

# 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<sup>a,b,\*</sup>, María José Torres<sup>b,c</sup>, Julia Liró<sup>a</sup>, Rafael Luque<sup>a</sup>, Javier Aznar<sup>a,b,c</sup> y grupo LISAND-Microbiología<sup>◇</sup>

<sup>a</sup> Unidad Clínica de Enfermedades Infecciosas, Microbiología y Medicina Preventiva, Hospital Universitario Virgen del Rocío, Sevilla, España

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

<sup>c</sup> 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%<sup>1,2</sup>.

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 habitantes<sup>3</sup>. En nuestro país no existen datos de incidencia de la infecciones 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 2003-2009<sup>4</sup>, 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<sup>5,6</sup>. 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 definidos<sup>7-9</sup>. 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 ECIII<sup>10</sup>, y estos podrían ser empleados de forma rutinaria en la caracterización de aislados procedentes de casos humanos<sup>11</sup>.

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 recomendados<sup>12</sup>. 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.<sup>13</sup>. 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 CLSI<sup>14</sup>.

### Electroforesis en campo pulsado

El estudio de las cepas mediante electroforesis en campo pulsado (PFGE) se realizó según el protocolo de PulseNet<sup>15</sup>, con pequeñas modificaciones<sup>16</sup>, 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.<sup>17</sup>. El

**Tabla 1**  
Características microbiológicas de los aislados de *Listeria monocytogenes*

Grupo PCR/Serotipo	N (%)	Clones epidémicos (%)			
		ECI	ECII	ECIII	No ECs
IVb/4b	94 (61%)	43 (46,2%)	10 (10,7%)	–	41 (41,1%)
Ila/1/2a	27 (18%)	–	–	9 (33,3%)	18
Ilb/1/2b	30 (19%)	–	–	–	30
Ilc/1/2c	3 (2%)	–	–	–	3
Total	154 (100%)	43 (27,9%)	10 (6,5%)	9 (5,8%)	92 (59,7%)

índice de discriminación de Simpson, expresado como porcentaje, se determinó según lo descrito por Hunter y Gaston<sup>18</sup>. Un pulsotipo se definió para un porcentaje de similitud de bandas de  $\geq 99\%$  y de  $\geq 90\%$  para cepas muy relacionadas<sup>19</sup>.

#### Multiplex PCR para la detección de clones epidémicos

En la identificación de los aislados pertenecientes a clones epidémicos ECI, ECII y ECIII, se utilizó el protocolo descrito por Chen y Knabel<sup>10</sup>, con pequeñas modificaciones (se realizaron las ampliificaciones por separado), empleándose una escalera de ADN 1 kpb (Promega) como marcador de peso molecular.

## Resultados

### Serotipado

De los 154 aislados clínicos, 94 (61%) pertenecían al serogrupo 4 y 60 (39%) al serogrupo 1.

El agrupamiento mediante PCR multiplex permitió asignar los aislados a 4 grupos: Ila: 27 cepas (18%); Ilb: 30 cepas (19%); Ilc: 3 cepas (2%), y IVb: 94 cepas (61%) (tabla 1).

En función de la combinación de los 2 métodos, los aislados se agruparon en 4 serotipos: 4b: 94 cepas (61%); 1/2b: 30 cepas (19%); 1/2a: 27 cepas (18%), y 1/2c: 3 cepas (2%).

### Sensibilidad antibiótica

El 100% de las cepas fueron sensibles a ampicilina y cotrimoxazol según criterios CLSI. Los valores de CMI modal para ampicilina fueron CMI<sub>50</sub>: 0,25 mg/l y CMI<sub>90</sub>: 0,75 mg/l (rango: 0,064–1 mg/l) y para cotrimoxazol CMI<sub>50</sub>: 0,016 mg/l y CMI<sub>90</sub>: 0,125 mg/l (rango: 0,002–0,5 mg/l).

