



Artículo original

Identificación de *Listeria monocytogenes* por amplificación del gen *iap* a partir de cultivos de *Listeria* sp. procedente de lugares de expendio de carne de res, pescado y verduras en Trujillo (Perú)

Identification of *Listeria monocytogenes* by *iap* gene amplification from cultures of *Listeria* sp. from places of sale of meat, fish and vegetables in Trujillo (Peru)

Pedro Mercado-Martínez; Darwin Zavaleta-Isquierdo; Vanessa Arroyo-Ulloa

Departamento de Microbiología y Parasitología. ²Escuela AP de Microbiología y Parasitología. Facultad de Ciencias Biológicas. Universidad Nacional de Trujillo. Trujillo. Perú

RESUMEN

A partir de cultivos de *Listeria* sp. procedentes de lugares de expendio de carne de res, pescado y verduras en Trujillo (Perú), se realizó la amplificación por PCR clásico de un fragmento de ADN conservado perteneciente al gen *iap* y limitado por los primers MonoA y Lis1B, para la identificación de *L. monocytogenes*. Para ello, se usó 37 cultivos de carne de res, 15 cultivos de pescado y 15 cultivos de verdura aislados e identificados fenotípicamente como pertenecientes al género *Listeria*; el procedimiento constó de tres etapas: (i) extracción del ADN molde de los cultivos aislados mediante la técnica del hervor para luego usando la técnica la PCR clásico, (ii) amplificación de los fragmentos conservados en el termociclador Applied Biosystems, obteniéndose en las muestras positivas 235 segmentos objetivos con un peso de 660 bp cada uno, el segmento de ADN amplificado se encuentra dentro del gen *iap* y es específico para *L. monocytogenes*, y (iii) corrido electroforético en gel de agarosa al 2% para luego ser comparados con el control positivo y determinado su peso molecular mediante el marcador ladder. Se obtuvo la identificación de *L. monocytogenes* en 10 de los 37 cultivos de carne de res, en tres de los 15 cultivos de pescado y en cuatro de los 15 cultivos de verduras.

Palabras clave: *Listeria monocytogenes*, PCR

ABSTRACT

From cultures of *Listeria* sp. from places of sale of meat, fish and vegetables in Trujillo (Peru), classical PCR amplification of a DNA fragment preserved *iap* gene belonging to and limited by the primers MonoA and Lis1B for identifying *L. monocytogenes* was performed. For this, 37 cultures of beef, 15 fish and 15 crops crops and vegetables isolated phenotypically identified as belonging to the genus *Listeria* was used; The procedure consisted of three stages: (i) removal of mold cultures isolated by the technique of boiling and then using the classical DNA PCR technique, (ii) amplification of the fragments stored in the Applied Biosystems thermocycler, resulting in samples 235 positive target segments with a weight of 660 bp each, the amplified DNA segment is within the *iap* gene and is specific for *L. monocytogenes*, and (iii) gel electrophoretic run 2% agarose and then be compared to the positive control and its molecular weight determined by the marker ladder. The identification of *L. monocytogenes* in 10 of the 37 cultures of beef, in three of the 15 cultures in four fish and vegetable crops 15 was obtained.

Keywords: *Listeria monocytogenes*, PCR

INTRODUCCIÓN

L. monocytogenes es un patógeno transmitido por el consumo de alimentos contaminados, puede causar una grave enfermedad invasiva conocida como listeriosis, principalmente en grupos de alto riesgo que incluye adultos mayores, pacientes inmunodeprimidos, mujeres embarazadas, recién nacidos e infantes; además, debido a su alta tasa de mortalidad en la población, la listeriosis ocupa el segundo lugar después de la salmonelosis, como causa más frecuente de muerte entre las enfermedades transmitidas por alimentos¹.

La listeriosis puede producirse por consumo de alimentos contaminados con *L. monocytogenes*, tales como, productos cárnicos, aves de corral, mariscos, pescados y productos lácteos, siendo la dosis infectante variable, dependiendo de varios factores tales como el estado inmune del individuo y la virulencia de la cepa ingerida².

La Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) es una técnica mediante la cual segmentos de ADN son amplificados usando una ADN polimerasa termoestable y dos cebadores o primers (oligonucleótidos, secuencias cortas de ADN específicas para un gen en particular), luego de desnaturarse el ADN los dos cebadores se unen a cada hebra respectivamente, delimitando la secuencia de ADN que se amplificará, entonces la ADN polimerasa reconoce los cebadores como puntos de iniciación de la polimerización, agregando dNTP (desoxinucleósidos trifosfatos) en la dirección 5'→3', y así sintetizar una nueva hebra de ADN; los fragmentos amplificados son detectados por electroforesis en gel de agarosa teñido con bromuro de etidio³. La PCR es una técnica fiable y reproducible para la identificación de *Listeria* spp. y diferenciación de *L. monocytogenes* de otras especies de *Listeria*, para esto se usan cebadores para genes de factores de virulencia o genes de subunidades de ARN; el principal obstáculo para el uso de la PCR en muestras directamente de comidas y ambientales, es la presencia de inhibidores de la PCR que podrían dar lugar a resultados falsos negativos. Para remover estos factores inhibitorios se emplean perlas magnéticas, tiras reactivas o membranas que permitan remover el ADN objetivo⁴.

La proteína p60 es una proteína extracelular de 60 KDa con actividad hidrolasa de la mureína, involucrada en la formación del septum durante la división celular y responsable de la invasión listerial en fagocitos no profesionales. El gen *iap* codifica la proteína asociada a la invasión p60 que es común en todas las especies de *Listeria*; una comparación anterior de secuencias de ADN indicó que es conservado y que ciertas porciones del gen son específicas para cada especie; por lo tanto, basándose en esto, una combinación de sólo cinco cebadores permite la detección específica y la diferenciación de especies de *Listeria*. Un cebador es derivado al extremo conservado 3' que es específico para todas las especies de *Listeria*, los otros cuatro cebadores son específicos para *L. monocytogenes*, *L. innocua*, *L. grayi* y las tres especies agrupadas *L. ivanovii*, *L. seeligeri* y *L. welshimeri*, respectivamente. Así, la técnica de PCR puede ser útil para la identificación y diferenciación de especies de *Listeria* aisladas de diferentes fuentes^{5,6}.

Finalmente, la identificación de *L. monocytogenes* por amplificación del fragmento de ADN conservado perteneciente al gen *iap* a partir de los cultivos de *Listeria* sp. nos proporcionará un elevado porcentaje de confiabilidad al determinar esta especie en los cultivos que fueron aislados e identificados fenotípicamente, además la identificación genotípica nos proporciona una mayor validez ya que la técnica de PCR tiene gran capacidad de sensibilidad y especificidad en la reacción, un gran poder discriminatorio y reproducibilidad, y es de fácil interpretación; al mismo tiempo, debido a su importancia como agente patógeno, la identificación de *L. monocytogenes* es de gran interés en salud pública.

MATERIALE Y MÉTODOS

Se usó 37 cultivos procedentes de lugares de expendio de carne de res, 15 cultivos procedentes de lugares de expendio de pescado y 15 cultivos procedentes de lugares de expendio de verdura identificados como *Listeria* sp.; se usó un par de cebadores diseñados a partir de un fragmento conservado de 660 bp perteneciente al gen *iap* específicos para identificar *L. monocytogenes*. La secuencia de nucleótidos se describe a continuación:

Mono A: 5'-CAAACCTGCTAACACAGCTACT-3'
Lis1B: 5'-TTATACGCGACCGAAGCCAAC-3'

Para la extracción y preparación del ADN molde se preparó, a partir de cultivos bacterianos aislados, un caldo de infusión de cerebro y corazón (BHI) y se dejó enriquecer de 20 - 24 horas a 35 °C luego se transfirió 1 mL de la suspensión a un tubo de microcentrífuga para centrifugar a 12 000 RPM/g por 3 minutos. El sobrenadante se eliminó y se resuspendió completamente el precipitado en 1 mL de NaCl al 0.85 % para luego centrifugar a 12 000 RPM/g por 3 minutos. El sobrenadante se eliminó y se resuspendió el precipitado en 1 mL de agua estéril y se hirvió durante 10 minutos. Finalmente se centrifugó a 12 000 RPM/g por 1 minuto, el sobrenadante fue separado y guardado como ADN molde a -20 °C.

Para el ensayo de PCR clásico se preparó el siguiente "master mix", el volumen final de la reacción fue de 22 µL, conteniendo 16 µL de agua ultra pura estéril, tampón de reacción MgCl₂ 2.5 µL; desoxirribonucleótidos trifosfato (dNTP) 1 µL, enzima Taq ADN polimerasa 0.5 µL, cebadores 1 µL de cada uno, y ADN genómico 1 µL. La amplificación del ADN se realizó en el Termociclador Applied Biosystems. Los productos obtenidos de la PCR fueron sometidos a un corrido electroforético.

