

**UNIVERSIDAD DE OVIEDO**

**MASTER UNIVERSITARIO EN BIOTECNOLOGÍA ALIMENTARIA**

**“Métodos de detección y control de *Listeria monocytogenes* en la industria alimentaria”**

**TRABAJO FIN DE MASTER**

**POR**

**ANA ALONSO MUÑIZ**

**JUNIO, 2018**





## **Agradecimientos**

Quisiera expresar mi agradecimiento a D. Felipe Lombó Brugos, mi tutor del trabajo fin de máster, por su dedicación, paciencia y supervisión del mismo.

Quisiera también agradecer a mis compañeros del máster, por considerarme una más de este grupo de alumnos, aunque la diferencia de edad fuese grande.

Agradecer a toda mi familia, pero sobre todo a mi madre, por el apoyo incondicional en esta aventura de volver a estudiar.

Agradecer a mi sobrina Irene su existencia. Ya que esta “niña milagro” me ayudó en la elección del TFM.

Y por último agradecer a mi novio Jorge, que sin la ayuda de él, no hubiese realizado el máster. Por ese “empujón” que me dio para que lo hiciera, por el apoyo durante todo el año, por su comprensión a la hora de no tener tiempo para dedicarle, y por su cariño.

## Índice

1. <b>Resumen</b>	página 1
2. <b>Abstract</b>	página 2
3. <b>Listado de Figuras</b>	página 3
4. <b>Listado de Tablas</b>	página 4
5. <b>Descripción</b>	página 5
6. <b>Taxonomía</b>	página 6
7. <b>Ecología y metabolismo</b>	página 9
8. <b>Factores de virulencia</b>	página 12
9. <b>Mecanismos de transmisión</b>	página 15
10. <b>Cuadro clínico</b>	página 17
11. <b>Epidemiología</b>	página 20
12. <b>Métodos de detección</b>	página 22
12.1. Baterías bioquímicas	página 22
12.2. Métodos de enriquecimiento por cultivo	página 24
12.3. Técnicas inmunológicas	página 26
12.4. Técnicas moleculares	página 30
12.5. Biosensores	página 32
12.6. Métodos convencionales de tipificación	página 32
13. <b>Métodos de control</b>	página 38
13.1. Métodos Físicos	página 38
13.2. Métodos Químicos	página 41
13.3. Métodos Biológicos	página 43
14. <b>Conclusiones</b>	página 48
15. <b>Abreviaturas y símbolos</b>	página 49
16. <b>Bibliografía</b>	página 50

## 1. Resumen

La listeriosis es una enfermedad producida por *Listeria monocytogenes*. Este microorganismo entérico se adquiere por vía oral, invadiendo la mucosa gástrica, y diseminándose luego a los tejidos periféricos, causando enfermedad sistémica en humanos. La enfermedad se estudió originalmente en conejos, y la especie se llamó *monocytogenes* debido a la monocitosis masiva observada en la sangre de los animales infectados. En 1980 se descubrió que *L. monocytogenes* era la causa de los brotes de esta enfermedad transmitida por alimentos en humanos (Pitts and Orazio, 2018).

*L. monocytogenes* es una bacteria Gram-positiva patógena, no esporulada, que causa Listeriosis en personas con un sistema inmune deficiente, particularmente niños pequeños, mujeres embarazadas, ancianos y personas inmuno-comprometidas (Pennone *et al.*, 2018). Es un patógeno de gran riesgo en muchos alimentos listos para el consumo humano, debido a su capacidad de sobrevivir y multiplicarse incluso bajo condiciones ambientales restrictivas para otras especies bacterianas. La enfermedad es grave en humanos , debido a sus altas tasas de mortalidad, y a que esta bacteria es ubicua, encontrándose en el suelo, el agua y la vegetación (Bergholz *et al.*, 2017).

El presente trabajo constituye un resumen de las características generales y de los métodos de control de la listeriosis en la actualidad. En él se detallan los diferentes métodos de detección y control de esta bacteria, divididos en 3 métodos físicos, químicos y biológicos, descritos más adelante.

## 2. Abstract

Listeriosis is a disease caused by *Listeria monocytogenes*. This enteric microorganism is acquired orally, invading the gastric mucosa, and then spreading to peripheral tissues, causing a systemic disease in humans. The disease was originally studied in rabbits, and the species was called *monocytogenes* because of the massive monocytosis observed in blood from infected animals. In 1980 it was discovered that *L. monocytogenes* was the cause of the outbreaks of this food-borne disease in humans (Pitts and Orazio, 2018).

*L. monocytogenes* is a pathogenic, non-sporulated Gram-positive bacterium that causes listeriosis in people with a deficient immune system, particularly young children, pregnant women, the elderly and immunocompromised people (Pennone et al., 2018). It's a pathogen of great concern in many ready-to-eat foods due to its ability to survive and multiply even under environmental conditions restrictive for other bacteria. This human disease is severe, due to its high rates of mortality and because this pathogen can be found in environments such as soil, water or vegetation (Bergholz et al., 2017).

The present work constitutes a review of the general characteristics and current control methods for listeriosis. It includes different methods and control detection, divided into physical, chemical and biological methods.

### 3. Listado de figuras

Figura 1. Representación de los serotipos de *L. monocytogenes* aislados desde muestras en *Agaricus bisporus*. Página 8.

Figura 2. Ciclo de vida de *L. monocytogenes*, página 13.

Figura 3. Vías de transmisión de *L. monocytogenes*, página 17.

Figura 4. Api *Listeria* negativo, página 23.

Figura 5. Api *Listeria* positivo, página 23.

Figura 6. Diagrama de Aglutinación de látex pasiva inversa, página 27.

Figura 7. Técnica ELISA, página 27.

Figura 8. Ensayo de flujo lateral, página 28.

Figura 9. Halo de inhibición producido por bacteriocinas en (A) *L. lactis* N8, (B) *L. lactis* N8-p-lecCI, (C) *L. lactis* N8-r-lecCI y (D) *L. lactis* NZ9000-p-lecCI, página 42.

#### 4. Listado de tablas

Tabla 1. Ejemplos de complejos clonales presentes en la especie *L. monocytogenes* y sus fenotipos. Página 7.

Tabla 2. Alimentos contaminados por *Listeria monocytogenes*, página 15.

Tabla 3. Casos de listeriosis por año, página 20.

Tabla 4. Tasas de letalidad según el rango de edad, página 21.

Tabla 5. Casos de listeriosis en recién nacidos y en mujeres embarazadas, página 21.

Tabla 6. Tipificación de *Listeria* según batería API, página 24.

Tabla 7. Ventajas e inconvenientes de los métodos de detección, página 29.

Tabla 8. Métodos comerciales de detección de *L. monocytogenes*, página 30.

Tabla 9. Ventajas e inconvenientes de las técnicas de tipificación utilizadas para las cepas de *L. monocytogenes*, página 34.

Tabla 10. Crecimiento detectado de *L. monocytogenes* según la temperatura y la concentración de la mezcla de vinagre y azúcar empleada en un experimento con pasta fresca rellena, página 39.

Tabla 11. Ensayo de control de *L. monocytogenes* (en log UFC/mL) sobre filetes de salmón fresco, utilizando AEW y NEW (como control se utilizó agua desionizada estéril, DI), página 40.

Tabla 12. Tipos de fagos utilizados frente a *L. monocytogenes*, página 44.

Tabla 13. Detección de *L. monocytogenes* en suspensión con el fago P100 y según la concentración de LM y la variación de la temperatura, página 46.

Tabla 14. Detección de *L. monocytogenes* según la titulación del fago P100 utilizada sobre lonchas de jamón curado, página 46.

## 5. Descripción

El género *Listeria* está formado por bacterias Gram-positivas, no esporuladas y móviles. De sus 7 especies, *L. monocytogenes*, *L. innocua*, *L. welshimeri*, *L. seeligeri*, *L. ivanovii*, *L. grayi* y *L. murrayi*, únicamente dos son patógenas, *L. monocytogenes* para humanos y animales, y *L. ivanovii* en animales (Hartford and Sneath, 1993).

*L. monocytogenes* es una bacteria ubicua y el agente causante de la listeriosis humana, una importante enfermedad transmitida por los alimentos con una alta tasa de mortalidad, particularmente en poblaciones de alto riesgo como lo son pacientes ancianos, inmunocomprometidos, mujeres embarazadas y niños recién nacidos. *L. monocytogenes* se distribuye ampliamente en las empresas de procesamiento de alimentos, lo que representa un riesgo de contaminación de productos alimenticios. Así, los alimentos contaminados se consideran el principal vehículo para la listeriosis, particularmente los alimentos listos para comer, que están destinados para ser consumidos sin ningún tratamiento extra. Los brotes y los casos esporádicos de listeriosis están generalmente asociados a este tipo de alimentos, como quesos blandos, ahumados, pescados, verduras, carnes, etc.(Martín, Bover-Cid and Aymerich, 2018).

## 6. Taxonomía

El género *Listeria* pertenece a la familia *Listeriaceae*, que se encuentra dentro de la clase *Bacilli* y del phylum *Firmicutes* ( <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/159>, 2018).

La caracterización de las cepas de *L. monocytogenes* es necesaria para determinar su potencial de virulencia, y favorecer su vigilancia y seguimiento epidemiológico. Entre los 13 serotipos descritos de *L. monocytogenes*, los serotipos 1/2a, 1/2b y 4b están implicados en el 90% de los casos y brotes de listeriosis humana, causando el serotipo 4b más de la mitad de los casos. Por otro lado, el serotipo 1/2c es común en lugares de procesamiento de alimentos y productos alimenticios, pero rara vez ha estado implicado en casos de listeriosis humana. Dentro de estos serotipos puede haber subgrupos que presenten cierta tendencia a causar listeriosis. Un ejemplo son los casos recientes relacionados con la variante del serotipo 4b, denominada 4bV (Bergholz *et al.*, 2017)

Se utilizan diversos métodos moleculares para identificar y monitorizar aislados de *L. monocytogenes*. Uno de ellos es la electroforesis en gel de campo pulsado (PFGE) considerada durante mucho tiempo como el método estándar por su alto poder discriminatorio, reproducibilidad, repetitividad. Otras técnicas son la tipificación multilocus de secuencias (MLST), la tipificación multilocus de secuencias de virulencia (MVLST) y la secuenciación del genoma completo (WGS). Recientemente el análisis multilocus de VNTR (número variable de repeticiones tándem), MLVA, ha surgido como un poderoso método para la identificación precisa de patógenos transmitidos por los alimentos, entre los que se encuentra *L. monocytogenes*. El enfoque aquí se basa en la detección del número de repeticiones en tándem en múltiples lugares y en número variable, distribuidas a lo largo del genoma. El MLVA es considerado un método fácil y de bajo coste, que proporciona resultados rápidos y portátiles con un alto poder discriminatorio (Martín, Bover-Cid and Aymerich, 2018).

En un estudio realizado en productos cárnicos y plantas procesadoras de carne se compararon los métodos de tipificación PGFE, MLST, WGS y MLVA. Todos salvo el MLVA presentaron varios inconvenientes para su uso en los laboratorios de control de calidad, como el trabajo intensivo requerido y el alto coste. En contra, el MLVA es un método alternativo con rapidez, facilidad de uso y bajo coste. El MLVA se basa en el

tamaño exacto de los fragmentos de ADN amplificados por PCR mediante electroforesis capilar y se puede utilizar de forma rutinaria como método alternativo al MLST. Además, el MLVA permite rastrear la propagación de clones patogénicos y la persistencia de subtipos particulares (Martín, Bover-Cid and Aymerich, 2018). *L. monocytogenes* consta de cuatro linajes evolutivos (I, II, III, IV). La mayoría de de los casos de listeriosis están asociados con el linaje I (serotipo 1/2b y 4b) y II (serotipos 1/2<sup>a</sup> y 1/2c).

Además de los diferentes serotipos, en este patógeno se han identificado a nivel genético diversos complejos clonales (CC). En la tabla 1 se pueden observar los CC emergentes detectados en varios estudios. Algunos, como el CC1 y el CC2, son menos frecuentes en los últimos años. En cambio, otros CCs que antes eran poco comunes han aumentado su frecuencia, particularmente el CC5, CC6, CC9 y CC121. En concreto, el CC121 se está expandiendo por Australia y Europa, y el CC6 por Europa. Un estudio en EEUU demostró además que los CC involucrados en meningitis, como el CC4, tenían un fenotipo más virulento que las cepas asociadas con septicemia, incluyendo una isla de patogenicidad de unas 8 Kb denominada LIPI-4.. (Bergholz *et al.*, 2017)

Genetic element	Present in these groups	Phenotype	References
LIPI-3	CC1, CC4, CC6	Increased competitiveness in GI tract	(Moura et al. 2016; Quereda et al. 2017)
LIPI-4	CC4	Central nervous system and maternal/fetal infection	(Maury et al. 2016)
LGI 1	CC8	Increased tolerance to QACs	(Kovacevic et al. 2015)
LGI 2	CC1, CC2, CC4	Arsenic resistance	(Lee et al. 2017)
SSI-2	ST121	Alkaline and oxidative stress resistance	(Harter et al. 2017)
pLMST6	CC6	Increased resistance to BC, amoxicillin, gentamycin	(Kremer et al. 2017)
Tn6188	Varied	Resistance to BC	(Muller et al. 2013)

Tabla 1. Ejemplos de complejos clonales presentes en la especie *L. monocytogenes* y sus fenotipos (Bergholz *et al.*, 2017)

En otro estudio sobre la presencia de *L. monocytogenes* en *Agaricus bisporus* (champiñón), se comprobó que, este hongo puede sufrir contaminación cruzada con este patógeno. Se caracterizaron varios aislados de este patógeno obtenidos desde este

alimento, mediante electroforesis en gel de campo pulsado (PFGE), reacción en cadena de la polimerasa (PCR) específica para la especie y PCR para la determinación del serogrupo. Se obtuvieron así 279 aislados de *L. monocytogenes* pertenecientes al serotipo 1/2a, 3a en el 40,8% de los casos, al 1/2b, 3b en el 30,1% de los casos y al 4b, 4d, 4e en el 29,1% de los casos. Por tanto, se concluyó que el cultivo de hongos representa un nicho ecológico adecuado para la ocurrencia y supervivencia de *L. monocytogenes*, por lo que conviene utilizar desinfectantes y tratamientos térmicos al final de la cosecha, además de la pasteurización del sustrato antes de la inoculación con las esporas del hongo. En la figura 1, que se muestra a continuación, se puede observar el serotipo obtenido de las diferentes muestras en este estudio. (Pennone *et al.*, 2018).

