

Universidad Nacional de San Martín
Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas “Dr. Carlos G. Malbrán”
Maestría en Microbiología Molecular: 11va Cohorte

Trabajo de Tesis realizado como requisito para optar al título de:

MAGISTER EN MICROBIOLOGÍA MOLECULAR

Estudio epidemiológico y serotipificación por PCR múltiple de *Listeria monocytogenes* aislada de matrices alimentarias en Argentina

Autora: Bioq. Yamila Paula Figueroa

Directora: Dra. Magdalena Costa

Co-Directora: Bioq. Paula Inés Buonfiglio

Tesis realizada en el Laboratorio Stambouliau

Agosto, 2021

Agradecimientos	5
Resumen	8
Introducción	9
Enfermedades transmitidas por alimentos	9
Una salud	10
Enfermedades zoonóticas	10
<i>Listeria monocytogenes</i>	11
Generalidades	11
Listeriosis como enfermedad transmitida por los alimentos	12
Patogenia	13
Formas clínicas	14
Listeriosis gastrointestinal no invasiva	14
Listeriosis invasiva	14
Adaptación y resistencia de <i>L. monocytogenes</i>	15
Epidemiología	18
Situación en Argentina	20
Alimentos asociados a la transmisión de <i>L. monocytogenes</i>	21
Monitoreo ambiental	24
Legislación	25
Variabilidad de la virulencia en las distintas poblaciones de <i>L. monocytogenes</i>	26
Serovariedades de <i>L. monocytogenes</i>	26
Identificación de <i>L. monocytogenes</i> y sus serotipos	28
Método de aislamiento convencional	28
Estudio de serotipos de <i>L. monocytogenes</i>	28
Detección de serogrupos de <i>L. monocytogenes</i>	30
Identificación empleando MALDI-TOF MS	30
Objetivos	32
Objetivo general	32
Objetivos particulares	32
Capítulo 1: Análisis de muestras totales	33
Materiales y métodos	33
Equipos	33
Reactivos	33
Medios	34
Cepas control	34
Muestreo	34
Lugar y periodo de muestreo	34
	1

Especificaciones para la toma de muestra	34
Tamaño de la muestra	35
Matrices	36
Obtención de aislamientos y procesamiento de muestras	36
Detección de <i>Listeria monocytogenes</i> y <i>Listeria</i> spp. de acuerdo a Norma ISO 11290:2017	36
Conservación de los aislamientos de <i>Listeria</i> spp.	38
Flujograma de trabajo: Detección de <i>L. monocytogenes</i> y <i>Listeria</i> spp.	39
Resultados	40
Muestras totales	40
Porcentaje de positividad total	41
Porcentaje de positividad por matriz	42
Categoría de cárnicos	43
Porcentaje de positividad por tipo de cárnico	44
Discusión	45
Conclusiones parciales	48
Capítulo 2: Serotipificación molecular mediante PCR múltiple	49
Materiales y métodos	49
Equipos	49
Reactivos	49
Cepas control	49
Tamaño de la muestra	50
Muestras serotipificadas	51
Puesta a punto de una técnica microbiológica	52
Detección de serogrupos de <i>L. monocytogenes</i> mediante PCR múltiple	53
Flujograma de trabajo: PCR múltiple de serogrupos de <i>L. monocytogenes</i>	58
Resultados	59
Etapa 1: puesta a punto de PCR multiplex de serogrupos de <i>L. monocytogenes</i>	59
Adaptación de PCR múltiple para serogrupos de <i>L. monocytogenes</i>	59
Cepas utilizadas en la puesta a punto	60
Realización y evaluación el ensayo	61
Conclusión	63
Etapa 2: Serotipificación molecular de muestras	63
Porcentaje de serogrupos totales	63
Análisis de los aislamientos serotipificados	64
Distribución de los serogrupos según los establecimientos involucrados	67
Etapa 3: Análisis de los monitoreos ambientales	69
Caso 1	69
Caso 2	76
Caso 3	78

Caso 4	81
Discusión	83
Conclusiones parciales	98
Capítulo 3: Experiencia empleando MALDI-TOF MS	99
Materiales y métodos	99
Equipos	99
Reactivos	99
Tamaño de la muestra	99
Identificación de <i>Listeria</i> spp. y <i>L. monocytogenes</i> empleando MALDI-TOF MS	99
Flujograma de trabajo	101
Resultados	102
Descripción de los aislamientos identificados	102
Análisis de los aislamientos identificados	102
Análisis de <i>L. monocytogenes</i>	103
Análisis de <i>L. innocua</i>	106
Discusión	109
Conclusiones parciales	111
Conclusiones	112
Bibliografía	114

A mis viejos que me regalaron su piel

Agradecimientos

Me tocó realizar esta tesis en una época sin igual, en un contexto difícil y distinto a todo lo que alguna vez imaginé, con un montón de dudas existenciales de presente y futuro, pero con la certeza de la compañía ineludible de muchas personas a las cuales especialmente agradeceré. Sin dudas este es un trabajo colectivo, lleno de amor y compañeras maravillosas que me acompañaron tanto profesional como personalmente para que hoy pueda estar finalizando esta etapa.

Quiero agradecer al Laboratorio Stamboulian, por ser mi escuela, mi casa y el lugar al que siempre querré volver. Por abrirme sus puertas cuando aún no estaba recibida y por dejarme crecer como profesional y persona.

A Maggi porque la admiro y ¿qué mejor que una Directora de tesis que es amiga?. Desde el inicio supe que ibas a ser excelente, lo que no sabía era que serías increíble. El primer día me dijo “mira que esta PCR es un bajón”, y así fue, pero vencimos, lo logramos y llegamos. Te quiero Maggi, gracias por la ayuda, la experiencia compartida, el aliento constante y el amor hasta en el más pequeñísimo detalle.

A Pau porque es mi amiga incondicional, porque la adoro, porque me da tantos grandes momentos, porque me hace reír como pocas personas lo hacen. Se incorporó a este proyecto en una tarde de plena crisis y llanto, en donde creía que nada me iba a salir, en donde las bandas de mi PCR eran pura teoría y desde ese entonces nunca más me soltó la mano. No solo lo logramos sino que además lo hicimos increíblemente bello. Amiga, cualquier palabra que pueda usar para agradecerte es chiquita pero todo lo que te quiero es enorme.

A Adriana por ser mi gran referente en la microbiología, la capitana de nuestro amado laboratorio de alimentos, la mejor jefa que me podría haber tocado en esta profesión. Porque desde el primer día me dijo que sí a la realización de esta maestría,

porque juntas elegimos el tema, porque siempre me impulsó a superarme. Adri, eternamente agradecida.

Agradecer también a Agus, Jime, Bren, Glori, Nadi y Mari. Mis amigas y confidentes. Las personas con las que puedo reír hasta llorar, el impenetrable cuadrado del mal, los mejores desayunos y una vida que con ustedes siempre fue un viernes con helado. Con quien creamos validaciones microbiológicas, revistas regionales y confesiones en el cuarto de la negación. Mis compañeras de trabajo por ocho años y mis amigas para toda la vida.

A Jime le quiero agradecer especialmente. Mi compañera pandemia. La única que me abrazó en los meses de soledad. La que estuvo en todos los fracasos metodológicos cuando ninguna banda aparecía y también con quien compartí el festejo cuando las cosas empezaron a salir. Mi eterna gratitud a esta gran profesional, compañera y amiga.

A Ceci quiero agradecerle por aguantarme la cabeza y el corazón. Por entender toda esta explosión de sentimientos que tantas veces quisieron salir todos juntos y pasar atolondrados por el ojo de una aguja. Por ser el palito que sostiene al árbol. Por ser incondicional en todo este aprendizaje. Por ser el motorcito que me anima a escribir. Nada sería lo mismo sin tu apoyo y tu perspectiva única y combativa que tanto bien me hace.

A Belu, Flor, Yani, Mari, Sofi, Pau y Magui, porque aunque la vida insista con regalarnos planes distintos y que nuestros cuerpos vivan en otras ciudades y países, esta amistad que nació en Junín y Paraguay, tiene un imán amoroso y feminista que nos une para siempre. A mis amigas de siempre, a las de cada una de las etapas de mi vida, a todas, por su inigualable presencia. Al Coco por ser el eslabón fundamental.

A Pipi por ser mi hermoso compañero de vida. Porque me animás a más, porque me inspirás. Por tus preguntas atentas y curiosas que me dejan reflexionando. Por el reencuentro hermoso que nos regalamos. Porque me invitaste a vivir a tu ciudad y me hiciste latir el corazón tan fuerte que pusimos la vida y la comodidad patas para arriba. Porque me abriste tu corazón hermoso y genuino. Por la vida que pasamos, los viajes en

barco, y los quince meses que nos extrañamos. Porque tu abrazo es el mejor lugar para estar. Por todo lo que vamos a vivir. Porque me querés como soy.

A mi mamá y a mi papá les agradezco por esta vida hermosa, por las alas enormes, de colores brillantes, por su amor desmedido, por su cuidado incondicional, por sembrarme la semilla del sacrificio, por convertirme en la mujer que soy llena de amor y amigas. A su lado todos los sueños son posibles. A mi hermano, mi compañero, mi mejor amigo, mi persona preferida en este mundo, la mente más serena y el corazón más caliente, de quien aprendo y con quién me vuelvo mejor. A Yaya por sus panqueques de manzana y una vida llena de risas y planes. A la Noni hermosa. A mis abuelos que me cuidan a donde quiera que vaya. A mis grandes amores, Neli, Vilma y Pedrito.

Al país que me vio nacer y crecer, que me permitió estudiar y concretar los sueños, que me abraza y me espera.

¡Gracias infinitas a todxs!

Resumen

L. monocytogenes es un patógeno oportunista de transmisión alimentaria. Presenta la particularidad de resistir a diversas condiciones de estrés pudiéndose adaptar mediante la producción de biofilms. Esta característica representa un grave problema para la industria alimentaria. Se clasifica en 13 serotipos, aunque sólo cuatro (1/2a, 1/2b, 1/2c y 4b) representan la causa del 89,0 al 98,0% de los casos de listeriosis en todo el mundo. Esto sugiere que determinadas cepas de *L. monocytogenes* tienen más probabilidades de causar enfermedad que otras. El objetivo del presente estudio fue detectar y serotipificar *Listeria monocytogenes* provenientes de distintas matrices de alimentos y monitoreos ambientales de plantas de procesamiento en Argentina. Dichas matrices constan de cárnicos, alimentos listos para consumo, bebidas hídricas, alimentos lácteos y vegetales congelados. Se analizaron 2124 muestras en el periodo 2016-2021, a partir de las cuales se detectaron 291 aislamientos compatibles con *L. monocytogenes* arrojando un porcentaje de positividad para este patógeno del 13,7%. Posteriormente se seleccionaron 180 cepas para análisis molecular de serogrupos mediante la puesta a punto de una técnica molecular. Si bien los serotipos 1/2a, 1/2b, 1/2c y 4b son los más frecuentemente detectados en productos alimenticios, en este estudio se observó que el serogrupo IIa (n=9) representa el 5,0%, IIb (n=116) representa el 68,9%, IIc (n=37) representa el 20,5% y IVb (n=10) representa el 5,6%. De las 180 cepas analizadas, 161 pertenecen a matrices alimentarias propiamente dicho y 19 pertenecen a cepas aisladas de monitoreos ambientales realizados en los establecimientos donde se manufacturan los alimentos.

Además se realizó la identificación a nivel de género y especie empleando MALDI-TOF MS y se observó que partiendo de medios de cultivo selectivos y diferenciales, se obtienen buenos resultados para tales fines.

Este trabajo resalta la importancia de la detección y serotipificación de *L. monocytogenes* para la toma de medidas accionables e identificación de brotes así como también es el primero en Argentina en describir un extenso estudio en matrices alimentarias.

Introducción

Enfermedades transmitidas por alimentos

Las enfermedades transmitidas por alimentos (ETAs) constituyen uno de los principales desafíos para la salud pública mundial. Las ETAs son provocadas por el consumo de productos alimenticios o agua contaminados con bacterias, parásitos, virus, hongos, las sustancias que estos producen o sustancias tóxicas en cantidades tales que afecten la salud de una persona en forma aguda o crónica (Torrens et al., 2015). Estos síntomas pueden durar algunos días, incluyen vómitos, dolores abdominales, diarrea y fiebre. La duración de los síntomas varía de acuerdo a la cantidad de bacterias o toxinas presentes en el alimento, la cantidad de alimento consumido y el estado de salud general de la persona, entre otros factores (Fernández et al., 2012).

Según la Organización Mundial de la Salud (OMS), las ETAs constituyen uno de los problemas de salud pública más relevantes a nivel mundial, tanto en países desarrollados como en países en vías de desarrollo. Pese a esto, el riesgo de padecer enfermedades de transmisión alimentaria es mayor en los países de ingresos bajos y medianos. Esto se debe directamente a la preparación de alimentos con agua no segura, la falta de higiene, las condiciones inadecuadas en la producción y almacenamiento de los alimentos. Además, la desigualdad en el acceso a la educación y la insuficiencia de compromiso político en materia de inocuidad alimentaria o su falta de aplicación también influye en la problemática (Wisbaum, 2011). Uno de los últimos informes de la OMS alerta que cada año hasta 600 millones de personas en todo el mundo, casi una de cada diez, enferman tras consumir alimentos contaminados. De estas personas, 420 mil mueren, siendo 125 mil niños y niñas menores de cinco años.

La industria de los alimentos evoluciona constantemente y la tecnología juega un papel fundamental en este sector. Los avances científicos, técnicos y tecnológicos permiten hoy producir alimentos que se adaptan a las demandas de los consumidores y los nuevos hábitos de consumo, con procesos productivos diversos, cubriendo la demanda de mercados

globales. Los cambios de hábitos en el consumo, la existencia de poblaciones susceptibles y las diversas adaptaciones de las poblaciones microbianas representan un nuevo desafío en el control de las ETAs (Arispe & Tapia, 2007).

Una salud

El concepto de “una salud” fue ideado para diseñar y aplicar programas, políticas, leyes e investigaciones, en los cuales, múltiples sectores trabajan para mejorar la salud pública. Los tres pilares fundamentales de este concepto son la inocuidad de los alimentos, el control de las zoonosis (enfermedades transmisibles entre animales y humanos) y el estudio de la resistencia a los antimicrobianos (Ferri, 2018). Además, según la Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE), el 60,0% de los patógenos que enferman al hombre provienen de los animales domésticos o salvajes (Castro, 2010).

La emergencia y reemergencia de enfermedades asociadas a los alimentos motivaron la revalorización del concepto “un mundo, una salud” por parte de la OMS, la Organización de la Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO) y la OIE, a saber que la salud humana y la sanidad animal son interdependientes y están vinculadas a los ecosistemas en los cuales coexisten (Ryu et al., 2017).

Abordar la salud desde esta perspectiva es fundamental ya que existen una gran cantidad de microorganismos que afectan tanto a los animales como a los humanos. El esfuerzo proveniente de un solo sector no puede prevenir o eliminar el problema y es por esto que se requieren de intervenciones multidisciplinarias que preserven la salud en su totalidad (Zunino, 2018).

Enfermedades zoonóticas

Las zoonosis son un grupo de enfermedades que se transmiten de forma natural de los animales a los humanos y viceversa. Los agentes infecciosos involucrados incluyen bacterias, virus, parásitos y hongos. El término deriva de dos vocablos griegos: zoon (animal) y nosos (enfermedad). En un sentido más estricto, las enfermedades que se transmiten del animal al hombre se denominan “antropozoonosis”, mientras que aquellas que se

transmiten del humano al animal se conocen como “zooantroponosis” (Messenger et al., 2014).

En los últimos años se ha observado una emergencia y reemergencia de algunas zoonosis, fenómeno vinculado estrechamente a cambios ecológicos y socioculturales en donde la población animal y humana comparten hábitat (Zaragoza et al., 2019).

La transmisión de las zoonosis puede ocurrir por diferentes vías, a través del contacto directo con un animal enfermo (por ejemplo Brucelosis), por medio de algún fluido corporal como orina o saliva (Leptospirosis), por el consumo de alimentos de origen animal que no cuenten con controles sanitarios correspondientes (Salmonelosis), por el consumo de frutas y verduras crudas mal lavadas o alimentos de origen animal (como es el caso de nuestro trabajo: Listeriosis) o mediante la presencia de algún intermediario (vector) como pueden ser los mosquitos u otros insectos (Báez, 2019).

Listeria monocytogenes

Generalidades

L. monocytogenes forma parte de la familia *Listeriaceae*, del género *Listeria*. Hasta el día de hoy se conocen veinte especies de *Listeria* que se subdividen en dos grandes grupos: *Listeria* sensu stricto, constituida por las especies de *Listeria monocytogenes*, *Listeria innocua*, *Listeria welshimeri*, *Listeria seeligeri*, *Listeria ivanovii* y *Listeria marthii*; y *Listeria* sensu lato, constituida por la especie *Listeria grayi*, *Listeria rocourtiae*, *Listeria fleischmannii*, *Listeria weihenstephanensis*, *Listeria floridensis*, *Listeria aquatica*, *Listeria cornellensis*, *Listeria riparia*, *Listeria grandensis*, *Listeria booriae*, *Listeria newyorkensis*, *Listeria costaricensis*, *Listeria goaensis* y *Listeria thailandensis* (Leclercq et al., 2019).

Dentro de este grupo, *L. monocytogenes* es la de mayor interés por ser responsable casi exclusiva de la listeriosis en el ser humano y *L. ivanovii* por ser patógena principalmente para los animales de la especie ovina y caprina pudiendo afectar también al ser humano (Allerberger & Wagner, 2010) (Gan et al., 2020). En el caso de *L. seeligeri* y *L. welshimeri*,

raramente causan infección en humanos y las demás no se asociaron con enfermedad animal o humana hasta el momento (Orsi et al., 2011).

Las bacterias pertenecientes al género *Listeria* son bacilos gram positivos cortos, regulares, no esporulados ni ramificados, que se observan en la tinción de Gram en disposición individual o formando cadenas cortas. Su tamaño puede variar entre 0,5 a 2 μm . Estas bacterias presentan la particularidad de presentar un tipo de movilidad llamado “tumbling” cuando es incubada entre 20°C y 25°C, siendo inmóvil a temperatura de 35°C. Es un microorganismo psicrótrofo con rango de temperatura de crecimiento entre 0°C y 45°C y su temperatura óptima de crecimiento es entre 30°C y 37°C. Puede crecer con niveles de pH entre 4,4 y 9,4, con una actividad de agua (a_w) $\geq 0,90$ y tolera concentraciones hasta 20,0% de NaCl (Milillo et al., 2012). Las colonias de *L. monocytogenes* en un medio agarizado son pequeñas (de 1 a 2 mm tras uno o dos días de incubación) y lisas. Se destaca su capacidad para producir β -hemólisis en agar sangre y el factor de CAMP (Christrie, Arkins, Munich - Petersen) (Mathakiya & Nayak, 2011).

L. monocytogenes es un patógeno oportunista que presenta la particularidad de resistir a diversas condiciones de estrés como congelación, secado, acidez y frío, pudiéndose adaptar a estas condiciones mediante la producción de biofilms. Esta característica representa un grave problema para la industria alimentaria por la dificultad en el control de las plantas de procesado (van der Veen et al., 2010).

L. monocytogenes se clasifica en 13 serotipos, aunque tan sólo tres (4b, 1/2a y 1/2b) representan por sí solos la causa del 89,0 al 96,0% de los casos de listeriosis en todo el mundo. Esto sugiere que determinadas cepas de *L. monocytogenes* tienen más probabilidades de causar enfermedad que otras (López et al., 2006).

Listeriosis como enfermedad transmitida por los alimentos

Por muchos años, *L. monocytogenes* se consideró patógeno de los animales y recién a partir de 1980 se empezó a considerar su papel como patógeno humano transmitido por el consumo de alimentos contaminados (Schlech et al., 1983).

Actualmente, se estima que *L. monocytogenes* es uno de los agentes más importantes de enfermedades de transmisión alimentaria. La posible explicación de esta enfermedad en humanos se debe a los importantes cambios a nivel de la producción, procesamiento y distribución de alimentos y materias primas, la refrigeración, los cambios de hábitos y la cultura de la alimentación de la población así como también un aumento de la susceptibilidad de las personas a la enfermedad (ancianos, personas gestantes, recién nacidos e inmunosuprimidos) incluyendo a los afectados por VIH (SIDA) (Shamloo et al., 2019).

Patogenia

La patogenia de la infección por *L. monocytogenes* aún no se encuentra del todo comprendida. Debido a que los alimentos son la principal ruta de entrada del patógeno, el tracto gastrointestinal es el primer sitio de contacto de *L. monocytogenes* en el hospedero (Vera et al., 2013). Esta bacteria es capaz de atravesar las tres barreras fisiológicas: intestinal, hematoencefálica y placentaria. Al cruzar la barrera intestinal, la bacteria se absorbe desde el lumen intestinal atravesando las células epiteliales y si el sistema inmune no logra controlar la infección, la bacteria continúa multiplicándose y la infección puede diseminarse al torrente sanguíneo. La mayoría de las bacterias alcanza el hígado y el bazo donde se replica en el interior de macrófagos o células epiteliales. La supervivencia del hospedero depende del desarrollo de una efectiva respuesta inmune adaptativa; de otro modo, la bacteria puede pasar al torrente sanguíneo y alcanzar cerebro o placenta, causando infecciones sistémicas potencialmente letales (Camejo et al., 2011). La capacidad de *L. monocytogenes* de replicarse en el citosol de células infectadas y diseminarse de célula-célula le permite evitar la respuesta inmune humoral. Además, *L. monocytogenes* produce infección grave debido a la capacidad que tiene de inducir su propia fagocitosis por células fagocíticas y no fagocíticas del huésped. Por esta razón, se considera un parásito intracelular facultativo (Pamer, 2004).

Formas clínicas

Listeriosis gastrointestinal no invasiva

Es la forma clínica más habitual y se encuentra vinculada con los brotes de toxiinfección alimentaria (Zhu et al., 2017). El inóculo necesario para causar enfermedad varía dependiendo de la cepa y de la situación del huésped. Los pacientes pueden ser portadores asintomáticos o sufrir deposiciones acuosas, náuseas, vómitos, cefalea, artromialgias y fiebre, síntomas que suelen autolimitarse, salvo que presenten alguna condición inmunosupresora (Artola et al., 2010).

Listeriosis invasiva

La listeriosis invasiva se produce cuando una infección inicial del tejido intestinal producida por *L. monocytogenes* deriva en la invasión de otras partes del organismo. Los órganos que se infectan más habitualmente son el útero grávido, el sistema nervioso central (SNC) y la sangre (Artola et al., 2010).

Principalmente se producen las siguientes infecciones invasivas:

Enfermedad gestacional y neonatal: para las personas gestantes, la forma más frecuente de presentación de la listeriosis es la fiebre con pocos síntomas acompañantes. La mayoría de estas personas presentan bacteriemia, síndrome seudogripal leve, fiebre, escalofríos, artromialgias, lumbalgia, tos, cefalea, mareo o síntomas gastrointestinales (Konar, 2017). La mayor gravedad es en el tercer trimestre, ya que puede producirse aborto, muerte fetal, mayor tasa de cesareas, prematuridad, sepsis y muerte neonatal. Los neonatos pueden adquirir la infección intraútero o durante el parto y sufrir sepsis, microabscesos y granulomas diseminados, infección respiratoria o meningitis, que se detectan en el nacimiento o luego, y conllevan a alta morbilidad y mortalidad. (C et al., 2008).

Bacteriemia: en inmunodeprimidos, la forma más frecuente, es la bacteriemia sin foco identificable que cursa con fiebre, deterioro rápido y a menudo fulminante (Lepe, 2020).

Infección del sistema nervioso central: los cuadros se pueden presentar como meningitis o meningoencefalitis. Afecta a neonatos (periodo perinatal precoz), adultos mayores e inmunodeprimidos. El cuadro se manifiesta con fiebre sutil y cambios cognitivos, hasta el curso fulminante (Jimenez et al., 2017).

Adaptación y resistencia de *L. monocytogenes*

L. monocytogenes es un patógeno resistente a una amplia gama de condiciones de estrés. Como consecuencia, este microorganismo es extremadamente difícil de controlar a lo largo de toda la cadena alimentaria, desde la producción hasta el almacenamiento y consumo. Los brotes frecuentes de infección por *L. monocytogenes* ilustran que las medidas de descontaminación y conservación no son suficientes para controlar a este patógeno. Con el fin de mejorar las medidas y que estas sean más eficientes para prevenir la contaminación durante el procesamiento y controlar el crecimiento durante el almacenamiento, es crucial conocer los mecanismos utilizados por *L. monocytogenes* para tolerar las condiciones de estrés en las diferentes matrices alimentarias y los entornos de procesamiento de alimentos (Bucur et al., 2018).

Capacidad de crecimiento a diferentes temperaturas

Los tratamientos térmicos y el control de la temperatura son estrategias que se han utilizado históricamente en la producción y conservación de los alimentos para prevenir o limitar la contaminación y la proliferación de patógenos transmitidos por alimentos. Sin embargo, la eficacia de los tratamientos térmicos contra *L. monocytogenes* está limitada por la capacidad intrínseca de este microorganismo para sobrevivir y replicarse activamente a temperaturas entre -0,4°C y 45°C (Chaturongakul et al., 2008) .

Resistencia a las altas temperaturas

Los tratamientos térmicos suaves (<100°C) se aplican principalmente en el procesamiento de alimentos para inactivar las células microbianas vegetativas de las bacterias que deterioran los alimentos y los patógenos transmitidos por los alimentos. Dichos tratamientos garantizan la seguridad alimentaria y una vida útil más prolongada siempre que los alimentos se envasen y almacenen de forma adecuada (van Boekel et al., 2010). Sin embargo, la principal preocupación con el procesamiento térmico de los

alimentos sigue siendo la capacidad de las bacterias patógenas lesionadas de manera subletal para recuperarse y crecer durante el almacenamiento posterior al procesamiento. Esto presenta particular relevancia para *L. monocytogenes* debido a su capacidad de crecer en un amplio rango de temperaturas.

La resistencia de las cepas de *L. monocytogenes* al calor varía significativamente entre los serotipos. De acuerdo a las investigaciones de Shen et al. (2014), las cepas pertenecientes al serotipo 1/2a mostraron una menor tolerancia al calor (hasta 2 log Unidades Formadoras de Colonias - UFC/ml), mientras que las cepas de los serotipos 1/2b y 4b exhibieron una variabilidad extensa (de indetectable a 4 log UFC/ml). La mayor tolerancia al calor se registró para una cepa de serotipo 7 (5 log UFC/ml) (Shen et al., 2014).

Las células de *L. monocytogenes* expuestas a tensiones subletales de temperatura pueden volverse considerablemente más resistentes al calor. Los investigadores anteriormente nombrados, encontraron que la exposición de *L. monocytogenes* a una temperatura de 48°C durante 30 minutos condujo a la adaptación al estrés por calor entre las células bacterianas. Además, el sometimiento a este leve estrés durante un corto tiempo no afectó la capacidad de crecimiento (Shen et al., 2014). También se demostró que la sal potencia la capacidad de *L. monocytogenes* para resistir los tratamientos térmicos (Jørgensen et al., 1995). Esto puede deberse al efecto protector de la disminución de la actividad del agua en el medio de crecimiento (Shebuski et al., 2000). La acidez es otro factor que puede influir en la termotolerancia de las bacterias (Ramos et al., 2014).

Resistencia a bajas temperaturas

L. monocytogenes se considera una bacteria psicrotolerante debido a su capacidad para resistir a temperaturas bajas como -0,4°C (Chan & Wiedmann, 2009). Esta tolerancia al estrés frío es responsable de la detección de *L. monocytogenes* en productos alimenticios refrigerados (Tasara & Stephan, 2006). Las bajas temperaturas dan como resultado una disminución de las tasas metabólicas y cambios en la composición de la membrana, expresión de proteínas de choque frío (Csps) y absorción de compuestos crioprotectores (Cordero et al., 2016; Neunlist et al., 2005; Phadtare et al., 1999).