RESULTADOS

En el primer corrido electroforético de ocho cultivos procedentes de carne de res sólo uno amplificó el ADN objetivo, en el segundo corrido se obtuvo la amplificación de cinco cultivos y en el tercer corrido se obtuvo la amplificación de cuatro muestras de los cultivos restantes (Figs. 1,2 y 3).

De los cultivos procedentes de verduras, se obtuvieron la amplificación de tres muestras en el primer corrido electroforético y una muestra en el segundo corrido; de los cultivos procedentes de pescado se obtuvo la amplificación de tres muestras en el corrido (Figs. 4, 5 y 6).

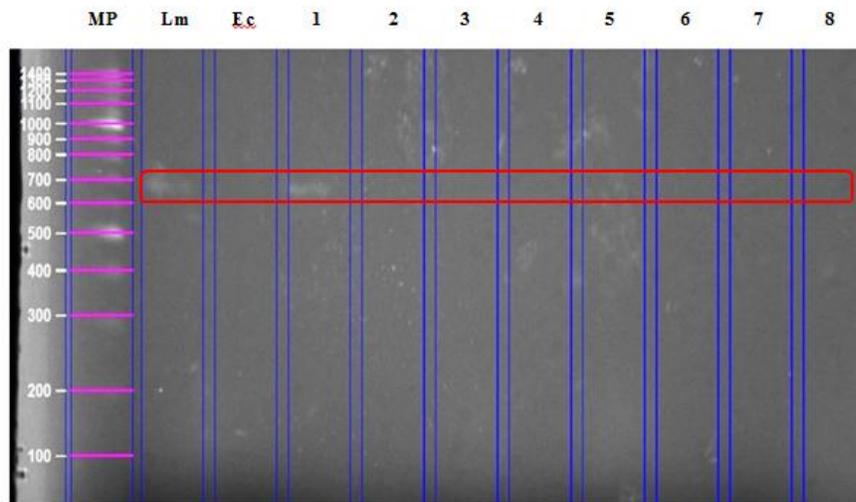


Fig. 1. Fragmento de ADN del gen *iap* amplificado en el cultivo 1 de 660 pb separado por electroforesis en gel de agarosa (MP, marcador de peso molecular ladder 100 bp; Lm, *Listeria monocytogenes* -control positivo-; Ec, *Escherichia coli* -control negativo-)

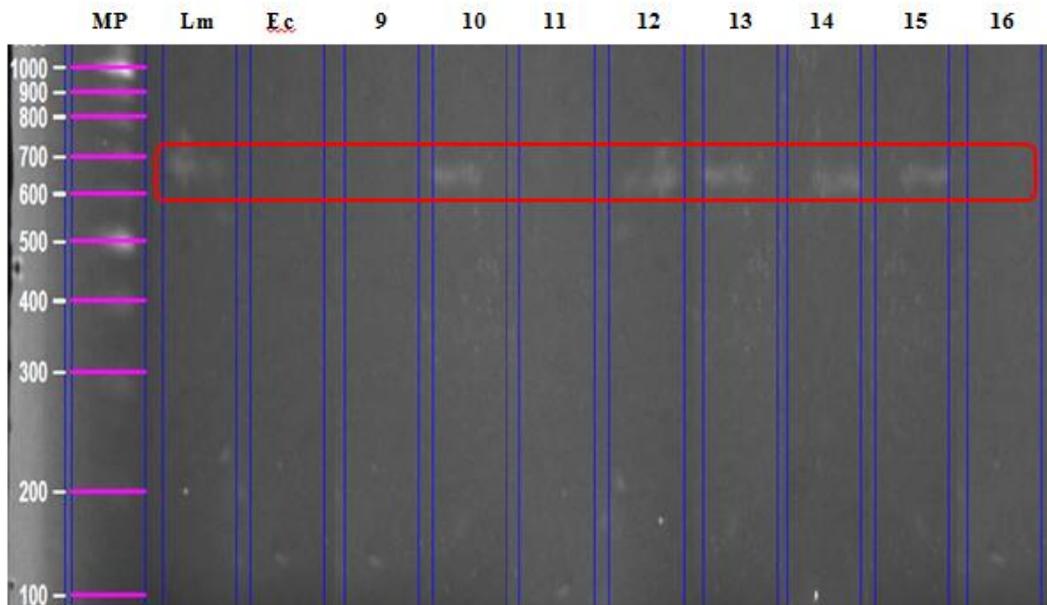


Fig. 2. Fragmentos de ADN amplificados del gen *iap* en los cultivo 10, 12, 13, 14 y 15 de 660 pb separado por electroforesis en gel de agarosa (MP, marcador de peso molecular ladder 100 bp; Lm, *Listeria monocytogenes* -control positivo-; Ec, *Escherichia coli* -control negativo-).

