

## Frecuencia y caracterización molecular de cepas de *Listeria monocytogenes* aisladas de alimentos listos para el consumo (ALC) en dos regiones de Chile

Parra-Flores, J.<sup>1</sup>, Bustamante, F.<sup>2</sup>, F.<sup>1</sup>, Ovalle Salinas, C.<sup>3</sup>, Castillo Castillo, C.<sup>3</sup>, Contreras Fernández, A.<sup>4</sup>, Lepuschitz, S.<sup>5</sup>, Ruppitsch, W.<sup>5</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Nutrición y Salud Pública, Universidad del Bío-Bío, Andrés Bello 720, Chillán, Chile, (56)422463167, <sup>2</sup>Laboratorio de Medio Ambiente y Salud Pública, Secretaría Regional del Ministerio de Salud en Maule, Talca, Chile, <sup>3</sup>Escuela de Nutrición y Dietética, <sup>4</sup>Laboratorio de Experimentación y Certificación de la Calidad de los Alimentos, Universidad del Bío-Bío, Andrés Bello 720, Chillán, Chile, <sup>5</sup>Austrian Agency for Health and Food Safety, Institute for Medical Microbiology and Hygiene, Vienna 1220, Austria. Correo:juparra@ubiobio.cl

**Palabras clave:** *Listeria monocytogenes*, alimentos listos para el consumo, secuencias tipo, serotipos

### Introducción

Los alimentos listos para el consumo (ALC) se definen como alimentos que son consumidos en estado crudo o manipulado, elaborado, mezclado, cocido o preparado y que son consumidos sin ninguna manipulación posterior [1]. Estos productos cada vez tienen mayor demanda debido al estilo de vida de las personas de ritmo más acelerado, donde el tiempo para preparar alimentos es escaso y cada vez menos saludable. Los ALC son una buena alternativa para atender las necesidades alimentarias cotidianas, sin embargo, no están exentos de ser contaminados por diversos agentes dentro de los que se destacan los agentes biológicos y que pueden afectar seriamente la salud de quienes los consumen. Entre estos riesgos encontramos microorganismos patógenos como *Salmonella* spp, *Escherichia coli* patógena y *Listeria monocytogenes* [2].

*L. monocytogenes* es una bacteria gram positiva, anaerobia facultativa y capaz de sobrevivir en diversos alimentos. Es un patógeno prevalente a nivel mundial, que presenta una alta tasa de mortalidad y una baja tasa de morbilidad. En Estados Unidos se ha estimado que causa más de 2,500 infecciones y 500 muertes anuales, mientras que en Europa con 1,642 casos con una letalidad de 17,8% [3]. Esta bacteria produce listeriosis, que es una enfermedad que se produce por el consumo de alimentos contaminados con este patógeno, la que se manifiesta por abortos, septicemia, meningitis y muerte. La listeriosis puede afectar a todas las personas, sin embargo, el mayor grupo de riesgo lo componen: embarazadas, niños, adultos mayores e inmunodeprimidos o con enfermedades autoinmunes. La cualidad fundamental en este grupo de riesgo es que poseen un sistema inmunológico deprimido o inmaduro (en el caso de los niños) lo que los hace más susceptibles a esta enfermedad [4].

*L. monocytogenes* se encuentra en el sistema gastrointestinal de animales, los cuales pueden migrar y contaminar por inadecuadas prácticas de manufactura e indebidas prácticas de higiene a los distintos alimentos como: verduras y frutas congeladas, lácteos no pasteurizados, entre otros. Los alimentos que se han asociado a mayor número de brotes a nivel nacional e internacional son quesos (camembert, brie), embutidos, carnes y pescados [5].

Los brotes y casos por *L. monocytogenes* se han asociado estrechamente a los serotipos 1/2a, 1/2b y 4b, los cuales son los causantes del 95% de los casos de listeriosis humana. Además, la gravedad además está asociada a múltiples factores de virulencia, así como la capacidad de formar biopelículas y a la resistencia de antibióticos especialmente a betalactámicos [6]. En Chile, entre los años 2008, 2009 y 2017-2018 se reportaron los mayores casos de listeriosis asociados a alimentos, con una letalidad entre 20 y 25%. En el año 2017 y 2018 hubo 18 fallecidos, donde el brote estuvo relacionado con alimentos listos para el consumo [7]. Por ello, el objetivo de este estudio es evaluar la frecuencia y caracterizar molecularmente cepas de *Listeria monocytogenes* aisladas de alimentos listos para el consumo (LPC) en dos regiones de Chile

## **Metodología**

### Muestreo

Se analizaron 436 muestras de ALC (Quesos, cecinas cocidas, frutas y vegetales comestibles pre-elaborados, comidas y platos mixtos con ingredientes crudos y/o cocidos) en las regiones de Ñuble y Maule, Chile.

