

CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA Y GENOTÍPICA DE CEPAS DE *LISTERIA MONOCYTOGENES* AISLADAS DE VEGETALES CONGELADOS

Ballesteros, L, Moreno, Y, Cuesta, G, Ferrús, M.A.

RESUMEN

Un total de 91 cepas fueron aisladas de productos vegetales congelados durante tres meses en una planta de procesado. Para determinar la prevalencia de la especie *L. monocytogenes* en estos vegetales las cepas fueron caracterizadas mediante serotipado, perfiles bioquímicos, PCR múltiple y determinación del gen de virulencia *Imo2821*. Para la subtipado molecular, los aislados se sometieron a análisis REP-PCR. La mayoría de los aislados (75) fueron identificados como *Listeria monocytogenes*. De ellas, el 85% presentaba la secuencia específica del gen de virulencia *Imo2821*. De entre las cepas confirmadas como *Listeria monocytogenes* 66 pertenecían al serotipo 1/2a y 4 al 1/2b, los cuales son los más frecuentemente aislados en alimentos. La técnica automatizada REP-PCR permitió determinar 17 perfiles genéticos distintos, formados por 70 a 80 bandas de entre 150 y 7000 pb. A un nivel de homología del 82% se definieron tres grupos genéticos o clusters. A este nivel, la técnica REP-PCR permitió discriminar entre los serotipos 1/2a, 4b y 1/2b, estableciendo interrelaciones entre los perfiles REP-PCR, serovares y perfiles bioquímicos (perfil API).

Palabras clave: *Listeria monocytogenes*, productos vegetales congelados, caracterización molecular

RESUM

Un total de 91 ceps van ser aïllades de productes vegetals congelats durant tres mesos en una planta de processat. Per a determinar la prevalença de l'espècie *L. monocytogenes* en aquests vegetals els ceps van ser caracteritzades mitjançant serotipat, perfils bioquímics, PCR múltiple i determinació del gen de virulència *Imo*. Per a la subtipificació molecular els aïllats es van sotmetre a anàlisis REP-PCR. La majoria dels aïllats (70) van ser identificats com a *Listeria monocytogenes*. D'elles, el 85% presentava la seqüència específica del gen de virulència *Imo2821*. D'entre els ceps confirmats com *Listeria monocytogenes* 66 pertanyien al serotip 1/2a i 4 al/1 2b, els quals són els més freqüentment aïllats en aliments. La tècnica automatitzada REP-PCR va permetre determinar 17 perfils genètics diferents, formats per 70 a 80 bandes d'entre 150 i 7000 pb. A un nivell de homologia del 82% es van definir tres grups genètics o clusters. A aquest nivell, la tècnica REP-PCR va permetre discriminar entre els serotips 1/2a, 4b i 1/2b, establint interrelacions entre els perfils REP-PCR, serovars i perfils bioquímics (perfil API).

Paraules clau: *Listeria monocytogenes*, productes vegetals congelats, caracterització molecular.

ABSTRACT

A total of 91 strains were isolated from frozen vegetables products during three months in a processing plant. To determine the prevalence of the *L. monocytogenes* species in these vegetables the strains were characterized by serotyping, biochemical profiles, multiplex PCR and PCR determination of virulence gene *lmo*. For molecular subtyping, isolates were subjected to REP-PCR analysis. Most isolates (70) were identified as *Listeria monocytogenes*. Of these, 85% had the sequence-specific virulence gene *lmo2821*. Between strains confirmed as *Listeria monocytogenes* 66 belonged to serotype 1/2a and 4 to 1/2b, which are the most frequently isolated from food. The REP-PCR automated technique revealed 17 different genetic profiles, consisting of 70 to 80 bands between 150 and 7000 bp. A level of 82% of homology were identified three genetic groups or clusters. At this level, the REP-PCR technique allowed discrimination between serotypes 1/2a, 1/2b and 4b, establishing relationships between the REP-PCR profiles, serovars and biochemical profiles (API profile) .

