

Epidemiología molecular de las infecciones por *Listeria monocytogenes* en un área de Madrid durante un período de 3 años (2001-2003)

Mónica García-Álvarez, Fernando Chaves, Francisca Sanz y Joaquín R. Otero

Servicio de Microbiología. Hospital 12 de Octubre. Madrid. España.

INTRODUCCIÓN. Durante el año 2003 hubo un incremento de casos de listeriosis diagnosticados en un hospital terciario de Madrid. Los objetivos del presente estudio fueron revisar las características clínicas de los casos diagnosticados, y estudiar la relación clonal entre los aislados clínicos de *Listeria monocytogenes*.

MÉTODOS. Se realizó un estudio retrospectivo de todos los pacientes diagnosticados de listeriosis en el Hospital 12 de Octubre durante el período de 2001 a 2003. Se revisaron las historias clínicas de los pacientes, y en todos los aislados clínicos se realizó serotipificación y electroforesis en campo pulsante (ECP) con las enzimas *AscI* y *SmaI*.

RESULTADOS. Se diagnosticaron un total de 18 pacientes: cuatro en el año 2001, dos en 2002 y 12 en el año 2003. Las tasas estimadas fueron: 7,3 casos/1.000.000 habitantes para el año 2001, 3,6 para el año 2002 y 21,8 para el año 2003. El serotipo más frecuente fue el 4b (66,7%), al que pertenecían el 83,3% de los casos diagnosticados en el año 2003. La ECP puso de manifiesto 12 patrones moleculares distintos, uno de los cuales fue común a 5 casos del año 2003.

CONCLUSIÓN. La aparente expansión de un clon de *L. monocytogenes* durante el año 2003 contribuyó en parte al incremento de la incidencia de listeriosis en ese año. Las técnicas de epidemiología molecular son muy útiles para la detección de posibles brotes de origen alimentario, y deberían promover investigaciones complementarias sobre la naturaleza de los alimentos implicados.

Palabras clave: *Listeria monocytogenes*. Epidemiología molecular. Listeriosis. Electroforesis en campo pulsante.

Molecular epidemiology of *Listeria monocytogenes* infections in a health district of Madrid in a 3-year period (2001-2003)

INTRODUCTION. During 2003, an increase in the number of cases of listeriosis was observed in a tertiary hospital in Madrid. The objectives of this study were to review the

clinical characteristics of the cases diagnosed from 2001 to 2003 and to investigate clonal relationships among the clinical isolates of *Listeria monocytogenes*.

METHODS. A retrospective analysis was performed of all cases of listeriosis diagnosed in Hospital 12 de Octubre (Madrid) during 2001-2003. Clinical records for each patient were reviewed and all clinical isolates were compared using serotyping and pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) with the *AscI* and *SmaI* restriction enzymes.

RESULTS. A total of 18 patients were diagnosed: 4 in 2001, 2 in 2002, and 12 in 2003. The estimated incidence rates were 7.3 cases per 1,000,000 inhabitants in 2001, 3.6 in 2002 and 21.8 in 2003. The most frequent serotype during the study period was 4b (66.7%), and this serotype represented 83.3% of the cases diagnosed in 2003. PFGE yielded 12 different genotypes; one of them (PFGE type G) was common to 5 cases diagnosed in 2003.

CONCLUSION. The expansion of a single clone of *L. monocytogenes* during 2003 partially contributed to increasing the incidence of listeriosis that year. Molecular epidemiology techniques are useful for detecting outbreaks of a possible foodborne origin and their results should promote epidemiological studies to investigate the food products involved.

Key words: *Listeria monocytogenes*. Molecular epidemiology. Listeriosis. Pulsed-field gel electrophoresis.

Introducción

La listeriosis es una infección asociada al consumo de alimentos contaminados por *Listeria monocytogenes*. Los rasgos clínicos de esta infección van desde un síndrome gripal leve hasta meningitis o meningoencefalitis. El microorganismo actúa como patógeno cuando las condiciones del huésped son favorables para su desarrollo (embarazadas, neonatos, ancianos e inmunodeprimidos), llegando a causar unas tasas de mortalidad del 20-30%¹.