La capacidad de *L. monocytogenes* de sobrevivir a la congelación y al almacenamiento a temperaturas inferiores a -18°C en carnes, también depende de la acidez del alimento. El daño que producen las bajas temperaturas a la estructura de la bacteria, se da en las primeras 24 horas de congelación y este daño permanece constante o bien se incrementa durante los 14 días siguientes. Aunque el daño celular hace perder la capacidad infectiva de la bacteria, esta puede recuperar su capacidad de multiplicación si está sometida a condiciones favorables para su crecimiento. Es por esta razón, que el pH del alimento es el factor que más influye en la capacidad de *Listeria* spp. para resistir a las bajas temperaturas. Así, valores de pH inferiores a 4,74 hacen que *L. monocytogenes* muestre una disminución en la recuperación de células que han sido dañadas por el frío (Flanders & Donnelly, 1994).

Resistencia a la acidez

La acidez es un método de conservación de alimentos ampliamente aplicado a productos lácteos, cárnicos y vegetales, y se logra principalmente mediante la fermentación por bacterias presentes en los alimentos crudos o añadidas como cultivos (Hill et al., 2017). Este efecto conservante se consigue por los productos del metabolismo que son ácidos orgánicos débiles (por ejemplo, acetato o lactato) que tienen actividad antimicrobiana y también por la inhibición del crecimiento microbiano (Caplice & Fitzgerald, 1999). *L. monocytogenes* tiene varios mecanismos para mantener su pH interno bajo condiciones de estrés ácido.

Resistencia a las bacteriocinas

Las bacteriocinas son péptidos antimicrobianos producidos por una amplia gama de bacterias ácido lácticas (BAL) y en su mayoría son activos contra bacterias gram-positivas, incluida *L. monocytogenes* (Chikindas et al., 2018). Las bacteriocinas se utilizan como aditivos alimentarios naturales y seguros que se emplean en una gran variedad de productos alimenticios (como frutas, verduras, productos lácteos y carnes). Estas se producen in situ mediante las BAL que se utilizan para la fermentación de los alimentos o se añaden de forma exógena (Silva et al., 2018). La mayoría de las bacteriocinas son específicas y actúan inhibiendo el crecimiento, alterando la homeostasis de la membrana y formando poros.

Un ejemplo de esto es la nisina que se usa en productos lácteos y cárnicos con el fin de inhibir el crecimiento de patógenos transmitidos por los alimentos, incluidos *L. monocytogenes* (Gharsallaoui et al., 2016).

Producción de Biofilms

La persistencia de residuos orgánicos en los entornos de procesamiento de alimentos puede dar lugar a la creación de sitios de refugio microbiano, biopelículas y nichos, que pueden servir como fuentes de contaminación cruzada. Los biofilms constan de células bacterianas encapsuladas en una matriz de exopolisacáridos que les permite adherirse entre sí y a superficies, y que además protege a las bacterias de condiciones adversas. Estas bacterias forman microcolonias dentro de una matriz en donde por medio de poros y canales permiten el transporte de oxígeno, nutrientes y residuos. Además esta matriz aumenta la resistencia a los desinfectantes. *L. monocytogenes* es uno de los patógenos que puede formar biopelículas.

Estos biofilms pueden formarse en todas las áreas de procesamiento de alimentos, incluidos pisos, paredes, tuberías y desagües. Muchas veces, la dificultad de limpiar y desinfectar las grietas, cintas transportadoras, pasteurizadores, entre otras áreas y equipamientos de difícil acceso, favorece la formación del biofilm. Esta formación de biofilms afecta la eficacia de los antimicrobianos (Sofos & Geornaras, 2010). Los patógenos como *L. monocytogenes*, pueden persistir en las plantas de procesamiento de alimentos desde meses hasta años (Tompkin, 2002). Es fundamental comprender las condiciones y los mecanismos que permiten que las bacterias se adhieran y formen biopelículas para poder desarrollar procedimientos de control efectivos (Sofos, 2009).

Epidemiología

La listeriosis es una enfermedad severa, prevenible y tratable. Es considerada una enfermedad relativamente rara (0,1 a 10 casos por millón de personas, dependiendo del país y la región) y grave. Aunque el número de casos es pequeño, la alta tasa de mortalidad de entre 20,0 y 30,0%, la convierte en un importante problema para la salud pública mundial (Hernandez-Milian & Payeras-Cifre, 2014).

Según los últimos datos del Centros para el Control y Prevención de Enfermedades (CDC, por sus siglas en inglés) en el año 2014, la incidencia fue cercana a 0,30 casos por cada 100.000 habitantes en Estados Unidos (675 casos reportados en 47 Estados y el Distrito de Columbia) (CDC, 2021). En la última información publicada por la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA, por sus siglas en inglés), durante el año 2018 se reportaron 2549 casos de listeriosis humana en la Unión Europea, con una tasa de hospitalización del 97,0% y 229 muertes, lo que implica una tasa de mortalidad del 15,6%. Particularmente en España, además, en ese mismo año, hubo 432 casos confirmados. Posteriormente entre agosto y septiembre de 2019 ha tenido lugar el brote de listeriosis más importante registrado en ese mismo país, asociado al consumo de carne mechada, afectando a 216 personas (*European Food Safety Authority*, n.d.).

Muchos de los estudios que se han realizado en América Latina, coinciden en que existe un subreporte de casos y una subestimación de la enfermedad. Sin embargo, se espera que por las condiciones sanitarias de muchos de estos países, la frecuencia y la letalidad sea elevada en comparación con países centrales (Castellanos et al., 2019; Mercado et al., 2012; Ramírez et al., 2007). En una investigación realizada en Chile, detectaron que las hospitalizaciones por listeriosis han aumentado en forma progresiva en los últimos años, concentrándose en los meses no calurosos y asociándose principalmente a pacientes adultos vulnerables (Sedano et al., 2013). En México, la situación es similar, la falta de datos exactos sobre la importancia de esta bacteria plantea la necesidad de concientizar a las instancias correspondientes para definir estrategias de búsqueda de *L. monocytogenes* en alimentos y de la recopilación de información precisa que permita conocer la importancia clínica y epidemiológica de la listeriosis (Castañeda-Ruelas et al., 2018). Por su parte, en un estudio realizado en Perú, *L. monocytogenes* ocupa el primer lugar como causa de meningitis neonatal, en donde la incidencia hospitalaria es de 1,5 casos por cada mil nacidos vivos y la letalidad del 3,8% (Lewis et al., 2017).

Según la bibliografía, la tasa de prevalencia de *L. monocytogenes* encontrada en alimentos puede variar entre 1,0% y 10,0%, pudiendo incluso ser mayor. Según estudios realizados entre septiembre de 2012 y enero de 2014 en China, se observó que la prevalencia total de *L. monocytogenes* fue 20,0% en alimentos crudos. Las muestras

comprendidas en ese estudio fueron vegetales, hongos comestibles, carne cruda, productos acuáticos y productos congelados (Wu et al., 2015).

Por su parte, un estudio realizado en Colombia en donde se realizó la búsqueda de *L. monocytogenes* en diversas muestras de manipuladores de alimentos de empresas de cárnicos y lácteos, se observó una prevalencia del 10,4% comparado con antecedentes bibliográficos que reportaron una prevalencia del 0,8%. En consecuencia, se demuestra una subestimación en la búsqueda y aislamiento de este patógeno en muestras de alimentos (Delgado et al., 2012).

Situación en Argentina

Es importante destacar que en Argentina, la listeriosis no es una enfermedad de notificación obligatoria y se cuenta con pocos datos sobre la prevalencia de *L. monocytogenes*, por lo que se puede asumir que existe una subnotificación de la enfermedad y el desconocimiento del real impacto en la salud pública nacional (Isequilla, 2018).

Desde el año 1985 y hasta el 2016, el Laboratorio Nacional de Referencia (LNR) registró 310 casos de listeriosis invasiva. Todos estos casos corresponden principalmente a sepsis y meningitis. Sin embargo, se desconoce la incidencia de *L. monocytogenes* en abortos espontáneos, dado que el aislamiento del microorganismo requiere de medios de enriquecimiento y selectivos complejos, no disponibles generalmente en los laboratorios de microbiología clínica tradicional (P. et al., 2006).

Hasta el presente no se documentaron brotes asociados a alimentos contaminados. Debido a las características únicas de la listeriosis, la vigilancia epidemiológica tradicional representa dificultades para la detección temprana. En el año 2018, la Administración Nacional de Medicamentos, Alimentos y Tecnología Médica (ANMAT) realizó el retiro preventivo del mercado de diferentes productos congelados a base de maíz y otros vegetales, de distintas marcas provenientes de una planta húngara. La decisión obedece a que el Sistema Europeo de Alerta Rápida para Alimentos y Piensos (RASFF, por sus siglas en

inglés) reportó que productos procesados en ese establecimiento estuvieron involucrados en un brote de listeriosis en Europa.

Con el anterior antecedente, en ese mismo año, la Comisión Nacional de Alimentos (CONAL), en la reunión N°124, y teniendo en cuenta la importancia y el impacto que esta temática presenta para los referentes de control de la inocuidad de alimentos en todo el país, acordó dar tratamiento en el marco del Programa Federal de Control de Alimentos (PFCA) al tema de vegetales congelados/supercongelados para abordar su tratamiento en un esquema integral y elaborar una propuesta con el fin de abrir el debate y generar acuerdos sobre las acciones a seguir.

En el año 2020, se resolvió incorporar al Código Alimentario Argentino (CAA) el Artículo 925 bis denominado “Los Vegetales Congelados/Supercongelados”. De esta manera, se incorporaron los criterios microbiológicos correspondientes a la Norma ISO 11290-1:2017 (*ISO 11290-1:2017, 2017*) para la búsqueda y el recuento de *L. monocytogenes* tanto en aquellos que no requieren tratamiento térmico como aquellos que sí lo requieren. A su vez, se incorporaron observaciones para los establecimientos elaboradores de estos productos para asegurar la calidad y salubridad de la comunidad. En caso de no cumplir con los criterios microbiológicos establecidos, se deberán adoptar medidas de gestión inmediatas que correspondan según el riesgo. Así mismo, la autoridad sanitaria deberá evaluar los antecedentes del establecimiento y los resultados de las auditorías para ampliar la evidencia de los hallazgos encontrados y tomar las medidas pertinentes en cada caso (*BOLETIN OFICIAL REPUBLICA ARGENTINA - SECRETARÍA DE CALIDAD EN SALUD Y SECRETARÍA DE ALIMENTOS, BIOECONOMÍA Y DESARROLLO REGIONAL - Resolución Conjunta 2/2020, n.d.*).

Alimentos asociados a la transmisión de *L. monocytogenes*

Los alimentos que más frecuentemente se han visto involucrados en los brotes de esta enfermedad son:

- 1) Alimentos listos para consumo.
- 2) Productos cárnicos.
- 3) Lácteos elaborados con leche sin pasteurizar.
- 4) Vegetales crudos y congelados.

5) Pescados crudos y ahumados.

Alimentos listos para consumo

Los alimentos más frecuentemente implicados en los brotes por *L. monocytogenes* son aquellos que se encuentran listos para el consumo, refrigerados y con una vida útil prolongada. Principalmente dentro de esta categoría encontramos pescados ahumados, productos cárnicos tratados por calor (patés, fiambres, salchichas cocidas, etc.) y quesos de pasta blanda.

La mayoría de los alimentos listos para consumo incluyen una fase de la producción en la que se elimina *Listeria* (cocción, horneado, etc.), lo que garantiza su seguridad. Por eso, la contaminación de estos alimentos suele producirse después de tratamiento térmico y antes de su envasado final por contacto con materias primas contaminadas (contaminación cruzada) o con superficies mal desinfectadas de la planta de producción (mesas de trabajo, utensilios, cintas transportadoras, etc.) (Ballesteros Arribas, 2019).

Productos cárnicos

Los productos cárnicos y sus derivados, se consideran como una de las principales fuentes de listeriosis humana causada por *L. monocytogenes*. Según la bibliografía publicada, la alta prevalencia en la carne y los productos cárnicos contaminados por *L. monocytogenes* pueden ocurrir a nivel de procesamiento, lo que puede estar relacionado con las condiciones de higiene de los establecimientos (M. Chen et al., 2019).

Otros estudios informaron que las probabilidades de contaminación cruzada de *L. monocytogenes* puede ser mediante tablas de cortar, balanzas, cajas de fiambres, fregaderos de preparación de fiambres, desagües de piso, pisos de los frigoríficos y estantes para cuchillos (Hoelzer et al., 2012).

Debido a estas razones, la carne y los productos cárnicos, desempeñan un rol fundamental en las enfermedades de transmisión alimentaria, fundamentalmente en la listeriosis humana lo que plantea un grave problema para la salud pública de los

consumidores (M. Chen et al., 2019) y una matriz fundamental para control por parte de las entidades sanitarias.

Productos lácteos

Los productos lácteos, en particular los quesos blandos, son una gran preocupación para la industria láctea y las autoridades de salud pública, ya que son una fuente principal en los brotes de listeriosis. Los quesos ofrecen un ambiente adecuado para la supervivencia y crecimiento de *L. monocytogenes*, permitiendo que este patógeno presente respuestas de tolerancia que favorecen su instalación en el queso y su persistencia en las plantas procesadoras de lácteos. El cumplimiento de las Buenas Prácticas de Manufactura (BPM), la observación de los Puntos Críticos de Control del Análisis de Peligros (HACCP, por sus siglas en inglés) y la vigilancia del patógeno en el entorno de elaboración del queso, son cruciales para ofrecer a la población un producto seguro (Melo et al., 2015).

La pasteurización es un tratamiento eficaz contra patógenos transmitidos por productos lácteos. Sin embargo, los quesos son productos listos para consumo, que no presentan ninguna instancia de tratamiento térmico previo a su consumo y generalmente se conservan a temperaturas de refrigeración que permiten la supervivencia y proliferación de bacterias psicrótroficas como *L. monocytogenes*. Es por esto que, la pasteurización de la leche cruda, no elimina los riesgos de contaminación de los productos lácteos por *L. monocytogenes* (Gould et al., 2014). Debido a estas razones, los productores de quesos consideran a *L. monocytogenes* como el principal peligro en la industria alimentaria y la salud humana (Le et al., 2014).

Vegetales y vegetales congelados

La provisión de vegetales durante cualquier época del año se debe a la tecnología de la congelación. Esta instancia de preservación permite incrementar la vida útil de los alimentos, contribuyendo a reducir el desperdicio. A pesar de que la congelación de los vegetales es una tecnología que permite mantener parte de los nutrientes, puede presentar una serie de riesgos microbiológicos para el consumidor, puesto que en este proceso los alimentos no se someten a ningún tratamiento térmico de conservación. Debido a su

capacidad de resistir bajas temperaturas, en este tipo de alimentos, *L. monocytogenes* presenta particular importancia (Panadero et al., 2019).

Monitoreo ambiental

L. monocytogenes tiende a ingresar en las plantas procesadoras de alimentos desde el exterior por parte de los operarios, así como también en el transporte utilizado para el ingreso de las materias primas, por medio de animales que excretan la bacteria o tengan la piel contaminada, mediante vegetales crudos contaminados, etc. Una vez dentro de la industria puede llegar al producto por medio de los manipuladores, las superficies de contacto, los equipos y las herramientas de trabajo o el propio ambiente en general (Sanz & Luis, 2017). La resistencia y persistencia previamente mencionadas de esta bacteria dificultan su eliminación, que junto con las altas tasas de mortalidad en los seres humanos, hacen que las industrias deban establecer un plan de control que garantice la seguridad de los alimentos elaborados (Nüesch-Inderbinnen et al., 2021).

Para prevenir la contaminación de los alimentos con esta bacteria, es fundamental las buenas prácticas de manufactura e higiene y el control efectivo de la temperatura en toda la cadena de producción alimentaria, incluyendo la distribución y el almacenamiento de alimentos. Además se debe evitar la contaminación cruzada y controlar tanto las fuentes y vías de contaminación por *L. monocytogenes*, como su crecimiento en el producto hasta el final de su vida útil (Sanz & Luis, 2017).

Monitoreos y puntos de control según CAA

El CAA en el capítulo II artículo 18 bis (ANMAT, 2017) detalla que los establecimientos elaboradores, industrializadores y/o fraccionadores, deberán respetar las “Directrices para la Aplicación del Sistema de Análisis de Peligros y Puntos Críticos de Control – HACCP”. El monitoreo debe proporcionar información a tiempo para poder realizar las correcciones de modo de asegurar el control del proceso. Los datos obtenidos del monitoreo deberán ser evaluados por el personal designado para este propósito en cada una de las industrias y se deberán tomar medidas. Si el monitoreo no es continuo, su frecuencia deberá ser suficiente como para garantizar que los puntos críticos de control (PCC) estén revisados y

comprobados. Además, todas las actividades del monitoreo deben documentarse y todos los registros y documentos relacionados con el monitoreo de los PCC deberán estar firmados por la persona o personas encargadas de la tarea.

Legislación

La dosis infectiva de *L. monocytogenes* es de 10^2 UFC en el caso de los grupos susceptibles o de riesgo, y de 10^{4-8} para la población inmunocompetente (Food and Agriculture Organization of the United Nations, 2004; Liu et al, 2008b; Ray & Bhunia, 2013). Pese a esto, la relación dosis-respuesta de la listeriosis humana y el rol de la virulencia aún no se encuentran bien dilucidadas. Según un modelo utilizado por la EFSA, el 92,0% de los casos de listeriosis invasiva serían atribuibles a dosis superiores a 100.000 UFC por porción. Los brotes se relacionan principalmente con alimentos que presentan altos niveles de *L. monocytogenes*. Pese a que existen evidencias de la variabilidad de la patogenicidad entre cepas, en la actualidad continúan considerándose todas las cepas de *L. monocytogenes*, igualmente virulentas.

La cantidad de *L. monocytogenes* tolerada por gramo de alimento, varía según los distintos países del mundo y se encuentran reguladas por diversas legislaciones:

- Normativa de la Unión Europea: máximo de 100 UFC/g en alimentos que se comercializan dentro de su vida útil, como ser la carne picada, alimentos listos para consumo, preparados de carne jamón, paleta cocida, frutas y hortalizas, leche pasteurizada, quesos, subproductos lácteos, anchoas, salmón, entre otros. En otros casos se exige ausencia en 25 g de alimento.
- Normativa EE.UU: 0 UFC en 25 g de muestra.

En Argentina, el CAA (*Código Alimentario Argentino*, 2018), exige en quesos de mediana, alta y muy alta humedad, ausencia de *L. monocytogenes* en 25 g de muestra, al igual que en el queso mozzarella, queso rallado, requesón, entre otros (Capítulo VIII: alimentos lácteos). Indica además que no debe haber *L. monocytogenes* en 25 g de: salazones (cocidos y crudas), jamón crudo, pernil de cerdo, chacinados (embutidos y no embutidos) y huevo cocido (con y sin cáscara) (Capítulo VI: Alimentos cárneos y afines).

El artículo 156 tris (Capítulo III) corresponde a las comidas preparadas listas para consumo: preparaciones con o sin cocción de uno o varios productos alimenticios de origen animal o vegetal con o sin la adición de otras sustancias autorizadas para el consumo. En este tipo de preparaciones, el CAA, exige la ausencia de *L. monocytogenes* en 25 g de alimento.

Variabilidad de la virulencia en las distintas poblaciones de *L. monocytogenes*

La contaminación de alimentos con *L. monocytogenes* es muy frecuente y por lo tanto la exposición de la población suele ser muy amplia. Pese a esto, la enfermedad se asocia con una pequeña subpoblación de esta especie bacteriana y se da principalmente en algunos individuos susceptibles. El estudio de serotipos y subtipos moleculares de *L. monocytogenes* responsables en los brotes epidémicos de listeriosis, fue el puntapié inicial de la idea de variabilidad de la virulencia. De esta manera, se demostró que un pequeño número de serotipos y clones están implicados en brotes (Y. Chen et al., 2005). Gracias a esto, se conoce que existen distintos grupos de cepas genéticamente homogéneas que podrían tener distinto potencial patogénico (Pohl et al., 2006). Es por esta razón que identificar una subespecie de *L. monocytogenes* de las cepas que producen listeriosis y evaluar su potencial patogénico, es primordial para controlar y prevenir la enfermedad.

Serovariedades de *L. monocytogenes*

En la actualidad, se conocen cuatro serogrupos que por su antígeno somático (O) (1/2, 3, 4 y 7), y combinados con los antígenos flagelares (H) conforman hasta el momento trece serovariedades o serotipos de *L. monocytogenes*: 1/2a, 1/2b, 1/2c, 3a, 3b, 4a, 4ab, 4b, 4c, 4d, 4e y 7 (Seeliger & Höhne, 1979; Struijk & Mossel, 2003). Sin embargo, cuatro de ellos (1/2a, 1/2b, 1/2c y 4b) han sido aislados en aproximadamente el 98,0% de los casos humanos y animales (Graves et al., 2007; Seeliger & Höhne, 1979; Tappero, 1995). Algunas de estas serovariedades son compartidas por *L. innocua*, que es considerada la variante no patógena de *L. monocytogenes* (Tabla 1).

Table 1: Serovariedades según especie

Espece	Serovariedad
<i>Listeria monocytogenes</i>	1/2a, 1/2b, 1/2c, 3a,3b, 3c, 4a, 4ab, 4b, 4c, 4d, 4e y 7
<i>Listeria ivanovii</i>	5
<i>Listeria innocua</i>	4ab, 6a, 6b
<i>Listeria welshimeri</i>	6a, 6b
<i>Listeria seeligeri</i>	1/2b, 4c, 4d, 6b

De esto se desprende que no todas las cepas de *L. monocytogenes* tienen igual capacidad de causar enfermedad en humanos (den Bakker et al., 2008; Doumith, Cazalet, et al., 2004; Ragon et al., 2008; Velge & Roche, 2010). Como se mencionó anteriormente, los serotipos responsables de la mayoría de las listeriosis humanas han sido: 1/2a, 1/2b, 1/2c y 4b; sin embargo, caracterizaciones fenotípicas y genotípicas relacionadas sugieren que el serotipo 4b ha sido responsable de los brotes más importantes de listeriosis humanas transmitidas por alimentos. Por otra parte, en ambientes de fábricas y en alimentos, se han aislado con mayor frecuencia los serotipos 1/2a y 1/2b (Muñoz, 2012).

L. monocytogenes es un patógeno con estructura clonal y su potencial patogénico difiere entre los diferentes grupos clonales, así como también la especificidad por el huésped y la adaptación a diferentes nichos ecológicos. Además se demostró que *L. monocytogenes* se divide en tres linajes según la secuencia de los genes de virulencia *hly*, *iap* y *fla* que codifican la flagelina. El linaje I contiene las serovariedades 1/2b, 3b, 3c y 4b, el linaje II comprende las serovariedades 1/2a, 1/2c y 3a y el linaje III las serovariedades 4a y 4c. Aquellos aislamientos del linaje I incluyen los clones epidémicos de *L. monocytogenes* responsables de la mayor cantidad de casos humanos de listeriosis. Los pertenecientes al linaje II provienen mayoritariamente de muestras de alimentos y ambiente, y los del linaje III provienen fundamentalmente de animales (Tabla 2).

Tabla 2: Linajes de *Listeria monocytogenes*

Linaje	Serovariedad	Fuente
--------	--------------	--------

I	1/2b, 3b, 3c, 4b	Humanos
II	1/2a, 1/2c, 3a	Alimentos y ambiente
III	4a, 4c	Animales

Identificación de *L. monocytogenes* y sus serotipos

En la actualidad, existen gran cantidad de métodos disponibles en el mercado para la detección e identificación de *L. monocytogenes* en muestras de alimentos y ambiente. Pese a esto, las pruebas microbiológicas convencionales, continúan utilizándose como técnica de referencia o “gold standard” frente a las cuales se comparan y validan todos los demás métodos. Las técnicas convencionales son muy sensibles y tienen la ventaja de que no requieren equipamiento sofisticado ni inversiones costosas. Pero también presentan la desventaja de que se llevan a cabo en un período de tiempo considerable, la experiencia práctica del operador, la necesidad de productos químicos, reactivos y medios diversos y la subjetividad relativa que supone la interpretación del crecimiento bacteriano en medios selectivos y diferenciales (Merino, 2011).

Método de aislamiento convencional

El aislamiento para la posterior identificación microbiana de *L. monocytogenes* a partir de muestras de alimentos requiere la utilización de medios de cultivo selectivos y diferenciales e instancias de enriquecimiento que permitan la multiplicación de las bacterias hasta un número suficiente que asegure la detectabilidad.

El Comité Técnico de la Organización Internacional para la Estandarización ISO/TC 34, Subcomite SC 9, Microbiología de Productos Agroalimentarios, afirma que la Norma ISO 11290:2017, partes 1 y 2, puede utilizarse para la detección de *L. monocytogenes* y *Listeria* spp. en gran variedad de muestras de alimentos.

Estudio de serotipos de *L. monocytogenes*.

El estudio de serotipos constituye una herramienta importante como primer nivel de diferenciación de las cepas de *L. monocytogenes*. La serotipificación de este patógeno se

utiliza en los estudios epidemiológicos, a pesar de poseer una capacidad de discriminación baja y que existen cepas no serotificables (Jeffers et al., 2001). Sin embargo, constituye una técnica valiosa para llevar a cabo la vigilancia y el estudio de brotes (Callejo et al., 2008). Una misma cepa, de un mismo origen, puede sobrevivir y propagarse durante largo periodo de tiempo y causar varios brotes, lo que da como resultado una epidemia. Una premisa básica es que los aislamientos que forman parte de la misma cadena de transmisión y son descendientes de la cepa inicial, se denominan clones. En este caso, una función importante de la subtipificación molecular es identificar con precisión la relación clonal entre los aislados reconociendo tempranamente un brote y colaborar en la identificación de las rutas de transmisión. Por lo tanto, el criterio más importante para la subtipificación molecular es la relevancia epidemiológica, que se define como la capacidad de agrupar aislados que están asociados epidemiológicamente con una epidemia/brote particular y separa estos aislados de aquellos que no están asociados (Y. Chen et al., 2005).

La tipificación de *L. monocytogenes* realizada mediante electroforesis en gel de campo pulsado (PFGE), es el método de subtipificación estándar para detectar brotes de listeriosis. Dicho método es muy preciso y reproducible para la comparación de estructuras finas y la tipificación molecular de *L. monocytogenes* (Brosch et al., 1996). Sin embargo, también requiere mucho trabajo y tiempo por lo que, con fines prácticos, se realiza la tipificación a nivel de serogrupo.

La serotipificación de *L. monocytogenes* también se puede realizar con métodos de aglutinación tradicionales pero su uso se encuentra limitado por el alto costo que tienen los reactivos de alta calidad, la disponibilidad y la necesidad de estrictos conocimientos técnicos para realizar el ensayo. Además, la reproducibilidad de la serotipificación no siempre es satisfactoria (Schönberg et al., 1996). En este marco, distintas técnicas de reacción en cadena de la Polimerasa (PCR) convencionales tomaron relevancia para la detección de serogrupos y serotipos de *L. monocytogenes* (Borucki & Call, 2003; Y. Chen & Knabel, 2007; Doumith, Buchrieser, et al., 2004).

Detección de serogrupos de *L. monocytogenes*

La detección de los serogrupos de *L. monocytogenes* se realiza mediante PCR múltiple, realizada por Doumith et al. (2004). Mediante esta técnica se pueden identificar cuatro serogrupos moleculares:

- Serogrupo IIa (incluye serotipos 1/2a, 3a).
- Serogrupo IIb (incluye serotipos 1/2b, 3b y 7).
- Serogrupo IIc (incluye serotipos 1/2c y 3c).
- Serogrupo IVb (incluye serotipos 4b, 4d y 4e).

Este procedimiento se utiliza para la investigación de brotes. De esta manera, la información del serogrupo permite discriminar entre los aislamientos que probablemente pertenezcan a un brote y los que no forman parte de este disminuyendo el número de cepas a las cuales se les debería realizar la identificación de serotipo por PFGE. Además, esta identificación se utiliza para la vigilancia microbiológica a largo plazo de la listeriosis humana. Para la industria alimentaria, el rastreo de cepas contaminantes dentro de la cadena alimentaria y el entorno vegetal es de primordial importancia (Doumith, Buchrieser, et al., 2004).

