



**Facultad de Medicina
Departamento de Ciencias Biomédicas**

**“Análisis de la variabilidad genética de la isla de
patogenicidad (LIPI 1) en cepas de *Listeria monocytogenes*
aisladas desde alimentos y de casos clínicos”**

Tesis para optar al grado de Magíster en Ciencias Médicas,
mención en Biología Celular y Molecular

MARIA ELISA ESCOBAR PEÑA

**Director de Tesis:
Maricel Vidal Oyarce, Biol., PhD.**

**Supervisor Programa:
Jenny Llanos PhD.**



**Facultad de Medicina
Departamento de Ciencias Biomédicas**

**“Análisis de la variabilidad genética de la isla de
patogenicidad (LIPI 1) en cepas de *Listeria monocytogenes*
aisladas desde alimentos y de casos clínicos”**

Tesis para optar al grado de Magíster en Ciencias Médicas,
mención en Biología Celular y Molecular

MARIA ELISA ESCOBAR PEÑA

**Realizado en: LABORATORIO DE SEREMI SALUD REGION METROPOLITANA.
LABORATORIO DE MICROBIOLOGIA**

**Director de Tesis:
Maricel Vidal Oyarce, Biol., PhD.**

**Supervisor Programa:
Jenny Llanos PhD.**

Fecha: 26 de Mayo del 2014

DEDICATORIA

La vida nos regala muchas oportunidades, deseos y sueños, en esta ocasión quisiera dedicar mi esfuerzo, mis alegrías y mis penas a mis pequeños hijos: Isabel y Alejandro, ellos que con solo su presencia me llenan de vida, alegrías y ganas de luchar cada día más, por ellos y por su bienestar.

Sus vidas para mí son un aliento en mis caídas, un camino para crecer y fortalecerme, para cumplir con el objetivo principal ser un apoyo en sus vidas, quien los cuide y proteja de toda adversidad.

Solo espero que puedan comprender y perdonar sencillamente a su mamá por no poder jugar con ellos cuando me lo pedían por el hecho de estar estudiando o trabajando.

No puedo dejar de destacar el apoyo de mi esposo, le agradezco de corazón por estar a mi lado en este tiempo de estudio, por sus palabras de aliento cuando no todo era positivo.

Y no puedo dejar de mencionar a mis padres y familia, quienes siempre me han apoyado en mis proyectos para seguir perfeccionándome en esta sociedad de exigencias y metas que me he propuesto cumplir. Gracias por cuidar a mis hijos en mi ausencia.

María Elisa

AGRADECIMIENTOS

Son muchas las personas a quien debo agradecer por haberme ayudado en cumplir mi objetivo de tener mis estudios de Magister.

Comienzo por mi Tutora Directa de la Tesis Experimental, Dra. Maricel Vidal, quien con su excelente disposición y amistad me enseñó como realizar una tesis de magister, a ser metódica y ordenada en el transcurso de la investigación, y también a aceptar “los tirones de orejas” cuando no cumplía con los tiempos y tareas que me encomendaba. Agradecida Maricel por el tiempo y paciencia que dedicaste a mi enseñanza en el área de biología molecular. Enviar también mis agradecimientos a su grupo de trabajo que me acogió desde el primer día que comencé a trabajar en el Laboratorio de Seremi de Salud Región Metropolitana.

A mis Profesores: Miguel, Bernardo, Eliana y María Elena quienes siempre estuvieron presentes en este tiempo de estudio y que gracias a ellos puede coordinar mis viajes a Santiago. Gracias por las palabras de aliento cuando me veían cansada y agotada, y también la mano amiga cuando estaba colapsada. Gracias!!!!!!!

Como no agradecer a mis amigas quien en los buenos y malos momentos siempre han estado conmigo, para July, Carlita y Silvia vayan mis sinceros agradecimientos por esos mensajes de texto o whatsapp con las palabras de aliento y el mensaje cariñoso “vamos que se puede”, y por supuesto la frase típica de mi amiga Silvia “y cuando terminarás.....a la cual yo respondía.....cuando la termine”.

A toda mi familia en general, por su cariño y apoyo a seguir avanzando en los proyectos que me propongo.

A mis Profesores del Programa de Magister en Ciencias Médicas, Mención Biología Molecular, Dra Jenny, Doc. Mario, y su grupo de profesores, agradecida de la buena disposición hacia mi persona, y de sus enseñanzas.

A todos aquellos que de una u otra manera han aportado a que una vez más cumpla con mis proyectos a cabalidad, Agradecida

María Elisa

INDICE GENERAL

RESUMEN	1
1. INTRODUCCION	3
1.1. Antecedentes generales	3
1.2. Epidemiología	5
1.2.1. Serovariedades de <i>L. monocytogenes</i>	6
1.3. Fisiopatología de la Infección	7
1.3.1. Características clínicas	7
1.3.2. Listeriosis neonatal	7
1.3.3. Listeriosis en adultos	7
1.3.4. Patogénesis	8
1.3.5. Patogenicidad y Virulencia	8
1.4. Generalidades de LIPI-1 y de sus genes constituyentes	9
1.4.1. Ciclo intracelular	11
1.4.2. Adherencia e Invasividad	12
1.4.3. Crecimiento intracelular y propagación celular	12
1.5. Enzimas de Restricción	13
1.5.1. Enzimas de restricción <i>HaeIII</i> y <i>PvuII</i>	14
1.6. Variabilidad Genética.	14
1.6.1. Linajes genéticos	15
1.7. <i>L. monocytogenes</i> en la industria alimentaria.	17
2. HIPOTESIS	19
3. OBJETIVOS	20
3.1. Objetivo general	20
3.2. Objetivos específicos	20
4. MATERIAL Y MÉTODOS	21
4.1. Aislamientos de <i>Listeria monocytogenes</i>	21
4.1.1. Recuperación de los aislados de <i>Listeria monocytogenes</i>	21
4.2. Cepas control	21
4.3. Aspectos de bioseguridad.	21
4.4. Técnicas de biología molecular	22
4.4.1. PCR para confirmar aislamientos de <i>Listeria monocytogenes</i>	22
4.4.2. Amplificación de la isla de patogenicidad (LIPI-1)	24
4.4.3. Restricción del fragmento amplificado de la Isla LIPI-1, utilizando las enzimas <i>HaeIII</i> y <i>PvuII</i> .	25
5. RESULTADOS	26
5.1. Confirmación de cepas de <i>L. monocytogenes</i>	26
5.2. Amplificación de la isla LIPI-1	26
5.3. Restricción del producto de amplificación de la isla LIPI-1 con las enzimas <i>HaeIII</i> y <i>PvuII</i>	28
5.4. Análisis de similitud de aislamientos de <i>L. monocytogenes</i> obtenidos de alimentos	29
5.4.1. Dendrograma	30
5.4.2. Dendrograma	31
6. DISCUSIÓN	32
7. CONCLUSIONES	34
8. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	35

INDICE DE TABLAS

Tabla 1: Secuencias, tamaño y origen de los de partidores utilizados en este estudio.....	22
Tabla 2: Mezcla de reacción de PCR	23
Tabla 3: Volúmenes de la mezcla	24
Tabla 4: Reacción de restricción	25

INDICE DE FIGURAS

Figura 1: Distribución anual de 24 casos de infecciones invasoras por <i>L. monocytogenes</i> en el Hospital Militar de Santiago. 1991-2012	5
Figura 2: Organización transcripcional y física del grupo de genes de virulencia (LIPI-1) de <i>Listeria monocytogenes</i> .	9
Figura 3: Ciclo de patogenicidad de <i>Listeria monocytogenes</i>	12
Figura 4: Ciclo de patogenicidad de <i>Listeria monocytogenes</i> . Proceso de invasión de las células adyacentes	13
Figura 5: Evolución del grupo de genes de virulencia LIPI-1 en el género <i>Listeria</i>	17
Figura 6: Amplificación de factores de virulencia <i>L. monocytogenes</i>	26
Figura 7: Amplificación isla de patogenicidad de <i>L. monocytogenes</i> en cepas aisladas desde alimentos y de casos clínicos	27
Figura 8: Restricción del fragmento amplificado de la isla de patogenicidad de <i>Listeria monocytogenes</i> con las enzimas <i>HaeIII</i> y <i>PvuII</i> .	28
Figura 9: Árbol de similitud en relación a los perfiles de restricción (software Treecon). Presenta la identificación de los Linajes y la cantidad de cepas para cada uno de ellos.	30
Figura 10: Árbol de similitud en relación a los perfiles de restricción (software Treecon). Presenta la formación de cluster con sus respectivos % de similitud.	31

RESUMEN

Listeria monocytogenes es el agente causal del cuadro clínico denominado Listeriosis. Esta enfermedad puede manifestarse como una gastroenteritis febril que generalmente es autolimitada, o bien, en su forma más severa e invasiva que se manifiesta como meningitis, meningoencefalitis e infecciones materno fetales.

La patogenicidad de *Listeria monocytogenes* se relaciona principalmente con una isla de patogenicidad (LIPI-1) que contiene seis genes (*prfA*, *hly*, *plcA*, *plcB*, *mpl* y *actA*), que codifican para factores de virulencia implicados en la infección causada por la bacteria a nivel celular. Sin embargo, se desconoce cuál de estos factores tiene mayor importancia o puede ser considerado de mayor riesgo en el desarrollo de la enfermedad, ya que se ha observado que tanto cepas aisladas desde alimentos, reservorios animales, ambientales y de casos clínicos, poseen todos los genes de virulencia que conforman la isla.

Por otro lado, los datos epidemiológicos indican que no todas las cepas de *L. monocytogenes* tienen la misma capacidad de producir enfermedad, observándose que en el 98% de los casos de listeriosis en humanos, los serotipos implicados son sólo 4 de los 13 descritos (1/2a, 1/2c, 1/2b y 4b). Así mismo, en base a distintos estudios genéticos y de subtipificación existirían tres grandes linajes que agruparían a

las cepas de *L. monocytogenes* de acuerdo a sus serovariedades, pudiendo establecerse también una relación entre aquellas capaces de producir infección en humanos y las que se aíslan desde ambientes.

El objetivo de este trabajo fue estudiar la variabilidad genética de la isla de patogenicidad (LIPI-1) en cepas de *L. monocytogenes* obtenidas desde alimentos y desde casos clínicos. Se trabajó con 96 cepas aisladas previamente desde diferentes alimentos (Fondecyt, 11075051) y con aislamientos clínicos obtenidos desde el Instituto de Salud Pública y que fueron colectados entre los años 2008 y 2009. Se diseñaron partidores dirigidos a los extremos de la isla de patogenicidad para su detección por PCR. Posteriormente, se realizó digestión del fragmento amplificado de la Isla LIPI-1, utilizando las enzimas de restricción *PvuII* y *HaeIII*, y finalmente se estudió la variabilidad genética entre las cepas de los distintos orígenes, a través de un análisis de similitud genética en base a la presencia o ausencia de los fragmentos de restricción obtenidos para cada cepa, los cuales fueron analizados con el Software Treecon para la elaboración de un dendrograma.

La amplificación del fragmento de la isla de patogenicidad LIPI-1 se obtuvo en 96 cepas analizadas, de las cuales sólo en 73 se logró obtener un perfil de restricción al realizar la digestión con *HaeIII* y *PvuII*. Se pudo inferir que existe variabilidad genética de la isla LIPI-1, obteniéndose varios perfiles de restricción distintos, dentro de los cuales se observan claramente 3 "cluster".

Dentro del "cluster" I se incluyen 47 aislamientos de origen clínico y de alimentos, correspondientes mayoritariamente al serotipo 4b y 1/2b (linaje genético II), que se relacionan genéticamente con sobre un 80% de similitud y donde puede observarse un grupo clonal (100% similitud) formado por 32 aislamientos de alimentos y de origen clínico relacionados con brotes de listeriosis ocurridos en Chile durante los años 2008 y 2009, y que mayoritariamente pertenecen al serotipo 4b. Los "cluster" II y III agrupan a un menor número de cepas también de ambos orígenes, que corresponden a los linajes genéticos I y II, respectivamente, en donde aparecen los serotipos 1/2a y 1/2b que también son descritos como causantes de casos clínicos en humanos, pero referidos más bien a casos esporádicos y no a brotes epidémicos. Por lo tanto, es posible que a través del análisis de variabilidad genética de la Isla LIPI-1 se puedan establecer patrones de restricción característicos de cepas que potencialmente pueden ocasionar listeriosis en humanos y pueden dar cuenta del grado de virulencia de las mismas.

1. INTRODUCCION

1.1. ANTECEDENTES GENERALES.

El género *Listeria* está compuesto por pequeños bacilos Gram positivos de extremos redondeados con 0,4-0,5 μm de diámetro y 0,5-2 μm de longitud. No forman cápsulas ni esporas y son anaerobios facultativos. Gracias a unos pocos flagelos periticos, son móviles a 20-25°C aunque no a 37°C (Swanson & Baer, 1995).

Son capaces de crecer en un amplio rango de temperaturas, entre 1 y 43°C, si bien su temperatura óptima de crecimiento está comprendida entre 30 y 37°C. Toleran condiciones de acidez y de alcalinidad, siendo capaces de crecer entre pH 5,5 y pH 9,6, aunque el crecimiento óptimo se produce a pH neutro o ligeramente alcalino (Sun, *et al.*, 1990).

L. monocytogenes se caracteriza por ser un microorganismo psicrótrofo y por lo tanto, se desarrolla a temperaturas de refrigeración y sobrevive a condiciones ambientales adversas (Sun, *et al.*, 1990).

Esta capacidad para crecer en un amplio rango de condiciones puede explicar que las bacterias pertenecientes a este género estén ampliamente distribuidas en la naturaleza. Se han aislado tanto del suelo como de aguas residuales, de vegetales en descomposición, de heces animales, de salas de mataderos así como de alimentos frescos, ahumados y congelados (Sanchez-Campillo, *et al.*, 1996).

