

Tipificación molecular de *Listeria seeligeri* aislada de embutidos en México

Jiménez-Edeza, M.¹ • Castañeda-Ruelas, G.M.^{1*} • Galván-Gordillo, S.V.²
Herrera-López, V.M.² • Hernández-Pérez, C.F.²

Palabras clave: genoma, Listeriosis, resistencia, virulencia

Key words: genome, Listeriosis, resistance, virulence

Introducción

Actualmente, el género *Listeria* incluye 17 especies: *L. monocytogenes*, *L. seeligeri*, *L. ivanovii*, *L. welshimeri*, *L. marthii*, *L. innocua*, *L. grayi*, *L. fleischmannii*, *L. floridensis*, *L. aquatica*, *L. newyorkensis*, *L. cornellensis*, *L. rocourtia*, *L. weihenstephanensis*, *L. grandensis*, *L. riparia*, y *L. booriae*. De estas, solo *L. monocytogenes* se considera una bacteria patógena que atenta la seguridad alimentaria y la salud pública [1]. La biodiversidad y amplia distribución de esta bacteria, la convierte en un desafío especial en la producción de alimentos listos para el consumo.

En México, *L. monocytogenes* es la principal bacteria de atención con respecto a la inocuidad de los

embutidos debido a la prevalencia y riesgo de adquirir la bacteria [2]. Cabe señalar, que otras especies del género *Listeria* se han en esta categoría de alimentos [3], pero, poco se ha explorado el riesgo que representan. Particularmente, *L. seeligeri* corresponde a una especie que se ha recuperado de embutidos en estudios preliminares y cuya presencia se ha subestimado (datos no reportados).

El uso de la secuenciación y las herramientas bioinformáticas han permitido el estudio de la diversidad y clonalidad de *L. monocytogenes*. Así como, identificar los elementos genéticos que determinan su patogenicidad, resistencia antimicrobiana y adaptabilidad

1 Facultad de Ciencias Químico-Biológicas. Universidad Autónoma de Sinaloa. Prolongación Josefa Ortiz de Domínguez S/N, Ciudad Universitaria, 80040, Culiacán, Sinaloa, México. Tel: +52(667)137860.

2 Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria (SENASICA). Carretera Federal México-Pachuca km 37.5, 55740, Municipio de Tecámac, Estado de México. Tel: +52(55)59051000.

* gloria.ruelas@uas.edu.mx



en un ambiente [4]. Dado que, la ecología de *L. seeligeri* ha sido poco explorada, el objetivo de este estudio fue secuenciar y anotar un genoma de una cepa de *L. seeligeri* previamente recuperada de embutidos comercializados en México.

Metodología

Colección de cepas de *Listeria*.

Para este estudio fue utilizada la cepa de *Listeria seeligeri* (ID BB77), la cual fue previamente aislada de una marca comercial de salchichas en México. La cepa se reactivó en caldo cerebro corazón (BD, EUA) durante 20 h a 35 ± 2 °C. La identificación y confirmación de la cepa se realizó mediante el cultivo en agar cromogénico ALOA® (Biomerieux, Francia) y VITEK® (Biomerieux, Francia), respectivamente.

Extracción de ADN, secuenciación, ensamblado y anotación

El ADN genómico se extrajo siguiendo las instrucciones del protocolo de preparación de ADN de alta pureza (Roche, Suiza). La calidad y pureza del ADN genómico se determinó mediante el fluorómetro Qubit® 3.0 (Invitrogen, EUA) y el espectrofotómetro Nanodrop® (Thermo Fisher Scientific, EUA). La

preparación de librerías y secuenciación se llevó a cabo utilizando los reactivos y la plataforma de Illumina MiSeq® (Illumina, EUA). Finalmente, el ensamblaje y anotación de los genoma se realizó mediante el programa de SPAdes® (v3.11.1) y la herramienta de RAST (v1.073), y Patric, respectivamente.

Tipificación

Para la predicción de la secuencia multilocus, complejo clonal y linaje fue utilizada la herramienta de tipificación de secuencias de *Listeria* del Instituto Pasteur BIGSdb-Lm (<https://bigsdb.pasteur.fr/listeria/>). Adicionalmente, dicha herramienta fue empleada para la búsqueda de genes asociados a la virulencia.

