



Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica

www.elsevier.es/eimc



Original

Caracterización microbiológica de los aislados de *Listeria monocytogenes* procedentes de casos humanos en Andalucía

José A. Lepe^{a,b,*}, María José Torres^{b,c}, Julia Liró^a, Rafael Luque^a, Javier Aznar^{a,b,c} y grupo LISAND-Microbiología[◇]

^a Unidad Clínica de Enfermedades Infecciosas, Microbiología y Medicina Preventiva, Hospital Universitario Virgen del Rocío, Sevilla, España

^b Instituto de Biomedicina de Sevilla (IBIS), Hospital Universitario Virgen del Rocío/CSIC/Universidad de Sevilla, Sevilla, España

^c Departamento de Microbiología, Facultad de Medicina, Universidad de Sevilla, Sevilla, España

INFORMACIÓN DEL ARTÍCULO

Historia del artículo:

Recibido el 13 de noviembre de 2011

Aceptado el 21 de febrero de 2012

On-line el 16 de abril de 2012

Palabras clave:

Listeriosis
Antibióticos
Pulsotipos
Clones epidémicos
España

Keywords:

Listeriosis
Antibiotics
Pulsotypes
EC markers
Spain

R E S U M E N

Objetivo: El objetivo de este estudio fue caracterizar microbiológicamente 154 aislados de *Listeria monocytogenes* procedentes de casos humanos ocurridos en Andalucía en el período 2005-2009.

Material y métodos: La serotipificación se realizó mediante antisueros comerciales frente a antígenos somáticos de *L. monocytogenes* y por PCR multiplex de acuerdo con el método descrito por Doumith et al. (2004). La sensibilidad antibiótica fue estudiada por Epsilon test e interpretada por criterios CLSI. La relación clonal mediante PFGE de los fragmentos de restricción obtenidos con la enzima *Apal* se realizó según protocolo PulseNet y el software Bionumerics. La identificación de clones epidémicos ECI, ECII y ECIII se estableció mediante un protocolo de PCR multiplex descrito por Chen y Knabel (2007).

Resultados: Los 154 aislados fueron agrupados en 4 serotipos: 4b [n = 94 (61%)], 1/2b [n = 30 (19%)], 1/2a [n = 27 (18%)] y 1/2c [n = 3 (2%)], siendo el 100% sensibles a ampicilina y cotrimoxazol. Se identificaron 62 pulsotipos diferentes. Treinta y siete aislados (24%) mostraron pulsotipos únicos, y los aislados restantes (76%) fueron asignados a 25 grupos PFGE (60% en grupos de más de 2 aislados). Los marcadores EC se encontraron en 62 (40,3%) aislados. El marcador de ECI estuvo presente en 43 (46,2%) de los aislados serotipo 4b, ECII en 10 (10,7%) aislados serotipo 4b, y ECIII en 9 (33,3%) aislados serotipo 1/2a.

Discusión: Una gran proporción de los aislados de *L. monocytogenes* pertenecientes a casos de listeriosis humana de nuestro estudio se agrupan clonalmente mediante técnicas de subtipado molecular, lo que sugiere la presencia de clones circulantes que podrían estar relacionados con brotes internacionales de origen alimentario o corresponder a cepas más virulentas.

© 2011 Elsevier España, S.L. Todos los derechos reservados.

Microbiological characterisation of *Listeria monocytogenes* isolates from human cases in Andalusia

A B S T R A C T

Objective: The aim of this study was to perform a retrospective study by genotyping 154 isolates from human listeriosis cases occurred in the region of Andalusia (southern Spain) in the period 2005-2009.

Material and methods: Serotyping was performed for 1 and 4 somatic antigens using commercial *Listeria* antisera, and by multiplex-PCR serogrouping according to the method described by Doumith et al. (2004). The antimicrobial susceptibility was performed by Epsilon test and interpreted by CLSI criteria. PFGE was performed according to the PulseNet protocol with the *Apal* enzyme. The similarity of PFGE profiles was evaluated using the Bionumerics software. The multiplex PCR protocol described by Chen and Knabel (2007) was used for the identification of isolates belonging to *L. monocytogenes* ECI, ECII, and ECIII epidemic clones.