De las seis especies que pertenecen al género *Listeria*, tres, *L. monocytogenes*, *L. seeligeri* y *L. ivanovii*, son β -hemolíticas en agar con 5% vol/vol de sangre de caballo o cordero. *L. monocytogenes* y *L. seeligeri* presentan un pequeño halo de hemólisis alrededor de las colonias que, en numerosas ocasiones, es difícil de observar de tal forma que se hace necesario retirar la colonia para poder detectarlo (Cossart, 2002). Por el contrario, *L. ivanovii* presenta un amplio doble halo de β -hemólisis. Para diferenciar más claramente entre estas especies se utiliza un test de potenciación de su actividad hemolítica con *Staphylococcus aureus* productor de β -hemolisina (esfingomielinasa C) y *Rhodococcus equi*, denominado test de CAMP (Collins, *et al.*, 1991).

La primera descripción de *L. monocytogenes* data de 1926 y se debe a un brote espontáneo de infección septicémica ocurrida en 1924 entre animales de laboratorio en la Universidad de Cambridge (Reino Unido). El proceso se caracterizaba por una leucocitosis mononuclear y lesiones necróticas en el hígado, por lo que se propuso el nombre de *Bacterium monocytogenes* para el microorganismo responsable. En 1927,

Pirie, estudiando la “Tiger river disease” del gerbo en África del Sur, que cursaba con focos hepáticos de necrosis, aisló una bacteria a la que llamó *Listerella hepatolytica*.

Desde la publicación de la clásica revisión titulada “*Listeria monocytogenes* and listerial infections” en la que se resumía el escaso conocimiento acumulado acerca de este grupo de bacterias en la década del 60, se produjo un aumento en el interés por este patógeno, especialmente con motivo de la aparición, a partir de los años ochenta, de importantes brotes de listeriosis humana que, aunque de reducida morbilidad, producían una elevada mortalidad (Gregory, *et al.*, 1996). Fue precisamente a raíz de estos brotes cuando se pudo demostrar por primera vez, sin ambigüedad, una asociación entre la infección humana y el consumo de alimentos contaminados con *L. monocytogenes* (Skalka, *et al.*, 1982).

Actualmente la listeriosis es una de las infecciones de origen alimentario que causan más preocupación tanto a las administraciones de la Salud Pública como a la industria alimentaria, por el incremento en la incidencia y el gran impacto económico de brotes epidémicos asociados al consumo de alimentos contaminados con *L. monocytogenes*. La emergencia de la listeriosis en la actualidad puede ser el resultado de complejas interacciones entre diversos factores como:

- (i) progresos médicos que han producido un cambio demográfico, incrementando la proporción de población de edad avanzada e inmunocomprometida;
- (ii) cambios en el sistema de producción primaria de alimentos (producción a gran escala de materias primas, modificación de las técnicas de procesado de los alimentos, expansión de la industria alimentaria y desarrollo de sistemas de almacenamiento en frío);
- (iii) modificaciones en los hábitos de alimentación (incremento en la demanda por parte de los consumidores de alimentos listos para comer, precocinados, refrigerados o congelados pero con un mínimo requerimiento de tiempo de cocinado antes de su consumo);
- (iv) realización de la compra una vez a la semana.
- (v) Variabilidad genética que hace que unas cepas puedan ser más virulentas o resistentes a condiciones adversas que otras.

Entre los años 1991 y 2012 en nuestro país fueron identificados un total de 25 casos, en 23 de ellos (92%) se pudo acceder a la ficha clínica para un análisis más detallado. De los dos casos restantes, en uno se contó con una identificación demográfica y año de aislamiento y fue considerado en la distribución de aislamientos por año para propósitos epidemiológicos. En el caso restante, no se obtuvieron datos. En la Figura 1 se presenta la distribución de casos por año. El 70% de los casos se concentró entre los años 2003 y 2012 (Sedano, *et al.*, 2013).

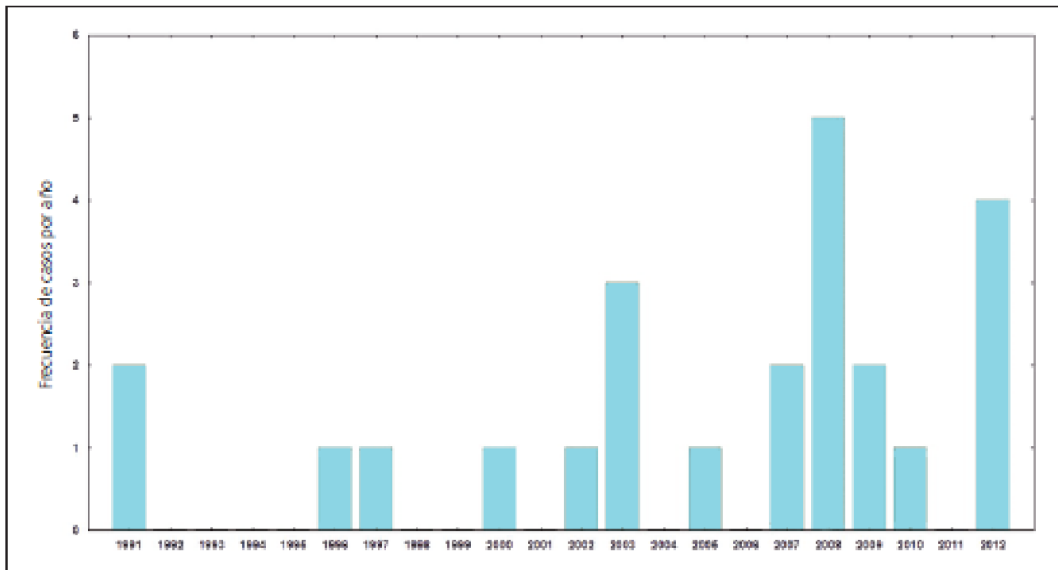


Figura 1: Distribución anual de 24 casos de infecciones invasoras por *L. monocytogenes* en el Hospital Militar de Santiago. 1991-2012

1.2. EPIDEMIOLOGÍA

A pesar de presentarse con una baja frecuencia, en la actualidad la listeriosis es una de las Enfermedades Transmitidas por Alimentos (ETAs), más letales conocidas causando gran alarma a nivel mundial a productores de alimentos, consumidores y autoridades sanitarias.

Esta preocupación a través de los años ha ido en aumento, ya que tanto investigadores como autoridades de la salud han llegado a la conclusión que no es posible su completa eliminación a nivel de plantas procesadoras de alimentos (Thimothe, *et al.*, 2004), por lo cual deberán extremarse las medidas para su control tanto a nivel industrial y comercial como también en el hogar.

Durante los últimos diez años, en EEUU y Europa han ocurrido brotes de ETA cuyo origen han sido en su mayoría alimentos cárnicos y lácteos. Estos eventos obligaron a retirar del mercado un gran volumen de productos alimenticios, como medida preventiva para proteger a la población. En Chile sólo a partir del año 2008 ha habido informes de brotes de listeriosis transmitidas a través de los alimentos, si bien ya había sido diagnosticada su presencia en casos clínicos (MINSAL, 2009).

En la población existen grupos más sensibles a contraer la listeriosis, por ejemplo las mujeres embarazadas donde la enfermedad provoca abortos espontáneos, nacimientos prematuros y mortinatalidad; los pacientes inmunodeprimidos por tratamientos contra el cáncer, trasplantados, enfermas de SIDA y ancianos; en quienes se da un cuadro invasivo con infección sistémica, septicemia y encefalitis (Rossi, *et al.*, 2008).

En personas que no pertenecen a los grupos de riesgo o que consumen antiácidos regularmente, una infección elevada de *L. monocytogenes* causa cuadros de gastroenteritis febriles leves similares a una gripe. Estos síntomas también los presentan las mujeres embarazadas al contraer la enfermedad. El número de células bacterianas que deben ingerirse para que se presente el cuadro aún no está claramente definido, pero se ha establecido que al consumir un alimento que contenga menos de 100 UFC/g, no debería presentarse el cuadro en individuos que no pertenecen al grupo de riesgo. El período de incubación para la presentación de los síntomas varía desde algunos días hasta tres meses (Vivas, 1999; Mortarjemi, 2002).

Los antecedentes epidemiológicos muestran que la enfermedad se presenta en forma de casos esporádicos, así como también de brotes de listeriosis invasiva, con una frecuencia de 3 a 8 casos por 1.000.000 habitantes. Se le considera una ETA de baja frecuencia pero de alta mortalidad, causando la muerte de un 20 a un 30% de las personas infectadas (Mortarjemi, 2002).

En ocasiones, la frecuencia aumenta y en esos casos es generalmente atribuible a algún alimento específico. Esta es la situación del brote ocurrido en Chile el año 2008, que se debió al consumo de una determinada marca de queso blando y que tuvo como consecuencias 124 personas afectadas, 5 de ellas con resultado de muerte (MINSAL, 2009).

1.2.1. Serovariedades de *L. monocytogenes*

El género *Listeria* comprende 6 especies: *L. monocytogenes*, *L. ivanovii*, *L. seeligeri*, *L. innocua*, *L. welshimeri* y *L. grayi*. Dos de ellas, *L. monocytogenes* y *L. ivanovii* son potencialmente patógenas de animales incluido el hombre (Bell & Kyriakides, 1998).

De estas especies, todas las cepas de *L. monocytogenes* se consideran virulentas para el hombre, aunque la virulencia es variable entre una cepa y otra. Se reconocen 13 serovares. En el 90% de los casos clínicos de listeriosis, los serotipos involucrados son el 4b, 1/2b y 1/2a. Sin embargo, es el serovar 4b, quien causa el 50 % de estos casos alrededor del mundo, lo cual sugiere que las cepas del serotipo 4b, estarían más adaptadas que las cepas del serogrupo 1/2 a los tejidos de hospederos mamíferos. Las cepas aisladas desde alimentos pertenecen a los grupos antigénicos 1/2a, 1/2b y 1/2c (Boerlin & Piffaretti, 1991).

1.3. FISIOPATOLOGÍA DE LA INFECCIÓN

1.3.1. Características clínicas

La listeriosis puede presentarse principalmente en dos formas clínicas: la listeriosis perinatal y listeriosis en el paciente adulto, donde los signos clínicos de la infección son muy similares en todos los casos. A pesar que *L. monocytogenes* es un patógeno capaz de atravesar las barreras digestiva, placentaria y nerviosa, la forma clínica predominante es una infección diseminada o local en el sistema nervioso central (SNC) (Vazquez-Boland, *et al.*, 2001)

1.3.2. Listeriosis neonatal

Esta forma se presenta por la invasión del feto vía transplacentaria y puede ocasionar aborto (generalmente a los 5 meses de gestación), alumbramiento prematuro o bien un recién nacido con una infección generalizada conocida como granulomatosis infantiséptica, que se caracteriza por la presencia de microabscesos pyogranulomatosos diseminados por todo el cuerpo del recién nacido. En la madre esta infección es generalmente asintomática o puede presentarse como un síndrome gripal leve (flu-like), con fatiga, dolor muscular y dolor de cabeza (Schuchat, *et al.*, 1991).

La listeriosis postnatal aunque es menos frecuente (10-15%), se presenta de 1-8 semanas post parto e incluye un síndrome febril acompañado de meningitis y en algunos casos gastroenteritis y neumonía. Ésta forma de infección puede tener secuelas importantes como hidrocefalia o retraso psicomotor (Vazquez-Boland, *et al.*, 2001).

1.3.3. Listeriosis en adultos

En esta forma de listeriosis la afectación al SNC es la más importante. Esta infección generalmente se desarrolla como una meningoencefalitis acompañada de cambios severos en la conciencia, desordenes motores y en algunos casos, parálisis de los nervios craneales. Esta forma encefálica es bifásica, en la primera fase se presenta un síndrome subfebril que dura de 3 a 10 días, en el cual, se puede presentar dolor de cabeza, vómito, desordenes visuales y malestar general. En la segunda fase se dan signos severos de romboencefalitis (Schlech, *et al.*, 1983; Vazquez-Boland, *et al.*, 2001).

La listeriosis puede también presentarse en forma de bacteremia o septicemia y en otras formas clínicas atípicas de la infección como miocarditis, neumonía, pleuritis,

hepatitis, colecistitis, peritonitis; siendo el síndrome gastroentérico febril la principal manifestación clínica de la infección, con síntomas como vómito, diarrea y fiebre (Dalton, *et al.*, 1997).

1.3.4. Patogénesis

Debido a que los alimentos contaminados son la principal fuente de infección, tanto en epidemias como en casos esporádicos, se piensa que tras haber superado la acidez del estómago, el sitio primario de entrada del patógeno al huésped es el tracto gastrointestinal. El curso clínico de la infección comienza alrededor de 20 horas después de haber ingerido el alimento contaminado (Riedo, *et al.*, 1994).

También se ha sugerido que la invasión del SNC puede producirse directamente a partir de lesiones en la mucosa bucal, desde donde el microorganismo puede acceder a las terminaciones de los nervios trigémino o facial, ascendiendo hasta alcanzar el tronco del encéfalo.

L. monocytogenes es un patógeno intracelular capaz de multiplicarse en varios tipos de células (fagocíticas y no fagocíticas). Además, tiene la habilidad de atravesar la barrera intestinal, placentaria y hematoencefálica durante su infección. Una vez que ha atravesado la barrera intestinal, *L. monocytogenes* comienza su multiplicación en las células fagocíticas adyacentes a las placas de Peyer para posteriormente trasladarse mediante la vía linfática y circulación sanguínea al hígado y bazo, los cuales constituyen los órganos blanco primarios de la infección (Schuchat, *et al.*, 1991; Vazquez-Boland, *et al.*, 2001).

