



---

**Universidad de Valladolid**  
**Campus de Palencia**

**ESCUELA TÉCNICA SUPERIOR  
DE INGENIERÍAS AGRARIAS**

**APLICACIÓN DE TÉCNICAS DE DETECCIÓN,  
CONFIRMACIÓN Y CARACTERIZACIÓN PARA  
EL CONTROL DE *LISTERIA*  
*MONOCYTOGENES* PRESENTE EN  
INDUSTRIAS LÁCTEAS**

**TRABAJO FIN DE MÁSTER**

**Alumno: Miguel Galindo Casas**

**Tutor: Pedro A. Caballero Calvo**  
**Directora: Marta Hernández Pérez**

**Máster en Ingeniería Agronómica**

**Curso 2020/21**

**APLICACIÓN DE TÉCNICAS DE  
DETECCIÓN, CONFIRMACIÓN Y  
CARACTERIZACIÓN PARA EL CONTROL  
DE *LISTERIA MONOCYTOGENES*  
PRESENTE EN INDUSTRIAS LÁCTEAS**

## ÍNDICE

Resumen _____	1
Abstract _____	1
1. Introducción _____	2
1.1. <i>L. monocytogenes</i> : Patogénesis y clasificación taxonómica .....	2
1.2. <i>L. monocytogenes</i> y sus riesgos para la seguridad alimentaria .....	6
1.3. Importancia de <i>L. monocytogenes</i> en la industria y productos lácteos.....	10
2. Objeto y Objetivos del Estudio _____	12
3. Materiales y Metodología del Estudio _____	13
3.1. Recogida de muestras.....	13
3.2. Análisis microbiológico (enriquecimiento selectivo por cultivo) .....	20
3.3. Extracción de ADN .....	23
3.4. PCR a tiempo real (RTi-PCR).....	24
3.5. Serotipificación molecular mediante PCR.....	27
3.6. Asignación de serogrupo en gel de agarosa.....	29
3.7. Conservación, secuenciación y bioinformática aplicada a bacterias .....	32
4. Resultados y Discusión _____	34
4.1. Resultados y discusión en las detecciones confirmadas y el serotipado .....	34
4.2. Resultados y discusión en la secuenciación masiva y aplicación de herramientas bioinformáticas (datos TORMES).....	41
5. Conclusiones _____	45
6. Agradecimientos _____	46
7. Bibliografía _____	47

## **Resumen**

El presente proyecto fin de máster tiene como objetivo la aplicación de una serie de técnicas metodológicas de captación (recogida), detección, confirmación y caracterización selectivas para el control de *Listeria monocytogenes* en la actualidad, concretamente sobre el muestreo de líneas de producción correspondientes a la industria láctea quesera. La elección de este ámbito de estudio se debe a la relevancia del sector alimentario como foco principal de los casos de listeriosis a nivel mundial, cuyas vectores principales son los alimentos crudos, productos refrigerados listos para el consumo (RTE), vegetales crudos, productos lácteos, pescados y carnes.

Para ello se analizó, comparativamente en el tiempo, la situación sanitaria respecto a esta bacteria patógena de tres fábricas de producción de queso, obteniéndose información genética relativa a la incidencia de la misma y su diagnóstico en el tiempo.

En el estudio se confirma la detección positiva de un total de 37 cepas aisladas de *L. monocytogenes*, cuya presencia resultó heterogénea en función de la fábrica analizada. Mientras que no se encontró ningún caso en la fábrica A, en la fábrica B se detectaron 9 casos y en la fábrica C un total de 28. La caracterización de las cepas confirmó que éstas pertenecieron en un 78,38% al linaje II (serogrupo 1/2a) y un 21,62% al linaje I (serogrupo 4b). En cuanto a susceptibilidad a antibióticos se detectaron 2 casos de resistencia a tetraciclina.

## **Abstract**

The present master's degree project aims to apply a series of methodological techniques of selective capture (collection), detection, confirmation and characterization for the control of *Listeria monocytogenes* at present, specifically on the sampling of production lines corresponding to the dairy cheese industry. The choice of this field of study is due to the relevance of the food sector as the main focus of listeriosis cases worldwide, whose main vectors are raw foods, refrigerated ready-to-eat (RTE) products, raw vegetables, dairy products, fish and meat.

To this end, the health situation regarding this pathogenic bacterium in three cheese production factories was analyzed comparatively over time, obtaining genetic information regarding its incidence and its diagnosis over time.

The study confirmed the positive detection of a total of 37 isolated strains of *L. monocytogenes*, whose presence was heterogeneous depending on the factory analyzed. While no cases were found in factory A, 9 cases were detected in factory B and a total of 28 in factory C. Characterization of the strains confirmed that 78.38% of them belonged to lineage II (serogroup 1 / 2a) and 21.62% to lineage I (serogroup 4b). Regarding susceptibility to antibiotics, 2 cases of resistance to tetracycline were detected.

## 1. Introducción

### 1.1. *Listeria monocytogenes*: Patogénesis y clasificación taxonómica

*L. monocytogenes* es una bacteria Gram positiva aislada por primera vez por Murray y colaboradores, en el año 1926, debido a un brote espontáneo de infección septicémica en 1924 entre conejos de laboratorio de la Universidad de Cambridge (Reino Unido). Ellos le asignaron el nombre de *Bacterium monocytogenes*, debido al gran número de monocitos que identificaron en la sangre de los animales infectados y a las lesiones necróticas observadas en el hígado [1].

En 1927 año, Pirie, estudiando la “*Tiger river disease*” en animales de África del Sur, que ocasionaba focos hepáticos de necrosis, aisló una bacteria Gram positiva y propuso el nombre de *Listerella hepatolytica*, cuyo género aparece en honor al cirujano Lord Lister [1].

Al darse cuenta Murray y Pirie que estaban trabajando con la misma bacteria decidieron combinar los nombres para formar *Listerella monocytogenes*. Este nombre después fue cambiando por razones taxonómicas a *Listeria monocytogenes* [1].

El género *Listeria* comprende un grupo de bacterias Gram positivas del *phylum Firmicutes*, con un contenido en G+C (Guanina y Citosina) bajo, situado en el 38 % de media (varía entre 34,6-41,6%), que incluye los géneros *Bacillus*, *Clostridium*, *Enterococcus*, *Streptococcus* y *Staphylococcus* [1-3].

Los resultados obtenidos de la secuenciación del genoma de *Listeria* han determinado que posee un cromosoma circular cuyo tamaño varía entre 2,8-3,2 Mpb (millones de pares de bases) de largo, detectándose en algunas cepas la presencia de plásmidos [2;4].

El pangenoma de *Listeria* en sentido estricto se estima en un aproximado de 6500 genes, de los cuales el 17% están involucrados en las bases nitrogenadas, nucleótidos, nucleósidos y el metabolismo de los ácidos nucleicos. El 14% está implicado en el metabolismo macromolecular celular y el 10% en el proceso metabólico de las proteínas. [3].

El género *Listeria* está formado por bacilos cortos (0,4-0,5  $\mu\text{m}$  de diámetro y 0,5-2  $\mu\text{m}$  de largo) de extremos redondeados y las células pueden estar solas o formando cadenas cortas. *Listeria* agrupa microorganismos no esporulados, sin formar cápsulas, ni esporas y son móviles por flagelos peritricos cuando se cultiva entre 10 - 25 °C pero es inmóvil a 37 °C, ya que a esta temperatura (t) no hay producción de flagelina [5].

El metabolismo es aerobio y/o anaerobio facultativo, catalasa positivo y oxidasa negativo. *Listeria* puede crecer a temperaturas que oscilan entre los 0 - 45 °C, pero el crecimiento óptimo ocurre entre 30 y 37 °C. No resiste temperaturas superiores a los 75°C. Es un microorganismo psicotrofo que se desarrolla adecuadamente a temperaturas de refrigeración y sobrevive a condiciones ambientales más duras que,

incluso, algunos microorganismos esporulados. No son exigentes nutricionalmente. Pueden fermentar azúcares como la glucosa, manosa y ramnosa, siendo capaces también de hidrolizar la esculina, pero no el manitol, inositol y la arabinosa, a diferencia de otras bacterias [4-5].

Puede tolerar diferentes rangos de pH (4,5 - 9,2), con un pH óptimo de 7, y puede sobrevivir a altas concentraciones de NaCl (10 % en relación w/v). Además, *Listeria* es uno de los pocos patógenos que puede crecer con una baja  $a_w$  (actividad de agua), de aproximadamente 0,93. Produce una toxina citolítica y hemolítica codificada por los genes *hly*, *plcA* y *plcB*. Es invasivo, intracelular e inmóvil debido a la expresión de los genes *ActA* y *PrfA*. Todas las características antes mencionadas son importantes parámetros utilizados para su enriquecimiento y posterior cultivo en el laboratorio [5]

El género *Listeria* incluye actualmente 17 especies reconocidas (*L. monocytogenes*, *L. ivanovii*, *L. seeligeri*, *L. grayi*, *L. innocua*, *L. welshimeri*, *L. marthii*, *L. rocourtiae*, *L. weihenstephanensis*, *L. grandensis*, *L. riparia*, *L. booriae*, *L. fleischmannii*, *L. floridensis*, *L. aquatica*, *L. newyorkensis*, *L. cornellensis*) [4], incluyendo 11 especies de *Listeria* descritas desde el año 2009 (*L. marthii*, *L. rocourtiae*, *L. weihenstephanensis*, *L. grandensis*, *L. riparia*, *L. booriae*, *L. fleischmannii*, *L. floridensis*, *L. aquatica*, *L. newyorkensis*, *L. cornellensis*) [3;6-10].

De estas especies, sólo *L. monocytogenes* y *L. ivanovii* son potencialmente patógenas [4]. Mientras *L. monocytogenes* infecta tanto a los animales como al hombre, *L. ivanovii* es principalmente patógena para rumiantes y, raramente, infecta al hombre, aunque se ha aislado desde humanos infectados indicando su potencial patogénico para el hombre. El Centro para el Control y Prevención de Enfermedades (CDC) reportó un caso de infección por *L. ivanovii* en un hombre con un trasplante de riñón [11].

En base a las reacciones serológicas, considerando los antígenos somáticos (O) y flagelares (H) y sus correspondientes antisueros, *L. monocytogenes* ha sido clasificada en 13 serotipos (1/2a, 1/2b, 1/2c, 3a, 3b, 3c, 4ab, 4a, 4b, 4c, 4d, 4e y 7). Sin embargo, tres serotipos específicos (1/2a, 1/2b, 4b) son responsables de la mayoría (aproximadamente el 98%) de los casos de listeriosis humana y animal [4;5;12-16].

Los estudios filogenéticos y de subtipificación han mostrado que *L. monocytogenes* forma una población estructurada, compuesta de 4 linajes evolutivos divergentes, designados como I, II, III y IV. La asignación de estos diferentes linajes se realizó usando una amplia gama de técnicas genotípicas y fenotípicas, que comprenden ribotipificación, electroforesis en gel de campo pulsado (PFGE) y tipificación de secuencia en multilocus (MLST) [17].

En 1989 se identificaron los linaje I y II [18] y posteriormente los linajes III y IV [19-21]. Los linajes I y II incluyen a la mayoría de los aislados vinculados a los casos clínicos de listeriosis. El linaje I agrupa a los serotipos 1/2b, 3b y 4b y se les ha identificado un mayor potencial patogénico que el linaje II, el cual está compuesto por los serotipos

1/2a, 1/2c, 3a y 3c [17;19]. Los linajes III y IV agrupan a cepas de los serotipos 4a, 4c y un 4b atípico [17].

Por otra parte, las cepas que forman parte del linaje IV anteriormente fueron clasificadas como una sub-población del linaje III; sin embargo, recientemente han sido consideradas como un linaje diferente, ya que se identificaron discrepancias significativas en la ecología de estos linajes, con la posibilidad de un hospedador específico para las cepas pertenecientes al linaje III y IV para mamíferos (no primates) [22].

La baja frecuencia de casos de listeriosis en humanos por cepas pertenecientes a estos linajes (III y IV), puede deberse a la baja prevalencia entre los aislados de alimentos debido, principalmente, a su menor tolerancia al estrés en estos y a los ambientes donde son procesados [17].

La patofisiología de la infección por *L. monocytogenes* en humanos y animales aún es poco comprendida, y los datos disponibles han derivado de las observaciones hechas en animales sujetos a experimentación. El alimento es la principal ruta de adquisición del patógeno, tanto en casos epidémicos como esporádicos, por lo que el tracto gastrointestinal es el primer sitio de entrada de *L. monocytogenes* al hospedador [23].

*L. monocytogenes* es un patógeno intracelular facultativo, que está bien adaptado para vivir tanto en el suelo como en el citoplasma de una célula eucariota. El período de incubación en humanos varía entre los individuos de 1 a 90 días, con un promedio de 30 días [1;24].

La listeriosis humana puede presentarse como epidemia o como casos esporádicos y es, fundamentalmente, una infección de carácter oportunista. Se sabe que la dosis infecciosa es al menos  $10^2$  células viables, en el caso de los grupos de riesgo y que esta cifra aumenta hasta  $10^4$  en el caso de la población sana y siendo extremadamente peligrosa con dosis  $>10^9$  (infección dosis dependiente) [25;26].

Sin embargo, aún no existe una completa comprensión de la relación dosis-respuesta de la listeriosis humana y del papel que juega la virulencia de la cepa implicada, así como la interacción con el hospedador [25].

La inmunidad del huésped es en general efectiva contra *Listeria* y la enfermedad se desarrolla dependiendo de la dosis infectante, de los determinantes de virulencia, y de la inmunidad del huésped. [26].

El proceso de infección comprende varias etapas: adhesión e invasión de la célula hospedadora, escape de la vacuola, multiplicación intracelular y proliferación extracelular [27]

Ingresan por vía digestiva e inducen la fagocitosis por parte del enterocito, siendo incluidas en un fagosoma (antes de formarse el fagolisosoma), del cual escapan rápidamente para multiplicarse en el citoplasma de la célula huésped [26;27].

En el interior del citoplasma celular son capaces de polimerizar los filamentos de actina en uno de los polos bacterianos. De esta forma es impulsada hacia la membrana citoplásmica, formando allí pseudópodos, lo que le permite penetrar posteriormente en otra célula adyacente. Así es capaz de moverse sin estar expuesta a los anticuerpos, el complemento o los polimorfonucleares [26].

Posee la capacidad de invadir, sobrevivir y multiplicarse al interior de las células fagocíticas (macrófagos) y no fagocíticas (epiteliales, endoteliales, hepáticas, fibroblastos y varios tipos de células nerviosas, incluyendo neuronas) desarrollando un ciclo intracelular con características similares [27;28]

Después de la ingestión por el ser humano, la bacteria realiza la transición a un estado fisiológico que promueve la supervivencia bacteriana y la replicación en la célula hospedadora [25].

Una vez en el interior de la célula, la vacuola es rápidamente lisada por la toxina listeriolisina O (LLO), codificada por el gen de virulencia *hly* y las dos fosfolipasas C (PI-PLC/ PC-PLC) codificadas por los genes *plcA* y *plcB*, ambas asociadas con la virulencia y que contribuyen a dañar las membranas celulares, causando la citólisis. Además inhibe el procesamiento del antígeno mediado por macrófagos [25;28;29].

La mayoría de los genes de virulencia que han sido identificados en *Listeria* (*plcA*, *hly*, *mpl*, *actA*, *plcB*, *inIA*, *inIB*, *inIC* y *hpt*) son regulados por el activador transcripcional PrfA, una proteína de 27 kD la cual se une específicamente a un sitio del ADN que es esencial para la patogénesis de *L. monocytogenes*. Se ha descrito que PrfA puede regular directamente 10 genes, además de 145 genes adicionales [30].

El gen *prfA* está ausente en *L. innocua*, y *L. welshimeri* y en *L. seeligeri* presenta una mutación, por lo tanto, no se realiza la expresión de los genes de virulencia. Sin embargo, el gen *prfA* está conservado en todas las cepas de *L. monocytogenes* dando lugar a la patogénesis de la especie [31].

El estudio realizado por Norrung & Andersen se identificaron diferencias significativas en la virulencia entre cepas de origen clínico y de alimentos. Además, existen también diferencias entre la virulencia y la composición antigénica de *L. monocytogenes*, lo cual queda de manifiesto ya que sólo 3 de los 13 serovares de *L. monocytogenes* (1/2a, 1/2b y 4b), son responsables de más de 98 % de los casos de listeriosis en humanos y animales, aunque otros serovares como 1/2c, también han sido aislados de alimentos, frecuentemente contaminados [32].

De *L. monocytogenes* se reconocen 13 serovares potencialmente patógenos, de los que los más involucrados en el desarrollo de listeriosis de origen alimentario son el 4b (37-64%), 1/2b (10-35%), 1/2a (15-25%) y 1/2c (0-4%) [32].

Por lo tanto, se sugiere que determinadas cepas de *L. monocytogenes* tienen más probabilidades de causar enfermedad que otras [5;23;31].

## **1.2. *Listeria monocytogenes* y sus riesgos para la seguridad alimentaria**

Como se ha comentado previamente, el género *Listeria* pertenece a una familia de bacterias (*Listeriaceae*) compuesta de 17 especies. Una de ellas, *L. monocytogenes*, es la especie patógena para el hombre y provoca la listeriosis, enfermedad que afecta tanto a seres humanos como a animales con invasiones severas del hospedador, ocasionando los siguientes cuadros clínicos: encefalitis, septicemias, gastroenteritis, neumonía, endocarditis, meningitis y meningoencefalitis, abortos e incluso la muerte [1;25].

Entre los humanos, las personas inmunodeprimidas, mujeres embarazadas, adultos de tercera edad y niños, son el principal grupo de riesgo para desarrollar esta infección, la cual es adquirida principalmente por el consumo de alimentos contaminados [34;35]. En individuos sanos, una severa gastroenteritis puede ocurrir después de la ingestión de alimentos contaminados con este microorganismo [1;33;34].

La tasa de incidencia de listeriosis es baja comparada con otros patógenos transmitidos por alimentos, como *Salmonella* spp. y *Shigella* spp; sin embargo, es alarmante la elevada tasa de mortalidad asociada, que varía entre el 20% y 30%, según la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO) y la Organización Mundial de la Salud (OMS). *L. monocytogenes* es susceptible a gran parte de los antibióticos utilizados en veterinaria y en terapia humana, excepto a las cefalosporinas y la fosfomicina donde presenta resistencia natural, y en ciertos casos a las tetraciclinas [33;34].

Aunque la listeriosis es poco frecuente en comparación con otras zoonosis de transmisión alimentaria, la enfermedad suele ser grave con altas tasas de hospitalización y mortalidad, cabiendo destacar que *L. monocytogenes* es un microorganismo zoonótico emergente en la industria de los alimentos, resultando de gran interés para la salud pública [1;33;34].

Uno de los desafíos constantes en el desarrollo industrial del sector es el garantizar el cumplimiento del mayor nivel de exigencia en cuanto a seguridad y salud de los productos alimentarios comercializados.

En este afán sobre la salud pública, una de las principales preocupaciones es garantizar la inocuidad alimentaria debido al riesgo implícito que conlleva la contaminación de los alimentos por microorganismos patógenos causantes de enfermedades de transmisión alimentaria.

El mayor causante a nivel internacional, de casos detectados de listeriosis, es el consumo de alimentos contaminados con *L. monocytogenes*, microorganismo que cuenta con el mayor índice de mortalidad (en %) por transmisión alimentaria a nivel de la UE, siendo la zoonosis en vigilancia con la mayor tasa de hospitalización (99,1% de media) [35;36]. De hecho, es la tercera causa principal de muertes transmitidas por alimentos debido a causas microbianas, siendo responsable de aproximadamente 250 muertes al año en los EE.UU [37].

La tasa de recuperación de este microorganismo en los alimentos varía entre 1 y 70 % o más. Es común en vegetales crudos, productos lácteos, quesos blandos, pescados, aves, carnes y productos refrigerados listos para su consumo (RTE). Por lo tanto, la ingestión de *L. monocytogenes* es un fenómeno muy común [38]. Sin embargo, ha sido descrita otra vía de infección, aunque muy raramente, desde animales infectados a humanos, así como entre humanos.

El primer caso de listeriosis humana fue notificado en 1929 en Dinamarca por Nyfelt [39]. No obstante, el primer cultivo obtenido de *L. monocytogenes* fue en 1921, con la bacteria aislada en Francia por Dumont & Cotoni [40].

Probablemente el hito en la historia más relevante que dio lugar a las primeras sospechas de la estrecha relación entre *Listeria* y los alimentos como medios transmisores de la infección fue la publicación en 1960, por Gray y Killinger, de la clásica revisión titulada "*Listeria monocytogenes and Listerial infections*" en la que se resumía extensivamente el relativamente escaso conocimiento acumulado acerca de este grupo de bacterias [41].

Desde entonces se produjo un aumento en el interés por este patógeno, especialmente con motivo de la aparición, a partir de los década de los 80, de importantes brotes de listeriosis humana que, aunque de reducida morbilidad, producían una elevada mortalidad. Fue precisamente a raíz de estos brotes cuando se pudo demostrar por primera vez, sin ambigüedad, una asociación entre la infección humana y el consumo de alimentos contaminados con *L. monocytogenes* [42-44].