Results: The 154 isolates were grouped into four serotypes: 4b [94 (61%)] strains, 1/2b [30 (19%)] strains, 1/2a [27 (18%)] strains, and 1/2c [3 (2%)] strains, with 100% of susceptibility to ampicillin and cotrimoxazole. A further sixty-two *Apal* distinct pulsotypes were recognized. Thirty-seven isolates (24%) showed

* Autor para correspondencia.

Correo electrónico: jalepe@cica.es (J.A. Lepe).

◇ Los componentes del grupo LISAND-Microbiología se relacionan en el anexo 1.

unique *Apal* pulsotypes, and the remaining 117 strains (76%) were assigned to 25 *Apal* clusters (60% in clusters of more than two isolates). The EC markers were found in 62 (40.3%) of the *L. monocytogenes* isolates tested. The ECI marker was present in 43 (46.2%) 4b serotype isolates, ECII in 10 (10.7%) 4b serotype isolates, and ECIII in 9 (33.3%) 1/2a serotype isolates.

Discussion: A large proportion of the human listeriosis cases under investigation could be grouped into molecular subtype clusters, and our cases could be related to international food-borne outbreaks.

© 2011 Elsevier España, S.L. All rights reserved.

Introducción

La listeriosis es una enfermedad invasiva producida por una bacteria intracelular, *Listeria monocytogenes*. Además, es una zoonosis que en humanos afecta a grupos de riesgo bien definidos: mayores de 65 años, inmunodeprimidos, gestantes y neonatos. Este microorganismo posee la habilidad excepcional de cruzar barreras biológicas, causando generalmente aborto, septicemia o infección del sistema nervioso central, y su mortalidad es cercana al 30%^{1,2}.

La importancia de la listeriosis no está suficientemente reconocida, ya que se trata de una enfermedad relativamente poco común. De hecho, está considerada una enfermedad rara, y como tal está incluida en ORPHANET, el Consorcio Europeo para Enfermedades y Medicamentos Huérfanos.

A nivel europeo, de los 1.454 casos confirmados de listeriosis durante el año 2008 (últimos datos suministrados por el European Centre for Disease Prevention and Control [ECDC]), la mayoría (56%) correspondían a personas mayores de 65 años, con una incidencia de 0,94 casos/100.000, seguido de los niños menores de 5 años, con 0,35 casos/100.000 habitantes³. En nuestro país no existen datos de incidencia de la infección por *L. monocytogenes*, pues no se considera una enfermedad de declaración obligatoria. Desde 1999 la listeriosis se incluyó dentro de las enfermedades de declaración obligatoria en Andalucía, declarándose 50 nuevos casos en el año 2010, con una tasa de 0,60 casos/100.000 habitantes e incrementándose respecto a los 0,54 casos/100.000 habitantes del periodo 2003-2009⁴, lo que supone el doble que el declarado en la población europea.

En Europa, la mayoría de los casos de listeriosis no están vinculados a una fuente común, y por tanto se definen como esporádicos. Sin embargo, debido a las características epidemiológicas y clínicas de la enfermedad, los sistemas tradicionales de vigilancia no son capaces de detectar casos asociados, sobre todo cuando un número limitado de casos están dispersos en una amplia área geográfica.

La caracterización molecular de los aislados de origen humano de *L. monocytogenes* debería ser una parte esencial de la investigación epidemiológica. La combinación de métodos fenotípicos y genotípicos se ha demostrado altamente eficaz en la investigación de brotes de la enfermedad^{5,6}. La subtipificación a nivel molecular permite caracterizar *L. monocytogenes* más allá de la especie y subespecie, ayudando a diferenciar los brotes de enfermedad de los casos esporádicos y proporcionando una mejor comprensión de la relación entre los aislados y sus patrones de diseminación.