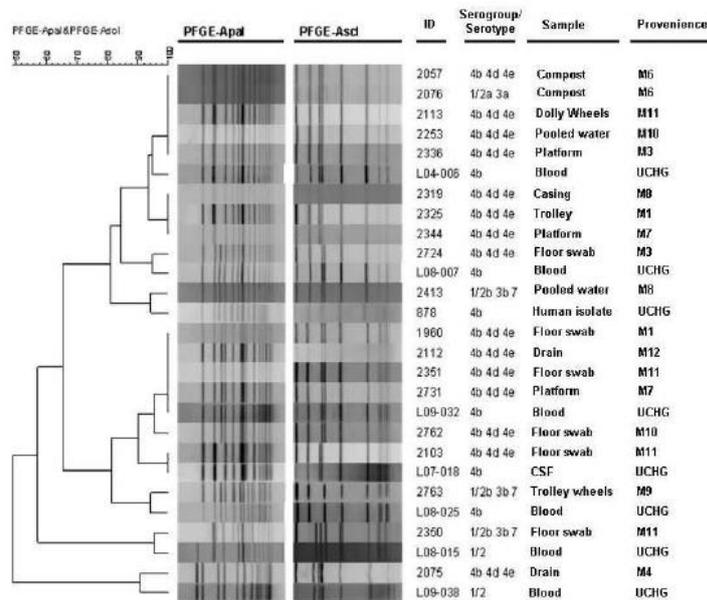


Figura 1. Representación de los serotipos de *L. monocytogenes* aislados desde muestras de *Agaricus bisporus* (Pennone *et al.*, 2018)

## 7. Ecología y Metabolismo

El primer aislamiento de este patógeno se produjo en Francia en 1921 a partir de una persona con meningitis, y a partir de entonces se ha aislado en una amplia gama de mamíferos y otros animales en todo el mundo. En 1960 ya se había sugerido una posible asociación entre la listeriosis en animales y la ingestión de alimento contaminado, pero no fue hasta 1980 cuando *L. monocytogenes* fue reconocida como un agente causante de brotes alimentarios en humanos. Desde entonces se ha asociado a una amplia gama de productos alimenticios, de entre los que destacan los quesos poco madurados (Walland *et al.*, 2015; McDougal and Sauer, 2018)

El medio ambiente proporciona un nicho ecológico para *L. monocytogenes*, que se asocia comúnmente con el suelo y vive como un saprófito sobre la vegetación en descomposición. Debido a esta amplia distribución de *L. monocytogenes* y su capacidad de crecer en el suelo vegetal, la contaminación de productos frescos durante el cultivo y el procesamiento posterior a la cosecha representa una amenaza para la salud humana y animal. Además, por su alta tolerancia al estrés térmico, el crecimiento de *L. monocytogenes* sobre las verduras puede aumentar aún más durante el almacenamiento, incluso a temperaturas de refrigeración. (Walland *et al.*, 2015)

Las infecciones se han asociado a diferentes tipos de alimentos, desde los crudos a los cocinados o procesados. Entre estos tipos de alimentos se incluyen productos lácteos, carne, pescado y vegetales. Esta especie puede sobrevivir y multiplicarse en numerosas condiciones que se aplican en la producción de alimentos, la conservación y el almacenamiento, ya que es relativamente resistente al ácido y altas concentraciones de sal, así como a la refrigeración, al agotamiento del hierro y a condiciones con poca cantidad de oxígeno. Esto implica que aún si solo está presente en niveles bajos, *L. monocytogenes* va a poder multiplicarse durante el almacenamiento del alimento. (Walland *et al.*, 2015)

En este sentido, la legislación vigente en la UE exige que *L. monocytogenes* debe de estar ausente en 25 gramos en aquellos alimentos en los que se pueda producir multiplicación de la bacteria, o no exceder de 100 UFC/g en alimentos en los que no se pueda producir multiplicación de la misma (Walland *et al.*, 2015).

En un estudio realizado en Colorado (EEUU) se tomaron muestras del suelo, agua, sedimento, suelo superficial y heces de animales silvestres durante la primavera, verano y otoño, para comprobar el crecimiento de esta bacteria. De todas las muestras, tres de ellas (dos fecales y una de agua) dieron positivo para *L. monocytogenes*. Otras 19 muestras (fecales, suelo, sedimento y suelo superficial) contenían otras especies de este género, en concreto, *L. welshimeri*, *L. grandensis* y *L. cornellensis*, determinadas gracias a la secuenciación del gen *sigB*. En este trabajo se determinó que la baja humedad, alta radiación solar y alta acidez del suelo en esta zona de Colorado son factores negativos para la multiplicación de este patógeno (Ahlstrom *et al.*, 2018).

En otras ocasiones, la proximidad a entornos urbanos y agrícolas aumenta la posibilidad de introducción de *L. monocytogenes* en instalaciones de procesamiento de alimentos debido a contaminación desde el suelo, el estiércol, la vegetación en descomposición o las masas de agua (Muhterem-Uyar *et al.*, 2018).

Dentro de la cadena de procesado de alimentos, distintos subtipos de *L. monocytogenes* son capaces de sobrevivir en equipos ineficazmente higienizados, adaptándose a varios factores de estrés como baja temperatura, presión osmótica, bajo pH y concentraciones subletales de biocidas (Muhterem-Uyar *et al.*, 2018).

Se requiere especial cuidado en la leche cruda, y por tanto en la fabricación de quesos con leche no pasteurizada, ya que los productos lácteos son vehículos comunes de listeriosis y de hecho el ganado lechero actúa como un reservorio para este patógeno (desde la leche y heces de vacas sanas). Otra fuente de contaminación importante para el ganado vacuno es el ensilado de baja calidad. Así, un estudio ha demostrado que en el entorno de procesamiento del queso (desagües, paredes, puertas y pisos) se encontró *L. monocytogenes* de forma permanente a lo largo de los 3 años de análisis. (Muhterem-Uyar *et al.*, 2018). En otro estudio realizado en 3 fincas lecheras finlandesas se estudiaron muestras de leche de tanque, de filtros y del ambiente del establo, observándose a lo largo de un año de análisis la presencia de la bacteria en todos estos ambientes. Las bacterias que se encuentran en la leche del tanque deben su presencia a la contaminación fecal o ambiental desde la superficie de la ubre, o a la presencia de biofilms en el equipo de ordeño. En este estudio de Finlandia se detectó un aumento del número de detecciones de este patógeno en las muestras de leche en tanque entre noviembre y abril en comparación con los casos de mayo a octubre, lo que implica que

el crecimiento de este patógeno es mayor a bajas temperaturas y que una buena higiene tanto en el ganado como en los equipos de ordeño reduciría los casos de listeriosis (Castro *et al.*, 2018)

## 8. Factores de virulencia

En *L. monocytogenes*, el primer gen virulento que se identificó fue el gen de la hemolisina (*hly*), que codifica la listeriolisina O (LLO). Cuando es fagocitada por los monocitos del huésped, la bacteria lisa la vacuola formada y escapa al citoplasma mediante la LLO, la fosfolipasa C específica de fosfatidilinositol (PlcA) y la específica de fosfatidilcolina (PlcB) (Naik, Bhangui and Bhat, 2017)

Otros factores de virulencia importantes en *L. monocytogenes* incluyen InlA, InlB, LLO y ActA. La investigación sobre el papel de estos factores de virulencia ha arrojado luz sobre cómo *L. monocytogenes* puede colonizar la placenta y llegar al feto (Lowe, D.E., Robbins, J.R. and Bakardjiev, A.I, 2018). En mamíferos como primates y ratones, *L. monocytogenes* puede ingresar dentro de las células infectadas de tres maneras diferentes: por fagocitosis, por endocitosis mediada y por diseminación de célula a célula.

La endocitosis mediada por receptor se produce a través de interacciones entre internalinas presentes en la membrana de la bacteria y los receptores de la célula hospedadora. Las internalinas más importantes son internalina A (InIA), que se une a la E-caderina celular y la internalina B (143 InIB), que se une al receptor de membrana tirosina quinasa c-Met. Una vez internalizada la bacteria, el factor de virulencia LLO forma poros en el fagosoma acidificante, permitiendo a *L. monocytogenes* salir al citoplasma de la célula hospedadora. La replicación ocurre en el citoplasma y las bacterias expresan entonces ActA para inducir motilidad basada en actina. Las bacterias móviles pueden así propagarse a las células vecinas sin exposición al entorno extracelular y reiniciar el ciclo de la infección. (Lowe, D.E., Robbins J.R and Bakardjiev A.I, 2018)

Además de poder cruzar la barrera hematoencefálica y la barrera materno-fetal, *L. monocytogenes* tiene la capacidad de invadir, sobrevivir y multiplicarse activamente dentro de los fagocitos y varias células no fagocíticas, pudiendo propagarse directamente de una célula a otra y evadir la inmunidad innata (Rolhion and Cossart, 2017)

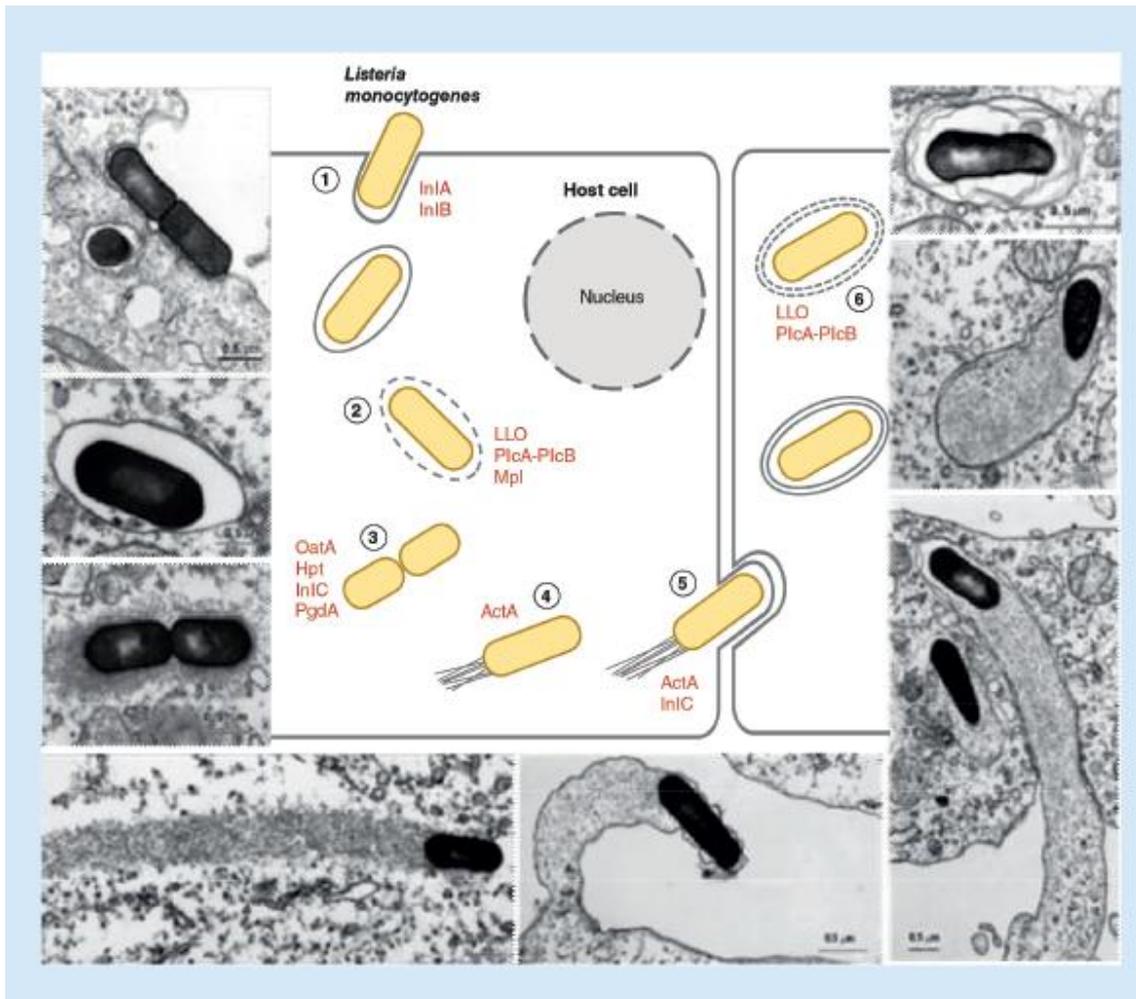


Figura 2. Ciclo de vida de *L. monocytogenes*. (Rolhion and Cossart, 2017)

En la figura 2, se puede observar el ciclo de vida intracelular de *L. monocytogenes*. La entrada de bacterias está mediada por las interacciones de internalinas InlA e InlB con sus respectivos receptores, E-cadherina y Met expresados en la superficie de la célula huésped. Las bacterias escapan entonces de la vacuola a través de la acción de factores secretados, la toxina formadora de poros LLO, dos fosfolipasas (PlcA y PlcB) y la metaloproteasa Mpl. Las bacterias se multiplican en el citosol con ayuda de varios factores, como la internalina InlC, el sistema de captación de azúcar Hpt, la N-desacetilasa de peptidoglicano PgdA y la O-acetiltransferasa de pared OatA, que favorecen el crecimiento intracelular y la evasión del sistema inmune. Además, dentro del citoplasma, la proteína bacteriana superficial ActA induce la polimerización de actina a través del reclutamiento del complejo Arp2/3, lo que origina Filamentos de actina polimerizados, llamados colas de cometa actina. La interacción de InlC con la proteína de unión a la actina TubA permite entonces la propagación de la bacteria de célula a célula. Durante el ciclo intracelular, LLO, PlcA y PlcB permiten la ruptura de

la vacuola de dos membranas que ha rodeado a la bacteria desde su fagocitosis (Rolhion and Cossart, 2017).