Hasta 1960 la listeriosis fue una enfermedad muy rara y desconocida (menos de 500 casos notificados en todo el mundo). Entre 1960 y 1982 se notificaron más de 10.000 casos y actualmente cada año se declaran a miles en todo el mundo [45].

A partir de este momento la aparición de brotes de listeriosis se encuentra asociado principalmente a la ingesta de alimentos contaminados por *L. monocytogenes*. Aun así, el primer brote en alimentos conocido se produjo durante un largo periodo (1949-1957) en Halle (Alemania), asociado al consumo de diversos productos elaborados con leche no pasteurizada [46]. Sin embargo este mecanismo no pudo establecerse hasta 1981 en un brote en Nueva Escocia (Canadá) [47].

Por muchos años el aislamiento clínico de *Listeria* fue bajo, pero a partir de los años 80 el número de informes de aislamientos de *Listeria* comenzó a incrementarse y desde 1983 en adelante una serie de brotes epidémicos en Norteamérica y Europa estableció claramente la listeriosis como una importante infección transmitida por los alimentos [11].

La listeriosis es una de las enfermedades transmitidas por alimentos más importantes [48], tal como muestran los Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades (CDC) al haber declarado que es la tercera causa principal de muerte por intoxicación alimentaria en la UE [11].

En la actualidad, el número de casos de listeriosis ha aumentado considerablemente. Se estima que la frecuencia en los países desarrollados se encuentra en un rango de 2 a 15 casos en una población de un millón de personas [33;34].

Un claro ejemplo, retrocediendo en el tiempo, es el informe del año 2006 de la European Food Safety Authority (EFSA) and the European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC) sobre agentes de infección por zoonosis, resistencia a antibióticos y brotes transmitidos por alimentos. [11;49]

Tomando sus datos, sobre el número de casos de listeriosis de un período de ocho años comprendido entre 1999 y 2006, se observa un aumento considerable de la incidencia, informando sólo en el año 2006 de un total de 1.583 casos frente a los 667 del año 1999 en el total de la UE. [49]

En Europa, se ha observado una tendencia a la alza en el período 2012 y 2016, con 2.536 casos de listeriosis humana confirmados en el año 2016. La incidencia global de la enfermedad ese mismo año fue de 0,47 casos por 100.000 personas, suponiendo un incremento del 9,3 % frente al año anterior, con un porcentaje de mortalidad que alcanza el 16,2 % [35].

De acuerdo con la última información publicada por la EFSA, durante el año 2018 hubo 2549 casos de listeriosis humana en la Unión Europea, con una tasa de hospitalización del 97% y con 229 muertes, lo que implica una tasa de mortalidad del 15,6%. En España, en ese mismo año, hubo 432 casos confirmados [36].

Posteriormente entre agosto y septiembre de 2019 tuvo lugar el brote de listeriosis por intoxicación alimentaria de *L. monocytogenes* más importante registrado en España, asociado al consumo de carne mechada, afectando a 216 personas [36].

En los últimos 10 años y, tanto en la UE como en España, se confirma una tendencia al alza estadísticamente significativa. Además, desde el año 2015, es una Enfermedad de Declaración Obligatoria (EDO) en nuestro país, lo que supone una importante mejora en la notificación de casos al ser objeto de vigilancia epidemiológica. Sin embargo, los brotes son difíciles de investigar, debido al largo periodo de incubación de la listeriosis (5-70 días), que dificulta el estudio de los alimentos consumidos por los enfermos [11].

El consumo de alimentos o piensos contaminados es la principal vía de transmisión a los seres humanos y los animales. El agente causal se encuentra ampliamente distribuido en el medio ambiente (suelo, plantas y agua), siendo altamente contaminante en plantas procesadoras de alimentos [50-52].

Esta bacteria puede ingresar en las plantas de alimentos mediante la tierra proveniente de los zapatos y la vestimenta del personal que trabaja en la fábrica, así como en el transporte utilizado, por medio de animales que excreten la bacteria o tengan la piel contaminada y mediante vegetales crudos contaminados. Una vez

ingresa en la industria puede llegar al producto por medio de los manipuladores, las superficies de contacto, los equipos y útiles de contacto o el propio ambiente [50-52].

A diferencia de muchas otras bacterias transmitidas por los alimentos, *Listeria* tiene características únicas y específicas, ya que es resistente a altas concentraciones de sal y a la acidez, pudiendo incluso multiplicarse a temperaturas de refrigeración.

Puede crecer en ambientes aeróbicos, micro-aerofílicos y anaeróbicos. Asimismo, su metabolismo le permite mantener la viabilidad en alimentos que se conservan a bajas temperaturas [50-52].

Debido a esto, las recomendaciones para prevenir la contaminación de alimentos por *L. monocytogenes* están vinculadas a la naturaleza de la bacteria, su medio y su resistencia a varias condiciones medioambientales[50-52].

La resistencia y persistencia de esta bacteria dificultan su eliminación, que, junto con las altas tasas de mortalidad en los seres humanos, hacen que los operadores deban establecer un plan de control que garantice la seguridad de los alimentos elaborados [50-52].

Por lo tanto deberá prestarse especial atención a la cocción de los alimentos crudos de origen animal, la corteza de los quesos o los productos listos para el consumo los cuales no han sido sometidos a un tratamiento listericida, como puede ser un tratamiento térmico [50;53].

Las evaluaciones de riesgos realizadas por los organismos estadounidenses FDA y FSIS, y por la FAO y la OMS sobre *L. monocytogenes* en los alimentos listos para el consumo han demostrado la gran influencia que la temperatura del almacenamiento tiene sobre el riesgo de listeriosis, al favorecer la proliferación de *L. monocytogenes* [53].

Al tolerar amplios rangos de pH, temperatura y sobrevivir en presencia de altas concentraciones salinas se ha catalogado a *L. monocytogenes* como un importante patógeno transmitido por los alimentos a nivel internacional [53].

La exposición a temperaturas indebidas que pudieran favorecer la proliferación de *L. monocytogenes* podría determinar una reducción de la vida útil del producto. El período de vida útil es otro factor importante que contribuye al riesgo asociado con los alimentos que favorecen la proliferación de *L. monocytogenes* [53].

Es necesario, por tanto, controlar la combinación de tiempo y temperatura utilizada para el almacenamiento. La vigilancia y el control de las temperaturas de almacenamiento refrigerado son medidas de control fundamentales. La temperatura del producto no debería superar los 6°C (preferentemente 2°C - 4°C) [53].

Actualmente se sabe con seguridad que los alimentos procedentes de la industria láctea pueden contaminarse durante su transformación por subtipos de *Listeria*

*monocytogenes* que persisten en las plantas procesadoras por su capacidad de permanencia en un ambientes industriales formando biofilms [53].

Para prevenir la contaminación de los alimentos con esta bacteria, es fundamental seguir las buenas prácticas de fabricación, las prácticas de higiene y el control de la temperatura en toda la cadena de producción alimentaria, incluyendo las operaciones de distribución y almacenamiento de producto final [50].

Debe evitarse la contaminación cruzada previa al envasado y controlar tanto las fuentes y vías de la contaminación por *L. monocytogenes*, como su crecimiento en el producto hasta el final de su vida útil [50].

Por lo tanto, de cara a garantizar el cumplimiento del Reglamento (CE) n.º 2073/2005, relativo a los criterios microbiológicos aplicables a los productos alimenticios, es necesario y preceptivo llevar a cabo muestreos rutinarios de los equipos y zonas de procesado para la detección de la *L. monocytogenes* en función de un protocolo de muestreo [50].

### **1.3. Importancia de *Listeria monocytogenes* en la industria y productos lácteos**

*L. monocytogenes* se encuentra ampliamente distribuido en la naturaleza debido a sus capacidades de supervivencia, entre las que se encuentra la creación de biofilms, permitiendo todo ello el encontrar sus reservorios en suelos, forraje, vegetación en descomposición, silos de grano, agua y varios productos alimenticios como vegetales crudos, lácteos no pasteurizados, queso, helados, pescado, embutidos y productos cárnicos y otros productos refrigerados [23].

Además, se ha aislado desde humanos y animales donde sobrevive como saprófito, siendo incluso aislada en heces de aproximadamente un 5 % de adultos sanos. Es un microorganismo ubicuos y resistente, con un estilo de vida esencialmente saprofita. Se encuentra como patógeno oportunista en el intestino de animales y personas que actúan como portadores y, también, ampliamente distribuido en ambientes naturales como suelo, agua, efluentes, pastos y ensilados dónde sobreviven durante períodos extensos de tiempo [23].

También se encuentra en el suelo, paredes, techos, material de trabajo y equipos de plantas de procesado de alimentos. En su estudio, desde su descubrimiento hasta la actualidad, se ha llegado a aislar en una gran variedad de alimentos listos para el consumo (RTE) de origen vegetal, lácteo, marino o cárnico y en ensaladas y frutas [23].

En 2008, los estudios de Wagner & McLauchlin demostraron que *Listeria* puede sobrevivir a pH 4,5 por sobre 90 días en queso tipo feta y crecer (aunque lentamente) a temperaturas de refrigeración, lo cual eleva las posibilidades de que *L. monocytogenes* pueda ser un contaminante post-procesamiento de los alimentos refrigerados que tienen una larga vida [1].

En el caso de quesos elaborados con leche pasteurizada o no pasteurizada, la ausencia de *L. monocytogenes* depende de parámetros intrínsecos ( $a_w < 0,92$ ,  $pH < 4,4$ , presencia de péptidos antimicrobianos, etc.) y extrínsecos ( $t < -18^\circ\text{C}$ ,  $\text{NaCl} > 16\%$ , humedad, etc.) limitantes o de su combinación [1], mientras que su presencia es siempre problemática debido a su capacidad extraordinaria de supervivencia en condiciones hostiles, pudiendo persistir en entornos asociados a alimentos durante meses o años [54-56].

Los brotes de enfermedad en humanos provocados por este organismo tienen un impacto económico considerable para la sociedad y la industria alimentaria [57]. La industria alimentaria y las agencias reguladoras alrededor del mundo realizan una gran cantidad de pruebas, en muestras de alimentos y ambientes alimentarios, de *L. monocytogenes* y *Listeria spp.* [4]

Por lo tanto, la detección de especies de *Listeria* se utiliza a menudo en la industria alimentaria, como marcador de las condiciones sanitarias existentes, al permitir el rastreo de aislados y localización de posibles cepas de *L. monocytogenes* que hagan acto de presencia dentro de la cadena y el entorno de la planta, así como de su crecimiento y persistencia. [4]

La identificación de nuevas especies de *Listeria* y cambios en su taxonomía suponen un impacto considerable para la industria alimentaria [58]. Además, hay que considerar los elevados costos asociados a la monitorización y análisis de la presencia/ausencia de *Listeria*, incluyendo el estudio característico de las cepas existentes, y debidos a la aplicación de medias para su eliminación en las superficies, materiales, equipos y productos, teniendo en cuenta la pérdida que produce en el sector industrial la retirada de alimentos donde se sospecha su presencia [59].

La presencia y persistencia en ambientes alimentarios de este patógeno representa un grave problema para la industria, debido a la dificultad de su control en las plantas de procesamiento y los riesgos asociados como enfermedad de transmisión alimentaria [53]. En este caso de estudio el enfoque está en *L. monocytogenes* en leches, derivados lácteos frescos o pasteurizados (quesos, queso fundido), superficies y coadyuvantes tecnológicos utilizados en las plantas de procesamiento de dichos alimentos.

La importancia sanitaria crítica, para garantizar la inocuidad de los productos lácteos y la salud de los consumidores, que supone la contaminación o recontaminación durante la manipulación, cortado o contacto con superficies contaminadas de los productos alimentarios por *Listeria*, viene demostrada por los antecedentes históricos mencionados relativos al consumo de alimentos, como principal vector de transmisión en los casos de listeriosis producidos a nivel mundial, por sus riesgos elevados en la salud de las personas y su creciente relevancia en la Red de Alertas Alimentarias (AESAN) [60-62].

Debido a esto se hace cada vez más relevante el estudio y análisis en profundidad de *L. monocytogenes*, particularmente en la industria láctea, haciendo uso de los actuales avances en microbiología y biología molecular aplicados al ámbito de la seguridad alimentaria para la discriminación y tipificación de este organismo patógeno [63].

## 2. Objeto y Objetivos del Estudio

El objeto principal del presente estudio es el análisis comparativo y la consecución en el tiempo de resultados de detección, confirmación y caracterización selectivos, de microorganismos de riesgo para las personas, concretamente la bacteria patógena *L. monocytogenes*. El análisis se desarrollara en las superficies, coadyuvantes tecnológicos, productos y equipos (ambiente de fabricación alimentaria) de un total de 3 fábricas dedicadas a la producción quesera, funcionando como metodología de control de *L. monocytogenes* en el ámbito alimentario.

Se estudian específicamente las cepas captadas en esta serie de fábricas del sector lácteo, un ambiente en donde dicho microorganismo constata un gran riesgo, igual que ocurre en otros sectores alimentarios (cárnicas, pesqueras, transformados vegetales) donde también, por su comportamiento y características, consigue establecerse llegando a producir intoxicaciones alimentarias. Para lograr la consecución de este objetivo principal, se plantean de manera complementaria 5 objetivos específicos:

- 1- Diseñar un plan de ensayos a seguir para la detección de *L. monocytogenes* en cada planta objetivo, aplicando un procedimiento de análisis selectivo en base a la normativa europea vigente y las directrices de muestreo oficiales, con capacidad de reproducibilidad para el estudio de sucesivos muestreos en el tiempo.
- 2- Determinar la identidad de los microorganismos detectados, resultantes del cultivo selectivo de las tomas muestreadas en las fábricas lácteas, para confirmar la presencia/ausencia de *L. monocytogenes* y su localización dentro de las mismas.
- 3- Determinar el linaje y serogrupo de las cepas de cara a la caracterización periódica, como sistema de seguimiento epidemiológico, de las cepas circulantes de *L. monocytogenes* en cada caso objetivo.
- 4- Aislar y conservar las cepas obtenidas en las instalaciones, de cara a la generación de una base de datos genotípicos de *L. monocytogenes*, mediante secuenciación masiva por PCR y uso de herramientas bioinformáticas, que nos permitan obtener resultados de su potencial patogénico (genes de virulencia) y resistencia a antibióticos.
- 5- Diagnosticar la situación sanitaria respecto a *Listeria* en las áreas de trabajo de cada fábrica, analizando y comparando los resultados de los muestreos para determinar si existe persistencia de cepas, de cara a evitar una alerta alimentaria por Listeriosis que ponga en riesgo la seguridad de los productos y salud de los consumidores, dentro de los sistemas de mejora continua de los planes de análisis de peligros y puntos de control críticos (APPCC) y los protocolos sanitarios a aplicar por la empresa para su eliminación.

En el caso de observar una reincidencia de cepas en los mismos puntos de muestreo (tras la aplicación de medidas correctoras), los datos nos permitirían sospechar de presencia de biofilms resistentes en las instalaciones y detectar el riesgo existente, implicando la necesidad de reorientar la respuesta en cada caso.

### **3. Materiales y Metodología del Estudio**

El presente estudio se desarrolla sobre una base metodológica procedimental formada por diferentes fases de análisis establecidas para la captación (recogida), detección, identificación (confirmación) y caracterización de las cepas de *L. monocytogenes* presentes en las superficies, equipos y productos de la industria láctea quesera.

Los datos a obtener con su aplicación permiten valorar la eficacia del plan de control APPCC seguido por la industria, en cuanto al sistema de limpieza y desinfección se refiere, permitiendo ejercer como procedimiento analítico de vigilancia selectiva sobre las cepas existentes de *L. monocytogenes* y su localización en las instalaciones frente al riesgo intrínseco sobre la salud que conlleva su transmisión a los alimentos [64].

#### **3.1. Recogida de muestras**

El procedimiento metodológico oficial a seguir para la toma de muestras en industrias alimentarias aparece establecido en la norma UNE-EN ISO 18593:2018 [65] sobre microbiología de la cadena alimentaria, por la cual se describen los posibles métodos horizontales de muestreo de superficies permitidos en la UE para la recogida y mantenimiento de microorganismos a fin de realizar su análisis microbiológico en laboratorio [65] y garantizar las disposiciones del Reglamento (CE) nº 852/2004 [66] relativo a la higiene de los productos alimentarios aplicable a todas las etapas de producción, transformación y a la distribución y exportación de alimentos.

Para la toma de muestras, se tienen en cuenta las directrices de muestreo oficial [51] y [52] basadas en la guía de ANSES realizada por el laboratorio comunitario de referencia para *L. monocytogenes*, puesto que la norma ISO 18593:2018 [65] no aporta recomendaciones específicas ni directrices suficientes a la hora de realizar la aplicación del artículo 5.2 del Reglamento (CE) nº 2073/2005 [67] relativo a los criterios microbiológicos aplicables a los productos alimenticios.

Dicho artículo establece la necesidad del muestreo regular en las zonas de trabajo y equipos utilizados en la producción alimentaria tomando como referencia la norma [65] en aquellos establecimientos que elaboren alimentos susceptibles de plantear un riesgo para la salud pública, en este caso objetivo por listeriosis, para garantizar el cumplimiento de los criterios microbiológicos del Anexo I del Reglamento (CE) nº 2073/2005 [67] y sus modificaciones indicadas en el Reglamento (CE) nº 1441/2007 [68].

El muestreo se realiza con el siguiente instrumental:

- Contenedor refrigerado y hermético para el transporte de las muestras a laboratorio a Tº entre 1 y 8 °C (según lo indicado en [5] y [6]).
- Esponjas con mango con 10 ml de solución amortiguadora neutralizante SSL10NB/ Hisopos de muestreo con bastoncillo con 10 ml de solución neutralizante RS96010NB.
- Guantes desechables esterilizados, rotuladores y etiquetas autoadhesivas.
- Bolsas estériles herméticas (Bolsas Stomacher).
- Botes estériles herméticos para recogida de muestras.

### **3.1.1. Condicionantes del momento óptimo de toma de muestras:**

La detección de *L. monocytogenes* puede dificultarse si se toman las muestras inmediatamente o poco después de que se haya producido la limpieza y desinfección de las instalaciones [51].

Debido a los daños que los agentes químicos utilizados para la limpieza y desinfección producen en las células, estas pueden continuar con vida, aunque no sean viables para cultivo en laboratorio, por lo que no se detectan fácilmente [51].

Además, es posible que no se puedan detectar aquellas células que hayan quedado albergadas en ciertos lugares, a pesar de su limpieza y desinfección. Es más fácil tomar muestras una vez que son desalojadas durante el procesado de los alimentos debido a la vibración de los equipos y/o tras el contacto con alimentos y líquidos [51].

Por lo tanto, para aumentar la probabilidad de detección de una cepa persistente, las muestras se deberán tomar durante el procesado de los alimentos, una vez transcurridas al menos 2 horas tras la producción o al final de esta fase, es decir, antes de los procesos de limpieza y desinfección [52].

En las líneas de transformación en las que se fabrican productos alimenticios a partir de productos crudos que no han sido sometidos a ningún tratamiento que reduzca los niveles de microorganismos (por ejemplo, quesos de leche cruda), las muestras de las superficies para la detección de *L. monocytogenes* que se tomen durante la fase de transformación pueden proceder tanto de estos productos crudos como de los lugares en los que las células de *L. monocytogenes* pueden persistir en el entorno de procesado del alimento [52].

En el caso de procesarse productos pasteurizados o materias primas que normalmente no están contaminadas (por ejemplo, quesos pasteurizados), en el análisis de *L. monocytogenes* de una muestra superficial que sea positiva, ésta debería considerarse como un tipo persistente de *Listeria* [52].

En caso de procesarse un alimento crudo, se pueden tomar muestras tras los procesos de limpieza y desinfección o al inicio de la fase de producción, además de las muestras que se recojan durante su transformación. No obstante, este procedimiento puede dar una falsa sensación de seguridad [52].

Se debe tener en cuenta que, la detección de *L. monocytogenes* en superficies en contacto con alimentos, tras realizar los procesos de limpieza y desinfección, es un indicador de la existencia de un fallo grave en tales procesos. Este caso señala la presencia de cepas persistentes y resistentes al sistema empleado, haciendo urgente y necesaria la toma de medidas correctoras que garanticen la seguridad sanitaria e inocuidad de los alimentos producidos.

De igual modo, sería recomendable tomar muestras cuando se efectúen tareas de mantenimiento o reparación de equipos, se realicen obras o se incremente la producción, ya que son situaciones que implican un aumento del riesgo de contaminación con *L. monocytogenes*.

### 3.1.2. Plan de ensayos y modo de operación:

*L. monocytogenes* puede estar presente en superficies limpias a simple vista, aunque es más frecuente en lugares húmedos y sucios, que permiten el crecimiento y la persistencia de la bacteria. Aquellos lugares de difícil acceso que no pueden limpiarse fácilmente son potenciales lugares donde puede albergarse la bacteria y de donde deben tomarse muestras [51].

