</i>. 100% of strains isolated and identified by biochemical methods according to standard protocol recommended by the ISO 11290-1: 1996, were also confirmed as <i>L. monocytogenes</i> by PCR analysis. Of these, 93.3% presented the sequence-specific virulence gene <i>lmo2821</i></p>															
PALABRAS CLAVE	DESCRIPTORES EN ESPAÑOL															
	<i>Listeria monocytogenes</i> , productos agropecuarios chilenos, caracterización molecular, gen de virulencia <i>lmo2821</i>															
	DESCRIPTORES EN INGLÉS															
	<i>Listeria monocytogenes</i> , Chilean agricultural products, molecular characterization, virulence gene <i>lmo2821</i>															
CLASIFICACIÓN DE LA UNESCO	URL MINISTERIO DE EDUCACIÓN Y CIENCIA: http://www.mec.es/ciencia/jsp/plantilla.jsp?area=plan_idi&id=6&contenido=/files/portada.jsp															
	<table border="1"> <thead> <tr> <th>CAMPO</th> <th>DISCIPLINA</th> <th>SUBDISCIPLINA</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>32</td> <td>3206</td> <td>320605</td> </tr> <tr> <td>33</td> <td>3309</td> <td>330990</td> </tr> <tr> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> </tbody> </table>			CAMPO	DISCIPLINA	SUBDISCIPLINA	32	3206	320605	33	3309	330990				
	CAMPO	DISCIPLINA	SUBDISCIPLINA													
32	3206	320605														
33	3309	330990														
(máximo tres áreas de conocimiento)																

CARACTERIZACION BIOQUIMICA, MOLECULAR Y DETERMINACION DE VIRULENCIA DE CEPAS DE *LISTERIA MONOCYTOGENES* EN PRODUCTOS AGROPECUARIOS CHILENOS

Peralta, A.K¹., Ferrús, M.A²., Ballesteros, L.², Moreno, Y.²

RESUMEN

Un total de 30 cepas de *L. monocytogenes* fueron aisladas de productos agropecuarios chilenos como vegetales congelados, alimentos frescos, carnes rojas, cecinas, pescados, condimentos y alimentos listos para su consumo durante los meses de Julio y Agosto del 2009.

La caracterización bioquímica y molecular de las cepas se realizó por perfil bioquímico, PCR y determinación del gen de virulencia *Imo2821*. El 100% de las cepas aisladas e identificadas por método bioquímico según protocolo estándar recomendado por la Norma ISO 11290-1:1996, fueron confirmadas también como *L. monocytogenes* por análisis de PCR. De ellas el 93,3% presentaban la secuencia específica del gen de virulencia *Imo2821*.

Palabras clave: *Listeria monocytogenes*, productos agropecuarios chilenos, caracterización molecular, gen de virulencia *Imo2821*

RESUM

Un total de 30 ceps de *L. monocytogenes* van ser aïllades de productes agropecuaris xilens com vegetals congelats, aliments frescos, carns vermelles, cecines, peixos, condiments i aliments llests per al seu consum durant els mesos de Juliol i Agost del 2009 . La caracterització bioquímica i molecular dels ceps es va realitzar per perfil bioquímic, PCR i determinació del gen de virulència *Imo2821*. El 100% dels ceps aïllats i identificades pel mètode bioquímic segons protocol estàndard recomanat per la Norma ISO 11290-1:1996, van ser confirmades també com *L. monocytogenes* per anàlisi de PCR. D'elles el 93,3% presentaven la seqüència específica del gen de virulència *Imo2821*

Paraules clau: *Listeria monocytogenes*, productes agropecuaris xilens, caracterització molecular, gen de virulència, *Imo2821*

ABSTRACT

A total of 30 strains of *L. monocytogenes* were isolated from Chilean agricultural products such as frozen vegetables, fresh foods, red meat, cured meat, fish, spices and food ready for consumption during the months of July and August 2009. The biochemical and molecular characterization of strains was performed by biochemical profile, PCR and determination of virulence gene *lmo2821*. 100% of strains isolated and identified by biochemical methods according to standard protocol recommended by the ISO 11290-1: 1996, were also confirmed as *L. monocytogenes* by PCR analysis. Of these, 93.3% presented the sequence-specific virulence gene *lmo2821*

Palabras clave: *Listeria monocytogenes*, Chilean agricultural products, molecular characterization, virulence gene, *lmo2821*

¹ Laboratorio de Alimentos y Agua, Facultad de Ciencias de la Salud, Universidad de Talca. Avda Lircay s/n, Talca, Chile.

² Centro Avanzado de Microbiología de los Alimentos. Dpto. de Biotecnología. Escuela Técnica Superior de Ingenieros Agrónomos. Universidad Politécnica de Valencia. Camino de Vera s/n. 46022 Valencia.