Para colonizar a sus huéspedes con éxito, los patógenos como *L. monocytogenes* deben regular apropiadamente la expresión genética de los factores de virulencia. La expresión coordinada de estos genes de virulencia en *L. monocytogenes* está regulada por PrfA, un factor de transcripción del CRP (receptor de la proteína AMPc). PrfA regula directamente la transcripción de los principales factores de virulencia, incluida las proteínas de superficie (internalinas InlA e InlB), la proteína secretada IniC, la toxina listerolisina O (encargada de la formación de poros), y las fosfolipasas PlcA y PlcB. El glutatión, que se encuentra abundantemente en el citoplasma de la célula hospedadora, induce un cambio alostérico en la estructura de esta proteína reguladora PrfA y se activa así la expresión de los factores de virulencia de *L. monocytogenes* (Rolhion and Cossart, 2017).

Además, estos genes de virulencia están termorregulados, ya que a baja temperatura, PrfA es indetectable, aunque su mRNA sí está presente en la bacteria. El ARN termosensor de PrfA fue el primer termosensor de ARN descubierto que regula la virulencia. Su extremo 5' forma una estructura secundaria que oculta el rbs e impide por tanto la traducción de este mRNA a temperaturas inferiores a 37 °C (Rolhion and Cossart, 2017).

## 9. Mecanismos de transmisión

*Listeria monocytogenes* es un patógeno intracelular que, debido a su capacidad para sobrevivir tanto en condiciones de refrigeración como de alta salinidad, sobrevive perfectamente en la cadena alimenticia y puede causar infección. Después de la ingestión, *L. monocytogenes* invade las células epiteliales intestinales, accediendo al sistema linfático y al torrente sanguíneo, dando como resultado la diseminación al hígado, bazo, sistema nervioso central, y en mujeres embarazadas, a la placenta. La combinación de la listeriolisina O (LLO) y ActA da como resultado un ciclo de vida casi exclusivamente intracelular durante la infección, evitando así las defensas del huésped extracelular. (Lowe, D.E., Robbins J.R and Bakardjiev A.I, 2018)

Los alimentos frecuentemente contaminados por *Listeria* son los que se muestran en la tabla 2.

<b>Alimentos contaminados por <i>Listeria monocytogenes</i></b>
Carnes frías y calientes listas para el consumo
Patés refrigerados o productos cárnicos para untar
Leche no pasteurizada (cruda) y productos lácteos
Frutas y vegetales crudos
Queso blanco fabricado con leche no pasteurizada: queso fresco, Feta, Brie, Camembert
Marisco ahumado refrigerado
Brotos crudos

Tabla 2. Alimentos frecuentemente contaminados por *L. monocytogenes* (Lowe, D.E., Robbins J.R and Bakardjiev A.I, 2018)

La listeriosis afecta a ancianos, personas inmunocomprometidas, niños y a mujeres embarazadas. Las infecciones durante el embarazo pueden provocar infecciones de la placenta diseminadas a los fetos y causar complicaciones graves del embarazo, incluido el aborto espontáneo, parto prematuro, muerte fetal intrauterina, sepsis neonatal y muerte, o secuelas neurológicas en los supervivientes (Lowe, D.E., Robbins J.R and Bakardjiev A.I, 2018)

Desde el punto de vista filogenético, *L. monocytogenes* se ha dividido en cuatro linajes evolutivos: I, II, III y IV. El linaje I es más frecuente entre los aislamientos clínicos

humanos, pero es raro en los alimentos procesados, donde el linaje II es más frecuente. Los linajes III y IV son raros y asociados con animales. Varios estudios sugieren que el linaje II es prevalente en las instalaciones de procesamiento de alimentos porque tiene una mayor capacidad para formar biofilms (Valderrama, Ostiguy and Cutter, 2014).

La formación de biofilms por *L. monocytogenes* es una gran preocupación en la industria alimentaria porque genera riesgos recurrentes de contaminación de alimentos listos para el consumo, ya que aumenta la resistencia a los tratamientos de desinfección durante los procedimientos de saneamiento. Además, en presencia de e-ADN asociado a muerte celular se mejora el desarrollo de los biofilms y se estabiliza la estructura del mismo.

Además de ser un patógeno humano y animal importante, *L. monocytogenes* también se está desarrollando como un nuevo tratamiento experimental en el contexto de la inmunidad tumoral. Debido a su ciclo de vida intracelular, la infección por *L. monocytogenes* desencadena una respuesta de células T CD8+(McDougal and Sauer, 2018).

Otro aspecto importante es la resistencia de *L. monocytogenes* a los biocidas (antisépticos, desinfectantes y conservantes) que se usan regularmente a nivel doméstico y en la industria alimentaria con el objetivo de prevenir la contaminación bacteriana durante el procesamiento de los alimentos. Esta resistencia a los biocidas (sales de amonio cuaternario, hipoclorito sódico, ácido peracético, etc.) puede estar mediada por mecanismos adquiridos o intrínsecos: permeabilidad de la membrana, bombas de transporte, formación de biofilms y transformación química de compuestos tóxicos.(Conficoni *et al.*, 2016).

## 10. Cuadro clínico

La listeriosis es una infección alimentaria poco común, pero que en mujeres embarazadas puede ser extremadamente grave para el feto y el recién nacido. En Estados Unidos, *L. monocytogenes* es la tercera causa de muerte por intoxicación alimentaria. Se suele utilizar en estos casos una prueba serológica para detectar la presencia de anticuerpos de listeriolisina O en sangre (Pucci, Massacesi and Liuzzi, 2018). Además, su alta tasa de mortalidad (20-30%), su gravedad (meningitis, septicemia y aborto) y su período de incubación, que varía desde pocas horas hasta 67 días, hacen difícil en ocasiones su diagnóstico y tratamiento (Pucci, Massacesi and Liuzzi, 2018). En estudios en primates se ha visto que la inmunidad materna es capaz de proteger a la madre de infecciones, pero no al feto (Pucci, Massacesi and Liuzzi, 2018).

Como se muestra en la Figura 3, *Listeria monocytogenes* infecta a los humanos después de la ingestión de alimentos contaminados, atraviesa la barrera intestinal y va al torrente sanguíneo a través de los ganglios linfáticos, para diseminarse a los tejidos diana, como son el hígado y el bazo. En individuos inmunocomprometidos, *L. monocytogenes* puede atravesar la barrera hematoencefálica o la barrera feto placentaria, causando meningitis, a menudo mortal, sepsis, nacimiento prematuro o aborto. (Radoshevich and Cossart, 2018)

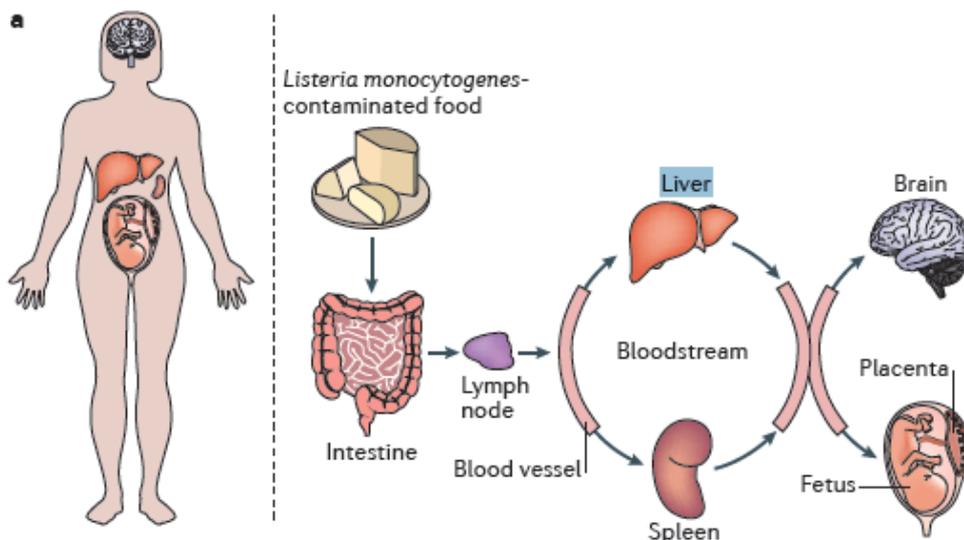


Figura 3. Vías de transmisión de *Listeria monocytogenes* (Radoshevich and Cossart, 2018)

Por lo general, la listeriosis es asintomática en individuos sanos o causa síntomas leves como fiebre, dolor de cabeza, mialgia y diarrea. Esta forma no invasiva es auto-limitante y generalmente no requiere tratamiento. Pero en personas con inmunidad debilitada (pacientes oncológicos, trasplantados, ancianos y embarazadas), la infección puede volverse invasiva y causar meningoencefalitis, sepsis, o incluso la muerte. (Pucci, Massacesi and Liuzzi, 2018)

En las mujeres embarazadas, la infección puede causar una variedad de síntomas, desde un leve resfriado a síntomas más graves. De hecho, la bacteria se puede diseminar al feto y puede causar complicaciones severas como son amnionitis, partos prematuros, abortos espontáneos, muerte fetal o infección del neonato. *L. monocytogenes* puede crecer en la placenta y es capaz de escapar de los mecanismos de defensa habituales. La listeriosis neonatal a menudo es más grave que la enfermedad materna, que muestra una tasa de mortalidad que oscila entre el 20% y el 60%. *L. monocytogenes* puede transferirse a través de la ruta feto placentaria o puede adquirirse desde el tracto vaginal durante el parto, y en general puede ocurrir en cualquiera de las etapas de la gestación. (Pucci, Massacesi and Liuzzi, 2018)

Estas infecciones por *L. monocytogenes* en mujeres embarazadas se pueden diagnosticar mediante cultivos de sangre materna o neonatal, líquido cefalorraquídeo, líquido amniótico, de la cavidad uterina o de la placenta. Los cultivos vaginales y de material fecal no son útiles para el diagnóstico, debido a la existencia de portadoras asintomáticas. Y en el caso de las pruebas serológicas, aunque no son útiles para diagnosticar una infección aguda, podrían seguir siendo útiles para detectar la forma no invasiva de la infección (enfermedad asintomática, gastroenteritis) durante un brote. Finalmente, el diagnóstico de infección por listeriosis materna, puede verse obstaculizado por la falta de síntomas gastrointestinales, siendo necesario realizar una historia clínica completa, considerando otros síntomas clínicos (Pucci, Massacesi and Liuzzi, 2018).

En un estudio prospectivo sobre la listeriosis invasiva, entre 107 casos confirmados de infección materno-neonatal, el 83% mostró efectos adversos (muerte fetal). De todos estos casos, 101 cursaron con fiebre y signos obstétricos tales como contracciones, parto, frecuencia cardíaca fetal anormal (62 casos) o pérdida fetal (21 casos). Solo un 5% de los casos tuvo un parto y una evolución postparto normal. Entre estas 107

madres, el 24% tuvieron pérdida fetal, el 45% tuvieron partos prematuros y el 21% tuvieron partos con complicaciones y entre los 82 neonatos que nacieron, solo el 12% tuvo una evaluación física normal, sin signos de infección y no necesitaron terapia antimicrobiana (Pucci, Massacesi and Liuzzi, 2018).

## 11. Epidemiología

Las medidas de control de este patógeno que comenzaron en la década de 1990 han reducido en gran medida la prevalencia de *L. monocytogenes* en muchas categorías de alimentos, particularmente en productos cárnicos. Por el contrario, los brotes de listeriosis de productos lácteos no han mostrado disminución. Sin embargo, esta enfermedad sigue ocurriendo, aunque normalmente en pequeños brotes. La incidencia de la listeriosis es baja en la población general a pesar de la amplia distribución del organismo en el medio ambiente y de la alta frecuencia de aislamiento desde los alimentos. Además, se han reconocido brotes recientes asociados a tipos de comida que no eran asociados tradicionalmente con esta bacteria, como el apio (5 muertes en un brote asociado a una máquina cortadora en Texas, en ancianos de un hospital), melón (33 muertes, 1 aborto y 147 afectados en un brote de 2011 en EEUU), brotes de soja (2 muertes en un brote de 2014 en EEUU), frutas con hueso, manzanas caramelizadas (7 muertes y 35 afectados en un brote de EEUU en 2014) y helados (2 muertes en un brote de 2014 en EEUU). (Buchanan *et al.*, 2017).

La Unión Europea (UE) ha sufrido también un aumento de los brotes esporádicos de listeriosis. La Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA) informó de 1.763 casos en 2013, con una tasa de 0.44 casos por 100000 habitantes y un aumento del 8.6% en comparación con 2012. En promedio, el 99.1% de los casos fueron hospitalizados, el mayor de todas las zoonosis en vigilancia de la UE. La tasa de letalidad en la UE fue del 15.6%. Y los tipos de comida contaminados fueron crustáceos, moluscos, queso, productos cárnicos y verduras. (Buchanan *et al.*, 2017). En 2017, hubo 270 muertes por esta bacteria en la UE, (Ricci *et al.*, 2018).