1.3.5. Patogenicidad y virulencia

Cuando se habla de bacterias patógenas, se hace referencia a aquellas bacterias que dañan las células y tejidos del organismo hospedero, con el cual han establecido una relación simbiote de parasitismo. Para la mayoría de las bacterias patógenas, la capacidad para generar daño (patogenicidad), está determinada por varias características estructurales y metabólicas propias de cada especie o grupo bacteriano, que en su conjunto reciben el nombre de factores de virulencia. Por ejemplo, la cápsula que poseen algunas bacterias, favorece la adhesión a epitelios y es el punto inicial para colonizar un tejido e iniciar una infección, y por lo tanto, es considerada un factor de virulencia.

Al igual que para la mayoría de las bacterias, la virulencia de *L. monocytogenes* es multifactorial, ya que su capacidad para crecer intracelularmente está determinada por enzimas como catalasa y superóxido dismutasa; compuestos de hierro, componentes estructurales de la superficie celular, producción de hemolisinas y otros

compuestos que inducen la actividad productora de monocitocis y promueven la actividad inmunosupresora (Dussurget, *et al.*, 2004).

1.4. GENERALIDADES DE LIPI-1 Y DE SUS GENES CONSTITUYENTES

Se ha determinado que los factores de virulencia se encuentran codificados a nivel cromosomal (Noriega R, *et al.*, 2008; Barbuddhe & Chakraborty, 2009). Sin embargo, Den Bakker, *et al.*, (2012) presentaron el primer informe de un potencial plásmido de virulencia en *L. monocytogenes*, en el cual se identificaron genes que codifican proteínas de la familia de Inl. Al eliminar el plásmido no se detectaron diferencias, entre la eficiencia en la invasión de células epiteliales, entre la cepa curada en comparación con la cepa silvestre.

En 1991, Farber & Peterkin, señalaron la producción de una hemolisina soluble por *L. monocytogenes*. Desde entonces, diversas sustancias se han considerado como factores de virulencia, entre los cuales destacan: internalinas, listeriolisina O, fosfolipasas C, proteína Act A, entre otras.

Los genes que codifican los factores de virulencia de *L. monocytogenes* se agrupan en una isla de patogenicidad llamada LIPI-1 (Figura 2). La isla contiene los 6 principales genes de virulencia, divididos en tres grupos: el monocistrón *hly*, el operón lecitinasa (*mpl*, *actA* y *plcB*) y el operón *plcA-prf*. El gen *hly* codifica la listeriolisina O, los genes *plcA* y *plcB* codifican las fosfolipasas C respectivas; mientras que, los genes *mpl*, *actA* y *prfA* codifican para una metaloproteasa, proteína que promueve la nucleación de actina y regulador transcripcional, respectivamente. LIPI-1 es controlado por el factor regulador positivo A (*prfA*) (Vazquez-Boland, *et al.*, 2001)

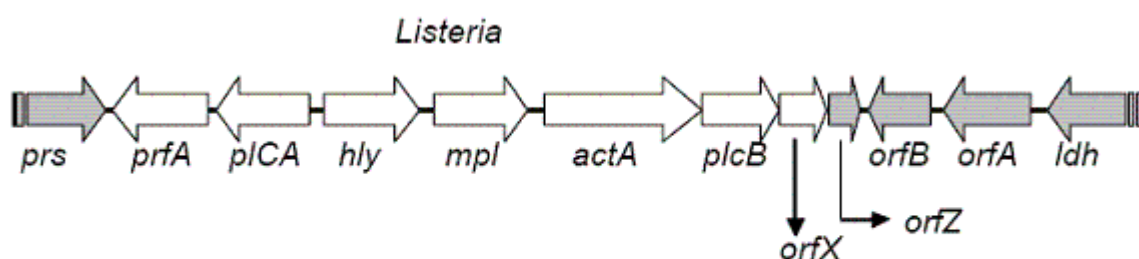


Figura 2: Organización transcripcional y física del grupo de genes de virulencia (LIPI-1) de *Listeria monocytogenes*. Modificado de Vazquez-Boland, *et al.*, (2001).

El monocistrón *hly*, codifica para la listeriolisina O, esta hemolisina fue el primer y más importante factor de virulencia demostrado en la patogénesis de la infección por *Listeria* (Tang, *et al.*, 1996). Tiene actividades citotóxicas sobre las células fagocíticas a pH relativamente bajos, entre 4.5 a 6.5 y es inhibida por el colesterol (Tang, *et al.*,

1996). Además, la listeriolisina O es capaz de modular la señalización de internalización vía calcio y expresión de citocinas en macrófagos (Tang, *et al.*, 1996), desgranular y formar leucotrienos en neutrófilos (Sibelius, *et al.*, 1999), producir apoptosis en células dendríticas (Guzman, *et al.*, 1996).

La activación del operón de lecitinasa da como resultado la transcripción de los genes *mpl*, *plcB* y *actA*. El gen *mpl*, codifica para una metaloproteasa dependiente de zinc involucrada en el procesamiento de las fosfolipasas. En el caso del gen *plcB*, este codifica para una hemolisina con actividad de fosfolipasa C, al igual que el gen *plcA*, el cual no está integrado en este operón. *plcB*, codifica para una fosfolipasa con actividad específica sobre la fosfatidil colina, también conocida como lecitinasa, mientras *plcA* codifica para una fosfolipasa con actividad específica sobre el fosfatidil inositol. Ambas hemolisinas ayudan a la liberación de *L. monocytogenes* del fagosoma mediante la hidrólisis de los fosfolípidos de la membrana fagosomal. El último gen de este operón (*actA*), codifica para una proteína denominada *ActA*, la cual, toma la actina del citoesqueleto de la célula huésped y lo polimeriza en colas de fibras cortas de actina, ocasionando con esto, la movilidad de la bacteria en el citoplasma célula y la invasión de las células adyacentes (Dussurget, *et al.*, 2004).

Se han identificado diversos determinantes moleculares de virulencia que juegan un papel en la infección celular por *L. monocytogenes* y el hecho de que todavía no sea conocido su mecanismo de acción, hace de *L. monocytogenes* uno de los modelos más interesantes de interacción patógeno-hospedador, tanto a nivel celular como molecular. Estos determinantes de virulencia comprenden:

a) Internalinas; son proteínas de superficie cuya estructura molecular presenta regiones LRR (repeticiones ricas en leucina) en su extremo N-terminal. Interactúan con receptores celulares específicos (E-cadherinas) para facilitar su ingreso o internalización a la célula huésped. Se han identificado 8 clases de internalinas, pero las mejor caracterizadas son la internalina A y la internalina B. La internalina A consta de 800 aminoácidos con 15 regiones LRR y la internalina B contiene 630 aminoácidos con 7 regiones LRR (Navarre & Schneewind, 1999).

La E-cadherina es una glucoproteína de adhesión intercelular dependiente de calcio, se expresa en diversas células de mamíferos (enterocitos, hepatocitos, células M, células dendríticas y células endoteliales) y constituye el receptor de la internalina A. El receptor de internalina B no se ha identificado, pero se conoce que contiene el sitio catalítico de una tirosinocinasa (Navarre & Schneewind, 1999).

b) Listeriolisina O: es una proteína de 52 KDa, integrante del grupo de toxinas dependientes de colesterol (CDTx), las cuales típicamente conservan el

undecapéptido en su región C-terminal con un residuo de cisteína que le confiere capacidad de formar puentes disulfuro con otras moléculas. La Listeriolisina O es una hemolisina producida por *L. monocytogenes* que se correlaciona con su patogenicidad (Gedde, *et al.*, 2000).

La listeriolisina O se activa a pH ácido (de 4,5 a 6,5) y baja concentración de hierro. Esta hemolisina actúa sobre el colesterol de la membrana vacuolar primaria, provocando su ruptura y liberación de listerias al citoplasma, además facilita la acción de las fosfolipasas C en la digestión de la vacuola secuencia N-terminal de 29 aminoácidos, semejante a la secuencia PEST de las proteínas humanas, para evitar el daño ulterior de membranas (Gedde, *et al.*, 2000).

c) Fosfolipasas C: son un grupo heterogéneo de enzimas que actúan sobre la cabeza polar de los fosfolípidos, a nivel del enlace fosfodiéster formado entre el 1,2-diácil-glicerol y el grupo fosfatidil. En las cepas de *Listeria* y otros microorganismos, son factores de virulencia que tienen acción directa sobre las membranas y en forma indirecta, a través de sus productos metabólicos, como inductores de la polimerización actínica, segundos mensajeros e iniciadores de eventos catalíticos (Gedde, *et al.*, 2000).

d) Proteína Act A: es una proteína bacteriana de superficie, semejante a las proteínas involucradas en la organización del citoesqueleto. En su forma madura contiene 610 aminoácidos divididos en tres dominios: N-terminal (1-233), región central rica en prolina (234-395aa) y C-terminal (396-610) (Goldberg, 2001).

La proteína Act-A induce la formación de polímeros de actina (G-F) en el citoesqueleto de la célula huésped. Las proteínas de unión entre la actina de la célula huésped y la proteína bacteriana Act-A son profilina, complejo Arp2/3 y proteína estimulante de vasodilatación (VASP). La polimerización de actina incluye los pasos de nucleación, elongación e intercambio, y se desarrolla de manera asimétrica, formando una “cola de cometa” que transporta las listerias mediante propulsión en dirección polar hacia una célula adyacente. Este particular mecanismo de motilidad intracelular permite que las listerias migren y alcancen las células adyacentes para diseminarse de célula en célula (Goldberg, 2001).

1.4.1. Ciclo Intracelular

El ciclo intracelular de *L. monocytogenes* comienza con la adherencia a la superficie de la célula eucariota, seguida de la invasión de la bacteria dentro de la célula huésped, con el fin de establecerse en el tejido y colonizarlo eficientemente, logrando así producir la enfermedad (Vazquez-Boland, *et al.*, 2001).

1.4.2. Adherencia e invasividad

L. monocytogenes es capaz de atravesar la barrera intestinal e invadir otros tejidos mediante la inducción de su propia endocitosis. La adherencia de la bacteria a la célula huésped, se lleva a cabo mediante el reconocimiento de diferentes receptores celulares como son: los receptores de -D galactosa, receptores de las fracciones C1Q, C3bi del complemento, y algunos componentes de la matriz extracelular (Vazquez-Boland, *et al.*, 2001). Además, 2 proteínas de 80 y 60 KDa denominadas Internalina y proteína p60 respectivamente, parecen estar involucradas en la entrada e invasividad del patógeno a su célula huésped (Farber & Peterkin, 1991).

1.4.3. Crecimiento intracelular y propagación celular

La virulencia de la cepa y la activación de los macrófagos son factores determinantes para la sobrevivencia de *L. monocytogenes* en la célula huésped (Figura 3). La secreción de la hemolisina, conocida como Listeriolisina O (LLO), como factor de virulencia no es necesaria para el crecimiento dentro de los tejidos del huésped, sin embargo, sí permite el escape de la bacteria a través de la membrana del fagosoma, permitiendo con ello el crecimiento y replicación de *L. monocytogenes* en el citoplasma celular (Vazquez-Boland, *et al.*, 2001).

a. *L. monocytogenes* induce su entrada a fagocitos.
b. La bacteria es internalizada en una vacuola (también conocida como fagosoma).
c, d. La membrana de la vacuola es lisada por la secreción de dos fosfolipasas, PlcA y PlcB, y la toxina formadora de poros listeriolisina O. La bacteria es liberada en el citoplasma, donde se multiplican y comienzan a polimerizar colas de actina,
e. La polimerización de actina permite que las bacterias se diseminen a células vecinas, mediante la formación de protuberancias en la membrana plasmática. f. A la entrada de las células vecinas, la bacteria presenta una vacuola con doble membrana, de la cual puede escapar para repetir el ciclo. Se muestran, además, micrografías electrónicas de los procesos descritos.

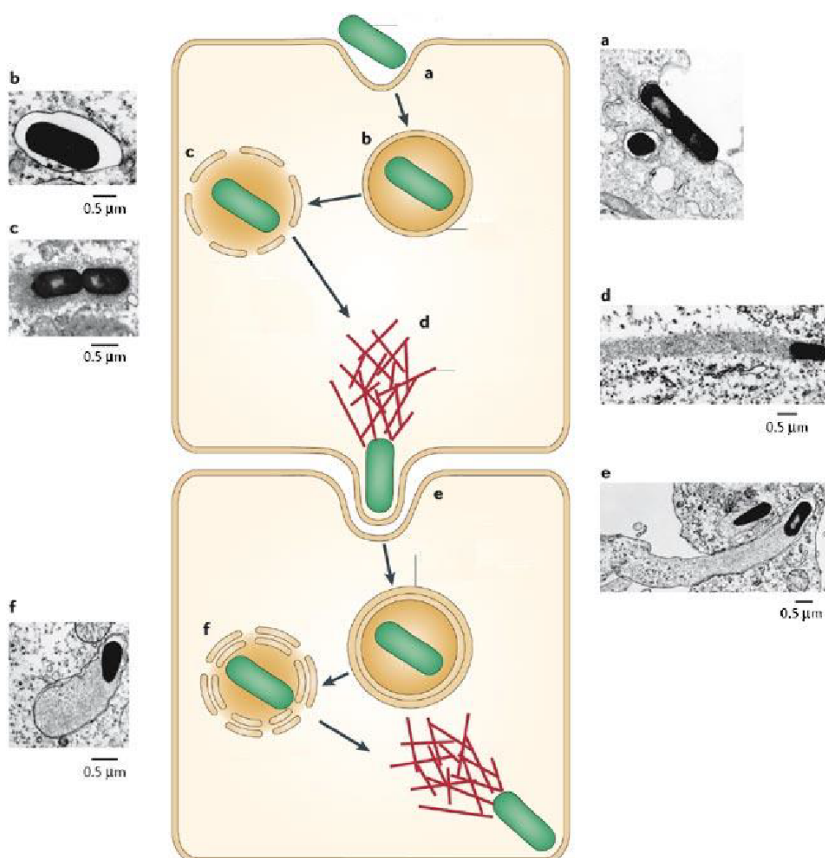


Figura 3: Ciclo de patogenicidad de *Listeria monocytogenes*. (Fuente: Vazquez-Boland, *et al.*, 2001).