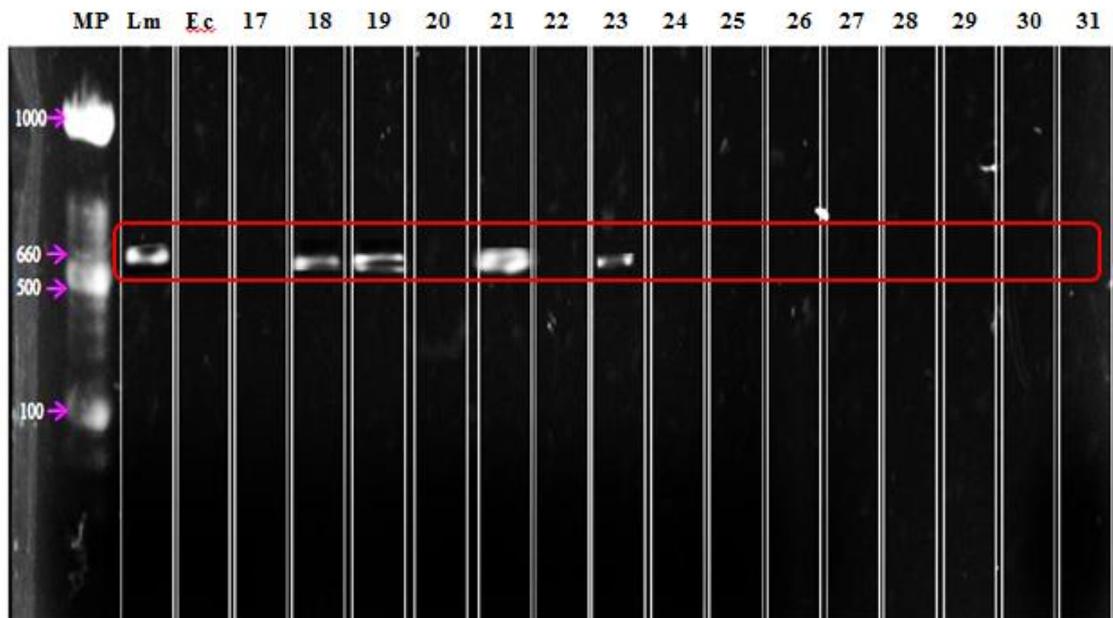


Fig. 3. Fragmentos de ADN amplificados del gen *iap* en los cultivo 18, 19, 21 y 23 de 660 pb separado por electroforesis en gel de agarosa (MP, marcador de peso molecular ladder 100 bp; Lm, *Listeria monocytogenes* -control positivo-; Ec, *Escherichia coli* -control negativo-).