Palabras clave: *Listeria monocytogenes*, frozen vegetables products, molecular characterization

INTRODUCCIÓN

El género *Listeria* está compuesto por bacterias Gram positivas con bajo contenido G+C, estrechamente relacionado con los géneros *Bacillus*, *Clostridium*, *Enterococcus*, *Streptococcus* y *Staphylococcus*. Son bacilos aerobios o anaerobios facultativos, no esporulados ni capsulados, catalasa positiva, móviles entre 10 y 25°C (Collins *et al.*, 1991). *Listeria* ha sido aislada de diferentes ambientes, como suelo, agua, efluentes, una gran variedad de alimentos y heces humanas y animales. (Fenlon, 1999). Esta amplia distribución se debe a su capacidad de sobrevivir durante períodos de tiempo prolongados, adaptándose a diferentes condiciones hostiles. 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*.

L. monocytogenes no fue considerado un patógeno hasta fines de la década del 70. A principios de los años 80 emerge como uno de los patógenos humanos de origen alimentario más importante. A partir de ese momento la literatura sobre *L. monocytogenes* comenzó a incrementarse y a partir de 1983 una serie de brotes epidémicos humanos en Norteamérica y Europa establecieron claramente la listeriosis como una grave enfermedad de origen alimentario (Bille, 1990). Su infección puede causar tanto casos esporádicos como grandes brotes de la enfermedad. (Varma *et al.*, 2007).

Se trata de una bacteria intracelular facultativa que tiene la capacidad de entrar, sobrevivir y multiplicarse no solo en células fagocíticas sino también en no fagocíticas, y cruzar la barrera intestinal del hospedador, así como las barreras hematoencefálica y placentaria (Seeliger *et al.*, 1940). 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). *L. monocytogenes* es también responsable de las mayores tasas de hospitalización (alrededor de un 90%) entre los patógenos alimentarios (Jemmi and Stephan, 2006). En la actualidad, se estima que *L. monocytogenes* es la principal causa de muerte originada por bacterias de origen alimentario en Estados Unidos: aproximadamente se registran 2500 casos de listeriosis humana al año, produciendo 500 muertes (Mead *et al.*, 2005).

Listeria monocytogenes se encuentra ampliamente distribuida en el medio natural (Fenlon, 1999). Siendo tolerante a condiciones adversas tales como pH extremos, altas temperaturas o falta de nutrientes (Wilks *et al.*, 2006) es tan ubicua que se puede encontrar en el suelo, agua, efluentes y alimentos (Liu, 2006). La extensa distribución de *L. monocytogenes* en el entorno natural y su habilidad para permanecer en las plantas de procesado, a pesar de los procesos de limpieza, causan la contaminación frecuente de alimentos, los cuales representan la principal fuente de infección en humanos (Rouquette *et al.*, 1996). Esta bacteria se ha asociado con una gran variedad 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 más frecuentemente asociados con brotes, y 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). Los alimentos se pueden contaminar en cualquier eslabón de la cadena productiva, así como también en el almacenamiento en frío. 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.

Un gran número de trabajos han demostrado que este patógeno presenta una gran variabilidad intraespecífica en su virulencia y patogeneidad. Entre los 14 serotipos conocidos, solo tres (1/2a, 1/2b y 4b) producen el 95% de los casos de infección (Liu., 2006). Además, diversos estudios han sugerido que las cepas virulentas pueden tener genes que no están presentes en los aislados no virulentos, lo que podría ser utilizado para una evaluación, por medio de PCR, de la potencial virulencia de este patógeno y para la detección específica de estas cepas más virulentas en alimentos (Liu *et al.*, 2003, Cabrita *et al.*, 2004). *Imo 2821* es una región que codifica para una proteína internalina, directamente relacionada con la capacidad para atravesar la barrera entérica y la internalización en las células del hospedador. Algunos estudios han mostrado que este gen está ausente en cepas no virulentas y ha sido propuesto como un marcador especie-específico (Liu *et al.*, 2003).

La gran heterogeneidad en la virulencia de *L. monocytogenes*, asociado a la elevada prevalencia de este organismo en alimentos, ha llevado a numerosos investigadores a señalar la necesidad de desarrollar métodos de subtipado suficientemente discriminatorios para poder realizar estudios epidemiológicos de cepas de *L. monocytogenes* implicadas en brotes o presentes en las cadenas de procesamiento de alimentos (Gasnov *et al.*, 2005).