Una vez en el citoplasma, *L. monocytogenes* comienza a desplazarse en el interior de la célula mediante la polimerización de la actina celular en largos tallos que la

impulsan incluso hacia células adyacentes (Figura 4.), evitando de esta manera el contacto con efectores humorales del sistema inmunológico. Desde el momento en que el patógeno ha sido capaz de trasladarse a las células adyacentes, se vuelve a activar la síntesis de la Listeriolisina junto con la síntesis de enzimas con actividad de fosfolipasa C (*PlcA* y *PlcB*), que ayudan a *L. monocytogenes* a liberarse nuevamente del fagosoma y de esta manera propagarse a través de todo el tejido (Figura 3.) (Vazquez-Boland, *et al.*, 2001).

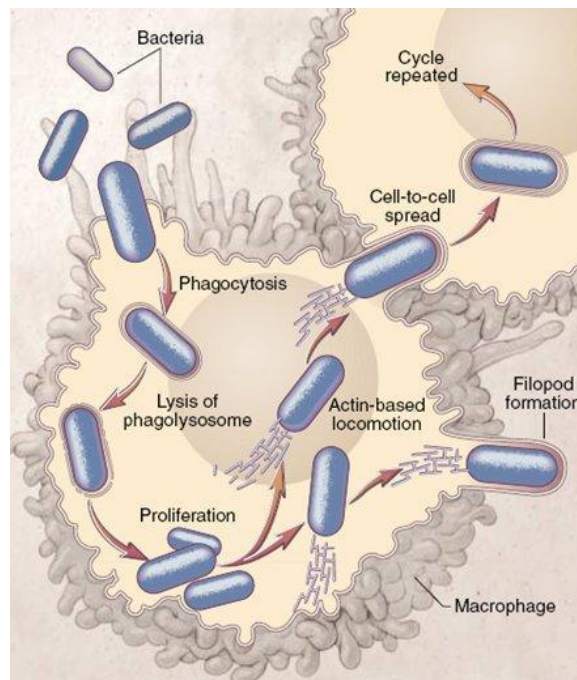


Figura 4: Ciclo de patogenicidad de *Listeria monocytogenes*. Proceso de invasión de las células adyacentes. (Fuente: Vazquez-Boland, *et al.*, 2001)

1.5. ENZIMAS DE RESTRICCIÓN

Un enzima de restricción (o endonucleasas de restricción) es aquella que puede reconocer una secuencia concreta de nucleótidos en una molécula de ADN y cortarla en ese punto preciso, llamado sitio o diana de restricción. En ocasiones, la enzima reconoce una secuencia concreta, pero no corta en ese sitio, sino en otro más alejado. Los sitios de restricción poseen entre 4 y 12 pares de bases, cuya secuencia es reconocida por la enzima. Evidentemente, cuanto más larga sea la secuencia de reconocimiento, menos probable es que una molécula de ADN la posea. Por esta razón, las enzimas que reconocen 4 nucleótidos del ADN cortan con más frecuencia que los que reconocen 6 u 8 nucleótidos, o más.

1.5.1. Enzimas de Restricción *HaeIII* y *PvuII*

HaeIII

HaeIII es una enzima de restricción producida por *Haemophilus aegyptius* que posee una diana de restricción en el ADN de cadena doble dependiente de una secuencia no metilada palindrómica (se leen igual de izquierda a derecha que de derecha a izquierda) y no escalonada, sobre la cual su actividad catalítica hidrolasa genera extremos romos. La enzima rompe el ADN en la posición donde se encuentra la secuencia GGCC. El corte ocurre entre el segundo y el tercer nucleótido (G y C). Los fragmentos de ADN se conocen como fragmentos de restricción. *HaeIII* corta ambas cadenas de ADN en la misma localización. La desnaturalización por calor ocurre a los 80 C después de 20 minutos.

La diana de restricción puede representarse según el siguiente diagrama:

Sitio de reconocimiento	Resultado del corte
5' GGCC 3' CCGG	5' GG CC 3' CC GG

PvuII

PvuII es una enzima de restricción producida por *Proteus vulgaris*. No puede ser desnaturalizado por calor. La secuencia blanco de restricción puede representarse según el siguiente diagrama:

Sitio de reconocimiento	Resultado del corte
5' CAGCTG 3' GTCGAC	5' CAG CTG 3' GTC GAC

1.6. VARIABILIDAD GENÉTICA.

L. monocytogenes se caracteriza por tener una alta heterogeneidad en la virulencia, lo cual se ha identificado tanto en estudios *in vivo* como *in vitro*. Gran parte de las cepas son naturalmente virulentas y capaces de producir alta mortalidad; en cambio existen otras que son avirulentas e incapaces de establecer una infección dentro del hospedero (Olier, *et al.*, 2002). Las diferencias en la virulencia entre las cepas de *L. monocytogenes* pueden deberse a polimorfismos en las secuencias nucleotídicas de estos genes, debido a mutaciones puntuales y/o la presencia o ausencia de algún gen de virulencia (Temoin, *et al.*, 2008).

LIPI-1 se encuentra insertada, establemente, en el cromosoma, en la misma posición en todas las especies. Tiene una composición de ADN similar a la del genoma de *Listeria*, no se han detectado elementos genéticos que favorezcan su movilidad (integrasas, transposasas, secuencias de inserción), como así también, factores de integración como repeticiones directas y ARN de transferencia (ARNt). Por lo tanto, esta isla es conservada en *L. monocytogenes* puesto que es indispensable para la colonización del hospedero (Schmidt & Hensel, 2004). Los genes *inIA* y *inIB* no se encuentran codificados en LIPI-1, sino que se han asociado a operones policistrónicos, las cuales también han sido identificados en otras especies de *Listeria*.

Análisis filogenéticos basados en el RNA ribosomal 16S (RNAr 16S) y 23S (RNAr 23S) han revelado que el género *Listeria* comprende dos grupos evolutivos, uno relativamente distante y que corresponde a *L. grayi* y el otro que incluye por un lado *L. monocytogenes* (patógena) y *L. innocua* (no patógena) y por el otro a *L. ivanovii* (patógena), *L. seeligeri* y *L. welshimeri* (no patógenas) (Figura 5) (Vazquez-Boland, *et al.*, 2001).

L. ivanovii desarrolla un ciclo de vida intracelular similar a *L. monocytogenes* ya que lleva una copia de LIPI-1. Las estructuras genéticas de LIPI-1 de *L. monocytogenes* y *L. ivanovii* son idénticas, pero las secuencias de ADN exhiben únicamente un 73 a un 78% de similaridad, un grado de divergencia compatible con la distancia genética que separa ambas especies (Figura 5) (Vazquez-Boland, *et al.*, 2001).

LIPI-1 no está presente en el genoma de las especies no patogénicas del género *Listeria*, a excepción de *L. seeligeri* en la cual hay una disrupción de la autoregulación positiva en el proceso de activación del LIPI-1 (Barbuddhe & Chakraborty, 2009; Vazquez-Boland, *et al.*, 2001).

El resultado de LIPI-1 en cada una de las dos líneas de descendencia es importante en la diversificación posterior del género; estabilización en *L. monocytogenes* y *L. ivanovii*; delección temprana en *L. innocua* y *L. welshimeri* e inactivación funcional en *L. seeligeri* (Vazquez-Boland, *et al.*, 2001).

1.6.1. LINAJES GENETICOS

El análisis filogenético de múltiples genes (Meinersmann, *et al.*, 2004) permite agrupar a las cepas de *L. monocytogenes* en tres grandes grupos genéticos denominados linajes I, II y III (Meinersmann, *et al.*, 2004; Nadon, *et al.*, 2001; Sauders, *et al.*, 2006; Wiedmann, 2002). Los serotipos 1/2b, 3b, 4b, 4d y 4e se encuentran normalmente en el linaje I, y son aislamientos de epidemias de origen alimentario en humanos y de casos esporádicos de listeriosis en animales y

humanos, mientras que el linaje genético II corresponde a los serotipos 1/2a, 3a, 1/2c y 3c, aislamientos mayoritariamente de casos esporádicos de listeriosis en humanos (Nadon, *et al.*, 2001).

Esta clasificación filogenética de linajes sitúa a los tres serotipos mayoritarios en dos linajes diferentes: los serotipos 1/2b y 4b pertenecen mayoritariamente al linaje I y el serotipo 1/2a al linaje II. Se ha postulado que estos dos linajes representarían dos subespecies de *L. monocytogenes*. El linaje III, que incluye los serotipos 4a y 4c así como determinadas cepas de serotipo 4b (Liu, 2006), representa una unidad taxonómica más alejada y se ha postulado que podría representar una nueva especie. Las cepas del linaje III suelen tener características atípicas y son muy escasas en los alimentos y en las muestras clínicas, aunque se aíslan con cierta frecuencia en animales (Roberts, *et al.*, 2005). Los linajes predominantes, I y II, representan dos grupos evolutivos separados. Estudios realizados con cepas de *L. monocytogenes* procedentes de casos clínicos de listeriosis animal han mostrado que el linaje I es de naturaleza clonal, más citopatogénico, y se asocia predominantemente con casos de encefalitis, mientras que el linaje II es más diverso desde el punto de vista genético y se asocia por igual con los distintos cuadros clínicos del ganado (Pohl, *et al.*, 2006).

Todos estos resultados de caracterización de amplias colecciones de cepas de *L. monocytogenes* indican que existen distintos grupos de cepas genéticamente homogéneos que podrían tener diferente potencial patogénico (Pohl, *et al.*, 2006). Al combinar el estudio de los subtipos moleculares con el estudio de la citopatogenicidad de dos grandes grupos de cepas de origen humano y alimentario (Gray, *et al.*, 2004) se ha observado que los subtipos previamente relacionados con brotes de listeriosis y los incluidos en el linaje I son más frecuentes en las cepas de origen humano y poseen más capacidad citopatogénica. Estos subtipos podrían formar un grupo clonal con mayor virulencia, lo que también favorecería la hipótesis de que las cepas humanas y alimentarias forman poblaciones diferentes (Chou & Wang, 2006). Por otro lado, el linaje II podría ser un subgrupo de *L. monocytogenes* especialmente adaptado a las condiciones ambientales (Sauders, *et al.*, 2006). Existen subtipos moleculares en los alimentos que no aparecen en las muestras clínicas, y algunas cepas clínicas no se encuentran en los alimentos (Gilbreth, *et al.*, 2005). No obstante, y dado que la listeriosis humana es una enfermedad de transmisión alimentaria, es lógico que estas poblaciones se solapen y que en la cadena de producción de alimentos se encuentren algunos subtipos de *L. monocytogenes* asociados a casos esporádicos o epidémicos de listeriosis humana (Borucki, *et al.*, 2004; Sauders, *et al.*, 2004).

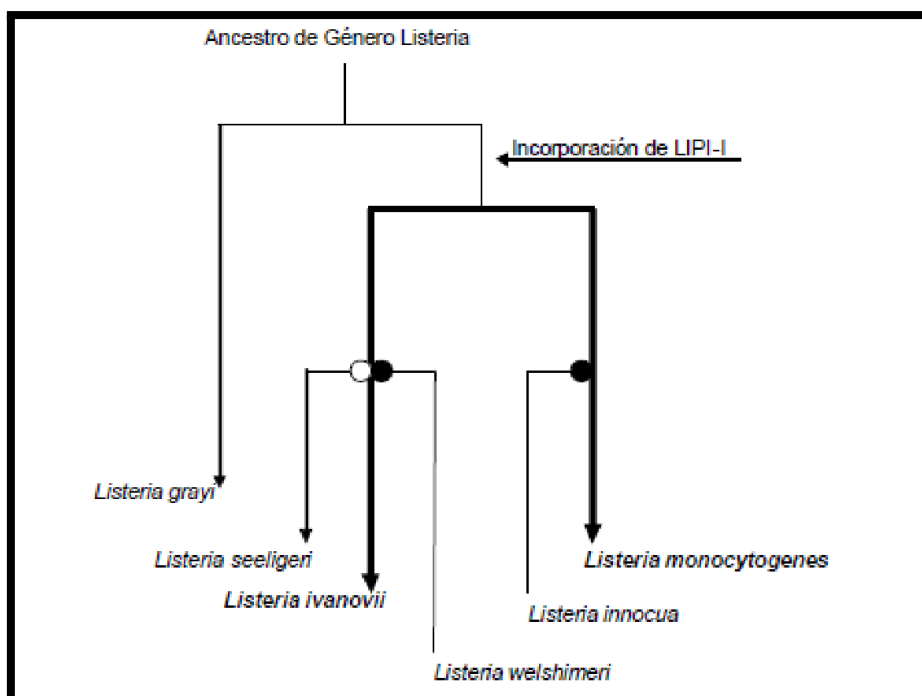


Figura 5: Evolución del grupo de genes de virulencia LIPI-1 en el género *Listeria*. La vía evolutiva seguida por LIPI-1 después de su adquisición por una línea de descendencia del ancestro común es indicada por flecha. Las líneas gruesas indican la conservación de una LIPI-1 funcional. Los círculos sólidos indican la pérdida de LIPI-1, conduciendo a especies no patogénicas (*L. innocua* y *L. welshimeri*). El círculo vacío indica la corrupción de LIPI-1, que conduce a una versión no funcional del grupo de virulencia (cabeza de flecha vacía) en la especie no patogénica *L. seeligeri*, *L. innocua* y *L. welshimeri* proviene de la excisión de LIPI-1 en las vías evolutivas correspondientes (Fuente: Modificado de Vazquez-Boland, *et al.*, 2001)

1.7. *L. monocytogenes* EN LA INDUSTRIA ALIMENTARIA.