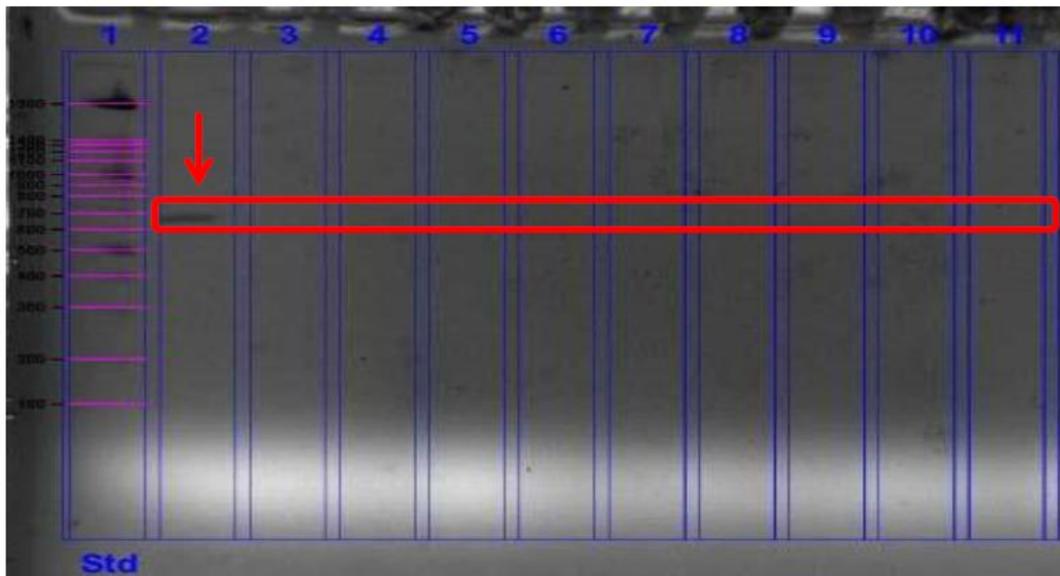


Fig. 4. Fragmentos de ADN amplificados del gen *iap* de *Listeria monocytogenes* separados por electroforesis en gel de agarosa: El marcador ladder 100pb (Pocillo 1). Cultivo 11 al 15 de verdura (pocillos 2, 3, 4, 5, 6) y cultivo 01 al 05 de pescado (7 ,8 ,9 ,10 ,11).

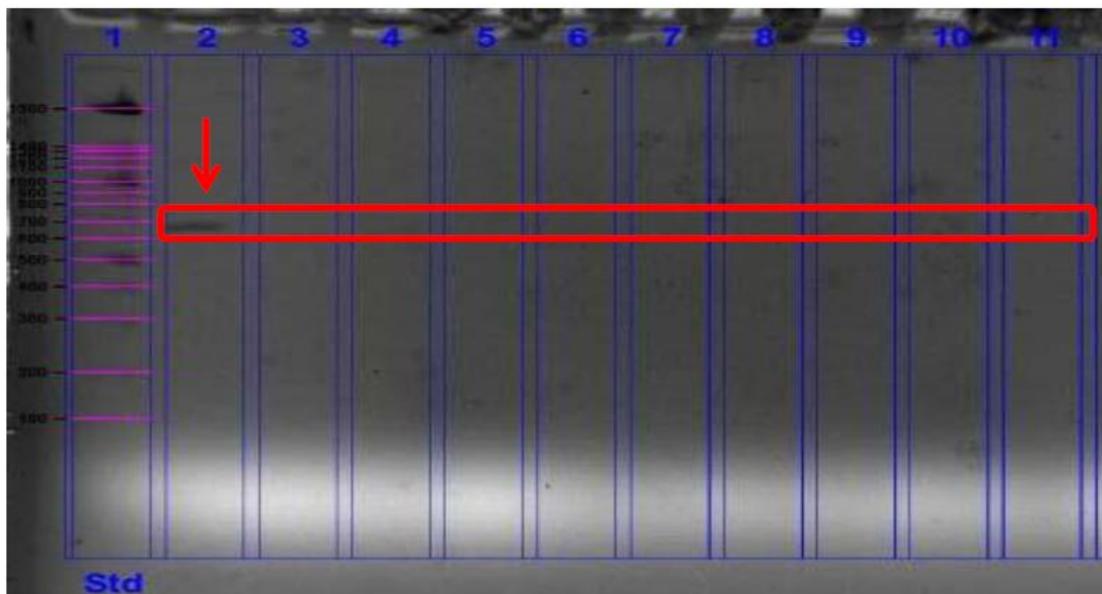


Fig. 5. Fragmentos de ADN amplificados del gen *iap* de *Listeria monocytogenes* separados por electroforesis en gel de agarosa: El marcador ladder 100pb (Pocillo 1). Cultivo 11 al 15 de verdura (pocillos 2, 3, 4, 5, 6) y cultivo 01 al 05 de pescado (7 ,8 ,9 ,10 ,11).