Por lo cual, el plan de ensayos debe basar la selección de los puntos de muestreo en el riesgo potencial presente en cada área de operación y las particularidades de cada caso, así como irse actualizando y revisando tras modificaciones en la distribución y procesado de la fábrica. Es prioritario recoger con frecuencia muestras de zonas en las que los productos alimenticios están expuestos a contaminación.

En el caso de este estudio, se realiza un plan de ensayos estructurado en la ejecución de una serie de 3 muestreos (espaciados en el tiempo  $\approx$  3 meses) en 50 puntos seleccionados, para cada una de las fábricas a analizar, cuyos nombres no se mencionan por motivos de confidencialidad (fábricas A,B,C). En la selección se incluyen la toma de superficies con/sin contacto directo con los alimentos, coadyuvantes tecnológicos y el propio alimento en sí. Cada punto de muestreo tiene un nº identificador de muestra que se indica con etiqueta o rótulo en cada uno de los dispositivos (bolsas, tubos, botes) usados. A continuación, se dispone la configuración del plan de muestreo modelo, para cada caso objetivo (Tablas 1-7).

-Tabla 1. Modelo de muestreo para la Fábrica A. Elaboración Propia

ÁREA	Nº MUESTRA	PUNTO DE MUESTREO
SALA 1	A-1	Arqueta enfriadores
	A-2	Arquetas higienizadoras (entre 2 y 3)
	A-3	Arqueta higienizadora 1
	A-4	Suelo pasteurizadores, arqueta común
	A-5	Suelo desnatadora (decanter centrífugo)
	A-6	Arqueta en la zona de nata
	A-7	Suelo del tanque nata pasteurizada
	A-8	Suelo finos+finos debajo de equipos
SALA CUBAS	A-9	Superficie salida cuba sobre escalón superior
	A-10	Superficie rejillas de la tapa de la cuba 1
	A-11	Superficie de la mesa de cuajo
	A-12	Superficie barra corte cuajada
	A-13	Suelo debajo de cuba 3
	A-14	Arqueta entre cuba 1 y 2
SALA FABRICACIÓN	A-15	Suelo Bumper
	A-16	Superficie de apertura de llenadora de minis
	A-17	Superficies de manipulación (ponetapas)
	A-18	Suelo debajo de llenadora

*-Tabla 2. Modelo de muestreo para la Fábrica A (continuación). Elaboración Propia*

ÁREA	Nº MUESTRA	PUNTO DE MUESTREO
SALA FABRICACIÓN	A-19	Bandeja de salida de suero de la llenadora
	A-20	Superficie mesa ponetapas
	A-21	Superficie mesa báscula salida llenadora
	A-22	Superficie cinta ponetapas
	A-23	Superficie molde limpio
	A-24	Superficie tapa molde limpio
	A-25	Superficie blanca de prensa 5, teflón entrada
	A-26	Superficie teflón entrada prensa 5
	A-27	Superficie cinta azul salida prensa 5
	A-28	Superficie cinta azul salida prensa 5
	A-29	Arqueta zona acumuladores próxima a llenadora
	A-30	Suelo lavadora 2
	A-31	Superficie molde y tapa sucia MINI
	A-32	Superficie cinta azul molde sucio entrada lavadora 2
	A-33	Arqueta zona desmoldeo
	A-34	Superficie cinta salida prensa, salida desapilador
	A-35	Superficie mesa desmoldeo junto a quitatapas
	A-36	Superficie volteador de tapas
	A-37	Superficie cinta salida desmoldeo
A-38	Arqueta zona de llenadora	
A-39	Queso MINI	
SALA SALADERO	A-40	Suelo entrada rejilla granate
	A-41	Salmuera
	A-42	Arqueta
	A-43	Superficie cinta salida saladero, travesaños y calles
SALA PALETIZADO	A-44	Antimoho
	A-45	Superficie palé
	A-46	Arqueta de paletizadora antes de la salida del saladero
	A-47	Superficie caja sucia
SALA CÁMARAS	A-48	Entrada higiénica
SISTEMA ACCESO ESTÉRIL (SAS)	A-49	Suelo
	A-50	Suelo rejilla granate

*-Tabla 3. Modelo de muestreo para la Fábrica B. Elaboración Propia*

ÁREA	Nº MUESTRA	PUNTO DE MUESTREO
ENTRADA	B-1	Rodillos SAS
SALA RECEPCIÓN	B-2	Arqueta 101

*-Tabla 4. Modelo de muestreo para la Fábrica B (continuación 1). Elaboración Propia*

ÁREA	Nº MUESTRA	PUNTO DE MUESTREO
SALA RECEPCIÓN	B-3	Suelos/Arqueta tanques nata
	B-4	Interior Tanque TC12
	B-5	Vibrador finos
SALA FABRICACIÓN A	B-6	Arqueta pasteurizador
	B-7	Boca manguera ACS 93
	B-8	Arqueta bajo zona de llenado
	B-9	Lira cuba C1
	B-10	Balsa llenadora
	B-11	Cinta 6
	B-12	Colchón 6
	B-13	Cinta gris debajo desmoldeo (234)
	B-14	Tapa limpia
	B-15	Molde limpio
	B-16	Arqueta 225
	B-17	Cinta azul desmoldeo
	B-18	Suelo debajo pasteurizador/Arqueta 338
	B-19	Arqueta 336
SALA FABRICACIÓN B	B-20	Arqueta 331/Sumidero llenadora
	B-21	Balsa suelo llenadora
	B-22	Suelo pasillo entre cubas
	B-23	Superficie llenadora
	B-24	Lira cuba 2
	B-25	Cinta 2
	B-26	Colchón 2
	B-27	Arqueta entre prensas 3 y 4
	B-28	Tapa limpia
	B-29	Molde limpio
	B-30	Sumidero 323 de zona de desmoldeo
	B-31	Cinta desmoldeo 324
SALA SALADERO 1	B-32	Arqueta entre piscina y pared
	B-33	Cestones
	B-34	Cinta 403
	B-35	Cinta entrada 501
	B-36	Cestones
	B-37	Salmuera
SALA SALADERO 2	B-38	Arqueta 906
	B-39	Superficie piscina/cestones
	B-40	Cinta 902

*-Tabla 5. Modelo de muestreo para la Fábrica B (continuación 2). Elaboración Propia*

ÁREA	Nº MUESTRA	PUNTO DE MUESTREO
PASTEURIZADOR	B-41	Cinta 601
	B-42	Caja salida 604
ZONA ANTIMOHO	B-43	Antimoho de Arqueta 718
	B-44	Cinta 701
	B-45	Boquillas tanque dosificador
	B-46	Bandeja de antimoho recuperado
SALA FABRICACIÓN C	B-47	Sumidero
	B-48	Cinta salida 1208
	B-49	Cinta entrada
	B-50	Salida cepilladora

*- Tabla 6 Modelo de muestreo para la Fábrica C. Elaboración Propia*

ÁREA	Nº MUESTRA	PUNTO DE MUESTREO
ENTRADA	C-1	Superficie caja blanca
	C-2	Superficie palé caja blanca
SALA PINTURA	C-3	Superficie cinta 1 antes de cepilladora
	C-4	Superficie cinta 1 después de cepilladora
	C-5	Superficie suelo arqueta
SALA SECADO	C-6	Superficie cinta 1607
ZONA VOLCADORES (CUÑAS QUESO)	C-7	Superficie volcador cuñas cortadas
	C-8	Superficie volcador cuñas 2
	C-9	Superficie volcador cuñas 2 carril
	C-10	Superficie volcador cuñas 1
	C-11	Superficie caja limpia lavadora (salida)
SALA LONCHEADO	C-12	Superficie mesa de apoyo
	C-13	Superficie guantes operario de mesa loncheado
SALA LONCHEADO 2	C-14	Superficie garras L19
SALA CUÑAS 1	C-15	Superficie dedos cortadora L16
	C-16	Superficie rejilla L16
	C-17	Superficie guantes operario L16
	C-18	Superficie suelo arqueta
SALA CUÑAS 2	C-19	Superficie rejilla L13
	C-20	Superficie guantes operario L13
	C-21	Superficie dedos cortadora L13
	C-22	Superficie cinta entrada cortadora L13
	C-23	Superficie cinta salida cortadora L13
	C-24	Superficie suelo arqueta

-Tabla 7. Modelo de muestreo para la Fábrica C (continuación). Elaboración Propia

ÁREA	Nº MUESTRA	PUNTO DE MUESTREO
SALA CUÑAS 3	C-25	Superficie guantes operario L11
	C-26	Superficie borde de apoyo L11
	C-27	Superficie cinta entrada cortadora L11
	C-28	Superficie cinta salida cortadora L11
	C-29	Superficie dedos cortadora L11
	C-30	Superficie suelo
	C-31	Superficie cuchilla laminadora L11
SISTEMA ACCESO ESTÉRIL (SAS Taller)	C-32	Superficie rodillos
	C-33	Superficie suelo salida
SISTEMA ACCESO ESTÉRIL (SAS Fundido)	C-34	Superficie rodillos
	C-35	Superficie suelo salida
SALA FUNDIDO	C-36	Superficie mesa antes cinta pesado
	C-37	Superficie cinta pesado
SALA RALLADO	C-38	Superficie suelo (daños)
	C-39	Superficie guantes operario
	C-40	Superficie tamiz L30
	C-41	Superficie canalón L30
	C-42	Superficie suelo
	C-43	Superficie mesa
	C-44	Superficie palé esclavo
	C-45	Superficie caja
SISTEMA ACCESO ESTÉRIL (SAS Picking)	C-46	Superficie rodillo
	C-47	Superficie suelo
SALA FUNDIDO 2	C-48	Superficie bajo rodillo
SISTEMA ACCESO ESTÉRIL (SAS Baños)	C-49	Superficie rodillos
	C-50	Superficie suelo salida

El método de operación del muestreo, en base a las directrices de análisis microbiológico, se realiza mediante frotado con las esponjas o hisopos sobre las superficies de los equipos y zonas de procesado (cintas, mesas, rodillos, cajas, palés, sumideros, arquetas, cortadoras, cepilladoras, etc) [51;52]. También en el muestreo se deben supervisar los coadyuvantes tecnológicos (agua de drenaje, salmuera, antimoho, etc) como también el propio alimento (queso), recogidos en botes o bolsas estériles. Para aquellas zonas pequeñas de difícil acceso, se recomienda utilizar hisopos. Por el contrario, se recomienda utilizar esponjas o paños para tomar muestras de las zonas más amplias [51;52].

Se recogen 25 g o 25ml de muestra del producto para su análisis, según lo indicado en el Capítulo 1 del Anexo I del Reglamento (CE) nº 2073/2005 en función de la capacidad del alimento que se procesa para favorecer el crecimiento de *Listeria*, en

nuestro caso se debe garantizar la ausencia en 25 g o la presencia de <100 ufc/g durante su vida útil [53;67].

Al emplear esponjas seguir el siguiente método: Abrir la bolsa de plástico que contiene el dispositivo de frotado. Extraer de forma aséptica el dispositivo de frotado con guantes estériles. Frotar con fuerza, con un movimiento en zigzag, la superficie completa en cuestión en dos direcciones perpendiculares con un total de 10 repeticiones, cambiando la cara que se utiliza del dispositivo de frotado. Volver a introducir el dispositivo de frotado en la bolsa de plástico y cerrarla para protegerlo de cualquier tipo de contaminación y para que permanezca húmedo hasta el momento del análisis [52].

Al emplear hisopos seguir el siguiente método: Extraer un hisopo del tubo en el que se encuentra y frotar con la máxima fuerza posible sin desintegrarlo y rotarlo en el interior del equipo o sobre cualquier otra zona de difícil acceso de la que se vayan a tomar muestras. Colocar el hisopo en el tubo original, cerrar el tubo para proteger el hisopo de cualquier tipo de contaminación y para que su extremo permanezca húmedo hasta el momento del análisis. Frotar la zona muestreada con un paño con alcohol en caso de no usarse una solución neutralizante [52].

Estos procedimientos de muestreo solo son válidos para los casos de detección y/o identificación de *L. monocytogenes* y *Listeria spp.* con una mayor sensibilidad y nunca para su recuento, independientemente del equipo de muestreo utilizado.

Lo recomendable es que a la hora de muestrear la superficie total sea de 1 m<sup>2</sup> en suelos y de 100 cm<sup>2</sup> en superficies de trabajo como cintas y mesas, exceptuando superficies irregulares como ganchos o guantes de los manipuladores, siempre que sea posible. Las extensiones tomadas en los puntos muestreados deben ser constantes, de cara a uniformizar la recogida, sin influir su disposición en una mayor o menor zona de arrastre de microorganismos [52].

El comienzo del análisis microbiológico en laboratorio debe realizarse tras el menor tiempo transcurrido posible desde la toma de muestras en planta. Realizar el transporte mediante el contenedor refrigerado. El tiempo ideal son 24h y nunca debe superar las 36h desde el muestreo, según lo establecido en el apartado 8.3 de la norma ISO 7218:2007 [69], junto con sus modificaciones dispuestas en la ISO 7218:2007/A1:2013 [70].

Las fechas y horario de muestreo e inicio del análisis en laboratorio deben quedar registradas en el informe analítico.

### **3.2. Análisis microbiológico (enriquecimiento selectivo por cultivo)**

En cuanto a la aplicación de un metodología de diagnóstico para la detección de *L. monocytogenes* en laboratorio, cabe tener en consideración que “los métodos de referencia actuales para la detección de *L. monocytogenes* según lo propuesto por la FDA, USDA, ISO e IDF permiten la recuperación de este patógeno de una variedad de alimentos y ambientes de las plantas con relativa facilidad” [71].

El procedimiento oficial a seguir para el análisis microbiológico aparece establecido en las normas UNE-EN ISO 11290-1:2017 e UNE-EN ISO 11290-2:2017 sobre microbiología de la cadena alimentaria, por las cuales se establecen los métodos horizontales para la detección y el recuento de *L. monocytogenes* y *Listeria spp.* [72;73]. Teniéndolo en cuenta, se siguen los siguientes 4 pasos procedimentales:

**1)** Una vez que las 50 tomas del muestreo son recepcionadas en el laboratorio, se realiza un enriquecimiento primario de las mismas en Caldo Half Fraser (HFB), un medio con concentración reducida de agentes selectivos, llevando como máximo las 24h posteriores. Dicho caldo se prepara con los componentes indicados en el Anexo II de la norma UNE-EN ISO 11290-1:2017 [72].

En este caso, para la preparación del caldo a media concentración, se disuelve en agua destilada el medio completo deshidratado Fraser Broth Base - ISO (CM0895) en frascos de reactivos de 2 L en relación 12,9 g por 225 ml, realizando una agitación de los mismos para favorecer la disolución, calentando si es necesario.

Una vez están los medios homogeneizados se esterilizan en autoclave a 121°C durante 15 minutos. Una vez esterilizados, se enfrían y mantienen en baño termostático a unos 50°C, se añade asepticamente el Half Fraser Selective Supplement (SR0166E) reconstituido y se homogeniza para su uso.

Las muestras en bolsas Stomacher son dosificadas con HFB mediante una llenadora peristáltica automática en relación de dilución 1:10, lo cual supone que las muestras de 25 g o 25 ml son suspendidas en 225ml y las esponjas de 10 ml con 90 ml de HFB. Posteriormente se homogenizan con Pulsifier durante 30s, tras lo cual pasan a incubarse a 30±1°C durante 24±2h.

**2)** Tras ello, se realiza un enriquecimiento secundario con Caldo Fraser Selectivo (FB), un medio con concentración completa de agentes selectivos cuyos componentes aparecen indicados en el Anexo II de la norma UNE-EN ISO 11290-1:2017 [72].

En este caso, se disuelve en agua destilada el medio deshidratado Fraser Broth Base - ISO en frascos de reactivos de 2 L, pero en relación 28,7 g por 500 ml, procediendo del mismo modo que con el HFB pero con el Fraser Selective Supplement (SR0156E) reconstituido.

Se preparan tubos de ensayo con 10 ml de Caldo Fraser selectivo a los que se transfieren 0,1 ml de los cultivos provenientes del enriquecimiento primario en HFB. Se realiza una agitación rápida en vórtex de los tubos y pasan a incubación a 37±1°C durante 48±2h.

A partir de los cultivos incubados, en ambos tipos de enriquecimiento, se realiza una primera supervisión visual de las muestras en base a la hidrólisis de la esculina, que produce el ennegrecimiento del caldo Fraser (figura 1), como indicador de sospecha de *Listeria* [74;75].



*Figura 1. Caldo Fraser. Sin inocular (izquierda) y sospecha de Listeria (derecha)*

**3)** El medio utilizado para cultivar selectivamente es el Agar Cromogénico para *Listeria* según Ottaviani y Agosti (ALOA), preparado tal como se indica en el Anexo I de la norma UNE-EN ISO 11290-2:2017, en frascos de reactivos de 1 L a partir de la disolución en agua destilada del medio deshidratado Chromogenic *Listeria* Agar – ISO (CM1084) en relación 34,5 g por 480ml, que se mantienen en agitación durante unos 30 minutos [73].

Una vez se obtenga una suspensión homogénea se esterilizan en autoclave a 121°C durante 15 minutos. Una vez termina el ciclo se añaden asépticamente los dos suplementos reconstituidos de ALOA denominados Chromogenic *Listeria* Selective Supplement (ISO) y OCLA (ISO) Differential Supplement, y se vuelve a agitar durante 5 minutos.

Una vez preparados se mantienen los botes a 48-50°C en un baño termostático para evitar su endurecimiento antes de la preparación de las placas de agar. Las placas Petri se preparan en la cabina de flujo laminar añadiendo aproximadamente 15-20 ml de agar a cada placa, formando una capa homogénea sin burbujas mediante una breve agitación lateral y se dejan solidificar [76].

Una vez se ha solidificado el agar en las placas, se realiza la siembra de las muestras incubadas en los dos tipos de enriquecimiento mediante la técnica de agotamiento con asas de 10 µl para un total de 100 placas (50 enriquecimiento primario + 50 enriquecimiento secundario) en cada muestreo de una fábrica. Una vez sembradas, se voltean las placas y se incuban a 37°C durante 48±2h para poder observar la posible aparición de colonias características de *L. monocytogenes*.

**4)** Una vez aisladas las muestras en placas, se realiza la interpretación de resultados en donde se seleccionan las colonias sospechosas, detectadas mediante los indicadores de *Listeria* en ALOA que tipifican a *L. monocytogenes* mediante colonias de color azul verdoso con halo opaco (*Figura 2*). En caso de ser colonias azul verdosas sin halo, es indicativo de *Listeria spp* (*Figura 3*). En el resto de casos indica la ausencia de *Listeria*.



*Figura 2. Presencia colonias típicas de L. monocytogenes en ALOA*



*Figura 3. Presencia de colonias de Listeria spp. (sin halo) en ALOA.*

Una vez que las colonias detectadas han sido interpretadas como positivas conforme a los indicativos de pertenencia a la especie *L. monocytogenes* se procede, en los siguientes apartados, a la confirmación y caracterización por medio de pruebas que

pueden ser: morfológicas, fisiológicas o bioquímicas [77]. En nuestro caso se procede a confirmar la presencia mediante el uso de datos de la secuenciación genética y programas bioinformáticos, herramientas que están ganando protagonismo en la comunidad investigadora, en el análisis de patógenos transmitidos por alimentos [63].

Para desarrollar el análisis microbiológico se ha empleado el siguiente instrumental:

- |   |                                      |
|---|--------------------------------------|
| -Bolsas Stomacher estériles                 | -Pipetas automáticas                 |
| -Stomacher/Pulsifier                        | -Pipetas de 10 ml                    |
| -Autoclave (J.P Selecta)                    | -Frascos de reactivos de laboratorio |
| -Balanza electrónica                        | -Asas de siembra de 10 µl            |
| -Baño termostático                          | -Llenadora peristáltica automática   |
| -Agitador magnético                         | -Estufas de incubación a 30 y 37°C   |
| -Placas de Petri de Ø 90 a 100 mm           | -Cabina de flujo laminar             |
| -Medios de OXOID (Thermo Fisher Scientific) | -Tubos de ensayo y gradillas         |

### **3.3. Extracción de ADN**

Para la extracción del ADN bacteriano de *L. monocytogenes* se utiliza una metodología rápida de lisis celular, a aplicar en las colonias provenientes de cada serie de 100 placas cultivadas en agar ALOA por muestreo, que tras la interpretación visual, son sospechosas de ser cepas positivas de la especie objetivo.

Para la obtención del material genético de las presuntas cepas de *L. monocytogenes* se realiza la recogida con asas de siembra de 1 µl sobre las colonias características de interés que estén perfectamente aisladas en las placas Petri [78].

La colonia arrastrada con el asa se transfiere a 100 µl de solución salina fisiológica o PBS 1X (Phosphate Buffered Saline) en tubos Eppendorf y se agita en vórtex para después añadir 900 µl de solución salina o PBS 1X y volver a agitar. Posteriormente se centrifuga a máxima velocidad (14000 rpm) durante 10 minutos [78].

