

Estudio mediante PCR múltiple de serotipos de *Listeria monocytogenes* aislados en Argentina

R. CALLEJO^{1*}, M. PRIETO¹, C. MARTÍNEZ¹, L. AGUERRE¹, F. ROCCA¹, G. MARTÍNEZ¹, O. PALMIERI²

¹Servicio Bacteriología Especial, Departamento Bacteriología, Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas (INEI) – Administración Nacional de Laboratorios e Institutos de Salud (ANLIS) “Dr. Carlos G. Malbrán”, Av. Vélez Sarsfield 563 (1281) Ciudad Autónoma de Buenos Aires; ²Cátedra de Enfermedades Infecciosas, Hospital de Enfermedades Infecciosas “Dr. F. J. Muñoz”, Uspallata 2272 (1282) Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina.
* Correspondencia. E-mail: rcallejo@anlis.gov.ar

RESUMEN

Se comparó una PCR múltiple recientemente validada para la caracterización de serotipos de *Listeria monocytogenes* con el método tradicional de serotipificación. Se estudiaron 342 aislamientos de origen humano, alimentario, veterinario y ambiental obtenidos durante el período 1992-2005. La concordancia entre ambos métodos para los serotipos 1/2a, 1/2b y 1/2c fue del 100%, y para el serotipo 4b fue del 98%. La serotipificación constituye una herramienta importante como primer nivel de diferenciación de cepas de *L. monocytogenes* para llevar a cabo la vigilancia epidemiológica y, sobre todo, el estudio de brotes. La PCR múltiple es una técnica alternativa rápida, de bajo costo y fácilmente adaptable en laboratorios de bacteriología clínica y bromatología.

Palabras clave: Listeriosis, *Listeria monocytogenes*, serotipificación, PCR

ABSTRACT

Study by multiplex PCR of *Listeria monocytogenes* serotypes isolated in Argentina. A multiplex PCR assay, recently validated to characterize the serotypes of *Listeria monocytogenes* was evaluated in comparison to conventional serotyping. Three hundred forty two *L. monocytogenes* strains isolated from human, food, animal and environmental sources during the 1992-2005 period were assayed. The concordance between the two methods for serotypes 1/2a, 1/2b and 1/2c was 100%, whereas for serotype 4b it was 98%. Serotyping is a useful tool for first line strain differentiation during epidemiological surveillance and outbreaks. The multiplex PCR assay offers a fast and low-cost alternative, which is easily adaptable to clinical bacteriology and bromatology laboratories.

Key words: Listeriosis, *Listeria monocytogenes*, serotyping, PCR

Listeria monocytogenes es un importante patógeno de transmisión alimentaria y de amplia distribución en la naturaleza. En humanos y animales produce una infección denominada listeriosis. Los alimentos especialmente implicados son los elaborados y refrigerados, que pueden contaminarse en cualquier punto de la cadena de producción (9). La listeriosis, a diferencia de otras infecciones transmitidas por alimentos, se caracteriza por presentar un largo período de incubación, lo cual dificulta la posibilidad de establecer la relación entre el caso clínico y el alimento consumido (6). Otra característica es la forma de presentación y la elevada tasa de mortalidad (20 al 30%) (8).

El espectro clínico comprende: infección del sistema nervioso central (meningitis o romboencefalitis), sepsis y nacimiento antes de término o aborto (6, 8). El grupo de pacientes en riesgo está constituido fundamentalmente por inmunosuprimidos, neonatos y embarazadas; sin embargo, esta bacteria puede producir cuadros leves de gastroenteritis en pacientes inmunocompetentes (1). Dada la severidad de esta infección, que puede presen-

tarse como casos esporádicos o en brotes, es necesario resaltar la necesidad de realizar la vigilancia epidemiológica de este microorganismo.

La serotipificación constituye el primer método de subtipificación para la investigación epidemiológica de listeriosis. La técnica convencional (10), basada en la detección de los diferentes antígenos somáticos (O) y flagelares (H), es laboriosa y de costo elevado. Requiere de un alto entrenamiento técnico y algunas veces no presenta reproducibilidad satisfactoria, lo cual demanda la realización de controles de calidad periódicos.

Se han identificado 4 serogrupos por su antígeno somático (1/2, 3, 4 y 7), que combinados con antígenos flagelares conforman hasta el momento trece serotipos. No obstante, el 98% de los aislamientos pertenecen a los serotipos 1/2a, 1/2b, 1/2c y 4b (7, 10, 11).