La presencia del patógeno en materias primas como leche, carne, pescado y vegetales, refuerzan la necesidad de que las industrias procesadoras de estos alimentos establezcan barreras que minimicen su ingreso a los lugares de proceso. En particular en aquellos puntos donde el alimento no es sometido a un tratamiento que permita la destrucción del patógeno.

Es por ello, que las industrias tienen, o deberían tener barreras sanitarias al ingreso de las salas de proceso. Éstas consisten en un riguroso control del uniforme del personal, lavado de mano y reducción del tránsito de personas que ingresan al lugar donde se procesan alimentos.

Se ha determinado que *L. monocytogenes* ingresa a través de la vestimenta, el calzado, las manos de los operarios, como también con los utensilios, el equipamiento y los materiales utilizados (Jeong & Frank, 1994).

La contaminación cruzada, es decir, el contacto de los alimentos listos para el consumo con superficies o utensilios contaminados, es otra vía de contaminación.

Uno de los problemas que enfrenta la industria es que los productos químicos utilizados para higienizar superficies como el ácido peracético, amonios cuaternarios y compuestos clorados no garantizan la eliminación del patógeno o bien pierden su efectividad en presencia de materia orgánica, como es el caso del cloro. Este problema se ve agravado dado que *L. monocytogenes* forma biopelículas en superficies donde han quedado residuos orgánicos lo cual dificulta la acción de los higienizantes (Lunden, 2004).

Los tratamientos con calor son los más efectivos para eliminar a *L. monocytogenes*. En leche mediante la pasteurización (71,7°C durante 15 s) se obtiene una reducción de 3 a 4 órdenes de magnitud mientras que en carne a 70°C durante 2 min se logra reducir en 6 órdenes de magnitud (Bell & Kyriakides, 1998).

En la actualidad se estudian tratamientos no térmicos para el control de *L. monocytogenes* en alimentos. Entre estas técnicas está el uso de bacteriófagos específicos en contra de *L. monocytogenes* (Guenther, *et al.*, 2009), el uso de extracto de aceites vegetales como el romero, té verde u orégano (Theivendran, *et al.*, 2006) y la aplicación de bacterias lácticas productoras de bacteriocinas (Izquierdo, *et al.*, 2009).

El desafío para la industria alimentaria es mantener alejada a *L. monocytogenes* de los lugares donde se procesan o almacenan alimentos para el consumo. Para ello deben tenerse implementados rigurosos programas de limpieza y sanitizado y utilizar higienizantes o biocontroladores capaces de eliminar al patógeno, incluso cuando éste forma biopelículas. También se debe implementar el sistema HACCP (Sistema de Análisis de Peligros y de Puntos Críticos de Control), independiente del tamaño de la empresa.

2. HIPOTESIS

Cepas de *Listeria monocytogenes* aisladas de casos clínicos y de alimentos, presentan diferencias genéticas en la isla de patogenicidad LIPI-1.

3. OBJETIVOS

3.1. OBJETIVO GENERAL

Analizar la variabilidad genética de la isla de patogenicidad (LIPI 1) en cepas *Listeria monocytogenes* aisladas de alimentos y casos clínicos.

3.2. OBJETIVOS ESPECIFICOS

1. Estimar la variabilidad genética de la isla de patogenicidad LIPI-1 mediante análisis de restricción.
2. Establecer las relaciones de similitud genética entre las cepas aisladas mediante análisis de agrupamiento.

4. MATERIAL Y MÉTODOS

4.1. AISLAMIENTOS DE *Listeria monocytogenes*

Los aislados de *Listeria monocytogenes* analizados en este estudio, corresponden a cepas obtenidas desde alimentos (63) consumidos en la Región Metropolitana (Fondecyt, 11075051) y desde casos clínicos (40) (ISP). Todas las cepas fueron mantenidas en leche descremada 20%. En el transcurso de la investigación, debido a no crecimiento, se eliminaron 7 cepas clínicas, quedando finalmente para el estudio un total de 96 cepas.

4.1.1. Recuperación de los aislados de *Listeria monocytogenes*

Con el fin de verificar la pureza de los aislados mantenidos en leche descremada, cada cepa fue sembrada en caldo BHI (caldo cerebro corazón, 37 g/ 1L, Merck) e incubada a 37°C (Estufa Binder). Después de 18 – 24 h de incubación, cada cultivo fue resembrado en Agar TSA/YE (40g TSA + 6g YEST/ 1L, Merck), mediante agotamiento por estría en placa. Se incubó a 37°C por 18 – 24 h.

4.2. Cepas control

En este estudio se usó como cepa control *L. monocytogenes* ATCC 13932.

4.3. Aspectos de Bioseguridad.

La presente tesis fue realizada en la Sección Microbiología del laboratorio Sanitario Ambiental y Laboral de la SEREMI de SALUD de la Región Metropolitana. Este Laboratorio cuenta con la infraestructura necesaria para el trabajo con patógenos bacterianos, de acuerdo a las normas de seguridad exigidas por el Manual de Normas de Bioseguridad editado por Conicyt (versión 2008). Las bacterias del género *Listeria* se consideran patógenos de alto riesgo y se ubican en el nivel de bioseguridad 3. De acuerdo con esto, se cuenta con seis áreas independientes de trabajo: recepción de muestras, preparación y siembra de muestras, sala de estufas, sala de traspasos y lectura, sala de biología molecular, sala de lavado, preparación y esterilización de material. Específicamente, el área de preparación y siembra de muestras, corresponde a una sección de contención que posee accesos de seguridad y medidas para el control de acceso. Tanto en la sala de preparación de muestras como en la de biología molecular, se cuenta con campanas de flujo laminar y gabinetes de bioseguridad con filtros EPA y características técnicas que garantizan la bioseguridad del personal que las usa. Todo el material residual se autoclava en recipientes especialmente destinados para tal efecto y el proceso se lleva a cabo en

un equipo y en un sector de la sala de esterilización, específicamente destinado a la descontaminación de material.

4.4. TÉCNICAS DE BIOLOGÍA MOLECULAR

4.4.1. PCR para confirmar aislamientos de *Listeria monocytogenes*

Para confirmar que las cepas mantenidas en freezer a -70°C estuvieran puras se realizó una PCR múltiple dirigida a amplificar 4 factores de virulencia específicos de *Listeria monocytogenes* más el gen *prs*, común a todas las especies del género *Listeria*.

Tabla 1: Secuencias, tamaño y origen de los de partidores utilizados en este estudio.

Partidor*	Secuencia 5'-3'	Gen/Proteína	Tamaño
Inl 1A-F Inl 1A-R	GGCTGGGCATAACCAAATTA CTTTTGTTGGTGCCGTAGGT	inIA/Internalina A	629 pb
Inl 1B-F Inl 1B-R	CCTAACCTCCGACCAAACA CCATTTGCGGCTTCTCTATC	inIB/InternalinaB	293 pb
prfA3-F prfA2-R	AACGGGATAAAACCAAACAA CTATGTGCGATACCGCTTGA	prfA/Regulador transcripcional	506 pb
Hly2-F Hly2-R	TCTACCAATTGCGCAACAAA GCAGGAGGATTTTCTGCATT	hly/Listeriolisina	852 pb
Prs-F Prs-R	GCTGAAGAGATTGCGAAAGAAG CAAAGAAACCTTGGATTTGCGG	prs/Proteína común a todas las especies de <i>Listeria sp.</i>	370 pb
islaF islaR	CGAAACTGCTGGTGCAACTA TCGTTTGCAATCCCTTTTTC	isla LIPI-1	9,9 kb

* Partidores descritos por Boderó, (2010).

Extracción ADN bacteriano

La extracción del ADN genómico se realizó a partir de las colonias aisladas según se especifica en el párrafo 4.1.1. Cada colonia fue resuspendida en 150 μL de agua desionizada estéril hasta obtener una suspensión ligeramente turbia. Se agitó en vortex y luego las células fueron lisadas por ebullición (100°C durante 15 minutos), de acuerdo al programa "ROTUB" del termociclador MJ Research®. Después de homogenizar con vortex se repitió el programa. Finalmente se centrifugó por 3 minutos a 12.000 rpm. El lisado obtenido se mantuvo a 4°C hasta su uso como ADN blanco para PCR.

Preparación de la mezcla de PCR

Los volúmenes de la mezcla para cada muestra de PCR se especifican en la Tabla 2.

Tabla 2: Mezcla de reacción de PCR

Reactivo	1x (µL)	
Buffer 5X	5	Promega
MgCl ₂ 25mM	1.5	Promega
DNTPs 10 mM	0.5	
prs F 10 mM	0.5	
prs R 10 mM	0.5	
InIA1 F 10 mM	0.5	
InIA1 R 10 mM	0.5	
InI1B F 10 mM	0.5	
InIB1 R 10 mM	0.5	
prfA3 F 10 mM	1	
prfA2 R 10 mM	1	
hly2 F 10 mM	1	
hly2 R 10 mM	1	
Taq	0.1(*)	
H ₂ O	8.9	
DNA	2	
Total	25 µL	

Reacción de PCR

Para la realización de la PCR los tubos con la mezcla de reacción fueron dispuestos en el termociclador (MJ Reasearch®.) y se utilizó el programa "MULTILIS".

Ciclos del programa "MULTILIS"

Denaturación inicial:	94 °C por 3 minutos	} 35 ciclos
Denaturación:	94°C por 1 minuto	
Alineamiento:	57,3°C por 0,45 minutos	
Extensión:	72°C por 0,45 minutos	
Extensión final:	72°C por 7 minutos	
Temperatura final:	4°C indefinido	

Las muestras amplificadas se mantuvieron a 4°C hasta el momento de realizar la electroforesis.

Electroforesis y visualización del amplificado

Los productos de PCR (10 µl por cada amplificado), fueron corridos en gel de agarosa al 2% en Buffer TAE 1X. Junto con las muestras se usó un marcador de peso molecular de 100 pb. Las condiciones de electroforesis fueron 85 V y 500 mA durante el tiempo necesario hasta que migrara a $\frac{3}{4}$ del campo (aproximadamente 1 hora 30 minutos).

Una vez completado el tiempo de electroforesis, el gel se tiñó en una solución de bromuro de etidio (0,5 µg/ml), por aproximadamente 5 minutos. Los fragmentos amplificados fueron observados en un transiluminador (Vilbert Loumart®) y los productos de amplificación fueron identificados por comparación con el marcador de peso molecular y comparando con la cepa control positivo. Cada gel fue fotografiado mediante sistema de captura de imágenes (Vilbert Loumart®).

4.4.2. Amplificación de la isla de patogenicidad (LIPI-1)

Extracción del ADN

Para la extracción de ADN desde células de *Listeria monocytogenes* se utilizó el Kit de extracción Wizard® Genomic DNA Purification kit (Promega). La extracción se aplicó a un cultivo overnight crecido en caldo BHI, de cada una de las cepas a analizar.

PCR

Para amplificar la isla de patogenicidad se utilizó la Polimerasa High Fidelity PCR Enzyme Mlx (Thermo Scientific), indicada para fragmentos sobre 5 Kb. Los partidores usados se muestran en la Tabla 1 y el mix de cada reacción en la Tabla 3.

Tabla 3: Volúmenes de la mezcla

Reactivo	1x (µL)
Buffer HF 10X	2,5
MgCl ₂ 25mM	1,5
DNTPs 10mM	0,5
Polimerasa HF 5U/ul	0,5
Partidor Isla F	0,3
Partidor Isla R	0,3
H ₂ O	18,4
Total	24
DNA	1

Nota: el ADN blanco utilizado corresponde a una dilución 1/10 del ADN extraído según kit Promega.

El programa utilizado para la amplificación de la isla LIPI-1 comprende los siguientes ciclos:

Denaturación inicial:	94 °C por 1-3 minutos	} 1 ciclo
Denaturación:	94°C 95°C por 30 segundos	} 10 ciclos
Alineamiento:	T _m -5 por 30 segundos	
Extensión:	68°C por 1min/kb	
Denaturación	94°C por 30 segundos	} 15-25 ciclos
Alineamiento	T _m -5 por 30 segundos	
Extensión	68°C por 1min/kb + x* seg/ciclo	
Extensión final:	68°C por 10 minutos	} 1 ciclo
Temperatura final:	4°C indefinido	

Electroforesis

Las muestras fueron cargadas en un gel de agarosa al 1% junto a un marcador de peso molecular de 1Kb.

4.4.3. Restricción del fragmento amplificado de la Isla LIPI-1, utilizando las enzimas Hae III y PvuII.

Tabla 4: Reacción de restricción

Reactivo	1x (μL)
Buffer 10X Fast Digest	2
DNA	10
Fast Digest Pvu II	1
Fast Digest Hae III	1
H2O	16
Total	30 μL

Para realizar la restricción del fragmento amplificado de LIPI-1, se utilizaron tubos que contenían 20 μl del MIX más 10 μl DNA de los amplificados de la isla LIPI-1 de cada cepa. Esta mezcla se incubó por 24 horas a temperatura ambiente; luego para observar los fragmentos de restricción se utilizó un gel de agarosa al 2,5%, cargando 10 μl del producto de restricción, 6 μL de ladder de 1 kb y se corrió el gel a 75volt por aproximadamente 3 horas.

5. RESULTADOS

5.1. CONFIRMACIÓN DE CEPAS DE *L. monocytogenes*

Se realizó una PCR para confirmar la pureza de las cepas de *Listeria monocytogenes* previamente aisladas desde alimentos y de casos clínicos. Esta PCR estuvo dirigida a cuatro de los principales factores de virulencia de la bacteria (*hly*, *inlA*, *prfA*, *inlB*) y al gen *prs*, común a todas las especies del género. Los tamaños de amplificación fueron 852, 629, 506, 370 y 293 pb, respectivamente. En esta etapa se pudieron confirmar 96 de las 103 cepas seleccionadas inicialmente. Además, se observa que en los carriles 3 al 5 la amplificación de aislamientos de *L. monocytogenes* obtenidos de alimentos y casos clínicos es negativa.