Aunque la mayoría de los casos de listeriosis parecen ser esporádicos, en las últimas décadas se han identificado varios brotes epidémicos relacionados con el consumo de diversos alimentos². En general, es difícil diferenciar los brotes epidémicos de los casos esporádicos. Esto se debe principalmente a dos motivos: en primer lugar, el período de incubación de la listeriosis es largo, entre 7 y 60 días,

Correspondencia: Dr. F. Chaves.
Servicio de Microbiología. Hospital 12 de Octubre.
Avda. de Córdoba, s/n. 28041 Madrid. España.
Correo electrónico: fchaves.hdoc@salud.madrid.org

Manuscrito recibido el 18-3-2005; aceptado el 7-6-2005.

lo que dificulta la identificación del alimento causante de la infección, y en segundo lugar, los casos que llegan a los centros sanitarios son aquellos que se dan en personas susceptibles de desarrollar cuadros graves, es decir, sólo vemos la punta del *iceberg*³.

Con el fin de poder identificar brotes epidémicos se han desarrollado diversas técnicas fenotípicas y genotípicas para el subtipado de *L. monocytogenes*^{4,5}. Entre las primeras, la serotipificación es la técnica clásica, aunque su poder de discriminación es bajo, ya que más del 90% de los aislados en humanos pertenecen a 3 de los 13 serotipos conocidos (1/2a, 1/2b y 4b)⁶. Las técnicas genotípicas tienen un poder de discriminación más elevado y algunos autores propugnan que la electroforesis en campo pulsante (ECP) sea la técnica de referencia⁶.

Durante el año 2003 hubo un incremento de casos de listeriosis diagnosticados en nuestro hospital. La razón de este incremento no estaba clara. Los objetivos de nuestro estudio fueron revisar las características clínicas de los casos diagnosticados en nuestra área de salud durante el período 2001-2003, y estudiar la relación clonal de los aislados clínicos de *L. monocytogenes* con el fin de identificar posibles brotes epidémicos.

Métodos

Pacientes y características del estudio

Se realizó un estudio retrospectivo de todos los pacientes diagnosticados de listeriosis en el Hospital 12 de Octubre de Madrid durante el período 2001-2003. Este hospital es el centro de referencia del Área de Salud N.º 11 de Madrid y atiende a una población aproximada de 550.000 habitantes. Las muestras clínicas fueron procesadas siguiendo los protocolos establecidos en nuestro laboratorio. La identificación bacteriana y la determinación de la sensibilidad a los antimicrobianos se realizaron mediante el sistema Wider (Soria Melguizo, Madrid, España). Los aislados clínicos fueron conservados a -70 °C. La información demográfica y clínica fue recogida mediante revisión de las historias clínicas de los pacientes.

Serotipificación

La serotipificación de los aislados clínicos se realizó en el Centro Nacional de Microbiología (Majadahonda, Madrid, España) mediante aglutinación con antisueros, de acuerdo al método descrito por Seeliger y Höhne⁶.

Electroforesis en campo pulsante

Se realizó según el método previamente descrito por Lukinmaa et al.³. Los aislados clínicos se recuperaron en placas de agar sangre, incubándose a 37 °C durante 18-24 h. Se tomó una colonia y se suspendió en medio líquido LB, incubándose a 37 °C en agitación durante 18 h. Los cultivos se centrifugaron a 3.000 rpm durante 15 min, se retiró el sobrenadante y el sedimento se resuspendió en 1 ml de *buffer* TE. De nuevo se centrifugó y el sedimento resultante se resuspendió con 200 µl de tampón PIV (10 mM Tris [pH 7,6], 1 M NaCl). Esta suspensión se mezcló a partes iguales con agarosa especial al 2% (Biorad, Richmond, USA). Los bloques se incubaron a 37 °C durante 5 h en un tampón de 6 mM Tris-HCl, 1 M NaCl, 100 mM EDTA suplementado con 10 mg/ml de lisozima y 5 mg/ml de ARNasas y de nuevo a 50 °C durante toda la noche en un tampón suplementado con 20 ng/ml de proteinasa K. Se realizaron 4 lavados de los bloques de 15 min cada uno con tampón TE 1x a temperatura ambiente. El ADN fue digerido a 37 °C durante 18-24 h de forma independiente con 25 U de *AscI* (New England Biolabs Inc., Beverly, Mass.) y 60 U de *SmaI* (New England Biolabs Inc., Beverly, Mass.), respectivamente. La electrofore-