### Preparación de la muestra

A 25 g de la muestra se agregó 225 mL de caldo de cultivo selectivo para *L. monocytogenes* (Half Fraser Broth), incubando a  $30\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$  durante 24 - 26 h. El análisis de *L. monocytogenes* se hizo según norma ISO 11290-1 1996.

### Detección de *L. monocytogenes*

Se realizó mediante el ensayo inmunoenzimático con equipo VIDAS (Vitek Inmuno Diagnostic Assay System). La medición e interpretación es realizada automáticamente por el equipo, arrojando la detección como positiva o negativa según sea el caso.

### Identificación de *L. monocytogenes*

Esta se realizó mediante la galería API Listeria de bioMérieux, Francia. Se incubó a  $35\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$  durante 24 hrs. El perfil numérico obtenido se evaluó en el programa ApiWeb proporcionado por el fabricante. Se utilizó como control la cepa de *Listeria monocytogenes* ATCC® 35152.

### Perfil de resistencia a antibióticos

Se utilizó el método estandarizado y descrito por el Laboratorio Internacional de Referencia National Committee for Clinical Laboratory Standards (CLSI, 2019). Los antibióticos utilizados fueron: Ampicilina 10 µg (AMP), Penicilina 10 µg (P), Sulfametoxazol - Trimetoprim 25 µg (STX), Eritromicina 15 µg (E), Vancomicina 30 µg (VA) y Cloranfenicol 30 µg (C). Las cepas *Escherichia coli* ATCC 25922 y *S. pneumoniae* ATCC 49619 fueron utilizadas como controles.

### Prueba de virulencia

Se detectó la presencia del gen *hly*, *inlA* y *prfA* mediante reacción de polimerasa en cadena (PCR) utilizando un termociclador de punto final Fermelo Biotec (China).

### Secuenciación genoma completo (WGS)

Las cepas de *L. monocytogenes* se secuenciaron en el Instituto de Microbiología Médica e Higiene AGES (Agencia Austriaca para la Salud y la Seguridad Alimentaria, Austria). Para WGS, el ADN se aisló de cultivos bacterianos con el kit de ADN MagAttract HMW (Qiagen, Hilden, Alemania) de acuerdo con el protocolo para bacterias grampositivas y las instrucciones del fabricante. La cantidad de ADN de entrada se cuantificó en un instrumento Lunatic (Unchained Labs, Pleasanton, CA, E.E.U.U.). Para preparar las bibliotecas de secuenciación se utilizó Nextera XT (Illumina Inc., San Diego, CA, EE. UU.) de extremo emparejado de 300 pb en un secuenciador Illumina MiSeq. Las cepas se secuenciaron para lograr una cobertura mínima de 80 veces utilizando los protocolos estándar recomendados por Illumina. Los archivos FASTQ resultantes se recortaron en calidad y se ensamblaron de novo con la versión 3.9.0 de SPAdes. Los contigs se filtraron para una cobertura mínima de 5 veces y una longitud mínima de 200 pb con el software SeqSphere + v. 6.0.0 (Ridom, Münster, Alemania).

Con el genoma secuenciado y utilizando la plantilla de tarea *L. monocytogenes* 5-plex PCR Serogroup integrada en el software SeqSphere+ v. 7.7.5 (2021-06), se determinó los serotipos con fragmentos de cinco regiones de ADN (*Imo118*, *Imo0737*, *ORF2110*, *ORF2829* y *prs* como control de amplificación interno). Las secuencias tipo (ST) se determinaron utilizando el esquema de la plantilla de tarea esquema MLST con fragmentos de los siete genes *abcZ*, *bglA*, *cat*, *dapE*, *dat*, *ldh* e *ihkA* y con los perfiles del Institut Pasteur MLST *Listeria* database (<http://bigsd.bpasteur.fr/Listeria/Listeria.html>) [8].