Estratificando según el serotipo y el clon epidémico, los más prevalentes fueron:

- Serotipo 4b (94 cepas): ampicilina CMI<sub>50</sub>: 0,25 mg/l; CMI<sub>90</sub>: 0,5 mg/l (rango: 0,094–1 mg/l) y cotrimoxazol CMI<sub>50</sub>: 0,016 mg/l; CMI<sub>90</sub>: 0,032 mg/l (rango: 0,002–0,094 mg/l).

- Clon epidémico ECI (43 cepas): ampicilina CMI<sub>50</sub>: 0,25 mg/l; CMI<sub>90</sub>: 0,5 mg/l (rango: 0,125–1 mg/l) y cotrimoxazol CMI<sub>50</sub>: 0,016 mg/l; CMI<sub>90</sub>: 0,047 mg/l (rango: 0,004–0,094 mg/l).

### Caracterización molecular y agrupamiento por electroforesis en campo pulsado

Entre los 154 aislados se diferenciaron 62 pulsotipos distintos. Treinta y siete aislados (24%) mostraron pulsotipos únicos, y las restantes 117 cepas (76%) fueron asignadas a 25 grupos Apal, el 60% en grupos de más de 2 cepas (tabla 2).

El 45% (n = 69) de las cepas se agrupaban en 6 pulsotipos (fig. 1). El pulsotipo más frecuente fue el P9, con 23 cepas del serogrupo 4b, aisladas en el período 2003–2009; había además 2 pulsotipos estrechamente relacionados, P7 y P8, con 6 y 2 cepas, respectivamente, por lo que el número de cepas asciende a 31. El siguiente

pulsotipo en frecuencia fue P53, con 17 cepas del serogrupo 1/2a, aisladas entre 2005 y 2009. El pulsotipo P19 incluía 10 cepas del serogrupo 4b aisladas entre 2003–2009, presentaba una estrecha relación con el pulsotipo P18 y elevaba la agrupación a 12 cepas. Seguía en frecuencia el pulsotipo P28, con 7 cepas del serogrupo 4b aisladas en el período 2007–2008. Por último, el pulsotipo P22 incluía 6 cepas del serogrupo 1/2b aisladas en el período 1994–2008.

El 31% de los pulsotipos (19/62) incluían un bajo número de cepas (entre 2 y 4). El 25% de estas cepas (12/48) pertenecían al serogrupo 1/2b, y el 69% (33/48), al serogrupo 4b. El serogrupo 1/2c incluyó 3 cepas (aisladas entre 2005 y 2009) en un único pulsotipo (P56).

Los pulsotipos únicos representaron el 24% de las cepas y el 60% de la pulsotipos: el 49% del serogrupo 4b, el 27% del serogrupo 1/2b y el 24% del serogrupo 1/2a.

### Investigación de clones epidémicos

Los marcadores EC se encontraron en 62 (40,3%) de los aislados estudiados (tabla 1). El marcador ECI estaba presente en 43 (46,2%) de los aislados serotipo 4b, ECII en 10 (10,7%) de los aislados serotipo 4b, y ECIII en 9 (33,3%) aislados del serotipo 1/2a.

El marcador ECI se detectó en 18 de las 23 cepas del grupo P9, y en 6 de las 8 cepas de los pulsotipos estrechamente relacionados P7 y P8. También en 8 de las 10 cepas que componían el pulsotipo P19, y en las 3 cepas de los pulsotipos estrechamente relacionados P18 y P20. Las 8 restantes (21,6%) con este marcador fueron aisladas de casos esporádicos (tabla 2).

El marcador ECII se detectó en 6 cepas de los pulsotipos P36, P38 y P39 (83% de similitud), mientras que las otras 4 cepas con este marcador fueron de casos esporádicos (tabla 2).

El marcador ECIII fue encontrado en 7 de 17 cepas del pulsotipo P53, y las 2 restantes correspondieron a casos esporádicos (tabla 2).

