

Tesina de la Licenciatura en Ciencias Biológicas
Facultad de Ciencias
Universidad de la República

“Caracterización de aislamientos
humanos y alimentarios de *Listeria*
monocytogenes”

Valeria Braga Selayes

Mayo 2018

Orientador: Dr. Gustavo Varela

Co-orientador: Dra. María Inés Mota

Departamento de Bacteriología y Virología.

Instituto de Higiene.

Facultad de Medicina, UdelaR

Contenido

Contenido	1
INTRODUCCIÓN.....	4
Generalidades.....	4
Hábitat, distribución y adaptación	4
Estructura antigénica.....	6
Patogenia.....	7
Ciclo intracelular de <i>L. monocytogenes</i>	7
Genes de virulencia.....	10
Islas de genes de patogenicidad	10
Internalinas	11
Mecanismos de detección y determinación de la virulencia.....	13
Subtipificación	15
Métodos fenotípicos	16
Métodos genotípicos	17
Epidemiología y Presentación Clínica	18
Gastroenteritis febril.....	19
Listeriosis invasiva.....	19
Infecciones localizadas.....	20
Tratamiento	21
Prevención	21
Justificación del trabajo.	23
OBJETIVOS.....	24
<i>Objetivo general</i>	24
<i>Objetivos Específicos</i>	24
MATERIALES Y MÉTODOS.....	25
Aislamientos	25
Cultivos.....	25
Extracción de ADN.....	25
Identificación bacteriana.....	25
1. Pruebas bioquímicas.....	25
2. PCR para el gen <i>inl A</i> (gen específico de especie).....	26

PCR múltiplex para los genes <i>inlC</i> e <i>inlJ</i>	26
Serotipificación	27
I. PCR múltiplex para determinación de perfiles serotipos de <i>L. monocytogenes</i>	27
II. Aglutinación para los antígenos somáticos 1 y 4	27
Electroforesis en gel de campo pulsado (PFGE).	27
RESULTADOS	29
1. Identificación bacteriana	29
2. Determinación de genes de virulencia	29
3. Serotipificación	30
I. PCR múltiplex para determinación de perfiles serotipos de <i>L. monocytogenes</i>	30
II. Aglutinación para los antígenos somáticos 1 y 4	30
Análisis de los serotipos de acuerdo al origen.	31
4. Pulsed Field Gel Electrophoresis (PFGE)	33
1. Genotipificación por PFGE con la enzima de restricción <i>AscI</i>	33
2. Genotipificación por PFGE con la enzima de restricción <i>ApaI</i>	34
DISCUSION	36
CONCLUSIONES	42
PERSPECTIVAS	43
BIBLIOGRAFÍA	44
ANEXOS	49

RESUMEN

Listeria monocytogenes es un importante patógeno de transmisión alimentaria que puede causar enfermedad grave denominada listeriosis. La listeriosis humana puede presentarse como casos esporádicos o brotes afectando sobre todo a mujeres embarazadas, recién nacidos, ancianos y adultos inmunocomprometidos. Las formas graves de la enfermedad (bacteriemia, meningitis, abortos) presentan una alta letalidad (20 a 30 %), encontrándose entre las principales causas de muerte por enfermedad transmitida por alimentos. Se han determinado 13 serotipos de *L. monocytogenes* pero solo cuatro (1/2a, 1/2b, 1/2c y 4b) son responsables del 95% de los casos de listeriosis humana. *L. monocytogenes* se agrupa en cuatro grupos filogenéticos denominados linajes I, II, III y IV. Los linajes I y II incluyen la mayoría de los aislamientos vinculados a casos clínicos de listeriosis. La subtipificación de cepas es importante para las investigaciones epidemiológicas. El objetivo de este trabajo fue caracterizar un conjunto de aislamientos de *L. monocytogenes* de origen humano y alimentario para avanzar en el conocimiento de la epidemiología local.

Se analizaron 75 aislamientos de *Listeria* spp. recibidos en el laboratorio del Depto. de Bacteriología y Virología en los años 2013 a 2015, 61 de origen alimentario y 14 de casos de listeriosis en humanos. A todos se les realizó la identificación por pruebas bioquímicas y por PCR para gen *inlA*, estudio de la virulencia mediante la detección de genes *inlJ* e *inlC*, determinación del serotipo por PCR múltiple y aglutinación; a las cepas humanas se les realizó además electroforesis en gel de campo pulsado (PFGE).

Todos los aislamientos fueron identificados como *L. monocytogenes* por pruebas bioquímicas y por PCR para gen *inlA*. En todos los aislamientos se detectó la presencia de los genes de virulencia *inlJ* e *inlC*. Se encontraron 4 serotipos siendo el 1/2b el serotipo predominante (36), continuando con el 4b (28) y en menor proporción los serotipos 1/2a (10) y 1/2c (1). Mediante PFGE utilizando las enzimas *AscI* y *ApaI* se obtuvieron 9 y 10 pulsotipos diferentes y se confirmó la presencia de un brote de listeriosis. La distribución de serotipos de los aislamientos alimentarios presenta similitudes con lo reportado en países de la región (mayor prevalencia de linaje I) pero difieren con lo reportado en el hemisferio norte (mayoritariamente linaje II). Quedó demostrada la utilidad de PFGE como técnica de caracterización molecular complementaria a la serotipificación para la detección y confirmación de brotes.

INTRODUCCIÓN

Generalidades

Taxonómicamente el género *Listeria* pertenece al reino *Bacteria*, phylum *Firmicutes*, clase *Bacilli*, orden *Bacillales*, familia *Listeriaceae*. Basándose en los resultados de la secuenciación del gen que codifica para la subunidad 16S del ARN ribosomal, *Listeria* spp. presenta gran homología con los géneros *Bacillus* y *Staphylococcus*. La posición filogenética de *Listeria* es consistente con el bajo contenido de GC en su ADN (36 – 42 mol %) (Wellinghausen, 2012). Actualmente se diferencian 17 especies: *L. monocytogenes*, *L. seeligeri*, *L. ivanovii*, *L. welshimeri*, *L. marthii*, *L. innocua*, *L. grayi*, *L. fleischmannii*, *L. floridensis*, *L. aquatica*, *L. newyorkensis*, *L. cornellensis*, *L. rocourtiae*, *L. weihenstephanensis*, *L. grandensis*, *L. riparia*, y *L. booriae*, donde solo *L. monocytogenes* y *L. ivanovii* son especies patogénicas. Mientras que *L. ivanovii* es principalmente un patógeno animal, *L. monocytogenes* es un patógeno que afecta tanto al hombre como a animales (Orsi & Wiedmann, 2016).

Este género comprende un grupo de bacilos Gram positivos cortos, regulares, que no presentan cápsula ni producen esporas. Forman colonias regulares de una tonalidad gris pálida de entre 0,5 y 2mm de diámetro. Poseen de uno a cinco flagelos peritricos y presentan una temperatura óptima de movilidad entre los 25°C y 28°C. No son exigentes desde el punto de vista nutricional, anaerobias facultativas, catalasa positiva, oxidasa negativa e hidrolizan la esculina en pocas horas. En las pruebas de rojo metilo y Voges-Proskauer dan resultados positivos y producen ácido a partir de D-glucosa y otros azúcares. La temperatura óptima de crecimiento oscila entre los 30°C y 37°C, pero pueden crecer, aunque más lentamente, a 4°C. Especialmente, *L. monocytogenes* crece mejor que otras bacterias refrigerándola a 4-10°C (llamado enriquecimiento en frío). Esto es especialmente útil para separarlas de otras bacterias que puedan estar contaminando las muestras mediante un largo período de incubación en este rango de temperatura (Bennet, 2005; Wellinghausen, 2012)

Hábitat, distribución y adaptación

Listeria se encuentra extensamente distribuida en la naturaleza. Ha sido aislada de la tierra, materia orgánica en descomposición, agua, aguas residuales, alimentos para

animales, aves de corral, carne fresca y procesada, leche cruda, queso, residuos de mataderos, y heces de portadores asintomáticos humanos y animales.

L. monocytogenes se ha aislado de numerosas especies de mamíferos, aves, peces, crustáceos e insectos. Sin embargo, el principal hábitat de *L. monocytogenes* se considera el suelo y la materia vegetal en descomposición, en la que crece y vive saprofiticamente (Wellinghausen, 2012).

L. monocytogenes tiene la capacidad de adaptarse y sobrevivir en ambientes con altas concentraciones de sal (10% NaCl), tolera un amplio rango de pH (4.5 a 9.0) y un amplio rango de temperatura (entre 0°C y 45°C) (Hain *et al.*, 2007). Debido a su gran distribución en el ambiente, esta bacteria aparece en diferentes etapas de la cadena productiva alimenticia ya sea contaminando materias primas, productos manufacturados, así como plantas de elaboración, almacenamiento y/o distribución formando biofilms adheridos a los equipos, cámaras, desagües, etc. (Kalmokoff *et al.*, 2001; Hassan *et al.*, 2004; Swaminathan *et al.*, 2007). La habilidad de esta bacteria de crecer bajo temperaturas de refrigeración (Hain *et al.*, 2007), aumenta el riesgo de contaminación de los alimentos, pudiendo sobrevivir largos períodos de congelación y posterior descongelación. Por su naturaleza ubicua comúnmente contamina productos crudos y, por contaminación cruzada, puede alcanzar productos terminados. Entre los alimentos frecuentemente contaminados con *L. monocytogenes* están los quesos blandos y leche no pasteurizada, chacinados, pescado ahumado, ensaladas y en general productos refrigerados prontos para el consumo (CDC, 2017; Vazquez-Boland *et al.*, 2001; Cartwright *et al.*, 2013).

Con el aumento de la ingestión de alimentos manufacturados listos para el consumo (LPC), este patógeno oportunista ha surgido como un importante problema de salud pública y alimentaria. Su importancia no es siempre reconocida ya que causa enfermedad con baja frecuencia comparada con otras enfermedades transmitidas por alimentos. Los largos períodos de incubación entre el consumo del alimento y la aparición de síntomas, dificultan el establecimiento de la relación con el alimento implicado, así como la detección de sus brotes. Por ello *L. monocytogenes* representa una grave amenaza a la inocuidad de los alimentos y es uno de los microorganismos que más preocupa a la industria alimentaria (López *et al.*, 2006; Cardozo *et al.*, 2013).

Estructura antigénica

Las especies de *Listeria* presentan proteínas de superficie grupo-específicas: los antígenos somáticos (O) y los flagelares (H), útiles para la caracterización serológica mediante antisueros monovalentes y polivalentes, los cuales permiten la clasificación de estas bacterias en diferentes grupos antigénicos. Existen quince subtipos (I-XV) de antígenos somáticos y cuatro subtipos (A-D) de antígenos flagelares. El serotipo de cada cepa en particular queda determinado por la combinación de los antígenos O y H.

Se han determinado trece serotipos para *L. monocytogenes* (1/2a, 1/2b, 1/2c, 3a, 3b, 3c, 4a, 4ab, 4b, 4c, 4d, 4e y 7), seis en *L. seeligeri* (1/2a, 1/2b, 3b, 4a, 4b, 4c y 6b), uno en *L. ivanovii* (5), tres para *L. innocua* (1/2b, 6a y 6b) y *L. welshimeri* (1/2b, 6a y 6b), y uno para *L. grayi* (Grayi) (Liu, 2013).

Se ha observado que solo cuatro serotipos de *L. monocytogenes*, 1/2a, 1/2b, 1/2c y 4b, son responsables del 95 % de los casos de listeriosis humana (Doumith *et al.*, 2004) lo que sugiere que determinadas cepas de *L. monocytogenes* tienen mayor probabilidad de causar enfermedad que otras. Además, las cepas de *L. monocytogenes* del serotipo 4b son aisladas principalmente de brotes de listeriosis y en menor medida de casos esporádicos; mientras que los serotipos 1/2a y 1/2b se asocian con casos esporádicos de infección por *L. monocytogenes*.

El análisis filogenético por secuenciación y análisis de múltiples genes permite agrupar a *L. monocytogenes* en cuatro grupos filogenéticos denominados linajes I, II, III y IV. El linaje I contiene a los serovares 1/2b, 3b, 4b, 4d, y 4e; el linaje II contiene a los serovares 1/2a, 1/2c, 3a y 3c; y el linaje III incluye a los serovares 4a y 4c. Este último se subdivide en tres subgrupos, el IIIA (serovares 4a y 4c), el IIIC (serovar 4c) y el IIIB reconocido recientemente como linaje IV que incluye el serovar 7 y los serovares atípicos 4a, 4b y 4c) (Ward *et al.*, 2008; Liu, 2013). Los linajes I y II incluyen la mayoría de los aislamientos vinculados a casos clínicos de listeriosis. El linaje I contiene las cepas epidémicas de brotes transmitidas por alimentos y se le ha identificado un mayor potencial patogénico que el linaje II. El linaje II contiene aislamientos de casos esporádicos de listeriosis en humanos y animales, muestras ambientales y de alimentos. El linaje III suele tener serovares de características atípicas y muy escasas en alimentos y muestras clínicas, aunque se han aislado con cierta

frecuencia en animales. En estudios filogenéticos recientes de *L. monocytogenes*, se ha demostrado que el linaje IV, conformado por los serovares pertenecientes al subgrupo IIIB, es genéticamente diferente al linaje III y está asociado con aislamientos humanos, de animales y de alimentos (Ward *et al.*, 2008; Orsi *et al.*, 2011 ; Muñoz, 2012).

Patogenia

La patogenia de la infección por *L. monocytogenes* es aún poco comprendida y los datos disponibles han derivado de observaciones hechas únicamente en animales de experimentación. Los alimentos contaminados aparecen como la principal ruta de adquisición del patógeno, por lo tanto, el tracto gastrointestinal es el sitio de entrada de *L. monocytogenes* al hospedero (Vazquez-Boland *et al.*, 2001). Esta bacteria es capaz de atravesar las tres barreras fisiológicas presentes en los seres humanos: intestinal, hemato-encefálica y placentaria. La bacteria pasa desde el lumen intestinal al medio interno, atravesando las células epiteliales o por traslocación por las células M alcanzando las placas de Peyer. Si el sistema inmune no es capaz de controlar eficientemente la infección a nivel intestinal, la bacteria seguirá multiplicándose y puede diseminarse a través del torrente sanguíneo y los ganglios linfáticos. Alcanza el hígado y el bazo donde puede multiplicarse en el interior de macrófagos o células epiteliales. Si la multiplicación de *L. monocytogenes* no es controlada por una efectiva respuesta inmune innata, la bacteria escapa y continúa replicándose. La sobrevivencia del hospedero depende del desarrollo de una respuesta inmune adaptativa efectiva; de otro modo, la bacteria puede ingresar nuevamente al torrente sanguíneo y alcanzar el cerebro o la placenta, causando infecciones sistémicas potencialmente letales (Camejo *et al.*, 2011). La capacidad de *L. monocytogenes* para multiplicarse en el citosol de las células infectadas y diseminarse de célula a célula le permite evitar la respuesta inmune humoral (Vera *et al.*, 2013).