Identificación empleando MALDI-TOF MS

Generalidades

Existen métodos de identificación alternativos que superan las dificultades de los métodos tradicionales y en las últimas décadas han ganado espacio en el laboratorio de microbiología. El desarrollo de la tecnología MALDI-TOF MS (matrix assisted laser desorption ionization-time of flight-mass spectrometry, en español: desorción/ionización láser asistida por una matriz con detección de masas por tiempo de vuelo) ha permitido la utilización de la espectrometría de masas en la identificación de microorganismos mediante el análisis de proteínas, principalmente ribosomales, a través de la creación de un espectro de masas que es específico para cada género y especie (Patel, 2015).

Antecedentes del empleo de MALDI-TOF MS en aislamientos de *L. monocytogenes* provenientes de alimentos

Las investigaciones sobre la aplicación de MALDI-TOF MS para la identificación de aislamientos de fuentes de alimentos y bebidas son escasas comparadas a las aplicaciones en microbiología clínica, pese a esto, en los últimos años se ha observado un crecimiento sostenido en las publicaciones en esta temática (Angelakis et al., 2011; Doan et al., 2012; Fernández-No et al., 2010).

Algunas investigaciones realizadas en aislamientos de *L. monocytogenes* provenientes de matrices alimentarias aseguran que la identificación a nivel de especie depende de las condiciones de cultivo y que es más efectiva para los aislamientos cultivados en agar cromogénico Agar Listeria Ottaviani Agosti (ALOA) durante 24 h (Jadhav et al., 2015). Por otra parte, otras investigaciones revelan que la identificación de *Listeria* spp. utilizando MALDI-TOF MS, solo podría lograrse a nivel de género a excepción de *L. grayi* (Farfour et al., 2012).

Por su parte, el manual de la Red Nacional de Espectrometría de Masas aplicada al laboratorio de Microbiología Clínica proporciona la siguiente recomendación: MALDI-TOF identifica correctamente a nivel de género, pero no discrimina a nivel de especie (generalmente entre *L. monocytogenes* y *L. innocua*) aún con valores de score >2,0 (Rocca et al., 2020). El fabricante recomienda la extracción etanólica para la identificación correcta a nivel de especie; sin embargo, es conveniente la confirmación de la especie con pruebas fenotípicas.

Debido a las preocupaciones en la salud pública y las estrictas regulaciones asociadas con la presencia de este patógeno en alimentos y entornos de procesamiento de alimentos es que son necesarias las técnicas de detección y subtipificación rápidas y confiables (Jadhav et al., 2015). Es por esta razón, que las investigaciones acerca de la detección de linajes de *L. monocytogenes* se encuentran en alza.

Objetivos

Objetivo general

Detectar y serotipificar *Listeria monocytogenes* en distintas matrices de alimentos.

Objetivos particulares

- 1) Realizar la búsqueda y aislamiento (según ISO 11290:2017) de *L. monocytogenes* en distintas matrices de alimentos derivados a un laboratorio de microbiología de alimentos en la Ciudad Autónoma de Buenos Aires correspondientes al periodo 2016-2021.
- 2) Efectuar la serotipificación molecular de *L. monocytogenes* mediante la puesta a punto e implementación de una técnica molecular de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR múltiple) para la detección de distintos serogrupos de *L. monocytogenes* (serogrupos IIa, IIb, IIc, IVb).
- 3) Llevar a cabo la identificación de *L. monocytogenes* a nivel de especie empleando MALDI-TOF MS partiendo desde el medio de cultivo Agar Cromogénico para *Listeria* de Acuerdo a Ottaviani y Agosti (ALOA).

Capítulo 1: Análisis de muestras totales

Materiales y métodos

Equipos

- Dilumat Start (BPS-04). Biomerieux.
- Agitador Stomacher (AGI-16). I Mix, Interlab.
- Equipo de Osmosis inversa (OSM-05).
- Autoclave Chamberland (ATC-07, ATC-03).
- Camara frigorifica (CFR-01).
- Estufa de incubación a 37°C (EST-25). Sanjor.
- Quemador de ansas 400 (ETR-06). ORL.
- Campana de bioseguridad (CAM-01). Steril GARDHood.
- Micropipetas de 10 ul, 20 ul, 200 µl y 1000 µl (PIP-ALI). Thermo Scientific.
- Vortex (AGI-19). Dragon-Lab.
- Freezer -70°C (FRI-01).
- Freezer -20°C (FRI-08). Whirlpool.
- Heladera Mabe (HEL-45).
- Heladera Whirlpool (HEL-44).
- Baño termostático estacionario (BAN-15). Viking, modelo Manson.

Reactivos

- Suplemento Citrato Férrico de amonio 5% esteril. Biokar (Zac de Ther, Francia).
- COMPASS Listeria agar suplemento selectivo. Biokar (Zac de Ther, Francia).
- COMPASS Listeria agar suplemento enriquecedor. Biokar (Zac de Ther, Francia).
- Suplemento selectivo para Listeria. PALCAM. Según Van Netten. Bioartis (Buenos Aires, Argentina).
- L-Rhamnosa. Rosco (Taastrup, Dinamarca).
- D-Xylosa. Rosco (Taastrup, Dinamarca).

Medios

- Half Fraser Broth (HFB)/Fraser Broth (FB). Biokar (Zac de Ther, Francia).
- COMPASS Listeria - ALOA (Agar Listeria de acuerdo a Ottaviani y Agosti). Biokar (Zac de Ther, Francia).
- PALCAM Listeria Agar Selectivo. Bioartis (Buenos Aires, Argentina).
- Agar Sangre Ovina (ASO). Britania (Buenos Aires, Argentina).
- TS-YEA (Trypteina Soja extracto de levadura agar). Según los componentes.
- Brain Heart Infusion (BHI). Oxoid (Hampshire, Reino Unido).
- Trypteina Soja Broth (TSB). Acumedia (Michigan, Estados Unidos).
- Glicerol. Biopack (Buenos Aires, Argentina).

Cepas control

Para la búsqueda e investigación de este patógeno, se utilizaron cepas control de *Listeria monocytogenes* ATCC 19111 y *Listeria innocua* ATCC 33090. Para la reacción de CAMP, se utilizó la cepa de *Rhodococcus equi* ATCC 6939 y *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. Además se utilizó una cepa de *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 como control negativo. Todas las cepas se inocularon en 5 ml de BHI y se incubaron a $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ durante 18 horas. Luego se repicaron en Agar Sangre Ovina, incubando a $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ durante 24-48 horas.

Muestreo

Lugar y periodo de muestreo

El estudio de búsqueda y aislamiento de *L. monocytogenes* comenzó en el año 2016 y se extendió hasta marzo de 2021 en la Ciudad Autónoma de Buenos Aires.

Especificaciones para la toma de muestra

La toma de muestra propiamente dicha, fue realizada por los clientes en plantas procesadoras de alimentos, frigoríficos, compañías procesadoras de carne, supermercados, comedores y otros expendedores de alimentos.

Las especificaciones generales del laboratorio para la toma de la misma fueron las siguientes:

- Las muestras deben ser enviadas en bolsa estéril y refrigeradas en contenedor entre 0-7°C.
- Almacenamiento: en caso de no ser enviadas inmediatamente al laboratorio, las materias primas de origen animal deben ser refrigeradas preferentemente entre 0°C y 4°C y hasta un máximo de 7°C. Otras materias primas, se deben almacenar a la menor temperatura que permita conservar su calidad.
- La cantidad de muestra debe ser suficiente para realizar el ensayo y guardar contramuestra para una futura repetición. Se aconseja enviar como mínimo 100 g.

Tamaño de la muestra

Entre el año 2016 y el 2021, se llevaron a cabo 2124 peticiones en matrices alimentarias y monitoreos ambientales recolectadas de distintos orígenes y establecimientos a las cuales se les solicitaba la búsqueda de *L. monocytogenes* y *Listeria* spp. para analizar mediante la norma ISO 11290:2017 (*ISO 11290-1:2017*, 2017). De la totalidad de las muestras, se obtuvieron 291 aislamientos compatibles con *L. monocytogenes*. (Figura 1).

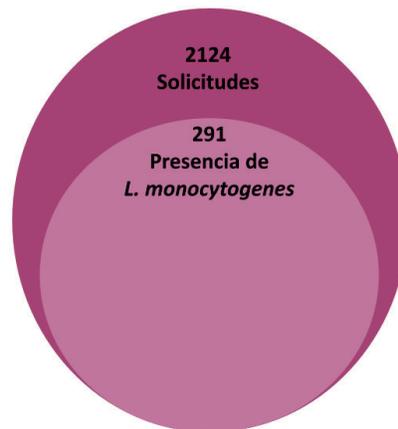


Figura 1: Diagrama del tamaño de las muestras (capítulo 1)

Matrices

Las matrices en las cuales se ha buscado y encontrado *L. monocytogenes* presentan múltiples orígenes. Para facilitar esta división, se tomó como referencia los distintos capítulos del Código Alimentario Argentino (Tabla 3).

Tabla 3: Capítulos del CAA y alimentos con presencia de *L. monocytogenes*

Capítulo del CAA	Descripción	Alimentos involucrados
Capítulo III - Condiciones generales (Artículo 156 tris)	Alimentos listos para consumo	Sanguches de jamon y queso, bagel con lomito ahumado y queso, rechessa tres quesos, ensaladas, ciabattas, wrap de jamón y queso, bagel de huevo y panceta, empanadas de queso y hamburguesa y empanadas de pollo.
Capítulo VI	Alimentos cárneos y afines	Carne vacuna, pollo y chacinados tanto embutidos (salames y salchichas) como salazones (paleta, fiambre cocido de pata de cerdo y bondiola).
Capítulo VIII	Alimentos lácteos	Queso y mozzarella feteada.
Capítulo XI (Artículo 925 bis)	Alimentos vegetales	Brócoli congelado envasado.
Capítulo XII	Bebidas hídricas, agua y aguas gasificadas	Helados.

Obtención de aislamientos y procesamiento de muestras

Detección de *Listeria monocytogenes* y *Listeria spp.* de acuerdo a Norma ISO 11290:2017

Preparación de la muestra

Los envases intactos de las muestras que arriban al laboratorio se desinfectaron con etanol al 70% en el sitio de la incisión previo a la toma de muestra.

Primer enriquecimiento selectivo

Se pesaron $25 \text{ g} \pm 2,5 \text{ g}$ de muestra en $225 \text{ ml} \pm 22,5 \text{ ml}$ de caldo HFB en una bolsa estéril (Whirl-pak® sampling bag) en Dilumat programado para que dispense una proporción 1:10 de caldo. Luego se agitó en agitador tipo stomacher durante dos minutos. En el caso de las esponjas, se utilizaron $90 \text{ ml} \pm 9 \text{ ml}$ de HFB en Dilumat programado. Posteriormente se incubó a $25\text{h} \pm 1\text{h}$ a $30^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$.

Segundo enriquecimiento selectivo

Se transfirieron $0,1 \text{ ml} \pm 0,02 \text{ ml}$ del HFB en $10 \text{ ml} \pm 0,5 \text{ ml}$ de FB. Se incubó a $37^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$ por $24\text{h} \pm 2\text{h}$. En el caso de búsqueda de otras especies de *Listeria* spp., se incubó 24h adicionales.

Estriado en placas de agar selectivo y diferencial

Se tomó una ansada del enriquecimiento de HFB y del FB y se estrió en una placa de ALOA y posteriormente una placa de PALCAM como segundo medio de cultivo selectivo y diferencial. Según las especificaciones del agar ALOA, se incubó a $37^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$ por $48\text{h} \pm 2\text{h}$. El agar PALCAM se incubó a $35^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$ por $48\text{h} \pm 2\text{h}$.

Las colonias presuntivas de *L. monocytogenes* en el agar ALOA se observaron de color verde azuladas rodeadas de un halo opaco. Las presuntivas de *Listeria* spp. se observaron verde azuladas sin halo. Aquellas colonias compatibles con *L. monocytogenes* o *Listeria* spp. que se observaron a las 24h en agar ALOA fueron identificadas. En los casos en los cuales no se observaron colonias características a las 24h se continuó la incubación de las placas hasta las 48h.

En el agar PALCAM, las colonias características del género *Listeria* spp. se observaron grises a verdes rodeadas de halos de color marrón oscuro a negro.

Caracterización fenotípica de *Listeria* spp.

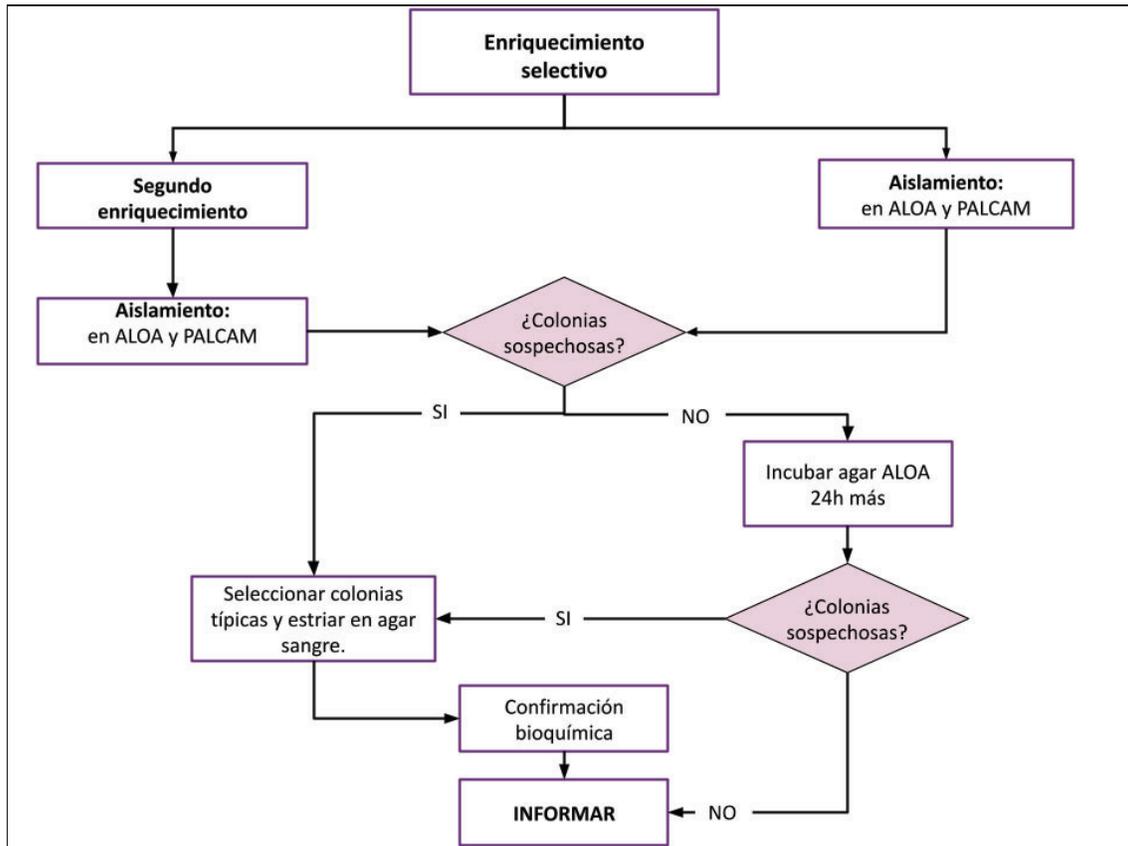
Pruebas bioquímicas y fisiológicas: para la identificación de las especies de *Listeria* spp. se realizaron las siguientes pruebas.

1. Producción de hemólisis: a partir del medio ALOA o PALCAM (selectivo y diferencial), se tomó una colonia característica aislada y se sembró sobre agar sangre. En simultáneo se realizó el mismo procedimiento con el control positivo (*L. monocytogenes* ATCC 19111) y el control negativo (*L. innocua* ATCC 33090) para la hemólisis. Luego se incubó a $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ durante 24h. Las cepas compatibles con *L. monocytogenes* mostraron una zona clara, estrecha e iluminada (denominada beta-hemólisis) en el agar sangre. *L. innocua*, por su parte, no mostró una zona clara evidente alrededor de la estría.
2. Fermentación de hidratos de carbono: a partir de la placa de agar sangre, se realizaron dos suspensiones en solución fisiológica. A una de ellas se le adicionó un disco de L-Rhamnosa y a la otra uno de D-Xylosa. Posteriormente se incubaron ambas suspensiones a $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ y se evaluaron a las 4h y a las 24h.
3. Prueba de CAMP: la prueba de CAMP se realizó en agar sangre conjuntamente a una cepa ATCC de *Staphylococcus aureus* (evidenciando una CAMP positiva) y de *Rhodococcus equi* (evidenciando una CAMP negativa). Simultáneamente se sembraron las cepas control (*L. monocytogenes* y *L. innocua*) y los aislamientos a caracterizar. Las placas se incubaron a 37°C durante 18h a 24h. (Flujograma 1).

Conservación de los aislamientos de *Listeria* spp.

Los aislamientos de *L. monocytogenes* obtenidos en el laboratorio desde el año 2016, se conservaron a -70°C en TSB, con 20,0% de glicerol. Para la apertura de las cepas necesarias para la siguiente etapa, se descongelaron y posteriormente, se tomó una alícuota y se repicó en Agar Sangre, incubado a $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ durante 24h-48h, hasta obtener un desarrollo microbiano satisfactorio. Todas las cepas de *L. monocytogenes* posterior análisis de serotipificación molecular, se conservaron en TSB con 20% de glicerol a -70°C .

Flujograma de trabajo: Detección de *L. monocytogenes* y *Listeria spp.*



Flujograma 1: Búsqueda y aislamiento de *L. monocytogenes* y *Listeria spp* mediante norma ISO 11290:2017.

Resultados

Muestras totales

El origen de las muestras arribadas al laboratorio (n = 2124) fueron los siguientes: cárnicos (n=873; 41,1%), alimentos listos para consumo (n=300; 14,1%), bebidas hídricas, agua y agua gasificada (n=375; 17,7%), superficies (n=282; 13,3%), correctivos y coadyuvantes (n=176; 8,3%), vegetales congelados (n=58; 2,7%), alimentos lácteos (n=35; 1,6%), alimentos farináceos - cereales, harinas y derivados (n=10; 0,5%), empaques (n=7; 0,3%), alimentos azucarados (n=5; 0,2%) y alimentos balanceados (n=2; 0,1%) (Figura 2).

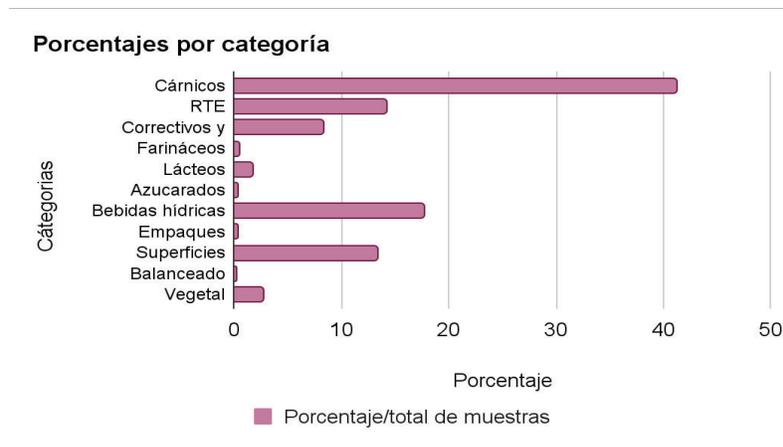


Figura 2: Porcentaje de muestras totales por categoría

De las 2124 muestras, se detectaron 291 aislamientos compatibles con *L. monocytogenes* que correspondieron a las siguientes categorías: cárnicos (n=154; 52,9%), alimentos listos para consumo (n=48; 16,5%), bebidas hídricas, agua y agua gasificada (n=16; 5,5%), superficies (n=64; 22,0%), vegetales congelados (n=3; 1,0%), alimento lácteo (n=5; 1,7%), alimento balanceado (n=1; 0,3%) (Figura 3).

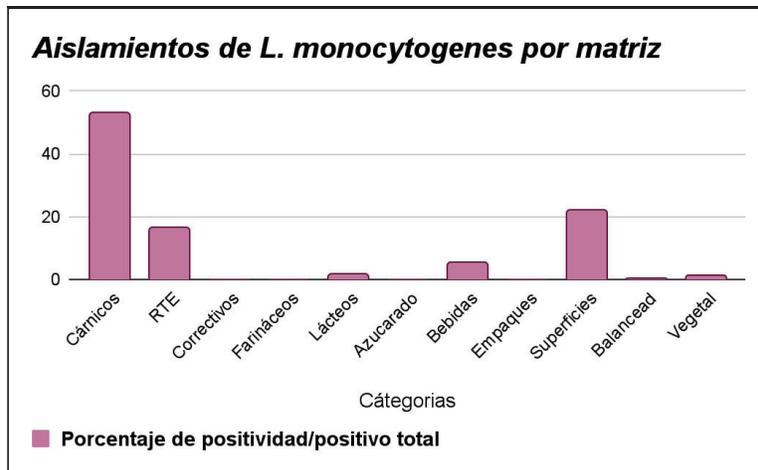


Figura 3: Porcentaje de positividad de *L. monocytogenes* sobre el total de positivos detectados en el laboratorio

Porcentaje de positividad total

De las 2124 muestras analizadas durante este periodo, en donde se obtuvieron 291 aislamientos compatibles con *L. monocytogenes* se desprende que el porcentaje de positividad obtenido en el laboratorio, fue del 13,7% (Figura 4).

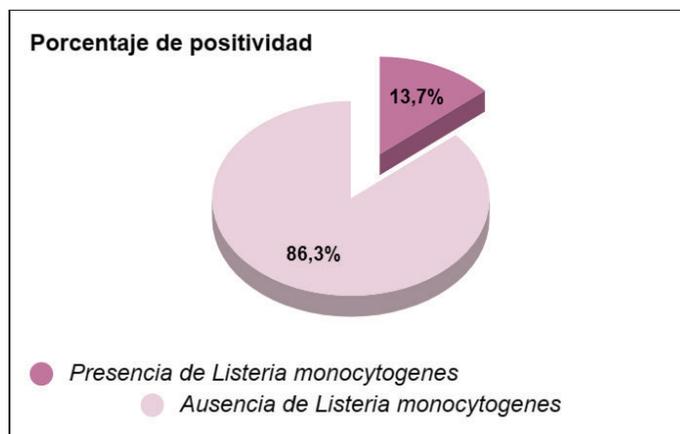


Figura 4: Porcentaje de positividad

La terminología empleada para informar los resultados, se basa en la Norma ISO 11290:2017 en donde obtenemos dos posibles resultados: **Ausencia de *Listeria monocytogenes*** y **Presencia de *Listeria monocytogenes***, según corresponda en cada caso. En la última actualización del año 2017, además de informar la presencia de *L. monocytogenes* también se debe informar la presencia de *Listeria* spp. cuando corresponda

e identificar las otras especies incluidas en este género. Para los fines de la tesis sólo abordaremos las cepas identificadas como *L. monocytogenes*. En la Figura 5 se observan dos cultivos puros de *L. monocytogenes* en los dos medios de cultivo empleados en la Norma ISO 11290:2017.

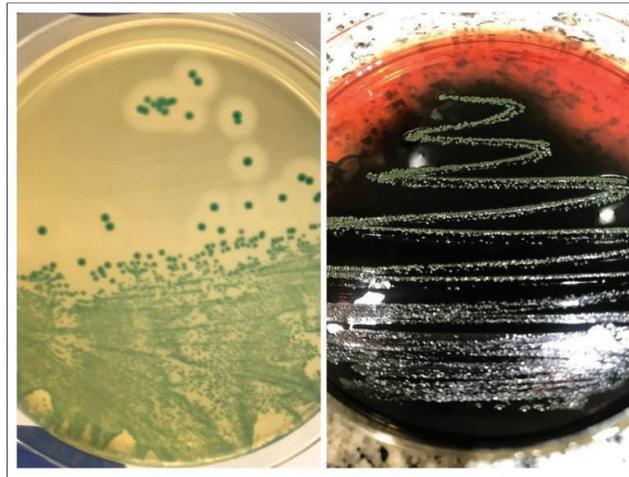


Figura 5: Cultivos de *L. monocytogenes* en medios de cultivos selectivos y diferenciales. Izq. Colonias verdes-azuladas con halo. Der. Colonias grises rodeadas de halos marrones oscuros.

Porcentaje de positividad por matriz

Teniendo en cuenta la cantidad de aislamientos compatibles con *L. monocytogenes* que se aislaron en cada una de las matrices, podemos discriminar la siguiente información en cuanto al porcentaje de positividad en cada una de las categorías. Para los fines de esta tesis nos centraremos en las matrices con mayor prevalencia en el trabajo diario del laboratorio (cárnicos, alimentos listos para consumo, monitoreos ambientales y bebidas hídricas). Los porcentajes de positividad de cada una de las categorías se encuentran detallados en la Tabla 4.

Tabla 4: Cantidad de muestras por categoría y cantidad de aislamientos positivos en cada una de esas categorías

Categorías	Cantidad total	Cantidad de positivos (%)
Cárnicos	873	154 (17,6%)
Alimento listo para consumo	300	48 (16,0%)

Correctivos y coadyuvantes	176	0 (0,0%)
Alimentos farináceos - cereales, harinas y derivados	10	0 (0,0%)
Alimento lácteo	35	5 (14,3%)
Alimentos azucarados	5	0 (0,0%)
Bebidas hídricas, agua y agua gasificada	375	16 (4,2%)
Empaques	7	0 (0,0%)
Superficies	282	64 (22,7%)
Alimento balanceado	2	1 (50,0%)
Vegetal congelado	58	3 (5,1%)
Total	2124	291 (13,7%)

Categoría de cárnicos

Con el objetivo de hacer un análisis exhaustivo de cada una de las matrices trabajadas en el laboratorio, se realizó una subclasificación de la categoría de cárnicos (n=873), de la siguiente manera: carne vacuna cruda (n=585; 67,0%), embutido (n=126; 14,4%), chacinado (n=92; 10,5%), rebozado de pollo (n=52; 6,0%), carne cocida: roja y blanca (n=16; 1,8%) y carne de pescado (n=2; 0,2%) (Figura 6).

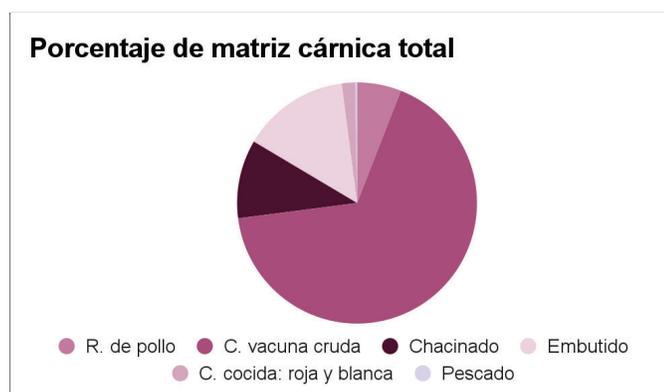


Figura 6: Subclasificación de la categoría de cárnicos

Porcentaje de positividad por tipo de cárnico

En cuanto a la categoría de cárnicos se evaluó el porcentaje de positividad en cada una de las subcategorías. El porcentaje de positividad para *L. monocytogenes* más alto lo hemos encontrado en los rebozados de pollo (n=21; 40,4%), seguido de los embutidos (n=34; 27,0%), chacinados (n=17; 18,5%) y carne vacuna cruda (n=82; 14,0%). Además se observó que en las categorías de carne cocida y carne de pescado, no se obtuvieron aislamientos compatibles con *L. monocytogenes* (Figura 7).