sis se realizó en geles de agarosa al 1% en el sistema CHEF DRIII (Biorad, Richmond, USA). Las condiciones de electroforesis con *AscI* fueron de 22 h, pulsos de 4 a 40 s, temperatura de 14 °C, y voltaje 6 V/cm, y cuando se empleó *SmaI* fueron de 11,5 h, pulsos de 5 a 15 s en un primer bloque y de 15 a 40 s en un segundo bloque. Como marcador molecular se utilizó *lambda ladder*. El análisis de los patrones moleculares se realizó con el programa informático Bionumerics (Applied Maths, Kortrijk, Bélgica). Se consideró que dos o más aislados de *L. monocytogenes* formaban parte del mismo clon si sus patrones moleculares eran indistinguibles mediante la técnica de ECP, tanto con la enzima *AscI* como con *SmaI*.

Resultados

Durante el período de estudio 18 pacientes fueron diagnosticados de listeriosis en nuestro hospital: 4 pacientes en el año 2001, dos en el 2002 y 12 pacientes en el año 2003. Las tasas estimadas fueron: 7,3 casos/1.000.000 habitantes para el año 2001, 3,6 para el año 2002, y 21,8/1.000.000 para el año 2003. Los pacientes se distribuían en 4 casos en neonatos y 14 en pacientes adultos. Las características demográficas y clínicas de los pacientes se presentan en la tabla 1.

Características de los pacientes

Todos los casos neonatales fueron considerados como sepsis de comienzo precoz (< 72 h). La edad gestacional media fue de 32 semanas (rango: 25 a 34 semanas), y el peso medio al nacer de 2.132 g (rango: 850-3.100 g). Tres de los casos neonatales tuvieron como antecedente clínico fiebre intraparto superior a 38 °C, pero en ninguno de los casos se dispuso de muestras clínicas de las madres para el aislamiento de *L. monocytogenes*. Ninguno de los casos neonatales falleció.

En todos los pacientes adultos el motivo de ingreso estuvo en relación con el aislamiento de *L. monocytogenes* y ningún caso se consideró como de adquisición intrahospitalaria. La edad media de los pacientes adultos fue de 59 años (rango: 35-78 años). Doce de los 14 (85,7%) pacientes adultos eran varones. Todos los pacientes tuvieron al menos un factor predisponente, siendo los más frecuentes: hepatopatía crónica (6 casos) y tumores sólidos malignos (4 casos). Uno de los pacientes de la serie tenía como factor predisponente, además de la hepatopatía crónica por virus de la hepatitis C (VHC), la coinfección por el virus de la inmunodeficiencia humana tipo 1 (VIH-1). Cuatro de los pacientes fallecieron en los 15 días posteriores al cuadro de listeriosis.

Tipificación de los aislados clínicos de *L. monocytogenes*

Se dispuso de 18 aislados clínicos de *L. monocytogenes* correspondientes a los 18 pacientes para estudios de tipificación. Doce casos pertenecían al serotipo 4b (66,7%), tres al serotipo 1/2a (16,7%), dos al serotipo 1/2b (11,1%) y uno al serotipo 1/2c (5,6%). Durante el período de estudio se observó que en el año 2003 correspondieron al serotipo 4b 10 de los 12 casos (83,3%). El análisis mediante electroforesis en campo pulsante, tanto con *AscI* como con *SmaI*, produjo 12 genotipos diferentes, si bien la interpretación de los resultados obtenidos con *AscI* fue más sencilla (fig. 1 y tabla 1). Un genotipo (patrón molecular G) fue compartido por 5 casos, dos genotipos (A y B) fueron com-