Resultados y discusión

Estadística del genoma

La descripción de la calidad y contenido del genoma de *L. seeligeri* se muestra en la Tabla 1. El genoma de *L. seeligeri* corresponde a un ensamblaje de alta calidad dado los valores de la calidad de lecturas (36.3 / 32.4), cobertura promedio (94.8 x), número de contigs (15) y tamaño del genoma (2.9 Mb). El contenido de G+C de 37.4 % y secuencias codificantes fue de 2,894.

Tabla 1. Datos de calidad y contenido del genoma de *L. seeligeri*.

Atributo	Unidad	Valor
Tamaño del genoma	pb	2,925,539
Contenido G+C	%	37.4
Cobertura	x	94.8
Contigs	No.	15
Calidad de lecturas (R1/R2)	No.	36.3/32.4
N50	pb	546.4
CDS	No.	2,894
RNA _t	No.	54
RNA _r	No.	3
Proteínas hipotéticas	No.	592
Proteínas con asignación funcional	No.	2.302
Proteínas con asignación de número EC	No.	777
Proteínas con asignación GO	No.	640
Proteínas con asignación de ruta	No.	541
Proteínas con asignaciones de familiar específicas de género (PLfam) Patric	No.	2.802
Proteínas con asignaciones de familia de género cruzado (PGfam) Patric	No.	2.824
CRISPR	No.	70

En la literatura se tiene poca información sobre genomas de *L. seeligeri*. No obstante, las métricas del genoma de la cepa BB77 coinciden con el único genoma de *L. seeligeri* reportado en la base de datos del NCBI [5]. Por otra, nuestros valores también son similares a métricas de genomas de *L. monocytogenes* [4].

Taxonomía

La cepa BB77 correspondió a la especie de *L. seeligeri* con un complejo clonal y secuencia tipo (ST) identificado como 2681.

Descripción de atributos

La distribución de los subsistemas anotados por RAST se ilustra en la Figura 1. La mayoría de las funciones

están asociadas a la síntesis de macromoléculas. La Tabla 2 muestra que la cepa BB77 se caracteriza por presentar genes de resistencia a antibióticos (quinolonas), desinfectantes (cloruro de benzalconio) y metales pesados (mercurio). Además, la presencia del plásmido *rep26* fue identificado. Los factores de resistencia y tolerancia a sustancias biocidas en la cepa BB77 son indicadores que contribuyen a describir la ecología de la especie y explicar su presencia en el entorno de los alimentos. Diversos autores han indicado que la presencia del casete *bcrABC* [6] y tolerancia a metales pesados (Hg, As, Cd) [7] definen el comportamiento saprófito de la bacteria y la exposición a la que se encuentran en la cadena de producción alimentaria.