## Discusión

La distribución de serotipos en nuestro estudio es similar a la descrita en otros países europeos<sup>20</sup>, con un predominio del serotipo 4b. Los posibles mecanismos por los que existe una mayor prevalencia del serotipo 4b, así como de 1/2a y 1/2b, en la enfermedad humana siguen siendo poco conocidos<sup>21</sup>.

Al igual que en otros estudios europeos, no se constataron problemas de resistencia antibiótica a ampicilina y cotrimoxazol en las cepas estudiadas<sup>22</sup>.

Durante el período de 4 años que abarca este estudio, ciertos pulsotipos de *L. monocytogenes* se mantuvieron estables en el tiempo y se distribuyeron ampliamente, concretamente 5 pulsotipos representaron el 39,9% de las cepas estudiadas. De ellos, 2 grandes grupos de los serotipos 1/2a (P53) y 4b (P9) representaron el 26% de los aislados, distribuyéndose en un período prolongado de tiempo (2003–2009 y 2005–2009, respectivamente),

**Tabla 2**  
Distribución de pulsotipos y marcadores EC en los aislados de *Listeria monocytogenes*

Serotipos (Grupo PCR)	Pulsotipos (n.º de cepas)	Marcadores EC (n.º de cepas)	Años (intervalo)	Comentarios
<i>Pulsotipos con alto número de cepas</i>				
4b (IVb)	P9 (23)	ECI (18)	2003-2009	95% de similitud con P7
1/2a (IIa)	P53 (17)	ECIII (6)	2005-2009	
<i>Pulsotipos con moderado número de cepas</i>				
4b (IVb)	P19 (10)	ECI (9)	2003-2009	95% de similitud con P9
4b (IVb)	P28 (7)	ECI (1)	2007-2008	
4b (IVb)	P7 (6)	ECI (5)	1996-2009	
1/2b (IIb)	P22 (6)	–	1994-2008	
<i>Pulsotipos con bajo número de cepas</i>				
1/2b (IIb)	P42 (4)	–	2005-2009	90% de similitud con P36
4b (IVb)	P5 (4)	ECI (1)	2005-2008	
1/2b (IIb)	P14 (4)	–	2007-2008	
4b (IVb)	P37 (3)	ECII (3)	2007	
4b (IVb)	P38 (3)	ECII (2)	2008	
4b (IVb)	P44 (3)	ECI (2), ECII (1)	2004-2008	
1/2c (IIc)	P56 (3)	–	2005-2009	
1/2b (IIb)	P1 (2), P13 (2)	–		
4b (IVb)	P6 (2), P8 (2), P18 (2), P25 (2), P30 (2), P31 (2), P36 (2), P39 (2), P48 (2), P61 (2)	ECI: P8(1) ECI: P18 (2) ECII: P36 (1)		P8: 95% de similitud con P9 P18: 95% de similitud con P19 P36: 90% de similitud con P37
<i>Pulsotipos únicos</i>				
IIb (1/2b)	P2, P3, P16, P21, P23, P49, P50, P51, P52, P57	–		
IIa (1/2a)	P15, P24, P41, P54, P55, P58, P59, P60, P62	ECIII: P24 ECIII: P54 ECIII: P61		
IVb (4b)	P4, P10, P11, P12, P17, P20, P26, P27, P29, P32, P33, P34, P35, P40, P43, P45, P46, P47	ECI: P11, P12, P17, P20 ECII: P45, P46, P47		

sin que exista constancia de que los casos fueran asignados por las autoridades sanitarias a brotes epidémicos de la enfermedad.

Estos resultados demuestran la importancia del subtipado molecular de rutina de los aislados clínicos de *L. monocytogenes*, ya que podría alertar sobre posibles brotes de enfermedad. Este aspecto ha sido puesto de manifiesto por los ECDC<sup>23,24</sup>. Sin embargo, aunque el uso de técnicas de PFGE para la tipificación molecular de aislados ha demostrado gran utilidad en la caracterización de casos esporádicos o epidémicos, los criterios de Tenover<sup>25</sup> no son generalmente aplicables en estudios a largo plazo y solo aislados con patrones indistinguibles deberían ser incluidos en los pulsotipos<sup>19</sup>. Por ello, en nuestro estudio se requirió una similitud del 99% en el patrón PFGE. Además, el uso de la enzima de restricción *Apal*, que proporciona un mayor número de bandas, permite un mayor poder discriminatorio, como se ha descrito previamente<sup>26</sup>.