TABLA 1. Características clínicas y microbiológicas de los casos de listeriosis

Caso n.º	Fecha aislamiento	Sexo	Edad (años)	Tipo de muestra	Factores predisponentes	Forma clínica	Serotipo	Patrón ECP
1	07/05/01	V	39	Sangre, LCR	VHB, VHC	Meningitis	1/2b	A
2	07/06/01	M	3 días	Sangre, LCR	Fiebre intraparto materna	Meningitis	4b	B
3	09/08/01	V	52	Sangre	Trasplante renal, hemodiálisis, corticoides	Sepsis	1/2c	C
4	14/11/01	V	1 día	Sangre, exudado ótico	ND	Sepsis	1/2a	D
5	21/08/02	V	66	Sangre	Cáncer de pulmón, quimioterapia	Sepsis	4b	E
6	02/12/02	M	1 día	Sangre, exudado ótico	Fiebre intraparto materna	Sepsis	1/2a	F
7	20/01/03	M	1 día	Sangre	Fiebre intraparto materna	Sepsis	4b	G
8	10/02/03	V	58	Líquido ascítico	Cirrosis, alcoholismo	Peritonitis	4b	H
9*	24/02/03	V	78	Sangre	IRC, hemodiálisis, cáncer de próstata	Sepsis	4b	I
10	06/03/03	V	35	Sangre	VIH, VHC	Sepsis	4b	J
11*	27/03/03	M	72	LCR	VHC	Meningitis	4b	G
12	28/03/03	V	58	Sangre	IRC, hemodiálisis	Sepsis	4b	G
13	02/05/03	V	59	Sangre	VHC, alcoholismo	Sepsis	4b	K
14	04/05/03	M	66	Sangre, LCR	Cirrosis, VHB, corticoides	Meningitis	4b	G
15*	01/06/03	V	77	Sangre	Cáncer de pulmón, radioterapia	Sepsis	4b	G
16*	17/07/03	V	57	Sangre	Cáncer de pulmón	Sepsis	1/2a	A
17	16/09/03	V	51	Sangre	LES	Sepsis	4b	B
18	19/12/03	V	72	LCR	IRC	Meningitis	1/2b	L

*Fallecen en los 15 días posteriores al cuadro de listeriosis.

ECP: electroforesis en campo pulsante; LCR: líquido cefalorraquídeo; V: varón; M: mujer; VHB: virus de la hepatitis B; VHC: virus de la hepatitis C; VIH: virus de la inmunodeficiencia humana; IRC: insuficiencia renal crónica; LES: lupus eritematoso sistémico; ND: dato no disponible.

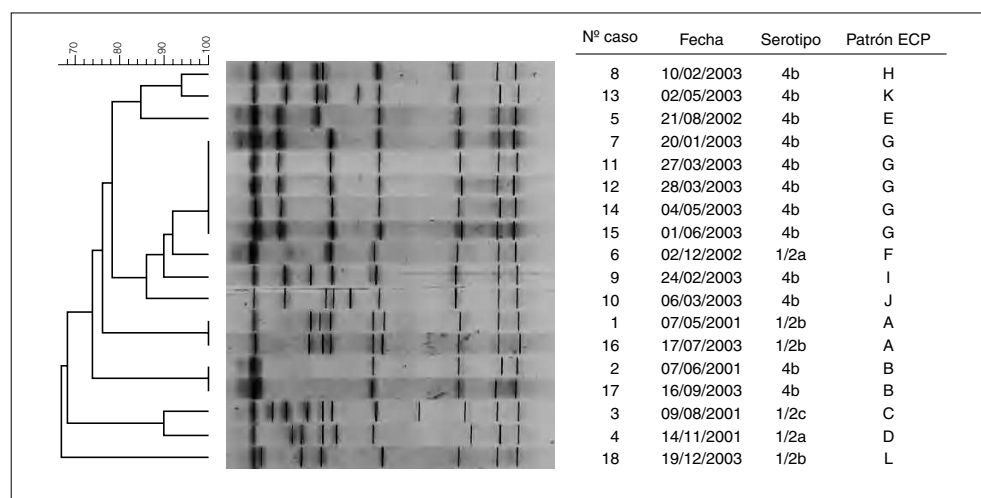
partidos por 2 casos cada uno, y nueve genotipos fueron considerados únicos. Todos los casos que compartían un idéntico patrón molecular tenían a su vez idéntico serotipo. De los 12 casos de listeriosis producidos en el año 2003, cinco presentaban el genotipo G, agrupándose entre los meses de enero a junio de ese año.