## Resultados y discusión

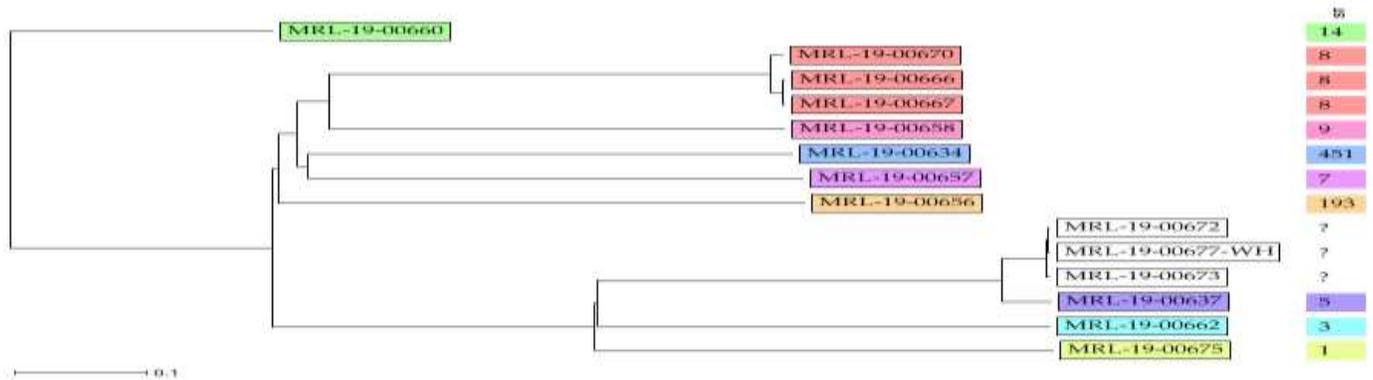
La prevalencia de *L. monocytogenes* fue de 3,1 % en los ALC muestreados (14/436), se aislaron y secuenciaron completamente 14 cepas de *L. monocytogenes*. El grupo de frutas y vegetales pre-elaborados quienes tuvieron la mayor positividad con 1,8%. Por categoría de alimento, se observa que para el grupo de frutas y vegetales comestibles pre-elaborados de un total de 22 muestras analizadas 8 muestras (36,4%) fueron positivas y para comidas y platos mixtos con ingredientes crudos y /o cocidos (incluidos emparedados) de un total de 67 muestras analizadas 4 muestras (5,9%) arrojaron presencia de patógeno. En el grupo cecinas cocidas de un total de 186 muestras analizadas 2 muestras (1,1%) fueron positivas. En tanto que, para el grupo de queso, queso fresco, queso chacra, queso maduro no se encontró presencia de *Listeria monocytogenes* en ninguna muestra. En un estudio publicado en 2020 también en ALC se encontró que la mayor positividad fue para comidas y platos preparados con 17,5% (7/40), seguida de frutas y verduras pre-procesadas con 8,6% (3/35) y de 8,5% (20/235) para las carnes cocidas. La positividad fue de 0% (0 / 90) para queso y queso fresco, al igual que en nuestro estudio [8].

**Tabla 1.** Distribución porcentual de muestras positivas para *Listeria monocytogenes* según tipo de elaboración

Tipo de elaboración	n	Positivas	
		n	(%)
<b>Quesos</b>	181	0	(0,0)
<b>Cecinas cocidas</b>	186	2	(0,4)
<b>Frutas y vegetales comestibles pre-elaborados</b>	22	8	(1,8)
<b>Comidas y platos mixtos con ingredientes crudos y cocidos</b>	67	4	(0,9)
<b>Total</b>	<b>436</b>	<b>14</b>	<b>(3,1)</b>

El 21,4 % de las cepas analizadas presentaron resistencia a ampicilina, de las cuales una cepa de *L. monocytogenes* fue aislada de cecinas cocidas y dos cepas de frutas y vegetales comestibles pre-elaborados. Este aspecto es importante debido a que estudios previos en Chile han indicado que *L. monocytogenes* es susceptible a ampicilina y que, éste antibiótico junto a amoxicilina y gentamicina se utilizan comúnmente para tratar la listeriosis [9].

Los serotipos más frecuentes en nuestro estudio fueron el 1/2a el cual representa un 50% de las cepas de *L. monocytogenes*, seguida de 1/2b con un 36%, 1/2c y 4b con 7%, respectivamente. De las cepas con resistencia a antibióticos, dos corresponden al serotipo 1/2a que fueron aisladas de salmón ahumado y ensaladas pre-elaboradas y la cepa restante serotipo 1/2b aislada de frutas. Además, nos preocupa que en nuestro estudio se encuentren presentes cuatro de los trece serotipos más frecuentes que producen listeriosis humana en el 98% de todos los casos en el mundo [10]. Cabe mencionar que el serotipo 4b y 1/2a son responsables de los más importantes brotes de listeriosis asociados a alimentos en 2008-2009 y en 2012, además, permanentes asociados a los casos de enfermedad por este patógeno desde 2013 a 2019 en Chile [8].



MRL-19-xxxx: codificación de número de cepa de *L. monocytogenes*; ST: secuencia tipo de perfil MLST

**Figura 1.** Árbol filogenético por método de Neighbor-Joining con 1,000 réplicas de las cepas de *Listeria monocytogenes* aisladas de ALC según secuencia tipo y origen de las muestras (ST).