Se retira el sobrenadante resultante del centrifugado y al pellet celular que permanece en el tubo se le añaden 100 µl de Tris-HCl (o buffer de PCR 1X). Se resuspende el pellet mediante vórtex y se pasa a incubar en el Termomixer Confort a 95°C durante 20 minutos en agitación a 800 rpm causando la lisis [78].

Al terminar se vuelve a centrifugar a máxima velocidad durante 5 minutos. Si no se va a utilizar inmediatamente, recoger 70 del sobrenadante a un tubo nuevo y conservar a 4 °C para almacenarlo un máximo de una semana o a -20°C para conservarlo más tiempo [78].

El procedimiento se realiza con el siguiente instrumental:

- |                                      |                          |
|--------------------------------------|--------------------------|
| -PBS 1X (Thermo Fisher Scientific)   | -Asas de siembra de 1 µl |
| -Tris-HCL (Thermo Fisher Scientific) | -Agitador vórtex         |
| -Puntas de pipetas estériles         | -Pipetas automáticas     |
| -Centrífuga eppendorf                | -Termomixer confort      |
| -Tubos eppendorf                     |                          |

### 3.4. PCR a tiempo real (RTi-PCR)

Se realiza una técnica diagnóstica cuantitativa del tipo RTi-PCR (a tiempo real) o también denominada qPCR, utilizada para amplificar la región cromosómica de virulencia *hly* con unas 400-500 pares de bases (pb), enmarcada por el gen *prs* en su extremo izquierdo y por *orf's* en su derecha, que es codificante de la enzima listeriosina O (LLO), una hemolisina responsable en gran medida de la capacidad patogénica expresada en *L. monocytogenes*. Simultáneamente, mediante la detección y medida de la intensidad de emisión de fluorescencia del equipo termociclador, poder cuantificar de forma absoluta y proporcional el producto de amplificación en su gráfico correspondiente ( $\Delta Rn/N^{\circ}$  Ciclos), como método de confirmación [79-83].

Se aplica el protocolo de detección cuantitativa de *L. monocytogenes* y *L. innocua* de Applied Biosystems 7500 RTi-PCR System with Taqman PCR Core Reagents Kit para los ensayos, realizados y evaluados con este procedimiento en base a su viabilidad y cuantificación precisa (valores de  $R^2 > 0,99$ ), en un rango dinámico de 5 unidades logarítmicas, con una eficiencia en la PCR superior al 99% [79;80].

Los reactivos se mantienen en las condiciones indicadas para su uso (nevera/congelador). En dicho procedimiento se seleccionan los cebadores, el reactivo Taq PCR y la sonda Taqman específica para el gen *hlyQ*, que forman parte de la mezcla de reacción de PCR, en donde se incluye el ADN extraído de las colonias cultivadas en placas de agar cromogénico ALOA [79;80].

La mezcla de trabajo (25  $\mu$ l/reacción), que se prepara en la cabina de flujo laminar en condiciones estériles, contiene unos cebadores o primers específicos del gen de virulencia *hlyQ*, llamados *hlyQF* (forward) cuya secuencia es 5'-CAT GGC ACC ACC AGC ATC T-3' y *hlyQR* (reverse) con la secuencia 5'-ATC CGC GTG TTT CTT TTC GA-3' [79;80].

También se incluye agua libre de nucleasas (agua SIGMA), el reactivo Taq ADN polimerasa (TaqMan Universal PCR Master), necesario para iniciar la reacción en cadena de la polimerasa de los genes a amplificar y una sonda Taq *hlyQP* cuya secuencia es 5'-FAM-CGC CTG CAA GTC CTA AGA CGC CA -TAMRA-3' [79;80], que funcionará como marcador para detectar la presencia de secuencias complementarias de ADN o ARN objetivo mediante la emisión de fluorescencia.

-Tabla 8. Relación de [reactivos] para el mix en base al protocolo de detección cuantitativa de *L. monocytogenes* y *L. innocua* por RTi-PCR según Rodríguez-Lazaro et. al. (2004).

REACTIVOS	Concentración Stock	Concentr. Final (por Pocillo)	$\mu$ l /REACCIÓN
H <sub>2</sub> O (hasta 25 $\mu$ l)			7,000
Taqman Universal PCR Master	2X	1X	12,500
Primer <i>hly</i> QF	10000 nM	50 nM	0,125
Primer <i>hly</i> QR	10000 nM	50 nM	0,125
Sonda Taqman <i>hly</i> QP	10000 nM	100 nM	0,250
ADN	0,2 ng/ $\mu$ l	1 ng/reacc.	5,000
<b>Total</b>			25,000

Se prepara para cada fábrica muestreada A, B y C, su mix correspondiente. El volumen de preparación, para cada mix de reactivos TaqMan, vendrá determinado cuantitativamente en función de las muestras objetivo (nº de cepas con ADN extraído) e incluyendo los patrones control de *L. monocytogenes* (positivo y negativo), con los parámetros, concentraciones y volúmenes de reacción dispuestos en la Tabla 8.

Se emplean X pocillos de la placa PCR, siendo X=Total de muestras sospechosas + patrones control, para cada muestreo (M1, M2, M3) realizado en cada fábrica (A, B, C). Cada mix de reactivos se agita en vórtex para garantizar la homogeneización y se prepara con él la placa PCR, subdividiendo por igual el volumen total (en µl/reacción) del mix en los X pocillos a utilizar en cada caso, tal como se muestra en la Tabla 9.

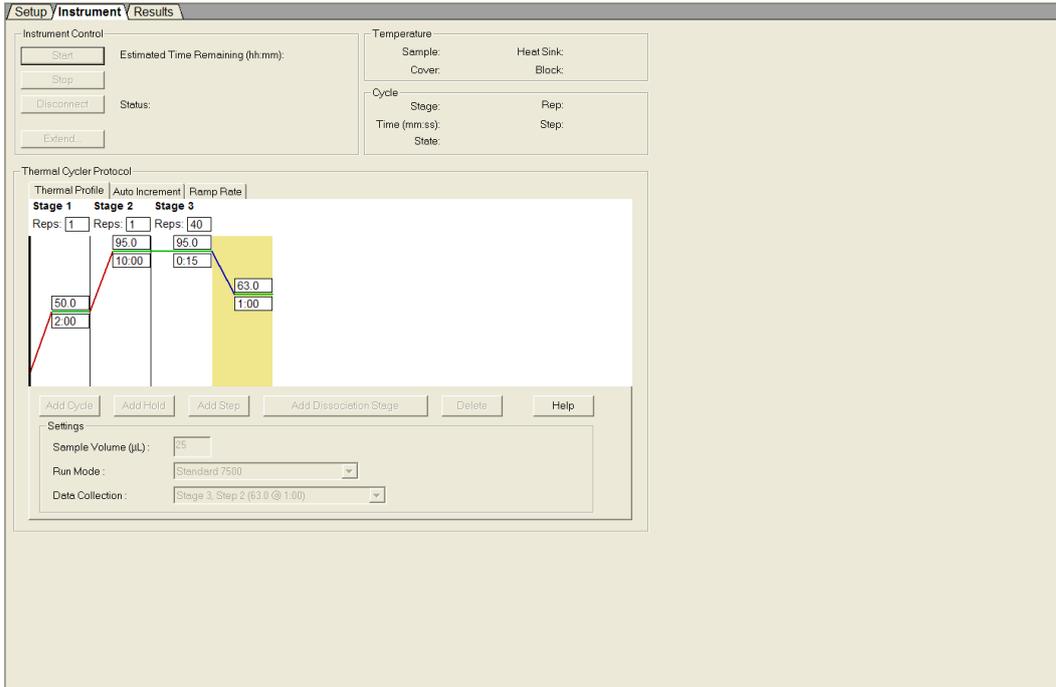
-Tabla 9. Parámetros del mix para cada caso en base al protocolo de detección cuantitativa de *L. monocytogenes* y *L. innocua* por RTi-PCR según Rodríguez-Lazaro et. al. (2004).

REACTIVO	MIX A			MIX B			MIX C		
	M1 (3)	M2 (3)	M3 (3)	M1 (5)	M2 (6)	M3 (4)	M1 (9)	M2 (10)	M3 (19)
H <sub>2</sub> O (hasta 25 µl)	21,00	21,00	21,00	35,00	42,00	28,00	63,00	70,00	133,00
Taqman Universal PCR Master	37,5	37,5	37,5	62,50	75,00	50,00	112,50	125,00	237,50
Primer hly QF	0,38	0,38	0,38	0,63	0,75	0,50	1,13	1,25	2,38
Primer hly QR	0,38	0,38	0,38	0,63	0,75	0,50	1,13	1,25	2,38
Sonda Taqman hly QP	0,75	0,75	0,75	1,25	1,50	1,00	2,25	2,50	4,75
ADN	15,00	15,00	15,00	25,00	30,00	20,00	45,00	50,00	95,00
<b>Total (MIX Sin ADN)</b>	60,00	60,00	60,00	100,00	120,00	80,00	180,00	200,00	380,00

Una vez preparada, se introduce el ADN de cada tubo eppendorf (5 µl/reacción) en su pocillo correspondiente. Posteriormente se sella la placa PCR con film estéril. Se pasa la placa a una centrífuga con condiciones de 1200 rpm durante 15-20s y se lleva al termociclador, un equipo que permite realizar ciclos térmicos necesarios para la amplificación del ADN [79;80].

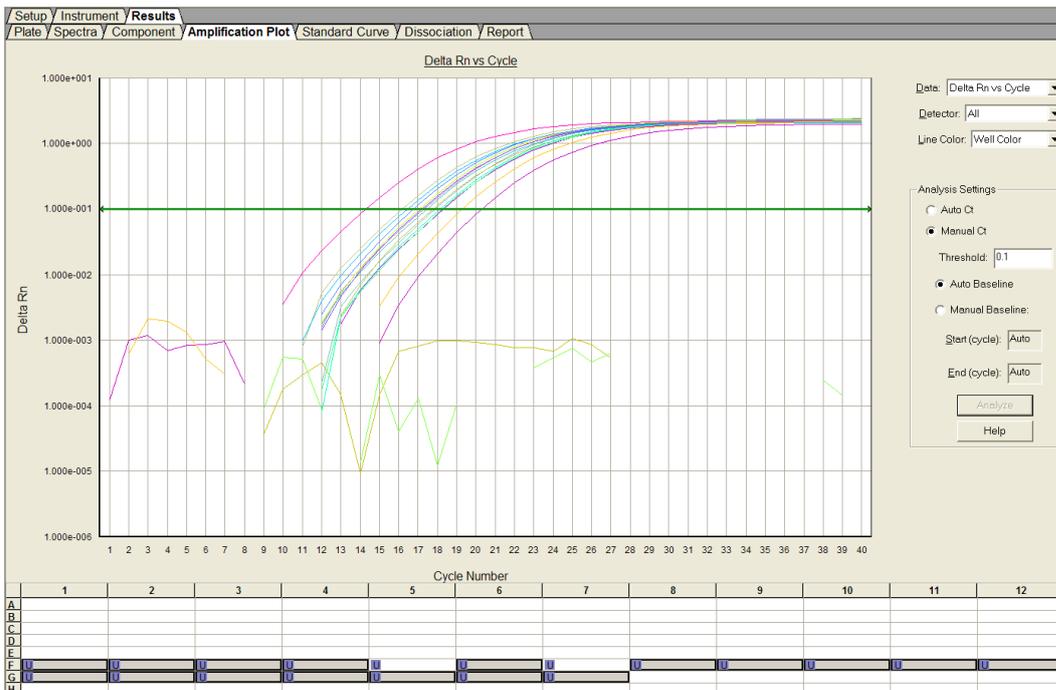
Este ha sido configurado de forma específica para el ciclo óptimo de *L. monocytogenes* mediante el establecimiento de un perfil de trabajo en el programa informático "7500 System SDS Software", en donde se indican las condiciones de la PCR Standard 7500 que se caracteriza por un perfil térmico dividido en 3 etapas con diferentes tiempos y nº de ciclos de repetición, y se identifica la configuración de la placa PCR (posición de cada muestra en los pocillos).

El perfil térmico estandarizado para *L. monocytogenes* (Figura 4) consiste en una primera etapa donde se sube la temperatura a 50 °C manteniéndola durante 2 min para posteriormente pasar a una segunda etapa donde subirla a 95 °C durante 10 minutos. Finalmente en la tercera etapa se realizan 40-50 ciclos de 15 s a 95 ° y 1 minuto a 63 °C [79;80]. Los resultados de amplificación se procesan a tiempo real mientras corren las etapas programadas, en el software del termociclador.



-Figura 4. Perfil térmico del termociclador con condiciones de ciclado según el protocolo de PCR Standard 7500 de Applied Biosystems para *L. monocytogenes*. Programa: 7500 System SDS Software.

Se interpretan dichos resultados de amplificación (Figura 5) para confirmar la presencia/ausencia de *L. monocytogenes*, por cuantificación de la emisión de fluorescencia de cada muestra en base al ciclo, denominado ciclo umbral ( $C_T$ ), en el que la fluorescencia de cada muestra supera el umbral o treshold (marcador verde).



-Figura 5. Gráfico de amplificación  $\Delta Rn/N^0$  Ciclos para 19 muestras de la fábrica C. 13 muestras son positivas superando el umbral (treshold). Programa: 7500 System SDS Software.

El procedimiento se realiza con el siguiente instrumental:

- Cabinas de flujo laminar
- Placas PCR de 96 pocillos
- Puntas de pipetas estériles
- Pipetas automáticas de precisión
- Equipo termociclador (reciclador térmico de PCR) de Applied Biosystems
- Tubos Eppendorf
- Agitador vórtex
- Film estéril para sellado de placas
- Nevera y congelador

### 3.5. Serotipificación molecular mediante PCR

Se utiliza un segundo proceso metodológico por PCR para la serotipificación molecular, técnica que se utiliza ampliamente para la vigilancia microbiológica a largo plazo de la listeriosis humana. La serotipificación molecular está basada en la detección por PCR de regiones específicas para cada serogrupo reconocido actualmente para *L. monocytogenes*. Se realiza un serotipado mediante una PCR múltiple frente al serotipado convencional [84-88].

La mezcla de trabajo (25 µl/reacción), que se prepara en la cabina de flujo laminar en condiciones estériles, contiene una serie de cebadores o Primers Set (MWG Biotech), que incluye 5 amplicones marcadores de genes en específico. Estos son *Imo0737*, *Imo1118*, *ORF2819*, *ORF2110* y *prs* [86].

De ellos, el gen *prs* es específico de todas las cepas del género *Listeria*, por lo cual su objetivo es el control interno de los resultados de amplificación, mientras que la función del resto es permitir la identificación selectiva de cepas por secuencias específicas de distintos serogrupos (1/2a, 1/2b, 1/2c, 3a, 3b, 3c, 4a, 4b, 4d, 4e) de *L. monocytogenes* [40]. Cada producto de la PCR está diseñado para amplificar distintos fragmentos de ADN con tamaños entre 370 y 906 pares de bases (pb) [84;85].

Aparte se incluyen un buffer, la Taq ADN polimerasa, un mix de nucleótidos para PCR (Roche, Boehringer), una solución de MgCl<sub>2</sub> (Applied Biosystems) y agua SIGMA [86].

-Tabla 10. Relación de [reactivos] para el mix en base al protocolo de PCR múltiple de análisis de los principales serovares de *L.monocytogenes* según Kérouanton et al. (2010).

REACTIVOS	PCR				
	Concent. Stock	Unidades	Concentr. Final	Unidades	µl /REACCIÓN
Primer Set (4 amplicones)	10	µM	0,4	µM	1
PCR Buffer	10	X	1	X	2,5
Solución de MgCl <sub>2</sub>	25	mM	2	mM	2
Mix Nucleótidos para PCR	10	mM/each	0,2	mM	0,5
FastStart Taq ADN Polimerasa	5	U/µL	1	U	0,2
Agua Libre de Nucleasas	-	-	-	-	13,8
ADN	1,00	ng/µL	5	ng/µL	5
<b>Total</b>					25

Se prepara para cada fábrica muestreada A, B y C, su mix correspondiente. El volumen de preparación, para cada mix de reactivos, vendrá determinado cuantitativamente en función de las muestras objetivo (nº de cepas con ADN extraído) e incluyendo los patrones control de *L. monocytogenes* (positivo y negativo), con los parámetros, concentraciones y volúmenes de reacción dispuestos en la Tabla 10.

Del mismo modo que con la RTi-PCR, se emplean X pocillos de la placa PCR, siendo  $X = \text{Total de muestras sospechosas} + \text{patrones control}$ , para cada muestreo (M1, M2, M3) realizado en cada fábrica (A, B, C). Cada mix de reactivos se agita en vórtex para garantizar la homogeneización y se prepara con él la placa PCR, subdividiendo por igual el volumen total (en  $\mu\text{l}/\text{reacción}$ ) del mix, en los X pocillos a utilizar en cada caso, tal como se muestra en la Tabla 11.

-Tabla 11. Parámetros del mix A, B y C según el protocolo Kérouanton et al. (2010).

REACTIVO	MIX A			MIX B			MIX C		
	M1 (3)	M2 (3)	M3 (3)	M1 (5)	M2 (6)	M3 (4)	M1 (9)	M2 (10)	M3 (19)
Primer Set (5 amplicones)	3,00	3,00	3,00	5,00	6,00	4,00	9,00	10,00	19,00
PCR Buffer	7,50	7,50	7,50	12,50	15,00	10,00	22,50	25,00	47,50
Solución de $\text{MgCl}_2$	6,00	6,00	6,00	10,00	12,00	8,00	18,00	20,00	38,00
Mix Nucleótidos para PCR	1,50	1,50	1,50	2,50	3,00	2,00	4,50	5,00	9,50
FastStart Taq ADN Polimerasa	0,60	0,60	0,60	1,00	1,20	0,80	1,80	2,00	3,80
Agua Libre de Nucleasas	41,40	41,40	41,40	69,00	82,80	55,20	124,20	138,00	262,20
ADN	15,00	15,00	15,00	25,00	30,00	20,00	45,00	50,00	95,00
<b>Total (MIX Sin ADN)</b>	60,00	60,00	60,00	100,00	120,00	80,00	180,00	200,00	380,00

Una vez preparada, se introduce el ADN de cada tubo Eppendorf (5  $\mu\text{l}/\text{reacción}$ ) en su pocillo correspondiente. Posteriormente se sella la placa PCR con film estéril. Se pasa la placa a una centrífuga con condiciones de 1200 rpm durante 15-20s y se lleva al termociclador (Icycler, Bio-Rad Laboratories) [84;85].

Las condiciones del perfil térmico estandarizado para la PCR múltiple de análisis de *L. monocytogenes*, consiste en una etapa inicial de desnaturalización de un único ciclo donde se sube la temperatura a 95 °C manteniéndola durante 5 min para posteriormente pasar a una segunda etapa donde se realizan 35 ciclos de 94 °C por 40s, 53 °C por 1min y 15s y 72 °C por 1min y 15s. Finalmente en la tercera etapa se realiza un último ciclo a 72 °C durante 7 minutos [84;85].

El procedimiento se realiza con el siguiente instrumental:

- Cabina de flujo laminar
- Placas PCR y film estéril para sellado
- Puntas de pipetas estériles
- Pipetas automáticas de precisión
- Tubos Eppendorf
- Nevera y congelador
- Agitador vórtex
- Termociclador de Applied Biosystems

### **3.6. Asignación de serogrupo por electroforesis en gel de agarosa.**

Para la asignación del serogrupo, tras el serotipado por PCR múltiple de las muestras positivas, se hace uso de un método de electroforesis en gel de campo pulsado o PFGE (Pulsed-Field Gel Electrophoresis), que es una técnica de separación de macromoléculas según su tamaño, la carga eléctrica y otras propiedades físicas [89].

La técnica PFGE se ha convertido rápidamente en el método estándar de subtipificación más sensible actualmente para la investigación de brotes de listeriosis y la discriminación de cepas en alimentos [84;85;90-92].

En este estudio buscamos separar e identificar fragmentos de ADN característicos de *Listeria*. Con el proceso generamos un frente de extracción consistente en la migración por la matriz (gel) de los fragmentos de ADN (genes) a distintas velocidades al aplicarse un campo eléctrico al medio.

La tasa de migración depende de la fuerza del campo eléctrico, el tamaño y forma de las moléculas, de la hidrofobicidad relativa de las muestras, tamaño de poro del gel de agarosa (función de su concentración en %) y por la fuerza iónica y la viscosidad del tampón de electroforesis [89].

En nuestro caso, la base matriz es un gel de Agarosa D1 Low EEO al 2% de concentración, puesto que es recomendada para separar segmentos de ADN Y ARN lineal con un tamaño entre 100 y 2500 pb (pares de bases) [89], apropiada para la detección de fragmentos amplificados característicos de *L. monocytogenes*.

En la preparación del gel se pesa la agarosa en polvo en base a obtener una relación del 2% de agarosa en una disolución de tampón o buffer TAE 1X (Tris Borate EDTA), cuyo volumen depende del tamaño de gel necesario, ya que este debe poder alojar el suficiente nº de pocillos en su extremo superior, en donde se insertarán las muestras de ADN y los marcadores indicados para cada caso [86;89].