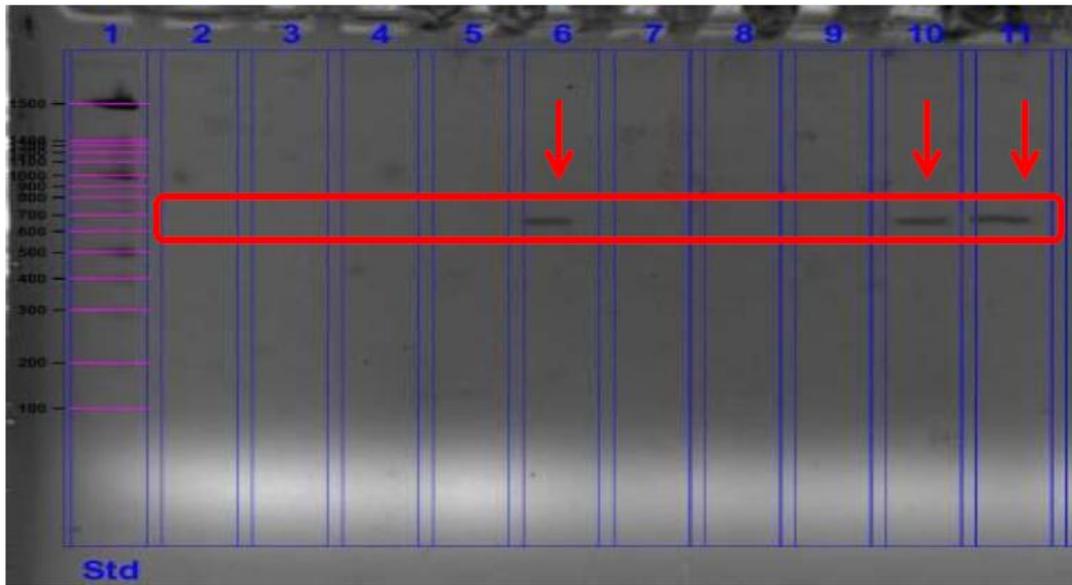


Fig. 6. Fragmentos de ADN amplificados del gen *iap* de *Listeria monocytogenes* separados por electroforesis en gel de agarosa: El marcador ladder 100pb (Pocillo 1). Cultivo 06 al 15 de pescado (Pocillos 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11).

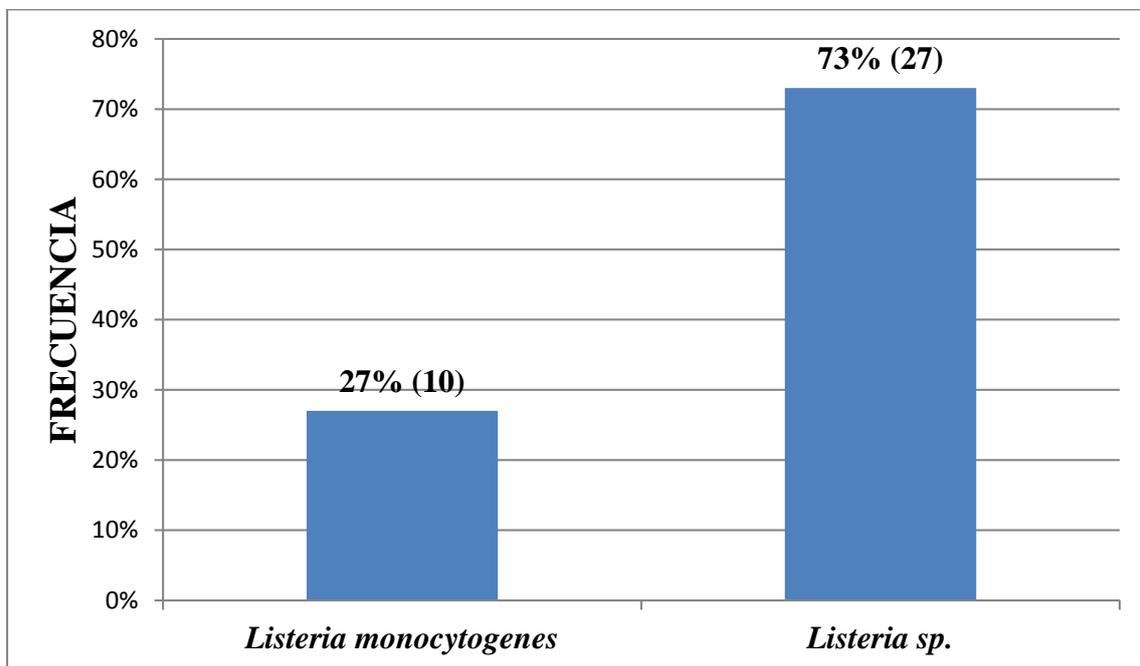


Fig. 7. Frecuencia de la especie *Listeria monocytogenes* identificada usando PCR clásico a partir de cultivos de *Listeria sp.* procedentes de lugares de expendio de carne de res en Trujillo ($p < 0.05$)