INTRODUCCION

El género *Listeria* esta compuesto por bacilos Gram-positivos, cortos, con extremos redondeados de 0.4-0.5 x 0.5-2 μm , se encuentran aislados o en cadenas cortas, y con menos frecuencia en largos filamentos, son aerobios o anaerobios facultativos, no esporulados, no capsulados, catalasa positiva, y oxidasa negativa. Son móviles cuando crecen entre 20 y 25°C, su temperatura optima de crecimiento es 30-37°C (*Bergey's Manual of Determinative Bacteriolog*), aún cuando sus límites de crecimiento son de -0.4 – 45 °C, incluso puede sobrevivir por varias semanas a -18°C (ICMSF 1996 Microorganismos in Food 6).

El género *Listeria* comprende seis especies: *L. monocytogenes*, *L. ivanovii*, *L. seeligeri*, *L. innocua*, *L. welshimeri* y *L. grayi*. Las dos especies potencialmente patógenas son *L. monocytogenes* y *L. ivanovii*.

Listeria monocytogenes es una bacteria descrita por primera vez en 1926, sin embargo, es en los años 80s cuando ésta empieza a aparecer en una serie de brotes extremadamente serios, invasivos, transmitidos por los alimentos con un alto costo económico para los servicios de salud pública y las industrias alimentarias. Recientemente la listeriosis se ubica en el segundo y cuarto lugar de las causas más comunes de muerte por enfermedades transmitidas por los alimentos en Estados Unidos e Inglaterra respectivamente (Liu, 2008). Las explicaciones posibles de la emergencia de la listeriosis humana transmitida por alimentos, como un asunto del máximo interés de Salud Pública, comprenden los cambios importantes en la producción, procesamiento y distribución de los alimentos, la utilización cada vez mayor de la refrigeración como medio de conservación primaria de los alimentos, los cambios en los hábitos de comida de la población, especialmente en cuanto a su preferencia por los alimentos ya preparados y un incremento del número de personas consideradas de alto riesgo de sufrir enfermedad: mujeres en estado de gestación, neonatos, recién nacidos y personas inmunodeprimidas son especialmente susceptibles a la infección que causa este patógeno, con una tasa de mortalidad de hasta un 75% (Vitas *et al.*, 2004). De hecho, tiene una tasa media de mortalidad de alrededor del 30% (Altekruse *et al*, 1997). La mortalidad de los cuadros clínicos causados por este germen es variable dependiendo de la serie y el tipo de paciente, pero puede llegar a 50%. *L. monocytogenes* es también responsable de las mayores tasas de hospitalización (alrededor de un 90%) entre los patógenos alimentarios (Jemmi and Stephan, 2006).

En los Estados Unidos en 2007 la incidencia fue 0,27 por 100.000 personas; en Europa se describe 0,2 a 0,8 casos por 100.000, con cifras absolutas de 1.600 a 8.400 casos y 320 a 2.500 muertes anuales. La incidencia en embarazadas es mucho mayor, 12 por 100.000 y en pacientes inmunocomprometidos puede llegar hasta 145 por 100.000. En Chile la incidencia fue 0,25 por 100.000 hasta antes del brote de 2008 (Rossi *et al*, 2008).

En la mayor parte de los casos esta bacteria se adquiere por consumo de alimentos contaminados, debido a que el desarrollo de un microorganismo patógeno en general, en un alimento no produce cambios en su sabor,

aspecto o textura. Considerando que crece bajo condiciones de baja tensión de oxígeno y sobrevive en el medio ambiente durante periodos prolongados, puede estar presente en una amplia gama de alimentos como leche, carne, pescados y mariscos. Sin embargo, es destruido mediante un tratamiento térmico adecuado ya sea de pasteurización o cocción.

L. monocytogenes se ha aislado en varios tipos de productos alimenticios como carnes, pescado y mariscos (Fenlon, 1999), productos lácteos frescos (Vitas *et al.*, 2004) y vegetales (Lunden *et al.*, 2004). Los alimentos con alto nivel de riesgo, son quesos y productos lácteos, patés y salchichas, pescados ahumados, ensaladas y en general productos industrializados, refrigerados, listos para el consumo, sin requerimientos de cocción o calentamiento previo (Farber and Peterkin, 1991). Por ello, es de vital importancia el control en la producción primaria y en el resto de la cadena productiva, por cuanto los alimentos se pueden contaminar en cualquier etapa de su producción. Por ser un microorganismo psicrótrofo, es decir que crece a bajas temperaturas, el almacenamiento en frío no elimina el riesgo de multiplicación. La reversibilidad de los daños por congelación en este patógeno contribuye a que los vegetales congelados contaminados sean una fuente potencial de infección (Flanders *et al.*; 1994). Su incidencia en vegetales congelados comercializados ha demostrado ser elevada, desde 1,2% (Aguado *et al.*, 2004) a 46% (Pappelbaum *et al.*, 2008) según diversos estudios.