El serotipado no es una herramienta suficiente para la discriminación epidemiológica, ya que la mayoría de casos están causados solo por tres serotipos (Nadon, 2001). Además, se ha demostrado, que en algunas ocasiones, se obtienen resultados erróneos como consecuencia de intercambios de antígenos que ocurren frecuentemente entre serotipos (Liu, 2006). En este sentido, los métodos moleculares, que diferencian cepas estrechamente ligadas, podrían proveer útil información genética, epidemiológica y ecológica sobre *L. monocytogenes*, permitiendo un control efectivo en la industria alimentaria.

L. monocytogenes posee cortas repeticiones de elementos extragenéticos palindrómicos (Repetitive Extragenic Palindromic sequences, REP). La utilidad de la técnica REP-PCR, basada en la caracterización de estos elementos, ha sido previamente evaluada por diversos autores. Este método molecular parece ser más discriminativo que otros métodos basados en la PCR y tiene un potencial de tipado similar al de los métodos RAPD y PFGE (Jersek *et al.*, 1999; Chou and Wang, 2006). El Sistema DiversiLab (DiversiLab System, Bacterial Barcodes Inc.) es un método automatizado de tipificación por REP-PCR. El sistema incluye todos los reactivos, así como el software para el procesamiento de los datos del análisis. La técnica automatizada es menos laboriosa que el método de PFGE y provee de resultados estandarizados en menos de 24h (Shutt *et al.*, 2005). Por tanto, este método podría ser una excelente alternativa como técnica para tipificar cepas de *L. monocytogenes*.

Los objetivos del presente estudio fueron: la evaluación de la presencia de diferentes serotipos de *L. monocytogenes* aislados de vegetales congelados provenientes de una planta de procesamiento; la determinación de la potencial virulencia de estas cepas mediante métodos moleculares; la comparación de la eficiencia de los métodos bioquímicos y moleculares para la correcta identificación de *L. monocytogenes*; la detección de posibles cepas persistentes en la planta de procesamiento y la evaluación de la técnica REP-PCR como método de tipificación molecular para estudios de valoración de riesgos, trazabilidad y seguimiento epidemiológico de este microorganismo.

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). *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 fueron también 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*

Un total de 70 aislados de *L. monocytogenes* fueron recuperados de vegetales congelados durante un periodo de 3 meses. El aislamiento se llevó a cabo de acuerdo con el protocolo estándar recomendado por la Norma ISO 11290-1:1996 (6).

Todas las presuntas colonias de *Listeria spp.* aisladas en los medios selectivos fueron purificadas y subcultivadas en placas de agar sangre (Columbia Blood Agar base suplementado con un 5% sangre desfibrinada de caballo, Scharlau Chemie S.A., Barcelona, Spain) 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 -80°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

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

Serotipado

El serotipo fue determinado por inactivación térmica de las bacterias y posterior aglutinación en porta, mediante el sistema comercial *Listeria* antisera set (Denken Seiken.Co, Ltd., Tokio, Japan), de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Para el ensayo, se introdujo una modificación previa al tratamiento térmico: las células *L. monocytogenes* fueron subcultivadas tres veces durante periodos de 12 horas, a 30°C en caldo Brain Heart Infusion (Merck.,Darmstadt., Germany) y resuspendidas en una disolución 0,2 w/v% de cloruro de sodio.

Extracción de DNA.

De un cultivo exponencial de cada una de las cepas, tanto aisladas durante el trabajo como de referencia, se recogieron las células por centrifugación a 14000 x g durante 30 s. 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]). Las células fueron resuspendidas en tampón Tris-EDTA (TE) y procesadas con el kit de extracción Realpure Kit (Durviz, Paterna, Spain). El DNA fue concentrado con etanol, seguido de una centrifugación a 14000 x g durante 5 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.

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 *lmo2821*

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 con Zamora *et al* (2000). 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.

Todas las reacciones se llevaron a cabo en 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 *Imo2821* mediante PCR.