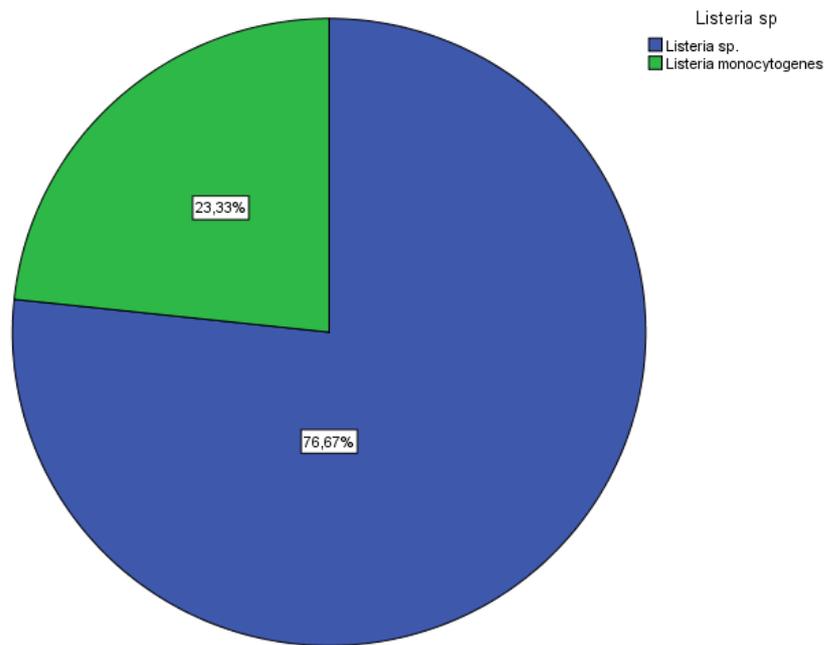


Fig. 8. Frecuencia de *Listeria* sp y *Listeria monocytogenes* identificadas mediante la amplificación del gen *iap* procedentes de lugares de expendio de verduras y pescados en Trujillo (Perú).

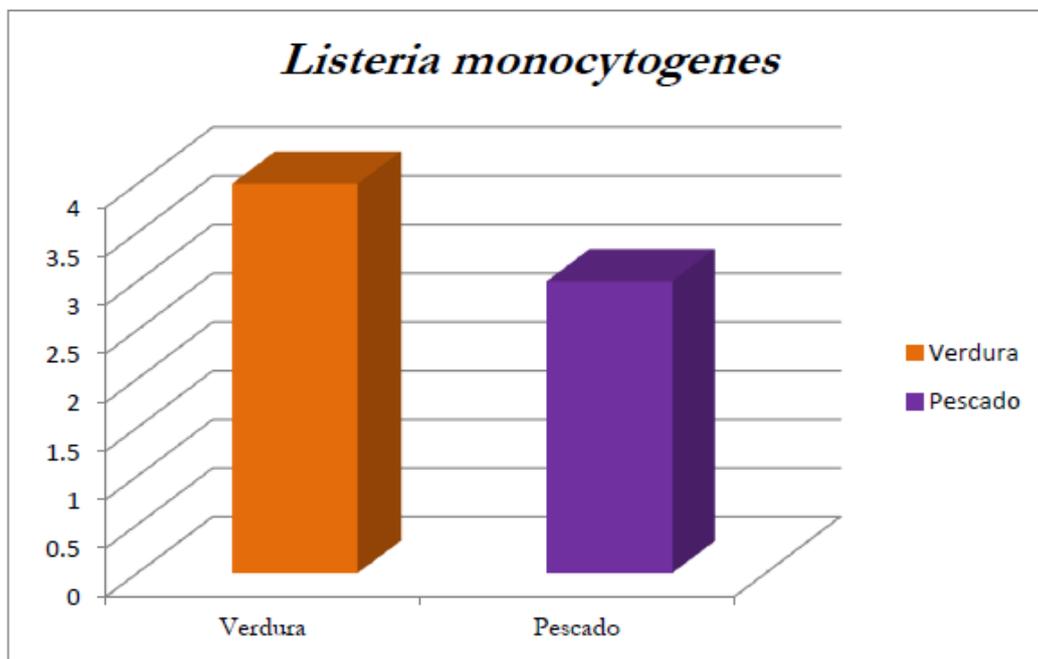


Fig. 9. Comparación de frecuencia de *Listeria monocytogenes* identificadas mediante la amplificación del gen *iap* procedentes de lugares de expendio de verduras y pescados en Trujillo ($p < 0,05$)