El 100% de las cepas de *L. monocytogenes* fueron positivas a los 3 factores de virulencia in vitro realizados y similar a estudios previos publicados [8]. Las secuencias tipo (ST) más frecuentes fueron ST8 con un 21% y con un mismo porcentaje de ST no identificadas. Además, se encontraron ST1, ST3, ST5, ST9, ST14, ST193 y ST451. Es importante destacar que el ST8 ha sido una de las secuencias tipo más asociadas a enfermedades transmitidas por alimentos (ETAs) y se encuentra comúnmente en los servicios de producción de alimentos [8]. La ST8 es más persistente en el tiempo, menos susceptible a desinfectantes y capaz de formar biopelículas fácilmente. En el año 2018 este ST8 ocasionó un brote múltiple en tres países: Dinamarca con 6 casos, Alemania con 5 casos y uno en Francia, con una letalidad de 33,3% [11]. En Chile, la ST8 se encuentra presente en casos clínicos y alimentos en reportes de 2019 y 2020, así como la ST1 y ST9 que han estado asociadas a los brotes extensos de listeriosis en 2008-2009 y 2012 [7, 8].

En resumen, el estudio permitió determinar la presencia de *L. monocytogenes* con presencia de factores de virulencia, resistentes a ampicilina y con ST asociados a casos de enfermedad en los ALC muestreados. Además, al no existir ningún tratamiento térmico previo a su consumo, esta situación representa un grave riesgo para la salud de los consumidores.

## Conclusiones

Se encontraron cepas de *L. monocytogenes* resistentes a ampicilina, con ST que han sido asociadas a brotes y con serotipos 1/2a, 1/2b, 1/2c y 4b, los cuales son los asociados a listeriosis en Chile. La presencia de *L. monocytogenes* en ALC obliga a la autoridad a redoblar la vigilancia epidemiológica mediante control de alimentos considerados de riesgo y educar a la población en la selección de alimentos más inocuos.

## Referencias

1. Monteiro, C. (2010). The big issue is ultra-processing. *World Nutr.* **1**: 237–269.
2. Scallan E, Hoekstra R, Angulo FJ, Tauxe RV, Widdowson M, Roy S, Griffin S. (2011). Foodborne Illness Acquired in the United States-Major Pathogens. *Emerg. Infect. Dis.* **17**: 7–15.
3. Letchumanan V, Wong P, Goh B, Ming L, Pusparajah P, Wong S et al. (2018). A review on the characteristics, taxonomy and prevalence of *Listeria monocytogenes*. *Prog. Microbes Mol. Biol.* **1** (1): a0000007.
4. Foerster C., L. Vidal, M. Troncoso, and G. Figueroa. (2012). Characterization of *Listeria monocytogenes* isolates from cattle and ground beef by pulsed-field gel electrophoresis. *Rev. Argent. Microbiol.* **44** (3):195-200.
5. Kinga W, Jacek O. (2017). Prevalence, genetic diversity and antimicrobial resistance of *Listeria monocytogenes* isolated from fresh and smoked fish in Poland. *Food Microbiol.* **64**:164-171.
6. Zhu Q, Gooneratne R, Altaf M. (2017). *Listeria monocytogenes* in Fresh Produce: Outbreaks, Prevalence and Contamination Levels. *Foods.* **6**:1-11.
7. Ulloa S, Arata L, Alarcón P, Araya P, Hormazábal J, Fernández J. (2019). Caracterización genética de cepas de *Listeria monocytogenes* aisladas durante los años 2007–2014 en Chile. *Rev. Chil. Infectol.* **36**: 585–590.

8. Bustamante F, Maury-Sintjago E, Leal FC, Acuña S, Aguirre J, Troncoso M, Figueroa G, Parra-Flores J. (2020). Presence of *Listeria monocytogenes* in Ready-to-Eat Artisanal Chilean Foods. *Microorganisms*. **8** (11):1669.
9. Seoane, M. (2013). *Listeria monocytogenes*. *Rev. Chil. Infectol.* **30**: 405–406.
10. Vallim D, Barroso C, Lisbôa R, Barbosa A, Rusak L, dos Reis C, Hofer E. (2015). Twenty Years of *Listeria* in Brazil: Occurrence of *Listeria* Species and *Listeria monocytogenes* Serovars in Food Samples in Brazil between 1990 and 2012. *Biomed. Res. Int.* 540204.
11. EFSA (European Food Safety Authority) and ECDC (European Centre for Disease Prevention and control). (2018). Multi-country outbreak of *Listeria monocytogenes* sequence type 8 infections linked to consumption of salmon products. *EFSA supporting publication*. **15** (10):1496.