La PCR para el gen *Imo 2821*, se realizó mediante el uso de los cebadores descritos por Dongjou Liu *et al.* (2003), la 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 patogeneicidad 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 *Imo2821*

Oligonucleótidos	Banda amplificada
<i>Imo2821</i> (5'-TGTAACCCCGCTTACACAGTT-3')	611pb
<i>Imo2821</i> (5'-TTACGGCTGGATTGTCTGTG-3')	

REP-PCR.

El DNA para el análisis REP-PCR fue extraído con el kit comercial Ultra Clean Microbial DNA Isolation kit (MoBio, Laboratories, Inc, USA). Para la amplificación se utilizaron Diversilab Listeria kit (Bacterial Barcodes Inc.) y AmpliTaq DNA Polymerase (Applied Biosystems Inc, USA) siguiendo las instrucciones del fabricante. La amplificación se produjo en un termociclador Mastercycler (Eppendorf Ibérica, S.L., Madrid, Spain) y los resultados se analizaron con el sistema Agilent Technologies 2100 Bioanalyzer

(B.02.05.SI360). Las condiciones consistieron en un paso inicial de desnaturalización de 94° C - 2 min.; 35 ciclos de 94° C-30s., 50° C-30s y 70° C-90s; y una elongación final a 70° C-3 min.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El objetivo del presente estudio fue identificar y caracterizar cepas de *L. monocytogenes* aisladas de vegetales congelados mediante el sistema API, serotipado, PCR, detección de gen de virulencia y REP-PCR. Debido a que las características fenotípicas de la bacteria pueden ser inestables, todos los resultados de las identificaciones bioquímicas fueron también confirmados por amplificación múltiple específica (mPCR). De acuerdo con los informes proporcionados por Huang et al. (2007) nuestros resultados mostraron que la PCR múltiple (FIG.1) y el método API tenían un 100% de concordancia en la identificación de la especie *L. monocytogenes*, siendo la identificación vía mPCR más rápida que la bioquímica. Las cepas aisladas que no obtuvieron perfil de *Listeria monocytogenes* tampoco fueron positivas en la multiplex PCR. Estas cepas se descartaron del estudio por no resultar objeto del mismo.

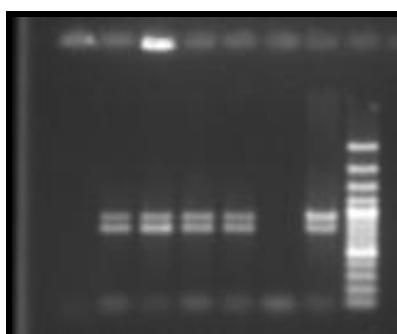


FIGURA 1. PCR múltiple del género *Listeria* y *L. monocytogenes*, pocillo 1 aislado negativo para *L. monocytogenes*, pocillo 2 muestra L21, pocillo 3 muestra L40, pocillo 4 muestra L62, pocillo 5 muestra L64, , pocillo 6 control – (agua miliQ estéril), pocillo 7 control + CECT 4032, pocillo 8 marcador molecular .



FIGURA 2. Perfil bioquímico API 6510 de *Listeria monocytogenes*.

La mayoría de los aislados presentaron el serotipo 1/2a (n=66), (n=3) ser el serotipo 1/2b y (n=1) del serotipo 4b. Este resultado presenta congruencia con otros trabajos previos (Vitas et al., 2004, Kiss et al., 2006) los cuales demostraron que 1/2a y 1/2b son los serotipos más frecuentemente aislados de alimentos. Los serotipos aislados usualmente en casos de listeriosis humana

son 4b, 1/2a y 1/2b (Liu *et al.*, 2006, Huang, 2007), los cuales también han sido también los detectados en este estudio. De acuerdo con otros autores (Vitas *et al.*, 2004), en este trabajo el serotipo 4b, asociado generalmente con productos cárnicos, fue encontrado en un porcentaje muy bajo (una única cepa).

Todas las cepas de *L. monocytogenes* son potencialmente patógenas, pero la virulencia puede variar y cambiar la habilidad 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 patogeneicidad (Liu, 2006). El gen de la internalina *Imo2821* (Figura.3) parece estar presente en todas las cepas virulentas de *L. monocytogenes* (Liu *et al.*, 2003).