DISCUSIÓN

La identificación de la especie *Listeria monocytogenes* por amplificación del fragmento de ADN conservado perteneciente al gen *iap* nos garantizó la fiabilidad de los resultados obtenidos, lo cual evidencia la presencia significativa de este patógeno en un 27% de los cultivos de *Listeria* sp. procedentes de lugares de expendio de carne de res en Trujillo, lugares que resultan ser fuentes de desarrollo y diseminación de este microorganismo causante de la listeriosis, enfermedad que hoy en día ocupa el segundo lugar después de la salmonelosis, como causa más frecuente de muerte entre las enfermedades que son transmitidas por alimentos. En la Gráfica N°1 observamos que existe diferencia significativa entre la presencia de *Listeria monocytogenes* con un 27% y *Listeria* sp. con un 73%, lo cual evidencia que en los lugares dónde se aislaron estos cultivos tienen inadecuadas prácticas de limpieza para este patógeno.

En la Gráfica N° 2 se observa que de un total de 30 cultivos de *Listeria* sp provenientes de lugares de expendio de verduras y pescados en Trujillo, se identificó molecularmente 7 cultivos como *Listeria monocytogenes* mediante PCR clásico, lo cual evidencia presencia significativa de éste patógeno en un 23.33% de los cultivos de *Listeria* sp evaluados.

En la Gráfica N° 3 observamos que existe diferencia significativa entre las muestras que corresponden a las obtenidas de lugares de expendio de verduras con 4 muestras positivas en comparación con las obtenidas de lugares de expendio de pescado con 3 muestras positivas.

Los cebadores usados en esta investigación Mono A y Lis1B evidenciaron su alta especificidad al reconocer el segmento objetivo de 660 pb del gen *iap* específico para *Listeria monocytogenes* y no para otras especies de *Listeria*. La técnica de PCR puede ser útil para la identificación y diferenciación entre especies del género *Listeria* aisladas de diferentes fuentes. Sin embargo en esta investigación la elección del segmento objetivo de 660 pb ubicado en el gen *iap* fue en base a estudios anteriores en el cual se determinó el uso de los cebadores Mono A y Lis1B para la identificación de *L. monocytogenes* mediante PCR clásico, ya que en el ensayo PCR múltiple para la identificación de *L. monocytogenes* se emplea el cebador específico para el gen *hly*, la amplificación con este cebador produce segmentos objetivos de ADN de 210 pb. Se conoce que una causa frecuente de falsos negativos y/o amplificaciones atenuadas de fragmentos objetivos por PCR clásico, es debido a inhibidores orgánicos e inorgánicos presentes en las muestras de ADN contaminadas que actúan directamente inhibiendo la acción de la Taq polimerasa.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Rebagliati V, Philippi R, Rossi M, Troncoso A. Prevention of foodborne listeriosis. *Indian J Pathol Microbiol* 2009; 52(2): 145-149.
2. El-Shenawy M, Mañes J, Soriano JM. *Listeria* spp. in Street-vended ready-to-eat foods. *Interdiscip Perspect Infect Dis*. 2011 Dec 12 [Epub ahead of print].
3. Mullis KB, Faloona F, Scharf S, Saiki R, Horn G, Erlich H. Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: The Polymerase Chain Reaction. *Cold Spring Harbor Symp Quant Biol* 1986; 51: 263-273.
4. Gasanov U, Hughes D, Hansbro PM. Methods for the isolation and identification of *Listeria* spp. and *Listeria monocytogenes*: a review. *FEMS Microbiol Rev* 2005; 29 (5): 851-875.
5. Bubert A, Hein I, Rauch M, Lehner A, Yoon B, Goebel W, et al. Detection and differentiation of *Listeria* spp. by a single reaction based on multiplex PCR. *Appl. Environ. Microbiol* 1999; 65 (10):4688-4692.
6. Villegas M. Caracterización molecular de cepas clínicas de *Listeria monocytogenes* aisladas en el Hospital Madre Niño San Bartolomé de Lima durante el período 2001-2005. Universidad Nacional Mayor de San Marcos. 2010.