Desde el momento que se ha reconocido la importancia de *L. monocytogenes* como patógeno productor de enfermedades alimentarias comienzan a buscarse métodos más selectivos, exactos y rápidos para su identificación, que permitan a la industria alimentaria tomar decisiones preventivas para evitar su presencia en cualquiera de las etapas productivas y mantener los sistemas de vigilancia adecuados, tanto por la industria como por las autoridades sanitarias de los diferentes gobiernos.

L. monocytogenes es un patógeno que presenta una gran variabilidad intraespecífica en su virulencia y patogenicidad. Entre los 14 serotipos conocidos, solo tres (1/2a, 1/2b y 4b) producen el 95% de los casos de infección (Liu., 2006). Hay resultados evidentes de que cepas virulentas de *L. monocytogenes* contienen genes aislados que no están presentes en *L. monocytogenes* avirulentas, y que la detección de estos genes tiene el potencial para proporcionar un método alternativo para distinguir cepas virulentas de cepas avirulentas (Gasnov *et al.*, 2005). La capacidad de distinguir cepas virulentas de cepas avirulentas de *L. monocytogenes* podría potencialmente evitar retiros de productos alimenticios y ayudar a prevenir brotes de enfermedades.

Los métodos que se han desarrollado para evaluar virulencia en *L. monocytogenes* incluyen técnicas de ensayos de virulencia en ratón y técnicas de cultivo *in vitro*. El ensayo de la virulencia del ratón proporciona una medición *in vivo* de la virulencia y, a menudo sirve como un estándar de referencia para otros métodos (Liu, 2003).

Una investigación de Liu (2003) desarrolló un ensayo de PCR para detectar 8 genes de virulencia en 12 cepas de *L. monocytogenes* aisladas de casos clínicos, alimentos y el medio ambiente que no están presentes en

otras especies de *Listeria*. Estos genes codifican una proteína, la internalina, directamente relacionada con la capacidad para atravesar la barrera entérica y la internalización en las células del hospedador. La detección de estos genes tiene el potencial de proporcionar un método alternativo para distinguir la virulencia en *L. monocytogenes*.

Los objetivos del presente estudio fueron la evaluación de los diferentes métodos de identificación bioquímica y molecular de *L. monocytogenes* aislada de productos agropecuarios chilenos como vegetales congelados, carnes (rojas y ave), cecinas, pescados, condimentos y alimentos listos para su consumo; y la determinación de la potencial virulencia de estas cepas mediante métodos moleculares; estos métodos son indispensables para la correcta identificación de *L. monocytogenes* y para estudios de valoración de riesgos para el consumidor, trazabilidad y seguimiento epidemiológico de este microorganismo, lo que los convierte en una alternativa promisoriosa para la detección rápida y fiable de patógenos de transmisión alimentaria en los laboratorios de ensayo.

MATERIAL Y MÉTODOS

Cepas bacterianas y condiciones de cultivo.

Se incluyeron para el estudio cinco cepas de referencia de *Listeria monocytogenes* procedentes de la Colección Española de Cultivos Tipo (*Listeria monocytogenes* CECT 911 (serotipo 1/2c), CECT 4031 (serotipo 1a), CECT 4032 (serotipo 4b), CECT 933 (serotipo 3a) y CECT 936 (serotipo 1/2b). Se incluyeron también cepas de otras especies del género *Listeria* y de otros géneros presentes en alimentos: *Listeria ivanovii* CECT 913, *Listeria innocua* CECT 910, *Vibrio vulnificus* CECT 529, *Vibrio parahaemolyticus* CECT 511, *Staphylococcus aureus* CECT 240, *S. epidermidis* CECT 231, *Micrococcus luteus* CECT 245, *Citrobacter freundii* CECT 401, *Salmonella enterica* CECT 915, *Enterobacter cloacae* CECT 194 y *Escherichia coli* CECT 349. Estas cepas fueron usadas para evaluar la especificidad de los ensayos de PCR. Todas ellas fueron rehidratadas y cultivadas de acuerdo con las respectivas instrucciones proporcionadas por la Colección Española de Cultivos Tipo.

Aislamiento de *L. monocytogenes*

El aislamiento de *L. monocytogenes* se hizo a partir de muestras de alimentos que se recibieron para su análisis durante los meses de julio y agosto de 2009.