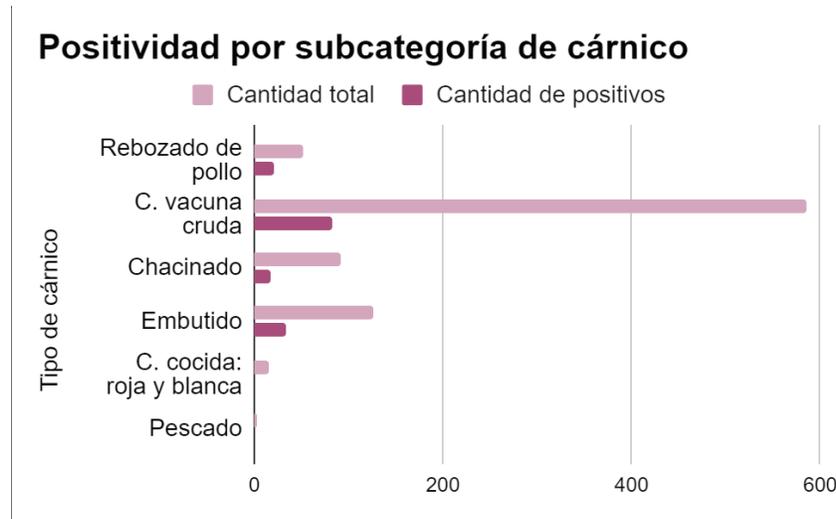


Figura 7: Positividad de *L. monocytogenes* por subcategoría de cárnico

Discusión

La listeriosis es un problema de salud pública importante en todo el mundo con una alta tasa de morbilidad. La vigilancia de *L. monocytogenes* en alimentos es de suma importancia para la evaluación de riesgos (M. Chen et al., 2019).

En esta primera etapa se determinó la presencia de *L. monocytogenes* en diferentes alimentos, establecimientos productores de alimentos, frigoríficos y expendios de alimentos y se analizaron las características fenotípicas de los aislamientos obtenidos.

Si bien se estima que en nuestro país la prevalencia de *L. monocytogenes* recuperadas de muestras de alimentos varía entre el 1,0 y el 10,0% [ANMAT, <https://www.argentina.gob.ar/anmat>], se cree que este dato podría estar subestimado o subreportado debido a la dificultad en las búsquedas microbiológicas, la no sospecha de este patógeno por parte de las industrias productoras de alimentos y la ineficacia de los sistemas de reportes (Barancelli et al., 2020; Rodríguez-Auad, 2018). Esta situación se vio reflejada en el estudio realizado en el laboratorio en donde se observó que de un total de 2124 muestras en las cuales se les solicitó investigar la presencia de *L. monocytogenes*, se encontró su presencia en 291, es decir, que el porcentaje de positividad total de *L. monocytogenes* fue de 13,7%.

La epidemiología de *L. monocytogenes* difiere según las partes del mundo, las distintas zonas urbanas de un mismo país, las costumbres de la población, así como los esfuerzos de los sistemas de vigilancia en detectar a este patógeno, entre otros. Por ejemplo, el porcentaje obtenido en nuestra investigación, si bien es menor al 20,0% propuesto por Wu et. al (2015), es más alto que el estimado en nuestra región (1% a 10% según ANMAT). Pese a esto, otras investigaciones detectaron un valor inferior al anteriormente comentado con una prevalencia promedio de *L. monocytogenes* en productos alimenticios de alrededor del 4,0% (Li et al., 2018; Ranjbar & Halaji, 2018).

En una investigación realizada en Chile, durante el periodo 2008 - 2012, en donde se analizaron gran cantidad y diversidad de muestras (2647 muestras de alimentos y 448

superficies de trabajo), observaron que *L. monocytogenes* estuvo presente en un 10% de las muestras (principalmente en carnes y alimentos listos para consumo) y en el 4% de las muestras ambientales (Saludes et al., 2015). De acuerdo a la diversidad de muestras analizadas, la región del mundo y las costumbres de la población, la investigación anteriormente nombrada, presenta ciertas semejanzas con el corriente estudio.

Tal como nombramos anteriormente, *L. monocytogenes* presenta la versatilidad de persistir en gran diversidad de ambientes e industrias alimentarias, especialmente a bajas temperaturas. Esta capacidad se debe principalmente a su potencial de adhesión, la facilidad con la que forma biopelículas, la resistencia a la desecación, el ácido, el calor y la tolerancia a los desinfectantes (Carpentier & Cerf, 2011).

Por lo observado en nuestra investigación, todas las matrices en las cuales se encontró *L. monocytogenes*, se encuentran respaldadas por el C.A.A, ya que en todas estas, se exige la ausencia de este patógeno en 25 g de muestra e informar la presencia de otras especies de *Listeria* spp. cuando son halladas en un alimento, exceptuando la categoría de bebidas hídricas (en las cuales analizamos únicamente muestras de helados), en donde hasta el momento, el C.A.A no ha incorporado dicha exigencia.

La excepción comentada anteriormente revela un grave problema ya que *L. monocytogenes* presenta la capacidad de resistir a bajas temperaturas (Chan & Wiedmann, 2009) y es por esta razón, que se ha podido detectar *L. monocytogenes* en productos alimenticios refrigerados (Tasara & Stephan, 2006).

Debido a la capacidad de *L. monocytogenes* de resistir a este tipo de temperaturas, es de vital importancia poner foco en esta problemática que ya ha sentado precedente en otras partes del mundo. En Estados Unidos, por ejemplo, un brote de listeriosis se desencadenó debido a helados contaminados producidos por una empresa que operaba en tres instalaciones distintas (Y. Chen et al., 2017). El anteriormente nombrado, no es el único antecedente de aislamientos de *L. monocytogenes* en muestras de helados y en los últimos años han sido reportados otros (Babacan, 2020; Delgado et al., 2012).

Las investigaciones en nuestra región y especialmente en Argentina son escasas pero contundentes, lo que pone de manifiesto la necesidad de una vigilancia epidemiológica mucho más activa. En los últimos años se han realizado estudios que detectaron este patógeno tanto en muestras de alimentos, animales, ambientes y humanos exhibiendo que es menester un abordaje multidisciplinario para esta problemática que reviste un notable riesgo para la salud en su totalidad. *Listeria* spp. y *L. monocytogenes* se detectaron en muestras provenientes de leche cruda de tambos, de animales con mastitis subclínica (A. L. Laciari et al., 1999) y de listeriosis en bovinos y los ambientes de producción lechera (Margineda et al., 2012). Posteriormente, se ha realizado una investigación en donde detectó *L. monocytogenes* provenientes de muestras de humanos (muestras de sangre, líquido cefalorraquídeo, cervix de persona gestante y contenido intestinal), alimentos (muestras de repollo, lechuga, calamar, merluza, mejillón, caballa) y animales (muestra de contenido intestinal de oveja) (A. Laciari et al., 2006). Otras investigaciones se han realizado en alimentos y en ambientes de producción de productos cárnicos (Londero, Costa, Galli, et al., 2019; Londero, Costa, Sucari, et al., 2019; Reyes et al., 2018). Últimamente, además, se han realizado investigaciones con el objetivo de evaluar susceptibilidad antimicrobiana de cepas de *L. monocytogenes* aisladas de infección invasiva humana y de alimentos mostrando eficiente respuesta a los antimicrobianos ensayados (Prieto et al., 2016).

El presente trabajo de investigación, sumado a los trabajos anteriormente mencionados, pretende colaborar a sentar precedente de una problemática actualmente silenciada pero que sin perder la vigencia, preocupa y alarma a nuestro sistema de salud. Las evidencias científicas que comprueban la presencia de este patógeno en gran cantidad de muestras y ambientes son claras, por lo que se necesitarán monitoreos epidemiológicos por parte de los sistemas de vigilancia, más exhaustivos y disciplinados para resguardar la salud de la población y el ambiente que la rodea.

Conclusiones parciales

Según lo expuesto en este capítulo se pueden obtener las siguientes conclusiones parciales:

- Existe la necesidad de efectuar vigilancia epidemiológica a nivel nacional para la obtención de datos certeros sobre la relevancia de este patógeno. Los valores de prevalencia encontrados como referencia y sobre los cuales nos hemos basado en esta tesis presentan gran diversidad, son antiguos y de investigaciones aisladas.
- Se ha podido detectar una subestimación y subreporte de datos con respecto a los aislamientos encontrados en muestras de alimentos comparándolos con las prevalencias publicadas por otros investigadores en otras partes del mundo.
- La detección de *L. monocytogenes* en muestras de helados plantea la necesidad de su incorporación al C.A.A.

Capítulo 2: Serotipificación molecular mediante PCR múltiple

Materiales y métodos

Equipos

- Termociclador para PCR, Gene Up (TER-09). Biomerieux.
- Vortex (AGI-19). Dragon-Lab.
- Bloque térmico (BCS-03). Pall.
- Cuba y fuente de poder para electroforesis. BIO-RAD, Wide Mini-Sub Cell GT.
- Transiluminador (TRA-01). BIO-RAD, Mini-Transiluminator.
- Armador de gel y peine.
- Nivel.

Reactivos

- Buffer PCR 10X y Taq polimerasa 5 U/ul. Promega (Wisconsin, Estados Unidos).
- Mezcla de dNTPs: dATP, dCTP, dGTP y dTTP 2.5 mM. Inbio Highway (Buenos Aires, Argentina).
- Agarosa. Promega (Wisconsin, Estados Unidos).
- Buffer Tris Acetato EDTA 1X (TAE). Promega (Wisconsin, Estados Unidos).
- Bromuro de etidio (BrEt 10 mg/ml). Promega (Wisconsin, Estados Unidos).
- Patrón de peso molecular. Genbiotech (Buenos Aires, Argentina).
- Agua de calidad PCR. Inbio Highway (Buenos Aires, Argentina).
- Dodecil Sulfato de Sodio (SDS). USB.

Cepas control

En la etapa de puesta a punto de la técnica molecular se utilizaron cepas controles positivos de cada uno de los serogrupos de *L. monocytogenes* que pertenecían a la colección del Laboratorio de Microbiología de los Alimentos (LaMa-FCV-UNLP) las cuales fueron caracterizadas molecularmente, confirmadas por el Instituto Malbrán y posteriormente

utilizadas en investigaciones publicadas (Londero, Costa, Galli, et al., 2019; Londero, Costa, Sucari, et al., 2019; Reyes et al., 2018) (Tabla 5).

Tabla 5: Cepas control empleadas como controles en la serotipificación molecular

Controles	Cepa	Origen
C+ perfil 1/2a	Lm ATCC	Stambouliau
C+ perfil 1/2b	LAMA 580	LaMA
C+ perfil 1/2c	LAMA 721	LaMA
C+ perfil 4b	LAMA 590	LaMA
C+ Li	LAMA 558	Stambouliau
C. bandas	LAMA 580 + LAMA 721	LaMA
C-	<i>E. faecalis</i> ATCC 29212	Stambouliau

Tamaño de la muestra

De los 291 aislamientos compatibles con *L. monocytogenes*, se seleccionaron 180 aislamientos de *L. monocytogenes* representativos de los diversos orígenes a los cuales se les realizó serotipificación molecular mediante la puesta a punto de una técnica molecular y posterior análisis descriptivo, estadístico y epidemiológico (Figura 8).



Figura 8: Diagrama del tamaño de las muestras

Muestras serotipificadas

Establecimientos involucrados

Las muestras a las cuales se les realizó la serotipificación molecular provienen de 16 establecimientos distintos distribuidos en varios puntos del país: Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Pcia. de Buenos Aires, Pcia. de Santa Fé, Pcia. de Rio Negro, y Pcia de La Pampa. La cantidad de muestras obtenidas por cada establecimiento se detalla en la Tabla 6.

Tabla 6: Características de los establecimientos

Establecimientos	Origen	Productos	Cantidad de aislamientos
1	Buenos Aires	Alimentos listos para consumo	50
2	Buenos Aires	Cárnicos (Carne vacuna cruda)	24
3	Buenos Aires	Cárnicos (chacinado)	1
4	Buenos Aires	Cárnicos (Carne vacuna cruda)	2
5	Santa Fé	Cárnicos (Carne vacuna cruda, embutido)	9
6	C.A.B.A	Cárnicos (Embutido)	8
7	Rio Negro	Cárnicos (Carne vacuna cruda, chacinado, embutido)	15
8	Buenos Aires	Cárnicos (Rebozado de pollo)	18
9	Buenos Aires	Cárnicos (Embutido)	29
10	Buenos Aires	Helados	9
11	Buenos Aires	Vegetales congelados	2
12	Buenos Aires	Lácteos	2
13	C.A.B.A	Helados	5
14	Santa Fé	Lácteos	3
15	Santa Fé	Helados	1
16	C.A.B.A	Alimentos listos para consumo	2
TOTAL	-	-	180

Monitoreos ambientales

Los monitoreos ambientales analizados durante la tercera etapa del corriente capítulo fueron realizados por los clientes. Los establecimientos que conjuntamente con sus muestras enviaron esponjados e hisopados de monitoreos ambientales fueron los siguientes; 1, 6, 9 y 14.

Puesta a punto de una técnica microbiológica

Previo a la implementación de la técnica molecular en el laboratorio, se llevó a cabo la puesta a punto de la misma tomando como referencia la publicación de Doumith y colaboradores (Doumith, Buchrieser, et al., 2004) y el Manual de Procedimientos (aislamiento, identificación y caracterización de *Listeria monocytogenes*) publicado por el Instituto Malbrán (Prieto, 2008).

La etapa de puesta a punto de la técnica molecular tuvo una duración de tres meses. Las especificaciones brindadas por los investigadores anteriormente mencionados, no se ajustaban en su totalidad en nuestro laboratorio. Particularmente los pares de *primers* “*prs*” F y R, “*lmo1118*” F y R y “*lmo0737*” F y R no amplificaban de forma reproducible en las corridas razón por la cual las concentraciones de algunos de los reactivos fueron modificadas (Tabla 8). Una vez realizado este procedimiento se pudo demostrar experimentalmente que el método mantuvo sus objetivos cuando fue utilizado por el usuario.

Procedimiento

Para llevar a cabo este procedimiento, el Manual de Calidad del Laboratorio Stambouliau, exige evaluar la comparabilidad de resultados entre las sucesivas determinaciones y entre operadores asegurando la correcta ejecución de la técnica y la calidad de los resultados obtenidos.

Elección de cepas para puesta a punto

Se seleccionaron un total de 21 cepas provenientes del cepario de Stambouliau y de la FCV-UNLP las cuales fueron inicialmente identificadas mediante pruebas bioquímicas y MALDI-TOF MS. De éstas cepas, 17 correspondían al género *Listeria* spp. y 4 fueron cepas provenientes de diferentes especies bacterianas (*Pediococcus acidilactici*, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 y *Escherichia coli* ATCC 25922) que naturalmente se encuentran presentes en matrices alimentarias, exhiben ciertos parentescos evolutivos con *Listeria* spp. o que fenotípica y genotípicamente son similares. Además se utilizaron las cepas *L. monocytogenes* ATCC 19111 y *L. innocua* ATCC 33090.

Dentro de las cepas de *Listeria* spp., 12 pertenecían a la especie *L. monocytogenes* (Lm) y 5 a otros géneros; 3 *L. innocua* (Li), 1 *L. welshimeri* (Lw) y 1 *L. seeligeri* (Ls). Respecto de las cepas pertenecientes a la especie *L. monocytogenes* se escogieron representantes de cada uno de los serogrupos de mayor importancia epidemiológica en Argentina y en el mundo: IIa, IIb, IIc y IVb.

Analistas

Para evaluar la competencia técnica, las cepas se prepararon y procesaron por las analistas involucradas en el proceso en un ensayo a ciegas. Para los fines de este ensayo, las operadoras involucradas fueron dos (identificados como analista 1 y analista 2). Bajo estos términos, la Directora Técnica (DT) fue la única persona que conocía la distribución de los microorganismos diana y no diana.

Criterios del ensayo

- Aceptación del ensayo: se evaluó si las cepas seleccionadas para el ensayo concordaban con los resultados esperados.
- Reproducibilidad: se evaluó si existía acuerdo entre las analistas.
- Competencia técnica: se determinó la competencia técnica de cada una de las analistas frente al resultado esperado para las muestras procesadas.

Detección de serogrupos de *L. monocytogenes* mediante PCR múltiplex

Preparación del templado

A partir de una cepa aislada y confirmada fenotípicamente como *L. monocytogenes* en agar sangre, se realizó una suspensión con ansa, de tres o cuatro colonias en un tubo de microcentrífuga de 1,5 ml esteril con 50 µl de buffer de lisis para PCR. Posteriormente, se calentó 15 minutos a 100°C en bloque térmico. A continuación se dejó enfriar a temperatura ambiente, se agregaron 100 µl de agua calidad PCR y se resuspendió con micropipeta automática para integrar todo el contenido del tubo.

Preparación de buffer de lisis (para preparar 50 ml):

1. 1,25 ml de solución madre de Sodium Dodecyl Sulphate (SDS) 10%: para preparar esta solución se pesó 1 g de SDS y luego se agregó 10 ml de agua calidad PCR.
2. 2,5 ml de NaOH 4% (2,5 ml).
3. Llevar a volumen final de 50 ml con agua calidad PCR.

Tipificación molecular

Luego de la etapa de lisis bacteriana, se realizó la PCR múltiple adaptada al protocolo propuesto por Doumith et al. (2004) empleando los mismos target moleculares y ciclado y modificando las concentraciones de los reactivos involucrados. Esta técnica identifica cinco perfiles compatibles con los serogrupos mayoritarios en la naturaleza. Cada uno de los serogrupos representa más de un serotipo: serogrupo IIa (serotipo 1/2a y 3a), serogrupo IIb (serotipos 1/2b, 3b y 7), serogrupo IIc (serotipos 1/2c y 3c) serogrupo IVa (serotipos 4a y 4c) y serogrupo IVb (serotipos 4b, 4d y 4e).

Los genes que se seleccionaron para el ensayo de PCR múltiple y que de acuerdo a la presencia pueden identificar los serogrupos IIa, IIb, IIc y IVb de *L. monocytogenes* fueron *Imo0737*, *Imo1118*, ORF2819 y ORF2110 (Tabla 7). Además, se utiliza el gen *prs* que es específico para cepas del género *Listeria* spp. como control interno de amplificación.

Tabla 7: Target, secuencias de nucleótidos y tamaño de productos amplificados

Target	Secuencias	Tamaño amplificado	Serovariedades
<i>Imo0737</i>	F: 5'-AGGGCTTCAAGGACTTACCC-3' R: 5'-ACGATTTCTGCTTGCCATTC-3'	691	<i>L. monocytogenes</i> serovares 1/2a, 1/2c, 3a y 3c.
<i>Imo1118</i>	F: 5'-AGGGGTCTTAAATCCTGGAA-3' R: 5'-CGGCTTGTTTCGGCATACTTA-3'	906	<i>L. monocytogenes</i> serovares 1/2c y 3c.
ORF2819	F: 5'-AGCAAAATGCCAAAACCTCGT-3' R: 5'-CATCACTAAAGCCTCCCATTG-3'	471	<i>L. monocytogenes</i> serovares 1/2b, 3b, 4b, 4d y 4e.
ORF2110	F: 5'-AGTGGACAATTGATTGGTGAA-3' R: 5'-CATCCATCCCTTACTTTGGAC-3'	597	<i>L. monocytogenes</i> serovares 4b, 4d y 4e.
<i>prs</i>	F: 5'-GCTGAAGAGATTGCGAAAGAAG-3' R: 5'-CAAAGAAACCTTGGATTGCGG-3'	370	Todas las especies de <i>Listeria</i> .

Tabla 8: Reactivos y cantidades para una reacción de PCR

Reactivos	Concentración Final	1 reacción (volumen)
Buffer Green 5X (7,5mM Mg)	1X (1,5 mM Mg)	10 μ l
dntps (10mM c/u)	0,3 mM	1,5 μ l
<i>lmo0737</i> -F y R (10 μ M)	0,03 μ M	0,15 μ l
<i>lmo1118</i> -F y R (10 μ M)	0,7 μ M	3,5 μ l
ORF2819-F y R (10 μ M)	0,1 μ M	0,5 μ l
ORF2110-F y R (10 μ M)	0,1 μ M	0,5 μ l
<i>Prs</i> -F y R (5 μ M)	0,02 μ M	0,2 μ l
GoTaq (5u/ μ l)	1,5 U	0,3 μ l
Agua	-	26,5 μ l
Templado de ADN	-	2 μ l

Volumen de la mezcla: 48 μ l

Volumen final de reacción: 50 μ l

Procedimiento

Se descongelaron a temperatura ambiente, durante 15-20 minutos, todos los reactivos (Tabla 8). Para definir el volumen total de los reactivos, se calculó la cantidad de reacciones a realizar (muestras + controles). Luego se realizó la mezcla en un tubo de microcentrífuga estéril y se fraccionó en la cantidad de microtubos correspondientes a cada una de las cepas a serotipificar. Finalmente, se colocaron las reacciones en el termociclador programado previamente con el siguiente perfil térmico o ciclado (Tabla 9):

Ciclado

Tabla 9: Programa de amplificación

Número de ciclos	Estadio	Temperatura	Tiempo
1 ciclo	Desnaturalización	94°C	3 minutos
35 ciclos	Desnaturalización	94°C	40 segundos
	Annealing	53°C	1,15 minutos
	Extensión	72°C	1,15 minutos
1 ciclo	Extensión	72°C	7 minutos

Controles

En cada análisis se incluyeron controles positivos, negativos, un control de reacción y un control de bandas. Los controles positivos provinieron de un templado de ADN obtenido de cepas de *L. monocytogenes* que poseían los genes que se deseaban testear y que correspondían a los distintos serogrupos, el control negativo provenía del ADN del aislamiento de *E. coli* ATCC 25922 (sin genes de virulencia), el control de reacción contenía la mezcla sin adición de templado y el control de bandas correspondía a un control positivo en el cual se observó la totalidad de bandas posibles en una misma reacción.

Corrida en gel de agarosa

Se preparó un gel de agarosa al 2,5% en buffer TAE 1X (para realizar un gel de cuarenta calles, se pesaron 2 g de agarosa y se agregaron 80 ml de buffer TAE 1X). Mientras que el gel se encontraba en estado líquido se adicionaron 10 µl de Bromuro de Etidio (0,5 µg/ml).

Se sembraron 8 µl del marcador de peso molecular de 100 pares de base en la primera calle de cada corrida para tener una referencia de la posición y el peso de las bandas. Posteriormente se cargó cada pocillo del gel con 10 µl de cada mezcla de reacción

de PCR. Se corrieron las muestras en 1x buffer de corrida TAE 1X a voltaje constante (100 V) durante 45 minutos en cuba electroforética. (Flujograma 2).

Visualización de resultados

Se obtuvieron cinco perfiles de bandas diferentes P-1/2a, P-1/2b, P-1/2c, P-4b y P-list (Figura 9). Para las cepas en las cuales no se obtuvieron fragmentos de amplificación, se repitió el procedimiento desde el inicio.

Pesos Moleculares		IIa	IIb	IIc	IVb	sp
906pb	—			—		
691pb	—	—		—		
597pb	—				—	
471pb	—		—		—	
370pb	—	—	—	—	—	—

Figura 9: Representación esquemática de los pesos moleculares obtenidos para cada serogrupo de *L. monocytogenes*. En la primera columna se observan los pesos moleculares correspondientes a cada producto de PCR.

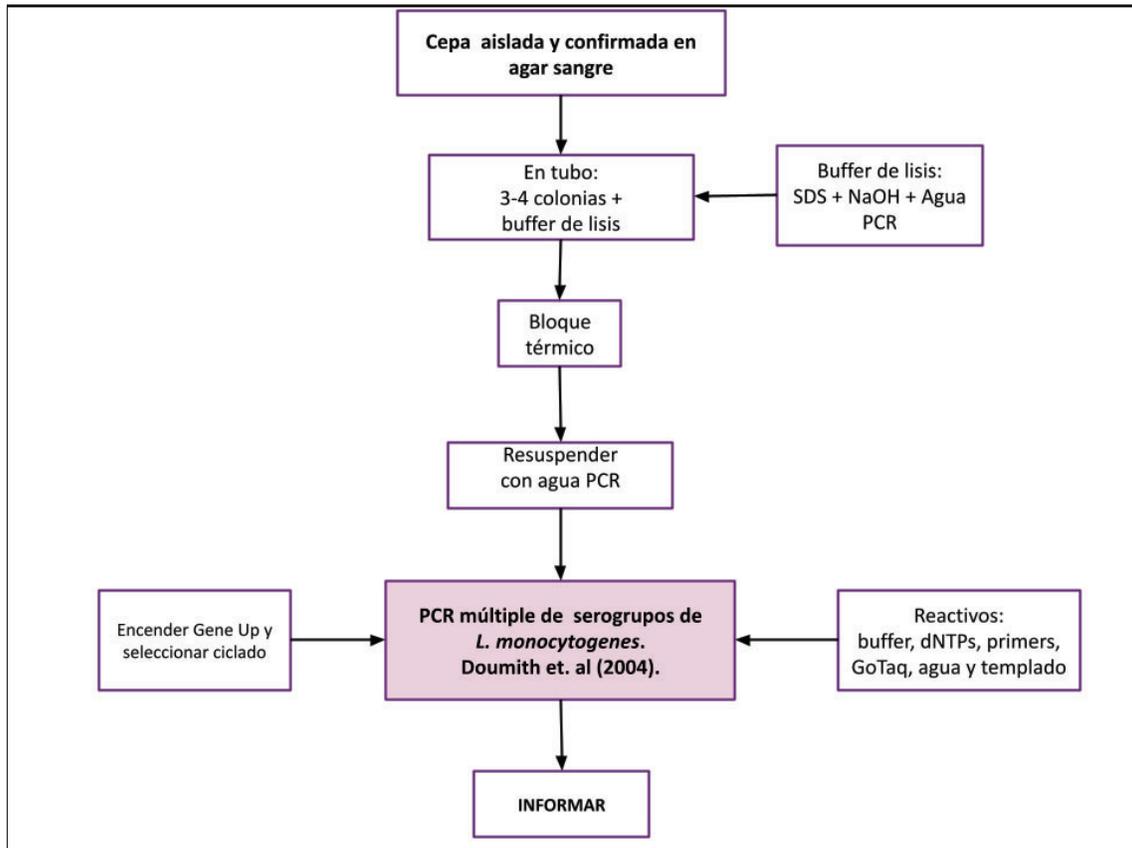
Los perfiles obtenidos representan los siguientes serotipos:

- Serogrupo IIa o perfil P-1/2a: corresponde a *L. monocytogenes* serotipo 1/2a y 3a.
- Serogrupo IIb o perfil P-1/2b: corresponde a *L. monocytogenes* serotipo 1/2b, 3b y 7.
- Serogrupo IIc o perfil P-1/2c: corresponde a *L. monocytogenes* serotipo 1/2c y 3c.
- Serogrupo IVb o perfil P-4b: corresponde a *L. monocytogenes* serotipo 4b, 4d, 4e.
- Perfil P-List: corresponde a *L. monocytogenes* serotipo 4a y 4c, *L. innocua*, *L. ivanovii*, *L. welshimeri* y *L. seeligeri*.

Expresión de resultados

Según los resultados obtenidos se informa: Se detecta *L. monocytogenes* serogrupo IIa, IIb, IIc, IVb o P-list (según lo observado en el gel de agarosa).

Flujograma de trabajo: PCR múltiple de serogrupos de *L. monocytogenes*



Flujograma 2: procedimiento PCR múltiple para detección de serogrupos de *L. monocytogenes*.

Resultados

Etapa 1: puesta a punto de PCR multiplex de serogrupos de *L. monocytogenes*

En primera instancia, se realizó la puesta a punto de la PCR múltiple para serogrupos de *L. monocytogenes* adaptando a las recomendaciones del manual de calidad del laboratorio para la verificación y validación de técnicas microbiológicas y tomando como referencia la técnica publicada por Doumith et. al (2004).

Adaptación de PCR múltiple para serogrupos de *L. monocytogenes*

Para poder llevar a cabo la técnica, se debieron realizar ajustes tanto en las concentraciones de los diferentes reactivos de PCR, en la disposición que estos se encuentran al momento de llevar a cabo la técnica y en los tiempos de la corrida en gel de agarosa.