La hibridación de ADN de aislamientos de diversos orígenes con sondas representativas de secuencias específicas de tres genomas secuenciados de *L. monocytogenes* (*L. monocytogenes* serotipo 1/2a EGDe, *L. monocytogenes* serotipo 4b CLIP 80459 y *L. innocua*

serotipo 6a CLIP 1262) permitió la división de los tres linajes de *L. monocytogenes* (I, II, III) en cinco grupos filogenéticos correlacionados con los serotipos: I.1 (1/2a-3a), I.2 (1/2c-3c), II.1 (4b-4d-4e), II.2 (1/2b-3b-7) y III (4a-4c) (4). Asimismo, se identificaron genes marcadores asociados a los cuatro primeros grupos. Sobre la base de este trabajo, Doumith *et al.* (3) desarrollaron una técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) múltiple, para diferenciar los cuatro serotipos principales de *L. monocytogenes*. Los genes marcadores seleccionados (3) fueron: *Imo0737*, específico para los serotipos 1/2a, 1/2c, 3a y 3c; *Imo1118* para 1/2c y 3c; ORF 2819 para 1/2b, 3b, 4b, 4d y 4e; ORF 2110 para 4b, 4d y 4e; y *prs*, gen específico para el género *Listeria*, incluido como control interno de amplificación.

Esta PCR fue recientemente validada (5) y el objetivo del presente trabajo ha sido comparar y correlacionar los resultados que se obtienen al identificar los serotipos mediante la caracterización molecular con los que arroja la técnica de aglutinación, considerada el método de referencia. Esta técnica molecular constituye un método rápido y económico para diferenciar serotipos con alto potencial patogénico, como el 4b, que podría ser aplicado en laboratorios clínicos y bromatológicos.

Se estudiaron 342 aislamientos de *L. monocytogenes* obtenidos a partir de muestras de diversos orígenes durante el período 1992-2005 y que forman parte de la colección de cultivos del Servicio Bacteriología Especial, INEI-ANLIS "Dr. Carlos G. Malbrán". La distribución de los aislamientos según el origen fue: humanos, 51% (176/342); alimentos, 37% (126/342); ambiente, 10% (34/342) y animales, 2% (6/342).

Los cultivos fueron confirmados como *L. monocytogenes* utilizando pruebas bioquímicas convencionales (2) y se conservaron a -80 °C en caldo tripteína soja adicionado con glicerol al 10% (v/v).

La técnica de serotipificación por aglutinación fue realizada utilizando sueros específicos para antígenos somáticos y flagelares (Denka Seiken, Japón), de acuerdo con el método de Seeliger y Hohne (9). La técnica de PCR múltiple se realizó según el protocolo descrito por Doumith *et al.* (3). Se utilizaron las siguientes cepas control provistas por el Instituto Pasteur de París: *L. monocytogenes* serotipo 1/2a (CIP 89380); *L. monocytogenes* serotipo 1/2b (CIP 90582); *L. monocytogenes* 1/2c (CIP 86754); *L. monocytogenes* serotipo 4b (CIP 88868) y *L. innocua* (ATCC 33090).

La Figura 1 muestra los diferentes perfiles de amplificación obtenidos con los distintos serotipos de *L. monocytogenes* y con otras especies de *Listeria*. Todos los aislamientos mostraron la banda correspondiente al gen genérico *prs* (370 pb). La distribución de serotipos según el origen de los aislamientos se muestra en la Tabla 2.

La amplificación de los cuatro genes permitió la separación de los serotipos en cuatro grupos (Tabla 1), a saber: Grupo (Gp) 1: serotipos 1/2a y 3a (amplificación del gen *Imo0737*); Gp 2: serotipos 1/2b, 3b y 7 (amplificación del gen ORF2819); Gp 3: serotipos 1/2c y 3c (amplificación de los genes *Imo0737* y *Imo1118*); y Gp 4: serotipos 4b, 4d y 4e (amplificación de ambos genes ORF2819 y ORF2110). Los serotipos 4a y 4c sólo amplificaron el gen *prs*, característico del género *Listeria* (Gp L).