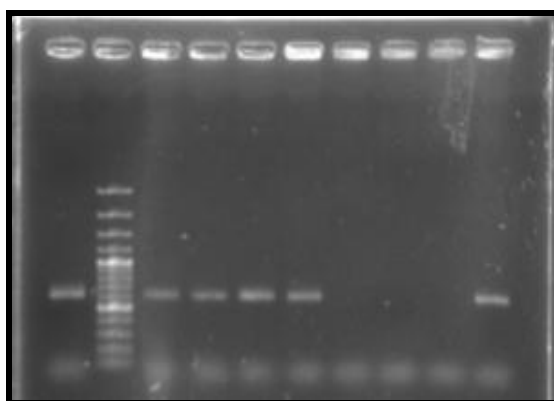


FIGURA 3. PCR del gen de virulencia *Imo2821*.. Pocillo1 muestra L21, pocillo 2 marcador molecular, pocillo 3 muestra L37, pocillo 4 muestra L40, pocillo 5 muestra L62, pocillo 6 muestra L64, pocillo 7 muestra L4, pocillo 8, muestra L6, pocillo 9 control – (agua miliQ estéril), pocillo 10 control + CECT4032.

Entre todos los aislados identificados como *L. monocytogenes* en este trabajo, un 21.43% (n=15) fueron negativos para la amplificación de *Imo2821*, mostrándose con ello como potencialmente no patógenas. Todas estas cepas, curiosamente, presentaron el perfil API 6110, cuya principal característica es ser ramnosa-negativa, y pertenecieron al serotipo 1/2a. Liu *et al.* (2006) estudiaron la virulencia de un linaje inusual de cepas ramnosa negativo (Linaje III, serotipos 4a y 4c), en ratón y concluyeron que las cepas pertenecientes a este grupo eran negativas para *Imo2821*, y presentaban virulencia vía intraperitoneal pero no vía oral. Por otro lado, se ha demostrado que la internalina 2821 está implicada el atravesamiento de la barrera intestinal del hospedador (Sabet *et al.*, 2005). Hasta donde sabemos, no existen estudios acerca de la virulencia de cepas atípicas 1/2a ramnosa negativas, por lo que sería necesario futuros estudios para evaluar la virulencia “in vivo” de estas cepas.

Aunque el serotipado y la identificación bioquímica son métodos normales para la caracterización de aislados de *L. monocytogenes*, estos métodos tienen menor poder discriminatorio y reproducibilidad que los moleculares, especialmente en estudios epidemiológicos y de riesgos. La técnica REP-PCR ha sido usada previamente para tipificar *L. monocytogenes* de diferentes fuentes (Jersek *et al.*, 1999; Chung-His and Wang, 2006), con muy buenos resultados. Nuestro estudio mostró la alta reproducibilidad y el poder

discriminatorio de este método. Los perfiles obtenidos para cepas de *Listeria monocytogenes* fueron claramente diferenciables de los obtenidos para otras especies del género (Figura 4).

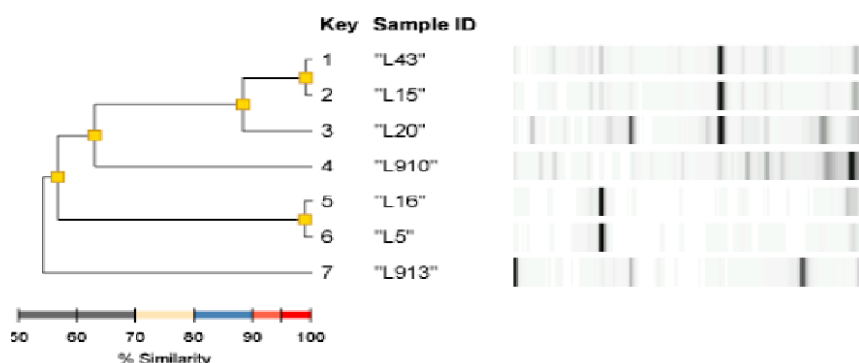


FIGURA 4. Cepas aisladas con perfiles diferentes a *L. monocytogenes*. L910 y L913 son cepas de referencia *L. innocua* CECT 910 y *L. ivanovii* CECT 913. Todos los aislados habían sido identificados bioquímicamente como *L. innocua*.