Year	Confirmed cases	Notification rate per 100,000 population	Cases with outcome data (% of confirmed cases)	Deaths	CFR (%; 95% CI) <sup>(i)</sup>
2008 <sup>(a)</sup>	1,381	0.30	653 (47.3%)	134	20.5% (17–24)
2009 <sup>(b)</sup>	1,645	0.36	757 (46.0%)	126	16.6% (14–19)
2010 <sup>(c)</sup>	1,601	0.35	1,063 (66.3%)	181	17.0% (15–19)
2011 <sup>(d)</sup>	1,476	0.32	1,054 (71.4%)	134	12.7% (11–15)
2012 <sup>(e)</sup>	1,642	0.41	1,112 (67.7%)	198	17.8% (16–20)
2013 <sup>(f)</sup>	1,763	0.44	1,228 (69.7%)	191	15.6% (14–18)
2014 <sup>(g)</sup>	2,161	0.52	1,401 (64.8%)	210	15.0% (13–17)
2015 <sup>(h)</sup>	2,206	0.46	1,524 (69.1%)	270	17.7% (16–20)

Tabla 3. Casos de listeriosis por año en la UE (Ricci *et al.*, 2018)

Las tasas de notificación más altas se observan con frecuencia en los mayores de 65 años y en los niños menores de un año. La tasa de hombres afectados fue el doble que para las mujeres, en el grupo de edad de entre 65 y 74 años, en 2015. En este rango de edad, la tasa de hombres afectados fue 140 veces mayor que para hombres de entre 5-14 años.

Age group (years)	Males (N = 4,753)		Females (N = 3,837)	
	Mean CFR (%)	95% CI	Mean CFR (%)	95% CI
< 1	12.7	[8.5–16.9]	11.6	[8.0–15.2]
1–20	7.6	[1.8–13.5]	5.4	[1.2–9.7]
21–44	12.6	[9.4–15.7]	3.4	[1.7–5.1]
45–64	17.7	[15.4–20.1]	16.1	[13.3–18.8]
65–74	16.0	[13.5–18.5]	19.3	[16.3–22.4]
≥ 75	20.3	[18.3–22.4]	22.5	[20.0–25.0]

Tabla 4. Tasas de letalidad según el rango de edad(Ricci *et al.*, 2018)

En el caso de mujeres embarazadas, los estudios de la EFSA muestran que entre 2009 y 2015, la proporción de casos fue de un 44% en grupos de mujeres de entre 15 y 44 años. Los casos asociados con el embarazo representaron el 56% de mujeres de este rango de edad. En el grupo de edad de 15-24 años, las proporciones de casos asociados con el embarazo fueron superiores al 50% (tabla 5).

Year	Age group (years)		
	< 1	15–24	25–44
	Number of cases (% pregnancy-associated)	Number of females (% pregnancy-associated)	Number of females (% pregnancy-associated)
2009	27 (40.7)	22 (54.5)	71 (45.1)
2010	70 (90.0)	10 (20.0)	49 (53.1)
2011	33 (87.9)	15 (66.7)	69 (68.1)
2012	29 (72.4)	16 (62.5)	69 (65.2)
2013	32 (84.4)	12 (58.3)	71 (73.2)
2014	43 (81.4)	16 (87.5)	87 (69.0)
2015	21 (76.2)	23 (78.3)	73 (74.0)
<b>Total</b>	<b>255 (79.2)</b>	<b>114 (64.0)</b>	<b>489 (64.6)</b>

Tabla 5. Casos de listeriosis en recién nacidos y en mujeres embarazadas (Ricci *et al.*, 2018)

## 12. Métodos de detección

En general, la enumeración y el aislamiento de patógenos transmitidos por los alimentos se realiza utilizando técnicas microbiológicas convencionales que se basan en métodos de cultivo estándar. Estos métodos son sensibles, de bajo coste, y permiten la evaluación cualitativa y cuantitativa de microorganismos, pero requieren varios días para aislar y enumerar los patógenos transmitidos por los alimentos. Los avances en la tecnología han permitido el desarrollo de métodos rápidos para análisis microbiano de alimentos. Estos incluyen kits bioquímicos, anticuerpos y métodos basados en ácidos nucleicos. A pesar de que los métodos de detección rápida puedan dar un resultado positivo para un patógeno transmitido para los alimentos, deben ser reconfirmados por métodos de cultivo estándar (Conficoni *et al.*, 2016)(Valderrama *et al.*, 2016).

Estos métodos de detección rápida se pueden dividir en tres categorías: técnicas inmunológicas, técnicas moleculares y biosensores. La mayoría de los métodos rápidos pueden analizar una muestra en unos pocos minutos o en pocas horas, pero aún carecen de suficiente sensibilidad y especificidad para las pruebas directas de los alimentos, de modo que la muestra todavía necesita ser enriquecida en cultivo antes del análisis. La sensibilidad es la probabilidad de que la prueba detecte un verdadero positivo, mientras que la especificidad es la probabilidad de que la prueba detecte un verdadero negativo. Su aceptación por parte de la industria depende no solo de la velocidad, sino también de la inversión inicial, del coste, del servicio técnico y de la facilidad de uso, entre otras consideraciones (Valderrama *et al.*, 2016).

### 12.1. Baterías bioquímicas

Entre las más importantes se encuentra el sistema Api *Listeria* (BioMerieux), que consta de las siguientes 10 pruebas: diferenciación entre *L. innocua* y *L. monocytogenes* basadas en la presencia o la ausencia de arilamidasa (Prueba DIM), hidrólisis de esculina, presencia de manosidasa, de enzimas para la utilización de ácido D-arabitol, D-xilosa, L-ramnosa, a-metil-D-glucósido, D-ribosa, glucosa-1-fosfato y D-tagatosa.. (Bille *et al.*, 1992). Estos kits se basan en las propiedades enzimáticas que contiene el microorganismo y su actuación sobre sustratos deshidratados, lo que produce un cambio de color en cada caso. Se basa en rellenar con la muestra objeto de estudio cada pocillo del kit, sellarlo e incubarlo durante 18-24 h a 37°C. Según la coloración que haya adoptado el pocillo, será resultado positivo o negativo (algunos pocillos requieren

añadir un reactivo para visualizar el color). En la hoja de resultados, los test están separados en grupos de 3 y se asigna para cada uno un valor 1, 2 ó 4. Para ello, las pruebas de la galería se separan en grupos de tres y se da a cada reacción positiva un valor igual a 1, 2 ó 4 dependiendo de la posición de la prueba en su grupo, 1<sup>a</sup>, 2<sup>a</sup>, 3<sup>a</sup> respectivamente. La suma de los 3 valores obtenidos (0 para reacciones negativas) dan una cifra entre 0 y 7 para cada grupo. Sumando en el inferior de cada grupo los números que corresponden a reacciones positivas, se obtiene 4 cifras que constituye el perfil numérico. Por medio del software de identificación Apiweb™, se introduce manualmente por teclado el perfil numérico de 4 cifras y al validar, te identifica, en porcentaje, la especie de *Listeria* de la muestra (tabla 6) (Insitudo de Salud Pública de Chile, 2009).



Figura 4. Apti *Listeria* negativo (Insitudo de Salud Pública de Chile, 2009).



Figura 5. Apti *Listeria* positivo (Insitudo de Salud Pública de Chile, 2009).

Cepa	DIM	ESC	$\alpha$ MAN	DARL	XYL	RHA	MDG	RIB	G1P	TAG
<i>L. innocua</i>	+	+	+	+	-	+	+	-	-	-
<i>L. ivanovii</i>	+	+	-	+	+	-	V	-	+*	-
<i>L. monocytogenes</i>	-	+	+	+	-	+	+	-	-	-

Tabla 6. Tipificación de *Listeria* según batería API (Insituto de Salud Pública de Chile, 2009).

### 12.2. Métodos de enriquecimiento por cultivo

Hay varios medios selectivos de enriquecimiento y recubrimiento que han sido desarrollados y utilizados para el aislamiento y detección de *Listeria monocytogenes* en muestras ambientales y de alimentos. Estos métodos de aislamiento deben de ser capaces de detectar un microorganismo en 25 gramos de muestra. Para lograr esta sensibilidad, hay un paso inicial de enriquecimiento para permitir que el microorganismo crezca y alcance un nivel detectable de  $\sim 10^4$ - $10^5$  UFC/mL antes de pasar la muestra al medio selectivo de cultivo.

Varios compuestos antimicrobianos se emplean en el paso de enriquecimiento para suprimir la microbiota competitiva, ya que las células de *Listeria* son de crecimiento lento y pueden ser rápidamente superadas por otros microorganismos competidores. Los agentes selectivos más usados son acrilflavina, ácido nalídixico y cicloheximida. La función de la acrilflavina es inhibir el crecimiento de otras bacterias Gram+, y se usa a menudo en combinación de otros agentes selectivos. El ácido nalídixico se usa para la inhibición de las bacterias Gram-, mientras que la cicloheximidimida se usa para la inhibición de hongos.

Además, hay otros antimicrobianos que generalmente se agregan a estos medios, como la ceftazidima (una cefalosporina de amplio espectro) y la moxalactama, así como el cloruro de litio. Además, la esculina es un glúcido que se incorpora frecuentemente en el enriquecimiento de *Listeria*, ya que todas las especies de *Listeria* son capaces de producir su hidrólisis y esto da como resultado la formación de un color negro en los medios. Por lo tanto, los cultivos que producen un intenso color negro en presencia de esculina indican la presencia de *Listeria* (Law *et al.*, 2015).

Las agencias reguladoras han recomendado medios de enriquecimiento de *L. monocytogenes* tales como el caldo de enriquecimiento de *Listeria* tamponado (BLEB), caldo Fraser, caldo de enriquecimiento selectivo para *Listeria* modificado (UVM), medio bacteriológico y analítico (BAM) (Law *et al.*, 2015).

Los medios más usados para el aislamiento de *Listeria* sp. son PALCAM (polimixina, acriflavina, cloruro de litio, ceftazidima, manitol y esculina) y Oxford. Estos dos tipos son útiles para el aislamiento de esta bacteria en muestras poco viables o ricas en microbiota competitiva (Law *et al.*, 2015).

El agar PALCAM se incuba generalmente durante 24-48 h a 37 °C. La presencia de este patógeno se observa con un ennegrecimiento del medio (debido al uso de la esculina) y colonias de 2 mm de diámetro con color gris verdoso y un centro negro hundido, con halo negro. Ocasionalmente pueden crecer *Enterococcus* sp o *Staphylococcus* sp. en el agar PALCAM, pero se pueden distinguir por la fermentación de manitol, que genera colonias grises o roja-amarillentas debido a la producción de ácidos tras la fermentación de manitol por estos otros géneros (Law *et al.*, 2015).

El agar Oxford se incuba a 37 °C durante 24-48 h. Después de 24 h de incubación, las colonias de *L. monocytogenes* son de color verde oliva con un halo negro. Después de 48 h, las colonias tienen unos 2-3 mm de diámetro, el color se oscurece con un centro negro hundido y rodeado de zonas negras. (Law *et al.*, 2015).

La principal limitación de PALCAM y Oxford es la incapacidad para distinguir *L. monocytogenes* y *Listeria* sp. no patógenas. Esto ha llevado a desarrollar medios cromogénicos que sí son capaces de diferenciarlas, como ALOA (Agar *Listeria* según Ottaviani y Agosti) y CHROMagar™ *Listeria* s (Law *et al.*, 2015).

La selectividad del ALOA se logra mediante la adición de cloruro de litio y antimicrobianos como la ceftazidima, polimixina B, ácido nalidíxico y cicloheximida, además de un sustrato cromogénico (5-bromo-4-cloro-3-indolyl- $\beta$ -D-glucopiranosida) para la detección de la actividad  $\beta$ -D-glucosidasa, común a todas las *Listeria* sp. La diferenciación de *L. monocytogenes* de otras *Listeria* sp. se basa en la producción de fosfatidilinositol por la fosfolipasa C codificada por el gen *plcA* presente sólo en *L. monocytogenes*. Esta enzima genera ácidos grasos insolubles en agua y la formación de un halo opaco alrededor de las colonias de *L. monocytogenes*. En ALOA, todas las

*Listeria sp* producen colonias de color azul verdoso, *L. monocytogenes* produce colonias azul verdosas con un halo opaco (Law *et al.*, 2015).

En el CHROMagar™ *Listeria* las colonias del patógeno son azules con un halo blanco (Law *et al.*, 2015).

### 12.3. Técnicas inmunológicas

Estos métodos se basan en la unión específica de un anticuerpo a un antígeno. (inmunoensayo) Hay un uso bastante amplio en la industria alimentaria de esta tecnología debido a su alta sensibilidad, automatización y alta especificidad. Estas técnicas incluyen varios tipos de ensayos que se describen a continuación.

El método de aglutinación en látex es el más común y emplea partículas de látex recubiertas de anticuerpos. Esta prueba se realiza manualmente y los resultados se determinan por simple observación. Aquí, una colonia aislada del patógeno a analizar se mezcla con estas perlas de látex cubiertas con anticuerpos. La aglutinación visible de las perlas de látex indicará la presencia del antígeno en pocos minutos. Si el antígeno está ausente, la aglutinación no ocurrirá y, por lo tanto, no se observará precipitado (Valderrama *et al.*, 2016).