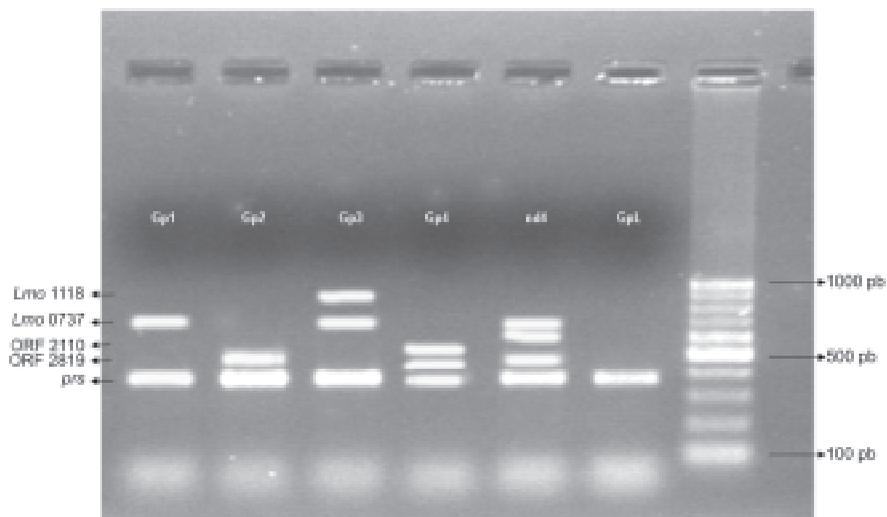


Figura 1. PCR múltiple. Perfiles de amplificación obtenidos con los distintos serotipos de *L. monocytogenes* y otras especies de *Listeria* spp. Calle 1, *L. monocytogenes* serotipo 1/2a (CIP 89380); calle 2, *L. monocytogenes* serotipo 1/2b (CIP 90582); calle 3, *L. monocytogenes* 1/2c (CIP 86754); calle 4, *L. monocytogenes* serotipo 4b (CIP 88868); calle 5, *L. monocytogenes* serotipo 4b perfil atípico (BE 123/06); calle 6, *L. innocua* (ATCC 33090); calle 7, marcador de peso molecular (100 Marker, Invitrogen).

Tabla 1. Relación entre los serotipos de *L. monocytogenes* y los genes amplificados

Serotipos	Gen amplificado por la PCR múltiple					Grupo PCR ⁽²⁾
	<i>Lmo1118</i> (906 pb)	<i>Lmo0737</i> (691 pb)	ORF2110 (597 pb)	ORF2819 (471 pb)	<i>prs</i> ⁽¹⁾ (370 pb)	
1/2 a	-	+	-	-	+	Gp 1
1/2 b	-	-	-	+	+	Gp 2
1/2 c	+	+	-	-	+	Gp 3
4b	-	-	+	+	+	Gp 4
3a	-	+	-	-	+	Gp 1
3b	-	-	-	+	+	Gp 2
3c	+	+	-	-	+	Gp 3
7	-	-	-	+	+	Gp 2
4d	-	-	+	+	+	Gp 4
4e	-	-	+	+	+	Gp 4
4a	-	-	-	-	+	Gp L
4c	-	-	-	-	+	Gp L

⁽¹⁾ Amplifica con todas las especies de *Listeria*.

⁽²⁾ Doumith *et al.*, 2004a.

Tabla 2. Distribución de serotipos de *L. monocytogenes* según el origen de los aislamientos

Serotipos; Gp PCR ⁽¹⁾	N° de aislamientos según el origen				Total
	Humano	Alimentos	Ambientales	Veterinario	
1/2 a; Gp1	3	11			14
1/2 b; Gp2	61	51	15	2	129
1/2 c; Gp3	1	13			14
4b; Gp4	111	45	19	4	179
3b; Gp2		5			5
3c; Gp3		1			1
Total	176	126	34	6	342

⁽¹⁾ Doumith *et al.*, 2004a.

La concordancia entre ambos métodos para los serotipos 1/2a, 1/2b y 1/2c fue del 100% y para el serotipo 4b fue del 98% (Tabla 3). Sólo 5 cepas clasificadas en el Gp 2 (perfil 1/2b) y un aislamiento clasificado en el Gp 3 (perfil 1/2c) por PCR correspondieron al serotipo 3b y 3c, respectivamente, por el método tradicional. Estos 6 últimos aislamientos fueron de origen alimentario.

Todos los aislamientos de origen humano mostraron una correlación del 100% entre la PCR múltiple y el método de aglutinación. Tres aislamientos presentaron idéntico perfil Gp 4 atípico, con una banda extra entre los fragmentos correspondientes a ORF2110 y *Lmo0737*, y fueron confirmados como serotipo 4b por el método de aglutinación. Será necesario efectuar estudios adicionales para caracterizar la banda extra, que deberán incluir la secuenciación de dicha banda y la comparación con la secuencia del gen *Lmo0737*.

Los perfiles obtenidos por PCR múltiple no distinguen los aislamientos del serotipo 1/2a de los 3a, los del serotipo 1/2b de los 3b y 7, los del serotipo 1/2c de los 3c, ni los del serotipo 4b de los 4d y 4e. Tampoco distinguen los serotipos 4a y 4c del resto de las especies del género *Listeria*. Sin embargo, los serotipos 3a, 3b, 3c, 4a, 4c, 4e, 4d y 7 son muy infrecuentes en alimentos y rara vez están asociados a infección humana. El serotipo 4b es el responsable de los grandes brotes epidémicos informados en el mundo, así como del 90 al 95% de los casos esporádicos.