La disolución TAE 1X se obtiene de la dilución en agua destilada del tampón concentrado TAE 50X - 5 L de 5 PRIME GmbH. Se homogeniza la mezcla en un frasco de reactivos estéril, se disuelve la agarosa calentando en un microondas y en agitación hasta que la solución sea transparente.

Posteriormente se enfría gel hasta unos 50°C y en agitación añadimos GelRed, una tinción fluorescente para ácidos nucleicos que sirve como sustituto del bromuro de etidio, debido a su alta toxicidad como agente intercalante del ADN, que permitirá la observación del frente de avance de la electroforesis bajo la luz UV del transiluminador [89].

El gel de agarosa se vierte en el molde soporte elegido, evitando que se formen burbujas de aire y se deja solidificar durante unos 15-20 minutos. Dicho molde esta sellado en los bordes con sujetadores y en él se coloca un peine nivelado dejando un

espacio al fondo del molde, de modo que el peine forme los pocillos al añadir la solución de agarosa.

Una vez se ha enfriado y solidificado observaremos que el gel se reafirma y se vuelve menos transparente. Estando correctamente listo lo retiramos del molde evitando estropear los pocillos al retirar el peine o romper el gel, lo colocamos en una solución tampón de TAE 1X en la cubeta de electroforesis de forma que quede completamente sumergido.

Se reserva uno de los pozos del gel para un marcador de referencia llamado ADN marcador que contiene fragmentos de ADN estandarizados y de tamaño conocido, lo cual facilita la determinación del tamaño de las muestras de ADN desconocidas.

También se reservan 2 pozos para los patrones control positivo y negativo de *L. monocytogenes*, como medio de verificación de que el procedimiento se ha realizado correctamente.

Las muestras de ADN tras la PCR múltiple y antes de cargarse en los pozos del gel se preparan con un tampón o buffer de carga, en este caso es azul de bromofenol, un colorante que permite añadir color a las muestras facilitando su carga en la cubeta, el aumento de la densidad de las mismas favoreciendo su asiento e identificar visualmente la distancia recorrida por las muestras en el gel [89].

Con el gel matriz ya sumergido en la solución tampón dentro de la cuba de electroforesis, se cargan con los pocillos con 10  $\mu$ l de cada muestra (producto de la PCR múltiple) de forma consecutiva, con cuidado de no pinchar el gel con la punta desechable de la pipeta de alta precisión y sin formar burbujas.

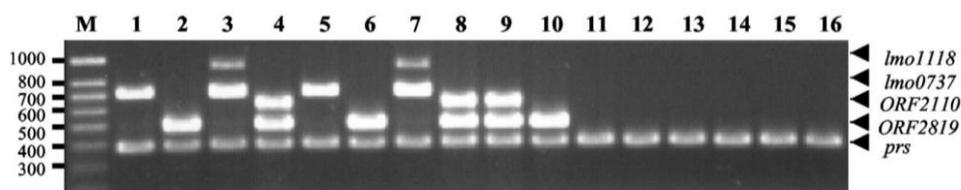
Una vez están los pozos correctamente rellenados, cerrar la cubeta del equipo de electroforesis y conectar los electrodos a la fuente de alimentación para que el ADN comience a migrar desde el cátodo (-) hacia el ánodo (+) puesto que los grupos fosfato de estos fragmentos están cargados negativamente [89].

Se aplica un voltaje de 120 V y se deja marchar la electroforesis el tiempo suficiente para que el tampón de carga halla recorrido la distancia adecuada a través del gel, consiguiendo que los fragmentos de ADN aparezcan claramente separados por tamaño, en pares de bases, con orden de mayor (cercano a los pozos) a menor (extremo positivo). En nuestro caso supone entre 60-90 minutos. Controlar el tiempo es imprescindible para evitar que fragmentos de ADN migren demasiado tiempo y se salgan del gel.

Una vez ha pasado el tiempo suficiente se apaga la corriente, se desconectan los cables y se pasa el gel de la cubeta de electroforesis al transiluminador Bio-Rad para registrar y cuantificar la emisión UV mediante el uso del Quantity One Software (Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, CA), de cara a la observación, identificación y digitalización de las bandas resultantes en cada muestra.

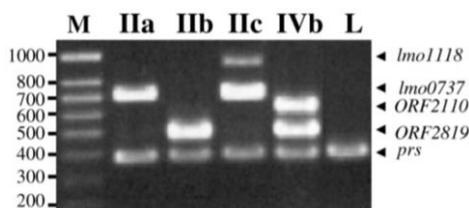
Los fragmentos de ADN, que forman las líneas denominadas bandas, son visibles bajo rayos UV debido a que contienen la suficiente cantidad de réplicas de fragmentos del mismo tamaño, que son resultado de la amplificación en el proceso de PCR.

Para su interpretación, las bandas de las muestras son comparadas con el marcador de referencia y los patrones de control para identificar su tamaño en pares de bases (pb), los genes correspondientes a los fragmentos de ADN amplificados y a que serogrupo de *L. monocytogenes* pertenecen las cepas positivas encontradas en los muestreos [84-86], tal como se muestra en los modelos con cepas de control conocidas de las Figuras 6 y 7.



-Figura 6. Electroforesis en gel de agarosa de fragmentos de ADN amplificados por PCR múltiple en condiciones estándar, mostrando la serotipificación de las cepas de referencia de *Listeria*. En orden de 1-12 son *L. monocytogenes* con los siguientes serogrupos: 1/2a; 1/2b; 1/2c; 4b; 3a; 3b; 3c; 4d; 4e; 7; 4a; 4c. Doumith, M. et al. (2004) [84]

En dichas figuras, los genes correspondientes a los fragmentos amplificados se indican a la derecha y su tamaño molecular se indica en la izquierda en pb (pares de bases) mediante el marcador de referencia.



-Figura 7. Gel de agarosa al 2% mostrando los diferentes perfiles suministrados de PCR múltiple dados por serogrupo de pertenencia. Doumith, M. et al. (2005) [85]

Se interpretan dichos resultados, en el caso de la Figura 8, para asignar el serogrupo de los fragmentos de ADN de *L. monocytogenes* amplificados, en base a la correspondencia frente al serotipado por PCR y la PFGE en cepas conocidas de referencia (Figura 6 y 7).



-Figura 8. Gel de agarosa al 2% para 8 muestras de ADN amplificadas por PCR múltiple de la fábrica C. En la posición 6 se encuentra el marcador de referencia. En las posiciones 10 y 11 los patrones de control (negativo y positivo). Posición 1 es 4b y el resto son 1/2a. Programa: Quantity One Software.

El procedimiento se realiza con el siguiente instrumental:

- |                                      |                                   |
|--------------------------------------|-----------------------------------|
| -Balanza de precisión                | -Pipetas automáticas de precisión |
| -Puntas de pipetas estériles         | -Agitador magnético               |
| -Frascos de reactivos de laboratorio | -Probeta de 100mL                 |
| -Unidad de electroforesis horizontal | -Transiluminador UV (Bio-Rad)     |
| -Microondas                          |                                   |

### **3.7. Conservación, secuenciación y bioinformática aplicada a bacterias**

La técnica de criopreservación de microorganismos, cuyo proceso consiste en la congelación celular a bajas temperaturas (-80°C a -196°C), permite el almacenamiento de cepas por largos períodos de tiempo mediante la inactivación metabólica del microorganismo, preservándolo de forma que permanezcan genéticamente estables [93].

Para una correcta preservación es indispensable garantizar que la metodología se aplique sin contaminaciones durante el proceso de conservación y alcance a obtener una considerable supervivencia (al menos un 70 %) de bacterias, implicando que sean recuperadas con viabilidad para su cultivo a medio o largo plazo tras la fase de descongelación [93]

El proceso consiste en, con las cepas de interés de *L. monocytogenes* identificadas tras el muestreo y análisis previos, realizar una preparación precongelación haciendo uso de glicerol al 20% (crioprotector no iónico) que recubre las células bacterianas con el fin de protegerlas de la lisis celular tanto por cambios de fase del agua y fenómenos osmóticos durante el ciclo de congelación-descongelación, que ocasionan pérdidas de viabilidad del cultivo, por lo cuál, hay que evitar descongelaciones y recongelaciones innecesarias.

En este caso, se transfieren dichas cepas identificadas y aisladas de las placas cultivadas en ALOA, provenientes de las tomas muestreadas de superficies, coadyugantes tecnológicos y productos en las fábricas A, B y C, a viales criogénicos de 1ml por cada cepa añadiendo 0,8 ml de glicerol 20% de forma homogénea y guardándolas bien identificadas en criocajas a -80°C.

Estas pasan a formar parte de la colección de aislados de *L. monocytogenes* del Laboratorio de Microbiología y Biología Molecular del Instituto Tecnológico Agrario de Castilla y León (Itacyl). Se referencian (Nº Ref) en base a que muestreo (M1, M2, M3) pertenece la cepa aislada y a su nº de muestra (1-50) que indica también su fábrica correspondiente (A, B, C).

Para su reconstitución las cepas se transfieren, una vez descongeladas, con asas de siembra de 10 µl a tubos con 5ml de Brain Heart Infusion-BHI (BD BIOSCIENCES) y se agita en vórtex. Se cultivan durante 16-18h a 37°C para su aplicación en la secuenciación masiva de PCR en puente (Illumina) y sistemas bioinformáticos (directorio TORMES) al diagnóstico y caracterización de muestras bacterianas [77;93].

El listado de 30 cepas detectadas que son tratadas para su conservación y secuenciación completa por PCR, se muestran en la Tabla 11. Son aplicadas a la búsqueda de genes de virulencia y de resistencia a antibióticos frente a bases de datos Resfinder, CARD, ARG-ANNOT y VFDB [94-97] mediante el cribado del genoma utilizando Abricate [98] con salida al directorio bioinformático TORMES [99].

*-Tabla 12. Listado de cepas de L. monocytogenes de las fábricas (A, B, C) conservadas para su secuenciación masiva por PCR y cribado con herramientas bioinformáticas. Elaboración propia.*

<b>CÓDIGO CEPA</b>	<b>Nº REF</b>	<b>ORIGEN</b>	<b>LINAJE/SEROGRUPO</b>
LBMM 5272	M1-C30	Fábrica C	II ; 1/2a
LBMM 5273	M1-C18	Fábrica C	II ; 1/2a
LBMM 5274	M1-C5	Fábrica C	II ; 1/2a
LBMM 5275	M1-C4	Fábrica C	II ; 1/2a
LBMM 5277	M1-C44	Fábrica C	II ; 1/2a
LBMM 5278	M1-C42	Fábrica C	II ; 1/2a
LBMM 5279	M1-B1	Fábrica B	II ; 1/2a
LBMM 5280	M1-B8	Fábrica B	II ; 1/2a
LBMM 5281	M1-B48	Fábrica B	I ; 4b
LBMM 5661	M2-C4	Fábrica C	I ; 4b
LBMM 5662	M2-C5	Fábrica C	II ; 1/2a
LBMM 5663	M2-C11	Fábrica C	II ; 1/2a
LBMM 5664	M2-C24	Fábrica C	II ; 1/2a
LBMM 5665	M2-C30	Fábrica C	II ; 1/2a
LBMM 5666	M2-C38	Fábrica C	II ; 1/2a
LBMM 5667	M2-C46	Fábrica C	II ; 1/2a
LBMM 5668	M2-C47	Fábrica C	II ; 1/2a
LBMM 5687	M2-B47	Fábrica B	I ; 4b
LBMM 5688	M2-B48	Fábrica B	I ; 4b
LBMM 5689	M2-B49	Fábrica B	I ; 4b
LBMM 5690	M2-B50	Fábrica B	I ; 4b
LBMM 5965	M3-C5	Fábrica C	II ; 1/2a
LBMM 5966	M3-C22	Fábrica C	II ; 1/2a
LBMM 5967	M3-C27	Fábrica C	II ; 1/2a
LBMM 5968	M3-C28	Fábrica C	II ; 1/2a
LBMM 5969	M3-C29	Fábrica C	II ; 1/2a
LBMM 5970	M3-C32	Fábrica C	II ; 1/2a
LBMM 5971	M3-C33	Fábrica C	II ; 1/2a
LBMM 5972	M3-C38	Fábrica C	II ; 1/2a
LBMM 5973	M3-C46	Fábrica C	II ; 1/2a

El procedimiento se realiza con el siguiente instrumental:

- Puntas de pipetas estériles
- Tubos eppendorf
- Viales criogénicos
- Congelador
- Servidores y herramientas bioinformáticas (directorio TORMES)
- Pipetas automáticas de precisión
- Agitador vórtex
- Criocajas
- Equipo Secuenciador Illumina

## 4. Resultados y Discusión

### 4.1. Resultados y discusión en las detecciones confirmadas y el serotipado:

En el presente estudio para el análisis comparativo y consecución en el tiempo de resultados de la detección, confirmación y caracterización selectivos de *L. monocytogenes*, se realizan y obtienen datos de un total de 450 muestreados (divididos en 50 muestras x 3 muestreos en cada fábrica estudiada), entre los cuales se detectan y confirman un total de 37 casos positivos que, tras la identificación de los microorganismos cultivados en el análisis microbiológico tradicional, en la serotipificación por PCR son caracterizados de modo que se dividen en 8 casos pertenecientes al serogrupo 4b (linaje I) y 29 al serogrupo 1/2a (linaje II). Esto supone que el 8,2% del total de muestreados son positivos, divididos en 21,62% en el linaje I y el 78,38% en el linaje II, tal como aparece a continuación en las Tablas 13-21.

Pasando a cada caso particular (Fábrica A, B y C), tras obtener y observar los datos, estos indican que la situación sanitaria respecto a *L. monocytogenes* es suficientemente diferenciada y no hay indicios de una relación directa de contaminación que vincule las cepas encontradas en los casos detectados en cada una de ellas.

De esta forma analizando los 3 muestreos (M1, M2, M3) realizados en la fábrica A con una diferencia entre ellos de aproximadamente unos 3 meses, tal como se muestra en las Tablas 13, 14 y 15, no se ha detectado y confirmado ninguna cepa perteneciente a *L. monocytogenes* indicando un completo control de Listeria en la instalaciones garantizando que las medidas de desinfección y control funcionan de forma efectiva en el tiempo.

-Tabla 13. Resultados de casos detectados ya confirmados y del serotipado en cada punto de referencia, para cada muestreo (M1, M2, M3)-Fábrica A. Elaboración Propia

Nº MUEST.	ÁREA/TIPO DE MUESTRA	DETECCIÓN DE L. MONOCYTOGENES			LINAJE/SEROGRUPO		
		Muestreo I	Muestreo II	Muestreo III	Muest. I	Muest.II	Muest. III
A-1	Suelo	AUSENCIA	AUSENCIA	AUSENCIA	-	-	-
A-2	Suelo	AUSENCIA	AUSENCIA	AUSENCIA	-	-	-
A-3	Suelo	AUSENCIA	AUSENCIA	AUSENCIA	-	-	-
A-4	Suelo	AUSENCIA	AUSENCIA	AUSENCIA	-	-	-

-Tabla 14. Resultados de casos detectados ya confirmados y del serotipado en cada punto de referencia, para cada muestreo (M1, M2, M3)-Fábrica A (continuación 1). Elaboración Propia

Nº MUEST.	ÁREA/TIPO DE MUESTRA	DETECCIÓN DE L. MONOCYTOGENES			LINAJE/SEROGRUPO		
		Muestreo I	Muestreo II	Muestreo III	Muest. I	Muest.II	Muest. III
A-5	Suelo	AUSENCIA	AUSENCIA	AUSENCIA	-	-	-
A-6	Suelo	AUSENCIA	AUSENCIA	AUSENCIA	-	-	-
A-7	Suelo	AUSENCIA	AUSENCIA	AUSENCIA	-	-	-
A-8	Suelo	AUSENCIA	AUSENCIA	AUSENCIA	-	-	-
A-9	Superficie	AUSENCIA	AUSENCIA	AUSENCIA	-	-	-
A-10	Superficie	AUSENCIA	AUSENCIA	AUSENCIA	-	-	-
A-11	Superficie	AUSENCIA	AUSENCIA	AUSENCIA	-	-	-
A-12	Superficie	AUSENCIA	AUSENCIA	AUSENCIA	-	-	-
A-13	Suelo	AUSENCIA	AUSENCIA	AUSENCIA	-	-	-
A-14	Suelo	AUSENCIA	AUSENCIA	AUSENCIA	-	-	-
A-15	Suelo	AUSENCIA	AUSENCIA	AUSENCIA	-	-	-
A-16	Superficie	AUSENCIA	AUSENCIA	AUSENCIA	-	-	-
A-17	Superficie	AUSENCIA	AUSENCIA	AUSENCIA	-	-	-
A-18	Suelo	AUSENCIA	AUSENCIA	AUSENCIA	-	-	-
A-19	Superficie	AUSENCIA	AUSENCIA	AUSENCIA	-	-	-
A-20	Superficie	AUSENCIA	AUSENCIA	AUSENCIA	-	-	-
A-21	Superficie	AUSENCIA	AUSENCIA	AUSENCIA	-	-	-
A-22	Superficie	AUSENCIA	AUSENCIA	AUSENCIA	-	-	-
A-23	Superficie	AUSENCIA	AUSENCIA	AUSENCIA	-	-	-
A-24	Superficie	AUSENCIA	AUSENCIA	AUSENCIA	-	-	-
A-25	Superficie	AUSENCIA	AUSENCIA	AUSENCIA	-	-	-
A-26	Superficie	AUSENCIA	AUSENCIA	AUSENCIA	-	-	-
A-27	Superficie	AUSENCIA	AUSENCIA	AUSENCIA	-	-	-
A-28	Superficie	AUSENCIA	AUSENCIA	AUSENCIA	-	-	-
A-29	Suelo	AUSENCIA	AUSENCIA	AUSENCIA	-	-	-
A-30	Suelo	AUSENCIA	AUSENCIA	AUSENCIA	-	-	-
A-31	Superficie	AUSENCIA	AUSENCIA	AUSENCIA	-	-	-
A-32	Superficie	AUSENCIA	AUSENCIA	AUSENCIA	-	-	-
A-33	Suelo	AUSENCIA	AUSENCIA	AUSENCIA	-	-	-
A-34	Superficie	AUSENCIA	AUSENCIA	AUSENCIA	-	-	-
A-35	Superficie	AUSENCIA	AUSENCIA	AUSENCIA	-	-	-
A-36	Superficie	AUSENCIA	AUSENCIA	AUSENCIA	-	-	-
A-37	Superficie	AUSENCIA	AUSENCIA	AUSENCIA	-	-	-
A-38	Suelo	AUSENCIA	AUSENCIA	AUSENCIA	-	-	-
A-39	Queso	AUSENCIA	AUSENCIA	AUSENCIA	-	-	-

*-Tabla 15. Resultados de casos detectados ya confirmados y del serotipado en cada punto de referencia, para cada muestreo (M1, M2, M3)-Fábrica A (continuación 2). Elaboración Propia*

Nº MUEST.	ÁREA/TIPO DE MUESTRA	DETECCIÓN DE L. MONOCYTOGENES			LINAJE/SEROGRUPO		
		Muestreo I	Muestreo II	Muestreo III	Muest. I	Muest. II	Muest. III
A-40	Suelo	AUSENCIA	AUSENCIA	AUSENCIA	-	-	-
A-41	Salmuera	AUSENCIA	AUSENCIA	AUSENCIA	-	-	-
A-42	Suelo	AUSENCIA	AUSENCIA	AUSENCIA	-	-	-
A-43	Superficie	AUSENCIA	AUSENCIA	AUSENCIA	-	-	-
A-44	Antimoho	AUSENCIA	AUSENCIA	AUSENCIA	-	-	-
A-45	Superficie	AUSENCIA	AUSENCIA	AUSENCIA	-	-	-
A-46	Suelo	AUSENCIA	AUSENCIA	AUSENCIA	-	-	-
A-47	Superficie	AUSENCIA	AUSENCIA	AUSENCIA	-	-	-
A-48	Suelo	AUSENCIA	AUSENCIA	AUSENCIA	-	-	-
A-49	Suelo	AUSENCIA	AUSENCIA	AUSENCIA	-	-	-
A-50	Suelo	AUSENCIA	AUSENCIA	AUSENCIA	-	-	-

En el caso de la fábrica B, cuyos resultados aparecen recogidos en las Tablas 16, 17 y 18, se llegan a detectar y confirmar un total de 9 casos positivos para el conjunto de muestreos realizados, de los cuales 2 colonias son caracterizadas, tras el tipado por PCR, dentro del linaje II en el serogrupo 1/2a (de los más frecuentes en industrias alimentarias), encontradas (en el caso del M1) en el punto B-1, en la superficie de los rodillos del equipo de sistema de acceso estéril (SAS) de la entrada de la fábrica y en el caso del M1 en el punto B-8 en una arqueta en la sala de fabricación A, que en los siguientes muestreos no vuelven a ser detectados.

El resto de casos pertenecen al linaje I y serogrupo 4b, todos ellos de la sala de fabricación C y encontrados en un sumidero (B-47) en las cintas de entrada (B-48) y salida (B-49) y en la salida de la cepilladora (B-50), de los cuales, se observa una cierta persistencia en el tiempo en B-47 y B-50 apareciendo reiterativamente en los muestreos M2 y M3, mientras que en los otros dos casos no se detecta reincidencia de las cepas en el último muestro realizando, indicando una mayor efectividad del proceso de desinfección tras un tiempo significativo.