En primera instancia, no fue posible amplificar el target *prs* de 348 pb correspondiente a la diana que caracteriza a *Listeria* spp. Además, se encontraron dificultades para amplificar la región de 691 pb amplificada por los *primers* *Imo0737* F y R y la de 901 pb amplificada por los *primers* *Imo1118* F y R. Dichos productos de PCR, no amplificaban de forma reproducible en las distintas corridas, razón por la cual, se hipotetizó que podría deberse a un desbalance en el equilibrio en los pares de *primers* generando competencia de los mismos en la mezcla de reacción. En consecuencia, se implementaron los siguientes cambios:

1. Se modificó la concentración de los reactivos.
2. Se realizaron PCRs simplex para cada amplicón de forma independiente. De esta manera, se verificó la efectividad de cada juego de *primers* por separado.
3. Se aumentó la concentración de dNTPs y Taq polimerasa. Se detectó que las PCR múltiples descritas en la bibliografía presentaban una concentración mayor de estos reactivos que los empleados en este protocolo.
4. Se aumentó drásticamente la concentración del par "*Imo1118*" F y R, que amplifica el amplicón de 901 pb, respecto del resto de los *primers* en la PCR multiplex.

5. Se disminuyó al mínimo la concentración del par de *primers* “*prs*” F y R que amplifican la banda de especie. La amplificación por parte de este par era tan eficiente que consumía gran parte de los reactivos al inicio del ciclado, dificultando la amplificación de los demás pares.

Cepas utilizadas en la puesta a punto

Se seleccionaron un total de 21 cepas. Estas cepas fueron reconfirmadas bioquímicamente y por MALDI-TOF MS previo a su utilización en este procedimiento (Tabla 10).

Tabla 10: Cepas reconfirmadas para utilizar en la puesta a punto

Cepas	Origen	Mo	Perfil	Pruebas bioquímicas	Maldi-TOF
LaMA					
557	Ambiente de carnicería	Lm	1/2b	CAMP: + Sau, -R.eq / Hem: +	<i>Listeria monocytogenes</i>
559	Ambiente de carnicería	Li	-	CAMP: - Sau, - R.eq / Az: R-, X+ / Hem: -	<i>Listeria innocua</i>
571	Carne	Li	-	CAMP: - Sau, - R.eq / Az: R-, X+ / Hem: -	<i>Listeria innocua</i>
580	Carne	Lm	1/2b	CAMP: + Sau, -R.eq / Az: R+, X- / Hem: +	<i>Listeria monocytogenes</i>
590	Carne	Lm	4b	CAMP: + Sau, -R.eq / Az: R+, X- / Hem: +	<i>Listeria monocytogenes</i>
592	Ambiente de carnicería	Lm	4b	CAMP: + Sau, -R.eq / Az: R+, X- / Hem: +	<i>Listeria monocytogenes</i>
594	Ambiente de carnicería	Lm	1/2b	CAMP: + Sau, -R.eq / Az: R+, X- / Hem: +	<i>Listeria monocytogenes</i>
629	Ambiente de carnicería	Lm	1/2c	CAMP: + Sau, -R.eq / Az: R+, X- / Hem: +	<i>Listeria monocytogenes</i>
721	Carne	Lm	1/2c	CAMP: + Sau, -R.eq / Az: R+, X- / Hem: +	<i>Listeria monocytogenes</i>
732	Carne	Lm	1/2c	CAMP: + Sau, -R.eq / Az: R+, X- / Hem: +	<i>Listeria monocytogenes</i>
810	Ambiente de carnicería	Lm	4b	CAMP: + Sau, -R.eq / Az: R+, X- / Hem: +	<i>Listeria monocytogenes</i>
1102	Carne	Lm	1/2a	CAMP: + Sau, -R.eq / Az: R+, X- / Hem: +	<i>Listeria monocytogenes</i>
1104	Carne	Ls	-	CAMP: + Sau, -R.eq / Az: R-, X+ / Hem: +	<i>Listeria seeligeri</i>
1105	Ambiente de carnicería	Lm	1/2a	CAMP: + Sau, -R.eq / Az: R+, X- / Hem: +	<i>Listeria monocytogenes</i>
1138	Carcasa bovina	Lw	-	CAMP: - Sau, - R.eq / Az: R-, X+ / Hem: -	<i>Listeria welshimeri</i>
ATCC					
19111	Cepario Stambouliau	Lm	1/2a	CAMP: + Sau, -R.eq / Az: R+, X- / Hem: + /RNA 16S + <i>rpoB</i> .	<i>Listeria monocytogenes</i>
33090	Cepario Stambouliau	Li	-	CAMP: - Sau, - R.eq / Az: R-, X+ / Hem: - /RNA 16S + <i>rpoB</i> .	<i>Listeria monocytogenes</i>
25923	Cepario Stambouliau	SAU	-	Coagulasa +, Catalasa +, Manitol +, DNAsa +, RNA 16S	<i>Staphylococcus aureus</i>
Pea	Cepario Stambouliau	PEA	-	Cepa secuenciada: RNA 16S	<i>Pediococcus acidilactici</i>
29212	Cepario Stambouliau	EFA	-	CAMP: - Sau/ Pyr+/ Az: Arg+, Man+, Sor+/Hem:+, RNA 16S.	<i>Enterococcus faecalis</i>

Distribución de cepas

La Directora Técnica, responsable de garantizar el ensayo a ciegas, realizó la distribución de cepas tal como se muestra en la tabla 11.

Tabla 11: Distribución de cepas

Distribución	Identificación	Distribución	Identificación
1	LaMA 1102	12	LaMA 592
2	LaMA 557	13	LaMA 810
3	LaMA 629	14	LaMA 559
4	LaMA 590	15	LaMA 571
5	ATCC 33090	16	LaMA 1138
6	LaMA 1105	17	LaMA 1104
7	ATCC 19111	18	ATCC 25923
8	LaMA 580	19	PEA
9	LaMA 594	20	ATCC 29212
10	LaMA 721	21	ATCC 25922
11	LaMA 732	-	-

Realización y evaluación el ensayo

Las cepas aisladas en agar sangre se ensayaron mediante la PCR múltiple para serogrupos de *L. monocytogenes* y se interpretaron acorde a la metodología que se pretendía poner a punto. En la figura 10 se observa un aislamiento puro de *L. monocytogenes* en agar sangre visualizándose también la CAMP positiva con *S aureus*.

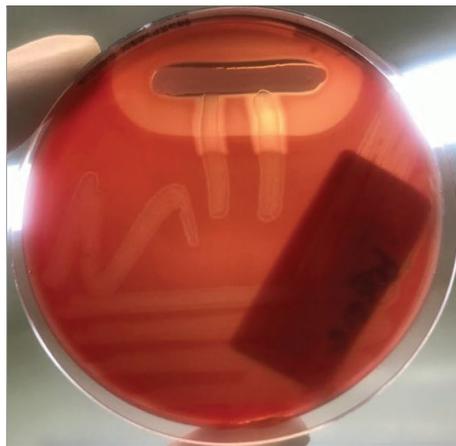


Figura 10: Aislamiento puro de *L. monocytogenes* (CAMP con *S. aureus*)

Se cumplió exitosamente con los criterios del ensayo:

1. Aceptación del ensayo: las cepas propuestas para la puesta a punto arrojaron los resultados esperados.
2. Reproducibilidad: existió acuerdo entre las analistas.
3. Competencia técnica: ambas analistas lograron verificar exitosamente la técnica molecular identificando y serotipificando correctamente las 21 cepas control (Tabla 12).

Tabla 12: Ejecución de los operadores

Distribución	Identificación	Serogrupo	Analista 1	Analista 2
1	1102	IIa	Ok	Ok
2	557	IIb	Ok	Ok
3	629	IIc	Ok	Ok
4	590	IVb	Ok	Ok
5	33090	Li	Ok	Ok
6	1105	IIa	Ok	Ok
7	19111	IIa	Ok	Ok
8	580	IIb	Ok	Ok
9	594	IIb	Ok	Ok
10	721	IIc	Ok	Ok
11	732	IIc	Ok	Ok
12	592	IVb	Ok	Ok
13	810	IVb	Ok	Ok
14	559	Li	Ok	Ok
15	571	Li	Ok	Ok
16	1138	LW	Ok	Ok
17	1104	LS	Ok	Ok
18	PEA	<i>P. acidilactici</i>	Ok	Ok
19	ATCC 29212	<i>E. faecalis</i>	Ok	Ok
20	ATCC 25922	<i>S. aureus</i>	Ok	Ok
21	25922	<i>E. coli</i>	Ok	Ok

Conclusión

Con los datos y resultados obtenidos tras realizar el ensayo de puesta a punto de la técnica molecular para la detección de serogrupos de *L. monocytogenes*, se decide que la técnica es apta para su uso.

Etapa 2: Serotipificación molecular de muestras

De los 291 aislamientos totales en los cuales se aisló e identificó bioquímicamente *L. monocytogenes*, se seleccionaron 180 cepas para análisis de serogrupos por la técnica de PCR múltiple puesta a punto en la etapa anterior. El resto de las cepas no se encontraban disponibles para estudio.

Porcentaje de serogrupos totales

A partir de los aislamientos serotipificados (n=180) se obtuvo la siguiente información general (Figura 11): *L. monocytogenes* perfil 1/2a (n=9) representando el 5%, *L. monocytogenes* perfil 1/2b (n=116) representando el 68,9%, *L. monocytogenes* perfil 1/2c (n=37) el 20,5 % y *L. monocytogenes* perfil 4b (n = 10) el 5,6 %. Los perfiles de serogrupos anteriormente nombrados fueron visualizados en el gel de agarosa como se observa en la Figura 12.

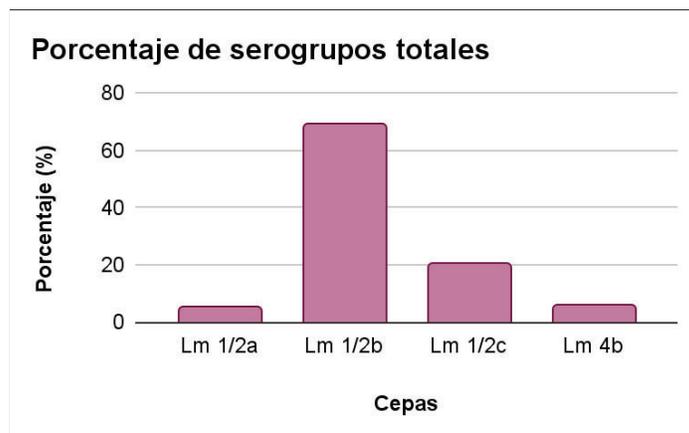


Figura 11: Distribución de frecuencias de cada serogrupo sobre el total de cepas estudiadas

Muestras serotipificadas

Los aislamientos a los cuales se les realizó PCR múltiple de serogrupos de *L. monocytogenes* pertenecen a las siguientes categorías: cárnicos (n=97), alimentos listos para consumo (n=43), superficies (n=19), bebidas hídricas (n=15), alimento lácteo (n=4) y vegetal congelado (n=2) (Tabla 13).

Tabla 13: Serotipificaciones por matriz

Matriz	Cárnico	RTE	Superficie	B. hídricas	Lácteo	Veg. cong.	Total
Cantidad	97	43	19	15	4	2	180



Figura 12: Ejemplo de corrida en gel de agarosa. En orden: calle 1: patrón de peso molecular (PM), calle 2 y 3: *L. monocytogenes* perfil 1/2b, calle 4: *L. monocytogenes* perfil 1/2a, calle 5: *L. monocytogenes* perfil 1/2b, calle 6: *L. monocytogenes* perfil 1/2c, calle 7: *L. monocytogenes* perfil 4b, calle 8: *L. innocua*, calle 9: *L. monocytogenes* perfil 1/2a, calle 10: *L. monocytogenes* perfil 1/2b, calle 11: *L. monocytogenes* perfil 1/2c, calle 12: *L. monocytogenes* perfil 4b, calle 13: *L. innocua*.

Análisis de los aislamientos serotipificados

De las 180 muestras analizadas y caracterizadas mediante serotipificación molecular, 161 pertenecen a matrices alimentarias propiamente dicho y 19 pertenecen a cepas aisladas de monitoreos ambientales realizados en los establecimientos donde se manufacturan los alimentos. Para los fines de esta tesis, se analizarán los resultados por separado.

Matrices

De las 161 muestras de *L. monocytogenes* provenientes de matrices alimentaria, y luego de la serotipificación molecular, pudo observarse que el serogrupo más prevalente fue

el IIb (n=107; 69%), luego en orden decreciente el IIc (n=36; 21%), y por último el IIa (n=9; 5%) y el IVb (n=9; 5%).

Al realizar el análisis separado para cada una de las categorías propuestas podemos ver que tanto en la categoría de cárnicos como en alimentos listo para consumo (RTE), el serogrupos mayoritariamente aislado fue el IIb (n=62; 64% y n=32; 74%, respectivamente). En la categoría de lácteos se detectó mayoritariamente el serogrupo IIa (n=2; 50%). En la categoría de bebidas hídricas, agua y agua gasificada (en la cual analizamos matrices de helados únicamente), se detectó el serogrupo IVb (n=4; 27 %) y el serogrupo IIb (n=11; 73 %). Por último, en la categoría de vegetales congelados, se obtuvieron en igual cantidad aislamientos compatibles con el serogrupo IIa (n=1; 50%) y IIb (n=1; 50%). La información detallada sobre los perfiles detectados para cada matriz se encuentran en la Tabla 14 y la Figura 13.

Tabla 14: Serogrupos por matriz

Perfil por matriz	Cárnico (%)	RTE (%)	Lácteo (%)	Bebida hídrica (%)	Vegetal congelado (%)	Total
Lm IIa (1/2a)	6 (6)	0	2 (50)	0	1 (50)	9
Lm IIb (1/2b)	62 (64)	32 (74)	1 (25)	11 (73)	1 (50)	107
Lm IIc (1/2c)	26 (27)	10 (23)	0	0	0	36
Lm IVb (4b)	3 (3)	1 (2)	1 (25)	4 (27)	0	9
Total	97	43	4	15	2	161

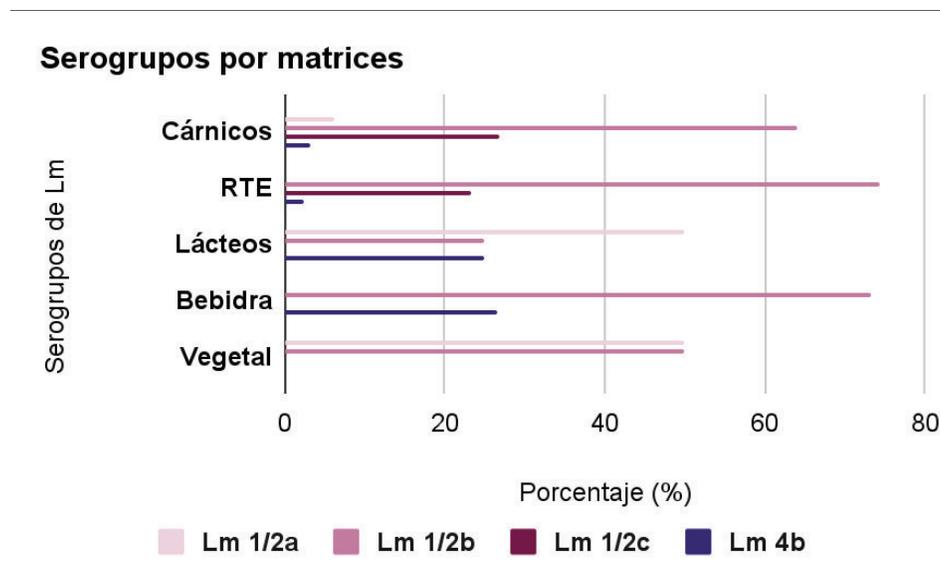


Figura 13: Distribución de serogrupos por matriz

Subcategoría de cárnicos

Con la finalidad de realizar un análisis exhaustivo de la matriz cárnica, se subclasificó en los siguientes subtipos: carne vacuna cruda (n=34), embutidos (n=27), rebozados de pollo (n=18) y chacinados (n=13) sumando un total de 97 muestras. Las cepas aisladas de dichas matrices se serotipificaron obteniendo los siguiente perfiles: tanto para carne vacuna cruda como embutidos el serogrupo mayoritario fue el IIb (85% y 100% respectivamente). Para los subtipos cárnicos de rebozados de pollo y chacinados el serogrupo mayoritario fue el IIc (60% y 55,5% respectivamente). (Tabla 15; Figura 14).

Tabla 15: Serogrupos detectados por subcategoría de cárnico

Perfil por Cárnico	Carne vacuna cruda (%)	Rebozado de pollo (%)	Chacinado (%)	Embutido (%)	Total (%)
Lm IIa (1/2a)	1 (3)	2 (11)	3 (16,6)	0	6 (6,2)
Lm IIb (1/2b)	29 (85)	3 (17)	3 (16,6)	27 (100)	62 (64)
Lm IIc (1/2c)	4 (12)	12 (67)	10 (55,5)	0	26 (26,8)
Lm IVb (4b)	0	1 (6)	2 (11)	0	3 (3)
Total	34	18	18	27	97

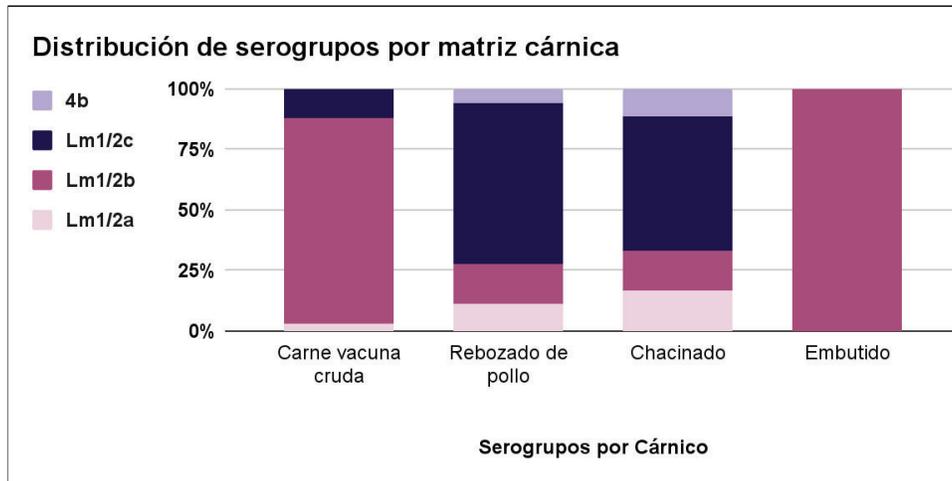


Figura 14: Distribución de frecuencias de serogrupos según tipo de cárnico

Distribución de los serogrupos según los establecimientos involucrados

Una vez realizado el análisis molecular de serogrupos de los aislamientos obtenidos durante este periodo, fue necesario hacer una evaluación de la distribución de estos según los establecimientos intervinientes en este ensayo. Esta distribución sólo tiene en cuenta el origen de las muestras. De esta manera se podrá evaluar si existe una relación entre los serogrupos mayoritariamente aislados y el establecimiento origen del aislamiento.

Tal como se observa en la Figura 15, se detectó una relación entre los serogrupos identificados con el origen del establecimiento de la matriz. En los establecimientos (1, 2, 5, 6, 9 y 10), se observó mayoritariamente el serogrupo IIb, indistintamente de la matriz de la cual se aisló este patógeno.

Por otra parte, en algunos pocos casos también se detectó diversidad de serogrupos en un mismo establecimiento como por ejemplo en 7 y 8. Particularmente para el caso del establecimiento 7 se puede observar que este es productor de carne vacuna cruda, embutidos y chacinados, lo que amplía el espectro de producción pudiendo aumentar la cantidad de materias primas, orígenes y maquinarias.

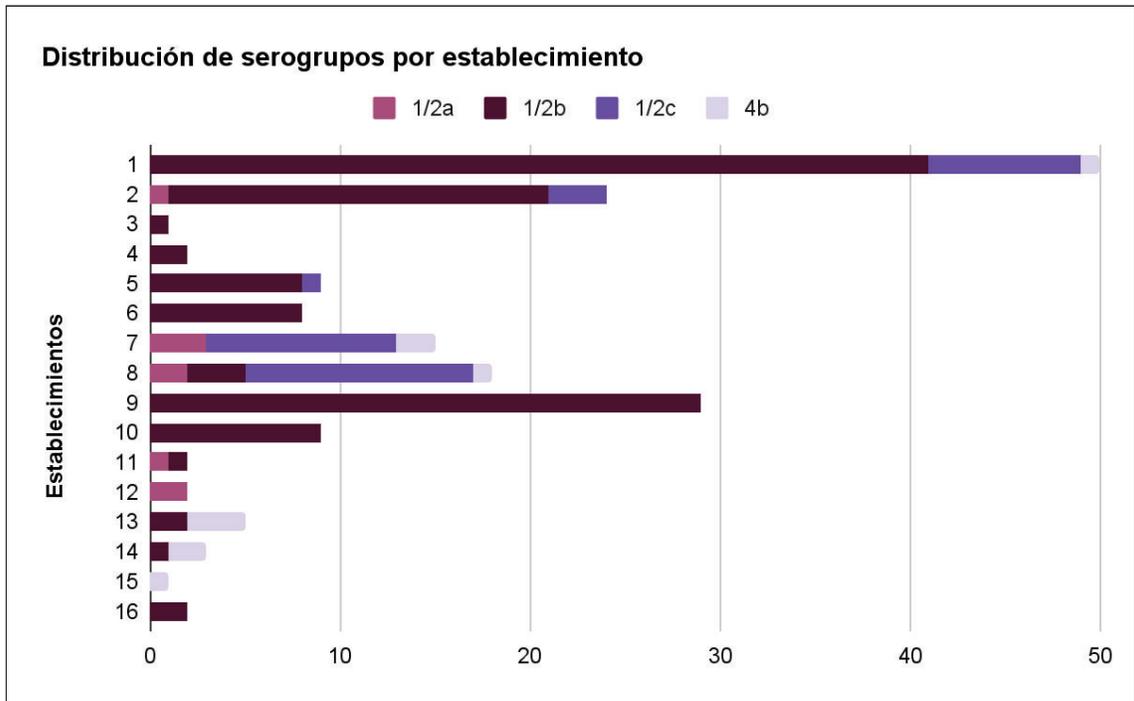


Figura 15: Distribución de frecuencias (porcentual) de serogrupos identificados por establecimiento.

Etapa 3: Análisis de los monitoreos ambientales

Monitoreo ambiental

En el laboratorio se recibieron hisopados y esponjados de ambiente y superficies de los establecimientos productores. De las 180 muestras serotipificadas, 19 de ellas provienen de monitoreos ambientales (Tabla 16).

Tabla 16: Monitoreo ambiental

Superficies analizadas	Nº de hisopados
Caso 1: Superficies del establecimiento 1	6
Caso 2: Superficies del establecimiento 9	5
Caso 3: Superficies del establecimiento 6	6
Caso 4: Superficies del establecimiento 14	2
Total	19

A continuación se explicarán cada uno de los casos estudiados:

Caso 1

El cliente 1 es una empresa elaboradora de alimentos envasados. Elabora sándwiches, comidas variadas, materias primas para preparación de alimentos, comidas rápidas y envasadas al vacío.

A finales del año 2017, la empresa contactó al laboratorio para solicitar información y enviar muestras de productos terminados y envasados de su planta elaboradora de alimentos.

Envío de muestras a través del tiempo

Primera tanda:

Diciembre 2017: se recibieron en el laboratorio, 10 muestras provenientes de productos terminados (sándwiches y ensaladas envasadas al vacío). Luego de realizar el cultivo, se detectó en una (10%) de las muestras un aislamiento compatible con *L. monocytogenes* (Tabla 17).

Producto terminado positivo:

- Pan de campo con jamón y queso.

Enero 2018: se recibieron en el laboratorio, 25 muestras de productos terminados (sándwiches y tartas). Luego del cultivo, se obtuvo que 7 (28%) de estas muestras arrojaron un resultado compatible con *L. monocytogenes* (Tabla 17).

Productos terminados positivos:

- Pan de campo con jamón y queso (cuatro lotes distintos).
- Pan de semillas de amapola con jamón y queso y manteca (tres lotes distintos).

Febrero 2018: se recibieron en el laboratorio 23 muestras provenientes tanto de materias primas como de productos terminados. Dentro de las materias primas, se recibieron muestras de queso feteado y sin fetear y de manteca. Dentro de los productos terminados, se recibieron únicamente sándwiches. Luego del cultivo correspondiente, se obtuvo en una de las muestras de queso feteado un aislamiento de *L. monocytogenes*. Además se obtuvieron 15 (65,2%) muestras de sándwiches con aislamientos compatibles con *L. monocytogenes* (Tabla 17).

Materias prima positivas:

- Queso feteado.

Producto terminado positivo:

- Pan de campo con jamón y queso (cinco lotes positivos).
- Sándwich mixto de jamón y queso con semillas (un lote).
- Sándwich de jamón y queso congelado (cinco lotes positivos).
- Pan de semillas de amapola con jamón y queso y manteca (cuatro lotes positivos).

Marzo 2018: se recibieron en el laboratorio 14 muestras provenientes de materias primas. Entre éstas había fiambre de cerdo, muzzarella feteada y sin fetear, queso cheddar feteado, pechuga de pollo, jamón crudo, longaniza feteada y salame feteado y sin fetear. Luego del cultivo, se obtuvo un (7,1%) aislamiento compatible con *L. monocytogenes* en una de las materias primas (Tabla 17).

Materia prima positiva:

- Muzzarella feteada.

Tabla 17: Resumen de aislamientos positivos de *L. monocytogenes* en caso 1

Mes	Materia prima (cantidad)	Presencia de <i>Lm</i> en materia prima	Porcentaje (%)	Producto terminado (cantidad)	Presencia de <i>Lm</i> en producto terminado	Porcentaje (%)
Diciembre	0	0	0	10	1	10
Enero	0	0	0	25	7	28
Febrero	3	1	33,3	20	15	75
Marzo	14	1	7,1	0	0	0
Total	17	2	11,8	55	23	41,8

Segunda tanda:

Debido a la preocupación de la empresa elaboradora de alimentos y tras haber analizado las muestras que resultaron con aislamientos compatibles con *L. monocytogenes*, se sugirió realizar un exhaustivo muestreo ambiental tomando muestras de las distintas áreas y superficies de trabajo.

Abril 2018: se recibieron 20 muestras provenientes de muestreo ambiental, a partir de las cuales se obtuvieron 9 (45%) aislamientos compatibles con *L. monocytogenes* en las siguientes zonas (Tabla 18).

Superficies positivas:

1. Feteadora de queso desarmada.
2. Sector bachas de cocina.
3. Cortina de cocina/producción.
4. Sector de vegetales.
5. Rejilla y canaleta del sector de cocina.
6. Cámara 2.
7. Cámara 5.
8. Túnel 1.

9. Túnel 2.

Mayo 2018: se recibieron 94 muestras en total. De éstas, 67 provenientes de monitoreo ambiental, 6 provenientes de productos terminados y 21 de materias primas. De las 67 muestras de monitoreo ambiental, 30 (44,7%) arrojaron aislamientos compatibles con *L. monocytogenes*. De las 6 provenientes de productos terminados, 2 (33,3%) resultaron con aislamientos compatibles con *L. monocytogenes*. Por último, de las muestras provenientes de materia prima, en ninguna se aisló *L. monocytogenes* (Tabla 18).

Productos terminados positivos:

1. Ciabatta multicereal de jamón y queso (dos lotes distintos).

Superficies positivas (zonas):

1. Feteadora de queso pre limpieza (3 zonas).
2. Feteadora de queso post limpieza (3 zonas).
3. Feteadora de queso en uso (3 zonas).
4. Feteadora de fiambre pre limpieza (3 zonas).
5. Feteadora de fiambre post limpieza (3 zonas).
6. Feteadora de fiambre en uso (3 zonas).
7. Rejillas de producción 1.
8. Rejillas de producción 2.
9. Rejillas de producción 3.
10. Empaquetadora pre limpieza (3 zonas).
11. Empaquetadora post limpieza (3 zonas).
12. Empaquetadora en uso (3 zonas).

Junio 2018: se recibieron 16 muestras en total. De éstas, 11 corresponden a productos terminados, 4 a monitoreo ambiental y 1 a materia prima. De las muestras de producto terminado, en 4 (36,3%) se aisló *L. monocytogenes* y de los esponjados de monitoreo ambiental, en los 4 (100%) se aisló el mismo patógeno (Tabla 18).