En la prueba de aglutinación de látex pasiva inversa (RPLA), se determina la producción de toxinas por un cultivo bacteriano. Si el antígeno está ausente, el resultado es revelado como un punto compacto formado en la parte inferior de la placa, como se muestra en la figura 6. La prueba utiliza partículas de látex recubiertas con antisuero de conejo, que reacciona con el antígeno objeto de estudio. Si el antígeno está presente, las partículas de látex se aglutinan formando una estructura dispersa por todo el pocillo de microtiter (Valderrama *et al.*, 2016)

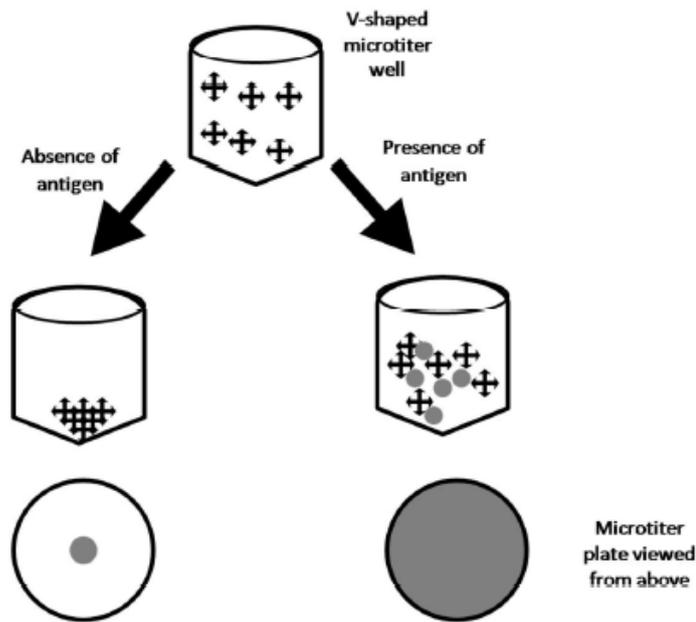


Figura 6. Diagrama de aglutinación de látex pasiva inversa. (Valderrama *et al.*, 2016)

El inmunoensayo ligado a enzimas (ELISA) utiliza un anticuerpo unido a una matriz sólida (como el fondo de un pocillo de microtiter) que captura el antígeno desde un cultivo enriquecido. Una vez el antígeno se inmoviliza, se agrega un anticuerpo conjugado con enzima, formando un complejo con el antígeno. Este paso es seguido por la adición de un compuesto cromogénico o fluorescente, o por un sustrato para una enzima (figura 7) (Valderrama *et al.*, 2016).

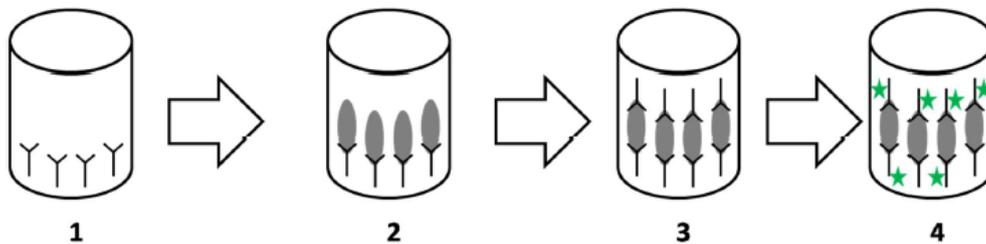


Figura 7. Técnica ELISA. (Valderrama *et al.*, 2016).

En la figura 7 se puede observar cómo los anticuerpos específicos para el patógeno se fijan en la superficie de los pocillos de plástico, luego los anticuerpos capturan los antígenos del patógeno si están presentes, y todo el material no unido en la muestra se elimina. Finalmente se agregan anticuerpos conjugados con enzimas específicas,

completando el sándwich. Al añadir un sustrato colorimétrico o fluorescente específico para la enzima utilizada se puede finalmente cuantificar la cantidad de bacterias presentes en la muestra inicial (Valderrama *et al.*, 2016). (Jadhav, Bhavne and Palombo, 2012).

En el ensayo de flujo lateral (LFA), la muestra bacteriana líquida ya enriquecida se deposita en la almohadilla del reactivo y migra a través de ella por capilaridad, encontrando los anticuerpos conjugados específicos (que llevan unidas partículas coloreadas) en su camino. Estos anticuerpos son inmovilizados por otros anticuerpos fijados en la almohadilla, en la zona de captura. Existe también una zona de control, que contiene anticuerpos específicos para los anticuerpos conjugados. Si el antígeno específico está presente, dos líneas se forman tras estas migraciones por capilaridad, como se muestra en la figura 8. Uno de los problemas asociados con los LFA son los falsos positivos, debido a las interferencias con la matriz alimentaria original de donde se ha obtenido la muestra (Valderrama *et al.*, 2016).

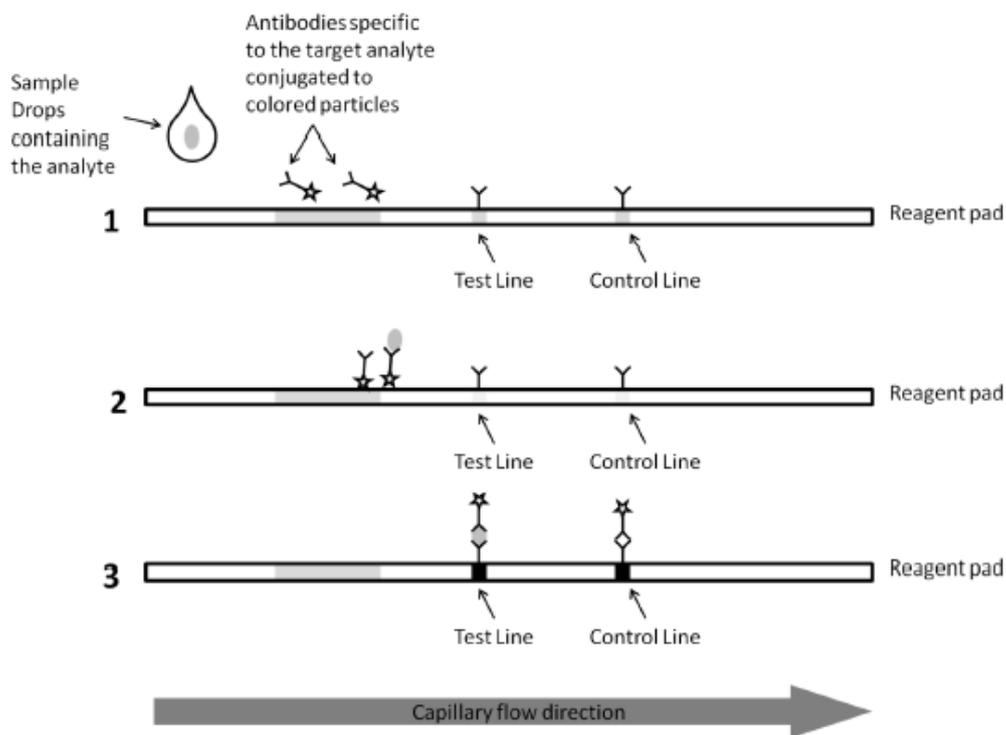


Figura 8. Ensayo de flujo lateral 1) la muestra se deposita en la almohadilla de reactivo. 2) Migración a través de la almohadilla de reactivo y unión a anticuerpos conjugados. 3) Dos líneas visibles (analito y control) representan un resultado positivo (Valderrama *et al.*, 2016).

El ensayo VIDAS® LM02 (BioMérieux) se basa en fluorescencia ligada a enzimas, y es específico para *L. monocytogenes* en muestras de alimentos. Esta técnica ELISA necesita aproximadamente 70 min para obtener el resultado tras pre-enriquecimiento (Jadhav, Bhave and Palombo, 2012).

En la siguiente tabla 7, se pueden observar las ventajas y los inconvenientes de los métodos más utilizados para la detección de *L. monocytogenes*.

MÉTODOS DE DETECCIÓN	VENTAJAS	INCONVENIENTES
<b>Cultivo microbiológico</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Solo sirve para células viables</li> <li>- Se detectan presuntas colonias que deben de ser confirmadas por técnicas moleculares.</li> <li>- La disponibilidad de medios cromogénicos hace la detección más fácil.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Es una técnica relativamente lenta. Requiere de 5 a 10 días para confirmar una muestra positiva.</li> <li>- Las células lesionadas o estresadas pueden no ser detectadas.</li> <li>- La bacteria no objeto estrechamente relacionada puede enmascarar la presencia de la bacteria objeto en el proceso de enriquecimiento.</li> </ul>
<b>Técnicas inmunológicas</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Técnica más rápida en comparación con el cultivo microbiológico.</li> <li>- Puede usarse para dirigir directamente las proteínas de virulencia/ toxinas en alimentos complejos y muestras ambientales.</li> <li>- Los caldos de</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- La dependencia de los antígenos hace que sea una técnica menos confiable en comparación con métodos genéticos de detección.</li> <li>- Puede producirse reacción cruzada si se comparten antígenos entre especies estrechamente</li> </ul>

	<p>enriquecimiento también se pueden usar para la detección de antígenos diana.</p> <p>- Las muestras presuntivas necesitan confirmación adicional.</p>	<p>relacionadas, que conducen a falsos positivos.</p> <p>- Se basa en la disponibilidad de anticuerpos específicos.</p>
--	---	---

Tabla 7. Ventajas e inconvenientes de los métodos de detección (Jadhav, Bhavne and Palombo, 2012).

#### 12.4. Técnicas moleculares

Las técnicas de PCR proporcionan una mayor sensibilidad, permiten tiempos de procesamiento más rápidos y aumentan la probabilidad de detectar patógenos bacterianos (Valderrama *et al.*, 2016).

La PCR cuantitativa (qPCR) permite detección y cuantificación simultáneas de una secuencia específica de ADN mediante moléculas fluorescentes que permiten visualizar la amplificación en tiempo real (Valderrama *et al.*, 2016).

En la tabla 8 se muestran algunos de los métodos moleculares de detección de *L. monocytogenes*. Se puede comprobar que el principal problema para la detección es la etapa necesaria de pre-enriquecimiento, que ralentiza el proceso. El kit iQCheck, validado por AFNOR (Asociación Francesa de Normalización), ha conseguido reducir el paso de pre-enriquecimiento a 18 h, eliminando un día de análisis al combinarlo con kits de análisis por qPCR (Radhakrishnan and Poltronieri, 2017).

Método	Compañía	Alimentos	Tiempo de enriquecimiento (h)	Tiempo de detección (h)	Tiempo total (h)	Nivel de detección
<b>Métodos inmunológicos</b>						
Reveal® para <i>L. monocytogenes</i>	Neogen	-	30-48	2	32-50	1-5 UFC /25 gr

Método	Compañía	Alimentos	Tiempo de enriquecimiento (h)	Tiempo de detección (h)	Tiempo total (h)	Nivel de detección
<b>Métodos basados en ácidos nucleicos</b>						
BAX® System <i>L. monocytogenes</i> 24E	DuPont	Lácteos, carne, pescado, vegetales, ambiente	24-48	3.5	27.5-31.5	10 <sup>4</sup> UFC/mL
GeneQuence	Neogen	jamón, carne de vacuno, perritos calientes, carne de cruda carne de cerdo, salmón	42-46	1.9	43.9-47.9	-
BAX® System <i>L. monocytogenes</i>	DuPont	Variedad de alimentos	48	3.5	51.5	10 <sup>5</sup> UFC/mL
TRANSIA™ PLATE <i>L. monocytogenes</i>	BioControl 1	Lácteos, carne, marisco, vegetales	-	-	46	-

Tabla 8. Métodos comerciales de detección de *L. monocytogenes* (Valderrama *et al.*, 2016).

Otras técnicas moleculares para la detección de *L. monocytogenes* son la detección de polimorfismos monocatenarios en productos de PCR y la técnica de amplificación isotérmica mediada por bucle (LAMP) (Jadhav, Bhave and Palombo, 2012).

La detección de polimorfismos monocatenarios en productos de PCR se basa en que las diferencias en la secuencia de nucleótidos de un producto de PCR provocará un cambio en la conformación de los productos monocatenarios generados, que puede detectarse mediante electroforesis en gel con gradiente de desnaturalización (DGGE), usando urea como agente desnaturalizante (Jadhav, Bhave and Palombo, 2012).

La técnica LAMP es un método de amplificación de ADN que, a diferencia de la PCR, ofrece una amplificación isotérmica autocíclica del ADN diana por medio de la *Bst* ADN-polimerasa de *Bacillus stearothermophilus*. La técnica LAMP tiene una sensibilidad 100 veces mayor que en comparación con el ensayo de PCR (Jadhav, Bhave and Palombo, 2012) (Jadhav, Bhave and Palombo, 2012)

#### 12.5. Biosensores

Un biosensor es un dispositivo analítico que permite la detección de patógenos o toxinas a través de un método electroquímico, acústico, térmico u óptico. Las ventajas de los biosensores, en comparación con otros métodos, son una mayor sensibilidad para toxinas y bacterias. Hasta la fecha, el único biosensor disponible comercializado es el Rapid B® de la compañía Vivione-Biosciences y es capaz de detectar *Salmonella* y *E. coli* O157: H7 (Valderrama *et al.*, 2016)

En el sistema de enfoque óptico basado en la resonancia de plasmón superficial (SPR), se utiliza la onda evanescente producida por un rayo de luz monocromático incidente. El haz de luz interactúa con electrones libres (plasmones) en una película metálica. La presencia del antígeno a detectar se registra a través de la detección de un cambio en la luz reflejada. El método SPR se ha aplicado extensamente a la detección de patógenos, como suspensiones celulares de *L. monocytogenes* a una concentración de 3-4 log UFC /mL pero con baja sensibilidad analítica.

Los biosensores eléctricos (EIS) miden los cambios de voltaje después de la unión de los antígenos, en este caso de *L. monocytogenes*. La medida se obtiene mediante la aplicación de una frecuencia determinada que permite la evaluación de la corriente producida. . Con estos métodos EIS se ha conseguido la detección de *L. monocytogenes*

con límites de detección tan bajos como 1 log UFC/ml (Radhakrishnan and Poltronieri, 2017).