*-Tabla 16. Resultados de casos detectados ya confirmados y del serotipado en cada punto de referencia, para cada muestreo (M1, M2, M3)-Fábrica B. Elaboración Propia*

Nº MUEST.	ÁREA/TIPO DE MUESTRA	DETECCIÓN DE L. MONOCYTOGENES			LINAJE/SEROGRUPO		
		Muestreo I	Muestreo II	Muestreo III	Muest. I	Muest. II	Muest. III
B-1	Superficie	PRESENCIA	AUSENCIA	AUSENCIA	II ; 1/2a	-	-
B-2	Suelo	AUSENCIA	AUSENCIA	AUSENCIA	-	-	-
B-3	Suelo	AUSENCIA	AUSENCIA	AUSENCIA	-	-	-

*-Tabla 17. Resultados de casos detectados ya confirmados y del serotipado en cada punto de referencia, para cada muestreo (M1, M2, M3)-Fábrica B (continuación 1) Elaboración Propia*

Nº MUEST.	ÁREA/TIPO DE MUESTRA	DETECCIÓN DE L. MONOCYTOGENES			LINAJE/SEROGRUPO		
		Muestreo I	Muestreo II	Muestreo III	Muest. I	Muest.II	Muest. III
B-4	Superficie	AUSENCIA	AUSENCIA	AUSENCIA	-	-	-
B-5	Superficie	AUSENCIA	AUSENCIA	AUSENCIA	-	-	-
B-6	Suelo	AUSENCIA	AUSENCIA	AUSENCIA	-	-	-
B-7	Superficie	AUSENCIA	AUSENCIA	AUSENCIA	-	-	-
B-8	Suelo	PRESENCIA	AUSENCIA	AUSENCIA	II ; 1/2a	-	-
B-9	Superficie	AUSENCIA	AUSENCIA	AUSENCIA	-	-	-
B-10	Superficie	AUSENCIA	AUSENCIA	AUSENCIA	-	-	-
B-11	Superficie	AUSENCIA	AUSENCIA	AUSENCIA	-	-	-
B-12	Superficie	AUSENCIA	AUSENCIA	AUSENCIA	-	-	-
B-13	Superficie	AUSENCIA	AUSENCIA	AUSENCIA	-	-	-
B-14	Superficie	AUSENCIA	AUSENCIA	AUSENCIA	-	-	-
B-15	Superficie	AUSENCIA	AUSENCIA	AUSENCIA	-	-	-
B-16	Suelo	AUSENCIA	AUSENCIA	AUSENCIA	-	-	-
B-17	Superficie	AUSENCIA	AUSENCIA	AUSENCIA	-	-	-
B-18	Suelo	AUSENCIA	AUSENCIA	AUSENCIA	-	-	-
B-19	Suelo	AUSENCIA	AUSENCIA	AUSENCIA	-	-	-
B-20	Suelo	AUSENCIA	AUSENCIA	AUSENCIA	-	-	-
B-21	Superficie	AUSENCIA	AUSENCIA	AUSENCIA	-	-	-
B-22	Suelo	AUSENCIA	AUSENCIA	AUSENCIA	-	-	-
B-23	Superficie	AUSENCIA	AUSENCIA	AUSENCIA	-	-	-
B-24	Superficie	AUSENCIA	AUSENCIA	AUSENCIA	-	-	-
B-25	Superficie	AUSENCIA	AUSENCIA	AUSENCIA	-	-	-
B-26	Superficie	AUSENCIA	AUSENCIA	AUSENCIA	-	-	-
B-27	Suelo	AUSENCIA	AUSENCIA	AUSENCIA	-	-	-
B-28	Superficie	AUSENCIA	AUSENCIA	AUSENCIA	-	-	-
B-29	Superficie	AUSENCIA	AUSENCIA	AUSENCIA	-	-	-
B-30	Suelo	AUSENCIA	AUSENCIA	AUSENCIA	-	-	-
B-31	Superficie	AUSENCIA	AUSENCIA	AUSENCIA	-	-	-
B-32	Suelo	AUSENCIA	AUSENCIA	AUSENCIA	-	-	-
B-33	Superficie	AUSENCIA	AUSENCIA	AUSENCIA	-	-	-
B-34	Superficie	AUSENCIA	AUSENCIA	AUSENCIA	-	-	-
B-35	Superficie	AUSENCIA	AUSENCIA	AUSENCIA	-	-	-
B-36	Superficie	AUSENCIA	AUSENCIA	AUSENCIA	-	-	-
B-37	Salmuera	AUSENCIA	AUSENCIA	AUSENCIA	-	-	-
B-38	Suelo	AUSENCIA	AUSENCIA	AUSENCIA	-	-	-

-Tabla 18. Resultados de casos detectados ya confirmados y del serotipado en cada punto de referencia, para cada muestreo (M1, M2, M3)-Fábrica B (continuación 2) Elaboración Propia

Nº MUEST.	ÁREA/TIPO DE MUESTRA	DETECCIÓN DE L. MONOCYTOGENES			LINAJE/SEROGRUPO		
		Muestreo I	Muestreo II	Muestreo III	Muest. I	Muest.II	Muest. III
B-39	Superficie	AUSENCIA	AUSENCIA	AUSENCIA	-	-	-
B-40	Superficie	AUSENCIA	AUSENCIA	AUSENCIA	-	-	-
B-41	Superficie	AUSENCIA	AUSENCIA	AUSENCIA	-	-	-
B-42	Superficie	AUSENCIA	AUSENCIA	AUSENCIA	-	-	-
B-43	Suelo	AUSENCIA	AUSENCIA	AUSENCIA	-	-	-
B-44	Superficie	AUSENCIA	AUSENCIA	AUSENCIA	-	-	-
B-45	Superficie	AUSENCIA	AUSENCIA	AUSENCIA	-	-	-
B-46	Antimoho	AUSENCIA	AUSENCIA	AUSENCIA	-	-	-
B-47	Suelo	AUSENCIA	PRESENCIA	PRESENCIA	-	I ; 4b	I ; 4b
B-48	Superficie	PRESENCIA	PRESENCIA	AUSENCIA	I ; 4b	I ; 4b	-
B-49	Superficie	AUSENCIA	PRESENCIA	AUSENCIA	-	I ; 4b	-
B-50	Superficie	AUSENCIA	PRESENCIA	PRESENCIA	-	I ; 4b	I ; 4b

En el caso de la fábrica C, cuyos resultados aparecen recogidos en las Tablas 19, 20 y 21, la situación observada es la más problemática a nivel de riesgo por *L. monocytogenes*, con un total de 28 casos positivos para el conjunto de muestreos realizados, de los cuales un único caso es caracterizado dentro del linaje I y serogrupo 4b, mientras que el resto pertenece al linaje linaje II y serogrupo 1/2a.

Esto indica la urgencia de toma de medidas más drásticas para frenar la permanencia en el tiempo de las cepas y evitar aún más su difusión por toda la fábrica, principalmente en aquellos puntos de muestreo donde se encuentran positivos de cepas con el mismo serotipado de forma reiterativa en diferentes muestreos hechos a lo largo del tiempo, haciendo visible que las medidas correctoras tomadas hasta el momento no son suficientes para el control de *L. monocytogenes* en la fábrica C y el riesgo de transmitirse al alimento final y producir intoxicación alimentaria en los consumidores es cada vez mayor si no se revierte la situación.

-Tabla 19. Resultados de casos detectados ya confirmados y del serotipado en cada punto de referencia, para cada muestreo (M1, M2, M3)-Fábrica C. Elaboración Propia

Nº MUEST.	ÁREA/TIPO DE MUESTRA	DETECCIÓN DE L. MONOCYTOGENES			LINAJE/ SEROGRUPO		
		Muestreo I	Muestreo II	Muestreo III	Muest. I	Muest.II	Muest. III
C-1	Superficie	AUSENCIA	AUSENCIA	AUSENCIA	-	-	-
C-2	Superficie	AUSENCIA	AUSENCIA	AUSENCIA	-	-	-
C-3	Superficie	AUSENCIA	AUSENCIA	AUSENCIA	-	-	-
C-4	Superficie	PRESENCIA	PRESENCIA	AUSENCIA	II ; 1/2a	I ; 4b	-

-Tabla 20. Resultados de casos detectados ya confirmados y del serotipado en cada punto de referencia, para cada muestreo (M1, M2, M3)-Fábrica C (continuación 1). Elaboración Propia

Nº MUEST.	ÁREA/TIPO DE MUESTRA	DETECCIÓN DE L. MONOCYTOGENES			LINAJE/SEROGRUPO		
		Muestreo I	Muestreo II	Muestreo III	Muest. I	Muest. II	Muest. III
C-5	Suelo	PRESENCIA	PRESENCIA	PRESENCIA	II ; 1/2a	II ; 1/2a	II ; 1/2a
C-6	Superficie	AUSENCIA	AUSENCIA	AUSENCIA	-	-	-
C-7	Superficie	AUSENCIA	AUSENCIA	AUSENCIA	-	-	-
C-8	Superficie	AUSENCIA	AUSENCIA	AUSENCIA	-	-	-
C-9	Superficie	AUSENCIA	AUSENCIA	AUSENCIA	-	-	-
C-10	Superficie	AUSENCIA	AUSENCIA	AUSENCIA	-	-	-
C-11	Superficie	AUSENCIA	PRESENCIA	AUSENCIA	-	II ; 1/2a	-
C-12	Superficie	AUSENCIA	AUSENCIA	AUSENCIA	-	-	-
C-13	Guantes	AUSENCIA	AUSENCIA	AUSENCIA	-	-	-
C-14	Superficie	AUSENCIA	AUSENCIA	AUSENCIA	-	-	-
C-15	Superficie	AUSENCIA	AUSENCIA	AUSENCIA	-	-	-
C-16	Superficie	AUSENCIA	AUSENCIA	AUSENCIA	-	-	-
C-17	Guantes	AUSENCIA	AUSENCIA	AUSENCIA	-	-	-
C-18	Suelo	PRESENCIA	AUSENCIA	AUSENCIA	II ; 1/2a	-	-
C-19	Superficie	AUSENCIA	AUSENCIA	AUSENCIA	-	-	-
C-20	Guantes	AUSENCIA	AUSENCIA	AUSENCIA	-	-	-
C-21	Superficie	AUSENCIA	AUSENCIA	AUSENCIA	-	-	-
C-22	Superficie	AUSENCIA	AUSENCIA	PRESENCIA	-	-	II ; 1/2a
C-23	Superficie	AUSENCIA	AUSENCIA	AUSENCIA	-	-	-
C-24	Suelo	AUSENCIA	PRESENCIA	AUSENCIA	-	II ; 1/2a	-
C-25	Guantes	AUSENCIA	AUSENCIA	AUSENCIA	-	-	-
C-26	Superficie	AUSENCIA	AUSENCIA	AUSENCIA	-	-	-
C-27	Superficie	AUSENCIA	AUSENCIA	PRESENCIA	-	-	II ; 1/2a
C-28	Superficie	AUSENCIA	AUSENCIA	PRESENCIA	-	-	II ; 1/2a
C-29	Superficie	AUSENCIA	AUSENCIA	PRESENCIA	-	-	II ; 1/2a
C-30	Suelo	PRESENCIA	PRESENCIA	AUSENCIA	II ; 1/2a	II ; 1/2a	-
C-31	Superficie	AUSENCIA	AUSENCIA	AUSENCIA	-	-	-
C-32	Superficie	AUSENCIA	AUSENCIA	PRESENCIA	-	-	II ; 1/2a
C-33	Suelo	AUSENCIA	AUSENCIA	PRESENCIA	-	-	II ; 1/2a
C-34	Superficie	AUSENCIA	AUSENCIA	AUSENCIA	-	-	-
C-35	Suelo	AUSENCIA	AUSENCIA	AUSENCIA	-	-	-
C-36	Superficie	AUSENCIA	AUSENCIA	AUSENCIA	-	-	-
C-37	Superficie	AUSENCIA	AUSENCIA	AUSENCIA	-	-	-
C-38	Suelo	AUSENCIA	PRESENCIA	PRESENCIA	-	II ; 1/2a	II ; 1/2a
C-39	Guantes	AUSENCIA	AUSENCIA	AUSENCIA	-	-	-

-Tabla 21. Resultados de casos detectados ya confirmados y del serotipado en cada punto de referencia, para cada muestreo (M1, M2, M3)-Fábrica C (continuación 2). Elaboración Propia

Nº MUEST.	ÁREA/TIPO DE MUESTRA	DETECCIÓN DE <i>L. MONOCYTOGENES</i>			LINAJE/ SEROGRUPO		
		Muestreo I	Muestreo II	Muestreo III	Muest. I	Muest.II	Muest. III
C-40	Superficie	AUSENCIA	AUSENCIA	AUSENCIA	-	-	-
C-41	Superficie	AUSENCIA	AUSENCIA	AUSENCIA	-	-	-
C-42	Suelo	PRESENCIA	AUSENCIA	AUSENCIA	II ; 1/2a	-	-
C-43	Superficie	AUSENCIA	AUSENCIA	AUSENCIA	-	-	-
C-44	Superficie	PRESENCIA	AUSENCIA	AUSENCIA	II ; 1/2a	-	-
C-45	Superficie	AUSENCIA	AUSENCIA	AUSENCIA	-	-	-
C-46	Superficie	AUSENCIA	PRESENCIA	PRESENCIA	-	II ; 1/2a	II ; 1/2a
C-47	Suelo	AUSENCIA	PRESENCIA	PRESENCIA	-	II ; 1/2a	II ; 1/2a
C-48	Suelo	AUSENCIA	AUSENCIA	PRESENCIA	-	-	II ; 1/2a
C-49	Superficie	PRESENCIA	AUSENCIA	PRESENCIA	II ; 1/2a	-	II ; 1/2a
C-50	Suelo	AUSENCIA	AUSENCIA	PRESENCIA	-	-	II ; 1/2a

Cabe destacar que las cepas de *L. monocytogenes* son capaces de formar biofilms y de persistir frente a desinfectantes como el amonio cuaternario y teniendo la capacidad de permanecer en superficies, equipos y material de trabajo procedentes de ambientes alimentarios durante meses a incluso años. Estas implicaciones producen graves problemas en las industrias alimentarias, la necesidad de parar la actividad y realizar tratamientos enzimáticos exhaustivos que suponen un elevado coste.

En este aspecto, cabe hacer referencia a que el término persistencia es usado en la literatura sobre el control de patógenos transmitidos por alimentos para describir: la supervivencia a largo plazo de patógenos en varios entornos, incluyendo el huésped, una instalación de procesado de alimentos y un entorno natural, y las reglas empíricas para identificar cuándo persiste un patógeno [59].

En cuanto a las reglas empíricas aplicadas para llamar persistente a una cepa, generalmente contienen dos requisitos; que los aislamientos de una cepa persistente sean indistinguibles por un método de serotipificación molecular y que dichos aislados sean obtenidos de la misma localización de muestreo durante períodos de tiempo suficientemente significativos (al menos 2-3 meses) [59].

Teniendo en cuenta estas bases para el estudio y observación de cepas bacterianas persistentes o que son reintroducidas repetidamente en ciertas localizaciones, se pueden obtener resultados que satisfagan las reglas e indicios para poder sospechar y determinar la presencia de este tipo de cepas de interés por el riesgo que conllevan asociado [59].

Por lo tanto, el estudio, análisis y caracterización en profundidad de las cepas, con las nuevas herramientas de biología molecular y microbiología de análisis genético

aplicadas a las bacterias, se hace cada vez más necesario para identificar con precisión, eficacia y rapidez la situación existente en cada caso, en esta labor perteneciente al control de enfermedades transmitidas por alimentos en el ámbito de la seguridad alimentaria.

Además, su puntualización, junto con los resultados obtenidos en el presente estudio, hacen presentes la importancia crítica que en el mismo tiene el seguimiento de las industrias, con muestreos extendidos a lo largo del tiempo, para poder valorar, verificar y tomar medidas correctoras correctamente por parte de los planes de análisis de peligros y puntos de control crítico (APPCC) implantados en las instalaciones para prevenir casos de alerta alimentaria e intoxicaciones por esta bacteria patógena.

Si el análisis del producto confirma la contaminación y el incumplimiento del criterio de seguridad alimentaria del Reglamento (CE) N° 2073/2005 respecto a *Listeria monocytogenes*, el operador tendrá que aplicar lo dispuesto en el artículo 7 del Reglamento sobre “Resultados insatisfactorios” [67].

#### **4.2. Resultados y discusión en la secuenciación masiva y aplicación de herramientas bioinformáticas (datos TORMES):**

Los análisis realizados mediante secuenciación masiva de ADN de las 30 cepas conservadas de *L. monocytogenes* de las fábricas (A,B y C) frente a bases de datos Resfinder, CARD, ARG-ANNOT [94-96] cribando su genoma utilizando Abricate [98] con salida al directorio bioinformático TORMES [99], cuyos resultados se muestran en las Tablas 22, 23 y 24, revelan (en cuanto a actividad de resistencia a antibióticos) que el 100% de los aislados son resistentes al grupo de las fosfomicinas, lincosamidas (lincomicina), fluoroquinolonas (ciprofloxacina), y los péptidos antimicrobianos [99].

*-Tabla 22. Listado de resultados de salida del directorio TORMES relativo a genes de virulencia y resistencia a antibióticos de las cepas de L. monocytogenes de las fábricas (A, B, C) conservadas. Elaboración propia.*

Nº REF	ORIGEN	LINAJE/ SEROGRUPO	RESISTENCIA ANTIB.	GENES VIRULENCIA
M1-C30	Fábrica C	II ; 1/2a	Fosfomicina, Lincosamidas, Fluoroquinolonas, Péptidos antimicrobianos	ActA,Ami,Auto,BSH,CipC,CipE,CipP,Fb pA,GtcA,hly,hpt,lap,InlA,InlB,InlC,InlF,Inl J,InlK,Lap,LapB,LntA,LpeA,LplA1,LspA,, Mpl,OatA,PdgA,PlcA,PlcB,PrfA,PrsA2.
M1-C18	Fábrica C	II ; 1/2a	Fosfomicina, Lincosamidas, Fluoroquinolonas, Péptidos antimicrobianos	ActA,Ami,Auto,BSH,CipC,CipE,CipP,Fb pA,GtcA,hly,hpt,lap,InlA,InlB,InlC,InlF,Inl J,InlK,Lap,LapB,LntA,LpeA,LplA1,LspA,, Mpl,OatA,PdgA,PlcA,PlcB,PrfA,PrsA2.
M1-C5	Fábrica C	II ; 1/2a	Fosfomicina, Lincosamidas, Fluoroquinolonas, Péptidos antimicrobianos	ActA,Ami,Auto,BSH,CipC,CipE,CipP,Fb pA,GtcA,hly,hpt,lap,InlA,InlB,InlC,InlF,Inl J,InlK,Lap,LapB,LntA,LpeA,LplA1,LspA,, Mpl,OatA,PdgA,PlcA,PlcB,PrfA,PrsA2.
M1-C4	Fábrica C	II ; 1/2a	Fosfomicina, Lincosamidas, Fluoroquinolonas, Péptidos antimicrobianos	ActA,Ami,Auto,BSH,CipC,CipE,CipP,Fb pA,GtcA,hly,hpt,lap,InlA,InlB,InlC,InlF,Inl J,InlK,Lap,LapB,LntA,LpeA,LplA1,LspA,, Mpl,OatA,PdgA,PlcA,PlcB,PrfA,PrsA2.
M1-C44	Fábrica C	II ; 1/2a	Fosfomicina, Lincosamidas, Fluoroquinolonas, Péptidos antimicrobianos	ActA,Ami,Auto,BSH,CipC,CipE,CipP,Fb pA,GtcA,hly,hpt,lap,InlA,InlB,InlC,InlF,Inl J,InlK,Lap,LapB,LntA,LpeA,LplA1,LspA,, Mpl,OatA,PdgA,PlcA,PlcB,PrfA,PrsA2.