Ciclo intracelular de L. monocytogenes

L. monocytogenes es un parásito intracelular facultativo que entra en el hospedador de forma primaria a través del intestino. El ciclo incluye la fagocitosis inducida por el propio patógeno, la lisis de la vacuola fagocítica, el movimiento en el citoplasma y la diseminación a las células vecinas. (Figura 1)

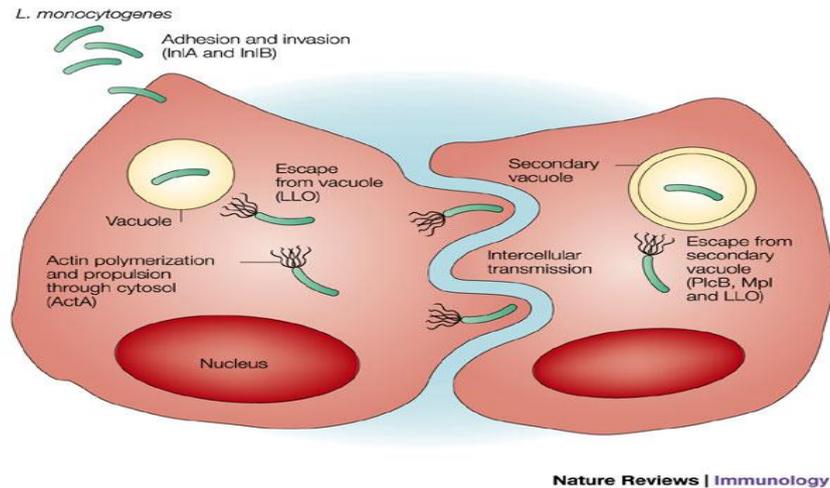


Figura 1. Esquema del ciclo intracelular de *L. monocytogenes*

El ciclo comienza con la adhesión de la bacteria a la superficie de la célula eucariota mediante la interacción con proteínas de superficie de la pared celular y la subsiguiente penetración en la célula hospedadora mediante fagocitosis inducida. Las dos principales proteínas de invasión de *L. monocytogenes* son la internalina A (InlA) y la internalina B (InlB), ambas codificadas por el operón inlAB. La InlA se une en forma covalente al peptidoglicano, mientras que la InlB se une mediante interacción electrostática a moléculas de ácidos lipoteicoicos, permitiendo así la adherencia de las bacterias a la célula eucariota. En particular, InlA se une al receptor E-cadherina, una glicoproteína transmembrana localizada en la superficie basolateral de varios tipos de células, incluyendo células epiteliales polarizadas como el enterocito. La interacción InlA/E-cadherina es crítica para la invasión del epitelio intestinal y activa una compleja vía de señalización que conduce a la reorganización del citoesqueleto del enterocito. Por su parte, InlB presenta un tropismo más amplio (Bonazzi *et al.*, 2009) y se han reconocido varias moléculas como potenciales receptores; entre ellas destaca el receptor para el factor de crecimiento de hepatocito (receptor Met). Met es un receptor transmembrana con un dominio intracelular con acción tirosina kinasa y, por lo tanto, la interacción InlB/ Met produce una fosforilación transitoria de Met. El receptor Met es expresado ubicuamente, permitiendo que *L. monocytogenes* se internalice en una gran variedad de células. Por lo tanto, este microorganismo puede invadir diferentes hospederos eucariotas, pero la eficiencia de la infección depende de la especie (Vera *et al.*, 2013). InlA le confiere a *L. monocytogenes* un tropismo más reducido, ya que E-cadherina sólo es expresada por un número limitado de células de origen epitelial. Cabe destacar que *L. monocytogenes* posee al menos 41 genes que codifican para este tipo de proteínas de adherencia. Existen muchas otras moléculas necesarias para la invasión y/o

entrada de *L. monocytogenes* a la célula eucariota, entre las que se encuentran varias autolisinas (Ami, p60, Auto) y una proteína fijadora de fibronectina (FbpA) (Lopez *et al.*, 2006).

Una vez fagocitada, la bacteria es capaz de escapar del ambiente hostil del fagosoma gracias a la secreción de listeriolisina O (LLO), una hemolisina activa pH ácido codificada por el gen *hly* y activada por tiol. LLO reconoce el colesterol de la membrana eucariota, forma poros y favorece la lisis de la membrana del fagolisosoma, lo que provoca la liberación de *L. monocytogenes* al citosol de la célula hospedadora. Además de esta toxina, *L. monocytogenes* secreta al medio extracelular dos fosfolipasas C (PI-PLC y PC-PLC) asociadas con la virulencia, que pueden contribuir a dañar las membranas y a producir citolisis. La PI-PLC esta codificada por el gen *plcA* y tiene como sustrato específico al fosfatidilinositol (PI); y PC-PLC que es una lecitinasa codificada por el gen *plcB* que hidroliza fosfatidilcolina, fosfatidilserina y fosfatidiletanolamina. Esta lecitinasa es activada y atraviesa la pared bacteriana gracias a una metaloproteasa específica (Mpl) codificada por el gen *mpl*. Una vez libre en el citosol, *L. monocytogenes* expresa los genes para adquirir los nutrientes necesarios para la multiplicación intracelular. Se ha determinado que el gen *hpt*, que codifica para el transportador de hexosa 6-fosfato, es importante para el crecimiento óptimo intracelular de *Listeria* (Vera *et al.*, 2013). Luego de la replicación, la bacteria utiliza el citoesqueleto de la célula hospedadora para desplazarse en su interior. El movimiento intracelular ocurre como consecuencia de un ensamblaje direccional de monómeros de actina de la célula hospedadora en uno de los polos de la bacteria, fenómeno dirigido por la proteína de superficie ActA (Lopez *et al.*, 2006).

Finalmente, la bacteria alcanza la periferia de la célula infectada, entra en contacto con la membrana celular y forma protuberancias hacia la célula colindante en forma de evaginaciones citoplásmicas. Estas estructuras invasoras son fagocitadas y la bacteria queda encerrada en un fagosoma de doble membrana, en cuya rotura parece jugar un papel fundamental la lecitinasa. Al ser un mecanismo que permite la diseminación de la bacteria por los tejidos del hospedador sin entrar en contacto con los efectores humorales del sistema inmune, este fenómeno de paso directo de célula a célula es crucial en la patogénesis de la infección que causa *L. monocytogenes* (Lopez *et al.*, 2006; Vera *et al.*, 2013).

Genes de virulencia

L. monocytogenes presenta varios tipos de genes asociados a virulencia. Por un lado, presenta genes organizados en islas de patogenicidad, y por otros genes aislados, entre los que se encuentran las internalinas (*inlA*, *inlB*, *inlC*, e *inlJ*).

Islas de genes de patogenicidad

Algunos genes de virulencia de *L. monocytogenes* se organizan dentro de unidades genéticas conocidas como islas de patogenicidad, que son adquiridas por la bacteria por mecanismos de transferencia genética horizontal. Seis de los genes de virulencia responsables del parasitismo intracelular de *L. monocytogenes* (*prfA*, *plcA*, *hly*, *mpl*, *actA* y *plcB*) están codificados en una región del cromosoma de 9 kb conocida como "isla 1 de patogenicidad de *Listeria*" (*Listeria pathogenicity island 1*, LIPI-1). Esta isla está presente también en *L. ivanovii*. LIPI-I se encuentra insertada establemente en el cromosoma en la misma posición en todas las especies (Figura 2). Tiene una composición de ADN similar a la del resto genoma de *Listeria* y no se han detectado elementos genéticos que favorezcan su movilidad. Por lo tanto, esta isla es conservada en *L. monocytogenes* puesto que presenta los genes necesarios para la colonización del hospedero (Vazquez-Boland *et al.*, 2001)

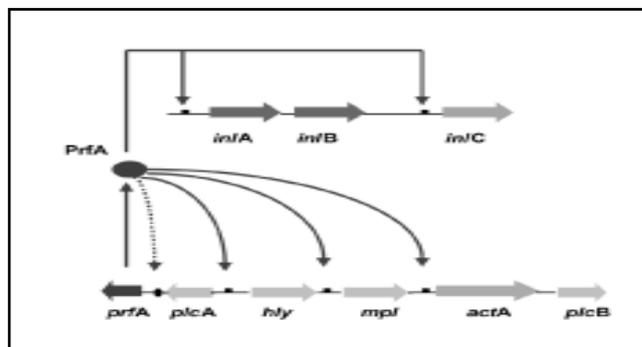


Figura 2. Esquema de Isla de patogenicidad LIPI- 1

El gen *prfA* está presente en todas las cepas de *L. monocytogenes* y codifica una proteína reguladora de 27kD (PrfA), la cual se une específicamente a un sitio en el ADN, regula la expresión de los genes de virulencia. PrfA regula la expresión de proteínas vinculadas a la entrada del microorganismo a células no fagocíticas, escape de la internalización vacuolar, se replica intracelularmente, y se disemina de célula a célula (Vazquez-Boland *et al.*, 2001; Lopez *et al.*, 2006).

LIPI-2 es una isla de internalinas específicas de *L. ivanovii* que contiene 10 genes *inl*, en un “cluster” de 22kb. Se encuentra ubicada entre dos genes *housekeeping* de la bacteria, los cuales son contiguos en *L. monocytogenes*. Se cree que juega un rol importante en el tropismo patogénico de esta especie en rumiantes.

LIPI-3 es una isla de patogenicidad presente en un sub-grupo de cepas de *L. monocytogenes* pertenecientes al linaje I, y en la cual se ha identificado la producción de un factor de virulencia adicional conocido como listeriolisina S (LLS). LLS es una citolisina que pertenece a la familia de la estreptolisina S (SLS), los miembros de esta familia ha sido asociada con el aumento de la virulencia de las cepas, lo que contribuye a la citotoxicidad y a la activación inflamatoria. Además, se ha demostrado que la LLS juega un rol en la sobrevivencia de *L. monocytogenes* y contribuye a su virulencia *in vivo*. LIPI-3 sólo ha sido identificada en algunas cepas del linaje I y muchas de éstas han estado implicadas en brotes de listeriosis (Cotter *et al.*, 2008; Clayton *et al.*, 2011).

Internalinas

Estas proteínas son miembros de una superfamilia de proteínas reconocidas por poseer en su extremo N-terminal un péptido señal y una región LRR (*leucine rich repeat*) y en su extremo C-terminal una secuencia conservada LPXTG (Leu-Pro-X-Thr-Gly, donde X es cualquier aminoácido) (Figura3). La comparación de secuencias para el grupo de las proteínas LRR sugiere que hay varias subfamilias diferentes de LRR, que se caracterizan por diferentes longitudes y secuencias consenso. Un LRR de internalinas típicamente contiene 22 residuos. El dominio LRR forma un solenoide curvado con leucinas e isoleucinas conservadas que forman el núcleo hidrofóbico, tal como se describe para InlB, InlH, e InlA. El reconocimiento del receptor involucra el dominio LRR.

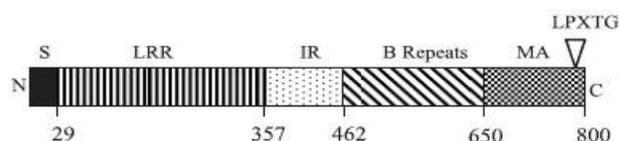


Figura 3. Esquema de internalina A. De izquierda a derecha extremo N-terminal, péptido señal, LRR, región intergénica, región de anclaje a la membrana, dominio LPTXG extremo C-terminal.

Como se mencionó anteriormente, las dos principales proteínas de invasión de *L. monocytogenes* son la internalina A (InlA) y la internalina B (InlB), ambas codificadas

por el operón *inLAB*. En particular, *InlA*, es una proteína compuesta de 800 aminoácidos que contiene 15-dominios LRR (Bonazzi *et al.*, 2009); y que alberga una región corriente abajo de la región LRR, que se ha demostrado que es crucial para la unión del dominio LRR al receptor E-cadherina y crítico para su estructura (Schubert *et al.*, 2002).

El tipo de secuencia consenso de la internalina J (*inlJ*) comprende 21 residuos y presenta una cisteína conservada en la posición 7 en lugar de una leucina. Las cisteínas son presumiblemente parte del núcleo hidrofóbico de la molécula y puede protegerse de la oxidación y por tanto es poco probable que formen enlaces disulfuro. Solamente una cisteína en la repetición 12 no está en la posición conservada y podría ser accesible a un ligando externo. El gen de la *inlJ* se encuentra directamente implicado en la virulencia de *L. monocytogenes* (Sabet *et al.*, 2005) ya que está presente en cepas/serotipos de *L. monocytogenes* que son capaces de causar la muerte en ratones, así como en brotes de listeriosis, pero no en cepas/serotipos avirulentos no patogénicos (Liu *et al.*, 2003, 2006b; Doumith *et al.*, 2004b; Liu, 2004). El único serotipo que da negativo para la *inlJ* por PCR, es el serotipo 4a, en el cual las cepas son incapaces de producir mortalidad de ratón, y son verdaderamente no patogénicas utilizando la determinación de virulencia relativa (ver más adelante) (Liu *et al.*, 2003; Liu, 2004). Por lo que se confirma, a *inlJ* como un gen implicado directamente en el pasaje de *L. monocytogenes* a través de la barrera intestinal, así como en etapas posteriores de la infección (Sabet *et al.*, 2005). Si bien la presencia o ausencia de un gen proporciona un indicador útil de la virulencia potencial de cepas de *L. monocytogenes*, existen algunas cepas de linaje IIIB inusuales (por ejemplo, el serotipo 7) que son negativos para la *inlJ* por PCR y Southern Blot, pero tienen la capacidad de causar la muerte del ratón cuando se inyectan de forma intraperitoneal (Liu *et al.*, 2006). Esto sugiere que *inlJ* no es absolutamente necesario para la virulencia de *L. monocytogenes* a través de la inoculación intraperitoneal pero sí que contribuye al pasaje del epitelio intestinal del huésped ya que en etapas posteriores de la infección, una delección en una cepa mutante del gen *inlJ* muestra una virulencia reducida tanto en ratones hEcad vía oral y ratones de tipo salvaje vía intravenosa (Sabet *et al.*, 2005). Teniendo en cuenta que sólo cuatro serotipos (1/2a, 1/2b, 1/2c y 4b) se aíslan de casos de listeriosis humana y que las cepas de el linaje IIIB que no presentan el gen *inlJ* pueden tener dificultades para atravesar la barrera intestinal del huésped durante la infección a través de la vía oral, pero tienen la capacidad de causar la mortalidad del ratón cuando se inocula por vía intraperitoneal, se agrego otro marcador

de virulencia adicional para la detección de cepas potencialmente virulentas de *L. monocytogenes* denominado internalina C (*inlC*).