Por otro lado, la mayoría de los brotes de listeriosis descritos en la literatura han involucrado a un pequeño grupo de cepas genéticamente muy relacionadas. Debido a los problemas potenciales de los estudios de PFGE en estudios a largo plazo, reconocer grupos clonales puede cambiar el enfoque de los estudios epidemiológicos. En *L. monocytogenes* se han reconocido 3 grupos principales de clones epidémicos designados como ECI, ECII y ECIII<sup>7-9</sup>. En nuestro estudio se ha encontrado una alta prevalencia (40,5%) de estos marcadores. El marcador ECI, relacionado con brotes de listeriosis en Nueva Escocia (1981), Massachusetts (1983), Los Ángeles (1985), Suiza (1983-87), Dinamarca (1985-87) y Francia (1992)<sup>27</sup>, se ha encontrado en el 28% de nuestras cepas, sobre todo en pulsotipos con amplio número de cepas. El

primer aislado con este marcador aparece en el año 1996, distribuyéndose de manera uniforme a lo largo de nuestro período de estudio.

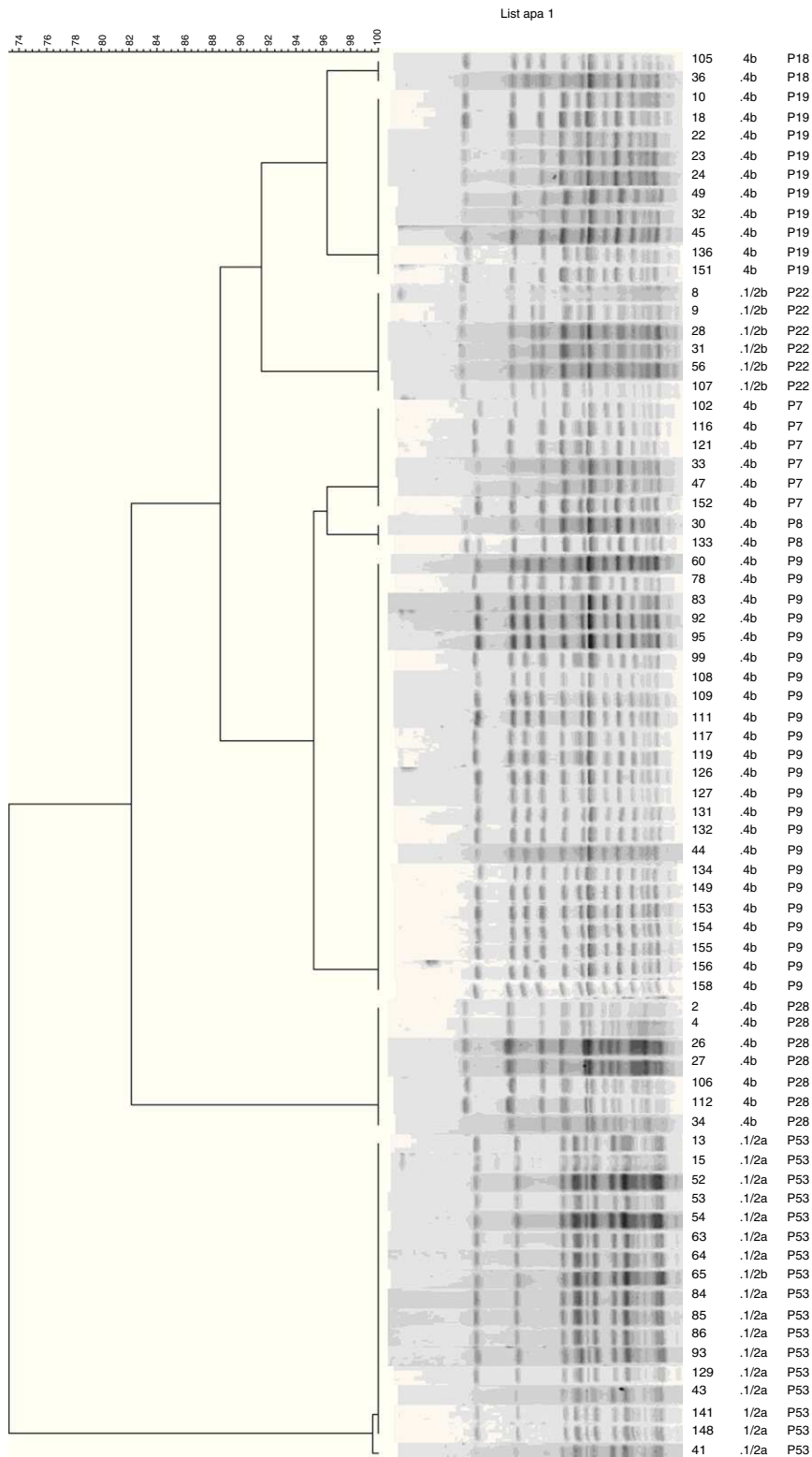
La distribución del marcador ECII, vinculado a 2 brotes en Estados Unidos en 1998-1999 y 2002<sup>27</sup>, parece ser más heterogéneo y aparece en pulsotipos de bajo número de aislados o en pulsotipos de casos aparentemente esporádicos. La heterogeneidad del grupo ECII ha sido demostrada por otros investigadores en Europa<sup>28</sup>.