Productos terminados positivos:

1. Sándwich triple de jamón y queso.
2. Baguette de jamón y queso.
3. Bagel de lomito y cheddar.
4. Ciabatta multicereal.

Superficies positivas:

1. Feteadora de fiambre post limpieza.
2. Feteadora de queso post limpieza.
3. Empaquetadora post limpieza.
4. Feteadora de queso en uso.

Julio 2018: se recibieron 12 muestras de monitoreo ambiental. De estas, en 4 (33,3%) se obtuvieron aislamientos compatibles con *L. monocytogenes* (Tabla 18).

Superficies positivas:

1. Feteadora de fiambre post limpieza.
2. Feteadora de queso post limpieza.
3. Empaquetadora post limpieza.
4. Feteadora de queso en uso.

Agosto 2018: se recibieron en el laboratorio 24 muestras provenientes de monitoreo ambiental y 1 muestra proveniente de materia prima. De las provenientes de monitoreo ambiental, se obtuvieron 4 (16,6%) superficies con aislamientos compatibles con *L. monocytogenes*. No se aisló *L. monocytogenes* en la muestra de materia prima (Tabla 18).

Superficies positivas:

1. Feteadora de fiambre post limpieza.
2. Feteadora de queso post limpieza.
3. Empaquetadora post limpieza.
4. Feteadora de queso en uso.

Tabla 18: Presencia de *L. monocytogenes* en caso 1 (segunda tanda)

Mes	Materias primas (cantidad)	Presencia de <i>Lm</i> en materias primas	Porcentaje (%)	Productos terminados (cantidad)	Presencia de <i>Lm</i> en productos terminados	Porcentaje (%)	Superficies (cantidad)	Presencia de <i>Lm</i> en superficies	Porcentaje (%)
Abril	0	0	0	0	0	0	20	9	45
Mayo	21	0	0	6	2	33,3	67	30	44,8
Junio	1	0	0	11	4	36,4	4	4	100
Julio	0	0	0	0	0	0	12	4	33,3
Agosto	1	0	0	0	0	0	24	4	16,7
Total	23	0	0	17	6	35,3	127	51	40,2

Tercera tanda:

Marzo 2019: luego de siete meses sin recibir muestras, ingresaron en el laboratorio 10 esponjados provenientes de monitoreo ambiental. De estas se obtuvieron 7 (70%) con aislamientos compatibles con *L. monocytogenes*.

Superficies positivas:

1. Feteadora de queso pre limpieza.
2. Feteadora de fiambre pre limpieza.
3. Empaquetadora pre limpieza.
4. Feteadora de queso post limpieza.
5. Feteadora de fiambre post limpieza.
6. Feteadora de queso en uso.
7. Empaquetadora en uso.

Análisis de serogrupos de los aislamientos positivos

Desde diciembre 2017 hasta marzo 2019, se recibieron 245 muestras del establecimiento 1. A partir de estas, se obtuvieron 81 (33,1%) aislamientos compatibles con *L. monocytogenes*; 28 (34,5%) de estas provenían de productos terminados, 2 (2,5%) de materias primas feteadas y 51 (63%) de monitoreo ambiental. De los 81 aislamientos compatibles con *L. monocytogenes*, se seleccionaron 30 aislamientos. De estos 30, 23 corresponden a alimentos listos para consumo, 1 a materia prima (muzzarella feteada) y 6 a

hisopados de superficies. Posteriormente se realizó serotipificación molecular, la cual arrojó en todos los aislamientos el serogrupo IIb (Tabla 19).

Tabla 19: Muestras totales y serotipificación de caso 1

Muestras totales (Dic 2017 a Mar 2019)	245
Positivas totales	81
Productos terminados positivos	28
Materias primas positivos	2
Monitoreos ambientales	51
Con PCR de serogrupos	30
Serogrupos aislados	IIb (30/30)

Interpretación de resultados del caso 1

Luego del aislamiento y posterior serotipificación de las muestras (productos terminados, materias primas y monitoreos ambientales) pertenecientes al caso 1, se detectó en todas las muestras serotipificadas el serogrupo IIb. Esto infiere la idea de que la contaminación de los productos terminados y materias primas en este establecimiento se relaciona directamente con las superficies contaminadas, instrumentos de trabajo y escasez de buenas prácticas de producción.

En el análisis minucioso del caso 1, se pudieron identificar los siguientes hallazgos:

- Contaminación de la planta productora de alimentos listos para consumo con *L. monocytogenes*.
- Diseminación de *L. monocytogenes* entre superficies, materias primas y productos terminados: se ha detectado la presencia de *L. monocytogenes* en las materias primas, productos terminados y superficies de monitoreo ambiental.
- Los productos terminados contaminados son siempre los mismos: un producto panificado con jamón y queso feteado en su interior.
- En el análisis de monitoreo ambiental se han observado una gran cantidad de superficies con aislamientos compatibles con *L. monocytogenes*: feteadoras, bachas, cortinas, rejillas, cámaras, túneles, y empaquetadoras.
- Las materias primas no se encuentran contaminadas cuando arriban a la planta. Se observó que tanto el queso como el jamón entero no presentaban *L.*

monocytogenes, sino que se aislaba el microorganismo luego de fetearse. Esto es compatible con los aislamientos obtenidos de la feteadora.

- En todos los aislamientos obtenidos de productos terminados, materias primas y superficies ambientales, se detectó el serogrupo IIb. Si bien este análisis molecular por PCR múltiple de serogrupos es insuficiente para asegurar la identidad clonal, este sería el primer paso a realizar para estudiarla.

Caso 2

El caso 2 corresponde a una empresa elaboradora de productos procesados con marca, complementada a una planta con actividad frigorífica. Los productos se destinan tanto al mercado local como al mercado internacional y uno de estos productos son las salchichas envasadas. En estas últimas, se realizó la búsqueda de *L. monocytogenes* según norma ISO 11290:2017 y posteriormente se serotipificó molecularmente.

Envío de muestras a través del tiempo

Junio 2020: se recibieron 42 muestras de salchichas provenientes de la planta procesadora de embutidos con solicitud de búsqueda de *L. monocytogenes*. De estas se obtuvieron 18 (42,8%) muestras en las cuales se aisló *L. monocytogenes* (Tabla 20).

Julio 2020: se recibieron 14 muestras de salchichas provenientes de la planta procesadora. A partir de estas se obtuvo 1 (7,1%) muestra con aislamiento compatible con *L. monocytogenes* (Tabla 20).

Diciembre 2020: se recibieron 7 muestras de salchichas provenientes de la planta procesadora de embutidos. De estas se obtuvieron 5 (71,4%) muestras en las cuales se aisló *L. monocytogenes* (Tabla 20).

Además, se recibieron 27 muestras provenientes del monitoreo ambiental de las superficies de trabajo de la planta procesadora. En ninguna de estas se obtuvo aislamiento compatible con *L. monocytogenes*.

Febrero 2021: se recibieron 70 muestras provenientes de monitoreo ambiental de las superficies de trabajo de la planta procesadora. A partir de estas, se obtuvieron 5 (7,1%) superficies en donde se aisló *L. monocytogenes* (Tabla 20).

Las zonas del monitoreo ambiental en las cuales se aisló *L. monocytogenes* fueron:

1. Punto 8 Drake 1 - 2/2/21.
2. Punto 8 Drake 1 - 3/2/21 .
3. Tronera de peladoras - 4/2/21.
4. Punto 9 Drake 1 - 5/2/21.
5. Desagüe N°5 - 5/2/21.

Tabla 20: Resumen de muestras enviadas de caso 2

Muestras	Producto terminado			Monitoreo ambiental		
	Totales	Positivas	Porcentaje (%)	Totales	Positivas	Porcentaje (%)
Junio 2020	42	18	42,9	0	0	0
Julio 2020	14	1	7,1	0	0	0
Diciembre 2020	7	5	71,4	27	0	0
Febrero 2021	0	0	0	70	5	7,1
Totales	63	24	38,1	97	5	5,2

Análisis de serogrupos de los aislamientos positivos

A partir de la totalidad de las muestras recibidas en el laboratorio, se desprende que de las 63 muestras provenientes de productos terminados (salchichas), se obtuvieron 24 (38,1%) aislamientos compatibles con *L. monocytogenes*. En cuanto al monitoreo ambiental se observó que, de las 97 muestras recibidas en el laboratorio, 5 (5,2%) arrojaron resultados compatibles con *L. monocytogenes*.

La serotipificación molecular se realizó en los 29 aislamientos obtenidos en el caso 2. Los resultados se observan en la tabla 21:

Tabla 21: Serogrupos aislados en caso 2

Muestra	Cantidad	Perfil detectado
Producto terminado	24	1/2b
Monitoreo ambiental	5	1/2b
Total	29	1/2b

Interpretación de los resultados del caso 2

A partir de estos resultados se evidenció que a lo largo de un periodo de 9 meses, se recibieron un total de 63 muestras de producto terminado, en donde se obtuvieron 24 aislamientos compatibles con *L. monocytogenes* pertenecientes al serogrupo IIb. En diciembre de ese mismo año, las muestras provenientes del monitoreo ambiental de las superficies de trabajo de la empresa, no presentaron aislamientos compatibles con *L. monocytogenes*. Esta primera tanda recibida, coincide con la mayor cantidad de productos terminados positivos, pero como se observó, no se obtuvieron superficies positivas. Esta no concordancia entre producto terminado y superficies, resultó extraña para el laboratorio debido a la gran cantidad de muestras contaminadas y a la relevante capacidad de *L. monocytogenes* de formar biopelículas.

Posteriormente, en febrero de 2021, y tras el análisis de 70 muestras de monitoreo ambiental de superficies, se pudo observar en 5 (3,5%) de ellas aislamientos compatibles con *L. monocytogenes* serogrupo IIb y correlaciones entre las zonas de muestreo y los días en los cuales se realizaron.

Estos resultados acercan a la posibilidad de una cepa de *L. monocytogenes* IIb permanente en este establecimiento.

Caso 3

El caso 3 corresponde a una empresa de biociencia que desarrolla ingredientes a base de cultivos microbianos destinados a las industrias de alimentación y nutrición, farmacéutica y agrícola. Esta empresa cuenta con plataformas de tecnología microbiana y fermentativa, en donde utilizan el poder de bacterias benéficas para responder a las demandas de las industrias productoras de alimentos.

En este caso, el cliente se contactó con el laboratorio para evaluar el poder de bioprotección de uno de sus productos implementándolo en la planta elaboradora de salchichas envasadas al vacío. A su vez, como vimos en el caso 2, esta empresa es cliente regular del laboratorio.

La bioprotección consiste en emplear un derivado biológico, que en este caso fue un cultivo de bacterias lácticas identificado como *Lactobacillus curvatus*, para inhibir el deterioro y proteger contra una contaminación nociva en los alimentos (que en este caso sería *L. monocytogenes*). Este principio facilita el mantenimiento de los productos en forma fresca y segura. La identificación del cultivo de bacterias lácticas se realizó en el laboratorio mediante PCR secuenciación y MALDI-TOF MS. El inóculo de *Lactobacillus curvatus* que se utiliza como bioprotector presenta un recuento entre 1.10^4 - 1.10^6 .

Envío de muestras a través del tiempo

03/12/2021: Se recibieron ocho muestras provenientes de productos terminados sometidos a distintas condiciones. A estos se les solicitó la búsqueda y aislamiento de *L. monocytogenes* para poner a prueba la eficacia del cultivo bioprotector de bacterias lácticas.

Condiciones

1. Producto terminado crudo sin cultivo bioprotector.
2. Producto terminado crudo sometido al rociado con el cultivo bioprotector.
3. Producto terminado sin cultivo bioprotector horneado.

Tras el cultivo y posterior aislamiento, se obtuvo que en las 2 (25%) muestras sometidas al rociado del cultivo bioprotector, se obtuvo aislamiento de *L. monocytogenes* (Tabla 22).

Tabla 22: resumen caso 3 - primera parte

Matriz	Cantidad	Presencia de Lm
Pre rociado	4	0
Post rociado	2	2
A la salida del horno	2	0
Total	8	2

21/12/2020: Debido a la incongruencia en los resultados del anterior estadio, la empresa de biociencia decide enviar al laboratorio muestras provenientes de productos terminados y monitoreos ambientales sin el empleo del cultivo bioprotector. En esta etapa, se recibieron 21 muestras provenientes de monitoreo ambiental y productos terminados en distintos estadios. De estas, 10 corresponden a muestras de productos terminados y 11 a monitoreos ambientales. Las 11 muestras de monitoreo ambiental provienen de hisopados de superficies de las áreas de trabajo en la planta elaboradora de salchichas. Un total de 5 (24%) muestras de monitoreo ambiental arrojaron resultados compatibles con *L. monocytogenes*.

Las muestras de producto terminado corresponden a los siguientes estadios (Tabla 23):

- Producto terminado esteril (sin cultivo bioprotector).
- Producto terminado esteril y envasado (sin cultivo bioprotector).

Luego de la realización del cultivo, se aisló *L. monocytogenes* en 5 (23,8%) hisopados de las superficies monitoreadas. En los productos terminados no se obtuvieron aislamientos compatibles con *L. monocytogenes*.

Tabla 23: resumen caso 3 - segunda parte

Matriz	Total	Presencia de Lm
Monitoreo ambiental	11	5
Producto terminado esteril	2	0
Producto terminado envasado	8	0
Total	21	5

04/02/21: se recibieron 7 muestras provenientes de monitoreo ambiental en donde en una (14,2%) de ellas se aisló *L. monocytogenes*. En esta oportunidad, no se recibieron muestras de producto terminado (Tabla 24).

Tabla 24: resumen caso 3 - tercera parte

Matriz	Total	Presencia de Lm
Monitoreo ambiental	7	1

Análisis de serogrupos de los aislamientos positivos

De los 8 aislamientos compatibles con *L. monocytogenes* identificados en el laboratorio, y luego de realizar la serotipificación molecular, se obtuvo en todos los casos el serogrupo IIb (Tabla 25).

Tabla 25: Serotipificación de aislamientos de caso 3

Muestras	Total	Perfil aislado
PT post rociado	2	1/2b
Monitoreo ambiental	6	1/2b
Total	8	1/2b

Interpretación de los resultados del caso 3

Según lo detectado en el caso 3 (y vinculándolo con el establecimiento del caso 2), se puede observar que la problemática del establecimiento radica en la contaminación a nivel ambiental de la planta procesadora, lo que genera que se aisle *L. monocytogenes* tanto en los productos terminados como en los monitoreos ambientales. Con respecto al cultivo bioprotector, no se pueden generar conclusiones debido a que las primeras medidas a tomar deberían ser las de sanitizar la planta y asegurarse de que las buenas prácticas de producción se lleven a cabo correctamente y posteriormente analizar si el cultivo bioprotector es efectivo o no.

Caso 4

El caso 4 corresponde a una empresa láctea de origen argentino vinculada a capitales extranjeros. Esta empresa comercializa sus productos en Argentina y otros países (Francia, España, Alemania, Irlanda, República Checa, Hungría, Polonia, Serbia, Ucrania, India, Japón, Egipto, Estados Unidos, Brasil, Uruguay y Chile). Algunos de los productos que mayoritariamente comercializa son: leche, crema, dulce de leche, yogur, queso untable, manteca, queso rallado, quesos en fetas, quesos blandos, quesos semiduros y quesos duros.

Envío de muestras a través del tiempo

El cliente se contactó con el laboratorio en el mes de diciembre de 2020 para enviar una muestra de producto terminado (queso) la cual ya presentaba la confirmación por

cultivo de *L. monocytogenes*. Posteriormente, al mes siguiente (enero 2021), se recibieron en el laboratorio dos muestras provenientes del monitoreo ambiental de superficies de trabajo de la empresa láctea. Tras el cultivo, se obtuvo aislamiento compatible con *L. monocytogenes* en las dos muestras de monitoreo ambiental.

Análisis de serogrupos de los aislamientos positivos

A los tres aislamientos compatibles con *L. monocytogenes*, se les realizó la serotipificación molecular. Es importante destacar, que ambas muestras de monitoreo ambiental (superficie 1 y superficie 2), arribaron al laboratorio el mismo día.

Los resultados se observan en la tabla 26:

Tabla 26: Resumen caso 4

Muestra	Fecha de ingreso	Perfil aislado
Producto terminado	Diciembre	4b
Superficie 1	Enero	4b
Superficie 2	Enero	1/2b

Interpretación de resultados del caso 4

Según lo detectado en el caso 4, se pudo observar que el producto terminado analizado en primera instancia presentaba un aislamiento de *L. monocytogenes* serogrupo IVb. Posteriormente, tras analizar dos esponjados de monitoreos ambientales de esta planta, se pudo detectar que se aisló en una de ellas *L. monocytogenes* serogrupo IVb y en la otra *L. monocytogenes* serogrupo IIb. Esto podría significar que el producto terminado se contaminó con la superficie 1 (y no con la 2). Debido a que la cantidad de muestras recibidas son escasas y la información brindada por parte del cliente es insuficiente para sacar conclusiones, se necesitaría ampliar el estudio para realizar un mejor análisis de la casuística.

Discusión

Para los fines prácticos y tradicionales, la serotipificación continúa siendo hoy en día el método de subtipificación de primer nivel en los laboratorios de salud pública, a pesar de su limitada capacidad para rastrear aislamientos (Nyarko & Donnelly, 2015), el bajo poder discriminatorio del método y la dificultad de replicación (Brosch et al., 1996). Para escapar a estas limitaciones, el ensayo de PCR múltiple que incluye los genes *Imo0737*, *Imo1118*, *ORF2819*, *ORF2110* y *prs* para la identificación molecular de los cuatro serogrupos principales de *L. monocytogenes* (IIa, IIb, IIc y IVb), desarrollado por Doumith et al (2004), resultó ser una alternativa confiable (Doumith, Buchrieser, et al., 2004; Doumith, Cazalet, et al., 2004).

Del total de los aislamientos obtenidos compatibles con *L. monocytogenes*, se serotipificaron 180 muestras provenientes de distintos orígenes. A partir de los aislamientos serotipificados se observó que el serogrupo mayoritario con un 68,9% es el serogrupo IIb, seguido del IIc que representa el 20,5% y por último el IVb y el IIa que representan el 5,6% y el 5% respectivamente. Si bien la PCR múltiple propuesta no distingue dentro de los serogrupos estudiados, los serovares 3a, 3b, 3c, 4a, 4c, 4e, 4d y 7 son muy poco frecuentes en los alimentos y rara vez se han detectados en listeriosis humana (Doumith, Buchrieser, et al., 2004). El presente trabajo aporta valiosa información sobre los serogrupos prevalentes que circulan en nuestro país.

En una investigación realizada en Uruguay en comercios minoristas e industrias de alimentos, observaron comparablemente al serotipo 1/2b como el mayoritario y proponen que puede permanecer viable durante períodos prolongados (Braga et al., 2017). Investigadores de distintas partes del mundo obtuvieron resultados diferentes. Paduro et al. (2017) en Chile, en una investigación de vigilancia en muestras de alimentos y aislamientos clínicos de *L. monocytogenes* que tuvo una duración de diez años, encontraron que los serotipos más detectados fueron el 4b (40%) y 1/2a (31,2%). Por su parte, Wu et al. (2015) en productos crudos, al igual que Yu et al. (2014) en productos de comercios minoristas, observaron en su investigación entre el año 2012 y 2014 en China que el serotipo

mayoritario fue el 1/2a con el 45,2%, seguido de 1/2b con el 30,6%, 1/2c con el 16,1% y por último el 4b con el 5,2%.

Según lo detectado en distintas partes del mundo y lo observado en esta investigación el serogrupo mayoritario es variable según la región del mundo en el cual se esté realizando el aislamiento (Y. Liu et al., 2019), la matriz de la cual se aisle (Augustin et al., 2011) y el origen establecimiento del cual se recolecte (Londero, Costa, Galli, et al., 2019). Estas variaciones se encuentran relacionadas a la capacidad de la *L. monocytogenes* para adherirse y persistir en distintas regiones, superficies y elementos de trabajo y de resistir a agentes sanitizantes (Carpentier & Cerf, 2011).

Los productos cárnicos se consideran una de las principales fuentes de transmisión de *L. monocytogenes* y esta es una de las razones por la cual la principal matriz de estudio del laboratorio son justamente este tipo de alimentos. Teniendo en cuenta la totalidad de matrices cárnicas que ingresaron al laboratorio, se pudo observar que el porcentaje de positividad fue del 17,6%. En Argentina, existen escasos estudios nacionales en donde se evaluó la prevalencia del patógeno en cuestión en carne cruda bovina y porcina [Red de Seguridad Alimentaria del CONICET; <https://rsa.conicet.gov.ar>]. Sin embargo, en China, se ha informado un nivel de prevalencia de *L. monocytogenes* en carne y productos cárnicos de 29,9% (M. Chen et al., 2019). Según estas investigaciones, la variación puede atribuirse a diferencias en el tamaño de la muestra, la constitución propia de la muestra, la ubicación geográfica, los procesos de manufactura, entre otros factores.

En la presente investigación, se observó que el serogrupo mayoritario fue el IIb en un 64% de los aislamientos. Sin embargo, con el objetivo de profundizar el análisis de la categoría de cárnicos, se realizó un desglose dependiendo de las diferentes características y orígenes de las matrices cárnicas que se incluyen en esta categoría.

La subcategoría de carne vacuna cruda en donde se obtuvieron 82 muestras con aislamientos compatibles con *L. monocytogenes*, representó un 14% de la positividad de los cárnicos a diferencia de lo que estimado por Liu et al (2019) en China con una prevalencia de *L. monocytogenes* en carne cruda del 8,5%. En el análisis de serogrupos de esta

subcategoría, se observa que el 85% de los aislamientos corresponde al serogrupo IIb, luego en menor medida el IIc (12%) y el IIa (3%). Si bien las muestras de carne cruda recibidas en el laboratorio son mayoritariamente recortes bovinos, cuando comparamos los resultados obtenidos con una investigación de la región realizada por Londero, Costa, Galli et al. (2019) en carne picada cruda se observa que la distribución de los serotipos que hallaron fue la siguiente: 1/2c (57,6%), 1/2b (18,7%), 4b (12,9%), 1/2a (6,5%) y 4a/4c (4,3%). Las razones de esta diferencia pueden deberse principalmente a la matriz del estudio (teniendo en cuenta que en esta investigación no se estudiaron este tipo de matrices), así como también la zona en donde se realizó la investigación y los proveedores involucrados en el abastecimiento de la carne cruda. Esto último, toma relevancia si tenemos en cuenta que la gran mayoría de las contaminaciones en los alimentos estudiados se relacionan íntimamente con las condiciones de los establecimientos.

Otro de los principales vehículos de *Listeria* spp. son las aves de corral, que pueden propagar este microorganismo al medioambiente (Jamshidi & Zeinali, 2019). *L. monocytogenes* se ha informado en diferentes productos avícolas, desde productos crudos hasta cocidos (Osaili et al., 2011). En esta investigación, en la subcategoría de rebozados de pollos se observó un 40,4% de positividad para aislamientos de *L. monocytogenes*. Este resultado es comparable con el de Schäfer et al. (2017), en donde informaron que la tasa de contaminación de las muestras de pechuga de pollo y muslo de pollo fue de 8,64% y 44,19%, respectivamente (Schäfer et al., 2017). En esta subcategoría se observó que el serogrupo mayoritariamente aislado es el IIc en un 67% de las muestras, seguido por el IIb en un 17% de las muestras, el IIa con un 11% y por último el IVb con un 6% de las muestras. Estos resultados difieren a los detectados por otros investigadores en donde en algunos casos, el serotipo 1/2b fue el más hallado (Zeinali et al., 2015) y en otros en donde el 4b fue el más predominante en productos avícolas (Fallah et al., 2012).

En nuestro caso, la procedencia de las muestras de un único establecimiento juega un rol crucial en el perfil mayoritariamente hallado, además de que la diversidad de serogrupos aislados hace referencia a que el proveedor de materias primas de pollo no sería uno solo (el análisis de los orígenes de las muestras con sus respectivos serogrupos se hará en otro apartado).

La subcategoría de chacinados arrojó un porcentaje de positividad del 18,5% y el serogrupo mayoritariamente hallado en esta matriz fue el IIc (62%), seguido del IIb (23%) y por último el IIa (15%). Para algunos investigadores, el procesamiento y la producción de chacinados en sí ha demostrado ser una causa importante de contaminación (Prencipe et al., 2012). En Brasil, por ejemplo, los resultados de una investigación realizada en San Pablo fueron sustancialmente diferentes a los obtenidos en esta investigación. En ese caso, la tasa de positividad fue de 0,8% en muestras de jamón y los serotipos mayoritariamente hallados fueron en orden decreciente, 4b (37,5%), 1/2b (25%), 3b (25%) y 1/2c (12,5%) (Martins & Leal Germano, 2011). Las diferencias que se observan con respecto a nuestra investigación, podrían radicar en que los productos analizados en Brasil se encontraban en estadio de comercialización, a diferencia de los analizados en nuestra investigación en donde los productos se encuentran en la etapa previa a la liberación del lote. Además, es fundamental las condiciones de los establecimientos, la diversidad de matrices que se procesan en estos y las manipulaciones que sufren previo al envío al laboratorio. Algunas de las medidas que se podrían tomar para mejorar la calidad y asegurar la inocuidad del producto podrían resguardar las buenas prácticas de manufactura, preservar la higiene en la manipulación, preparación, elaboración, envasado, almacenamiento, transporte y distribución de alimentos para consumo humano, con el objeto de garantizar la inocuidad del producto.

En la subcategoría de embutidos se observó que la tasa de positividad de *L. monocytogenes* es de 27%. Este porcentaje, es comparable con las investigaciones de De Cesare et al. (2007) en donde la prevalencia global de *L. monocytogenes* en las salchichas muestreadas fue del 28,2% y de Mureddu et al. (2014) en donde informaron una prevalencia del 31,5%. En esta matriz, se encontró que el 100% de las muestras presentaban el serogrupo IIb, sin presencia de los otros tres serogrupos, hallazgo no comparable a otros estudios como por ejemplo el de Mureddu et al. (2014) en donde observaron que el serotipo prevalente resultó 1/2c (43%), seguido de 1/2a (40%), 4b (8,6%) y 1/2b (8,6%).

Es importante destacar que la alta prevalencia de *L. monocytogenes* en la carne y los productos cárnicos en algunos casos, pero no en otros, sugiere que la contaminación

probablemente ocurra a nivel de procesamiento. Esto suele estar asociado con las condiciones de higiene de los entornos minoristas en los cuales se dispensan estos productos.

Adicionalmente, en un análisis sobre consumo de embutidos fermentados y riesgo de listeriosis realizado en Argentina, se observó que el riesgo de enfermedad (listeriosis) por consumo de paleta de cerdo, es insignificante incluso en las poblaciones más susceptibles. Estos investigadores afirman que el estricto control de la temperatura del proceso es de vital importancia para disminuir el riesgo de listeriosis. Además, la protección que otorga el actual criterio microbiológico argentino para los embutidos fermentados y la paleta de cerdo curada en seco (ausencia de *L. monocytogenes* en 25 g de producto) garantiza la inocuidad de estos productos (Brusa et al., 2021).

Finalmente, es interesante destacar que existen investigaciones en listeriosis bovina en Argentina en donde han aislado el patógeno en los ambientes de feedlot y tambos asociados a sistemas de producción intensivos. En estos se utilizan comúnmente diferentes suplementos alimenticios y es frecuente el aislamiento de *L. monocytogenes* asociada al agua, los alimentos de los animales y sus ambientes (Margineda et al., 2012).

El consumo de productos alimenticios listos para consumo se encuentra en crecimiento debido al estilo cambiante de vida de los ciudadanos. *L. monocytogenes* presenta una alta tasa de supervivencia y se ha aislado de alimentos listos para consumo crudos, mínimamente procesados e incluso procesados térmicamente (Jamali et al., 2013). Este patógeno es considerado un indicador del estado sanitario de las plantas procesadoras de alimentos (Jemmi & Stephan, 2006) debido a su capacidad de formar biofilms que son resistentes a los sanitizantes.