La InlC tiene el mismo activador transcripcional que otros genes de virulencia y está presente sólo en cepas patógenas de *Listeria* spp. Mientras que la superficie de unión al receptor de las internalinas A y B es cóncavo y con grupos aromáticos, la superficie de InlC es más pequeño, plano y más hidrófilo, lo que sugiere que InlC puede estar involucrada en asociaciones débiles o transitorias con receptores. Esto puede explicar por qué no se ha descubierto aun ningún receptor específico para InlC. InlC presenta un cap/tapa helicoidal, una repetición rica en leucina y dominios similares a inmunoglobulinas (Ig), como se conoce para otros miembros de la familia de internalinas (Schubert *et al.*, 2002). El dominio de la tapa, presenta de 35-76 residuos, que contiene tres hélices y dos hebras muy cortas. El dominio LRR, contiene entre 77-213 residuos, con una estructura superhelicoidal y que comprende seis repeticiones, cada una con 22 residuos por repetición excepto en el bucle tres, que tiene 21 residuos. Cada LRR tiende a tener leucina, isoleucina o valina en las posiciones 5, 7, 12, 15, 18 y 21 del bucle. La asparagina en la posición 10 parece ser importante, ya que forma una escalera de asparagina dentro del dominio LRR (Ooi *et al.*, 2006). Utilizando cebadores de PCR diseñados a partir del gen *inlC*, se observó que este gen está presente en todos los serotipos 1/2a, 1/2b, 1/2c, 3a, 3b, 3c, 4b, 4d, y 4e y en algunas cepas del serotipo 4c, pero ausentes en el serotipo 4a. El linaje IIIB que contiene cepas negativas para *inlJ*, pero es capaz de causar la mortalidad del ratón también es positivo por PCR para el gen *inlC*.

Al igual que *inlJ*, *inlC* es un marcador de virulencia adicional que contribuye en una etapa más tardía, en etapas post-intestinales de infección por *L. monocytogenes*. Se ha demostrado que una delección en una cepa mutante que contiene el gen *inlC* muestra baja virulencia mediante una vía intravenosa en el ratón (Engelbrecht *et al.*, 1996; Liu *et al.*, 2007) pero no afectan la entrada en células epiteliales, la multiplicación intracelular o la propagación célula a célula.

Mecanismos de detección y determinación de la virulencia

A pesar de ser una especie definida clásicamente como patogénica, *L. monocytogenes* se compone de un espectro de cepas (o genotipos) con potencial para producir daño variable. Mientras que muchas cepas de *L. monocytogenes* producen

enfermedades severas y algunas veces mortales, otras causan poco daño en el hospedero. A lo largo del tiempo, se han desarrollado diversos métodos de laboratorio para medir dicha virulencia. Estos incluyen, ensayos de virulencia en ratón, ensayo de células *in vitro*, y detección de proteínas y genes asociados con la virulencia. Estos métodos no sólo han contribuido a comprender mejor la virulencia y patogenicidad de *L. monocytogenes* sino que también han ayudado a tomar medidas de control y prevención adecuadas contra la listeriosis.

Ensayos de virulencia en ratón: fue uno de los primeros métodos utilizados para la evaluación de la virulencia de *L. monocytogenes*, siendo capaz de proporcionar una medición *in vivo*. Este método es considerado el *gold standard* para comparar cualquier nuevo ensayo desarrollado en la determinación de virulencia (Liu *et al.*, 2003). En general, el ensayo de virulencia en ratón se lleva a cabo inoculando vía oral, nasal, intraperitoneal, intravenosa o subcutánea diferentes grupos de ratones con varias dosis de *L. monocytogenes*. La virulencia de una cepa de *L. monocytogenes* queda determinada por la mortalidad del ratón resultante de la infección, luego de la estimación de unidades formadoras de colonia (UFC) por recuento en placa, expresada como dosis letal media (LD50). La LD50 es la dosis infectante que causa una mortalidad del 50% en la población infectada. Aunque el cálculo de LD50 es un paso esencial después de la infección experimental, la estimación de UFC por recuento en placa, es una tarea que requiere mucha atención y consistencia, ya que tiene un margen de error muy amplio. Por este motivo, el número de UFC para una determinada cepa de *L. monocytogenes* puede variar de un laboratorio a otro, dando como resultado diferentes valores de LD50 para un mismo ensayo.

Virulencia relativa (%): ha sido descrita como una alternativa de la interpretación directa del ensayo de virulencia en ratón (Liu, 2004). Se obtiene dividiendo el número de ratones muertos por el número total de ratones sometidos al ensayo para una determinada cepa, utilizando una cepa virulenta como referencia. Al ser un método independiente del recuento de UFC requiere menos grupos de dosificación. Mientras que los valores de LD50 proporcionan una medida algo imprecisa de la virulencia, la virulencia relativa es un método más directo y preciso. Sin embargo, dado el alto costo y los problemas asociados con la experimentación con animales, el ensayo de virulencia del ratón no se utiliza habitualmente para determinar la virulencia de *L. monocytogenes*.

Ensayos de células in vitro: las técnicas de cultivo celular *in vitro* han sido utilizadas como una alternativa al ensayo de virulencia en ratón. Estos métodos miden la capacidad de *L. monocytogenes* de causar efectos citopatogénicos en la línea celular de tipo enterocito Caco-2 (Pine *et al.*, 1991), o formar placas en la línea celular de adenocarcinoma humano HT-29 (Roche *et al.*, 2001). Las principales ventajas de estos ensayos incluyen su relativamente bajo costo, y su facilidad de uso. Sin embargo, estas pruebas requieren mucho tiempo y son menos sensibles que los ensayos con ratón. Por esta razón, no han podido ser establecidos como métodos de rutina para la determinación de la virulencia y la patogenicidad de *L. monocytogenes*.

Detección específica de gen(es) de virulencia: provee una estrategia útil para la detección de la virulencia de *L. monocytogenes*, buscando genes presentes en cepas virulentas, pero ausentes en cepas avirulentas. En 2007, Liu y colaboradores desarrollaron una PCR múltiple que incorpora los cebadores para los genes *internalina A (inlA)* que es especie específica y los cebadores para los genes *internalina C (inlC)* e *internalina J (inlJ)* para la determinación de la virulencia de *L. monocytogenes*. La identidad de *L. monocytogenes* fue validada por la amplificación de una banda de 800pb utilizando los cebadores para *inlA*, mientras que su potencial de virulencia se determinó mediante la obtención de dos amplicones de 517pb y/o 238pb usando los cebadores para *inlC* e *inlJ*, respectivamente. Este método fue validado mediante ensayos de virulencia con ratones. En dichos ensayos se observó que aquellas cepas de *L. monocytogenes* con potencial para causar mortalidad en ratones a través de la inoculación intraperitoneal fueron positivas para los genes *inlC* y/o *inlJ*, mientras que las cepas naturalmente incapaces de producir mortalidad en el ratón fueron negativas (Liu *et al.*, 2007).

De esta manera, en este trabajo concluyeron que la utilización de una PCR múltiple con cebadores específicos para *inlA*, *inlJ* y *inlC* permite la rápida, sensible y simultánea confirmación de *L. monocytogenes* y su potencial virulencia (Liu *et al.*, 2007).

Subtipificación

L. monocytogenes se compone de una diversidad de cepas por lo que disponer de procedimientos para subtipificar las cepas involucradas en brotes de listeriosis, y así contribuir con el conocimiento de la epidemiología es parte de los programas de control

y prevención dirigida a la listeriosis. Al igual que la identificación específica de especie, hay dos métodos principales de subtipificación: la fenotípica y la genotípica.

Mientras que los métodos de subtipificación fenotípica presentan ocasionalmente baja discriminación y reproducibilidad, la subtipificación molecular es altamente sensible, discriminatoria y reproducible. Para una mejor discriminación de subtipificación, se utiliza a menudo en la práctica para la epidemiológica de brotes de *L. monocytogenes* la combinación de dos o más técnicas, ya sea fenotípicas o genotípicas (Liu, 2006)

Métodos fenotípicos

Los métodos de subtipificación fenotípica incluyen la serotipificación, fagotipificación, electroforesis de enzimas multilocus (MLEE) y tipificación de esterasa. A continuación se detalla únicamente el método de serotipificación.

Serotipificación: Considerando que, en base a reacciones serológicas entre antígenos somáticos (O) y flagelares (H) y sus correspondientes antisueros (Seeliger & Höhne, 1979 ; Seeliger & Jones, 1986), se puede separar las cepas de *L. monocytogenes* en 13 serotipos (1/2a, 1/2b, 1/2c, 3a, 3b, 3c, 4a, 4b, 4c, 4d, 4e y 7) y que sólo cuatro de estos (1/2a, 1/2b, 1/2c y 4b) se asocian comúnmente con la listeriosis humana, el serotipado puede ser potencialmente útil para el screening de cepas de *L. monocytogenes* involucradas en brotes (Liu, 2006). Sin embargo, el valor del serotipado clásico en *L. monocytogenes* en la investigación epidemiológica es algo limitada, debido a la complejidad de la técnica, que requiere la utilización de 19 antisueros de alto costo (15 somáticos y 4 flagelares) y no fácilmente disponibles. Utilizando marcadores genéticos específicos, Doumith y colaboradores (2004) desarrollaron una PCR múltiple que permite separar las cepas de *L. monocytogenes* en cinco grupos serológicos distintos. El grupo IIa comprende los serovares 1/2a y 3a, el grupo IIb comprende los serovares 1/2b, 3b y 7, el grupo IIc comprende los serovares 1/2c y 3c, el grupo IVa los serovares 4a y 4c y el grupo IVb comprenden los serovares 4b, 4d y 4e. Los perfiles de PCR múltiple propuestos por estos autores no distinguen, dentro de la especie *L. monocytogenes*, el serovar 1/2a del 3a, el 1/2c del 3c, el 1/2b del 3b y del 7, o el 4b del 4d y del 4e. Estos perfiles tampoco distinguen los serovares de *L. monocytogenes* 4a y 4c de las otras especies de *Listeria*. Sin embargo, debido a que los serovares 3a, 3b, 3c, 4a, 4c, 4e, 4d, y 7 son muy poco frecuentes en los alimentos y rara vez reportados como implicados en la listeriosis humana, la multiplex PCR ofrece una alternativa muy útil al serotipado en

las investigaciones epidemiológicas, siendo altamente específico para *L. monocytogenes* proporcionando al mismo tiempo la confirmación de la especie (Doumith *et al.*, 2004) Por otra parte la aglutinación con antisueros específicos para los antígenos somáticos 1 y 4 de *Listeria* permite diferenciar los serotipos 1/2a, 1/b y 1/2c de los otros serovares incluidos en los grupos IIa, IIb y IIc de la PCR anteriormente mencionada. Por lo tanto la combinación de la PCR múltiple y la aglutinación permite determinar estos serotipos; no así para el grupo 4 (serovares 4b, 4d y 4e).

Métodos genotípicos

Los métodos de subtipificación genotípica comprende la electroforesis en gel de campo pulsado (PFGE), ribotipificación, técnicas de subtipificación basadas en PCR, por ejemplo, amplificación al azar de ADN polimórfico (RAPD), amplificación de fragmentos de polimorfismo (AFLP), PCR de restricción de fragmentos de polimorfismo (PCR-RFLP) y PCR de elementos repetitivos (REP-PCR) y las técnicas de subtipificación basadas en la secuenciación del ADN como la tipificación de secuencias multilocus (MLST). A continuación se detalla únicamente el método de electroforesis en gel de campo pulsado.

Electroforesis en gel de campo pulsado (PFGE): Es un método de subtipificación genotípica por biología molecular altamente reproducible, que se basa en el análisis de polimorfismos de fragmentos obtenidos por la digestión del ADN bacteriano. En el análisis de RFLP, se digiere el ADN genómico bacteriano con enzimas de restricción para producir fragmentos que luego se separan por electroforesis en gel de agarosa y que forman distintos patrones de bandas para cada cepa en particular. PFGE utiliza enzimas de restricción seleccionadas para producir entre 8 y 25 fragmentos de ADN de 40-600kb, y corrientes alternas en pulsos para obtener una mejor resolución en los fragmentos de ADN. En este método, las suspensiones bacterianas se colocan en los plugs (bloques) de agarosa, donde son lisados, y el ADN se digiere con las enzimas de restricción. Los plugs que contienen el ADN digerido se transfieren a un gel de agarosa y se someten a electroforesis por 19-25hrs con corrientes alternas en pulsos en un ángulo de 120°. Sobre la base de los distintos patrones de banda de ADN, PFGE clasifica *L. monocytogenes* en subtipos (o pulsotipos). Por su capacidad de discriminación se considera el método estándar de referencia para diferenciar cepas de *L. monocytogenes* (Liu *et al.*, 2006). Sin embargo, debido al tiempo necesario para

llevar a cabo la técnica (30hs aproximadamente) no es ampliamente utilizada fuera de laboratorios de referencia como de investigación.

Por lo tanto, la serotipificación se utiliza como método de primera línea ya que, de los 13 serovares que se describen para *L. monocytogenes*, el 95 % de los aislamientos humanos y alimentarios pertenecen a los serovares 1/2a, 1/2b, 1/2c y 4b. Esta determinación del serovar permite la discriminación entre aislamientos que probablemente pertenecen a un brote de los que no forman parte del mismo y por lo tanto disminuye el número de cepas que necesitan ser mejor caracterizadas por PFGE con el fin de mejorar la discriminación más allá del nivel del serovar.