El aislamiento se llevó a cabo de acuerdo con el protocolo estándar recomendado por la Norma ISO 11290-1:1996 (6), siguiendo las etapas de:

- a) pre-enriquecimiento en Caldo Fraser Semi (25 gr de muestras en 225 ml de medio, incubado por 24 h a 30°C)
- b) enriquecimiento (0.1 ml de cultivo en 9 ml de medio Fraser completo),
- c) aislamiento (cultivo pre-enriquecido y enriquecido en agar PALCAM y agar ALOA, incubados a 37°C durante 24 horas)
- d) confirmación de *Listeria* spp.: todas las presuntas colonias de *Listeria* spp. aisladas en los medios selectivos fueron purificadas y subcultivadas en placas de agar sangre (Trypto Caseine Soja Sang de Mouton, Laboratoire AES, Ref.AEB522870, Lot 918305) para comprobar la actividad hemolítica. Se analizó también su actividad oxidasa y catalasa, y se les realizó tinción Gram.

Las cepas sospechosas de ser *L. monocytogenes* fueron congeladas en glicerol (10% [vol/vol] glicerol en 1% [wt/vol] Caldo Nutritivo num. 2 [NB, Oxoid CM67]) con crioviales a -25°C hasta su requerimiento.

Los cultivos puros fueron recuperados en TSA (Casein – Peptone Soy Meal - peptone for microbiology, Merck., Darmstadt, Germany), incubados 24 horas a 37°C.

Confirmación bioquímica de *Listeria monocytogenes*

Se utilizó la batería miniaturizada de pruebas bioquímicas API Listeria (Biomerieux, Mercy L'Etoile, France), de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

Extracción de DNA.

La extracción se realizó a partir de un cultivo exponencial de cada una de las cepas de *L. monocytogenes*, tanto aisladas durante el trabajo como de referencia, los cultivos se centrifugaron a 10.000 g por 30 segundos. y se lavaron dos veces con tampón fosfato estéril (PBS, 130 mmol l⁻¹ Cloruro de Sodio, 10 mmol l⁻¹ Fosfato de sodio, [pH 7.2]), posteriormente y siguiendo las instrucciones del Kit de extracción UltraClean Microbial DNA Isolation (MOBIO Laboratories, Inc, USA. Catalog 12224-50, Lot U09D30). Este Kit se basa en producir la lisis de los microorganismos mediante una combinación de calor, detergente y la fuerza mecánica en contra de perlas vítreas. El ADN liberado se enlaza a un filtro de sílice, se lava y se recupera el ADN en un tampón Tris libre de ADN.

El DNA fue concentrado con etanol, seguido de una centrifugación a 14000 x g durante 15 min., posterior resuspensión en 200 µl de solución de hidratación e incubación durante 12 horas para su rehidratación a temperatura ambiente. El DNA concentrado se guardó -20° C, para su posterior análisis.

La caracterización molecular se realizó dividiendo su proceso en dos partes: la primera, extracción de su ADN genómico que se desarrolló en el Laboratorio de Análisis de Alimentos y Agua, de la Universidad de Talca,

Chile y la segunda parte, la técnica de PCR con confirmación posterior por electroforesis se realizó en el Laboratorio de Microbiología, del Dpto. de Biotecnología de la Escuela Técnica Superior de Ingenieros Agrónomos de la Universidad Politécnica de Valencia, España.

Identificación mediante multiplex PCR

Se utilizaron los iniciadores específicos descritos por Border *et al.* (1990), cuya secuencia se especifica en la Tabla 1. que amplifican un fragmento de 938 pb del rDNA 16S específico del género *Listeria* y un fragmento de 750 pb específico de especie, correspondiente al gen *hlyA* de *L. monocytogenes*.

La especificidad de los iniciadores se comprobó mediante una búsqueda en la base de datos BLAST (National Center for Biotechnology Information, [<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/>]) y por la amplificación del DNA de todas las cepas de referencia, pertenecientes al género *Listeria* y a otros géneros, mencionadas previamente.

Tabla 1. Secuencia de nucleótidos de los iniciadores utilizados para la amplificación del gen de virulencia *Imo2821*

Oligonucleótidos	Banda amplificada
L1 (5'-CTCCATAAAGGTGACCCT-3')	938pb
U1 (5'-CAGCMGCCGCGGTAATWC-3')	
LF (5'-CAAACGTTAACAACGCAGTA-3')	750pb
LR (5'-TCCAGAGTGATCGATGTAA-3')	

La amplificación se llevó a cabo de acuerdo al trabajo realizado por Ballesteros y cols (2009). Las condiciones de PCR fueron las siguientes: 30µl de solución de PCR (tampón de PCR 1X, 2.5mM de MgCl₂, 0.2mM de cada dNTP, 20pmol de cada iniciador y 2U de Taq (DFS-Taq, Bioron international, Rheingoenheimer Str.36, D-67065 Sludwigshafen, Denmark) y 3µl de ADN. La amplificación se realizó con una etapa previa de desnaturalización a 95°C-1min, seguido de 40 ciclos (94°C-30s, 51°C-20, 74°C-30s) y una elongación final 74°C-8 min que asegura la completa extensión del producto.