### 12.6. Métodos convencionales de tipificación

Dado que existen numerosas cepas de *L. monocytogenes*, es necesario un buen sistema de subtipificación para el control de los brotes y el seguimiento del origen de la contaminación.

Entre los tipos de métodos de tipificación se encuentra el serotipado, que se basa en la aglutinación de los antígenos somáticos (O) y flagelares (H) por antisueros mono y polivalentes. La serotipificación convencional tiene el inconveniente de necesitar antisueros de calidad preparados con cepas estandarizadas, ser muy costosa, consumir mucho tiempo, tener baja reproducibilidad y requerir mano de obra cualificada para detectar las reacciones de aglutinación.(Jadhav, Bhave and Palombo, 2012).

En el fagotipado, las cepas pueden ser diferenciados en diferentes fagovares. Sin embargo, un número significativo de cepas de *Listeria* no son tipificables, por lo que esta técnica tiene un alcance limitado (Jadhav, Bhave and Palombo, 2012).

#### 12.6.1. Métodos de tipificación basados en el uso de enzimas de restricción

El ribotipado se basa en el polimorfismo observado en el gen rARN 16 S, y permite diferenciar entre cepas pertenecientes a los serotipos 1/2b y 4b (Jadhav, Bhave and Palombo, 2012).

En la electroforesis en gel de campo pulsado (PFGE) se usan enzimas de restricción que cortan el ADN genómico con baja frecuencia. El PFGE ha sido el método de referencia para estudios epidemiológicos en brotes transmitidos por los alimentos(Jadhav, Bhave and Palombo, 2012).

#### 12.6.2. Métodos de tipificación basadas en PCR

En la amplificación aleatoria de ADN polimórfico (RAPD) se usan oligonucleótidos dirigidos contra una secuencia genómica del patógeno, generándose un perfil genético

concreto. Aunque se considera menos discriminatorio que otras técnicas de tipificación, es simple, económico y rápido (Jadhav, Bhavé and Palombo, 2012).

En la tipificación multilocus de secuencias (MLST), siete loci diferentes del genoma del patógeno se utilizan para analizar sus diferencias de nucleótidos utilizando PCR, vía secuenciación. Este método es menos discriminatorio para el serotipo 4b (Jadhav, Bhavé and Palombo, 2012).

Los análisis multilocus de secuencias repetitivas en tándem (MLVA) se basan en el principio de detección de la variación en el número de repeticiones en tándem en un locus particular en el ADN genómico del patógeno. Es una técnica simple, rápida, confiable y confiere una buena tipificación (Jadhav, Bhavé and Palombo, 2012).

Técnica de tipificación	Base de la técnica	Ventajas	Inconvenientes
<b>Serotipado</b>	-Aglutinación de los antígenos somáticos (O) y flagelares (H)	-Primer enfoque de subtipado utilizado para identificar serotipos de un brote	-Necesarios antisueros caros y de buena calidad -Laborioso, lento y requiere mano de obra cualificada -Puede haber reacción cruzada debido al intercambio de antígenos
<b>Serotipado molecular</b>	-Regiones con diferencias genómicas dirigidas por cebadores de PCR	-Rápido y económico, basado en la técnica de PCR -Técnica más confiable ya que se basa en el genotipo	-No puede distinguir entre todos los serotipos, solo puede identificar el serogrupo molecular

			-Tiene que utilizarse otra técnica junto con ésta en investigaciones epidemiológicas
<b>Fagotipado</b>	-Sensibilidad a la infección del bacteriófago por la bacteria huésped	-Las infecciones específicas por fagos del huésped dan menos cambios en los tipificados aislados	-Requiere un gran conjunto de muestras de fagos, generalmente solo disponibles en laboratorios de referencia.
<b>Técnica de tipificación</b>	Base de la técnica	Ventajas	Inconvenientes
<b>Ribotipado</b>	-Comparación del patrón de digestión de restricción obtenido después de la digestión del cromosoma.	-Altamente reproducible y técnica discriminatoria útil para grandes conjuntos de muestras. -La automatización está disponible	-Comparaciones entre laboratorios afectadas. -Se requieren dos enzimas de restricción para una mayor discriminación -Diferenciación ineficiente entre serotipos 1 / 2b y 4b en algunos estudios.
<b>PFGE</b>	-Comparación del patrón de digestión de restricción obtenido después de la digestión del	-Técnica estándar de oro altamente discriminatoria. -Aislamientos eficientes de	-Exigente, laboriosos y requiere un equipamiento especial.

	cromosoma	subtipos pertenecientes al serotipo 4b.	-Variaciones entre laboratorios con cambios en las condiciones experimentales. -Requiere mano de obra cualificada para interpretar los resultados.
<b>AFLP</b>	-Polimorfismos en tamaños de banda de ADN obtenidos después de la amplificación por PCR de los productos de digestión de restricción	-Altamente discriminatorio, sensible, y técnica con disponibilidad de automatización. -También se puede usar para revelar relaciones evolutivas entre cepas.	-Exigente y costoso debido al gasto adicional de adaptadores. -La interpretación de los resultados se ve afectada por la digestión incompleta de ADN cromosómico.
<b>RAPD</b>	-Polimorfismo en la amplificación por PCR de ADN genómico	-Rápido, simple y económico	-Baja discriminación y reproducibilidad.
<b>MLST</b>	-Polimorfismo en secuencias genómicas de genes de virulencia	-Comparaciones entre laboratorios factible y preciso. -Técnica altamente discriminativa proporcionando datos en la historia evolutiva del organismo.	-Altamente costoso y requiere mucho tiempo. -Menos discriminatorio para aislamientos del serotipo 4b. -Enfocarse solo en genes de virulencia es poco fiable

			debido a su rápida evolución. -La selección de loci genéticos influye en el índice discriminatorio
<b>MLVA</b>	-Variación en el número de copias en tándem en el ADN genómico	-Simple, rápido y económico. -Se puede realizar usando electroforesis en gel de agarosa o electroforesis de gel por capilaridad. -Altamente discriminatorio con la misma viabilidad en comparación entre laboratorios.	-

Tabla 9. Ventajas e inconvenientes de las técnicas de tipificación utilizadas para las cepas de *L. monocytogenes*. (Jadhav, Bhave and Palombo, 2012)

## 13. Métodos de control

### 13.1. Métodos físicos

El dióxido de cloro ( $\text{ClO}_2$ ) ha surgido recientemente como una prometedora tecnología de desinfección no térmica. Este gas es un fuerte agente oxidante que penetra la membrana celular, dañando proteínas y enzimas dentro de la célula del patógeno. Este gas se ha usado para tratar productos frescos como arándanos, espinacas, patatas, naranjas, tomates, lechuga, zanahorias, melones y frijoles. Además se ha usado su efecto antimicrobiano en superficies de acero inoxidable, madera, plástico y vidrio. En este caso, la temperatura de tratamiento es un factor importante que afecta a la eficacia microbiana de este gas, al afectar a su solubilidad y a su reactividad (Park and Kang, 2018).

Este gas se ha ensayado frente a diversas cepas de *L. monocytogenes* aisladas desde aves de corral, conejo y pacientes, y resuspendidas luego en agua de peptona tamponada estéril a concentraciones finales de 7-8 log UFC/mL. Estas muestras del patógeno (100  $\mu\text{L}$ ) se utilizaron para contaminar artificialmente muestras troceadas estériles de tomate y espinaca, que fueron finalmente tratadas con 20 rpm del gas durante 30 min, a dos temperaturas diferentes., Los resultados mostraron que el tratamiento con gas a 25 °C es más efectivo que 15 °C (Park and Kang, 2018).

Estos resultados sugieren que el control de la temperatura podría ser una alternativa al uso de altas concentraciones de gas  $\text{ClO}_2$ , que pueden causar cambios en la calidad de los alimentos o acelerar la corrosión de las superficies de procesamiento de alimentos (Park and Kang, 2018).

Con el aumento de la demanda por parte de los consumidores de alimentos fáciles de cocinar, como la pasta rellena refrigerada han aumentado los casos de listeriosis, ya que aunque se comercializan refrigerados, *L. monocytogenes* es capaz de sobrevivir y crecer a estas temperaturas. (Ro *et al.*, 2017).

Para ayudar en el control de este patógeno en este tipo de alimentos refrigerados listos para el consumo, se han ensayado diversos aditivos, como una mezcla de azúcar y vinagre (CSV) a la concentración de 0.1, 0.3, 0.5 y 1%, incluida en la masa de pasta refrigerada. En este ensayo, la superficie de cada ravioli fue inoculada con 0.1 ml de cultivo de *L. monocytogenes*, y estos fueron almacenados en atmósfera modificada con

una mezcla de gases (0% O<sub>2</sub>, 0.3% CO<sub>2</sub> y 99.7% de N<sub>2</sub>), y finalmente almacenados a 4 °C, 10 °C, 17 °C y 24 °C durante 60 días (Ro *et al.*, 2017).

El envasado en atmósfera modificada controló mejor el crecimiento de *L. monocytogenes* durante 15 días, frente a los 2 días en el caso del envasado en condiciones aeróbicas (sin esta atmósfera) (Ro *et al.*, 2017). Además, la adición de la mezcla de azúcares y vinagre, sobre todo al 0,5% y al 1%, causó una disminución importante de la concentración del patógeno (tabla 10) (Ro *et al.*, 2017).

Concentration of CSV (%)	Temperature (°C)			
	4	10	17	24
0	<sup>C</sup> 0.15 ± 0.06 <sup>a</sup>	<sup>C</sup> 0.23 ± 0.08 <sup>a</sup>	<sup>B</sup> 1.08 ± 0.37 <sup>a</sup>	<sup>A</sup> 1.85 ± 0.19 <sup>a</sup>
0.1	<sup>C</sup> 0.09 ± 0.02 <sup>ab</sup>	<sup>C</sup> 0.14 ± 0.05 <sup>ab</sup>	<sup>B</sup> 0.94 ± 0.00 <sup>a</sup>	<sup>A</sup> 1.96 ± 0.06 <sup>a</sup>
0.3	<sup>C</sup> 0.05 ± 0.00 <sup>bc</sup>	<sup>C</sup> 0.06 ± 0.00 <sup>b</sup>	<sup>B</sup> 0.65 ± 0.00 <sup>ab</sup>	<sup>A</sup> 1.64 ± 0.06 <sup>a</sup>
0.5	<sup>D</sup> 0.02 ± 0.01 <sup>bc</sup>	<sup>C</sup> 0.06 ± 0.00 <sup>b</sup>	<sup>B</sup> 0.35 ± 0.01 <sup>b</sup>	<sup>A</sup> 0.73 ± 0.00 <sup>b</sup>
1	<sup>C</sup> 0.01 ± 0.00 <sup>c</sup>	<sup>C</sup> 0.05 ± 0.00 <sup>b</sup>	<sup>B</sup> 0.27 ± 0.00 <sup>b</sup>	<sup>A</sup> 0.80 ± 0.01 <sup>b</sup>

Tabla 10. Crecimiento detectado de *L. monocytogenes* según la temperatura y la concentración de la mezcla de vinagre y azúcar empleada en un experimento con pasta fresca rellena (Ro *et al.*, 2017).

Una de las principales preocupaciones de los productores de la industria pesquera es el crecimiento de *L. monocytogenes* en las condiciones de refrigeración de estos productos (Ovissipour *et al.*, 2018). En estos casos, uno de los desinfectantes más novedosos es el agua electrolizada ácida (AEW) a pH en torno a 3. El AEW no tiene efectos negativos sobre las propiedades sensoriales del color, sabor y textura del alimento. El agua electrolizada neutra (NEW), con un pH de 5-6.5, tiene menos efectos secundarios en la calidad de los alimentos, además de una mejor propiedad antimicrobiana. Sin embargo, la AEW tiene una efectividad limitada en la disminución de cargas bacterianas en el marisco a temperatura ambiente (Ovissipour *et al.*, 2018).

En un estudio con filetes de salmón fresco y refrigerado durante tres días se compararon dos tratamientos con AEW y NEW. El AEW utilizada tenía un pH de 2.7, un potencial de oxidación-reducción (ORP) de 1150 mV y 60 ppm de cloro libre. El NEW tenía un pH de 6.8, un ORP de 786 mV y 60 ppm de cloro libre. A continuación,

$3 \times 10^7$  UFC del patógeno *L. monocytogenes* se inocularon sobre las porciones de filete de salmón (Ovissipour *et al.*, 2018). Estas porciones de filetes de salmón inoculadas se incubaron a diferentes temperaturas (20 °C, 50 °C, 55 °C, 60 °C y 65 °C) durante 2, 6 y 10 min. (Ovissipour *et al.*, 2018)

Tras el experimento, se tomaron muestras de los filetes de salmón y se realizó un conteo de las UFC del patógeno presentes mediante un ensayo de dilución en placa de medio de cultivo selectivo para *L. monocytogenes*. La temperatura, el tiempo y el tipo de agua electrolizada tuvieron un efecto significativo importante en la reducción bacteriana sobre el salmón, como se puede observar en la tabla 11. En general, en todos los tratamientos, el agua NEW produjo una mayor reducción bacteriana en comparación con el agua AEW. Además, las temperaturas de tratamiento más altas fueron más efectivas para reducir el patógeno, tanto con AEW como con NEW (Ovissipour *et al.*, 2018).