Epidemiología y Presentación Clínica

Aunque la listeriosis es una enfermedad rara comparada con otras enfermedades transmitidas por alimentos, su incidencia varía entre 0.1 y 11.3 casos/millón (0,1% de todas las infecciones transmitidas por los alimentos), es considerada como una de las infecciones más severas (Disson & Lecuit, 2012)

La listeriosis humana puede presentarse como epidemias o en forma de casos esporádicos, y que afecta sobre todo a mujeres embarazadas, recién nacidos, ancianos y adultos inmunodeprimidos. El espectro clínico va desde infecciones banales, como una gastroenteritis febril en sujetos inmunocompetentes, hasta enfermedad invasiva como bacteriemia, sepsis, meningitis y meningoencefalitis en personas con algún tipo de inmunosupresión. La tasa de letalidad promedio de listeriosis es de 20 a 30% (la más alta de todas las infecciones alimentarias). Se desconoce con exactitud la dosis mínima para producir una listeriosis invasiva, pero se sabe que es más baja en aquellos individuos pertenecientes a la población de riesgo. Los factores que pueden influir en el desarrollo de la enfermedad invasiva incluyen la virulencia de los microorganismos infectantes (linaje, presencia de genes de virulencia accesorios, etc.), la susceptibilidad del hospedero y el tamaño del inóculo (Vázquez- Boland *et al.*, 2001) Además de las formas invasivas, pueden ocurrir casos de infección localizada como resultado de una diseminación hematogena. Estas ocurren en el peritoneo, las articulaciones, el endocardio o en los ojos. En personas sanas la infección por *L. monocytogenes* puede provocar una gastroenteritis febril o infecciones cutáneas por la exposición directa de la piel al microorganismo (típicamente en veterinarios, manipuladores de alimentos).

Ambas condiciones son autolimitadas y presentan sintomatología inespecífica, por lo que son ampliamente sub-diagnosticadas (Swaminathan & Gerner-Smidt, 2007).

Gastroenteritis febril

Es una enfermedad leve, autolimitada, que ocurre por lo general en la población sana y está asociada al consumo de alimentos contaminados con *L. monocytogenes*. Presenta un período de incubación de 24-48 hs. Se presenta como náuseas, vómitos, diarrea y cefalea. En escasas ocasiones puede llevar a enfermedad invasiva (Hernández & Payeras, 2014).

Listeriosis invasiva

1-Infeción en la embarazada y neonatal

Durante la gestación, la inmunidad mediada por células se ve ligeramente alterada, y las embarazadas son propensas a desarrollar infección por este microorganismo. *L. monocytogenes* puede proliferar en la placenta y escapar de los mecanismos de defensa habituales. Aunque la enfermedad puede ocurrir en cualquier etapa de la gestación, es más frecuente durante el tercer trimestre. El microorganismo puede recuperarse de cultivos del cuello uterino, líquido amniótico y placenta (Dreverts & Bronze, 2008). La mayoría de las embarazadas infectadas se presentan con bacteriemia acompañada de fiebre, escalofríos, cefalea, mal estar general y leucocitosis. Las complicaciones incluyen el aborto espontáneo o la muerte fetal (20%), especialmente cuando la infección ocurre tempranamente en el embarazo. También puede desencadenar un parto prematuro o infección neonatal severa.

Hasta dos tercios de los neonatos de madres con listeriosis desarrollan una infección neonatal por transmisión transplacentaria o lo adquieren durante el pasaje por el canal de parto. La listeriosis neonatal se clasifica en temprana (aparición <7 días después del parto), siendo la vía transplacentaria la más frecuente, o tardía (aparición ≥ 7 días), principalmente por transmisión durante el parto o contaminación cruzada intrahospitalario (Dreverts & Bronze, 2008). La enfermedad temprana suele manifestarse en el momento del parto y se presenta como neumonía, bacteriemia o meningitis. La aspiración meconial, distrés respiratorio, fiebre, letargia, ictericia y rash cutáneo son frecuentemente observados. En contraste, la infección tardía ocurre en los recién nacidos a término sin complicaciones durante el embarazo. Esta es menos

frecuente que la infección neonatal temprana y generalmente se presenta como una meningitis.

2-Listeriosis en el adulto

Generalmente se presenta como una bacteriemia con o sin foco evidente, o como una infección del SNC bajo la forma de meningitis, meningocelalitis, y menos frecuentemente romboencefalitis o abscesos cerebrales.

La meningitis y meningocelalitis, acompañada o no de signos focales neurológicos, es la forma de presentación más frecuente (70-90%), siendo reconocida como la segunda a cuarta causa de meningitis bacteriana aguda en adultos. Los factores predisponentes son las personas mayores de 60 años y la inmunosupresión. El cuadro clínico es similar al producido por otros agentes etiológicos, y se caracteriza por fiebre elevada, cefalea intensa, rigidez de nuca, y alteraciones motoras como temblor, ataxia y convulsiones. Los signos meníngeos son menos frecuentes en los pacientes inmunodeprimidos (Disson & Lecuit, 2012).

La romboencefalitis se ve en menos del 10% de las listeriosis invasivas de adultos. Tiene un curso bifásico, con un período prodrómico dado por cefalea, náuseas, vómitos y fiebre, seguido de una fase de afectación progresiva del tronco cerebral y cerebelo donde se observa parálisis facial, ataxia, hemiparesia y alteraciones de la sensibilidad (Disson & Lecuit, 2012).

Los abscesos cerebrales se observan con mayor frecuencia en inmunodeprimidos y pacientes con comorbilidades, siendo la presentación más frecuente fiebre, cefalea y signos focales neurológicos (Drevets & Bronze, 2008; Disson & Lecuit, 2012; Hernández & Payeras, 2014).

Infecciones localizadas

L. monocytogenes no causa solo enfermedad invasiva, sino que mediante la inoculación directa del microorganismo se puede observar conjuntivitis, infecciones de piel y linfadenitis. A su vez, la enfermedad bacteriémica puede derivar en peritonitis, osteomielitis, hepatitis, pleuritis, abscesos esplénicos, entre otros (Paciel & Medina, 2016)

Tratamiento

En el caso de enfermedad invasiva es importante comenzar con el tratamiento de forma precoz, debido a la gravedad y alta letalidad de la enfermedad. El tratamiento de actual consiste en antibióticos β -lactámicos como la ampicilina a dosis altas, pudiendo combinarse con aminoglucósidos como la gentamicina.

Los antimicrobianos de segunda línea en caso de alergia a β -lactámicos son trimetoprim / sulfametoxazol, vancomicina, e incluso linezolid. La duración del tratamiento por lo general es de al menos 2 semanas en la bacteriemia del inmunocompetente y de hasta 4 a 6 semanas en otras presentaciones invasivas según el sitio afectado, la inmunidad del paciente y la evolución clínica (Paciel & Medina, 2016).

Prevención

La listeriosis se puede prevenir de tres maneras:

1. controlar el microorganismo en el ambiente de las plantas de elaboración de los alimentos
2. poner especial atención en la manipulación, elección y preparación del alimento en el uso doméstico
3. en circunstancias especiales, con la profilaxis antibiótica.

En primer lugar, *Listeria* spp. es muy ubicua en el medio ambiente y se introduce fácilmente en los mataderos y en las plantas de procesamiento de alimentos. El organismo prolifera en biofilms y en el ambiente de bajas temperatura que se encuentran a menudo en estas plantas. La introducción en los alimentos procesados es por tanto inevitable, pero la contaminación puede reducirse mediante una buena higiene industrial. La industria alimentaria ha introducido un programa titulado “Análisis de riesgos en puntos críticos de control (HACCP) para mejorar el control de *Listeria* y otros patógenos transmitidos por alimentos en estos ambientes. Esta iniciativa se ha asociado con una reducción de la enfermedad esporádica en las regiones geográficas donde se lleva a cabo una vigilancia activa de la listeriosis.

En segundo lugar, los grandes brotes de listeriosis transmitidos por los alimentos han llevado a la publicación de recomendaciones dietéticas para la población de riesgo. (Ver más abajo). Estas recomendaciones y la concientización del problema de la listeriosis por parte del público en general, pueden haber contribuido en la disminución

de los casos esporádicos de infección. Sin embargo, los brotes de origen alimentario continúan ocurriendo en un contexto de enfermedad esporádica, y hay pocas probabilidades de eliminar completamente el patógeno del alimento y, por lo tanto, de prevenir la enfermedad en su totalidad. Cocinar a temperaturas adecuadas y pasteurizar todos los alimentos eliminaría completamente el riesgo de listeriosis alimentaria.

En tercer lugar, la terapia antibiótica profiláctica puede prevenir algunos casos de listeriosis. Por ejemplo, tratar a las mujeres embarazadas con ampicilina cuando presentan enfermedad febril inespecífica en el entorno de un brote de listeriosis, así como, los pacientes con infección avanzada por VIH que son tratados con TMP-SMZ diariamente o tres veces por semana para prevenir la neumonía por *Pneumocystis carinii*. Los datos de vigilancia sugieren que este tratamiento puede ser una medida preventiva eficaz para la listeriosis en esta población de pacientes. Por último, algunos pacientes sometidos a quimioterapia se benefician utilizando antibacterianos profilácticos, aunque el uso generalizado de quinolonas en este contexto puede no ser tan efectivo contra la listeriosis como es la profilaxis con TMP-SMZ (Schlech, 2000).

Recomendaciones para la prevención de la listeriosis alimentaria:

Para la población en general

- Cocinar bien los alimentos crudos de origen animal (por ejemplo, carne de res, cerdo y aves de corral).
- Lavar bien las frutas y verduras crudas antes de consumirlas.
- Mantener las carnes crudas separadas de verduras, alimentos cocinados y alimentos listos para el consumo.
- Evitar el consumo de leche cruda (no pasteurizada) o alimentos preparados con leche no pasteurizada.

Recomendaciones adicionales para la población de riesgo (no consumir y lavarse las manos luego de manipularlos) (<http://www.cdc.gov/Features/PrenatalInfections/>)

- Leche no pasteurizada y queso elaborado a partir de ella.
- Quesos blandos (ejemplo: quesos de estilo mexicano, Feta, Brie, Camembert, quesos azules)
- Congelados que solo requieran calentar y servir.
- Chacinados y embutidos, (recordar que si consume frankfurters se deben calentar a temperatura de ebullición suficiente tiempo).
- Vegetales crudos prontos para consumir (ensaladas prontas).
- Pescados y mariscos ahumados, ensaladas de pollo, jamón o mariscos.
- Patés refrigerados y pastas de carne.
- Carnes y pescados que no se encuentren bien cocidos.

Además todos los consumidores deberían seguir cuatro pasos de seguridad en la elaboración y/o manipulación para lograr comidas seguras:

- a) Limpiar, lavado de manos, utensilios y superficies regularmente (incluyendo el refrigerador).
- b) Separar, productos crudos como carnes rojas, pollo, mariscos, pescados, huevos, etc, de los alimentos cocidos, utilizar tablas diferentes para cortar materias primas crudas de alimentos cocidos prontos para el consumo y así evitar la contaminación cruzada.
- c) Cocinar, realizar la cocción a temperatura correcta y suficiente dependiendo del tipo de alimento (recordar que el calentamiento en microonda no elimina este tipo de bacterias patógenas).
- d) Refrigerar, apropiadamente los alimentos.

Justificación del trabajo.

En el marco de una línea de investigación del Departamento de Bacteriología y Virología sobre el estudio de cepas de *Listeria monocytogenes*, nos propusimos caracterizar un subconjunto de cepas aisladas entre 2013 y 2015 de humanos y de alimentos con el fin de avanzar en el conocimiento de la epidemiología de esta patología en nuestro país.

OBJETIVOS

Objetivo general

Caracterizar un conjunto de aislamientos de origen humano y alimentario correspondientes a *L. monocytogenes*

Objetivos Específicos

- Confirmar genóticamente los aislamientos identificados fenotípicamente como *L. monocytogenes*
- Determinar su potencial patogénico mediante la detección de algunos genes asociados con virulencia.
- Determinar la distribución de los serotipos de *L. monocytogenes* de acuerdo al origen de los aislamientos.
- Comparar genóticamente los aislamientos de origen humano mediante PFGE

MATERIALES Y MÉTODOS

Aislamientos

Se estudiaron 75 aislamientos de *Listeria* sp. que fueron recibidos para confirmar la identificación en el Laboratorio de Bacteriología y Virología del Instituto de Higiene durante el período comprendido entre enero de 2013 y diciembre de 2015. Catorce aislamientos fueron recuperados de casos de listeriosis humana (un aislamiento por paciente) y 61 aislamientos de alimentos. Salvo 2 casos de listeriosis neonatal, ningún otro caso había sido asignado a un brote.

Los aislamientos fueron conservados en agar nutritivo semi-sólido sembrados en profundidad y en glicerol a -80°C para estudios posteriores.

Cultivos

Las cepas fueron cultivadas en Tryptic soy agar (TSA) con el agregado de sangre ovina al 5% (ASO 5%), incubadas en aerobiosis a 37°C, durante 24-48 horas.

Extracción de ADN

El ADN bacteriano se obtuvo a partir de cultivos *overnight* a 37°C en agar sangre ovina al 5%. Para esto se suspendieron de 3 a 5 colonias en 50 µl de una solución de lisis (SDS 0,25%- NaOH 0,05N) y se incubaron por 15 min a 100°C. Posteriormente, se agregaron 100 µl de H₂Omq, se centrifugaron a 13000 rpm y el sobrenadante se guardó a -20°C para su posterior utilización como molde en los diferentes ensayos de PCR.

Identificación bacteriana

1. Pruebas bioquímicas

A partir de los cultivos *overnight* en TSA-SO se determinó la producción o no de β-hemólisis, se consignaron las características macroscópicas de las colonias (tamaño, tipo de borde, consistencia, color, etc.) y se realizó la tinción clásica de Gram (Wellinghausen, 2012)

Para la identificación del género *Listeria* se realizaron las siguientes pruebas bioquímicas: reacción de catalasa en lámina, hidrólisis de la esculina y producción de ácido a partir de D-glucosa (Mac Faddin, 2003; Wellinghausen, 2012) (ver ANEXO)

Para la diferenciación entre especies se tuvo en cuenta la producción de β - hemólisis y se realizaron los siguientes tests: prueba de CAMP con *S. aureus* y *R. equi* y producción de ácido a partir de otros azúcares (manitol, D-xilosa, ramnosa) (Mac Faddin, 2003; Wellingshausen 2012) (ver ANEXO)

2. PCR para el gen *inlA* (gen específico de especie)

La técnica de PCR se realizó según el protocolo descrito por Liu *et al.* (2007). La reacción de amplificación se realizó en un termociclador Gene Amp PCR System 2700 (Applied Biosystems®, FosterCity, CA, USA) en un volumen de reacción de 25 μ l conteniendo 1.0U de Taq polimerasa, buffer de PCR 1X, 0.2mM de dNTPs y 10ng de ADN bacteriano junto con 25pmol de cada uno de los cebadores (ver ANEXO). El programa de PCR consistió en 1 paso inicial de 94°C por 2 min; 30 ciclos de 94°C por 20seg, 55°C por 20seg y 72°C por 50seg; y 1 paso final de 72°C por 2 min. El producto de amplificación fue sometido a electroforesis en gel de agarosa al 1% y posteriormente revelado con bromuro de etidio. El tamaño del amplicon obtenido fue de 800pb. Se incluyeron como controles positivo y negativo las cepas *L. monocytogenes* ATCC 19111 y *L. innocua* ATCC 51742, respectivamente.