*-Tabla 23. Listado de resultados de salida del directorio TORMES relativo a genes de virulencia y resistencia a antibióticos de las cepas de L. monocytogenes de las fábricas (A, B, C) conservadas (continuación 1). Elaboración propia.*

Nº REF	ORIGEN	LINAJE/ SEROGRUPO	RESISTENCIA ANTIB.	GENES VIRULENCIA
M1-C42	Fábrica C	II ; 1/2a	Fosfomicina, Lincosamidas, Fluoroquinolonas, Péptidos antimicrobianos	ActA,Ami,Auto,BSH,CipC,CipE,CipP,Fb pA,GtcA,hly,hpt,lap,InIA,InIB,inIC,InIF,InI J,InIK,Lap,LapB,LntA,LpeA,LplA1,LspA,, Mpl,OatA,PdgA,PlcA,PlcB,PrfA,PrsA2.
M1-B1	Fábrica B	II ; 1/2a	Fosfomicina, Lincosamidas, Fluoroquinolonas, Péptidos antimicrobianos	ActA,Ami,Auto,BSH,CipC,CipE,CipP,Fb pA,GtcA,hly,hpt,lap,InIA,InIB,inIC,InIF,InI J,InIK,Lap,LapB,LntA,LpeA,LplA1,LspA,, Mpl,OatA,PdgA,PlcA,PlcB,PrfA,PrsA2.
M1-B8	Fábrica B	II ; 1/2a	Fosfomicina, Lincosamidas, Fluoroquinolonas, Péptidos antimicrobianos	ActA,Ami,Auto,BSH,CipC,CipE,CipP,Fb pA,GtcA,hly,hpt,lap,InIA,InIB,inIC,InIF,InI J,InIK,Lap,LapB,LntA,LpeA,LplA1,LspA,, Mpl,OatA,PdgA,PlcA,PlcB,PrfA,PrsA2.
M1-B48	Fábrica B	I ; 4b	Fosfomicina, Lincosamidas, Fluoroquinolonas, Péptidos antimicrobianos	ActA,BSH,CipC,CipE,CipP,FbpA,hly,hpt ,lap,InIA,InIB,inIC,Lap,LapB,LLLSA,LLS B,LLSD,LLSG,LLSH,LlsLSP,LLSX,LLSY ,IntA,LpeA,LplA1,LspA,,Mpl,OatA,PdgA, PlcA,PlcB,PrfA,PrsA2.
M2-C4	Fábrica C	I ; 4b	Fosfomicina, Lincosamidas, Fluoroquinolonas, Péptidos antimicrobianos	ActA,BSH,CipC,CipE,CipP,FbpA,hly,hpt ,lap,InIA,InIB,inIC,Lap,LapB,LLLSA,LLS B,LLSD,LLSG,LLSH,LlsLSP,LLSX,LLSY ,IntA,LpeA,LplA1,LspA,,Mpl,OatA,PdgA, PlcA,PlcB,PrfA,PrsA2.
M2-C5	Fábrica C	II ; 1/2a	Fosfomicina, Lincosamidas, Fluoroquinolonas, Péptidos antimicrobianos, Tetraciclina	ActA,Ami,Auto,BSH,CipC,CipE,CipP,Fb pA,GtcA,hly,hpt,lap,InIA,InIB,inIC,InIF,InI J,InIK,Lap,LapB,LntA,LpeA,LplA1,LspA,, Mpl,OatA,PdgA,PlcA,PlcB,PrfA,PrsA2.
M2-C11	Fábrica C	II ; 1/2a	Fosfomicina, Lincosamidas, Fluoroquinolonas, Péptidos antimicrobianos	ActA,Ami,Auto,BSH,CipC,CipE,CipP,Fb pA,GtcA,hly,hpt,lap,InIA,InIB,inIC,InIF,InI J,InIK,Lap,LapB,LntA,LpeA,LplA1,LspA,, Mpl,OatA,PdgA,PlcA,PlcB,PrfA,PrsA2.
M2-C24	Fábrica C	II ; 1/2a	Fosfomicina, Lincosamidas, Fluoroquinolonas, Péptidos antimicrobianos	ActA,Ami,Auto,BSH,CipC,CipE,CipP,Fb pA,GtcA,hly,hpt,lap,InIA,InIB,inIC,InIF,InI J,InIK,Lap,LapB,LntA,LpeA,LplA1,LspA,, Mpl,OatA,PdgA,PlcA,PlcB,PrfA,PrsA2.
M2-C30	Fábrica C	II ; 1/2a	Fosfomicina, Lincosamidas, Fluoroquinolonas, Péptidos antimicrobianos	ActA,Ami,Auto,BSH,CipC,CipE,CipP,Fb pA,GtcA,hly,hpt,lap,InIA,InIB,inIC,InIF,InI J,InIK,Lap,LapB,LntA,LpeA,LplA1,LspA,, Mpl,OatA,PdgA,PlcA,PlcB,PrfA,PrsA2.
M2-C38	Fábrica C	II ; 1/2a	Fosfomicina, Lincosamidas, Fluoroquinolonas, Péptidos antimicrobianos	ActA,Ami,Auto,BSH,CipC,CipE,CipP,Fb pA,GtcA,hly,hpt,lap,InIA,InIB,inIC,InIF,InI J,InIK,Lap,LapB,LntA,LpeA,LplA1,LspA,, Mpl,OatA,PdgA,PlcA,PlcB,PrfA,PrsA2.
M2-C46	Fábrica C	II ; 1/2a	Fosfomicina, Lincosamidas, Fluoroquinolonas, Péptidos antimicrobianos	ActA,Ami,Auto,BSH,CipC,CipE,CipP,Fb pA,GtcA,hly,hpt,lap,InIA,InIB,inIC,InIF,InI J,InIK,Lap,LapB,LntA,LpeA,LplA1,LspA,, Mpl,OatA,PdgA,PlcA,PlcB,PrfA,PrsA2.
M2-C47	Fábrica C	II ; 1/2a	Fosfomicina, Lincosamidas, Fluoroquinolonas, Péptidos antimicrobianos	ActA,Ami,Auto,BSH,CipC,CipE,CipP,Fb pA,GtcA,hly,hpt,lap,InIA,InIB,inIC,InIF,InI J,InIK,Lap,LapB,LntA,LpeA,LplA1,LspA,, Mpl,OatA,PdgA,PlcA,PlcB,PrfA,PrsA2.
M2-B47	Fábrica B	I ; 4b	Fosfomicina, Lincosamidas, Fluoroquinolonas, Péptidos antimicrobianos	ActA,BSH,CipC,CipE,CipP,FbpA,hly,hpt ,lap,InIA,InIB,inIC,Lap,LapB,LLLSA,LLS B,LLSD,LLSG,LLSH,LlsLSP,LLSX,LLSY ,IntA,LpeA,LplA1,LspA,,Mpl,OatA,PdgA, PlcA,PlcB,PrfA,PrsA2.
M2-B48	Fábrica B	I ; 4b	Fosfomicina, Lincosamidas, Fluoroquinolonas, Péptidos antimicrobianos	ActA,BSH,CipC,CipE,CipP,FbpA,hly,hpt ,lap,InIA,InIB,inIC,Lap,LapB,LLLSA,LLS B,LLSD,LLSG,LLSH,LlsLSP,LLSX,LLSY ,IntA,LpeA,LplA1,LspA,,Mpl,OatA,PdgA, PlcA,PlcB,PrfA,PrsA2.
M2-B49	Fábrica B	I ; 4b	Fosfomicina, Lincosamidas, Fluoroquinolonas, Péptidos antimicrobianos	ActA,BSH,CipC,CipE,CipP,FbpA,hly,hpt ,lap,InIA,InIB,inIC,Lap,LapB,LLLSA,LLS B,LLSD,LLSG,LLSH,LlsLSP,LLSX,LLSY ,IntA,LpeA,LplA1,LspA,,Mpl,OatA,PdgA, PlcA,PlcB,PrfA,PrsA2.

-Tabla 24. Listado de resultados de salida del directorio TORMES relativo a genes de virulencia y resistencia a antibióticos de las cepas de *L. monocytogenes* de las fábricas (A, B, C) conservadas (continuación 2). Elaboración propia.

Nº REF	ORIGEN	LINAJE/ SEROGRUPO	RESISTENCIA ANTIB.	GENES VIRULENCIA
M2-B50	Fábrica B	I ; 4b	Fosfomicina, Lincosamidas, Fluoroquinolonas, Péptidos antimicrobianos	ActA,BSH,ClpC,ClpE,ClpP,FbpA,hly,hpt,lap,InIA,InIB,InIC,Lap,LapB,LLLSA,LLSB,LLSD,LLSG,LLSH,LLsLSP,LLSX,LLSY,IntA,LpeA,LplA1,LspA,,Mpl,OatA,PdgA,PlcA,PlcB,PrfA,PrsA2.
M3-C5	Fábrica C	II ; 1/2a	Fosfomicina, Lincosamidas, Fluoroquinolonas, Péptidos antimicrobianos, Tetraciclina	ActA,Ami,Auto,BSH,ClpC,ClpE,ClpP,FbpA,GtcA,hly,hpt,lap,InIA,InIB,InIC,InIF,InIJ,InIK,Lap,LapB,LntA,LpeA,LplA1,LspA,,Mpl,OatA,PdgA,PlcA,PlcB,PrfA,PrsA2.
M3-C22	Fábrica C	II ; 1/2a	Fosfomicina, Lincosamidas, Fluoroquinolonas, Péptidos antimicrobianos	ActA,Ami,Auto,BSH,ClpC,ClpE,ClpP,FbpA,GtcA,hly,hpt,lap,InIA,InIB,InIC,InIF,InIJ,InIK,Lap,LapB,LntA,LpeA,LplA1,LspA,,Mpl,OatA,PdgA,PlcA,PlcB,PrfA,PrsA2.
M3-C27	Fábrica C	II ; 1/2a	Fosfomicina, Lincosamidas, Fluoroquinolonas, Péptidos antimicrobianos	ActA,Ami,Auto,BSH,ClpC,ClpE,ClpP,FbpA,GtcA,hly,hpt,lap,InIA,InIB,InIC,InIF,InIJ,InIK,Lap,LapB,LntA,LpeA,LplA1,LspA,,Mpl,OatA,PdgA,PlcA,PlcB,PrfA,PrsA2.
M3-C28	Fábrica C	II ; 1/2a	Fosfomicina, Lincosamidas, Fluoroquinolonas, Péptidos antimicrobianos	ActA,Ami,Auto,BSH,ClpC,ClpE,ClpP,FbpA,GtcA,hly,hpt,lap,InIA,InIB,InIC,InIF,InIJ,InIK,Lap,LapB,LntA,LpeA,LplA1,LspA,,Mpl,OatA,PdgA,PlcA,PlcB,PrfA,PrsA2.
M3-C29	Fábrica C	II ; 1/2a	Fosfomicina, Lincosamidas, Fluoroquinolonas, Péptidos antimicrobianos	ActA,Ami,Auto,BSH,ClpC,ClpE,ClpP,FbpA,GtcA,hly,hpt,lap,InIA,InIB,InIC,InIF,InIJ,InIK,Lap,LapB,LntA,LpeA,LplA1,LspA,,Mpl,OatA,PdgA,PlcA,PlcB,PrfA,PrsA2.
M3-C32	Fábrica C	II ; 1/2a	Fosfomicina, Lincosamidas, Fluoroquinolonas, Péptidos antimicrobianos	ActA,Ami,Auto,BSH,ClpC,ClpE,ClpP,FbpA,GtcA,hly,hpt,lap,InIA,InIB,InIC,InIF,InIJ,InIK,Lap,LapB,LntA,LpeA,LplA1,LspA,,Mpl,OatA,PdgA,PlcA,PlcB,PrfA,PrsA2.
M3-C33	Fábrica C	II ; 1/2a	Fosfomicina, Lincosamidas, Fluoroquinolonas, Péptidos antimicrobianos	ActA,Ami,Auto,BSH,ClpC,ClpE,ClpP,FbpA,GtcA,hly,hpt,lap,InIA,InIB,InIC,InIF,InIJ,InIK,Lap,LapB,LntA,LpeA,LplA1,LspA,,Mpl,OatA,PdgA,PlcA,PlcB,PrfA,PrsA2.
M3-C38	Fábrica C	II ; 1/2a	Fosfomicina, Lincosamidas, Fluoroquinolonas, Péptidos antimicrobianos	ActA,Ami,Auto,BSH,ClpC,ClpE,ClpP,FbpA,GtcA,hly,hpt,lap,InIA,InIB,InIC,InIF,InIJ,InIK,Lap,LapB,LntA,LpeA,LplA1,LspA,,Mpl,OatA,PdgA,PlcA,PlcB,PrfA,PrsA2.
M3-C46	Fábrica C	II ; 1/2a	Fosfomicina, Lincosamidas, Fluoroquinolonas, Péptidos antimicrobianos	ActA,Ami,Auto,BSH,ClpC,ClpE,ClpP,FbpA,GtcA,hly,hpt,lap,InIA,InIB,InIC,InIF,InIJ,InIK,Lap,LapB,LntA,LpeA,LplA1,LspA,,Mpl,OatA,PdgA,PlcA,PlcB,PrfA,PrsA2.

Sin embargo, el 6,67% son resistentes a la tetraciclina, concretamente siendo 2 resultados en la fábrica C provenientes del mismo punto de muestreo “Superficie Suelo Arqueta” de la Sala de Pintura, en diferentes momentos de recogida (separados en el tiempo unos 3 meses). Esta situación es posiblemente indicadora, en conjunto con el resto de su caracterización (linaje II, serotipo 1/2a), de la pertenencia de los aislados obtenidos a una cepa persistente de *L. monocytogenes* que no es retirada tras las medidas de limpieza en la fábrica.

En cuanto a susceptibilidad, todos los aislados analizados son sensibles a un amplia gama de antibióticos con actividad bacteriostática, particularmente los  $\beta$ -lactámicos (cefalosporinas, ampicilina, etc), aminoglucósidos (estreptomina, gentamicina), glucopéptidos (vancomicina), frente a *L. monocytogenes*.

Se han encontrado resultados similares en un estudio realizado en un total de 470 muestras alimentarias (360 en alimentos listos para el consumo y 210 en leche pasteurizada) en China, en el que más del 95% de los aislados fueron susceptibles a una amplia gama de antibióticos, con la peculiaridad de que el 60,4% han desarrollado resistencia a estreptomocina [100].

Por otro lado, las muestras alimentarias tomadas en la ciudad de Cumaná (Venezuela), mostraron sensibilidad de las cepas de *L. monocytogenes* estudiadas por gentamicina, cloranfenicol y vancomicina, obteniendo resistencias en un 26,6% de los casos a ampicilina y 6,7% a eritromicina [101].

Los resultados obtenidos, junto con la visión en otros casos estudiados en diferentes lugares, hacen sospechar de que el patrón de sensibilidad a los antibióticos por parte de las cepas de *L. monocytogenes* encontradas en industrias lácteas y alimentarias, aunque permanece relativamente estable, está tendiendo a un aumento de la resistencia en sus cepas frente a la acción de compuestos como la tetraciclina, la estreptomocina o la ampicilina. Esta situación se comenzó a vislumbrar a partir del primer reporte de la primera cepa de *L. monocytogenes* resistente a antibióticos detectada en Francia en 1988 [102].

En relación a los resultados de genes de virulencia indicar que los factores principales secuenciados de *Listeria* afectan a aspectos como la motilidad (*ActA*), la adherencia (*Ami*, *FbpA*, *InlF*, *InlJ*, *Lap*, *Lap B*), la resistencia biliar (BSH), a exoenzimas (*Mpl*, *PlcA*, *PlcB*), a la evasión inmune (*OatA*, *PgdA*), a inmunomoduladores (*InlC*, *InlK*, *LntA*), al crecimiento intracelular (*LplA1*, *PrsA2*), la invasión (*Auto*, *GtcA*, *InlA*, *InlB*, *InlP*, *LpeA*, *Vip*, *p60*), la adquisición de hierro (*SvpA*), a la adaptación metabólica (*Hpt*), a la peptidasa (*Lsp*), la regulación (*PrfA*), a las proteínas de estrés (*ClpC*, *ClpE*, *ClpP*), a las toxinas (LLO, LLS) y a las islas de patogenicidad de *Listeria* (*LIPI-1*, *LIPI-2*, *LIPI-3*, *LIPI-4*) [103]. Los resultados se muestran en las Tablas 22, 23 y 24.

Destacar que la distinción observada, tras la aplicación en las 30 cepas aisladas y analizadas frente a la base de datos VFDB [97] cribando su genoma utilizando Abricate (eliminando identidades <90%), es la diferenciación de virulencia entre las cepas del linaje II y serogrupo 1/2a con las del linaje I y serogrupo 4b.

Se demostró que las cepas analizadas del linaje I y serogrupo 4b (20% del total) mostraron una capacidad patogénica de causar enfermedad con mayor facilidad o de ocasionar mayores efectos epidemiológicos con menor dosis debido a genes codificantes de toxinas, como los LLS, frente al linaje II y serogrupo 1/2a, a parte del gen *hly* codificante de Listeriosina O (LLO) compartido en ambos casos evolutivos.

Dichos resultados concuerdan y refrendan las conclusiones al respecto desarrolladas por diversos estudios ya mencionados en el Apartado 1. Introducción, siendo uno de los riesgos asociados la expansión clonal de cepas hipervirulentas [17;19;23;31;69].

## 5. Conclusiones

El presente estudio confirmó la presencia del patógeno *L. monocytogenes* en los procesos productivos e instalaciones pertenecientes a distintas fábricas de elaboración de queso.

La presencia de este patógeno resultó muy heterogénea en las fábricas estudiadas, lo que reveló una situación sanitaria diversa en cada caso. En la fábrica A no se encontró ningún caso positivo a lo largo del tiempo de muestreo en la misma. Mientras tanto, en el caso de la fábrica B se detectaron un total de 9 casos, que aparecieron principalmente en las superficies de equipos y cintas de una de las salas de fabricación. Este resultado hizo patente la necesidad de tomar medidas correctoras con urgencia para hacer frente a las cepas sospechosas y evitar su persistencia de forma efectiva, puesto que las medidas de higiene tomadas entre los muestreos realizados no fueron suficientes ni adecuadas. La situación más problemática fue la encontrada en la fábrica C donde se detectaron un total de 28 casos (fundamentalmente del serotipo 1/2a), distribuidos en suelos y superficies de la mayoría de las áreas de trabajo, mostrando en ciertos puntos claras sospechas de persistencia, indicando el grave riesgo que supone dicha situación.

En cuanto a las cepas detectadas en el presente estudio, destacó en cuanto a la caracterización realizada, que la variabilidad obtenida se debió únicamente a dos tipos de cepas claramente diferenciadas, una de ellas con mayor capacidad patogénica gracias a sus genes de virulencia (linaje I, serogrupo 4b) que las otras (linaje II, serogrupo 1/2). Este resultado permitió confirmar la presencia de los dos serotipos más frecuentes encontrados en alimentos.

En la caracterización de las 37 muestras de *L. monocytogenes* confirmadas como positivas, se obtuvo que el serogrupo más frecuente es el 1/2a con el 78,38% del total, mientras que el 21,62% correspondió al serogrupo 4b, confirmando los resultados recogidos en otros estudios observados.

De cara a la eliminación de las cepas de *Listeria* existentes en las fábricas estudiadas donde se ha detectado persistencia, se hace necesaria la toma de estrategias específicas y eficaces dentro del plan APPCC, como la implementación de tratamientos enzimáticos (de elevado coste) cada vez más necesarios para mantener el control de la bacteria en ambientes alimentarios con elevada presencia de casos.

Cabe destacar la creciente preocupación existente relativa al aumento de resistencia a antibióticos en ciertas cepas de *L. monocytogenes* encontradas en el estudio frente a la tetraciclina u otros en otros estudios observados, teniendo en cuenta que esta bacteria no se caracteriza por una elevada resistencia a antibióticos, salvo la natural a la fosfomicina y los riesgos que supone para la salud la listeriosis.

Finalmente, los resultados del presente estudio aportan un diagnóstico efectivo de la contaminación por *L. monocytogenes* en 3 plantas de fabricación de quesos dentro del sector lácteo. Para obtener una visión más amplia al respecto, así como para validar la

metodología y sistemática empleadas, se haría necesaria la realización de más estudios en profundidad de *L. monocytogenes* en diferentes productos y ambientes alimentarios propicios para su desarrollo.

## **6. Agradecimientos**

En primer lugar, quiero agradecer a mi familia y amigos por su apoyo incondicional en mis estudios y la realización de este trabajo fin de máster.

También quiero agradecer a Pedro A. Caballero Calvo por permitirme realizar este trabajo, así como su atención, dedicación y supervisión como tutor del presente trabajo fin de máster.

Quisiera agradecer la ayuda de Marta Hernández Pérez como tutora de prácticas y especialmente a Patricia González García y a David Abad por compartir conmigo sus conocimientos, trabajo y atención, sin los cuales no sería posible la realización de ese trabajo fin de master.

Quiero agradecer al Instituto Tecnológico Agrario de Castilla y León (ITACyL), especialmente el equipo del Laboratorio de Microbiología y Biología Molecular que me permitieron hacer parte de la rutina del laboratorio teniendo en cuenta las circunstancias de la pandemia.