El equipo donde se realizaron todas las reacciones es un termociclador automático PHC-3 Thermal Cycler (Techne Corporation, Cambridge, UK). Los productos de PCR fueron analizados mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% (peso/vol) SeaKem LE agarose (FMC Bioproducts, Denmark) a 100V durante una hora en tampón TAE y visualizados mediante un transiluminador UV después de una tinción en bromuro de etidio.

El tamaño molecular de los amplicones fue confirmado mediante comparación con el marcador molecular GeneRuler 100-bp DNA Ladder Plus (MBI, Fermentas, Burlington, Canadá). El DNA patrón procedía de las cepas *L. monocytogenes* CECT 4032 y CECT 936, usadas como controles positivos. Una muestra en la que el DNA se reemplazaba por agua libre de nucleasas se incluyó como control negativo en todos los ensayos.

Identificación del gen de virulencia *lmo2821* mediante PCR.

La PCR para el gen *lmo 2821*, se realizó mediante el uso de los cebadores descritos por Dongjou Liu *et al.* (2003), cuya secuencia se indica en la Tabla 2, los cuales amplifican una banda de 611pb. Las condiciones de la reacción fueron: un volumen final de 25µl con 0,5U Taq DNA polimerasa, 50µM dNTPs, 25pmol de cada cebador y 10ng de la muestra de DNA. Los parámetros consistieron en un paso inicial de desnaturalización a 94°C-2min, seguido de 25 ciclos (94°C-20s, 60°C-20s y 72°C-45s) y un paso final de 72°C durante 2min. Se utilizó como control positivo la cepa CECT 4032, cuya patogenicidad está comprobada, y se ha asociado frecuentemente a casos de meningitis (características proporcionadas por la CECT).

Tabla 2. Secuencia de nucleótidos de los iniciadores utilizados para la amplificación del gen de virulencia *lmo2821*

Oligonucleótidos	Banda amplificada
Lmo2821 (5'-TGTAACCCCGCTTACACAGTT-3')	611pb
Lmo2821 (5'-TTACGGCTGGATTGTCTGTG-3')	

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los objetivos del presente estudio fueron: la evaluación de los métodos de identificación bioquímica y molecular de *L. monocytogenes* aislada a partir de productos agropecuarios chilenos como vegetales congelados, carnes (rojas y ave), cecinas, pescados, condimentos y alimentos listos para su consumo; y la determinación de la potencial virulencia de estas cepas mediante métodos moleculares.

El aislamiento de *L. monocytogenes* se realizó a partir de 440 muestras de productos alimenticios chilenos, se obtuvo aislamiento en 30 de ellos, resultando para este estudio una prevalencia de 6.8% de *L. monocytogenes* en estos productos. En estudios efectuados anteriormente, la prevalencia varió según tipo de productos alimenticios entre el 11% y 25% dependiendo del alimento (Cordano y Jacquet, 2009).

La Figura 1, muestra el tipo de alimento en que se encontraron las 30 cepas de *L. monocytogenes*, que fueron aisladas de los productos y que se han considerado para el presente estudio.

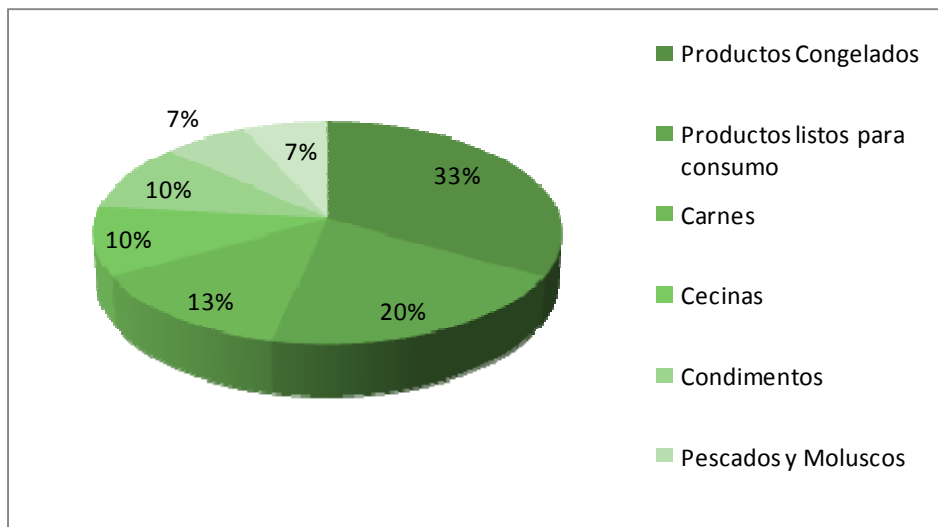


Figura 1. Porcentaje de cepas de *L. monocytogenes* según el tipo de alimentos de donde se aislaron.