En esta investigación, los aislamientos de *L. monocytogenes* en muestras de alimentos listos para consumo, representan el 16%. Este resultado es similar con el 13,5% observado por Szymczak et al. (2020) en una reciente investigación. En cuanto a los serogrupos hallados en nuestra investigación, se observó mayoritariamente el serogrupo IIb (74%), luego el IIc (23%) y por último el IVb (2%). El serogrupo IIb, aislado comúnmente en alimentos listos para consumo, participa en la mayoría de los brotes de enfermedades

transmitidas por los alimentos siendo un problema en la salud pública (Jamali et al., 2013) ((Wang et al., 2015). Nuestra investigación coincide con la realizada en Corea en alimentos listos para consumo a base de pescado y los entornos de procesamiento, en donde observaron que las cepas aisladas pertenecían mayoritariamente al serotipo 1/2b (73%) y que 11 de las muestras de hisopos ambientales obtenidas pertenecían al mismo serotipo (Lee et al., 2017).

Lo anteriormente nombrado difiere con lo observado por otros investigadores en otras partes del mundo. En Japón por ejemplo, en una investigación en donde tan solo se aisló *L. monocytogenes* en 52 (1,7%) de 2980 muestras, el serotipo más común fue 1/2a (Shimajima et al., 2016).

Según una investigación realizada por Kurpas et al (2018) en alimentos listos para consumo con contenido cárnico, una de las formas más importantes de proteger los alimentos de *L. monocytogenes* es prevenir la propagación de las bacterias en las plantas de procesamiento en las diferentes etapas de la cadena de producción de alimentos. Estas etapas son las siguientes: cadena de producción de la carne, ganado con adecuado manejo veterinario y calidad de los piensos, almacenamiento de la carne, entorno de procesamiento de los alimentos listos para consumo y los comercios minoristas (Kurpas et al., 2018).

Los alimentos listos para consumo que están contaminados con *L. monocytogenes* podrían plantear graves problemas de salud debido a que las condiciones de almacenamiento inadecuadas pueden permitir un rápido crecimiento del patógeno. Algunas de estas condiciones erróneas se deben a la refrigeración a destiempo, temperaturas por encima de los niveles recomendados, errores en las condiciones de almacenamiento de acuerdo a las características del producto, consumo del alimento a destiempo, entre otras (Center for Food Safety & Nutrition, 2021).

La categoría de bebidas hídricas, agua y agua gasificada y la de alimentos lácteos se discutirán en conjunto debido a las similitudes que presentan. La categoría de bebidas hídricas, agua y agua gasificada está conformada en su totalidad, en el presente trabajo, por helados y se ha detectado que el porcentaje de positividad de *L. monocytogenes* fue del

4,2%. En esta categoría se detectó al serogrupo IIb como el mayoritario (73%) y posteriormente al IVb (27%). Por otra parte, los alimentos lácteos presentaron un porcentaje de positividad del 14,3%. En esta categoría se detectó principalmente al serogrupo IIa (50%), luego el IIb (25%) y IVb (25%). La relevancia de estos resultados radica en la forma de consumo de estos alimentos. Tal como informa Barbuddhe et al (2008), los serotipos 1/2a, 1/2b y 4b son los principales serotipos asociados con enfermedades en humanos. En la bibliografía consultada no se han encontrado gran cantidad de investigaciones haciendo foco en estas matrices. Pese a eso, durante el 2015 se desató un brote asociado al consumo de helados en Estados Unidos, evidenciando que las mejoras en la epidemiología y los métodos de detección, han llevado al reconocimiento temprano de los brotes asociados a los productos lácteos (Buchanan et al., 2017).

A su vez, en una investigación realizada en San Pablo en quesos, salmuera y ambiente de producción de queso, se detectaron los serotipos 4b, 1/2b y 1/2c. Además, en esta misma investigación se evaluó la capacidad de producir biofilms por cada uno de estos serotipos y se concluyó que no se observó relación entre los serotipos y su capacidad para formar biopelículas (In Lee et al., 2017).

Cabe destacar que el serotipo 4b es el más frecuentemente hallado en los casos de listeriosis humanas. En algunas investigaciones este serotipo representa más del 55% de los casos de listeriosis invasiva (Kuch et al., 2018). Pese a esto, existen algunas investigaciones realizadas en matrices alimentarias que plantean la hipótesis de que, aunque el serogrupo IVb podría llegar a tener una mayor virulencia, sería menos capaz de sobrevivir en los alimentos en comparación con los otros serogrupos (Kathariou, 2002; Lomonaco et al., 2015; Wałęcka-Zacharska et al., 2015).

Si bien este tipo de matrices no constituyen el número mayoritario de esta tesis, es importante tener en cuenta que existen investigaciones realizadas en bovinos y ambientes de predios lecheros en donde se ha detectado la presencia de *L. monocytogenes* en amplia distribución alertando de la importancia y peligro potencial que representan para la salud humana y animal (Latorre et al., 2009; Mohammed et al., 2009). Además, según Matto et al (2019), se ha detectado la presencia de bovinos portadores clínicamente sanos que excretan

L. monocytogenes por materia fecal. Esto constituye un riesgo potencial de contaminación de la leche y de distribución del patógeno en el ambiente de los sistemas de producción lechera (Matto et al., 2019).

L. monocytogenes puede afectar a las industrias productoras de vegetales congelados debido a que estos alimentos no están sometidos a tratamientos térmicos para eliminar a este patógeno del producto final (Panadero et al., 2019). Los alimentos se pueden contaminar en cualquier eslabón de la cadena productiva, así como también en el almacenamiento en frío. Además, la reversibilidad de los daños tras la congelación de *L. monocytogenes* contribuye a que los vegetales congelados contaminados sean una fuente potencial de infección. Según diversos estudios, la incidencia de este patógeno en vegetales congelados se encuentra entre 1,2% y 46% (Flanders & Donnelly, 1994).

Otros estudios indican que el riesgo de transmisión de *L. monocytogenes* por el consumo de verduras es bajo. Pese a esto, la persistencia del patógeno es motivo de preocupación por lo que se recomiendan controles periódicos de la presencia de *Listeria* spp. en este tipo de industrias y una revisión periódica de los procedimientos de limpieza y desinfección utilizados en las plantas (Aguado et al., 2004).

Si bien en esta investigación, los vegetales y vegetales congelados no se encuentran en gran proporción, se detectó que el porcentaje de positividad fue de 5,1% y que los serogrupos obtenidos, en igual proporciones, fueron el IIa y el IIb. Estos resultados presentan similitudes con los obtenidos por otros grupos de investigación en donde detectaron en un 66% de sus aislamientos de *L. monocytogenes* el serotipo IIa (Moreno et al., 2012).

Hasta el momento en Argentina, todas las cepas de *L. monocytogenes* se consideran potencialmente patógenas. Los avances futuros en la asociación de determinados marcadores de virulencia con los diferentes grupos genéticos de *L. monocytogenes* permitirán mejorar la evaluación de riesgos de la enfermedad que causa este microorganismo, teniendo en cuenta no sólo la definición de la especie sino también la de los subtipos virulentos (López et al., 2006).

Uno de los aspectos fundamentales a analizar a la hora de evaluar los resultados observados en esta investigación es la procedencia de cada una de las muestras y su relación con el serogrupo mayoritariamente observado en cada uno de los establecimientos involucrados. Según lo detectado en el presente trabajo, existe una marcada tendencia en las industrias productoras de alimentos en aislar un serogrupo determinado a lo largo del tiempo y de la cadena de producción. Como pudo observarse, el patrón característico involucra al mismo serogrupo (*L. monocytogenes* serogrupo IIb), pese a que las materias primas necesarias para la producción en cada uno de los casos son sustancialmente distintas. En base a esto, cobra fuerza la idea de que *L. monocytogenes* serogrupo IIb podría presentar cierta ventaja evolutiva que favorece el establecimiento de la misma en determinados ambientes (Kadam et al., 2013).

Pese a esto, también se detecta que en otros establecimientos, existe una mayor variabilidad en cuanto a los serogrupos hallados observándose mayoritariamente en ambos el serogrupo IIc, pero con presencias también de los otros tres. Puede pensarse que esta situación es debida al abastecimiento de materia prima de diferentes orígenes y que reunidos en un mismo establecimiento, da como resultado un amplio abanico de serogrupos. Apoyando esta observación, algunas investigaciones sostienen la hipótesis de que ciertas serovariedades de *L. monocytogenes* podría causar una contaminación persistente en las instalaciones de las industrias de alimentos más que otras serovariedades debido a la selección natural. Sin embargo, este es un concepto que no se encuentra estudiado en profundidad (Autio et al., 2003; Lundén et al., 2003).

Es importante destacar que algunos de los establecimientos analizados, la gran cantidad y diversidad de productos que se manufacturan (carne vacuna cruda, chacinados y embutidos), colaboran a la variabilidad genética hallada pudiendo aportar cada una de las matrices un serogrupo distinto por tratarse de matrices, orígenes y animales faenados diversos.

Las investigaciones de Hoelzer et al. (2012) informaron que las probabilidades de transferencia de *L. monocytogenes* dentro de las industrias pueden ser desde tablas de

cortar, balanzas, cajas, fregaderos, desagües de piso, estantes, cuchillos, superficies de contacto hacia los productos terminados y alimentos involucrados en la cadena de producción. Además, debido a la alta prevalencia de *L. monocytogenes* en las diversas materias primas, subproductos y ambientes, se deben idear medidas y reglamentaciones de desinfección para reducir la prevalencia de la contaminación a nivel de procesamiento en los establecimientos (Hoelzer et al., 2012).

La mayoría de los casos de listeriosis están asociados al consumo de alimentos contaminados. Es bien conocido que algunas cepas de *L. monocytogenes* pueden persistir durante meses o años en plantas productoras de alimentos y en la industria cárnica aumentando el riesgo de contaminación del producto final (D'Arrigo et al., 2020). Debido a esta capacidad que presenta *L. monocytogenes* de mantener la viabilidad en alimentos y en el medio ambiente industrial, y la dificultad que presenta su eliminación y control, es que regularmente, los establecimientos productores de alimentos deben ejecutar un plan de monitoreo de los ambientes de trabajo que garantice la seguridad de los alimentos elaborados. Algunas investigaciones sugieren que la efectividad de la limpieza y desinfección podría estar relacionada con la complejidad de las líneas de procesamiento y las máquinas utilizadas (Thevenot et al., 2005).

Las medidas que se recomiendan para el control de patógenos (en este caso *L. monocytogenes*) en ambientes de producción de alimentos son los siguientes (Henriques et al., 2017; Isequilla, 2018; Panadero et al., 2019):

1. Separar los alimentos crudos de los productos listos para el consumo.
2. Buenas prácticas de manufactura y condiciones controladas: las buenas prácticas se aplican tanto para el personal de las industrias como a los procesos de producción. Las mesadas de trabajo y los pisos deben encontrarse secos, sin grietas y en buenas condiciones para evitar la generación de nichos bacterianos y la promoción de su crecimiento.
3. Diseño sanitario de instalaciones y equipos: se debe prestar particular atención a la sanitización de los equipos. Los sanitizantes deben ser los adecuados en cada caso y deben penetrar hasta el interior de los equipos. Las herramientas de trabajo se deben desarmar para sanitizar en profundidad.

4. Monitoreo ambiental regular de *L. monocytogenes* (y otros patógenos ambientales).

Los estudios sobre la ecología microbiana del entorno en el cual se procesan los alimentos en las industrias, son fundamentales para comprender cómo se instala un determinado patógeno y poder encauzar los esfuerzos para poder erradicarlo. Algunas cepas de *L. monocytogenes* tienen la capacidad de establecerse en las plantas de procesamiento de alimentos y permanecer durante meses o años (Tompkin, 2002). Esta característica de establecimiento de una bacteria en una determinada zona se vio reflejada en el análisis del caso 1, en donde se observa la persistencia de *L. monocytogenes* serogrupo IIb en la planta en donde se procesan y manufacturan alimentos listos para consumo.

La planta procesadora del caso 1 constituye lo que comúnmente se conoce como nicho o sitio de refugio. Un nicho es un sitio dentro del entorno de fabricación en el que un patógeno con las capacidades como las de *L. monocytogenes* se establece y se multiplica (Valderrama & Cutter, 2013). Estos sitios pueden resultar imposibles de sanitizar mediante procedimientos normales de limpieza y desinfección. Como se ha visto, por ejemplo, en la feteadora desarmada, la bacteria penetra hasta las zonas más internas de una herramienta, dificultando o imposibilitando su erradicación. Estos sitios son reservorios desde los cuales el patógeno se dispersa durante la producción y contamina posteriormente las superficies de contacto, las materias primas y el producto terminado. Tal como se ha visto en algunas investigaciones (D'Arrigo et al., 2020), si bien la contaminación fue mayor durante el procesamiento también se observó después de la limpieza y desinfección observando la ineficiencia del procedimiento sanitizante y de los sanitizantes empleados.

Algunas investigaciones muestran que una carga inicial mínima de este patógeno, sería necesaria para que las bacterias persistan en un nicho y que la única forma de evitar esta persistencia sería la limpieza y desinfección inmediata. Además, en contraposición a lo anteriormente comentado, estos investigadores detectaron que no existen cepas de *L. monocytogenes* con ventajas evolutivas que favorezcan la persistencia, sino sitios de refugio con determinadas condiciones que favorecen la permanencia (Carpentier & Cerf, 2011).

En cuanto al serogrupo hallado (IIb) es conocido que tiene un efecto significativo en la formación de biofilms. Algunas investigaciones sugieren que las cepas del serotipo 1/2b así como las del 1/2a forman un mejor biofilm que las cepas del serotipo 4b en un medio rico en nutrientes, mientras que en un medio pobre en nutrientes los niveles de producción de biopelícula de las cepas de serotipo 1/2a y 4b fueron bastante similares e inferiores a los de las cepas de serotipo 1/2b (Kadam et al., 2013). Esto explicaría el por qué del establecimiento de *L. monocytogenes* serogrupo IIb en planta procesadora del caso 1 revelando la vital importancia de monitorear la presencia de este patógeno y este serogrupos en los ambientes de elaboración de alimentos.

Tal como se detectó en el caso 2, es conocido que *L. monocytogenes* se ha encontrado en todas las etapas de la industria de la carne de cerdo desde los mataderos y a lo largo de toda la cadena productiva (Lopez et al., 2008). Las fuentes de contaminación de *L. monocytogenes* durante el sacrificio provienen del ambiente (Meloni, 2015). A lo largo de la cadena de suministro de carne de cerdo, los niveles de contaminación por *L. monocytogenes* suelen ir aumentando (Lopez et al., 2008). Además, debido a su alta tolerancia al pH bajo y la alta concentración de sal, este patógeno es de muy difícil control en los entornos de procesamiento de salchichas fermentadas (Thévenot et al., 2006).

Según lo comentado en resultados en donde se observó que un mismo aislamiento de *L. monocytogenes* tanto en salchichas como en monitoreos ambientales, se puede asegurar que la carne cruda es una fuente importante de contaminación de los ambientes de producción y de los equipos de trabajo. Según Chasseignaux et al. (2004), las zonas usualmente más contaminadas son las áreas de recepción de materias primas, los estantes de las heladeras y las salas de procesamiento. Algunas investigaciones aseguran que descontaminar las superficies en donde se procesa la carne es un desafío especial porque, cuando *L. monocytogenes* queda atrapada en una biopelícula, recibe una protección adicional contra los desinfectantes y tratamientos disponibles (Zhao et al., 2004).

En cuanto a la serotipificación molecular, se observó que en la totalidad de los aislamientos obtenidos (n=29), se detectó el serogrupo IIb. Como se comentó anteriormente, *L. monocytogenes* es capaz de sobrevivir en condiciones diversas y por esta

razón se detecta en los productos finales. *L. monocytogenes* serogrupo IIb puede considerarse como una cepa fácilmente adaptable. Es por esta razón que se ha aislado tanto de las salchichas como del entorno de la industria. Este patógeno y particularmente aquellas cepas que se adaptan a sus entornos son un problema muy importante para las industrias, ya que tanto si provienen de la carne cruda o del ambiente, pueden contaminar y permanecer en los productos finales (Lopez et al., 2008).

Por lo expuesto, las salchichas pueden estar contaminadas con *L. monocytogenes* que provienen de diversas fuentes: carne cruda, entornos de los mataderos, producción y condiciones de postprocesamiento. Para prevenir estas fuentes de contaminación, se deben aplicar rigurosas decisiones que tienen que ver con buenas prácticas de fabricación, esquemas de muestreo correctos y procedimientos adecuados de limpieza y desinfección.

Tal como se comentó anteriormente, el caso 3 y el caso 2 se encuentran estrechamente relacionados. Hoy en día, los cultivos bioprotectores se encuentran reemplazando los conservantes naturales y a los extractos vegetales y animales debido a que estos últimos pueden cambiar el olor, el sabor y la textura de los alimentos (Woraprayote et al., 2016).

En el caso 3 se empleó un cultivo de *L. curvatus* como cultivo bioprotector para controlar y erradicar la presencia de *L. monocytogenes* en las salchichas. Esta bacteria ácido láctica produce dos tipos de bacteriocinas, que presentan actividad antimicrobiana contra la especie *Listeria* spp. (Blanco Massani et al., 2015). Varios autores han demostrado la eficacia de cultivos bioprotectores para evitar el crecimiento de *L. monocytogenes* en carnes cocidas (Bredholt et al., 1999, 2001; Vermeiren et al., 2004).

La cocción y la pasteurización de productos como las salchichas suelen eliminar la presencia de *L. monocytogenes*. Para eliminar la recontaminación, el procesamiento suele realizarse en salas blancas, donde el ambiente se desinfecta completamente y el aire se filtra, lo que reduce en gran medida la propagación de patógenos. Además, las herramientas se limpian y desinfectan, y los trabajadores reciben capacitación en buenas prácticas de

producción. Estas medidas, empleadas por parte de las plantas productoras, suelen reducir la contaminación con *L. monocytogenes* (Iacumin et al., 2020).

Sin embargo, como se ha visto en este caso, el producto se puede recontaminar en el proceso de envasado si las condiciones ambientales no son óptimas. Si bien en este caso se observa que se obtuvo aislamiento de *L. monocytogenes* post rociado con el cultivo bioprotector, como el monitoreo ambiental arrojó también resultados positivos, existe la posibilidad de que el producto se haya recontaminado. Estos resultados son escasos para sacar conjeturas sobre la eficacia del cultivo bioprotector y sería necesario realizar más ensayos desafiando este cultivo contra el patógeno en cuestión. Tal como observamos en el caso 2, el serogrupo aislado en la totalidad de los aislamientos compatibles con *L. monocytogenes* fue el IIb, lo que refuerza la posibilidad de una contaminación cruzada entre el ambiente y el producto terminado. En una reciente investigación se reveló que los cultivos bioprotectores exhibieron un efecto inhibitorio significativo sobre la expresión de diversos genes asociados a la patogenicidad y la formación de biopelículas por parte de *L. monocytogenes* (Hossain et al., 2021), por lo que el empleo de cultivos bioprotectores para el control de *L. monocytogenes* es prometedor.

Los protocolos de limpieza y desinfección minuciosos pueden prevenir la formación de biopelículas de *L. monocytogenes* y son necesarios para evitar la contaminación de las plantas productoras de alimentos y los productos terminados, de modo de resguardar la salud pública de los consumidores (Henriques et al., 2017).

El establecimiento del caso 4 se encuentra representado por una escasa cantidad de cepas. Pese a esto, la importancia de hacer una evaluación del mismo radica en el tipo de matriz involucrada (lácteos), la forma de consumo de esta matriz, la detección del serogrupo mayormente aislado en los casos de listeriosis humanas y la detección adicional de otro serogrupo acompañante en dos muestras recibidas durante la misma jornada laboral.

La detección de los serogrupos IIb y IVb en matrices lácteas y productos derivados de estos, coincide con la realizada por Kevenk et al. (2016) en donde obtuvieron resultados que indican una mayor prevalencia de los serotipos de *L. monocytogenes* 4b y 1/2b.

Similarmente, Hofer et al. (2000), detectaron a *L. monocytogenes* serotipo 4b como el más frecuente en leche en Brasil y *L. monocytogenes* 1/2b ocupó el segundo lugar en su estudio.

La presencia de *L. monocytogenes* serogrupo IVb en la leche y los productos lácteos son de vital importancia y preocupación por la salud pública, ya que este es el serotipo predominante en los casos de listeriosis en humanos (D. Liu et al., 2006; Roberts et al., 2006). De esta manera, y comparativamente a lo observado en la investigación anteriormente nombrada, es imperativo llevar a cabo medidas preventivas, incluidas la implementación de buenas prácticas de higiene, técnicas de pasteurización y buenas prácticas de fabricación durante la preparación de leche y productos lácteos además de asegurar la cadena de frío durante el almacenamiento (Kevenk & Gulel, 2016).

Conclusiones parciales

Según lo expuesto en este capítulo se pueden obtener las siguientes conclusiones parciales:

- La puesta a punto de la PCR múltiple para serotipos de *L. monocytogenes* en el laboratorio, permitió hacer un análisis integrado de las muestras recibidas en el laboratorio entre el año 2016 y 2021. Además, se pudo optimizar y adaptar la técnica a un laboratorio que recibe y procesa gran cantidad de muestras.
- Se detectó al serogrupo IIb como el mayoritario y se evidencia la necesidad de reforzar las políticas de control para este serogrupo.
- Teniendo en cuenta que el serogrupo IVb es el mayormente hallado en los casos de listeriosis humanas, y habiendo detectado en significativa cantidad de muestras de helado, se expone la necesidad de efectuar una correcta vigilancia epidemiológica en este tipo de matrices, no sólo mediante el cultivo de *L. monocytogenes* sino también más exhaustivamente para conocer sus características moleculares.
- Se evidencia la necesidad de implementar, difundir y divulgar las buenas prácticas de control en las industrias productoras de alimentos, educando al personal responsable y haciendo vigilancia de *L. monocytogenes* serogrupo IIb ya que fue el serogrupo que mayoritariamente se detectó en nuestra investigación.

Capítulo 3: Experiencia empleando MALDI-TOF MS

Materiales y métodos

Equipos

- MALDI-TOF MS (MSC-04).

Reactivos

- Matriz de MALDI-TOF MS. BD Bruker (Massachusetts, Estados Unidos).

Tamaño de la muestra

De las 180 cepas confirmadas bioquímicamente como *L. monocytogenes* y posteriormente serotipificadas molecularmente; 100 fueron a su vez identificadas por MALDI-TOF MS (Figura 16).

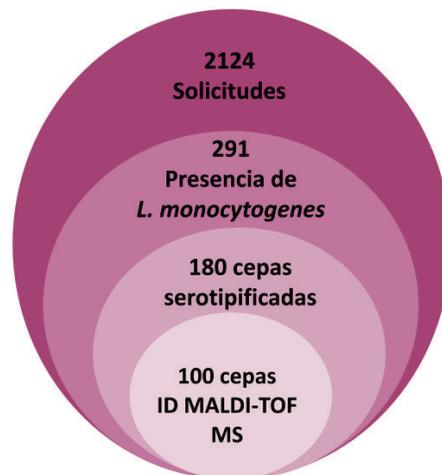


Figura 16: Diagrama del tamaño de las muestras

Identificación de *Listeria* spp. y *L. monocytogenes* empleando MALDI-TOF MS

Medios de cultivo y condiciones de incubación

A partir de una de estas colonias características provenientes del medio ALOA, de un cultivo fresco de 24h, se realizó el procedimiento que involucra a la identificación por MALDI-TOF MS.

Procedimiento

1. Se tomó con un palillo de madera una pequeña porción de una colonia sospechosa de *Listeria spp.* crecida en medio de cultivo ALOA.
2. Posteriormente se depositó directamente sobre uno de los sectores específicos de una placa metálica conductora.
3. Al sector de la placa metálica donde se encontraba la colonia sospechosa se le adicionó ácido fórmico y cuando se secó, una solución saturada de un compuesto orgánico de baja masa denominado matriz.
4. Posteriormente se dejó secar a temperatura ambiente. En esta etapa, la muestra de la colonia sospechosa y la matriz se cristalizan formando un depósito sólido incrustado en la matriz. Esto es esencial para la ionización exitosa de la muestra.
5. Finalmente se insertó dentro del equipo.
6. El perfil espectral que se generó fue comparado automáticamente mediante un programa informático con una base de datos de espectros, construido a partir de cepas de referencia, permitiendo la identificación del microorganismo.
7. Luego de la lectura, el software arrojó el resultado de la identificación con un nivel de score que fue cotejado para evaluar si la identificación microbiana es a nivel de género, especie o si no identificó. (Flujograma 3).

Sistema de SCORE

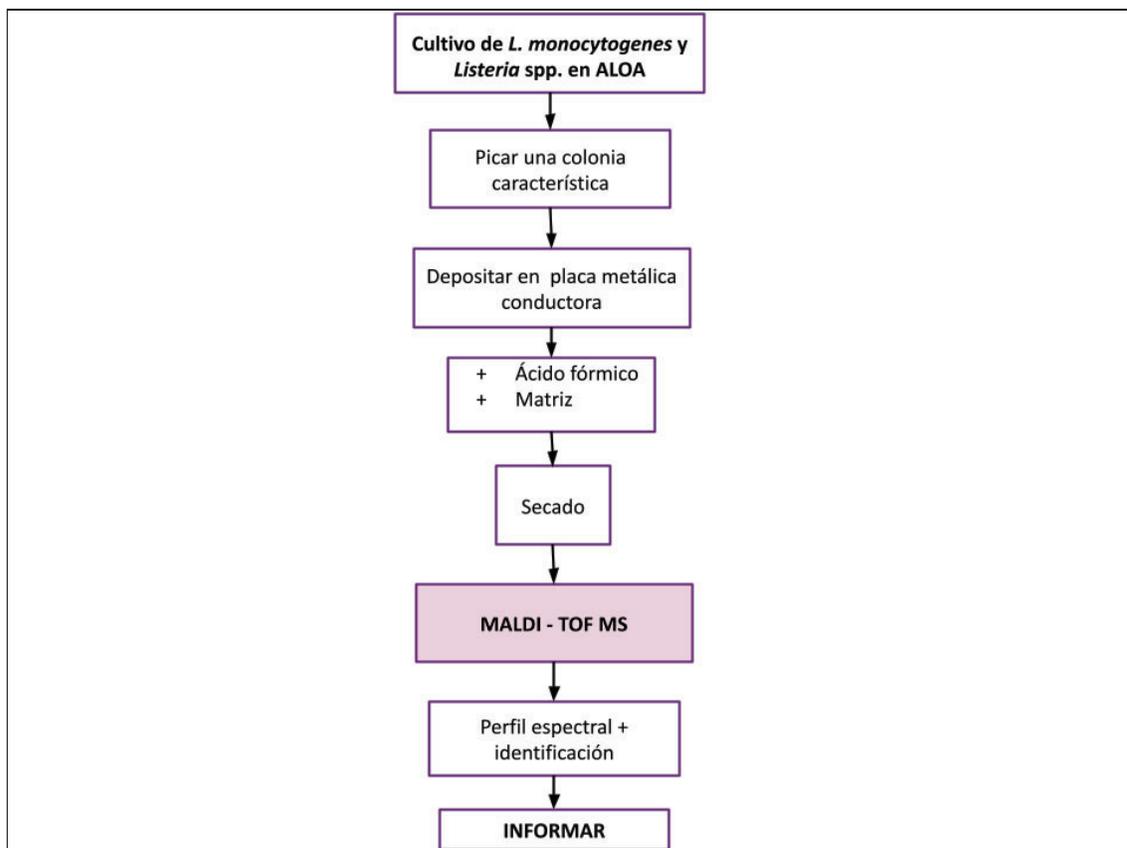
El sistema MALDI Biotyper® creado y comercializado por Bruker Daltonics emplea un valor de puntuación que oscila entre 0,000 y 3,000 que correlaciona la similitud del microorganismo de prueba a nivel del género y de la especie dentro de la base de datos.

- Entre 2,300 y 3,000 el software interpreta como altamente probable a nivel de especie.
- Entre 2,000 y 2,299 el software interpreta la identificación segura a nivel de género y probable a nivel de especie.

- Entre 1,700 y 1,999 representan una probable identificación a nivel de género, y se sugieren pruebas adicionales para una identificación positiva a nivel de la especie del microorganismo.
- Las puntuaciones entre 0,000 y 1,699 no se consideran una identificación fiable.