## 7. Bibliografía

1. Wagner M. & McLauchlin J. (2008). Handbook of *Listeria monocytogenes*. Chapter 1: Biology. Ed. D. Liu. CRC Press, Taylor & Francis Group. p 3-25.
2. Camejo, A. et al. (2011). The arsenal of virulence factors deployed by *Listeria monocytogenes* to promote its cell infection cycle. *Virulence.*, Vol 2 (5): 379-394.
3. Den Bakker, H.C. et al. (2014). *Listeria floridensis* sp. nov., *Listeria aquatica* sp. nov., *Listeria cornellensis* sp. nov., *Listeria riparia* sp. nov. and *Listeria grandensis* sp. nov., from agricultural and natural environments. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology.*, Vol 64 (6): 1882-1889.
4. Orsi, R.H. et al. (2016). Characteristics and distribution of *Listeria spp.*, including *Listeria* species newly described since 2009. *Applied Microbiology and Biotechnology.*, Vol 100: 5273-5287.
5. Rocourt, J. & Buchrieser, C. (2007). The genus *Listeria* and *Listeria monocytogenes*: Phylogenetic position, taxonomy, and identification. In: Ryser ET, Marth EH. *Listeria, Listeriosis e Food Safety*. Ed. 3, CRC Press, Boca Raton, FL., p: 1-38.
6. Rasmussen, O.F. et al. (1995). *Listeria monocytogenes* exists in at least three evolutionary lines: evidence from flagellin. Invasive associated protein and listeriolysin O genes. *Microbiology.*, Vol 141 (9): 2053-2061.
7. Lang Halter, E. et al. (2013). *L. weihenstephanensis* sp. nov. Isolated from water plant *Lemna trisulca* taken from a freshwater pond. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology.*, Vol 63 (2): 641-647.
8. Graves, L.M. et al. (2010). *Listeria marthii* sp. nov., isolated from the natural environment, Finger Lakes National Forest. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology.*, Vol 60 (6): 1280-1288.
9. Leclercq, A. et al. (2010). *Listeria rocourtiae* sp. Nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology.*, Vol 60 (9): 2210-2214.
10. Weller, D. et al. (2015). *Listeria booriae* sp. Nov. and *Listeria newyorkensis* sp. Nov., from food processing environments in the USA. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology.*, Vol 65 (1): 286-292.
11. European Centre for Disease Prevention and Control (2020). Listeriosis. In: ECDC. Annual epidemiological report for 2017. Surveillance Report. Stockholm. Disponible: <https://www.ecdc.europa.eu/en/publications-data/listeriosis-annual-epidemiological-report-2017>
12. Zhang Y. et al. (2007). Characterization of *Listeria monocytogenes* isolated from retail foods. *International Journal of Food Microbiology.*, Vol 113 (1): 47-53.
13. Chen, Y. et al. (2007). Multi-Virulence-Locus sequence typing identifies single nucleotide polymorphisms which differentiate epidemic clones and outbreak strains of *Listeria monocytogenes*. *Journal of Clinical Microbiology. Bacteriology.*, Vol 45 (3): 835-846.

14. Liu, D. (2006). Identification, subtyping and virulence determination of *Listeria monocytogenes*, an important foodborne pathogen. *Journal of Medical Microbiology.*, Vol 55: 645-659.
15. Nightingale, K.K. et al. (2005). Select *Listeria monocytogenes* subtypes commonly found in foods carry distinct nonsense mutations in *inlA*, leading to expression of truncated and secreted internalin A, and are associated with a reduced invasion phenotype for human intestinal epithelial cells. *Applied and Environmental Microbiology.*, Vol 71 (12): 8764-8772.
16. Wiedmann, M. et al. (1997). Ribotypes and virulence gene polymorphisms suggest three distinct *Listeria monocytogenes* lineages with differences in pathogenic potential. *Infection and Immunity.*, Vol 65 (7): 2707-2716.
17. Orsi, R. N., den Bakker H. C., Wiedmann, M. (2011). *Listeria monocytogenes* lineages: Genomics, evolution, ecology, and phenotypic characteristics. *International Journal of Medical Microbiology.*, Vol 301: 79-96.
18. Piffaretti, J.C. et al. (1989). Genetic characterization of clones of the bacterium *Listeria monocytogenes* causing epidemic disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.*, Vol 86: 3818-3822.
19. Ward, T.J. et al. (2008). Multilocus genotyping assays for single nucleotide polymorphism-based subtyping of *Listeria monocytogenes* isolates. *Applied and Environmental Microbiology.*, Vol 74 (24): 7629-7642.
20. Roberts, A. et al. (2006). Genetic and phenotypic characterization of *Listeria monocytogenes* lineage III. *Microbiology.*, Vol 152 (3): 685-693.
21. Rasmussen, O.F. et al. (1995). *Listeria monocytogenes* exists in at least three evolutionary lines: evidence from flagellin. Invasive associated protein and listeriolysin O genes. *Microbiology.*, Vol 141 (9): 2053-2061.
22. Jeffers, G.T. et al. (2001). Comparative genetic characterization of *Listeria monocytogenes* isolates from human and animal listeriosis cases. *Microbiology.*, Vol 147 (5): 1095-1104.
23. Vázquez-Boland, J. A. et al. (2001). *Listeria* pathogenesis and molecular virulence determinants. *Clinical Microbiology Reviews.*, Vol 14 (3): 584-640.
24. Mead, P.S. et al. (2006). Nationwide outbreak of listeriosis due to contaminated meat. *Epidemiology & Infection.*, Vol 134: 744-751.
25. López, V., Suárez, M., Chico-Calero, I., Navas, J., Martínez-Suárez, J. V. (2006). *Listeria monocytogenes* en alimentos ¿son todos los aislamientos igual de virulentos?. *Revista Argentina de Microbiología.*, Vol 38: 224-234.
26. Macedo, M. & Vola, M. (2008). Principales grupos de bacilos Gram positivos aerobios. Capítulo 20. *Bacteriología y virología médica.* Pág., 339-353.
27. Chen J., Luo X., Jiang L., Jin P., Wei W., Liu D., Fang W. (2009). Molecular characteristics and virulence potential of *Listeria monocytogenes* isolates from Chinese food systems. *Food Microbiology.*, Vol 26: 103-111.

28. Témoïn, S. et al. (2008). Multiple point mutations in virulence genes explain the low virulence of *Listeria monocytogenes* field strains. *Microbiology.*, Vol 154 (3): 939-948.
29. Liu D. et al. (2007). A multiplex PCR for species and virulence specific determination of *Listeria monocytogenes*. *Journal of Microbiological Methods.*, Vol 71 (2): 133-140.
30. Freitag N.E. et al. (2009). *Listeria monocytogenes*-from saprophyte to intracellular pathogen. *Nature Reviews Microbiology.*, Vol 7: 623-628.
31. Velge, P. & Roche, S. (2010). Variability of *Listeria monocytogenes* virulence: a result of the evolutionary between saprophytism and virulence?. *Future Microbiology.*, Vol 5: 1799-1821.
32. Nørrung, B & Andersen, J.K. (2000). Variations in virulence between different electrophoretic types of *Listeria monocytogenes*. *Letters in Applied Microbiology.*, Vol 30: 228-232.
33. Wiedmann, M. (2002). Detection and characterization of *Listeria monocytogenes*. *Journal of AOAC International.*, Vol 85 (2): 494.
34. Wiedmann M. (2002). Molecular subtyping methods for *Listeria monocytogenes*. *Journal of AOAC International.*, Vol 85: 524- 531.
35. European Food Safety Authority / European Centre for Disease Prevention and Control - EFSA/ECDC (2018). The European Union summary report of trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2017. *The EFSA Journal.*, Vol 16 (12): 5500.
36. European Food Safety Authority / European Centre for Disease Prevention and Control - EFSA/ECDC (2021). The European Union One Health 2019 Zoonoses Report. *The EFSA Journal.*, Vol 19 (2): 6406.
37. Scallan, E. (2011). Foodborne illness acquired in the United States-Major Pathogens. *Emerging Infectious diseases.*, Vol 17 (1): 7-15
38. Lorber, B. (2007). Community-Acquired *Listeria monocytogenes* meningitis in Adults. *Clinical Infectious Diseases.*, Vol 44 (5): 765-766.
39. Nyfelt, A. (1929). Etiologie de la mononucleóse infectieuse. *C.R. Seances Soc. Biol.*, Vol 101: 590-591.
40. Seeliger, H.P.R. (1988). Listeriosis-History and actual developments. *Infection.*, Vol 16 (2): 80-84.
41. Fraser, G. (1962). A plate method for the rapid identification of *Listeria (Erysipelothrix) monocytogenes*. *Veterinary Record.*, Vol 74: 50-51.
42. Rack, P., Tenner, K., Szivessy, K. (1970). Electron microscopic studies in experimental keratoconjunctivitis listeriosa. Part 1. Penetration of *Listeria monocytogenes* into corneal epithelia cells. *Acta Microbiologica Academiae Scientiarum Hungaricae.*, Vol 17: 221-236.

43. Gregory, S.H., Sagnimeni, A.J., Wing, E.J. (1996). Expression of the inLAB operon by *Listeria monocytogenes* is not required for entry into hepatic cells in vivo. *Infection and Immunity.*, Vol 64: 3983-3986
44. Skalka, B., Smola, J., Elischerova, K. (1982). Routine test for in vitro differentiation of pathogenic and apathogenic *Listeria monocytogenes* strains. *Journal of Clinical Microbiology.*, Vol 15: 503-507.
45. Rocourt, J. et al. (2000). Epidemiology of human listeriosis and seafoods. *International Journal of Food Microbiology.*, Vol 62 (3): 197-209.
46. Seeliger, H.P.R. (1961). *Listeriosis*. Hafner Publishing Company, New York., Pág., 154-228
47. Schlech, W.F. et al. (1983). Epidemic Listeriosis-Evidence for transmission by food. *The New England Journal of Medicine.*, Vol 308 (4): 203-206.
48. Schneider, K. R. et al. (2013). Preventing foodborne illness: Listeriosis. Institute of Food and Agricultural Sciences Extension. University of Florida. Pág., 1-5.
49. Denny J. & McLauchlin J. (2008). Human *Listeria monocytogenes* infections in Europe an opportunity for improved European surveillance. *Eurosurveillance.*, Vol 13: 1- 5.
50. Directrices sobre la aplicación de principios generales de higiene de los alimentos para el control de *Listeria monocytogenes* en alimentos. CAC/GL 61; (2007). p. 1-30.
51. Directrices para el muestreo oficial de líneas de producción de alimentos listos para el consumo que pueden plantear riesgo de *Listeria monocytogenes* y actuaciones consiguientes. Revisión 0. Comisión Institucional de la Agencia Española de Consumo, Seguridad Alimentaria y Nutrición (2015). p. 1-27.
52. Directrices para la verificación del muestreo de *Listeria monocytogenes* en zonas de trabajo y equipos utilizados en la producción de alimentos listos para el consumo. Versión 1. Comisión Institucional de la Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición (2020). p. 1-31.
53. Documento de orientación para la verificación de estudios de vida útil en relación con *Listeria monocytogenes* en alimentos listos para el consumo. Comisión institucional de la Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición (2019). p. 1-91.
54. Carpentier, B. & Cerf, O. (2011). Persistence of *Listeria monocytogenes* in food industry equipment and premises. *International of Journal of Food Microbiology.*, Vol 145: 1-8.
55. Tompkin, R.B. (2002). Control of *Listeria monocytogenes* in the food-processing environment. *Journal of Food Protection.*, Vol 65: 709-725.
56. Ferreira, V. et al. (2014). *Listeria monocytogenes* persistence in food associated environments: epidemiology, strain characteristics, and implications for public health. *Journal of Food Protection.*, Vol 77: 150-170.

57. Ivanek, R. et al. (2004). Mathematical model of *Listeria monocytogenes* cross-contamination in a fish processing plant. *Journal of Food Protection.*, Vol 67 (12): 2688-2697.
58. Churchill, L. T., Lee, H., Hall, J. C. (2006). Detection of *Listeria monocytogenes* and the toxin listeriolysin O in food. *Journal of Microbiological Methods.*, Vol 64: 141-170.
59. Whole-genome sequencing allows for improved identification of persistent *Listeria monocytogenes* in Food-Associated environments. *Applied and Environmental Microbiology.*, Vol 81 (17): 6024-6037
60. González, M. B. (2019). *Listeria*: problemática y control en la industria. Agencia de Seguridad Alimentaria, Sanidad Ambiental y Consumo (ASASAC).
61. Pradhan, A.K. et al. (2010). Quantitative risk assessment of listeriosis-associated deaths due to *Listeria monocytogenes* contamination of deli meats originating from manufacture and retail. *Journal of Food Protection.*, Vol 73: 620-630.
62. Endrikat, S. et al. (2010). A comparative risk assessment for *Listeria monocytogenes* in prepackaged versus retail-sliced deli meat. *Journal of Food Protection.*, Vol 73: 612-619
63. Taboada, E. N., Graham M. R., Carriço, J. A., Domselaar G. V. (2017) Food safety in the age of the next generation sequencing, bioinformatics, and open data access. *Frontiers in Microbiology.*, Vol 8: 1-10.
64. Jordan, K., Fox, E. M., Wagner, M. (2014). *Listeria monocytogenes*: Methods and Protocols. *Methods in Molecular Biology.*, Vol 1157 :1-285.
65. International Organization for Standardization - ISO. (2008). ISO Norm 18593:2018. Microbiology of the food chain. Horizontal methods for surface sampling. International Organization for Standardization, Geneva, Switzerland.
66. Reglamento (CE) nº 852/2004 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 29 de abril de 2004, relativo a la higiene de los productos alimenticios. Diario Oficial de la Unión Europea (DOUE) núm. 139, de 30 de abril de 2004, p. 1-54.
67. Reglamento (CE) nº 2073/2005 de la Comisión, de 15 de noviembre de 2005, relativo a los criterios microbiológicos aplicables a los productos alimenticios. Diario Oficial de la Unión Europea (DOUE) núm. 338, de 22 de diciembre de 2005, p. 1-26.
68. Reglamento (CE) nº 1441/2007 de la Comisión, de 5 de diciembre de 2007, que modifica el Reglamento (CE) nº 2073/2005 relativo a los criterios microbiológicos aplicables a los productos alimenticios. Diario Oficial de la Unión Europea (DOUE) núm. 195, de 20 de julio de 2016, p. 12-29.
69. International Organization for Standardization - ISO. (2008). ISO Norm 7218:2007. Microbiology of food and animal feeding stuffs - General requirements and guidance for microbiological examinations. International Organization for Standardization, Geneva, Switzerland.

70. International Organization for Standardization - ISO. (2008). ISO Norm 7218:2007/A1:2013. Microbiology of food and animal feeding stuffs - General requirements and guidance for microbiological examinations. Amendment 1. International Organization for Standardization, Geneva, Switzerland.
71. Beumer, R. R. & Hazeleger, W. C. (2003). *Listeria monocytogenes*: diagnostic problems. FEMS Immunology and Medical Microbiology., Vol 35: 191-197.
72. International Organization for Standardization - ISO. (2018). ISO Norm 11290-1:2017. Microbiology of the food chain. Horizontal method for the detection and enumeration of *Listeria monocytogenes* and of *Listeria spp.* Part 1: Detection method. International Organization for Standardization, Geneva, Switzerland
73. International Organization for Standardization - ISO. (2018). ISO Norm 11290-2:2017. Microbiology of the food chain. Horizontal method for the detection and enumeration of *Listeria monocytogenes* and of *Listeria spp.* Part 2: Enumeration method. International Organization for Standardization, Geneva, Switzerland.
74. Law, J. W-F. et al. (2015). An insight into the isolation, enumeration, and molecular detection of *Listeria monocytogenes* in food. Frontiers in Microbiology., Vol 6 (1227): 1-15
75. Valderrama, W. B. et al. (2016). Commercially available rapid methods for detection of selected food-borne pathogens. Critical Reviews in Food Science and Nutrition., Vol 56 9: 1519-1531
76. Análisis microbiológico de los alimentos. Metodología analítica oficial. Microorganismos patógenos. Volumen 1 (2011). Red Nacional de Laboratorios Oficiales de Análisis de Alimentos (RENALOA-ANMAT).
77. Moya, A. S. (2017). Microbioma y secuenciación masiva. Revista Española de Quimioterapia., Vol 30 (5): 305-311.
78. Burbano, E. et al. (2006). Rapid DNA extraction and PCR validation for direct detection of *Listeria monocytogenes* in raw milk. Revista MVZ Córdoba., Vol 11(1): 715-724.
79. Rodríguez-Lázaro, D. et al. (2004). Simultaneous quantitative detection of *Listeria spp.* and *Listeria monocytogenes* using a duplex real-time PCR-based assay. FEMS Microbiology Letters., Vol 233: 257-267
80. Rodríguez-Lázaro, D. et al. (2004). Quantitative Detection of *Listeria monocytogenes* and *Listeria innocua* by real-time PCR: Assessment of hly, iap, and lin02483 targets and amplifluor technology. Applied and Environmental Microbiology., Vol 70 (3): 1366-1377
81. Domingues, L. (2017). PCR: Methods and protocols. Methods in Molecular Biology., Vol 1620 :1-282.
82. Cremonesi, P. et al. (2014). Development of 23 individual TaqMan real-time PCR assays for identifying common foodborne pathogens using a single set of amplification conditions. Food Microbiology., Vol 43: 35-40.

83. Chen, J. Q. et al. (2017). PCR-based methodologies for detection and characterization of *Listeria monocytogenes* and *Listeria ivanovii* in foods and environmental sources. *Food Science and Human Wellness.*, Vol 6: 39-59.
84. Doumith, M., Buchrieser, C., Glaser, P., Jacquet, C., Martin, P. (2004). Differentiation of the major *Listeria monocytogenes* serovars by multiplex PCR. *Journal of Clinical Microbiology.*, Vol 42 (8): 3819-3822.
85. Doumith, M. et al. (2005). Multicenter validation of a multiplex PCR assay for differentiating the mayor *Listeria monocytogenes* serovars 1/2a, 1/2b, 1/2c, and 4b: Toward an international standard. *Journal of Food Protection.*, Vol 68 (12): 2648-2650.
86. Kérouanton, A., Marault, M., Petit, L., Grout, J., Dao, TT., Brisabois, A. (2010). Evaluation of a multiplex PCR assay as an alternative method for *Listeria monocytogenes* serotyping. *Journal of Microbiological Methods.*, Vol 80: 134-137.
87. Borucki, M. & Call, D. R. (2003). *Listeria monocytogenes* serotype identification by PCR. *Journal of Clinical Microbiology.*, Vol 41 (12): 5537-5540
88. International Organization for Standardization - ISO. (2005). ISO Norm 22174:2005. Microbiology of food and animal feeding stuffs. Polymerase chain reaction (PCR) for the detection of food-borne pathogens. General requirements and definitions. International Organization for Standardization, Geneva, Switzerland.
89. Somma, M. & Querci, M. (2007). Análisis de la presencia de organismos genéticamente modificados en muestras de alimentos. Sesión nº 5. Electroforesis en gel de agarosa. Joint Research Center (JRC). European Commision / OMS.
90. Borucki, M. K. et al. (2004). Selective discrimination of *Listeria monocytogenes* epidemic strains by a mixed-genome DNA microarray compared to discrimination by pulsed-field electrophoresis, ribotyping, and multilocus sequence typing. *Journal of Clinical Microbiology.*, Vol 42 (11): 5270-5276.
91. Graves, L.M. & Swaminathan, B. (2001). PulseNet standardized protocol for subtyping *Listeria monocytogenes* by macrorestriction and pulsed-field gel electrophoresis. *International Journal of Food Microbiology.*, Vol 65 (1-2): 55-62.
92. Kérouanton, A. et al. (1998). Comparison of five typing methods for the epidemiological study of *Listeria monocytogenes*. *International Journal of Food Microbiology.*, Vol 43 (1-2): 61-71.
93. García, M.D. & Uruburu, F. (2000). La conservación de cepas microbianas. *Microbiología SEM.*, Vol 30: 12-6
94. Zankari, E. et al. (2012). Identification of acquired antimicrobial resistance genes. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy.*, Vol 67 (11): 2640-2644.
95. McArthur, A.G. et al. (2013). The comprehensive antibiotic resistance database. *Antimicrobial Agents and Chemotheramy.*, Vol 57 (7): 3348-3357.

96. Gupta, S.K. et al. (2014). ARG-ANNOT, a new bioinformatic tool to discover antibiotic resistance genes in bacterial genomes. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy.*, Vol 58 (1): 212-220
97. Chen, L. et al. (2005). VFDB: A reference database for bacterial virulence factors. *Nucleic Acids Research.*, Vol 33: 325-328
98. Seemann, T. (2017). Abricate. Github: <https://github.com/tseemann/abricate>
99. Narciso, M.Q., Rodríguez-Lázaro, D., Eiros, J.M., Hernández, M. (2019). TORMES: An automated pipeline for whole bacterial genome analysis. *Bioinformatics.*, Vol 35 (21): 4207-4212.
100. Chen, Y. et al. (2019). Heterogeneity, characteristics, and public health implications of *Listeria monocytogenes* in Ready-to-eat food items and pasteurized milk in China.
101. Villalobos de Bastardo, L.B. & Martínez, R. E. (2006). Susceptibilidad antimicrobiana de *Listeria spp.* aisladas de alimentos durante el periodo 2003-2004. Cumaná, Venezuela. *Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología.*, Vol 26 (1): 1315-2556.
102. Aureli, P. et al. (2003). Susceptibility of *Listeria monocytogenes* isolated from foods in Italy to antibiotics. *International Journal of Food Microbiology.*, Vol 83: 325-330.
103. Radoshevith, L. & Cossart, P. (2017). *Listeria monocytogenes*: towards a complete picture of its physiology and pathogenesis. *Nature Reviews-Microbiology.* p. 1-15.