Tal como se observa en la Figura 1, el 33 % de las cepas fueron aisladas de productos congelados (choclo, arvejas, espárragos, frutas), seguido de un 20% de cepas en los productos alimenticios listos para su consumo (Pizza, Papas Mayo, Ensalada César, Sandwich Vegetariano, Champiñón), lo que elevan aún más el riesgo, porque éstos no serán sometidos a ningún tratamiento.

La identificación de las características bioquímicas de las 30 cepas de *L. monocytogenes* se realizó con el ensayo miniaturizado de la galería API que consta de reacciones enzimáticas o de fermentación de azúcares.

Este resultado muestra que existe un 100% de concordancia entre la identificación molecular de las cepas se realizada por amplificación múltiple específica (mPCR) y la identificación de *L. monocytogenes* por método bioquímico (API).

La mayoría de los aislados (96.7%) presentaron el perfil numérico 6510 de la galería API y sólo un aislado (3.3%) presentó el perfil 6110. Este resultado es congruente con otros trabajos (Moreno y cols, 2009) los cuales demostraron que son los perfiles más frecuentemente aislados de alimentos.

En la Figura 2, se puede observar los perfiles numéricos que presentaron las *L. monocytogenes* identificadas por el sistema API de este estudio.



FIGURA 2. Perfil bioquímico API 6110 (superior) 6510 (inferior) de *Listeria monocytogenes*.

La técnica de PCR aplicada a las 30 cepas aisladas de los productos alimenticios resultó positiva para *L.monocytogenes* en el 100 % de las muestras analizadas, tal como lo muestra la Figura 3 a continuación.

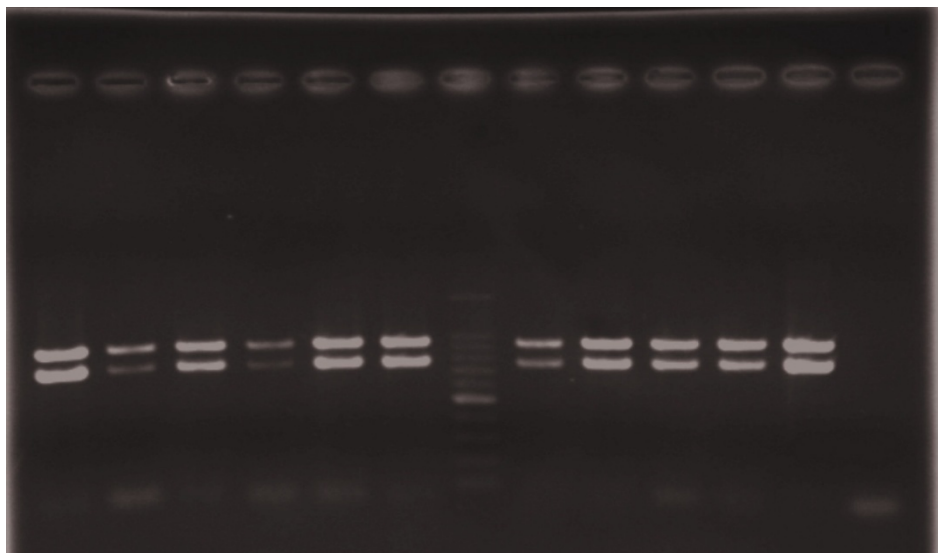


FIGURA 3. PCR múltiple del género *Listeria* y *L. monocytogenes*, pocillo 1 muestra L1, pocillo 2 muestra L2, pocillo 3 muestra L3, pocillo 4 muestra L4, pocillo 5 muestra L5, pocillo 6 muestra L6,, pocillo, pocillo 7 marcador molecular, pocillo 8 muestra L7, pocillo 9 muestra L8, pocillo 10 muestra L9, pocillo 11 control (+) CECT 4032, pocillo 12 control (-) (agua miliQ estéril),

En cuanto a la determinación de virulencia se puede decir que aún cuando todas las cepas de *L. monocytogenes* son potencialmente patógenas, la virulencia puede variar y cambiar la capacidad de producir infección. Muchos autores han estudiado las proteínas diana y los genes presentes en las cepas virulentas y avirulentas, con el fin de establecer diferencias en la determinación de la virulencia de *L. monocytogenes* y su patogenicidad (Liu, 2006).

En este estudio se encontró que 28 de las 30 cepas analizadas dieron positivo al ensayo de virulencia. (Figura.4).