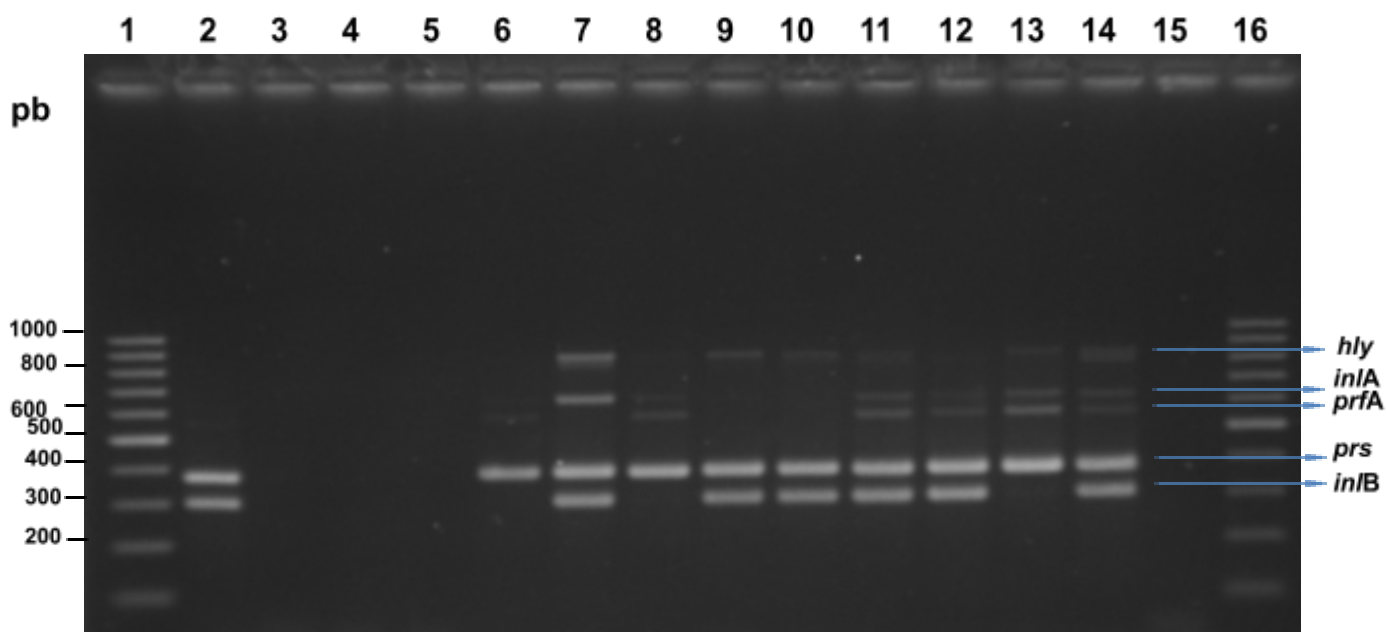


Figura 6: Amplificación de factores de virulencia *L. monocytogenes*. Carriles 1 y 16: DNA Ladder 100pb, carriles del 2, 6 al 13: aislamientos de *L. monocytogenes* obtenidos de alimentos y casos clínicos con amplificación positiva; carril 14: *L. monocytogenes* ATCC 13932; carril 15: Control negativo de reacción.

5.2. AMPLIFICACION DE LA ISLA LIPI-1

La amplificación de la isla de patogenicidad se realizó exitosamente en 73 de las 96 cepas analizadas, de las cuales 37 correspondieron a cepas aisladas desde alimentos y 36 a cepas clínicas. El amplificado obtenido fue de un tamaño aproximado de 9,9 kb.

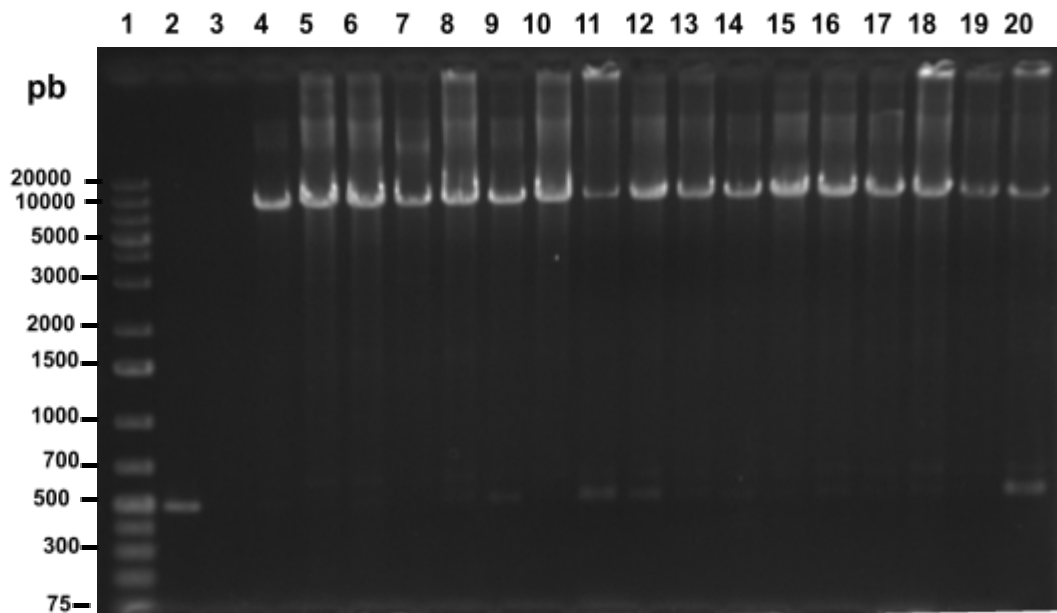


Figura 7: Amplificación isla de patogenicidad de *L. monocytogenes* en cepas aisladas desde alimentos y de casos clínicos. Carril 1: DNA Ladder 1 kb; carriles 2 y 3: aislamientos de *L. monocytogenes* con amplificación negativa; carriles 4 al 19: aislamientos de *L. monocytogenes* con amplificación positiva; carril 20: *Listeria monocytogenes* ATCC 13932.

5.3. RESTRICCIÓN DEL PRODUCTO DE AMPLIFICACIÓN DE LA ISLA LIPI-1 CON LAS ENZIMAS *HaeIII* y *PvuII*

De las 73 cepas que amplificaron para el fragmento de la isla de patogenicidad LIPI-1, en el total de ellas se logró obtener un perfil de restricción al realizar la digestión con *HaeIII* y *PvuII*. Se observaron 9 perfiles de restricción diferentes.

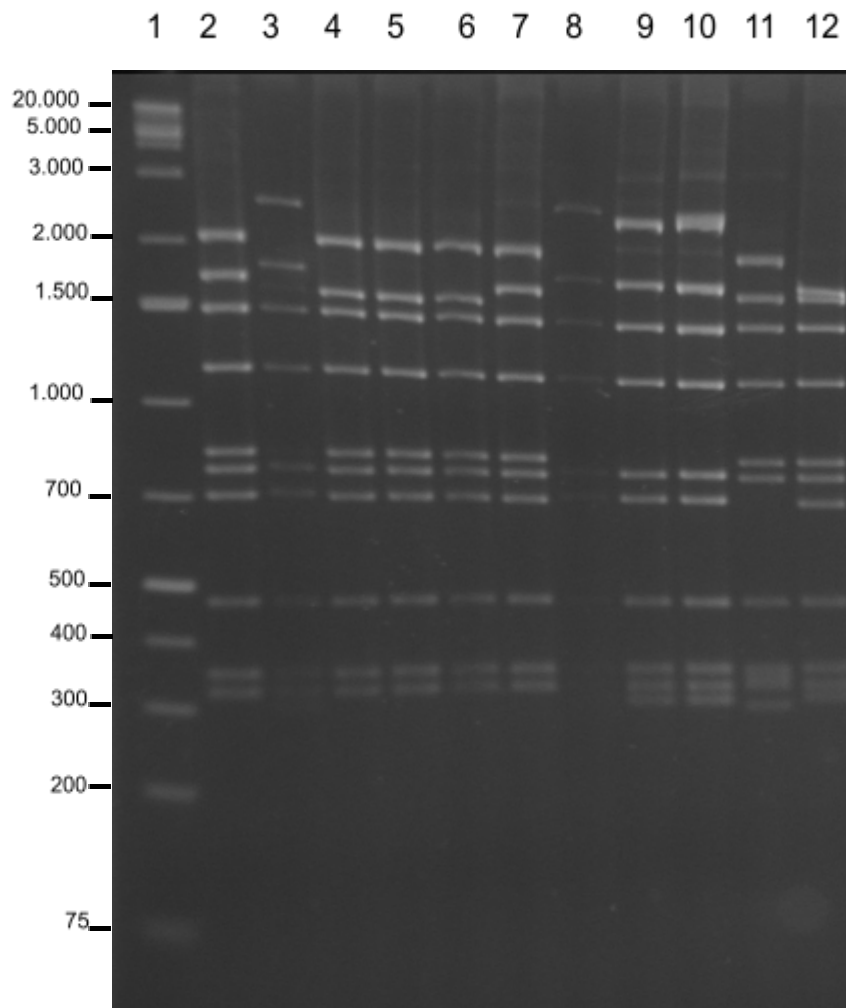


Figura 8: Restricción del fragmento amplificado de la isla de patogenicidad de *Listeria monocytogenes* con las enzimas *HaeIII* y *PvuII*. Carril 1: Marcador de peso molecular de 1Kb, Carriles 2 al 12: perfiles de restricción obtenidos para diferentes aislamientos de *L. monocytogenes*.

5.4. ANÁLISIS DE SIMILITUD DE AISLAMIENTOS DE *L. monocytogenes* OBTENIDOS DE ALIMENTOS

Se observaron varios perfiles de restricción distintos y los aislamientos se agruparon en 3 clusters,

Dentro del “cluster” I se incluyen 47 aislamientos de origen clínico y de alimentos, correspondientes mayoritariamente al serotipo 4b y 1/2b (linaje genético II) que se relacionan genéticamente con sobre un 80% de similitud y donde puede observarse un grupo clonal (100% similitud) conformado por 32 aislamientos proveniente de ambos orígenes y principalmente de serotipo 4b, en donde se incluyen aislamientos de alimentos y de origen clínico relacionados con brotes de listeriosis ocurridos en Chile durante los años 2008 y 2009.

Los “cluster” II y III agrupan a un menor número de cepas también de ambos orígenes, que corresponden a los linajes genéticos I y II, respectivamente, en donde aparecen los serotipos 1/2a y 1/2b que también son descritos como causantes de casos clínicos en humanos, pero referidos más bien a casos esporádicos y no a brotes epidémicos. Por lo tanto, es posible que a través del análisis de variabilidad genético realizado a la Isla LIPI-1 se puedan establecer patrones de restricción característicos de cepas que potencialmente pueden ocasionar listeriosis en humanos y pueden dar cuenta del grado de virulencia de las mismas.

5.4.1. DENDROGRAMA

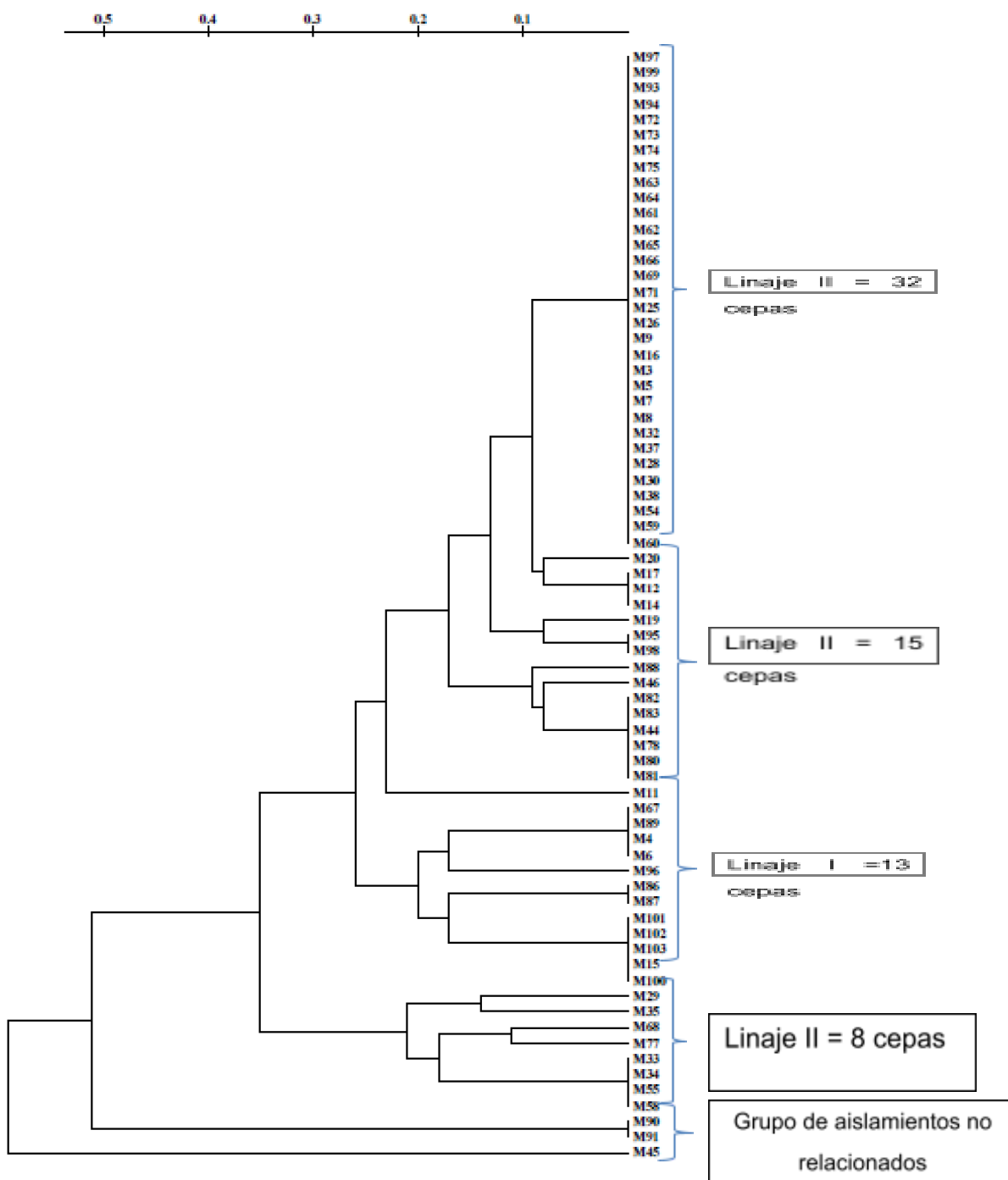


Figura 9: Árbol de similitud en relación a los perfiles de restricción (software Treecon). Presenta la identificación de los Linajes y la cantidad de cepas para cada uno de ellos.