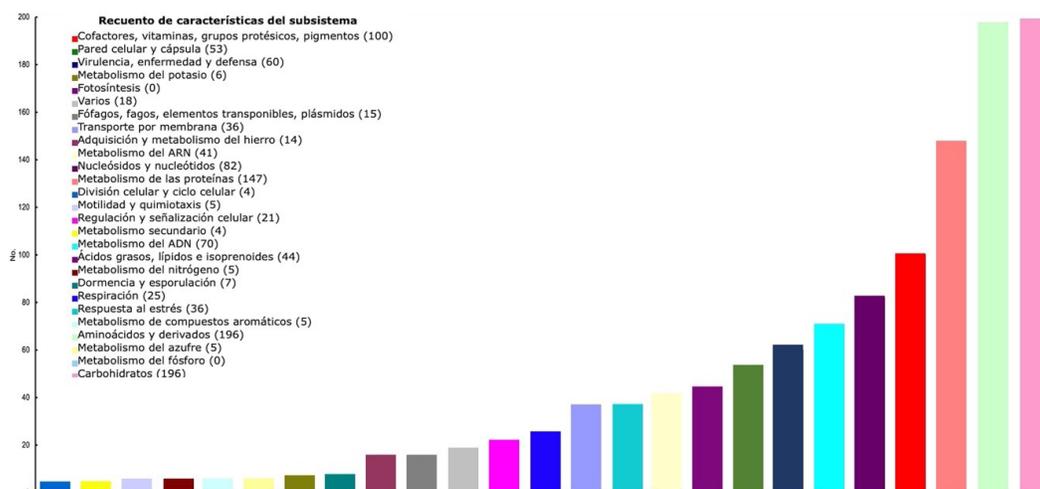


Figura 1. Familia de subsistemas de la cepa BB77 de *L. seeligeri* aislada de embutidos en México.

Tabla 2. Tipificación *in silico* de ciertos atributos de las cepas de *L. seeligeri*.

Atributo	Gen
Resistencia antimicrobiana	<i>mprF</i>
	<i>norB</i>
Resistencia a desinfectantes	<i>bcrB</i>
	<i>bcrC</i>
Virulencia	<i>flaA</i>
	<i>lhrC</i>
	<i>tcsA</i>
Fagos	No detectado.
Plásmidos	<i>rep26 (Inc18)</i>
Tolerancia a metales pesados	<i>merR1, merR2</i>

Respecto a la virulencia, la cepa careció de la principal isla de patogenicidad de *L. monocytogenes* (LIPI-1) [8]. No obstante, se identificaron los genes *flaA*, *lhrC* y *tcsA* que se asocian a propiedades de virulencia.

Conclusión

El borrador del genoma de alta calidad de la cepa BB77 aquí publicado proporciona una idea de la base genómica de *L. seeligeri*, contribuyendo a recopilar información y estimular estudios sobre esta especie del

género *Listeria*. La cepa BB77 muestra algunos genes asociados a la virulencia y exhibe estrategias de resistencia a los antimicrobianos y desinfectantes que favorezcan su colonización.

Reconocimientos

Este trabajo fue apoyado por la Convocatoria del Programa de Fomento y Apoyo a Proyectos de Investigación PRO_A7_069 de la Universidad Autónoma de Sinaloa.

Referencias

1. Orsi RH & Wiedmann M. Characteristics and distribution of *Listeria spp.*, including *Listeria* species newly described since 2009. *Applied of Microbiology Biotechnology*. 2016. Doi:10.1007/s00253-0167552-2.
2. Jiménez-Edeza M, Castillo-Burgos M, Germán-Báez LJ, et al. Venta a granel de embutidos: una tendencia de comercialización asociada al riesgo de enfermedades transmitidas por alimentos en Culiacán, México. *Revista Mexicana de Ciencias Pecuarias*. 2020. doi:10.22319/rmcp.v11i3.5274
3. Silva LE, Pérez C, Barreras A, et al. Identification of *Listeria spp.* In frankfurters products exhibited for sale. *Journal of Animal and Veterinary Advances*. 2007.
4. Bechtel TD y Gibbons JG. Population Genomic analysis of *Listeria monocytogenes* from food reveals substrate-specific genome variation. *Frontiers of Microbiology*. 2021. Doi:10.3389/fmicb.2021.620033.
5. Steinweg C, Kuenne CT, Billion A, et al. Complete genome sequence of *Listeria seeligeri*, a nonpathogenic member of the genus *Listeria*. *Journal of Bacteriology*. 2010. Doi:10.1128/JB.01415-09.
6. Kurpas M, Osek ., Moura A, et al. Genomic Characterization of *Listeria monocytogenes* Isolated from ready-to-eat meat and meat processing environments in Poland. *Frontiers in Microbiology*. 2020. Doi:10.3389/fmicb.2020.01412
7. Parsons C, Lee S, Kathariou S. Heavy metal resistance determinants of the foodborne pathogen *Listeria monocytogenes*. *Genes*. 2019. Doi:10.3390/genes10010011
8. Camejo A, Carvalho F, Reis O, et al. The arsenal of virulence factors deployed by *Listeria monocytogenes* to promote its cell infection cycle. *Virulence*. 2011. Doi: 10.4161/viru.2.5.17703