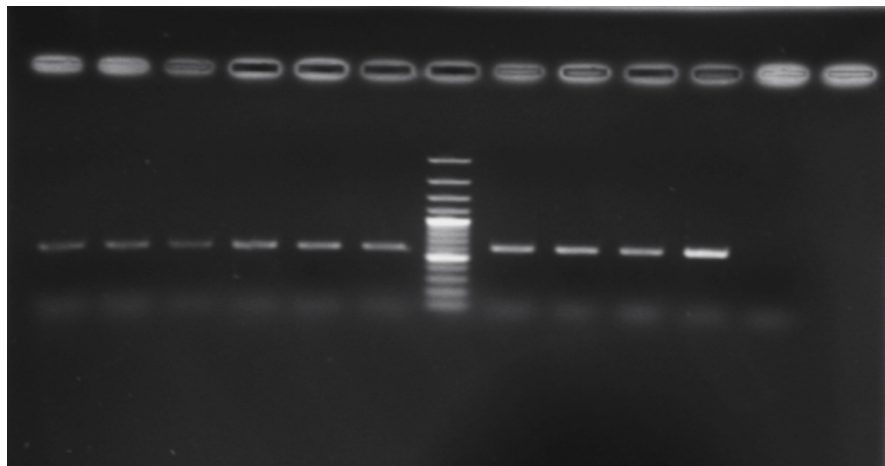


FIGURA 4. PCR del gen de virulencia Imo2821.. Pocillo1 muestra L21, Pocillo2 muestra L22, Pocillo3 muestra L23, Pocillo 4 muestra L24, Pocillo 5 muestra L25, Pocillo 6 muestra L26, Pocillo 7 marcador molecular, pocillo 8 muestra L27, pocillo 9 muestra L28, pocillo 10 muestra L29, pocillo 11 control (+) CECT4032, pocillo 12 control (-) (agua miliQ estéril)

Los resultados indicarían que el 93.3 % de las cepas aisladas de los productos agropecuarios chilenos analizados son virulentas, considerando que dieron positivo a la detección del gen Imo2821 por técnica de PCR.

CONCLUSIONES

1. Se analizaron 440 muestras de productos alimenticios chilenos durante los meses de Junio, Julio y parte de Agosto del 2009, y se aisló *L. monocytogenes* en el 6.8% (30) de ellos. Cepas que se constituyeron en el material para el presente estudio.
2. El mayor porcentaje de cepas de *L. monocytogenes* (33%) fueron aisladas de muestras de productos congelados (choclo, arvejas, espárragos, frutas).
3. Existe una concordancia del 100 % entre la identificación bioquímica miniaturizada API con la identificación por mPCR, existiendo una ventaja considerable en el tiempo en que se obtienen los resultados por PCR.
4. El protocolo de mPCR puesto a punto por Ballesteros y cols. (2009), usado en este trabajo ha permitido la identificación a nivel de especie de forma rápida y fiable.
5. La mayoría de las cepas de *L. monocytogenes* aisladas de productos agropecuarios chilenos son virulentas, considerando que el 93.3 % dio positivo al ensayo de virulencia, realizado para la amplificación del gen *Imo2821*
6. La técnica PCR ha demostrado ser un método eficaz para la caracterización molecular de *L. monocytogenes*, proporcionando información de gran utilidad para posteriores estudios epidemiológicos, o de trazabilidad de las cepas contaminantes a través de la cadena de producción.

REFERENCIAS

Ballesteros L, 2009. Caracterización Fenotípica y Genotípica de Cepas de *Listeria monocytogenes* aisladas de vegetales congelados. Tesis de Master. Universidad Politécnica de Valencia.

Bansal NS, McDonnell FHY, Smith A, Arnold G, Ibrahim GF (1996) Multiplex assay for the routine detection of *Listeria* in food. *Int J Food Microbiol* 33:293-300

Border PM, Howard JJ, Plastow GS, Siggins KV (1990) Detection of *Listeria* species and *Listeria monocytogenes* using polymerase chain reaction. *Lett Appl Microbiol* 11:158-162

Chou, ChH, Wang Ch (2006) Genetic relatedness between *Listeria monocytogenes* isolates from seafood and humans using PFGE and REP-PCR *Int J Food Microbiol* 110: 135-148

Cordano AM, Jacquet C.(2009) *Listeria monocytogenes* isolated from vegetable salads sold at supermarkets in Santiago,Chile: prevalence and strain characterizacion. *Int J Food Microbiol* 132 (2-3): 176-179.

Dorsch M , Stackebrandt E (1991) Phylogenetic analysis of the genus *listeria* based on reverse transcriptase sequencing of 16s rrna. *Int J of Systematic Bac* 41: 240-246.

Flanders KJ, Unjury,R (1994) resuscitation and detection of *Listeria* spp. from frozen environments. *Food Microbiol* 11:473-480

Fenlon, D. R. (1999) *Listeria monocytogenes* in the natural environment. In *Listeria, Listeriosis and Food Safety*, pp. 21–37. Edited by E. T. Ryser & E. H. Marth. New York: Marcel Dekker

Gasarov U, Hughes D, Hansbro PM (2005) Methods for the isolation and identification of *Listeria* spp. and *Listeria monocytogenes*: A review *FEMS Microbiol Rev* **29**: 851–875

International Journal of Food Microbiology 90 (2004) 341– 347. Characterization of *Listeria monocytogenes* and *Listeria innocua* from a vegetable processing plant by RAPD and REA.