Todos los aislados de *L. monocytogenes* fueron tipables mediante REP-PCR, proporcionando 17 perfiles diferentes, formados por 70 a 80 bandas de entre 150 y 7000 pb. Cada perfil estaba formado solo por cepas pertenecientes al mismo serotipo, excepto la cepa L73 (REP tipo 14). Otros autores ya habían señalado que el serotipo no es siempre reproducible y que podría no encontrarse una correlación con el tipado molecular (Nadon et al., 2001).

El análisis numérico de las similitudes genéticas (Dendrograma Figura.5) mostró tres clusters o grupos génicos diferentes a un nivel de homología del 82%. El Cluster I incluía los perfiles 1, 2, 3, 4, 6 y 7, agrupados al 94% de homología, y pertenecientes todos ellos al serotipo 1/2a, excepto una cepa (L86, serotipo 1/2b), que presentaba un perfil único. El Cluster 2 (93.5% de homología genética) agrupaba los perfiles 8 a 14, con un total de 35 aislados del serotipo 1/2a y las tres cepas de referencia 1/a, 1/2c y 3a. Todas las cepas de los Clusters I y II presentaban serotipos incluidos en el linaje I de *L. monocytogenes* (Wiedmann et al., 1997).

Los perfiles REP 3 y 10 se repetían en un gran número de aislados, 24 y 22 cepas respectivamente. Dentro de cada uno de ellos, todas las cepas presentaban el mismo serotipo (1/2a) y perfil bioquímico (6110). Estas cepas habían sido aisladas de diferentes muestras durante todo el periodo de muestreo, lo que sugiere que puede tratarse de cepas persistentes en la planta de procesado, adaptadas a las condiciones de la misma, y que contaminan distintos alimentos durante su procesamiento.

El cluster o grupo genético III contenía las cepas pertenecientes a los serovares 4b y 1/2b, unidos entre ellos al 93.6% de homología, y correspondientes al linaje III de *L. monocytogenes*. En este grupo todos los aislados presentaban el perfil API 6510. Pudimos observar también que los perfiles API 6110 (n=48) dieron solo cuatro tipos diferentes de REP mientras que las cepas ramnosa positivo (n=22) produjeron 12 tipos de REP diferentes, mostrando este último una gran heterogeneidad genética.