PCR múltiplex para los genes *inlC* e *inlJ*

A los efectos de evaluar la capacidad patogénica de los aislamientos se analizaron por PCR la presencia de los genes de virulencia *inlC* e *inlJ*, según el protocolo descrito por Liu *et al.* (2007). La reacción de amplificación se realizó en un termociclador Gene Amp PCR System 2700 (Applied Biosystems®, Foster City, CA, USA) en un volumen de reacción de 25 μ l conteniendo 1.25U de Taq polimerasa, buffer de PCR 1X, 0.2mM de dNTPs y 10ng de ADN bacteriano junto a 30pmol de cada uno de los cebadores para el gen *inlC* (ver ANEXO) y 20 pmol de cebadores específicos para el gen *inlJ* (ver ANEXO). El programa de PCR consistió en 1 ciclo de 94°C por 2 min; 30 ciclos de 94°C por 20seg, 55°C por 20seg y 72°C por 50seg y 1 ciclo de 72°C por 2 min. Los productos de la amplificación fueron separados por electroforesis en gel de agarosa y posteriormente revelados con bromuro de etidio. El tamaño de los amplicones obtenidos para los genes *inlC* e *inlJ* fue de 517pb y 238pb, respectivamente.

Serotipificación

I. PCR múltiplex para determinación de perfiles serotipos de L. monocytogenes

La técnica de PCR múltiplex se realizó según el protocolo descrito por Doumith *et al.* (2004). La reacción de amplificación se realizó en un termociclador Gene Amp PCR System 2700 (Applied Biosystems®, Foster City, CA, USA) en un volumen final de 25µl conteniendo 1.25U de Taq polimerasa, 0.2 mM de dNTPs, Tris-HCl 50 mM – KCl 10 mM – (NH₄)₂SO₄ 50 mM - MgCl₂ 2 mM, pH 8.3. Se utilizaron los siguientes 5 pares de cebadores a una concentración final de 0.2µM: lmo0737, ORF2819, ORF2110, lmo1118 y prs (ver ANEXO). El programa de PCR consistió en 1 ciclo de 94°C por 3 min; 35 ciclos de 94°C por 0.40 min, 53°C por 1.15 min y 72°C por 1.15 min y 1 ciclo de 72°C por 7 min. El producto de amplificación fue sometido a electroforesis en gel de agarosa al 2% y posteriormente revelado con bromuro de etidio.

Se utilizaron las siguientes cepas control: *L. monocytogenes* serotipo 1/2a (CIP 89381); *L. monocytogenes* serotipo 1/2b (CIP 90602); *L. monocytogenes* 1/2c (CIP 89756) y *L.monocytogenes* serotipo 4b (CIP 88868) y agua calidad molecular como control de mezcla.

II. Aglutinación para los antígenos somáticos 1 y 4

El serotipado fue llevado a cabo mediante aglutinación en lámina utilizando antiseros comerciales *Listeria* O Antiserum Type 1 y 4 (BD Difco) de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

Electroforesis en gel de campo pulsado (PFGE).

La técnica de PFGE se realizó para los aislamientos de origen humano de acuerdo con el protocolo estándar de la red Pulsenet para *Listeria monocytogenes* (CDC, 2013). Las suspensiones bacterianas se ajustaron a una densidad óptica de 1.4 a 610nm, junto con un volumen igual de 1.2% de solución de agarosa de campo pulsado (Bio-Rad, Hercules, CA, US) precalentada a 55°C y luego colocadas en moldes adecuados. Los plugs se lavaron 6 veces con solución de lavado, se cortaron en trozos (aprox. 2 mm) y se digirieron durante 2 horas a 37°C con 10U de la enzima de restricción *AscI* y a 25°C con 10U de la enzima de restricción *Apal* (New England, BioLabs Inc., Massachusetts,

EE.UU.). La separación de los fragmentos de ADN se realizó con el sistema CHEF DR-II (Bio-Rad, Hercules, CA, US). Se incluyó *Salmonella enterica* serotipo Braenderup (CDCH9812) como control de patrón de peso molecular. Las bandas se visualizaron mediante tinción con gel con 100 µg / ml de bromuro de etidio como agente intercalante del ADN y la imagen se capturó con el sistema FOTODYNE (Thermo Fischer Scientific, Waltham MA, US) FOTO / AnalystTM Investigator Eclipse. Los patrones de PFGE se analizaron utilizando el software BioNumerics, versión 6.1 (Applied-Maths Sint-Martens-Latem, Bélgica). El coeficiente de correlación de Dice se utilizó para determinar los niveles de similitud (Dice, 1945). Para el análisis de los patrones de agrupación se utilizó el UPGMA (unweighted-pairgroupmatchingalgorithm) (Foerster *et al.*, 2013; Jain *et al.*, 2000) con una tolerancia y optimización del 1.5 %. Los aislamientos que presentan una similitud $\geq 95\%$ correspondieron al mismo pulso tipo y aquellos con $\geq 80\%$ se ubicaron en el mismo pulsogruppo (Montero *et al.*, 2015)

RESULTADOS

1. Identificación bacteriana.

Todos los aislamientos estudiados fueron identificados como *L. monocytogenes* por las siguientes pruebas bioquímicas: bacilos Gram positivos en la microscopía, colonias β-hemolíticas, positividad para las pruebas de catalasa, hidrólisis de la esculina y ácido a partir de D-glucosa; prueba de CAMP positiva con *S. aureus* y producción de ácido a partir de manitol, D-xilosa y ramnosa. Además todos los aislamientos tuvieron resultados positivos por PCR para el gen *inlA* (ver figura 1).

2. Determinación de genes de virulencia

En todos los aislamientos se detectó la presencia de los genes de virulencia *inlJ* e *inlC*.

A modo de ejemplo, en la figura 4 se muestran los productos de PCR que se obtuvieron en las determinaciones de los genes *inlA*, *inlJ* e *inlC* para los tres primeros aislamientos alimentarios confirmados como positivos para *L. monocytogenes*.

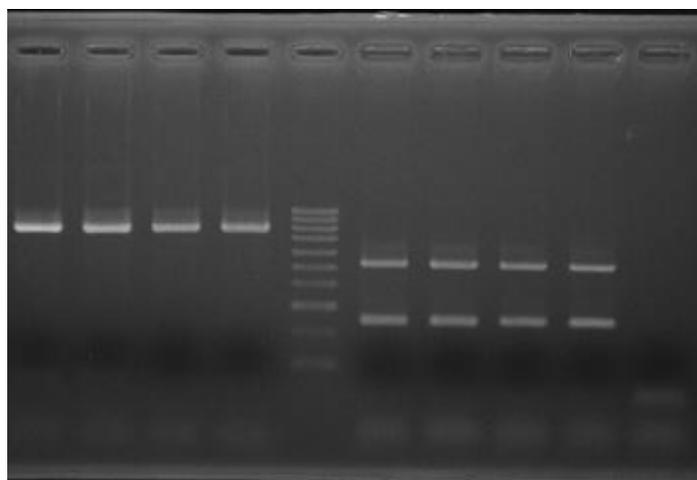


Figura 4. Corrida electroforética de los productos de PCR de los genes internalina. Carriles 1-4: *inlA* (800pb), Carril 5: Marcador de peso molecular 100pb. Carriles 6-9: *inl J* e *inl C* (238pb y 517pb respectivamente). Carril 10 control de mezcla.

3. Serotipificación

*I. PCR múltiple para determinación de perfiles serotipos de *L. monocytogenes**

Del total de aislamientos estudiados (75), IIb fue el perfil de serotipo predominante (36), continuando con el perfil IVb (28) y en menor proporción los perfiles IIa (10) y IIc (1).

A modo de ejemplo, en la figura 5 se muestran los productos de PCR multiplex de la determinación de los 4 principales serovares para *L. monocytogenes*.

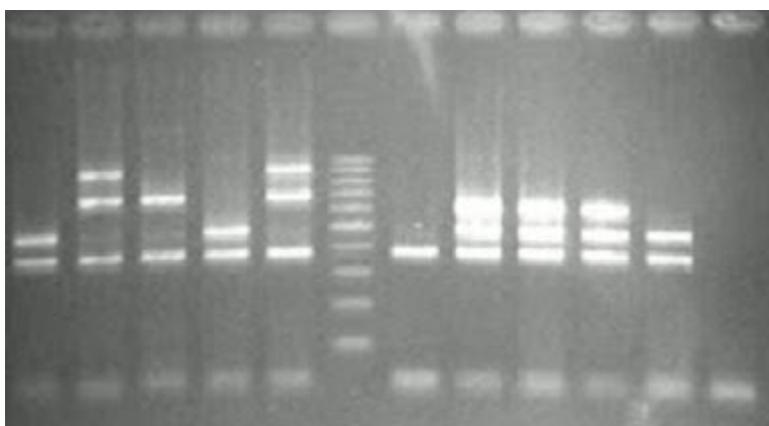


Figura 5. PCR múltiple de los 4 principales serovares. Carril 1: A54; carril 2: A59, carril 3: ATCC serotipo 1/2a (CIP 89381), carril 4: ATCC 1/2b (CIP 90602), carril 5: ATCC 1/2c (CIP 89756), carril 6: marcador de peso molecular, carril 7: *L. innocua*, carril 8: ATCC serotipo 4b (CIP 88868), carril 9: A55, carril 10: A57, carril 11: A61, carril 12: control de mezcla.

II. Aglutinación para los antígenos somáticos 1 y 4

Todos los aislamientos identificados por PCR múltiple como serogrupo IIa, IIb y IIc mostraron aglutinación positiva con el antisuero de serotipo 1.

En cuanto al serogrupo IVb, todos los aislamientos que fueron positivos por PCR, mostraron también una aglutinación positiva con el antisuero de serotipo 4.

TABLA 1. Aglutinación en lámina para los antígenos somáticos 1 y 4.		
	Antisuero 1	Antisuero 4
Perfil 1/2a*	10	-
Perfil 1/2b*	36	-
Perfil 1/2c*	1	-
Perfil 4b*	-	28
Total	47	28

*Perfil 1/2a: serotipos 1/2a y 3a

*Perfil 1/2b: serotipos 1/2b, 3b y 7

*Perfil 1/2c: serotipos 1/2c y 3c

*Perfil 4b: serotipos 4b, 4d y 4e

De la combinación de la PCR múltiple y aglutinación (ver Tabla 1) se desprende que los aislamientos positivos para el serogrupo IIa, IIb y IIc corresponden a los serotipos 1/2a, 1/2b y 1/2c, respectivamente. Si bien para el serogrupo IVb las técnicas empleadas no permiten diferenciar entre los serotipos 4b, 4c y 4d, dada la baja frecuencia de los serotipos 4d y 4e asumimos que estos aislamientos correspondían al serotipo 4b.

Análisis de los serotipos de acuerdo al origen.

En la tabla 2 se presentan los resultados de los serotipos determinados, discriminados según el origen de las muestras a partir de las cuales se obtuvieron los aislamientos. Las muestras alimentarias procesadas fueron nombradas como A y el n° correspondiente y las humanas como H y el n° correspondiente.

TABLA 2. Serotipos determinados por multiplex PCR de <i>Listeria monocytogenes</i>				
	1/2a	1/2b	1/2c	4b
Aislamientos alimentarios (N=61)	9 (14.75 %)	28 (45.90 %)	1 (1.64 %)	23 (37.70 %)
Aislamientos humanas (N=14)	1 (7.14 %)	8 (57.14 %)	0	5 (35.71 %)
Total (N=75)	10 (13.33 %)	36 (48.00 %)	1 (1.33 %)	28 (37.33 %)

En cuanto a los aislamientos de muestras alimentarias (61) se obtuvieron los 4 serotipos más frecuentes, siendo el mayoritario el serotipo 1/2b (45.90%), seguido por el serotipo 4b (37.70%), y en menor proporción el serotipo 1/2a (14.75%) y el perfil 1/2c (1.63%).

En cuanto a los aislamientos de muestras humanas (14) el serotipo mayoritario fue el perfil 1/2b (57.14%), seguido por el serotipo 4b (35.71%) y un solo aislamiento correspondiente al serotipo 1/2a (7.14%). No se obtuvieron aislamientos correspondientes al serotipo 1/2c.

En las tablas 3 y 4 se muestra un resumen de las características de las cepas de origen alimentario (Tabla 3) y humano (Tabla 4)

TABLA 3. Serotipos y presencia (+) de los genes *inlA*, *inlJ* e *inlC* de los aislamientos de alimentos.

	Fecha de aislamiento	Serotipo	<i>InlA</i>	<i>InlJ</i>	<i>InlC</i>		Fecha de aislamiento	Serotipo	<i>InlA</i>	<i>InlJ</i>	<i>InlC</i>
A1	07/01/2013	4b	+	+	+	A31	21/10/2013	1/2a	+	+	+
A2	07/01/2013	1/2b	+	+	+	A32	21/10/2013	1/2b	+	+	+
A3	07/01/2013	1/2b	+	+	+	A33	21/10/2013	4b	+	+	+
A4	24/01/2013	1/2b	+	+	+	A34	21/10/2013	1/2b	+	+	+
A5	24/01/2013	4b	+	+	+	A35	21/01/2014	1/2a	+	+	+
A6	24/01/2013	1/2b	+	+	+	A36	21/11/2013	4b	+	+	+
A7	24/01/2013	4b	+	+	+	A37	21/11/2013	4b	+	+	+
A8	19/02/2013	1/2b	+	+	+	A38	10/12/2013	4b	+	+	+
A9	05/03/2013	1/2a	+	+	+	A39	10/12/2013	1/2b	+	+	+
A10	05/03/2013	1/2a	+	+	+	A40	15/01/2014	1/2a	+	+	+
A11	05/03/2013	4b	+	+	+	A41	15/01/2014	1/2b	+	+	+
A12	12/03/2013	4b	+	+	+	A42	15/01/2014	1/2 ^a	+	+	+
A13	19/03/2013	1/2b	+	+	+	A43	15/09/2014	4b	+	+	+
A14	19/04/2013	1/2b	+	+	+	A44	15/09/2014	1/2b	+	+	+
A15	02/05/2013	1/2b	+	+	+	A45	15/09/2014	1/2b	+	+	+
A16	02/05/2013	1/2b	+	+	+	A46	15/09/2014	1/2b	+	+	+
A17	23/07/2013	4b	+	+	+	A47	15/09/2014	1/2b	+	+	+
A18	23/07/2013	1/2b	+	+	+	A48	22/12/2014	1/2b	+	+	+
A19	23/07/2013	4b	+	+	+	A49	22/12/2014	1/2b	+	+	+
A20	01/08/2013	1/2a	+	+	+	A50	12/01/2015	1/2b	+	+	+
A21	01/08/2013	1/2b	+	+	+	A51	01/04/2015	1/2b	+	+	+
A22	28/08/2013	4b	+	+	+	A52	17/06/2015	4b	+	+	+
A23A	28/08/2013	1/2b	+	+	+	A53	17/06/2015	1/2b	+	+	+
A24	02/09/2013	4b	+	+	+	A54	17/06/2015	1/2b	+	+	+