Varios estudios han demostrado que, en general, los brotes de listeriosis están causados por un pequeño número de cepas estrechamente relacionadas, lo que sugiere que estas cepas pueden pertenecer a grupos clonales bien definidos⁷⁻⁹. Así, se han descrito clones epidémicos que incluyen cepas que están genéticamente relacionadas e implicadas en uno o más brotes a lo ancho del mundo. Actualmente existen métodos moleculares para la detección de los clones epidémicos mas prevalentes: ECI, ECII y ECIII¹⁰, y estos podrían ser empleados de forma rutinaria en la caracterización de aislados procedentes de casos humanos¹¹.

El objetivo de este trabajo fue caracterizar microbiológicamente, tanto desde el punto de vista fenotípico como genotípico, 154 cepas de *L. monocytogenes* aisladas de casos humanos ocurridos en Andalucía en el periodo 2005-2009.

Material y métodos

Aislados bacterianos

El estudio incluyó a 154 aislados procedentes de casos de listeriosis humana. Ciento treinta y nueve se obtuvieron de los laboratorios de microbiología de 15 hospitales de Andalucía entre 2005 y 2009, en el marco del proyecto LISAND (colaboración de la Sociedad Andaluza de Microbiología y Parasitología y de la Sociedad Andaluza de Enfermedades Infecciosas para estudiar los casos humanos de listeriosis en Andalucía). Adicionalmente, se han incluido 15 aislados esporádicos humanos de *L. monocytogenes* que habían sido identificados por los mismos laboratorios desde 1993 hasta 2004. Todos los aislados se caracterizaron fenotípicamente según procedimientos recomendados¹². Noventa y ocho (64%) cepas habían sido aisladas de sangre, 46 cepas de líquido cefalorraquídeo (30%), 5 (3%) de líquido ascítico y 5 (3%) de otras procedencias (líquidos articular, pleural, peritoneal y biliar). El estudio no incluye aislados procedentes de casos neonatales. Cada aislado en este estudio representaba un caso de listeriosis humana. Ningún caso había sido asignado como perteneciente a brotes epidémicos.

Serotipado

El serotipado de los antígenos somáticos 1 y 4 de *L. monocytogenes* se realizó con antisueros comerciales para *Listeria* (BBL-Difco), de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

Complementariamente se realizó el estudio de serogrupos por PCR multiplex, de acuerdo con el método descrito por Doumith et al.¹³. Se utilizaron 5 parejas de cebadores para amplificar los genes *Lmo0737*, *Lmo1118*, ORF 2819, ORF 2110 y *prs*. Los fragmentos amplificados se sometieron a electroforesis en gel de agarosa al 2%.

Estudio de sensibilidad antibiótica

El estudio de la actividad de ampicilina y cotrimoxazol se realizó en agar Mueller-Hinton 5% sangre de caballo, mediante Epsilon-test (E-test. BioMerieux. Francia) según las instrucciones del fabricante, empleando una cepa de *Streptococcus pneumoniae* ATCC 49619 como control de calidad. Los valores de CMI fueron interpretados según recomendaciones CLSI¹⁴.

Electroforesis en campo pulsado

El estudio de las cepas mediante electroforesis en campo pulsado (PFGE) se realizó según el protocolo de PulseNet¹⁵, con pequeñas modificaciones¹⁶, empleando como enzima de restricción *Apal* y como estándar de referencia ADN de *Salmonella enterica* serotipo Braenderup H9812 digerido con *XbaI*.

La similitud de los perfiles de PFGE se evaluó utilizando el software Bionumerics version 5.1 (Applied Maths, Sint-Martens-Latem, Bélgica). El agrupamiento se realizó mediante la aplicación del coeficiente de correlación de Dice y el método UPGMA (Unweighted Pair Group Method Using Arithmetic Average), con un 1,5% de tolerancia según lo recomendado por Martin et al.¹⁷. El

Download English Version:

<https://daneshyari.com/en/article/3400895>

Download Persian Version:

<https://daneshyari.com/article/3400895>

[Daneshyari.com](https://daneshyari.com)