Jersek B, Gilot P, Gubina M, Klun N, Mehle J, Tcherneva E, Rijpens N, Herman L, Typing of *Listeria monocytogenes* strains by repetitive element sequence-based PCR, *J. Clin. Microbiol.* **37** (1999), pp. 103–109.

John Holt et all, *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, ed. Williams & Wilkins, 9 th (1994):567-570.

ICMSF Microorganismos in Foods 5 . Microbiological Specifications of Food Pathogens.Blackie Academic & Professional.1996.

Kiss R, Tirczka T, Szita G, Bernath S, Csiko G. *Listeria monocytogenes* food monitoring data and incidence of human listeriosis in Hungary, 2004. *Int J Food Microbiol.* 2006;112(1):71-4.

Liu D, Austin FW, Ainsworth AJ, Lawrence M (2003) Characterization of virulent and avirulent *Listeria monocytogenes* strains by PCR amplification of putative transcriptional regulator and internalin genes. *J. Med. Microbiol.* 52: 1066–1070.

Liu. D. (2003) Characterization of virulent and avirulent *Listeria monocytogenes* strains by PCR amplification of putative transcriptional regulator and internalin genes. *J. Med. Microbiol.* 52: 1065 – 1070.

Liu D (2006) Identification, subtyping and virulence determination of *Listeria monocytogenes*, an important foodborne pathogen. *J. Med Microbiol* 55: 645-659

Lunden J, Tolvanen R, Korkeala H (2004) Human listeriosis outbreaks linked to dairy products in Europe. *J Dairy Science* 87 (E. Suppl.), E6-E11.

Lyautey E, D.R. Lapen, G. Wilkes, K. McCleary, F. Pagotto, K. Tyler, A. Hartmann, P. Piveteau, A. Rieu, W.J. Robertson, D.T. Medeiros, T.A. Edge, V. Gannon and E. Topp, Distribution and characteristics of *Listeria monocytogenes* isolates from surface waters of the South Nation River watershed, Ontario,Canada, *Appl. Environ. Microbiol.* **73** (2007), pp. 5401–5410.

Mead PS, Dunne EF, Graves L, Wiedmann M, Patrick M, Hunter S, et al. Nationwide outbreak of listeriosis due to contaminated meat. *Epidemiol Infect* 2005; 1: 1-8.

Microbiología de los alimentos para consumo humano y para animales. Método horizontal para la detección y el recuento de *Listeria monocytogenes*. Parte 1: Método de detección. (ISO 11290-1:1996).

Moreno Y, Ballesteros Y, Ferrús MA, Cuesta G, Cañigral I. (2009) Caracterización Fenotípica y Genotípica de cepas de *Listeria monocytogenes* aisladas de vegetales congelados. XVI Congreso Nacional de Microbiología de los Alimentos. Libro de ponencias. 136-137.

Nadon CA, Woodward DL, Young C, Rodgers FG, Wiedmann M (2001) Correlations between molecular subtyping and serotyping of *Listeria monocytogenes*. J Clin Microbiol 39:2704-2707.

Paillard D, Dubois V, Thiebaut R, Nathier F, Hoogland E, Caumette P, Quentin C (2005) Occurrence of *Listeria* spp. In effluents of French urban wastewater treatment plants. Appl Environ Microbiol 71:7562-7566.

Rossi L, Paiva A, Tornese M, Chianelli S, Troncoso, A. Brote de infección por *Listeria monocytogenes*: Una revisión de las vías que llevan a su aparición. Rev Chil Infect 2008; 25(5): 328-335.

Rouquette, C. and Berche P. 1996. The pathogenesis of infection by *Listeria monocytogenes*. Microbiol. SEM 12: 245-258.

Sabet, C., Lecuit, M., Cabnes, D., Cossart, P. & Bierne, H. (2005). LPXTG protein InlJ, a newly identified internalin involved in *Listeria monocytogenes* virulence. Infect Immun 73, 6912–6922.

Seeliger, H; 1940, Genus *Listeria* Pirie. In Bergey's manual of systematic bacteriology, Baltimore, MD, 1235.

Vitas AI, Aguado V, García-Jalón I (2004) Occurrence of *Listeria monocytogenes* in fresh and processed foods in Navarra (Spain) Int J Food Microbiol 90:349-356

Wiedmann M, Bruce JL, Keating C, Johnson AE, McDonough PL, Batt CA (1997) Ribotypes and virulence gene polymorphism suggest three distinct *Listeria monocytogenes* lineages with differences in pathogenic potential. Infect Immun 65:2707-2716.

Wilks SA, et al., 2006. Survival of *Listeria monocytogenes* Scott A on metal surfaces: implications for cross-contamination. Int J Food Microbiol. 11(2):93-8