Temp. (°C)	DI			AEW			NEW		
	Time (min)			Time (min)			Time (min)		
	2	6	10	2	6	10	2	6	10
20	7.7 ± 0.03 (0.2)	7.7 ± 0.02 (0.2)	7.7 ± 0.1 (0.2)	7.3 ± 0.05 (0.6)	7.3 ± 0.05 (0.6)	7.1 ± 0.04 (0.8)	7.3 ± 0.04 (0.6)	7.2 ± 0.03 (0.7)	6.9 ± 0.11 (1.0)
50	7.4 ± 0.04 (0.5)	7.2 ± 0.04 (0.7)	7.1 ± 0.08 (0.8)	7.3 ± 0.06 (0.6)	7.2 ± 0.04 (0.7)	7.0 ± 0.06 (0.9)	7.0 ± 0.11 (0.9)	6.5 ± 0.04 (1.4)	6.0 ± 0.03 (1.9)
55	7.3 ± 0.11 (0.6)	7.2 ± 0.07 (0.8)	7.0 ± 0.05 (0.9)	7.2 ± 0.04 (0.7)	7.1 ± 0.05 (0.8)	7.0 ± 0.04 (0.9)	6.7 ± 0.08 (1.2)	5.9 ± 0.03 (2.0)	5.7 ± 0.07 (2.2)
60	7.3 ± 0.08 (0.6)	7.0 ± 0.05 (0.9)	6.0 ± 0.07 (1.9)	7.1 ± 0.05 (0.8)	6.4 ± 0.06 (1.5)	5.3 ± 0.03 (2.6)	6.6 ± 0.05 (1.3)	5.9 ± 0.05 (2.0)	4.9 ± 0.09 (3.0)
65	7.3 ± 0.05 (0.6)	5.8 ± 0.03 (2.0)	4.9 ± 0.04 (3.0)	5.9 ± 0.05 (2.0)	5.5 ± 0.03 (2.4)	2.9 ± 0.06 (5.0)	5.4 ± 0.07 (2.5)	4.7 ± 0.07 (3.2)	2.3 ± 0.04 (5.6)

Tabla 11. Ensayo de control de *L. monocytogenes* (en log UFC/mL) sobre filetes de salmón fresco, utilizando AEW y NEW (como control se utilizó agua desionizada estéril, DI) (Ovissipour *et al.*, 2018)

En este estudio también se valoró, mediante FTIR, la desnaturalización de las proteínas musculares en el salmón, aspecto importante para no tener pérdida de calidad de la carne, observándose que a mayor temperatura (55 °C, 60 °C y 65 °C), el músculo de

salmón tratado con AEW tenía mayor deterioro en su calidad. Por tanto, el agua NEW puede aplicarse sola o en combinación con un proceso térmico suave para inactivar *L. monocytogenes* en pescados, con un impacto mínimo en su calidad proteica (Ovissipour *et al.*, 2018).

### 13.2. Métodos químicos

Desde los años 90, los brotes de enfermedades asociadas al consumo de zumo de frutas han ido en aumento. Se ha llevado a cabo una cantidad significativa de estudios en la aplicación de campo eléctrico pulsado, aceites esenciales, ozono y bacteriocinas para ayudar en la conservación de estos zumos de frutas.

Varias bacteriocinas se han ensayado en zumos de fruta, como nisina, enterocina AS48, bovicina HC5 y bificina C6564. De ellas, solo la nisina ha sido aprobada como aditivo alimentario por la EFSA. Sin embargo, la efectividad de la nisina en productos alimenticios está influenciada por la presencia de glutatión en la matriz alimentaria, de metabisulfito de sodio, de proteasas y de óxido de titanio (Lee, Khan and Oh, 2018).

Las nanopartículas de quitosano se pueden rellenar con nisina para evitar el crecimiento de patógenos en zumo de naranja. Este biopolímero no tóxico y biodegradable se obtiene desde la quitina de crustáceos por medio de N-desacetilación. En la industria alimentaria se usa mucho como agente antimicrobiano (Lee, Khan and Oh, 2018). Estas partículas se forman al añadir un 10% de una solución acuosa de nisina (en fosfato de sodio) sobre un 90% de quitosano en ácido acético al 1%, en agitación y en presencia de trehalosa (para evitar agregaciones de nanopartículas). Las nanopartículas formadas se recuperan con una centrifugación de 10 min a 20.000 rpm, liofilizándolas a continuación (Lee, Khan and Oh, 2018). Para comprobar la actividad antimicrobiana de estas nanopartículas con nisina, se añadieron a una concentración final de 2,5 mg/mL a 25 mL de zumo de naranja inoculado con *L. monocytogenes* y se incubaron a 25 °C durante 48 h. Se obtuvo así una reducción de *L. monocytogenes* desde los valores iniciales de 8.12 log UFC/mL hasta 4.51 log UFC/mL en el caso de las nanopartículas encapsuladas con nisina, superiores a los controles con quitosano a 2,5 mg/mL (6,54 log UFC/mL), nisina a 1 mg/mL (5,78 log UFC/mL), o quitosano a 2,5 mg/mL (5,97 log UFC/mL) (Lee, Khan and Oh, 2018).

En otro estudio se evaluó el uso de nisina (producida por *Lactococcus lactis* N8) junto con leucocina C (producida por *L. lactis* NZ9000) para inhibir el crecimiento de *L. monocytogenes in vitro*. Ambas bacteriocinas tienen diferentes modos de acción, y se demostró que los halos de inhibición frente a *L. monocytogenes* del tratamiento combinado eran mayores que por separado (Figura 10) (Fu *et al.*, 2018).

La producción de bacteriocina se determinó mediante difusión en una placa de agar. Leucocina fue secretada por cepas de *L. lactis* y el resultado fue la aparición de una zona de inhibición en las placas de *Listeria monocytogenes*. Todas las cepas construidas mostraron una excelente actividad anti-listeriosis en comparación con la cepa salvaje N8 (ligera inhibición), como se puede apreciar en la figura 9. El efecto inhibitorio de N8-r-lecCI era distinto que el efecto de las cepas N8-p-lecCI y NZ9000, lo que indica que el N8-r-lecCI tiene una mayor actividad antimicrobiana. (Fu *et al.*, 2018)



Figura 9. Halo de inhibición producido por bacteriocinas en (A) *L. lactis* N8, (B) *L. lactis* N8-p-lecCI, (C) *L. lactis* N8-r-lecCI y (D) *L. lactis* NZ9000-p-lecCI. (Fu *et al.*, 2018)

Otro tipo de nanopartículas, en este caso con radicales (RNP) han mostrado actividad *in vivo* en ratones frente a *L. monocytogenes*, en un tratamiento combinado con el antibiótico amoxicilina (Ikeda *et al.*, 2018). Se utilizaron aquí copolímeros oxidantes

formados por 2,2,6,6-tetrametilpiperidina-1-oxilo (TEMPO) con polietilenglicol (PEG), y *L. monocytogenes* inyectada intraperitonealmente a cada ratón. Tras 0, 1 o 2 días del experimento de infección se contabilizaron (por dilución en placa) las bacterias de este patógeno presentes en el hígado, bazo, pulmones y sangre de los ratones. (Ikeda *et al.*, 2018). Así, valores de  $2 \times 10^{11}$  UFC en los órganos estaban asociados a alta tasa de mortalidad (a los dos días de la inyección del patógeno) y fallos orgánicos. A parte de los ratones infectados se les administraron diferentes dosis de amoxicilina, lo que hizo que todos ellos sobreviviesen a la infección en el caso de dosis de antibiótico superiores a 25 mg/kg. La administración por si sola de RNP no ejerció ningún efecto terapéutico en los ratones infectados, incluso a dosis altas de 200 mg/kg, pero la terapia combinada de RNP y amoxicilina hizo que los ratones sometidos a esta combinación sobrevivieran más de 6 días (el límite de supervivencia alcanzado en el caso del tratamiento solo con amoxicilina), evidenciándose por tanto un efecto sinérgico (Ikeda *et al.*, 2018)

### 13.3. Métodos biológicos

El uso excesivo de antibióticos en veterinaria ha generado un aumento de casos de patógenos transmitidos por alimentos resistentes a los mismos. Se han intentado desarrollar métodos para controlar la contaminación microbiana en los alimentos y durante su procesamiento. Los bacteriófagos han surgido así como opciones viables y seguras para la prevención, el tratamiento y/o erradicación de estos contaminantes en varios alimentos y su entorno industrial, aprobándose en 2006 el primer producto comercial a base de fagos (ListShield™) para controlar *L. monocytogenes* en la carne y productos avícolas (Endersen *et al.*, 2014).

El bacteriófago P100 es efectivo frente a 21 cepas de *L. monocytogenes* pertenecientes a 13 serotipos diferentes, causando reducciones de 3.5 a 5.5 log/cm<sup>2</sup>, en biofilms establecidos de este patógeno (Endersen *et al.*, 2014). Este fago permite eliminar al patógeno en quesos maduros tratados con el mismo, sin provocar efectos tóxicos en animales (Bai *et al.*, 2016).

El fago A511 también se ha usado, en este caso en alimentos líquidos (leche y salmuera de queso mozzarella) y sólidos (perritos calientes, carne de pavo en rodajas, salmón ahumado, marisco, col en rodajas y hojas de lechuga). Este fago A511 produjo en los alimentos líquidos una reducción de *L. monocytogenes* por debajo del límite de

detección, tras 6 días de tratamiento a 6 °C, y 5 reducciones logarítmicas en el caso de los alimentos sólidos. (Bai *et al.*, 2016)

TIPO DE FAGO	APLICACIONES	RESULTADOS
A511	Leche con chocolate, salmuera de queso mozzarella perritos calientes, carne de pavo en rodajas, salmón ahumado, marisco, col en rodajas y hojas de lechuga	-Líquidos: Reducción por debajo del nivel de detección (a 6 °C durante 6 días). -Sólidos: Reducción de 5 log (a 6 °C durante 6 días).
TIPO DE FAGO	APLICACIONES	RESULTADOS
A511	Queso suave	-Reducción de 6 log en 22 días.
P100	Queso	Erradicación completa en 22 días.
P100	Melón, pera y manzana	-Melón: Reducción de 1.5 log. -Pera: Reducción de 1.0 log.
FWLLm1	Pechuga de pollo lista para comer	-Reducción de 2.5 log y la inhibición del crecimiento a 5 °C durante 21 días.
LM103, LMP-102 (mezcla de fagos)	Melón, manzana golden	-Melón: Reducción de 2.0-4.6 log. -Manzana: Reducción de 0.4 log.
LMP-102	Melón	-Reducción del número de células viables a niveles no detectables y supresión del crecimiento del patógeno a 10 °C durante 7 días de almacenamiento

Tabla 12. Tipos de fagos utilizados frente a *L. monocytogenes*. (Bai *et al.*, 2016)

Algunos fagos de ciclo lítico producen endolisinas para degradar el péptidoglicano de la bacteria parasitada, durante la etapa terminal de su ciclo de vida lítico. Estas endolisinas son particularmente eficaces cuando se aplican exógenamente a bacterias Gram+, como por ejemplo en una matriz alimentaria. Así se ha diseñado una cepa de *L. lactis* capaz de secretar la endolisina anti-*Listeria* Ply511, y que podría utilizarse para controlar *L. monocytogenes* en queso y otras leches fermentadas (Endersen *et al.*, 2014). Las endolisinas tienen dos regiones proteicas conservadas, una N-terminal con la actividad enzimática y una C-terminal con el dominio de unión a la pared celular bacteriana. Dado que las endolisinas se dirigen específicamente a la capa de peptidoglicano en la bacteria, son seguras para el ser humano (Bai *et al.*, 2016). La endolisina LysZ5 del fago FWLLm3 de *L. monocytogenes* puede inhibir específicamente el crecimiento de la bacteria hasta 4 log UFC en leche de soja tratada a 3 °C durante 3 h. (Bai *et al.*, 2016).

El jamón curado es un producto cárnico listo para consumo y que no permite el crecimiento de *L. monocytogenes*, debido a su baja actividad del agua ( $A_w$ ) y a la refrigeración. (Iacumin, Manzano and Comi, 2016). En un estudio con jamón curado se inoculó éste con 2, 3 o 4 log de UFC de *L. monocytogenes* resuspendida en 1 mL de medio BHI y se añadieron después de 30 min de incubación con la bacteria entre 1 y 10 log PFU del fago P100 en 1 mL de suspensión. (Iacumin, Manzano and Comi, 2016). Las lonchas así inoculadas fueron envasadas al vacío y tras varios días de almacenamiento a 4 °C, 10 °C o 20 °C se tomaron muestras de las rodajas y se realizó el recuento de bacterias por el método de dilución en placa (límite de detección 10 UFC/g). Se comprobó así que el tratamiento con el fago era mejor en presencia de concentraciones menores de la bacteria y a temperaturas bajas (4 °C y 10 °C), como se muestra en la tabla 13. (Iacumin, Manzano and Comi, 2016).

Temperature	2 log CFU/cm <sup>2</sup>	3 log CFU/cm <sup>2</sup>	4 log CFU/cm <sup>2</sup>
4 °C	Not detected/25 cm <sup>2</sup>	Detected/25 cm <sup>2</sup>	0.3 log ± 0.1 <sup>a</sup>
10 °C	Not detected/25 cm <sup>2</sup>	Detected/25 cm <sup>2</sup>	2.2 log ± 0.2 <sup>b</sup>
20 °C	Not detected/25 cm <sup>2</sup>	Detected/25 cm <sup>2</sup>	3.0 log ± 0.1 <sup>c</sup>

Legend: mix of *L. monocytogenes*: 2-3-4 log CFU/cm<sup>2</sup>—P100 8 log PFU/cm<sup>2</sup>: Data represent the means (Log CFU/cm<sup>2</sup>) ± standard deviations (S.D.); Mean with the same letters within the same column (following the values) are not significantly different ( $p < 0.05$ ).