A25	17/09/2013	4b	+	+	+	A55	09/07/2015	4b	+	+	+
A26	21/10/2013	4b	+	+	+	A56	27/08/2015	1/2a	+	+	+
A27	21/10/2013	4b	+	+	+	A57	09/10/2015	4b	+	+	+
A28	21/10/2013	4b	+	+	+	A58	09/10/2015	1/2 ^a	+	+	+
A29	21/10/2013	4b	+	+	+	A59	09/10/2015	1/2c	+	+	???
A30	21/10/2013	1/2b	+	+	+	A60	09/10/2015	4b	+	+	+
						A61	03/12/2015	1/2b	+	+	+

TABLA 4. Serotipos y presencia (+) de los genes *inlA*, *inlJ* e *inlC* de los aislamientos de origen humano

	Fecha de aislamiento	Muestra clínica	Patología	Serotipo	<i>InlA</i>	<i>InlJ</i>	<i>InlC</i>
H1	13/02/2013	Punción vertebral	Discoepondilitis. AP: diálisis.	1/2b	+	+	+
H2	06/05/2013			1/2b	+	+	+
H3	31/05/2013	Hemocultivo	MEAS	1/2a	+	+	+
H4	08/07/2013	Hemocultivo		1/2b	+	+	+
H5	24/10/2013	Líquido de ascitis		4b	+	+	+
H6	06/03/2014	Hemocultivo		4b	+	+	+
H7	06/03/2014	Hemocultivo		4b	+	+	+
H8	12/03/2014	LCR y hemocultivo	MEAS en tto con ceftriaxona	4b	+	+	+
H9	17/03/2014		Convulsiones y depresión de conciencia. AP: tabaquista intenso, CBP en tto con quimioterapia.	1/2b	+	+	+
H10	25/06/014	LCR		1/2b	+	+	+
H11	19/09/2014	Hemocultivo		1/2b	+	+	+
H12	10/09/2014	Líquido articular y hemocultivo		1/2b	+	+	+
H13	01/10/2014	Hemocultivo		1/2b	+	+	+
H14	04/09/2015	Membranas ovulares	Aborto	4b	+	+	+

4. Pulsed Field Gel Electrophoresis (PFGE)

1. Genotipificación por PFGE con la enzima de restricción *AscI*

En la Figura 6 se presenta el dendrograma de los aislamientos humanos digeridos con la enzima *AscI*, el pulsotipo (P), serotipo, fecha de aislamiento y tipo de muestra correspondiente a cada uno de ellos.

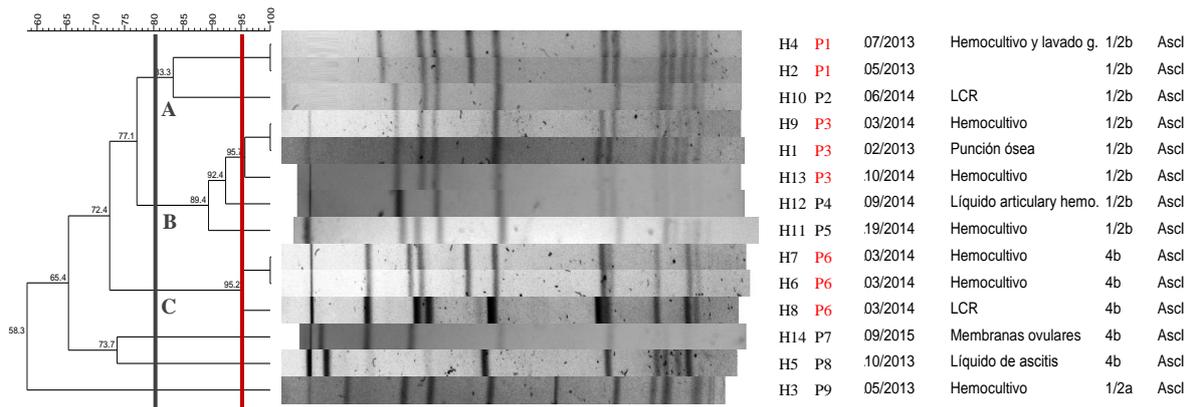


Figura 6. Dendrograma de aislamientos humanos digeridos con la enzima de restricción *AscI*. Se muestra el además del pulsotipo (P1-P11), la fecha de aislamiento, tipo de muestra y el serotipo.

Como puede observarse, en total se identificaron 9 pulsotipos, 3 de ellos (P1, P3, P6) (similitud $\geq 95\%$). De los 9 pulsotipos, 6 pulsotipos (P1, P2, P3, P4, P5, P6) se agruparon en tres pulsogrupos A, B, C (similitud $\geq 80\%$) bien definidos, representados por los perfiles 1/2b en 2 pulsogrupos (A y B) y el perfil 4b en 1 pulsogrupo (C). Dentro del pulsogrupo A, se encuentran tres aislamientos (H4, H2, H10) compuesto por los pulsotipos P1 (2 aislamientos idénticos: H2-H4) y P2 (1 aislamiento: H10) (Perfil- 1/2b). Dentro del pulsogrupo B se encuentran cinco aislamientos (H9, H1, H13, H12, H11) compuesto por los pulsotipos P3 (2 aislamientos idénticos: H9-H1 y 1 aislamiento H13), P4 y P5, representados por H12, H11 respectivamente (Perfil- 1/2b). Dentro del pulsogrupo C se encuentran tres aislamientos (H7, H6, H8) compuesto por los pulsotipos P6 (2 aislamientos idénticos: H7-H6) y 1 aislamiento: H8 (Perfil- 4b). Fuera de estos pulsogrupos, se encuentran presentes 3 aislamientos en tres pulsotipos distintos (P7, P8, P9) representados por los aislamientos H14, H5 (Perfil 4b) y H3 (Perfil- 1/2a), en un total de 14 aislamientos estudiados. La mayoría de los aislamientos con perfil 1/2b (5 de 8) analizados por *AscI* pertenecen al mismo pulsogrupo (similitud $\geq 80\%$) con un 77.1% de homología entre ambos pulsogrupos (A y B respectivamente) (Figura 6).

2. Genotipificación por PFGE con la enzima de restricción *ApaI*

En la Figura 7 se presenta el dendrograma de los aislamientos humanos digeridos con la enzima *ApaI*, el pulsotipo (P), serotipo, fecha de aislamiento y tipo de muestra correspondiente a cada uno de ellos.

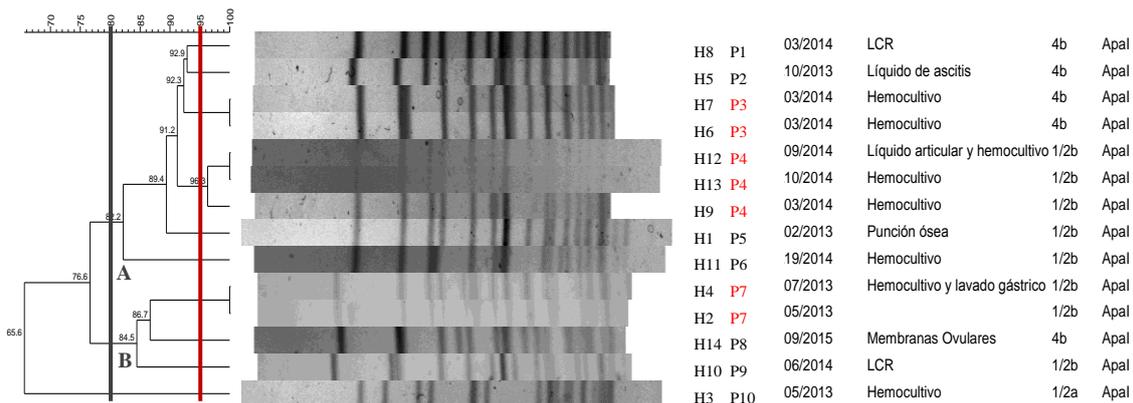


Figura 7. Dendrograma de aislamientos humanos digeridos con la enzima de restricción *ApaI*. Se muestra además del pulsotipo (P1-P11), la fecha de aislamiento, tipo de muestra y serotipo.

Como puede observarse, se identificaron 10 pulsotipos, tres de ellos (P3, P4, P7) (similitud $\geq 95\%$). De los 10 pulsotipos, 9 pulsotipos se agruparon en dos pulsogrupos A, B (similitud $\geq 80\%$) bien definidos, que comprenden los perfiles 1/2b y 4b. Dentro del pulsogrupos A, existen 9 aislamientos (H8, H5, H7, H6) (Perfil 4b), (H12, H13, H9, H1, H11) (Perfil 1/2b) compuesto por los pulsotipos P1 (1 aislamiento: H8), P2 (1 aislamiento: H5), P3 (2 aislamientos idénticos: H7-H6) (Perfil 4b), P4 (2 aislamientos idénticos: H12- H13 y 1 aislamiento: H9), P5 (1 aislamiento: H1), P6 (1 aislamiento: H11). Dentro del pulsogrupos B, existen 4 aislamientos (H4, H2, H14, H10) compuesto por los pulsotipos P7 (2 aislamientos idénticos: H4- H2) (Perfil 1/2b), P8 (1 aislamiento: H14) (Perfil 4b) y P9 (1 aislamiento: H10) (Perfil 1/2b). Por fuera de estos pulsogrupos, se encuentra el pulsotipo (P10) (H3) (Perfil 1/2a), en un total de 14 aislamientos estudiados. La mayoría de los aislamientos con perfil 1/2b (5/8 aislamientos) y con perfil 4b (4/5 aislamientos) analizados por *ApaI* pertenecen al mismo pulsogrupos (A) (similitud $\geq 80\%$) con un 76.6% de homología entre ambos pulsogrupos (A y B respectivamente) (Figura 7).

DISCUSION

En el presente trabajo se estudiaron 75 aislamientos de *Listeria monocytogenes*, 61 provenientes de muestras alimentarias y 14 de muestras de casos de listeriosis humana. Es importante destacar que los aislamientos de origen alimentario no tenían una relación "conocida" por nosotros como fuente de los casos clínicos, simplemente se estudiaron todas las cepas remitidas al Depto. de Bacteriología y Virología (DByV) desde los diferentes laboratorios.

Todos los aislamientos fueron confirmados como *L. monocytogenes* tanto por pruebas bioquímicas como por PCR para el gen de *inlA* mostrando un 100% de concordancia entre ambas metodologías. En otro trabajo realizado en el DByV de un total de 220 cepas estudiadas, se identificó un solo aislamiento como *L. monocytogenes* por pruebas bioquímicas pero la PCR fue repetidamente negativa para el gen de *inlA* (serotipo 4b, aislado de la pastura de un potrero). La baja frecuencia de este resultado demuestra la utilidad de la detección de *inlA* como método de identificación genotípica de *L. monocytogenes*, como ha sido expresado por otros autores (Liu et al).

Diversos ensayos *in vitro*, como subtipificación molecular y estudios epidemiológicos en casos de listeriosis humana muestran el rol que cumple la proteína de superficie InlA de *L. monocytogenes*, y su potencial virulencia en células humanas (Jacquet *et al.*, 2004; Rousseaux *et al.*, 2004; Nightingale *et al.*, 2005, 2008). Sin embargo, existen al menos 18 diferentes polimorfismos en el gen *inlA* que expresan proteínas trucas y que determinan una disminución o atenuación de la virulencia en modelos animales (Orsi *et al.*, 2007; Van Stelten & Nightingale, 2008). Se ha observado que una proporción considerable de aislamientos (mayor a 30%) se encuentran atenuados en su virulencia debido a que presentan codones *stop* prematuros en el gen de *inlA*. Las características de virulencia difieren considerablemente entre los diferentes linajes siendo esta alteración genética más frecuentemente encontrada en los aislamientos de origen alimentario del linaje II (1/2a y 1/2c) en comparación con los del serotipo 1/2b y 4b que raramente presentan dichos codones *stop* por lo que codifican para la proteína completa y por ende se les atribuye una mayor capacidad de virulencia (Jacquet *et al.*, 2004; Rousseaux *et al.*, 2004; Nightingale *et al.*, 2005, 2008; Orsi *et al.*, 2007).

Todos los aislamientos resultaron positivos para los genes de virulencia *inlJ* e *inlC* lo que indica su potencial patogénico. Esto no significa necesariamente que el hospedero pueda contraer la enfermedad luego de la infección por estas cepas, ya que por un lado la patogenia de *L. monocytogenes* es multifactorial (incluye la expresión de muchos otros genes) y por otro lado la probabilidad de contraer listeriosis invasiva luego de la ingestión de *L. monocytogenes* es en promedio muy baja, y depende del hospedero, la dosis infectiva y la virulencia de la cepa (Vazquez-Boland *et al.*, 2001; Vera *et al.*, 2013)

En cuanto a la distribución de serotipos encontrados en este trabajo, 85% del total de aislamientos pertenecieron al linaje I (1/2b y 4b) (83% en alimentos, 92% en humanos) mientras que 15% pertenecen al linaje II (1/2a y 1/2c). El serotipo 1/2b fue el predominante (48%), seguido del serotipo 4b (37.33%) y en menor proporción 1/2a y 1/2c (13.33% y 1.33% respectivamente).

En los aislamientos de origen alimentario se observó la presencia de los cuatro serotipos: 1/2a, 1/2b, 1/2c, 4b, manteniendo la distribución global de serotipos mencionada anteriormente: 1/2b (45.90%), 4b (37.70%), 1/2a (14.75%) y 1/2c (1.33%).

En Colombia, Muñoz encontró que los serotipos más prevalentes aislados de muestras de alimentos tomadas entre 2000 y 2009 (n=1424) fueron el serotipo 4b (57,6%), 1/2b (10,8%) y 1/2a (9,5%), con un evidente predominio de cepas que corresponden al serotipo 4b con respecto a los otros serotipos (proporción de 5 a 1). En diversas zonas de Brasil, Almeida *et al.*, encontraron esta misma distribución, con un 50% de aislamientos pertenecientes al serotipo 4b, seguido de un 30% del serotipo 1/2b y un 8% del serotipo 1/2a. En Chile, en el trabajo realizado por Montero *et al.*, si bien el serotipo 4b fue el más prevalente (46%), el serotipo 1/2a (32%) fue el siguiente en frecuencia y en menor medida el 1/2b (13%). En Argentina, Prieto *et al.*, encontraron una prevalencia de 62% para el serotipo 1/2b y 38% al serotipo 4b. Al comparar nuestros resultados con los países de la región, se observa también un predominio de aislamientos pertenecientes al linaje I (1/2b y 4b), pero en nuestro caso prevalece el serotipo 1/2b sobre el 4b al igual que en Argentina.