Diversilab v3.3
PC
#276

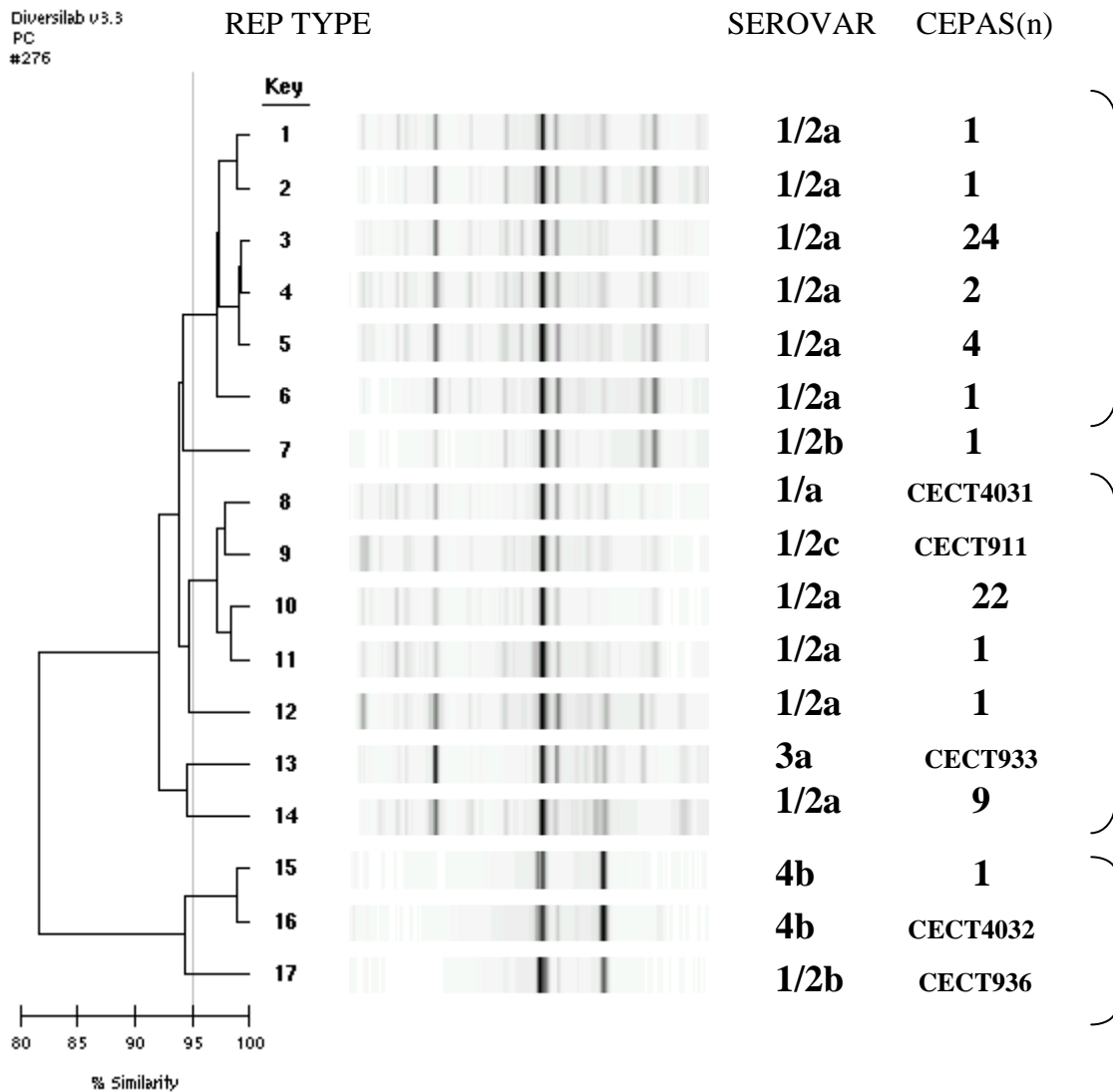


FIGURA 5. Perfiles diferentes de REP-PCR de las cepas de *L. monocytogenes* aisladas de vegetales congelados.

Aunque en este trabajo los serotipos 4b y 1/2b (Linaje III) se separaban claramente de los serotipos del Linaje I, el número de cepas era demasiado escaso. Sería necesario realizar estudios más amplios para poder asegurar la fiabilidad de este resultado.

CONCLUSIONES

1. La mayoría de aislados de *L. monocytogenes* a partir de vegetales congelados pertenecen al serotipo 1/2a, siendo este responsable del 95% de las infecciones.
2. El protocolo de mPCR puesto a punto en este trabajo ha permitido la identificación a nivel de especie de forma rápida y fiable.

3. El 78.57% de cepas de *L. monocytogenes* resultan potencialmente infecciosas o virulentas ya que fueron positivas para la amplificación del gen *lmo2821*.
4. Además de la identificación serológica y bioquímica, es necesario el subtipado para el control de fuentes de contaminación en las plantas de procesado y la determinación de los riesgos potenciales para el consumidor.
5. La técnica REP-PCR ha demostrado ser un método eficaz para la caracterización molecular de *L. monocytogenes*, proporcionando información de gran utilidad para posteriores estudios epidemiológicos, de análisis de riesgos, o de trazabilidad de las cepas contaminantes a través de la cadena de producción.

REFERENCIAS

- 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
- Collins MD, Wallbanks DJ, Lane J, Shah R, Nietupski J, Smida J,
- Dorsch M , Stackebrandt E (1991) Phylogenetic analysis of the genus *listeria* based on reverse transcriptase sequencing of 16s rna. *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
- Gasanov 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.
- 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).
- 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.
- 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