5.4.2. DENDROGRAMA

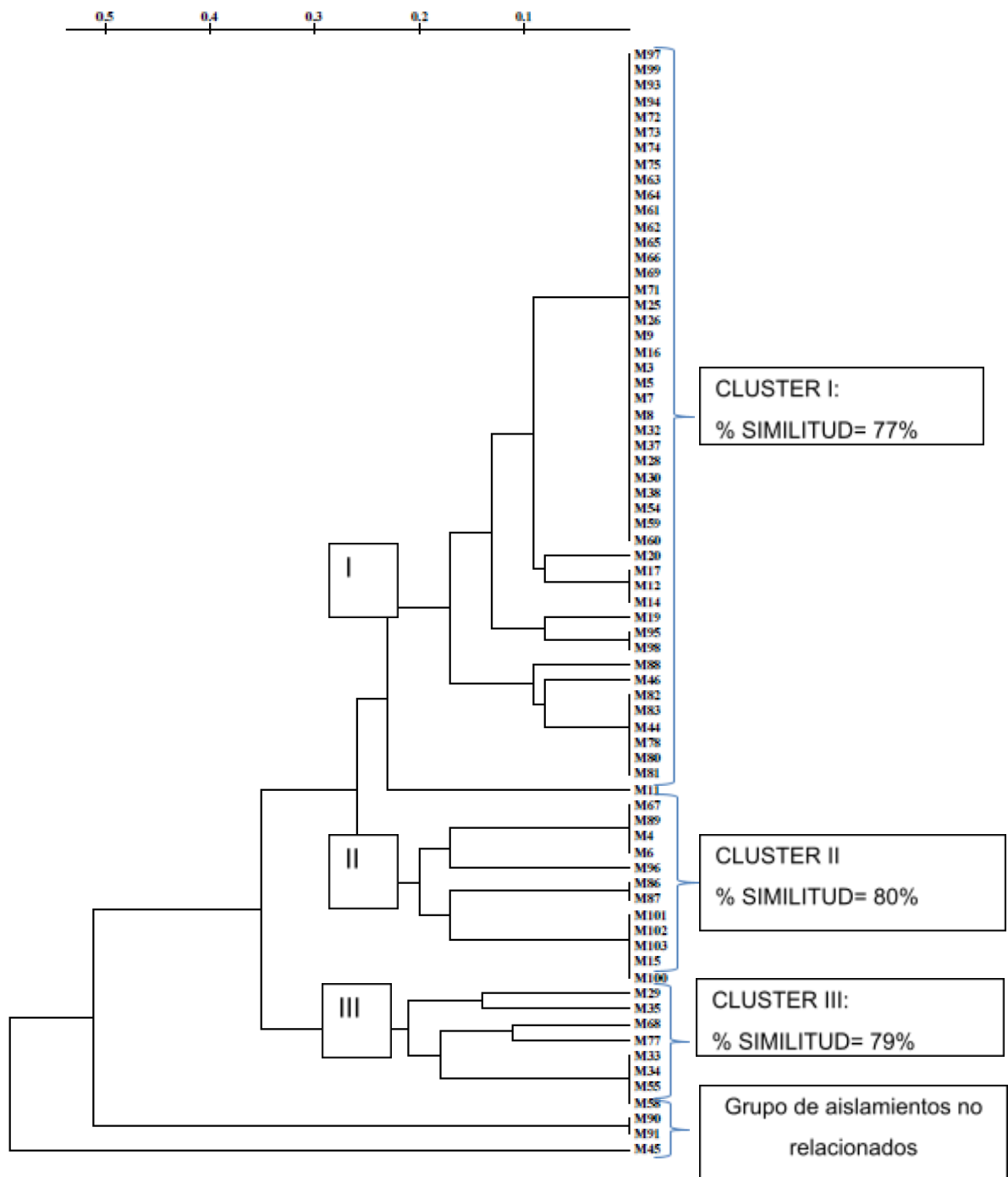


Figura 10: Árbol de similitud en relación a los perfiles de restricción (software Treecon). Presenta la formación de cluster con sus respectivos % de similitud.

6. DISCUSIÓN

En los últimos años se ha intensificado el estudio de *L. monocytogenes* como patógeno transmitido por alimentos, siendo una amenaza para la salud pública debido a su alta tasa de mortalidad (Leite, *et al.*, 2006).

El dilema que se plantea en la evaluación y control de riesgos de la listeriosis alimentaria es que aunque la contaminación de determinados alimentos sea muy frecuente, y por tanto, la exposición muy amplia, la enfermedad se asocia con una pequeña subpoblación de esta especie bacteriana y tiene lugar en una pequeña proporción de los individuos susceptibles. Tasas de prevalencia de *L. monocytogenes* del 1 al 10%, y aún mayores, son frecuentes en algunos alimentos a pesar de ello, la listeriosis sintomática continúa siendo una enfermedad poco observada (McLauchlin, *et al.*, 1990).

Los genes de virulencia que están codificados en el cromosoma en la isla LIPI-1, ya están determinados en las especies de *Listeria monocytogenes*, y en general pueden ser detectados tanto en cepas provenientes desde alimentos como de casos clínicos, sin entregar mayor información respecto al potencial de virulencia de una cepa u otra. En este trabajo se ha evidenciado que al amplificar la isla completa y posteriormente realizar restricción del fragmento, se pueden establecer patrones de restricción distintos, que dan cuenta de aislamientos que se agrupan por algunas características específicas, y que si podrían ayudar en la orientación de cuales aislamientos podrían ser potencialmente más virulentos que otros. Se han obtenido varios perfiles de restricción distintos, dentro de los cuales se observan claramente 3 cluster (ver Figura 9). El cluster I incluye aislamientos de ambos orígenes, correspondientes mayoritariamente al serotipo 4b y 1/2b (linaje genético II) que se relacionan genéticamente con sobre un 80% de similitud, además existe un grupo clonal (100% similitud) conformado por aislamientos de ambos orígenes y principalmente de serotipo 4b, que incluye cepas de origen clínico involucrados en brotes de listeriosis ocurridos en Chile. Al realizar este método de análisis en un grupo de aislamientos de *L. monocytogenes*, y obtener el perfil descrito para este cluster, claramente se podría inferir que estos aislamientos corresponden a potenciales cepas causantes de brotes.

El progreso en la genómica de *L. monocytogenes* y el conocimiento de su fisiología puede servir para identificar moléculas blanco para el desarrollo de nuevos agentes antimicrobianos en el tratamiento de listeriosis y otras infecciones bacterianas o sustancias inhibidoras para el control selectivo de la supervivencia y crecimiento de *L. monocytogenes* en los alimentos.

El estudio de los serotipos y subtipos moleculares de las cepas de *L. monocytogenes* responsables de los grandes brotes epidémicos de listeriosis ha sido el punto de partida de la idea de la variabilidad de la virulencia, pues se ha demostrado con diferentes técnicas que existe un número muy pequeño de serotipos y de clones implicados (Chen, *et al.*, 2005).

Analizando la distribución de los serotipos de *L. monocytogenes* en las muestras clínicas y en los alimentos, se observa que de los 13 serotipos en que se clasifica *L. monocytogenes*, tan sólo tres (4b, 1/2a y 1/2b) representan por sí solos la causa del 89 al 96% de los casos de listeriosis en todo el mundo, lo que sugiere que determinadas cepas de *L. monocytogenes* tienen más probabilidades de causar enfermedad que otras (McLauchlin, *et al.*, 1990).

El serotipo 4b es muy clonal y el número de cepas diferentes asociadas a los brotes en distintos países y durante más de 20 años es muy pequeño; por ejemplo, una cepa de serotipo 4b aislada en Austria después del año 2000 resultó idéntica a otra cepa también epidémica de Estados Unidos de 1985 (Grif, *et al.*, 2006). Estas cepas de serotipo 4b aisladas de la mayoría de los brotes epidémicos forman tres grupos genéticos homogéneos estrechamente relacionados, que se han denominado “clones epidémicos” (ILSI Research Foundation, 2005; Miettinen, *et al.*, 1999).

En los alimentos no asociados con casos de listeriosis, por el contrario, predominan los serotipos 1/2, mientras que el serotipo 4b es muy escaso. Las cepas de serotipo 4b podrían tener una menor capacidad para formar biopelículas en las plantas de procesado de alimentos en comparación con las de los serotipos 1/2, lo que podría explicar su escasez en ellos (Schmidt & Hensel, 2004). Por el contrario, la diferente distribución de los serotipos no está relacionada, aparentemente, con la existencia de alguna clase de ventaja del serotipo 1/2a frente al 4b en los medios de cultivo selectivos empleados habitualmente (Kreft & Vazquez-Boland, 2001).

La alta mortalidad de la listeriosis, sumada a la creciente población inmunosuprimida y al incremento a nivel mundial de infecciones alimentarias, hace necesario estudiar este tema en nuestro país, conocer las cepas de *L. monocytogenes* que circulan en nuestro medio, así como implementar técnicas que permitan identificarlas y realizar seguimiento epidemiológico. Esta investigación permite generar una posible herramienta de búsqueda de cepas de *L. monocytogenes* con potencial patogénico basándose en el análisis de restricción de enzimas aplicado en LIPI-1, lo que podría contribuir en la búsqueda de la profilaxis, tratamiento y control de la listeriosis en Chile.

7. CONCLUSIONES

- 1.- La restricción del fragmento amplificado de la isla LIPI-1 de aislamientos de *L. monocytogenes* de origen clínico y de alimentos, entregó varios perfiles de restricción distintos.
- 2.- No existe un patrón específico de restricción que pueda asociarse sólo a cepas clínicas o sólo a cepas aisladas desde alimentos.
- 3.- Los patrones de restricción se relacionan y concuerdan con lo descrito en literatura para los linajes genéticos I y II de *Listeria monocytogenes*.
- 4.- Se observan claramente 3 clúster genéticos, que se relacionan con sobre un 80% de similitud.
- 5.- Dentro del cluster I se observó un grupo mayoritario conformado por 32 aislamientos, pertenecientes al serotipo 4b y linaje genético II incluyendo cepas de casos clínicos y alimentos involucrados en brotes de listeriosis.
- 6.- Los cluster II y III incluyeron aislamientos de alimentos y de casos clínicos de serotipos 1/2a, 1/2b, 1/2c y 4b. Las cepas clínicas correspondieron a casos esporádicos.
- 7.- Los perfiles de restricción observados entregan información en la diferenciación de cepas de *Listeria monocytogenes* que podrían producir listeriosis en humanos

8. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. Barbuddhe, S. B. and T. Chakraborty. 2009. *Listeria* as an enteroinvasive gastrointestinal pathogen. In: Sasakawa, C. (Ed.). *Molecular Mechanisms of Bacterial Infection via the Gut*. pp. 173-195. Springer Berlin Heidelberg.
2. Bell, C. and A. Kyriakides. 1998. *Listeria*: una aproximación práctica al microorganismo y su control en los alimentos. 177 pp. Zaragoza: Editorial Acribia.
3. Boderó, M. F. 2010. Detección y caracterización de *Listeria monocytogenes* aisladas desde alimentos en la Región Metropolitana durante el período 2008-2009. Facultad de Medicina. Escuela de Postgrado, Universidad de Chile, Santiago de Chile. 88 pp.
4. Boerlin, P. and J.-C. Piffaretti. 1991. Typing of human, animal, food, and environmental isolates of *Listeria monocytogenes* by multilocus enzyme electrophoresis. *Applied and Environmental Microbiology*. 57(6): 1624-1629.
5. Borucki, M. K., J. Reynolds, C. C. Gay, K. L. McElwain, S. H. Kim, D. P. Knowles and J. Hu. 2004. Dairy farm reservoir of *Listeria monocytogenes* sporadic and epidemic strains. *Journal of Food Protection*. 67(11): 2496-2499.
6. Collins, M., S. Wallbanks, D. Lane, J. Shah, R. Nietupski, J. Smida, M. Dorsch and E. Stackebrandt. 1991. Phylogenetic analysis of the genus *Listeria* based on reverse transcriptase sequencing of 16S rRNA. *International journal of systematic bacteriology*. 41(2): 240-246.
7. Cossart, P. 2002. Molecular and cellular basis of the infection by *Listeria monocytogenes*: an overview. *International journal of medical microbiology*. 291(6-7): 401-409.
8. Chen, Y., W. Zhang and S. J. Knabel. 2005. Multi-virulence-locus sequence typing clarifies epidemiology of recent listeriosis outbreaks in the United States. *Journal of clinical microbiology*. 43(10): 5291-5294.
9. Chou, C.-H. and C. Wang. 2006. Genetic relatedness between *Listeria monocytogenes* isolates from seafood and humans using PFGE and REP-PCR. *International journal of food microbiology*. 110(2): 135-148.
10. Dalton, C. B., C. C. Austin, J. Sobel, P. S. Hayes, W. F. Bibb, L. M. Graves, B. Swaminathan, M. E. Proctor and P. M. Griffin. 1997. An Outbreak of Gastroenteritis and Fever Due to *Listeria monocytogenes* in Milk. *New England Journal of Medicine*. 336(2): 100-106.
11. Den Bakker, H., B. Bowen, L. Rodríguez-Rivera and M. Wiedmann. 2012. FSL J1-208, a Virulent Uncommon Phylogenetic Lineage IV *Listeria monocytogenes* Strain with a Small Chromosome Size and a Putative Virulence Plasmid Carrying Internalin-Like Genes. *Applied and Environmental Microbiology*. 78(6): 1876-1889.
12. Dussurget, O., J. Pizarro-Cerda and P. Cossart. 2004. Molecular determinants of *Listeria monocytogenes* virulence. *Annu. Rev. Microbiol.* 58: 587-610.
13. Farber, J. M. and P. I. Peterkin. 1991. *Listeria monocytogenes*, a food-borne pathogen. *Microbiological reviews*. 55(3): 476-511.
14. Fondecyt. 11075051. 2008. Vigilancia y caracterización de factores de virulencia de cepas patógenas de *Listeria* spp aislados desde alimentos en la Región Metropolitana. Investigador Responsable: Maricel Vidal.
15. Gedde, M. M., D. E. Higgins, L. G. Tilney and D. A. Portnoy. 2000. Role of Listeriolysin O in Cell-to-Cell Spread of *Listeria monocytogenes*. *Infection and immunity*. 68(2): 999-1003.
16. Gilbreth, S. E., J. E. Call, F. M. Wallace, V. N. Scott, Y. Chen and J. B. Luchansky. 2005. Relatedness of *Listeria monocytogenes* Isolates recovered from selected ready-to-eat foods and listeriosis patients in the United States. *Appl Environ Microbiol.* 71(12): 8115-8122.

17. Goldberg, M. B. 2001. Actin-based motility of intracellular microbial pathogens. *Microbiology and molecular biology reviews*. 65(4): 595-626.
18. Gray, M. J., R. N. Zadoks, E. D. Fortes, B. Dogan, S. Cai, Y. Chen, V. N. Scott, D. E. Gombas, K. J. Boor and M. Wiedmann. 2004. *Listeria monocytogenes* isolates from foods and humans form distinct but overlapping populations. *Applied and Environmental Microbiology*. 70(10): 5833-5841.
19. Gregory, S. H., A. J. Sagnimeni and E. J. Wing. 1996. Expression of the inlAB operon by *Listeria monocytogenes* is not required for entry into hepatic cells in vivo. *Infect Immun*. 64(10): 3983-6.
20. Grif, K., I. Heller, M. Wagner, M. Dierich and R. Würzner. 2006. A comparison of *Listeria monocytogenes* serovar 4b isolates of clinical and food origin in Austria by automated ribotyping and pulsed-field gel electrophoresis. *Foodborne Pathog Dis*. 3(1): 138-141.
21. Guenther, S., D. Huwyler, S. Richard and M. J. Loessner. 2009. Virulent bacteriophage for efficient biocontrol of *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat foods. *Appl Environ Microbiol*. 75(1): 93-100.
22. Guzman, C. A., E. Domann, M. Rohde, D. Bruder, A. Darji, S. Weiss, J. Wehland, T. Chakraborty and K. N. Timmis. 1996. Apoptosis of mouse dendritic cells is triggered by listeriolysin, the major virulence determinant of *Listeria monocytogenes*. *Mol Microbiol*. 20(1): 119-126.
23. ILSI Research Foundation, Risk Science Institute. 2005. Achieving continuous improvement in reductions in foodborne listeriosis—a risk-based approach. *Journal of Food Protection*. 68(9): 1932-1994.
24. Izquierdo, E., E. Marchioni, D. Aoude-Werner, C. Hasselmann and S. Ennahar. 2009. Smearing of soft cheese with *Enterococcus faecium* WHE 81, a multi-bacteriocin producer, against *Listeria monocytogenes*. *Food Microbiol*. 26(1): 16-20.
25. Jeong, D. K. and J. F. Frank. 1994. Growth of *Listeria monocytogenes* at 21°C in Biofilms with Microorganisms Isolated from Meat and Dairy Processing Environments. *LTW - Food Science and Technology*. 27(5): 415-424.
26. Kreft, J. and J. A. Vazquez-Boland. 2001. Regulation of virulence genes in *Listeria*. *Int. J. Med. Microbiol*. 291(2): 145-57.
27. Leite, P., R. Rodrigues, M. Ferreira, G. Ribeiro, C. Jacquet, P. Martin and L. Brito. 2006. Comparative characterization of *Listeria monocytogenes* isolated from Portuguese farmhouse ewe's cheese and from humans. *Int. J. Food Microbiol*. 106(2): 111-21.
28. Liu, D. 2006. Identification, subtyping and virulence determination of *Listeria monocytogenes*, an important foodborne pathogen. *J Med Microbiol*. 55: 645-59.
29. Lunden, J. M. 2004. Persistent *Listeria monocytogenes* Contamination in Food Processing Plants. Department of Food and Environmental Hygiene, Faculty of Veterinary Medicine, University of Helsinki, Finland. 66 pp.
30. McLaughlin, J., M. H. Greenwood and P. N. Pini. 1990. The occurrence of *Listeria monocytogenes* in cheese from a manufacturer associated with a case of listeriosis. *Int J Food Microbiol*. 10(3-4): 255-262.
31. Meinersmann, R. J., R. W. Phillips, M. Wiedmann and M. E. Berrang. 2004. Multilocus sequence typing of *Listeria monocytogenes* by use of hypervariable genes reveals clonal and recombination histories of three lineages. *Appl Environ Microbiol*. 70(4): 2193-2203.
32. Miettinen, M. K., A. Siitonen, P. Heiskanen, H. Haajanen, K. J. Bjorkroth and H. J. Korkeala. 1999. Molecular epidemiology of an outbreak of febrile gastroenteritis caused by *Listeria monocytogenes* in cold-smoked rainbow trout. *J Clin Microbiol*. 37(7): 2358-2360.
33. MINSAL. 2009. Ministerio de Salud de Chile. Informe Brote Listeriosis Región Metropolitana Departamento de Epidemiología 5 de febrero 2009. 5 pp. Santiago de Chile. **Disponible en:**

34. Mortarjemi, Y. 2002. Chronic sequele of food-borne infections. In: Blackburn, C. and P. Mc-Clure (Eds.). Foodborne pathogens, hazards, risk analysis and control. pp. 506. Editorial Woodhead Publishing limited.
35. Nadon, C. A., D. L. Woodward, C. Young, F. G. Rodgers and M. Wiedmann. 2001. Correlations between molecular subtyping and serotyping of *Listeria monocytogenes*. J Clin Microbiol. 39(7): 2704-2707.
36. Navarre, W. W. and O. Schneewind. 1999. Surface proteins of gram-positive bacteria and mechanisms of their targeting to the cell wall envelope. Microbiol Mol Biol Rev. 63(1): 174-229.
37. Noriega R, L. M., S. Ibáñez V, P. González A, M. Yamamoto C, J. Astudillo D, M. González V, R. Riveros K, F. Lira C, A. Marcotti S, J. Pérez G, L. Thompson M, M. F. Daza P, M. Espinosa I, C. Pinochet V and P. A. Vial C. 2008. *Listeria monocytogenes*: Informe de un aumento de casos en mujeres embarazadas y revisión de la literatura. Revista chilena de infectología. 25: 342-349.
38. Olier, M., F. Pierre, J. P. Lemaitre, C. Divies, A. Rousset and J. Guzzo. 2002. Assessment of the pathogenic potential of two *Listeria monocytogenes* human faecal carriage isolates. Microbiology. 148(6): 1855-1862.
39. Pohl, M. A., M. Wiedmann and K. K. Nightingale. 2006. Associations among *Listeria monocytogenes* genotypes and distinct clinical manifestations of listeriosis in cattle. Am J Vet Res. 67(4): 616-626.
40. Riedo, F. X., R. W. Pinner, M. L. Tosca, M. L. Cartter, L. M. Graves, M. W. Reeves, R. E. Weaver, B. D. Plikaytis and C. V. Broome. 1994. A point-source foodborne listeriosis outbreak: documented incubation period and possible mild illness. J Infect Dis. 170(3): 693-6.
41. Roberts, A., K. Nightingale, G. Jeffers, E. Fortes, J. M. Kongo and M. Wiedmann. 2005. Genetic and phenotypic characterization of *Listeria monocytogenes* lineage III. Microbiology. 152(3): 685-693.
42. Rossi, M. L., A. Paiva, M. Tornese, S. Chianelli and A. Troncoso. 2008. Brotes de infección por *Listeria monocytogenes*: Una revisión de las vías que llevan a su aparición. Revista chilena de infectología. 25: 328-335.
43. Sanchez-Campillo, M., S. Dramsi, J. M. Gomez-Gomez, E. Michel, P. Dehoux, P. Cossart, F. Baquero and J. C. Perez-Diaz. 1996. Modulation of DNA topology by *flaR*, a new gene from *Listeria monocytogenes*. Mol Microbiol. 18(5): 801-811.
44. Sauders, B. D., K. Mangione, C. Vincent, J. Schermerhorn, C. M. Farchione, N. B. Dumas, D. Bopp, L. Kornstein, E. D. Fortes, K. Windham and M. Wiedmann. 2004. Distribution of *Listeria monocytogenes* molecular subtypes among human and food isolates from New York State shows persistence of human disease-associated *Listeria monocytogenes* strains in retail environments. J Food Prot. 67(7): 1417-28.
45. Sauders, B. D., M. Z. Durak, E. Fortes, K. Windham, Y. Schukken, A. J. Lembo, Jr., B. Akey, K. K. Nightingale and M. Wiedmann. 2006. Molecular characterization of *Listeria monocytogenes* from natural and urban environments. J Food Prot. 69(1): 93-105.
46. Schlech, W. F., 3rd, P. M. Lavigne, R. A. Bortolussi, A. C. Allen, E. V. Haldane, A. J. Wort, A. W. Hightower, S. E. Johnson, S. H. King, E. S. Nicholls and C. V. Broome. 1983. Epidemic listeriosis-evidence for transmission by food. N Engl J Med. 308(4): 203-206.
47. Schmidt, H. and M. Hensel. 2004. Pathogenicity islands in bacterial pathogenesis. Clin Microbiol Rev. 17(1): 14-56.
48. Schuchat, A., B. Swaminathan and C. V. Broome. 1991. Epidemiology of human listeriosis. Clin Microbiol Rev. 4(2): 169-183.

49. Sedano, R., A. Fica, D. Guiñez, S. Braun, L. Porte, J. Dabanch, T. Weitzel and A. Soto. 2013. Infecciones por *Listeria monocytogenes*, una experiencia de dos décadas: A two decade experience. *Revista chilena de infectología*. 30: 417-425.
50. Sibelius, U., E. C. Schulz, F. Rose, K. Hattar, T. Jacobs, S. Weiss, T. Chakraborty, W. Seeger and F. Grimminger. 1999. Role of *Listeria monocytogenes* exotoxins listeriolysin and phosphatidylinositol-specific phospholipase C in activation of human neutrophils. *Infect Immun*. 67(3): 1125-1130.
51. Skalka, B., J. Smola and K. Elischerová. 1982. Routine test for in vitro differentiation of pathogenic and apathogenic *Listeria monocytogenes* strains. *J Clin Microbiol*. 15(3): 503-507.
52. Sun, A. N., A. Camilli and D. A. Portnoy. 1990. Isolation of *Listeria monocytogenes* small-plaque mutants defective for intracellular growth and cell-to-cell spread. *Infect Immun*. 58(11): 3770-3778.
53. Swanson, J. A. and S. C. Baer. 1995. Phagocytosis by zippers and triggers. *Trends Cell Biol*. 5(3): 89-93.
54. Tang, P., I. Rosenshine, P. Cossart and B. B. Finlay. 1996. Listeriolysin O activates mitogen-activated protein kinase in eucaryotic cells. *Infect Immun*. 64(6): 2359-2361.
55. Temoin, S., S. M. Roche, O. Grepinet, Y. Fardini and P. Velge. 2008. Multiple point mutations in virulence genes explain the low virulence of *Listeria monocytogenes* field strains. *Microbiology*. 154(3): 939-48.
56. Theivendran, S., N. S. Hettiarachchy and M. G. Johnson. 2006. Inhibition of *Listeria monocytogenes* by Nisin Combined with Grape Seed Extract or Green Tea Extract in Soy Protein Film Coated on Turkey Frankfurters. *Journal of Food Science*. 71(2): M39-M44.
57. Thimothe, J., K. K. Nightingale, K. Gall, V. N. Scott and M. Wiedmann. 2004. Tracking of *Listeria monocytogenes* in smoked fish processing plants. *J Food Prot*. 67(2): 328-341.
58. Vazquez-Boland, J. A., M. Kuhn, P. Berche, T. Chakraborty, G. Dominguez-Bernal, W. Goebel, B. Gonzalez-Zorn, J. Wehland and J. Kreft. 2001. *Listeria* pathogenesis and molecular virulence determinants. *Clin Microbiol Rev*. 14(3): 584-640.
59. Vivas, L. 1999. Listeriosis: Problema en desarrollo. *ILE*. Enero-Febrero: 86-90.
60. Wiedmann, M. 2002. Molecular subtyping methods for *Listeria monocytogenes*. *J AOAC Int*. 85(2): 524-531.