En cambio en el hemisferio norte las cepas más frecuentemente recuperadas de alimentos pertenecen al linaje II (1/2a y 1/2c), siendo el serotipo 1/2a el predominante (Orsi *et al.*, 2011, Cardozo *et al.*, 2013, Shen *et al.*, 2013). En Estados Unidos, Shen *et*

al., muestran que aproximadamente 1/3 de los aislamientos correspondió al serotipo 1/2a (32.8%), seguidos de 1/2c (26,9%), 1/2b (22.4%) y 4b (16.4%) en aislamientos de carne cruda. En Irlanda, O'Connor *et al.*, encontraron que el serotipo más común presente en las diferentes categorías de alimentos (carne, pescados y mariscos, productos lácteos, vegetales crudos) era 1/2a (41%) seguido de 4b (27%), 1/2b (17%) y 1/2c (15%). En Polonia, Korzak *et al.*, analizaron 471 cepas de *L. monocytogenes* aisladas de diferentes alimentos y encontraron la siguiente distribución de serotipos: 1/2a (54.4%); 1/2c (25.5%); 1/2b (12.5%) y 4b (7.6%).

Los resultados de todos estos trabajos muestran que la distribución de los linajes I y II en muestras alimentarias es diferente entre las distintas zonas geográficas (norte-sur). Varios autores reportan que la mayor variabilidad genética se observa en los aislamientos provenientes del linaje II y que este hecho podría sugerir una mayor adaptación a diversos ambientes (Orsi *et al.*, 2011; Shen *et al.* 2013). Procesos tales como selección positiva y recombinación homóloga (RH) están asociados a una mayor adaptación y ambos procesos han contribuido a las diferencias observadas entre ambos linajes. Se presume que los aislamientos del linaje I de *L. monocytogenes* constituyen una población clonal adaptada al hospedador y que el resultado de la recombinación puede no ser necesaria y puede ser seleccionada en contra para estos aislamientos (Orsi *et al.*, 2011). Por lo tanto de acuerdo a los resultados de este trabajo (83% de las cepas corresponden al linaje I) estaríamos expuestos a cepas más adaptadas al hombre (menos variables) y mayor potencial patogénico..

A diferencia de lo que ocurrió en las cepas de alimentos, en los aislamientos de muestras humanas de nuestro trabajo se encontraron tres serotipos: 1/2a, 1/2b y 4b; no se obtuvieron aislamientos del perfil 1/2c. Estos resultados concuerdan con lo reportado en el mundo (Doumith *et al.*, 2004; Liu, 2006; Swaminathan & Gerner-Smidt, 2007). En cuanto a la distribución de serotipos los mas prevalentes fueron el 1/2b (57.14%) y 4b (35.71%).

En Chile, en 40 aislamientos humanos estudiados el serotipo 4b fue el predominante (52,5%), seguido del 1/2b y 1/2a casi en la misma proporción (25 y 22,5% respectivamente). En Brasil, Almeida *et al.*, encontraron que un 49% de los aislamientos perteneció al serotipo 4b, seguido del 1/2b (28%), 14% del serotipo 1/2c y un 8% del serotipo 1/2a. En Argentina, Prieto *et al.*, encontraron una prevalencia del

71% para el serotipo 4b y 29% al serotipo 1/2b. Se puede observar que en estos países de la región el serotipo 4b es el predominante, lo que los diferencia de nuestros resultados, y que la distribución es similar a la observada en los aislamientos de origen alimentario.

En Italia, Mammina *et al.*, encontraron que los serotipos recuperados de muestras clínicas mostraron un predominio del serotipo 1/2a (46.3%), seguido del 4b (42.6%) y por último el 1/2b (11.1%). En Suiza, Althaus *et al.*, también encontraron que la mayoría de las cepas pertenecían al serotipo 1/2a (60%), serotipo 4b (30%), 1/2b (5%) y 1/2c (1%). Lo mismo sucedió en Suecia, en un estudio realizado por Lopez-Valladares *et al.*, que involucró 983 aislamientos de un amplio periodo (1958-2010), 49,1% correspondieron al 1/2a, 34% al 4b, 9,1% al 1/2b y 2,1% al 1/2c. En EEUU, sin embargo, los datos de la vigilancia nacional del periodo 2004-2009 muestran una predominancia del serotipo 4b, seguido del 1/2a y luego 1/2b (Silk *et al.*). Esta distribución con predominancia de los serotipos 1/2a y 4b es diferente de la observada en América del Sur donde predominan los serotipos 4b y 1/2b. Solo en España, más específicamente en Andalucía, la distribución en 154 aislamientos fue similar a la de América Latina: 4b (61%), 1/2b (19%), 1/2a (18%) y 1/2c (2%).

A diferencia del hemisferio norte donde el serotipo 1/2a es el predominante tanto en aislamientos alimentarios como clínicos (excepto en aislamientos de casos humanos en EEUU), en nuestra región se observa una baja prevalencia de este serotipo que ocupa el 3° lugar en la mayoría de los casos.

Los resultados del presente trabajo y de los otros mencionados con anterioridad, muestran que en la mayoría de los casos, la distribución de serotipos es la misma tanto en cepas recuperadas de alimentos como de casos de listeriosis humana. La situación del hemisferio norte con predominancia de serotipo 1/2a tanto en alimentos como en humanos sugiere que la enfermedad en humanos está determinada en mayor medida por la frecuencia de exposición que por la virulencia de las cepas.

De acuerdo a los trabajos revisados anteriormente, solamente en Uruguay y Argentina predomina el serotipo 1/2b sobre el 4b. En Chile Montero *et al* demostraron una asociación del serotipo 1/2b con las salchichas cocidas. En nuestro país, un trabajo sobre prevalencia de *L. monocytogenes* en diferentes tipos de alimentos mostró que 75% de los aislamientos de muestras de embutidos correspondían al serotipo 1/2b (Braga *et*

al., 2017), lo cual sugiere a este tipo de alimentos como fuente importante de este serotipo.

Por otra parte, un aislamiento clínico del serotipo 1/2b recuperado en nuestro país en 2016 fue secuenciado en forma completa demostrándose que el mismo presentaba las islas de patogenicidad LIPI-1 y LIPI 3 (Muchaamba *et al.* 2017). Esta última isla presenta un factor de virulencia adicional, una citolisina/hemolisina conocida como listeriolisina S (LLS) presente en un subconjunto de cepas asociadas exclusivamente al linaje I (Cotter *et al.*, 2008). Varias de estas cepas han sido implicadas en brotes epidémicos; son pocas las cepas carentes de LIPI-3 que han sido asociadas a brotes epidémicos hasta la fecha (Clayton *et al.*, 2011). Si bien la caracterización de esta isla de patogenicidad fue en un solo aislamiento, este resultado muestra el potencial patogénico y epidémico de las cepas del serotipo predominante en nuestro país.

En cuanto a la caracterización por PFGE de los aislamientos humanos, se encontraron 2 aislamientos H2-H4 (serotipo 1/2b, pulsotipo P1) indistinguibles mediante las enzimas *AscI* y *Apa I* (pulsotipo P7) (Figura 7). Estos casos podrían configurar un brote siempre y cuando hubiera una relación epidemiológica entre ambos casos. En nuestro país la división epidemiología del Ministerio de Salud es quien se encarga de realizar la investigación epidemiológica ante la notificación de los casos de listeriosis. Es necesaria la interrelación entre los equipos que realizan la investigación epidemiológica con los laboratorios de subtipificación molecular para la mejor y más rápida identificación de los brotes de listeriosis.

A su vez se encontraron dos aislamientos indistinguibles H6-H7 (serotipo 4b, pulsotipo P6) al ser digeridos con *AscI* (Figura 6) y confirmados con *Apa I* (pulsotipo P3) (Figura 7). En este caso la investigación epidemiológica sumado a los resultados de la tipificación molecular por PFGE pudieron confirmar que se trató de un brote intrahospitalario de listeriosis neonatal (Mota *et al.*, 2014).

En cuanto a los aislamientos H1-H9 (serotipo 1/2b) designados con el pulsotipo P3 también resultaron indistinguibles cuando se los digirió con *Asc I* (Figura 6), aunque al digerirlos con *ApaI* presentaron patrones algo diferentes (90% de homología), por lo que estarían estrechamente relacionadas (pulsotipos P4-P5) (Figura 7). Este resultado destaca la importancia de trabajar con las dos enzimas sugeridas. Las combinaciones de enzimas utilizadas en este estudio son las recomendadas y se genera de esta forma un

mayor poder de discriminación. Las mismas se dirigen a secuencias de corte ricas en GC y debido al hecho de que *L. monocytogenes* presenta un bajo contenido de GC (37%) se generan patrones de PFGE con pocas bandas (de 10 a 20 bandas) lo cual facilita su análisis (Cardozo *et al.*, 2013).

No pudimos avanzar en la relación genética de los aislamientos humanos con los alimentarios por no contar con los perfiles de PFGE de estas últimas. Esto se debió a que no contábamos con los recursos suficientes para analizar todas las cepas por esta metodología, dado que es una técnica relativamente costosa y por ello se priorizó el estudio de las cepas humanas con el fin de descartar la existencia de brotes.

CONCLUSIONES

Los 75 aislamientos estudiados provenientes de muestras clínicas y alimentos se confirmaron como *L. monocytogenes* tanto por pruebas bioquímicas como genotípicas.

Todos los aislamientos presentaron los genes de virulencia *inlJ* e *inlC*, lo que sugiere el potencial patogénico de los cultivos recuperados de alimentos.

Los serotipos de los aislamientos humanos concuerdan con los reportados para el resto del mundo.

Los serotipos 1/2b y 4b pertenecientes al linaje I, fueron los predominantes tanto en los aislamientos provenientes de alimentos como de muestras clínicas, indicando una correlación en la distribución de serotipos entre los aislamientos alimentarios y humanos.

La distribución de serotipos de los aislamientos alimentarios presenta similitudes con lo reportado en países de la región (mayor prevalencia de linaje I) pero difieren con lo reportado en el hemisferio norte (mayoritariamente linaje II), lo que hace pensar en una circulación de cepas a nivel regional diferente a las que circulan en otras zonas geográficas.

Quedó demostrada la utilidad de PFGE como técnica de caracterización molecular complementaria a la serotipificación para la detección y confirmación de brotes.

El presente trabajo demuestra el rol potencial que cumplen los alimentos en la diseminación de este patógeno de transmisión alimentaria. Debido a que los alimentos pueden contaminarse en cualquier eslabón de la cadena alimentaria, se sugiere la estandarización y aplicación de medidas sanitarias de control, así como también medidas de prevención para los grupos vulnerables.

Finalmente, se pone de manifiesto la necesidad de continuar realizando estudios de genotipificación en aislamientos humanos y alimentarios, los cuales contribuyen a establecer la situación epidemiológica de este patógeno emergente en Uruguay.

PERSPECTIVAS

- Continuar con la caracterización de cepas incorporando nuevas metodologías:
MLST
Secuenciación de genoma completo (WGS)
- Detección de mutaciones en el gen *inlA*: codones stop prematuros.
- Incluir el estudio de LIPI-3 en cepas pertenecientes al linaje I, para inferir y comparar el grado de patogenicidad de las cepas aisladas de ambos orígenes.

BIBLIOGRAFÍA

Almeida, R. M., Barbosaa, A., Lisbôaa, R., Felipe das Mercês Santos, A., Hofera, E., Vallima, D., Hoferb, C. (2017). Virulence genes and genetic relationship of *L. monocytogenes* isolated from human and food sources in Brazil. *Braz J Infect Dis* 21(3):282–289

Althaus, D., Lehner, A., Brisse, S., Maury, M., Tasara, T., Stephan, R. (2014). Characterization of *Listeria monocytogenes* strains isolated during 2011-2013 from human infections in Switzerland. *Foodborne Pathogens and Disease*, 11:753-758.

Bennett L: *Listeria monocytogenes*. In: Mandell, GL, Bennett, JE, Dolin, R. ed. Principles and practice of infectious diseases, 7th ed. Philadelphia, PA: Elsevier Health Sciences 2005: 2707-2714.

Bonazzi, M., Lecuit, M., & Cossart, P. (2009). *Listeria monocytogenes* internalin and E-cadherin from structure to pathogenesis. *Cell Microbiol*, 11(5), 693-702.

Braga, V., Vázquez, S., Vico, V., Pastorino, V., Mota, M.I., Legnani, M., Schelotto, F., Lancibidad, G., Varela, G. (2017). Prevalence and serotype distribution of *Listeria monocytogenes* isolated from foods in Montevideo-Uruguay. *Brazilian Journal of Food Microbiology* 48: 689–694

Camejo, A., Carvalho, F., Reis, O., Leitão, E., Sousa, S., & Cabanes, D. (2011). The arsenal of virulence factors deployed by *Listeria monocytogenes* to promote its cell infection cycle. *Virulence*, 2(5), 379-94.

Cardozo-Bernal, A. M., Ramón, L. F., Poutou-Piñales, R. A., Carrascal-Camacho, A. K., & Zambrano, D.C. (2013). Electroforesis en Gel de Campo Pulsado (PFGE) para la diferenciación molecular de *Listeria monocytogenes*. *Univ. Sci*, 18(2), 203-222.

Cartwright, E. J., Jackson, K. A., Johnson, S. D., Graves, L. M., Silk, B. J., & Mahon, B. E. (2013). Listeriosis Outbreaks and Associated Food Vehicles, United States, 1998-2008. *Emerging Infectious Diseases*, 19(1), 1.

Center of Disease Control Center Prevention. cdc.gov. Consultado el 18 de diciembre de 2017. <http://www.cdc.gov/Features/PrenatalInfections/>

Center of Disease Control Center (CDC, 2013) Standard Operating Procedure for PulseNet PFGE of *Listeria monocytogenes*. PNL04.

Chatterjee, S. S., Hossain, H., Otten, S., Kuenne, C., Kuchmina, K., Machata, S., ... & Hain, T. (2006). Intracellular gene expression profile of *Listeria monocytogenes*. *Infect Immun*, 74(2), 1323-1338.

Cotter, P. D., Draper, L. A., Lawton, E. M., Daly K. M., Groeger, D. S., Casey P. G., ... & Hill, C. (2008). Listeriolysin S, a novel peptide haemolysin associated with a subset of Lineage I *Listeria monocytogenes*. *PLoS Pathogens*, 4 (9), e1000144.