Los resultados fueron comparables con los obtenidos por Doumith *et al.* (3), quienes hallaron un rango de concordancia del 96,6 al 100%, suficiente para que la PCR sea usada como alternativa de la serotipificación por aglutinación.

No obstante, todos los aislamientos deben ser confirmados por el laboratorio de referencia y remitidos para el

Tabla 3. Concordancia entre los resultados obtenidos por PCR y la serotipificación convencional de *L. monocytogenes*

Serotipo ⁽¹⁾	Resultados de la PCR múltiple				Nº de cepas	Concordancia	
	Grupos definidos ⁽²⁾						Perfil no definido del Gp4 ⁽³⁾
	Gp1	Gp2	Gp3	Gp4			
1/2a	14					14	100%
1/2b		129				129	100%
1/2c			13			13	100%
4b				177	3	180	98%
3b		5				5	ND ⁴
3c			1			1	ND ⁴

⁽¹⁾ Determinado por el método de Seeliger y Hohne, 1979.

⁽²⁾ Según la técnica descrita por Doumith *et al.*, 2005.

⁽³⁾ Perfiles Gp4 con una banda extra.

⁽⁴⁾ No determinado.

análisis epidemiológico molecular por macrorrestricción de ADN y separación electroforética en campo pulsado (PFGE). Este es el método estandarizado de mayor poder discriminatorio para la detección de brotes de listeriosis y el que permite el análisis de los clones circulantes y la detección de nichos ecológicos. De esta forma es posible realizar la vigilancia de esta patología en el país.

Agradecimientos: El presente trabajo fue realizado con un subsidio de la Fundación Alberto J. Roemmers y fondos del Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas. Los autores desean agradecer al Dr. M. Doumith (Instituto Pasteur, Francia) por haber provisto las cepas patrón.

BIBLIOGRAFÍA

1. Aureli P, Fiorucci GC, Caroli D, Marchiaro G, Novara O, Leone L, *et al.* An outbreak of febrile gastroenteritis associated with corn contaminated by *Listeria monocytogenes*. *N Engl J Med* 2000; 342: 1236-41.
2. Bille J, Swaminathan B, Rocourt J. *Listeria* and *Erysipelothrix*. En: Murray PR, Baron EJ, Jorgesen JH, Pfaller MA, Tenover FC, White O, editors. *Manual of Clinical Microbiology*. Washington D.C., ASM Press, 2003, p. 461-71.
3. Doumith M, Buchrieser C, Glaser P, Jacquet C, Martin P. Differentiation of the major *Listeria monocytogenes* serovars by multiplex PCR. *J Clin Microbiol* 2004a; 42: 3819-22.
4. Doumith M, Cazalet C, Simoes N, Frangeul L, Jacquet C, Kunst F, *et al.* New aspects regarding evolution and virulence of *Listeria monocytogenes* revealed by comparative genomics and DNA arrays. *Infect Immun* 2004b; 72: 1072-83.
5. Doumith M, Jacquet C, Gerner-Smidt P, Graves LM, Loncarevic S, Mathisen T, *et al.* Multicenter validation of a multiplex PCR assay for differentiating the major *Listeria monocytogenes* serovars 1/2a, 1/2b, 1/2c, and 4b: toward an international standard. *J Food Prot* 2005; 68: 2648-50.
6. Farber JM, Peterkin PI. *Listeria monocytogenes*, a food-borne pathogen. *Microbiol Rev* 1991; 55: 476-511.
7. Graves LM, Swaminathan B, Hunter S. Subtyping *Listeria monocytogenes*. En: Ryser ET, Marth EH, editors. *Listeria, listeriosis and food safety*. Boca Raton, Florida, EE.UU, CRC Press, 2007, p. 283-304.
8. Lorber B. Listeriosis. *Clin. Infect Dis* 1997; 24: 1-11.
9. Schuchat A, Deaver KA, Wenger JD, Plikaytis BD, Mascola L, Pinner RW, *et al.* Role of foods in sporadic listeriosis I. Case-control study of dietary risk factors. *JAMA* 1992; 267: 2041-5.
10. Seeliger HPR, Höhne K. Serotyping of *Listeria monocytogenes* and related species. *Methods Microbiol* 1979; 13: 31-49.
11. Tappero JW, Schuchat A, Deaver KA, Mascola L, Wenger JD, *et al.* Reduction in the incidence of human listeriosis in the United States. Effectiveness of prevention efforts? The Listeriosis Study Group. *JAMA* 1995; 273: 1118-22.