En nuestro estudio, el marcador ECIII (este grupo clonal, a diferencia de los anteriores, solo incluye cepas del serotipo 1/2a), vinculado a un brote multiestatal de listeriosis asociada al consumo de embutidos de pavo en Estados Unidos en el año 2000<sup>29</sup>, está asociado con un solo pulsotipo (P53), incluyendo aislados del periodo 2005-2008. Esto concuerda con el estudio de Mammina et al.<sup>11</sup> realizado en Italia, donde las 3 cepas con marcadores ECIII descritas estaban agrupadas en un único pulsotipo.

Es importante señalar que la presencia de marcadores ECII y ECIII ha sido poco comunicada en casos humanos en Europa. Solo un estudio realizado en Italia en 2009 evidenció la existencia de estos marcadores en aislados clínicos de *L. monocytogenes*<sup>11</sup>.

En consecuencia, un alto porcentaje de los casos de listeriosis humana en Andalucía podrían estar relacionados con brotes epidémicos ocurridos a nivel internacional y/o la presencia de clones más virulentos.

Este es el primer gran estudio de epidemiología molecular de casos humanos de listeriosis en España, y más concretamente en Andalucía, y sería conveniente disponer de datos similares de otras zonas de España para comprobar la distribución de serotipos, pulsotipos y marcadores EC. Por tanto, nuestro trabajo podría ser útil en



**Figura 1.** Dendrograma de los 6 principales pulsotipos y pulsotipos altamente relacionados.

la reinterpretación de la epidemiología de la listeriosis en el sur de España, así como contribuir a la adopción de medidas de prevención de la enfermedad en el futuro.

#### Conflicto de intereses

Los autores declaran no tener ningún conflicto de intereses.

#### Anexo 1. Componentes del grupo LISAND-Microbiología

María Dolores López-Prieto (Hospital de Jerez, Cádiz), José Porrás (Hospital Universitario Carlos Haya, Málaga), Marina de Cueto (Hospital Universitario Virgen Macarena, Sevilla), Concepción Carazo (Complejo Hospitalario de Jaén, Jaén), Ana Isabel Aller (Hospital Universitario de Valme, Sevilla), Alberto de la Iglesia