Clayton, E. M., Hill, C., Cotter, P. D., & Ross, R. P. (2011). Real-time PCR assay to differentiate listeriolysin S- positive and-negative strains of *Listeria monocytogenes*. *Appl Environ Microb*, 77(1), 163-71

Disson, O. & Lecuit, M. (2012). Targeting of the central nervous system by *Listeria monocytogenes*. *Virulence*, 3(2), 213-221.

Dreverts, D. A., & Bronze, M. S. *Listeria monocytogenes*: epidemiology, human disease, and mechanisms of brain invasión. (2008). *FEMS Immunol Med Microbiol* 53(2), 151-165.

Engelbrecht, F., Chun, S. K., Ochs, C., Hess, J., Lottspeich, F., Goebel, W., & Sokolovic, Z. (1996). A new PrfA-regulated gene of *Listeria monocytogenes* encoding a small, secreted protein which belongs to the family of internalins. *Mol Microbiol*, 21(4), 823-837.

Engelbrecht, F., Dickneite, C., Lampidis, R., Götz, M., DasGupta, U., & Goebel W. (1998). Sequence comparison of the chromosomal regions encompassing the internalin C genes (inlC) of *Listeria monocytogenes* and *L. ivanovii*. *Mol Gen Genet MGG*, 257(2):186-197.

Hain, T., Chatterjee, S. S., Ghai, R., Kuenne, C. T., Billion A., Steinweg C., ...& Eisenreich, W. (2007). Pathogenomics of *Listeria* spp. *International Journal of Medical Microbiology*, 297(7), 541-557.

Hassan, A. N., Birt, D. M., & Frank, J. F., (2004). Behavior of *Listeria monocytogenes* in a *Pseudomonas putida* biofilm on a condensate forming surface. *J. Food Prot.*, 67(2), 322-327.

Hernandez-Millan A., & Payeras-Cifre A. (2013). What Is New in Listeriosis? *BioMed Research international*, 2014.

Jacquet, C., Doumith, M., Gordon, J. I., Martin, P. M., Cossart, P., & Lecuit, M. (2004). A molecular marker for evaluating the pathogenic potential of the foodborne *Listeria monocytogenes*. *J. Infect. Dis.*, 189(11), 2094-2100.

Kalmokoff, M. L., Austin, J. W., Wan, X. D., Sanders, G., Banerjee, S., & Farber, J. M. (2001). Adsorption, attachment and biofilm formation among isolates of *Listeria monocytogenes* using model conditions. *J. Appl. Microbiol.* 91(4), 725-734.

Kalekar, S., Rodrigues, J., D' Costa, D., Doijad, S., Ashok Kumar, J., Malik, S. V. S., ... & Barbuddhe, S. B., (2011). Genotypic characterization of *Listeria monocytogenes* isolated from humans in India. *Ann. Trop. Med. Parasitol*, 105(5), 351-358.

Kanki, M., Naruse, H., Taguchi, M., & Kumeda, Y. (2015). Characterization of specific alleles in InlA and PrfA of *Listeria monocytogenes* isolated from foods in Osaka, Japan and their ability to invade Caco-2 cells. *Int. J. Food Microbiol*, 211, 18-22.

Korzak, D., Borek, A., Daniluk, S., Grabowska, A., & Pappelbaum, K. (2012). Antimicrobial susceptibilities of *Listeria monocytogenes* strains isolated from food and food processing environment in Poland. *Int. J. Food Microbiol*, 158(3), 203-208

Jonquière, R., Bierne, H., Fiedler, F., Gounon, P., & Cossart, P. (1999). Interaction between the protein InlB of *Listeria monocytogenes* and lipoteichoic acid: a novel mechanism of protein association at the surface of Gram positive bacteria. *Mol Microbiol*, 34(5), 902-14.

Lepe, J. A., Torres, M. J., Liró, J., Luque, R., & Aznar, J. (2012) Caracterización microbiológica de los aislados de *Listeria monocytogenes* procedentes de casos humanos en Andalucía. *Enf. Inf. Micro*, 30(10), 602-607.

Leong, D., Alvarez-Ordoñez, A., & Jordan, K., (2014). Monitoring occurrence and persistence of *Listeria monocytogenes* in foods and food processing environments in the Republic of Ireland. *Front. Microbiol*, 5, 1- 8.

Liu, D. (2006). Identification, subtyping and virulence determination of *Listeria monocytogenes*, an important foodborne pathogen. *J. Med. Microbiol*, 55(6), 645-659.

Liu, D. (2013). Molecular Approaches to the Identification of Pathogenic and Non pathogenic *Listeriae*. *Microbiology Insights*, 6, 59–69.

López, V., Suárez, M., Chico-Calero, I., Navas, J., & Martínez-Suárez, J. V. (2006). Foodborne *Listeria monocytogenes*: are all the isolates equally virulent? *Rev. Argent. Microbiol*, 38(4), 224-234.

Mac Faddin, J. F. (2003). Pruebas bioquímicas para la identificación de bacterias de importancia clínica. 3ª ed. Ed. Médica Panamericana, Buenos Aires.

Mamma, C., Aleo, A., Romani, A., Pellissier, N., Nicoletti, P., Pecile, P., Nastasi, A., Pontello, M. (2009). Characterization of *Listeria monocytogenes* Isolates from Human Listeriosis Cases in Italy. *J. Clin. Microbiol*, 47(9), 2925–2930

Mota, M. I., Braga, V., Casas, M., Pérez-Giffoni, G., Vico, V., Santucci, N., Camou, T., & Varela, G., (2014). Brote Intrahospitalario de Listeriosis Neonatal. XXII Congreso latinoamericano de patología clínica. XV Congreso uruguayo de Patología Clínica, Punta del Este- Uruguay.

Muñoz, A. I. (2012). Distribución de serotipos de *Listeria monocytogenes* aislados de alimentos, Colombia, 2000-2009. *Biomédica*, 32(3), 408-417.

Muchaamba, F., Guldimann, C., Tasara, T., Mota, M. I., Braga, V., Varela, G., ... & Stephan, R. (2017). Full- genome sequence of *Listeria monocytogenes* strain H34, isolated from a newborn with sepsis in Uruguay. *Genome Announc.*, 5(24), e00544-17.

National Center for Biotechnology Information. Ncbi.nlm.nih.gov. Consultado el 18 de Diciembre de 2017. www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?id=1637

Neves, E., Lourenço, A., Silva, A. C., Coutinho, R., & Brito, L. (2008). Pulsed-Field gel electrophoresis (PFGE) analysis of *Listeria monocytogenes* isolates from

different sources and geographical origins and representative of the twelve serovars. *Syst. Appl. Microbiol*, 31(5), 387-392.

O'Connor L., O'Leary M., Leonard N., Godinho M., O'Reilly C., Egan, J., & O'Mahony, R. (2010). The characterization of *Listeria spp.* isolated from food products and the food-processing environment. *Appl. Microbiol*, 51(5), 490–498.

Ooi, A., Hussain, S., Seyedarabi, A., & Pickersgill, R.W. (2006). Structure of internalin C from *Listeria monocytogenes*. *Acta Crystallography Section D: Biological Crystallography*, 62(11), 1287-1293

Orsi, R. H., den Bakker, H. C., & Wiedman, M. (2011). *Listeria monocytogenes* lineages: Genomics, evolution, ecology, and phenotypic characteristics. *Int Med Microbiol*, 301(2), 79-96.

Orsi, R. H., & Wiedmann, M. (2016). Characteristics and distribution of *Listeria spp.*, including *Listeria* species newly described since 2009. *Appl Microbiol Biotechnol*, 100(12), 5273-5287.

Pamer, E. G. (2004). Immune responses to *Listeria monocytogenes*. *Nature Rev Immuno.*, 4(10), 812-823.

Paciel, D., & Medina, J. (2016) Enfermedad por *Listeria monocytogenes*. Minireview: Listeriosis invasiva en adultos. Catedra de enfermedades infecciosas, Fmed, UdelaR.

Standard Operating Procedure for PulseNet PFGE of *Listeria monocytogenes* (PNL04 Last Updated April 2013). Atlanta, GA: CDC, 2013.(www.cdc.gov)

Rousseaux, S., Olier, M., Lemaitre, J. P., Piveteau, P., & Guzzo, J. (2004). Use of PCR- restriction fragment length polymorphism of *inlA* for rapid screening of *L. monocytogenes* strains in the ability to invade Caco-2 cells. *Appl. Environ. Microbiol*, 70(4), 2180-2185.

Seeliger, H. P. R., & Jones, D. (1986). Genus *Listeria*. In: Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, 2, 1235-1245.

Seeliger, H. P. R., & Höhne, K. (1979). Serotyping of *Listeria monocytogenes* and related species. *Methods Microbiol*, 13, 31-49.

Schlech, W. (2000). Foodborne Listeriosis. *Clinical Infectious Diseases*, 31,770–5

Shen, J., Rump, L., Zhang, Y., Chen, Y., Wang, X., & Meng, J. (2013). Molecular subtyping and virulence gene analysis of *Listeria monocytogenes* isolates from food. *Food Microbiol*, 35(1), 58-64.

Shimajima, Y., Ida, M., Nakama, A., Nishino, Y., Fukui, R., Kuroda, S., ...& Sadamasu, K. (2016). Prevalence and contamination levels of *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat foods in Tokyo, Japan. *J. Vet. Med. Sci.*, 78(7), 1183-1187.

Shubert, W. D., Urbanke, C., Ziehm, T., Beier, V., Marchner, M. P., Doman E., ... & Heinz, D. W. (2002). Structure of internalin, a Major Invasion Protein of *Listeria monocytogenes*, in Complex with its Human Receptor E- cadherina. *Cell*, 111(6), 825-836.

Swaminathan, B., & Gerner-Smidt P. (2007). [The epidemiology of human listeriosis](#). *Microbes Infect*, 9(10), 1236-43.

Thisted Lambertz, S., Ivarsson, S., Lopez-Valladares, G. Sidstedt M., Lindqvist, R. (2013). Subtyping of *Listeria monocytogenes* isolates recovered from retail ready-to-eat foods, processing plants and listeriosis patients in Sweden 2010. *International Journal of Food Microbiology* 166: 186–192.

Tenover, F. C., Arbeit, R. D., Goering, R. V., Mickelsen, P. A., Murray, B. E., Persing, D. H., & Swaminathan, B. (1995). Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed- field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. *J Clin Microbiol*, 33(9), 2233-2239.

Vázquez-Boland, J. A., Kuhn, M., Berche, P., Chakraborty, T., Dominguez-Bernal, G., Goebel, W., ... & Kreft, J. (2001). *Listeria* pathogenesis and molecular virulence determinants. *Clin.Microbiol. Rev.*, 14(3), 584–640.

Vázquez-Boland, J. A., Domínguez-Bernal, G., González-Zorn, B., Kreft, J., & Goebel, W. 2001.Pathogenicity islands and virulence evolution in *Listeria*. *MicrobesInfect*, 3(7), 571-584.

Vera, A., González, G., Domínguez, M., & Bello, H. (2013). Principales factores de virulencia de *Listeria monocytogenes* y su regulación. *Rev Chilena Infectol*, 30(4), 407-416.

Veiga, E., & Cossart, P. (2006). The role of clathrin-dependent endocytosis in bacterial internalization. *Trends in cell biology*, 16(10), 499-504.

Ward, T. J., Ducey, T. F., Usgaard, T., Dunn K. A., & Bielawski, J. P. (2008). Multilocus genotyping assays for single nucleotide polymorphism-based subtyping of *Listeria monocytogenes* isolates. *Appl Environ Microbiol*, 74(24), 7629-7642.

Wellington N: *Listeria* and *Erysipelothrix*. In: Murray, PR, Baron, EJ, Pfaller, MA, Tenover FC, Tenover FC ed. *Manual of Clinical Microbiology*, 10th ed. Washington, DC: American Society for Microbiology Press, 2012: 461-467.

ANEXOS

Los procedimientos utilizados en las pruebas bioquímicas se describen a continuación:

Catalasa: En un portaobjeto se realizó una suspensión homogénea a partir de una colonia aislada en solución salina (0,9 %); luego se colocó sobre ella una gota de peróxido de hidrógeno al 3 %. La producción de burbujas indica una prueba positiva.

Hidrólisis de la esculina: se realizó en tubo con fondo y superficie. Se siembra por picadura y en superficie. Un resultado positivo, se ve indicado por la aparición de un fondo negro.

Test de CAMP (Christie, Atkins, Munch- Peterson): se realizó en placas de ASO 5 % utilizando una estría vertical de una cepa de *Staphylococcus aureus* productor de β -lisina (CAMP-S) y de una cepa de *Rhodococcus equi* ATCC (CAMP-R) y de forma horizontal en ángulo recto con la anterior a 3 o 4 mm las cepas de *Listeria* a identificar. Las placas se incubaron en aerobiosis, a 37°C entre 24-48 horas. Un resultado se considera positivo cuando la hemólisis se potencia formando una “cabeza de fósforo” característica, cerca de la estría de *Staphylococcus aureus* de *Rhodococcus equi*.

Producción de ácido a partir de carbohidratos: Se estudiaron los siguientes azúcares: glucosa, manitol, xilosa y ramnosa. Los caldos de rojo fenol conteniendo los diferentes azúcares a una concentración del 1 %, se sembraron a partir de colonias aisladas y se incubaron en aerobiosis a 37°C por 24 horas. El cambio de color del indicador de pH hacia el amarillo indica la fermentación del azúcar analizado.

Secuencia de nucleótidos de los cebadores utilizados:

Gen	Cebadores (5'-3')	Tamaño(bp)
InlA	F: ACGAGTAACGGGACAAATGC	800bp
InlA	R: CCCGACAGTGGTGCTAGATT	
InlC	F: AATTCCCACAGGACACAACC	517bp
InlC	R: CGGGAATGCAATTTTTCACTA	
InlJ	F: TGTAACCCCGCTTACACAGTT	238bp
InlJ	R: AGCGGCTTGGCAGTCTAATA	

Gen	Cebadores(5'-3')	Tamaño(bp)
lmo0737	F: AGGGCTTCAAGGACTTACCC R: ACGATTTCTGCTTGCCATTC	691bp
lmo1118	F: AGGGGTCTTAAATCCTGGAA R: CGGCTTGTTCCGGCATACTTA	906bp
ORF2819	F: AGCAAAATGCCAAACTCGT R: CATCACTAAAGCCTCCCATTG	471bp
ORF2110	F: AGTGGACAATTGATTGGTGAA R: CATCCATCCCTTACTTTGGAC	537bp
prs	F: GCTGAAGAGATTGCGAAAGAAG R: CAAAGAAACCTTGGATTTGCGG	370bp