Discusión

En el presente trabajo es de destacar el aumento en la incidencia de listeriosis en el año 2003 (21,8/1.000.000) en nuestra área de salud, que se produjo a expensas de un clon de *L. monocytogenes*, responsable de 5 de los 12 casos

de listeriosis. Este clon, con el patrón de ECP G, afectó a 5 pacientes durante el primer semestre de ese año. Un estudio de epidemiología molecular realizado en el estado de Nueva York durante los años 1996-2000, demostraba que el 31% de los casos de listeriosis en humanos declarados eran producidos por cepas con idéntico patrón molecular, y estos casos pudieran representar brotes producidos a partir de una misma fuente alimentaria². Probablemente, gran parte de los casos de listeriosis que llegan a nuestros hospitales no son los casos esporádicos que aparentan ser, sino que forman parte de brotes, con una única fuente alimentaria, que la mayor parte de las veces pasan inadvertidos. Las técnicas de epidemiología molecular son una herramienta muy útil para la detección y control de los

Figura 1. Dendograma con los patrones de electroforesis en campo pulsante (ECP) con la enzima AscI de los aislados clínicos de *Listeria monocytogenes*. La escala en la parte superior izquierda representa el porcentaje de similitud.



brotes de origen alimentario, y deberían promover investigaciones complementarias sobre la naturaleza de los alimentos implicados. Aunque la incidencia de listeriosis documentada es baja, hay que tener en cuenta la variabilidad existente según la zona geográfica. Aun así, los sistemas de vigilancia están de acuerdo en que la verdadera incidencia de listeriosis está infravalorada⁸.

La listeriosis era considerada clásicamente una infección que afecta sobre todo a mujeres embarazadas y neonatos⁹, pero en los últimos años ha cobrado especial importancia en pacientes inmunodeprimidos y en pacientes con enfermedades crónicas. Nuestros hallazgos confirman esta tendencia, con sólo 4 casos de listeriosis diagnosticados en neonatos, frente a 14 en adultos. Los factores de riesgo que aparecen en nuestra serie ya han sido descritos anteriormente en la literatura médica como el alcoholismo, la insuficiencia renal crónica, la utilización de corticoides, el cáncer o la hepatopatía crónica⁹⁻¹². En contra de lo que cabría esperar, la incidencia de listeriosis en los pacientes infectados por el VIH-1 es baja, situación que también se refleja en nuestro país y que se ha explicado por diversas hipótesis, aunque ninguna de ellas es concluyente¹³. En los neonatos la infección por *L. monocytogenes* es bien conocida, y la presencia de fiebre materna intraparto superior a 38 °C constituye un factor de riesgo para ésta y otras infecciones de transmisión vertical¹⁴. No sorprende que la presentación clínica más habitual en nuestra serie sea la sepsis y la meningitis, al igual que en otras publicadas⁹, sin embargo, merece especial atención el caso de peritonitis bacteriana espontánea que, si bien ya ha sido descrito previamente asociado a cirrosis¹⁵, no es una presentación habitual.

Más del 90% de los aislamientos de *L. monocytogenes* en humanos pertenecen a los serotipos 1/2a, 1/2b y 4b; estos serotipos fueron también los aislados con mayor frecuencia en nuestros pacientes y además que en el año 2003 se produjo un incremento de casos, a expensas del serotipo 4b. Otros estudios realizados en España¹⁶, señalan que el 81,7% de los aislados clínicos procedentes de humanos y animales pertenecen al serotipo 4b. Esta evolución de los serotipos contrasta con la publicada en otros trabajos^{3,8}, en los que se observa un descenso en la prevalencia del serotipo 4b a expensas de un incremento de los serotipos 1/2a y 1/2b. Tampoco se ha observado ninguna correlación entre genotipo y serotipo, aunque quizá nuestra serie no sea lo suficientemente amplia como para poner de manifiesto una correlación que otros autores sí han descrito^{17,18}.

La listeriosis es una infección transmitida por determinados alimentos, y el estudio de los serotipos de las cepas aisladas en alimentos y en humanos ha servido para identificar las vías de transmisión de la infección, y así poder controlar la cadena alimentaria. Estudios como el de De Simón et al¹⁹ muestran una mayor prevalencia del serotipo 4b en las cepas que se aíslan de los alimentos, lo cual explicaría a su vez la elevada prevalencia de dicho serotipo en humanos.

La listeriosis es un problema de salud pública y por ello se realizan controles de *L. monocytogenes* en la industria

alimentaria. Sin embargo, en España no se considera una enfermedad de declaración obligatoria, lo que dificulta la vigilancia de posibles brotes epidémicos. Dada la elevada morbilidad y mortalidad de esta infección, sería recomendable plantearse realizar los estudios epidemiológicos necesarios para detectar y erradicar estos brotes.