Tabla 13. Detección de *L. monocytogenes* en suspensión con el fago P100 y según la concentración de LM y la variación de la temperatura. (Iacumin, Manzano and Comi, 2016)

Además se observó inhibición total de la presencia del patógeno en las lonchas de jamón curado cuando la titulación del fago P100 era mayor o igual a 7 PFU/mL, independientemente de la concentración inicial de *L. monocytogenes* (2 o 3 log UFC/mL) (tabla 14).

P100 Titer	<i>L. monocytogenes</i> Concentration	
	2 log CFU/mL	3 log CFU/mL
PFU/mL	DT (h)	DT (h)
10 <sup>10</sup>	∞ <sup>a</sup>	∞ <sup>a</sup>
10 <sup>9</sup>	∞ <sup>a</sup>	∞ <sup>a</sup>
10 <sup>8</sup>	∞ <sup>a</sup>	∞ <sup>a</sup>
10 <sup>7</sup>	∞ <sup>a</sup>	∞ <sup>a</sup>
10 <sup>6</sup>	18.00 ± 0.30 <sup>b</sup>	13.00 ± 1.00 <sup>b</sup>
10 <sup>5</sup>	17.30 ± 1.00 <sup>b</sup>	13.00 ± 1.00 <sup>b</sup>
10 <sup>4</sup>	13.30 ± 2.00 <sup>c</sup>	11.30 ± 2.00 <sup>b</sup>
10 <sup>3</sup>	13.30 ± 1.00 <sup>c</sup>	11.00 ± 2.00 <sup>b</sup>
10 <sup>2</sup>	13.00 ± 1.00 <sup>c</sup>	11.00 ± 1.00 <sup>b</sup>
10 <sup>1</sup>	12.30 ± 0.30 <sup>c</sup>	12.00 ± 0.30 <sup>b</sup>
10 <sup>0</sup>	12.30 ± 0.30 <sup>c</sup>	12.00 ± 1.00 <sup>b</sup>
Control	12.00 ± 1.00 <sup>c</sup>	12.00 ± 0.30 <sup>b</sup>

Legend: D.T.: Detection time; ∞: No growth; Control: No P100 inoculum. Data represent the means ± standard deviations of the total samples; Mean with the same letters within the same column (following the values) are not significantly differently ( $p < 0.05$ ).

Tabla 14. Detección de *L. monocytogenes* según la titulación del fago P100 utilizada sobre lonchas de jamón curado (Iacumin, Manzano and Comi, 2016).

En cuanto al tiempo de almacenamiento, la titulación de fago P100 fue relativamente estable en las rodajas de jamón durante todo el período de almacenamiento. También se evaluó el control de los biofilms de esta bacteria en las superficies de la instalación, mediante suspensiones de fagos en probetas de acero inoxidable incubadas sobre cultivos en placa de Petri de la bacteria, a 30 °C durante 4 días. Unas placas no se trataron entonces y a las otras se les aplicó una suspensión del fago 8 log PFU/cm<sup>2</sup>. Finalmente, las probetas metálicas se colocaron en placas de Petri con medio estéril y se

incubaron a 20 °C durante 24 h, comprobándose que el fago P100 fue capaz de eliminar totalmente el biofilm formado por la bacteria sobre la superficie metálica (Iacumin, Manzano and Comi, 2016).

Por tanto, el uso de fagos podría reemplazar fácilmente a otras tecnologías, como el CO<sub>2</sub>, el ozono o la irradiación, tanto para tratar matrices alimentarias como superficies industriales. (Iacumin, Manzano and Comi, 2016).

## **14. Conclusiones**

El objetivo de este trabajo ha sido hacer una revisión de los métodos de detección y control de *L. monocytogenes* en alimentos. Su presencia en las intoxicaciones alimentarias ha aumentado con los años, y aunque no es una enfermedad frecuente, sí son graves las consecuencias que produce. Se necesitan así métodos innovadores que, de alguna manera, controlen el crecimiento de esta bacteria en la industria alimentaria.

En los últimos años, la evolución tecnológica ha permitido desarrollar métodos comerciales rápidos para la detección de *L. monocytogenes*, como las baterías bioquímicas API®, rutinarias en los laboratorios de control y calidad alimentaria.

En cuanto a los métodos de control, la utilización de la nisina da muy buenos resultados, pero también el uso de bacteriófagos como el P100, ya que ambos métodos carecen de toxicidad en humanos y son muy efectivos en la reducción de los títulos de este patógeno, y en el caso del fago P100 también para eliminar sus biofilms sobre las superficies de trabajo en la industria alimentaria.

## 15. Abreviaturas y símbolos

°C	Grados centígrados
mL	Mililitros
UFC	Unidades formadoras de colonias
PFC	Unidades formadoras de placa
g	Gramo
CC	Complejos clonales
LLO	Listerolisina O
DIM	Prueba para glicil arilamidasa
CSV	Mezcla de azúcar y vinagre
DI	Agua desionizada
AEW	Agua electrolizada ácida
NEW	Agua electrolizada neutra

## 16. Bibliografía:

Ahlstrom, C. A. *et al.* (2018) 'Molecular ecology of *Listeria* spp., *Salmonella*, *Escherichia coli* O157:H7 and non-O157 Shiga toxin-producing *E. coli* in pristine natural environments in Northern Colorado', *Journal of Applied Microbiology*, 124(2), pp. 511–521. doi: 10.1111/jam.13657.

Bai, J. *et al.* (2016) 'Biocontrol and rapid detection of food-borne pathogens using bacteriophages and endolysins', *Frontiers in Microbiology*, 7(APR), pp. 1–15. doi: 10.3389/fmicb.2016.00474.

Bergholz, T. M. *et al.* (2017) 'Genomic and phenotypic diversity of *Listeria monocytogenes* clonal complexes associated with human listeriosis'. doi: 10.1007/s00253-018-8852-5.

Bille, J. *et al.* (1992) 'API *Listeria*, a new and promising one-day system to identify *Listeria* isolates', *Applied and Environmental Microbiology*, 58(6), pp. 1857–1860.

Buchanan, R. L. *et al.* (2017) 'A review of *Listeria monocytogenes*: An update on outbreaks, virulence, dose-response, ecology, and risk assessments', *Food Control*. doi: 10.1016/j.foodcont.2016.12.016.

Castro, H. *et al.* (2018) 'Occurrence, persistence, and contamination routes of *Listeria monocytogenes* genotypes on three Finnish dairy cattle farms: A longitudinal study', *Applied and Environmental Microbiology*, 84(4). doi: 10.1128/AEM.02000-17.

Conficoni, D. *et al.* (2016) 'Resistance to biocides in *Listeria monocytogenes* collected in meat-processing environments', *Frontiers in Microbiology*, 7(October), pp. 1–9. doi: 10.3389/fmicb.2016.01627.

Endersen, L. *et al.* (2014) 'Phage Therapy in the Food Industry', *Annual Review of Food Science and Technology*, 5(1), pp. 327–349. doi: 10.1146/annurev-food-030713-092415.

Fu, Y. *et al.* (2018) 'Co-expression of nisin Z and leucocin C as a basis for effective protection against *Listeria monocytogenes* in pasteurized milk', *Frontiers in Microbiology*, 9(MAR), pp. 1–11. doi: 10.3389/fmicb.2018.00547.

Genbank: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/159> (Mayo 2018)

Hartford, T. and Sneath, P. H. (1993) 'Optical DNA-DNA homology in the genus *Listeria*.', *International journal of systematic bacteriology*, 43(1), pp. 26–31. doi: 10.1099/00207713-43-1-26.

Iacumin, L., Manzano, M. and Comi, G. (2016) 'Phage Inactivation of *Listeria monocytogenes* on San Daniele Dry-Cured Ham and Elimination of Biofilms from Equipment and Working Environments', *Microorganisms*, 4(1), p. 4. doi: 10.3390/microorganisms4010004.

Ikeda, Y. *et al.* (2018) 'Antioxidative Nanoparticles Significantly Enhance Therapeutic Efficacy of an Antibacterial Therapy against *Listeria monocytogenes* Infection', *Molecular Pharmaceutics*. doi: 10.1021/acs.molpharmaceut.7b00995.

Instituto de Salud Pública de Chile (2009) 'Procedimiento para identificación bioquímica de cepas de *L.monocytogenes* aisladas en alimentos y ambiente', p. 15.

Jadhav, S., Bhawe, M. and Palombo, E. A. (2012) 'Methods used for the detection and subtyping of *Listeria monocytogenes*', *Journal of Microbiological Methods*. Elsevier B.V., 88(3), pp. 327–341. doi: 10.1016/j.mimet.2012.01.002.

Law, J. W. F. *et al.* (2015) 'An insight into the isolation, enumeration, and molecular detection of *Listeria monocytogenes* in food', *Frontiers in Microbiology*, 6(NOV), pp. 1–15. doi: 10.3389/fmicb.2015.01227.

Lee, E. H., Khan, I. and Oh, D. H. (2018) 'Evaluation of the efficacy of nisin-loaded chitosan nanoparticles against foodborne pathogens in orange juice', *Journal of Food Science and Technology*. Springer India, 55(3), pp. 1127–1133. doi: 10.1007/s13197-017-3028-3.

Lowe, D.E., Robbins, J.R. and Bakardjiev, A.I (2018) 'Animal and human tissue models of vertical *Listeria monocytogenes* transmission and implications for other pregnancy-associated infections' *American Society for Microbiology*. doi:10.1128/IAI.00801-17

Martín, B., Bover-Cid, S. and Aymerich, T. (2018) 'MLVA subtyping of *Listeria*

monocytogenes isolates from meat products and meat processing plants', *Food Research International*. doi: 10.1016/j.foodres.2017.12.052.

McDougal, C. and Sauer, J.-D. (2018) 'Listeria monocytogenes: The Impact of Cell Death on Infection and Immunity', *Pathogens*, 7(1), p. 8. doi: 10.3390/pathogens7010008.

Muhterem-Uyar, M. *et al.* (2018) 'New aspects on Listeria monocytogenes ST5-ECVI predominance in a heavily contaminated cheese processing environment', *Frontiers in Microbiology*. doi: 10.3389/fmicb.2018.00064.

Naik, M. M., Bhangui, P. and Bhat, C. (2017) 'The first report on Listeria monocytogenes producing siderophores and responds positively to N-acyl homoserine lactone (AHL) molecules by enhanced biofilm formation', *Archives of Microbiology*. Springer Berlin Heidelberg, 199(10), pp. 1409–1415. doi: 10.1007/s00203-017-1416-8.

Ovissipour, M. *et al.* (2018) 'Electrolyzed water and mild-thermal processing of Atlantic salmon ( *Salmo salar* ): Reduction of Listeria monocytogenes and changes in protein structure', *International Journal of Food Microbiology*. Elsevier B.V, 276, pp. 10–19. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2018.04.005.

Park, S.-H. and Kang, D.-H. (2018) 'Effect of temperature on chlorine dioxide inactivation of Escherichia coli O157:H7, Salmonella typhimurium, and Listeria monocytogenes on spinach, tomatoes, stainless steel, and glass surfaces', *International Journal of Food Microbiology*. Elsevier, 275(November 2017), pp. 39–45. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2018.03.015.

Pennone, V. *et al.* (2018) 'Diversity of *Listeria monocytogenes* strains isolated from *Agaricus bisporus* mushroom production', *Journal of Applied Microbiology*. doi: 10.1111/jam.13773.

Pitts, M. G. and Orazio, S. E. F. D. (2018) 'A Comparison of Oral and Intravenous Mouse Models of Listeriosis', *Pathogens*, 7(1), p. 13. doi: 10.3390/pathogens7010013.

Pucci, L., Massacesi, M. and Liuzzi, G. (2018) 'Clinical management of women with listeriosis risk during pregnancy: a review of national guidelines', *Expert Review of Anti-infective Therapy*. Taylor & Francis, 16(1), pp. 13–21. doi:

10.1080/14787210.2018.1417837.

Radhakrishnan, R. and Poltronieri, P. (2017) 'Fluorescence-free biosensor methods in detection of food pathogens with a special focus on *Listeria monocytogenes*', *Biosensors*, 7(4), pp. 1–12. doi: 10.3390/bios7040063.

Radoshevich, L. and Cossart, P. (2018) 'Listeria monocytogenes: towards a complete picture of its physiology and pathogenesis', *Nature reviews. Microbiology*. doi: 10.1038/nrmicro.2017.126.

Ricci, A. *et al.* (2018) 'Listeria monocytogenes contamination of ready- to- eat foods and the risk for human health in the EU', *EFSA Journal*, 16(1). doi: 10.2903/j.efsa.2018.5134.

Ro, E. Y. *et al.* (2017) 'Effects of natural antimicrobials with modified atmosphere packaging on the growth kinetics of *Listeria monocytogenes* in ravioli at various temperatures', *Journal of Food Safety*, (June 2017), p. e12392. doi: 10.1111/jfs.12392.

Rolhion, N. and Cossart, P. (2017) 'How the study of *Listeria monocytogenes* has led to new concepts in biology', *Future Microbiology*. doi: 10.2217/fmb-2016-0221.

Valderrama, W. B. *et al.* (2016) 'Commercially Available Rapid Methods for Detection of Selected Food-borne Pathogens', *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. doi: 10.1080/10408398.2013.775567.

Valderrama, W. B., Ostiguy, N. and Cutter, C. N. (2014) 'Multivariate analysis reveals differences in biofilm formation capacity among *Listeria monocytogenes* lineages', *Biofouling*, 30(10), pp. 1199–1209. doi: 10.1080/08927014.2014.980818.

Walland, J. *et al.* (2015) 'Listeria monocytogenes infektion bei wiederkäuern: Besteht eine verbindung zur kontamination von umwelt und lebensmitteln und zur menschlichen gesundheit? eine übersicht', *Schweizer Archiv fur Tierheilkunde*, 157(6), pp. 319–328. doi: 10.17236/sat00022.