(Hospital Infanta Elena, Huelva), José Antonio Pérez (Hospital Universitario San Cecilio, Granada), Manuel Causse (Hospital Universitario Reina Sofía, Córdoba), María Victoria García (Hospital Universitario Virgen de la Victoria, Málaga), Consuelo Miranda (Hospital Universitario Virgen de las Nieves, Granada), José María Saavedra (Hospital Juan Ramón Jiménez, Huelva), Rocío Tejero (Hospital Infanta Margarita, Cabra, Córdoba), Francisco Franco (Hospital de Riotinto, Huelva), Ana García-Tapia (Hospital Universitario Puerta del Mar, Cádiz), Manuel Rodríguez-Iglesias (Hospital Universitario Puerto Real, Cádiz), Miguel Martínez-Lirola (Complejo Hospitalario Torrecárdenas, Almería), Inmaculada López-Rodríguez (Hospital Costal del Sol, Marbella, Málaga), María del Carmen Domínguez (Hospital de Osuna, Sevilla), María Jesús Pérez-Santos (Hospital de la Serranía, Ronda, Málaga), María Teresa Cabezas (Hospital de Poniente, Almería), Carmen Serrano (Hospital San Juan de Dios, Bormujos, Sevilla).

## Bibliografía

- Oevermann A, Zurbriggen A, Vandeveld M. Rhombencephalitis caused by *Listeria monocytogenes* in humans and ruminants: a zoonosis on the rise? *Interdiscip Perspect Infect Dis*. 2010;2010:632513.
- Reek C, Tenschert W, Elsner HA, Kaulfers PM, Huland H. Pulsed-field gel electrophoresis for the analysis of *Listeria monocytogenes* infection clusters after kidney transplantation. *Urol Res*. 2000;28:93–6.
- European Centre for Disease Prevention Control. Annual Epidemiological Report on Communicable Diseases in Europe 2010. Stockholm: ECDC; 2010.
- Sandoval Abreu E. Vigilancia de la listeriosis en Andalucía. SVEA Informe Semanal. 2011;16:1–2.
- Sauders BD, Mangione K, Vincent C, Schermerhorn J, Farchione CM, Dumas NB, et al. 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*. 2004;67:1417–28.
- Jaradat ZW, Schutze GE, Bhunia AK. Genetic homogeneity among *Listeria monocytogenes* strains from infected patients and meat products from two-geographic locations determined by phenotyping, ribotyping and PCR analysis of virulence genes. *Int J Food Microbiol*. 2002;76:1–10.
- Piffaretti JC, Kressebuch H, Aeschbacher M, Bille J, Bannerman E, Musser JM, et al. Genetic characterization of clones of the bacterium *Listeria monocytogenes* causing epidemic disease. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1989;86:3818–22.
- Kathariou S, Graves L, Buchrieser C, Glaser P, Siletzky RM, Swaminathan B. Involvement of closely related strains of a new clonal group of *Listeria monocytogenes* in the 1998–99 and 2002 multistate outbreaks of foodborne listeriosis in the United States. *Foodborne Pathog Dis*. 2006;3:292–302.
- Bibb WF, Gellin BG, Weaver R, Schwartz B, Plikaytis BD, Reeves MW, et al. Analysis of clinical and food-borne isolates of *Listeria monocytogenes* in the United States by multilocus enzyme electrophoresis and application of the method to epidemiologic investigations. *Appl Environ Microbiol*. 1990;56:2133–41.
- Chen Y, Knabel SJ. Multiplex PCR for simultaneous detection of bacteria of the genus *Listeria*, *Listeria monocytogenes*, and major serotypes and epidemic clones of *L. monocytogenes*. *Appl Environ Microbiol*. 2007;73:6299–304.
- Mammina C, Aleo A, Romani C, Pellissier N, Nicoletti P, Pecile P, et al. Characterization of *Listeria monocytogenes* isolates from human listeriosis cases in Italy. *J Clin Microbiol*. 2009;47:2925–30.