Agradecimientos

Los autores agradecen al Dr. Julio Vázquez del Centro Nacional de Microbiología por la serotipificación de los aislados clínicos de *L. monocytogenes*, y al Dr. Fernando Dronda por sus comentarios y sugerencias.

Bibliografía

1. Bille J, Rocourt J, Swaminathan B. *Listeria* and *erysiplothrax*. En: Murray P, Baron ET, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover R, editors. *Manual of Clinical Microbiology*. 8ª ed. Washington: American Society for Microbiology; 2003. p. 461-71.
2. Sauters BD, Fortes ED, Morse DL, Dumas N, Kiehlbauch JA, Schukken Y, et al. Molecular subtyping to detect human listeriosis clusters. *Emerg Infect Dis*. 2003;9:672-80.
3. Lukinmaa S, Miettinen M, Nakari UM, Korkeala H, Siitonen A. *Listeria monocytogenes* isolates from invasive infections: variation of sero- and genotypes during an 11-year period in Finland. *J Clin Microbiol*. 2003;41:1694-700.
4. Schuchat A, Swaminathan B, Broome CV. Epidemiology of human listeriosis. *Clin Microbiol Rev*. 1991;4:169-83.
5. Wiedmann M. Methods in nutrition science- subtyping of bacterial foodborne pathogens. *Nutr Rev*. 2002;60:201-8.
6. Wiedmann M. Molecular subtyping methods for *Listeria monocytogenes*. *J AOAC Int*. 2002;85:524-31.
7. Seeliger HP, Höhne K. Serotyping of *Listeria monocytogenes* and related species. *Methods Microbiol*. 1979;13:31-49.
8. Hjaltestad E, Gudmundsdottir S, Jonsdottir K, Kristinsson KG, Olafur S, Kristjansson M. Listeriosis in Iceland, 1978-2000: a description of cases and molecular epidemiology. *Scand J Infect Dis*. 2002;34:735-41.
9. Julián A, Jiménez A, De Górgolas M, Fernández R, Fernández ML. Infecciones por *Listeria monocytogenes* en el adulto. Aspectos clínicos y microbiológicos de una enfermedad cambiante. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2001;19:297-303.
10. Rivero GA, Torres HA, Rolston KV, Kontoyiannis DP. *Listeria monocytogenes* in patients with cancer. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2003;47:393-8.
11. Rettaly CA, Speeg KV. Infection with *Listeria monocytogenes* following orthotopic liver transplantation: case report and review of the literature. *Transplant Proc*. 2003;35:1485-7.
12. Beebe JL, Koneman EW. Recovery of uncommon bacteria from blood: association with neoplastic disease. *Clin Microbiol Rev*. 1995;8:336-56.
13. Guerra J, Muñelo I, Pérez-Simón MR, Blanco B, Carro JA, Alcoba M. Listeriosis en pacientes con infección por el virus de la inmunodeficiencia humana en España. Aportación de tres casos y revisión de la literatura. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2004;22:18-21.
14. Zach T. Listeria infection. *Emedicine [revista electrónica]* 2003 diciembre. Disponible en: <http://www.emedicine.com/ped/topic1319.htm>
15. Nolla-Salas J, Almela M, Gasser I, Latorre C, Salvado M, Coll P. Spontaneous *Listeria monocytogenes* peritonitis: a population-based study of 13 cases collected in Spain. *Am J Gastroenterol*. 2002;97:1507-11.
16. Vela AI, Fernández-Garayzabal JF, Vázquez JA, Latre MV, Blanco MM, Moreno MA, et al. Molecular typing by pulsed-field gel electrophoresis of Spanish animal and human *Listeria monocytogenes* isolates. *Appl Environ Microbiol*. 2001;67:5840-43.
17. Brosch R, Chen J, Luchansky JB. Pulsed-field fingerprinting of *Listeriae*: identification of genomic divisions for *Listeria monocytogenes* and their correlation with serovar. *Appl Environ Microbiol*. 1994;60:2584-92.
18. Nadon CA, Woodward DL, Young C, Rodgers FG, Wiedmann M. Correlations between molecular subtyping and serotyping of *Listeria monocytogenes*. *J Clin Microbiol*. 2001;39:2704-7.
19. De Simon M, Ferrer MD. Initial numbers, serovars and phagevars of *Listeria monocytogenes* isolated in prepared foods in the city of Barcelona (Spain). *Int J Food Microbiol*. 1998;44:141-4.