- Weaver RE. Morphological, physiological and biochemical characterization. En: Jones GL, editor. Isolation and identification of *Listeria monocytogenes*, CDC lab manual. 1st ed. Atlanta, Ga: Centers for Disease Control; 1989. p. 39–43.
- Doumith M, Buchrieser C, Glaser P, Jacquet C, Martin P. Differentiation of the major *Listeria monocytogenes* serovars by multiplex PCR. *J Clin Microbiol*. 2004;42:3819–22.
- Clinical and Laboratory Standards Institute Methods for Antimicrobial Dilution and Disk Susceptibility Testing of Infrequently Isolated or Fastidious Bacteria; Approved Guideline. CLSI document M45-A. Clinical and Laboratory Standards Institute, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898 USA, 2006.
- Graves LM, Swaminathan B. PulseNet standardized protocol for subtyping *Listeria monocytogenes* by macro-restriction and pulsed-field gel electrophoresis. *Int J Food Microbiol*. 2001;65:55–62.
- Halpin JL, Garrett NM, Ribot EM, Graves LM, Cooper KL. Re-evaluation, optimization, and multilaboratory validation of the PulseNet-standardized pulsed-field gel electrophoresis protocol for *Listeria monocytogenes*. *Foodborne Pathog Dis*. 2010;7:293–8.
- Martin P, Jacquet C, Goulet V, Vaillant V, De Valk H. Participants in the PulseNet Europe Feasibility Study. Pulsed-field gel electrophoresis of *Listeria monocytogenes* strains: the PulseNet Europe Feasibility Study. *Foodborne Pathog Dis*. 2006;3:303–8.
- Hunter PR, Gaston MA. Numerical index of the discriminatory ability of typing systems: an application of Simpson's index of diversity. *J Clin Microbiol*. 1988;26:2456–66.
- Barrett TJ, Gerner-Smidt P, Swaminathan B. Interpretation of pulsed-field gel electrophoresis patterns in foodborne disease investigations and surveillance. *Foodborne Pathog Dis*. 2006;3:20–31.
- Goulet V, Hedberg C, Le Monnier A, de Valk H. Increasing incidence of listeriosis in France and other European countries. *Emerg Infect Dis*. 2008;14:734–40.
- Kathariou S. *Listeria monocytogenes* virulence and pathogenicity, a food safety perspective. *J Food Prot*. 2002;65:1811–29.
- Granier SA, Moubareck C, Colaneri C, Lemire A, Roussel S, Dao TT, et al. Antimicrobial resistance of *Listeria monocytogenes* isolates from food and the environment in France over a 10-year period. *Appl Environ Microbiol*. 2011;77:2788–90.
- De Valk H, Jacquet C, Goulet V, Vaillant V, Perra A, Simon F, et al. Surveillance of *Listeria infections* in Europe. *Euro Surveill*. 2005;10:251–5.
- Denny J, McLauchlin J. Human *Listeria monocytogenes* infections in Europe — an opportunity for improved European surveillance. *Euro Surveill*. 2008;27:13, pii: 8082.
- Tenover FC, Arbeit RD, Goering RV, Mickelsen PA, Murray BE, Persing DH, et al. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. *J Clin Microbiol*. 1995;33:2233–9.
- Cheng Y, Knabel SJ. Strain Typing. En: Liu D, editor. Handbook of *Listeria monocytogenes*. Boca Raton, FL: CRC Press; 2008. p. 214–8.
- Cheng Y, Siletzky RM, Kathariou S. Genomic Divisions/Lineages, Epidemic Clones, and Population Structure. En: Liu D, editor. Handbook of *Listeria monocytogenes*. Boca Raton, FL: CRC Press; 2008. p. 344–50.
- Franciosa G, Scalfaro C, Maugliani A, Floridi F, Gattuso A, Hodzic S, et al. Distribution of epidemic clonal genetic markers among *Listeria monocytogenes* 4b isolates. *J Food Prot*. 2007;70:574–81.
- Centers for Disease Control and Prevention. Multistate outbreak of listeriosis—United States, 2000. *Morb Mortal Wkly Rep*. 2000;49:1129–30.