Además se tiene en cuenta el siguiente concepto recomendado por la RENAEM: en la identificación de todos los microorganismos se debe revisar el *top ten* (que son las diez especies probables que arroja el software) y de estar frente a un resultado de varias especies con valor de score > 2,000 se debe utilizar el siguiente criterio que permite dar validez a la interpretación: “para poder distinguir entre especies muy parecidas, se recomienda una divergencia del 10% entre la primer especie y la distinta siguiente del top ten” (Rocca et al., 2020).

Flujograma de trabajo



Flujograma 3: Detección de *L. monocytogenes* partiendo de medio de colonia aislada en cultivo selectivo y diferencial (ALOA) empleando MALDI - TOF MS.

Resultados

Los resultados detallados a continuación resultan del análisis de los datos crudos obtenidos tras la observación de las identificaciones surgidas empleando MALDI-TOF MS y de la detección de un patrón característico representativo en una gran proporción de los aislamientos recuperados. A raíz de esta observación, en abril de 2021, el laboratorio Stambouliau consultó al servicio de Bacteriología Especial (BE) del Laboratorio Nacional de Referencia (LNR) sobre la interpretación de los resultados de la identificación obtenida por MALDI-TOF MS en los aislamientos de *L. monocytogenes* provenientes de muestras de alimentos y monitoreos ambientales. En base a la experiencia del laboratorio Stambouliau en este tipo de aislamientos, se observó que la identificación por MALDI-TOF MS partiendo de medios de cultivos selectivos y diferenciales empleados en microbiología de alimentos la identificación de *L. monocytogenes* y *L. innocua*, mejora sustancialmente.

Descripción de los aislamientos identificados

De los 291 aislamientos totales en los cuales se aisló e identificó bioquímicamente *L. monocytogenes*, se identificaron 100 cepas empleando MALDI-TOF MS. Estas cepas corresponden al periodo comprendido entre diciembre de 2019 (momento en el cual ingresó el MALDI-TOF MS al laboratorio) y marzo de 2021. La totalidad de estas cepas se encuentran serotipificadas molecularmente mediante la PCR múltiple puesta a punto durante este periodo.

Análisis de los aislamientos identificados

A partir de una cepa fresca (24h a 37°C) de *L. monocytogenes*, aislada en agar ALOA y observada en ese mismo medio de cultivo como una colonia verde con halo alrededor, se realizó la identificación por MALDI-TOF MS (Figura 17).



Figura 17: colonias verdes con halo en agar ALOA

Análisis de *L. monocytogenes*

Se analizaron los score de la interpretación por MALDI-TOF MS de la totalidad de las cepas identificadas como *L. monocytogenes* (n=100) en base a las siguientes observaciones:

1. Cantidad de cepas en las cuales MALDI-TOF MS arrojó como resultado *L. monocytogenes* como segunda opción mayoritaria (el primer lugar fue para *L. innocua*).
2. Cantidad de cepas confirmadas como *L. monocytogenes* pero no identificadas por MALDI-TOF MS.
3. Cantidad de cepas identificadas únicamente como *L. innocua*, es decir, que en el top ten no se encontraba la opción de *L. monocytogenes*.
4. Cantidad de cepas en las cuales el score de la identificación fue mayor a 2,000. Además en esta misma instancia se evaluó la diferencia de score con respecto a la segunda especie que arroja como posibilidad el MALDI-TOF MS (siendo la primera opción *L. monocytogenes*).

Tras analizar estos resultados se observó que la totalidad de las cepas en donde se identificó como primera especie a *L. monocytogenes*, arrojaron un valor de score mayor a 2,000.

De la totalidad de las cepas analizadas por MALDI-TOF MS (n=100), un 15% fue identificado como *L. innocua* (en estos casos, la segunda especie mayoritaria fue *L. monocytogenes*), un 4% de las cepas no fue identificada (en estos casos se volvió al cultivo original y se reconfirmó la identificación mediante técnicas tradicionales) y ninguna cepa confirmada como *L. monocytogenes* fue identificada como *L. innocua* en su totalidad (es decir, el top ten con opción única de *L. innocua*). El 81% de las cepas fue identificada como *L. monocytogenes* con diferencia de score a favor de la identificación a nivel de especie (Figura 19).

En cuanto al análisis de las diferencias de score con respecto a la segunda especie sugerida por MALDI-TOF MS se observó lo siguiente (Tabla 27):

Tabla 27: Análisis de cepas analizadas por MALDI-TOF MS

Diferencia de Score	Cantidad de cepas (n°)	Interpretación
Lm en 2 lugar	15	no ID como Lm % 19
NO ID	4	
L. in	0	
10%	3	ID como Lm % 81
9%	1	
8%	4	
7%	6	
6%	13	
5%	8	
4%	14	
3%	14	
2%	7	
1%	11	
TOTAL	100	

Se observó lo siguiente: el 81% de las cepas (identificadas previamente como *L. monocytogenes*) arrojaron como resultado y con diferencia de score a favor de la identificación, la especie *L. monocytogenes*. El 15% no identificó a *L. monocytogenes* como

primera opción en el top ten sino que esta especie se encontraba segunda en base a la mayoría (en primer lugar *L. innocua*). El 4% de las cepas, no lograron ser identificadas.

Luego de esta observación se deduce que el 81% de las cepas confirmadas a nivel de género y especie presentan una diferencia de score positiva a favor de la identificación de la especie *L. monocytogenes*, y que un 19% no identificaría a *L. monocytogenes* a nivel de especie y para los cuales sería necesario complementar con otras técnicas tradicionales para poder realizar la identificación de especie certera o ampliar la base de datos de MALDI-TOF MS para esta especie con aislamientos regionales. Además se puede observar que de este 81%, el 73% queda comprendido entre una diferencia de score del 1% y el 7% (Figura 18).

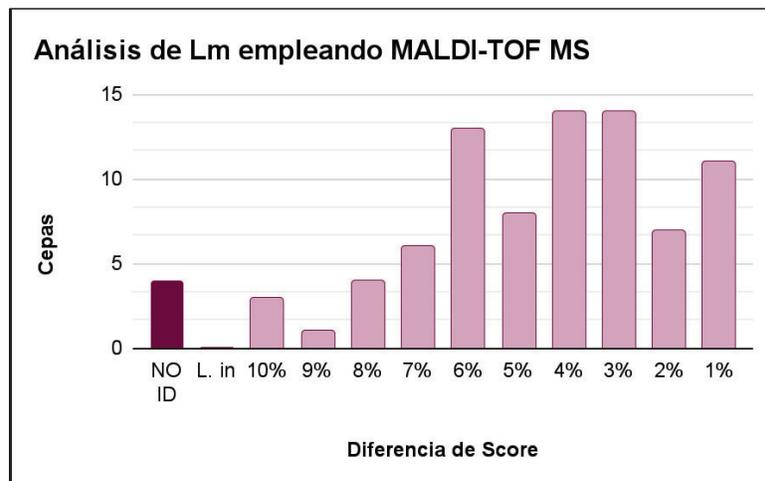


Figura 18: Análisis de *L. monocytogenes* empleando MALDI – TOF MS

Ejemplo de resultado

Resultados ID de instrumento	Puntuación de probabilidad	Calidad
Listeria monocytogenes CCUG 35751 CCUG	2.34584030	+++
Listeria monocytogenes CCUG 32843 CCUG	2.30189430	+++
Listeria monocytogenes CCUG 61052 CCUG	2.28214830	++
Listeria monocytogenes CCUG 32964A CCUG	2.21388130	++
Listeria monocytogenes CCUG 59664 CCUG	2.20906390	++
Listeria monocytogenes Mb19348_1 CHB_1	2.20425370	++
Listeria monocytogenes CCUG 31527 CCUG	2.14777090	++
Listeria monocytogenes ser4B ATCC 19115 THL_1	2.14668220	++
Listeria ivanovii 141021_19119 AGES	2.11128290	++
Listeria monocytogenes CCUG 53269 CCUG	2.10796320	++

Figura 19: *L. monocytogenes* por MALDI-TOF MS. En este caso se observa que la identificación presenta una excelente calidad (expresado con las tres cruces). La diferencia de score entre *L. monocytogenes* (primera opción) y *L. ivanovii* (n°9 en el top ten) es mayor al 10%.

Análisis de *L. innocua*

Analizando la identificación de *L. innocua* por MALDI-TOF MS, se observaron las cepas que durante este periodo (diciembre de 2019 a marzo de 2021) arrojaron una identificación tanto bioquímicamente como por MALDI-TOF MS de *L. innocua*. El procedimiento en este caso fue igual que en el anterior pero partiendo de una colonia verde sin halo en medio de cultivo ALOA (Figura 20). En el total de cepas identificadas como *L. innocua* (n=12), se observaron las siguientes particularidades (Tabla 28):

- 10 arrojaron únicamente *L. innocua* identificando con un score mayor a 2,000 (ejemplo en Figura 21).
- 1 arrojó como segunda especie a *L. monocytogenes* con una diferencia de score mayor al 5%.
- 1 arrojó como primera opción *L. welshimeri* y como segunda opción (y con bajo score) a *L. innocua* con una diferencia de score mayor al 10%.

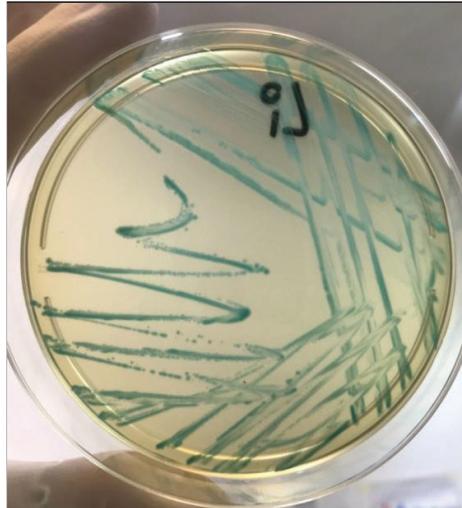


Figura 20: Colonias verdes sin halo en agar ALOA

Tabla 28: Análisis de score de *L. innocua*

Cepa	Score 1 Li	Score 2. Segunda especie	ID 2° Especie
198769	2,083	1,964	Lm
198592	2,262	-	-
197679	2,447	-	-
196704	2,403	-	-
195906	2,425	-	-
210367	2.257	-	-
210368	2,331	-	-
210498	2,195	-	-
213144	2,294	-	-
213145	2,294	-	-
217930	2,038 (Lw)	1,819	Li
217995	2,217	-	-

Ejemplo de resultado

Resultados ID de instrumento	Puntuación de probabilidad	Calidad
Listeria innocua CCUG 44511 CCUG	2.44738920	+++
Listeria innocua CCUG 44813 CCUG	2.39010660	+++
Listeria innocua CCUG 24928 CCUG	2.38218260	+++
Listeria innocua CCUG 27612 CCUG	2.37535190	+++
Listeria innocua CCUG 18949 CCUG	2.36995320	+++
Listeria innocua CCUG 35613 CCUG	2.35911390	+++
Listeria innocua CCUG 22268 CCUG	2.35600610	+++
Listeria innocua CCUG 24924 CCUG	2.35204250	+++
Listeria innocua CCUG 22270 CCUG	2.31534440	+++
Listeria innocua CCUG 21830 CCUG	2.30342730	+++

Figura 21: *L. innocua* por MALDI-TOF MS. En esta imagen de los resultados se observa la identificación de *L. innocua* con un score mayor a 2,000 lo que arroja una excelente calidad en la identificación (observado con las tres cruces).

Interpretación de los resultados

Según lo detectado en las cepas de *L. monocytogenes* y *L. innocua* analizadas por MALDI-TOF MS, y teniendo en cuenta las recomendaciones del RENAEM para este género y especie, se pudo observar que la detección de *L. monocytogenes* partiendo de un medio selectivo y diferencial como es el ALOA, arroja buenos resultados para la identificación a nivel de especie (score mayor a 2,000). Pese a esta observación, la diferencia de score entre la especie mayoritaria (*L. monocytogenes*) y la segunda especie mayoritaria (*L. innocua*), no presentan una diferencia de score del 10%. Así mismo, se observa que *L. innocua* presenta una identificación confiable y de alta calidad para la identificación a nivel de especie cuando se parte de este mismo medio.

Discusión

La mayoría de las técnicas tradicionales que se utilizan para la identificación de *L. monocytogenes*, son laboriosas, implican una gran cantidad de medios de cultivos selectivos y diferenciales y requieren largos periodos de incubación. Por otro lado, los métodos rápidos para detectar *Listeria* spp. y *L. monocytogenes* basados en PCR, presentan dificultad a la hora de identificar cepas atípicas y alta complejidad y laboriosidad en la identificación de subespecies (Maldonado et al., 2017).

La espectrometría de masas por tiempo de vuelo de ionización por desorción láser asistida por matriz (MALDI-TOF MS) es una herramienta valiosa y consolidada para el análisis de microorganismos a nivel de género, especie y subespecie (Rocca et al., 2019). La alta precisión y velocidad en los resultados hacen de esta una herramienta con enorme potencialidad en sus usos a futuro para responder a las demandas de la salud pública, la industria de los alimentos, el análisis de sangre y el diagnóstico de enfermedades.

Los resultados obtenidos en esta instancia fueron el punto de partida sobre el cual se basará el proyecto denominado “Análisis proteómico de aislamientos del género *Listeria* spp. provenientes de muestras de alimentos” a realizarse conjuntamente con el laboratorio de Bacteriología Especial del Laboratorio Nacional de Referencia. En este primer acercamiento se pudo detectar que, tal como informó Sandrin y col. (2013), las condiciones de cultivo de *Listeria* spp. y *L. monocytogenes*, son esenciales para la correcta identificación por MALDI-TOF MS.

Además, según lo observado en la presente investigación, la identificación a nivel de especie evitando la realización de la extracción etanólica, pero partiendo del medio de cultivo ALOA de 24h fue exitosa en más del 80% de las cepas presuntivas de *L. monocytogenes*, observándose en todas ellas un score mayor a 2,000 y una diferencia porcentual positiva con respecto a la segunda especie mayoritaria. Además, tal como se detectó en nuestro laboratorio, la identificación con alto grado de certeza de *L. innocua* apoyan lo anteriormente comentado. Estas observaciones coinciden con lo propuesto por

Jadhav et al. (2015), quienes detectaron que MALDI-TOF MS representa una técnica rápida, eficaz y rentable para el seguimiento de fuentes contaminadas con *L. monocytogenes* y en donde también observaron que la performance de MALDI-TOF MS para la identificación a nivel de especie mejora sustancialmente cuando se parte de un medio ALOA de 24 hs. Algunas razones que sustentan estas observaciones se fundamentan en que el medio de cultivo (ALOA) podría presentar menor cantidad de interferencias y que facilita una mejor ionización de la muestra. Es conocido que el rendimiento del MALDI-TOF MS puede ser alterado por los altos niveles de sal y la presencia de pigmentos (Anderson et al., 2012).

Es necesario destacar la importancia de generar bases de datos específicas y regionales acordes al laboratorio en el cual se encuentre el MALDI-TOF MS en cuestión. Las especies que se encuentran principalmente de forma rutinaria en los laboratorios clínicos suelen presentar mayor representación (es decir, alto número de espectros de referencia) en comparación a patógenos ambientales o alimentarios (Jadhav et al., 2015) y es por esta razón que la potencialidad del empleo de MALDI-TOF MS para la detección de patógenos alimentarios es un terreno fértil para futuras investigaciones.

Conclusiones parciales

Según lo expuesto en este capítulo se pueden obtener las siguientes conclusiones parciales:

- La identificación de *L. monocytogenes* a nivel de especie empleando MALDI-TOF MS arroja buen nivel de score (probable para nivel de especie) y diferencia porcentual positiva a favor de la identificación.
- Cuando se identifica partiendo de medios de cultivo selectivos y diferenciales, se observa una identificación fidedigna a nivel de especie para *L. monocytogenes* en más del 80% de las cepas, así como también para *L. innocua*.
- En una baja proporción de las cepas identificadas se cumple la premisa de RENAEM en donde se sugiere una diferencia de score mayor al 10% entre la primera especie propuesta y la segunda.
- La incorporación de MALDI-TOF MS a las normas internacionales de alimentos, brindaría una identificación fidedigna que reduciría los tiempos de estudio en al menos dos días. Esto además beneficiaría la liberación de lotes en la industria alimentaria.

Conclusiones

Esta investigación resume el trabajo colectivo y permanente de 5 años (2016-2021) con foco en *L. monocytogenes* realizado en un laboratorio de la Ciudad Autónoma de Buenos Aires en Argentina. Los antecedentes que involucran a este patógeno en nuestro país son escasos y esta es una de las primeras investigaciones que involucra a una gran diversidad de matrices y orígenes. Es por esta razón que este estudio cobra vital relevancia y sienta precedente en el país, investigando gran cantidad de cepas provenientes de matrices alimentarias, así como también monitoreos ambientales de industrias productoras de alimentos. A su vez, detectando los serogrupos más relevantes para la salud pública en general y estableciendo referencias en la identificación de *L. monocytogenes* por MALDI-TOF MS.

Dado que no existe una notificación obligatoria para los casos de listeriosis en Argentina, la Vigilancia Sanitaria y Salud Pública tiene problemas para identificar la ocurrencia de brotes, y solo se reportan casos aislados, lo que puede explicar los pocos casos de listeriosis en la literatura y la ausencia de reportes de brotes en nuestro país.

Como conclusión final destacamos los siguientes aspectos:

- En el periodo 2016-2021 en un laboratorio de la Ciudad Autónoma de Buenos Aires, se detectó un porcentaje de positividad de *L. monocytogenes* para matrices alimentarias y entornos de producción del 13,7%.
- Si bien los serotipos 1/2a, 1/2b, 1/2c y 4b son los más frecuentemente detectados en productos alimenticios, en este estudio se observó marcada presencia de *L. monocytogenes* serogrupo IIb (68,9%).
- La serotipificación molecular es una herramienta valiosa y posible para los laboratorios de microbiología molecular de alimentos y brinda en tiempos cortos la subtipificación de *L. monocytogenes*.
- Aunque la identificación empleando MALDI-TOF MS mejora partiendo del medio de cultivo selectivo y diferencial ALOA, se necesitará de una investigación adicional para realizar la identificación de *L. monocytogenes* a nivel de especie y de sus serogrupos.

Esta investigación se realizará conjuntamente con el laboratorio de Bacteriología Especial del Instituto Malbrán.

A pesar de los esfuerzos a nivel de salud pública y seguridad alimentaria, y de las mejoras en los métodos de diagnóstico en el laboratorio para la detección de *L. monocytogenes*, este patógeno continúa siendo uno de los desafíos principales a controlar. Esta investigación contribuye al conocimiento de la dinámica poblacional de este patógeno en la Ciudad Autónoma de Buenos Aires y destaca la necesidad de profundizar las políticas públicas de control y reforzar la vigilancia epidemiológica en Argentina.

Bibliografía

- Aguado, V., Vitas, A. I., & García-Jalón, I. (2004). Characterization of *Listeria monocytogenes* and *Listeria innocua* from a vegetable processing plant by RAPD and REA. *International Journal of Food Microbiology*, *90*(3). [https://doi.org/10.1016/s0168-1605\(03\)00313-1](https://doi.org/10.1016/s0168-1605(03)00313-1)
- Allerberger, F., & Wagner, M. (2010). Listeriosis: a resurgent foodborne infection. *Clinical Microbiology and Infection: The Official Publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, *16*(1), 16–23.
- Anderson, N. W., Buchan, B. W., Riebe, K. M., Parsons, L. N., Gnacinski, S., & Ledebor, N. A. (2012). Effects of solid-medium type on routine identification of bacterial isolates by use of matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *Journal of Clinical Microbiology*, *50*(3), 1008–1013.
- Angelakis, E., Million, M., Henry, M., & Raoult, D. (2011). Rapid and accurate bacterial identification in probiotics and yoghurts by MALDI-TOF mass spectrometry. *Journal of Food Science*, *76*(8), M568–M572.
- ANMAT. (2017, August 17). <https://www.argentina.gob.ar/anmat>
- Arispe, I., & Tapia, M. S. (2007). Inocuidad y calidad: requisitos indispensables para la protección de la salud de los consumidores. *Agroalimentaria*, *12*(24), 105–118.
- Artola, B. S., Sánchez Artola, B., & Palencia Herrejón, E. (2010). Infecciones por *Listeria*. In *Medicine - Programa de Formación Médica Continuada Acreditado* (Vol. 10, Issue 50, pp. 3368–3372). [https://doi.org/10.1016/s0304-5412\(10\)70044-5](https://doi.org/10.1016/s0304-5412(10)70044-5)
- Augustin, J.-C., Bergis, H., Midelet-Bourdin, G., Cornu, M., Couvert, O., Denis, C., Huchet, V., Lemonnier, S., Pinon, A., Vialette, M., Zuliani, V., & Stahl, V. (2011). *Design of challenge testing experiments to assess the variability of Listeria monocytogenes growth in foods.*

<https://pubag.nal.usda.gov/catalog/533445>

Autio, T., Keto-Timonen, R., Lundén, J., Björkroth, J., & Korkeala, H. (2003). Characterisation of Persistent and Sporadic *Listeria monocytogenes* Strains by Pulsed-Field Gel Electrophoresis (PFGE) and Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP). In *Systematic and Applied Microbiology* (Vol. 26, Issue 4, pp. 539–545).

<https://doi.org/10.1078/072320203770865846>

Babacan, O. (2020). Antibiotic susceptibility and phylogenetic analyses for the origins and serotypes of *Listeria monocytogenes* strains isolated from ice cream and cream cakes. *TURKISH JOURNAL OF VETERINARY AND ANIMAL SCIENCES*, 44(5), 1100–1109.

Báez, F. (2019). Zoonosis: un problema de salud pública. *Medicina Clínica y Social*, 3(3), 104–105.

Ballesteros Arribas, J. M. (2019). Listeriosis: realidad de un brote alimentario. *Sanidad Militar*, 75(4), 189–190.

Barancelli, G. V., Silva-Cruz, J. V., Porto, E., & Oliveira, C. A. F. (2020). *LISTERIA MONOCYTOGENES*: OCORRÊNCIA EM PRODUTOS LÁCTEOS E SUAS IMPLICAÇÕES EM SAÚDE PÚBLICA. *Arquivos do Instituto Biológico*, 78(1), 155–168.

Blanco Massani, M., V. MolinaauthorINTI Gral Paz 5445. Buenos Aires, A., M.

SanchezauthorINTI Gral Paz 5445. Buenos Aires, A., V. RenaudauthorINTI Gral Paz 5445.

Buenos Aires, A.-U., P. EisenbergauthorINTI Gral Paz 5445. Buenos Aires, A.-U., & de

Referencia para Lactobacilos, G. V. (2015). *Active polymers containing Lactobacillus curvatus CRL705 bacteriocins: Effectiveness assessment in Wieners*.

<https://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=US201600253074>

BOLETIN OFICIAL REPUBLICA ARGENTINA - SECRETARÍA DE CALIDAD EN SALUD Y SECRETARÍA DE ALIMENTOS, BIOECONOMÍA Y DESARROLLO REGIONAL - Resolución Conjunta

- 2/2020. (n.d.). Retrieved November 23, 2020, from <https://www.boletinoficial.gob.ar/detalleAviso/primera/232470>
- Borucki, M. K., & Call, D. R. (2003). *Listeria monocytogenes* Serotype Identification by PCR. *Journal of Clinical Microbiology*, *41*(12), 5537–5540.
- Braga, V., Vázquez, S., Vico, V., Pastorino, V., Mota, M. I., Legnani, M., Schelotto, F., Lancibidad, G., & Varela, G. (2017). Prevalence and serotype distribution of *Listeria monocytogenes* isolated from foods in Montevideo-Uruguay. *Brazilian Journal of Microbiology: [publication of the Brazilian Society for Microbiology]*, *68*9–694.
- Bredholt, S., Nesbakken, T., & Holck, A. (1999). Protective cultures inhibit growth of *Listeria monocytogenes* and *Escherichia coli* O157:H7 in cooked, sliced, vacuum- and gas-packaged meat. *International Journal of Food Microbiology*, *53*(1), 43–52.
- Bredholt, S., Nesbakken, T., & Holck, A. (2001). Industrial application of an antilisterial strain of *Lactobacillus sakei* as a protective culture and its effect on the sensory acceptability of cooked, sliced, vacuum-packaged meats. *International Journal of Food Microbiology*, *66*(3), 191–196.
- Brosch, R., Brett, M., Catimel, B., Luchansky, J. B., Ojieniyi, B., & Rocourt, J. (1996). Genomic fingerprinting of 80 strains from the WHO multicenter international typing study of *Listeria monocytogenes* via pulsed-field gel electrophoresis (PFGE). *International Journal of Food Microbiology*, *32*(3), 343–355.
- Brusa, V., Prieto, M., Campos, C. A., Epszteyn, S., Cuesta, A., Renaud, V., Schembri, G., Vanzini, M., Michanie, S., Leotta, G., & Signorini, M. (2021). *Quantitative risk assessment of listeriosis associated with fermented sausage and dry-cured pork shoulder consumption in Argentina*. <https://pubag.nal.usda.gov/catalog/7150304>
- Buchanan, R. L., Gorris, L. G. M., Hayman, M. M., Whiting, R. C., & Jackson, T. C. (2017).

review of *Listeria monocytogenes*: An update on outbreaks, virulence, dose-response, ecology, and risk assessments. *Food Control*.

<https://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=US201700173308>

Bucur, F. I., Grigore-Gurgu, L., Crauwels, P., Riedel, C. U., & Nicolau, A. I. (2018). Resistance of *Listeria monocytogenes* to Stress Conditions Encountered in Food and Food Processing Environments. *Frontiers in Microbiology*, 9. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02700>

Callejo, R., Prieto, M., Martínez, C., Aguerre, L., Rocca, F., Martínez, G., & Palmieri, O. (2008). Estudio mediante PCR múltiple de serotipos de *Listeria monocytogenes* aislados en Argentina. *Revista Argentina de Microbiología*, 40(2), 89–92.

Camejo, A., Carvalho, F., Reis, O., Leitão, E., Sousa, S., & Cabanes, D. (2011). The arsenal of virulence factors deployed by *Listeria monocytogenes* to promote its cell infection cycle. *Virulence*, 2(5), 379–394.

Caplice, E., & Fitzgerald, G. F. (1999). Food fermentations: role of microorganisms in food production and preservation. *International Journal of Food Microbiology*, 50(1-2), 131–149.

Carpentier, B., & Cerf, O. (2011). Review — Persistence of *Listeria monocytogenes* in food industry equipment and premises. <https://pubag.nal.usda.gov/catalog/587155>

Castañeda-Ruelas, G. M., Chaidez-Quiroz, C., Salazar-Jiménez, E. P., Hernández-Chiñas, U., & Eslava-Campos, C. A. (2018). *Listeria monocytogenes* y la listeriosis, problema de salud pública en México. In *Salud Pública de México* (Vol. 60, Issues 4, jul-ago, p. 376). <https://doi.org/10.21149/9466>

Castellanos, N. A. M., Gómez, L. M. P., Parra, A. K. C., Neiza, N. C. G., Rodríguez, M. C. O., & Neira, Y. S. (2019). Microorganismos comúnmente reportados como causantes de enfermedades transmitidas por el queso fresco en las Américas, 2007-2016. *Revista*

cubana de higiene y epidemiologia, 56(1).

<http://www.revepidemiologia.sld.cu/index.php/hie/article/view/171>

Castro, R. F. (2010). La situación actual de las zoonosis más frecuentes en el mundo. *Gaceta medica de Mexico*, 146(6), 423–429.

CDC. (2021, May 4). *CDC Works 24/7*. <https://www.cdc.gov/index.htm>

C, D. L. de la, de la C, D. L., C, F. A., de Jourdan H, F., O, P. M., J, C. B., & C, P. G. (2008).

Infecciones por *Listeria monocytogenes* en mujeres embarazadas: experiencia del Hospital Clínico de la Pontificia Universidad Católica de Chile. In *Revista chilena de infectología* (Vol. 25, Issue 5). <https://doi.org/10.4067/s0716-10182008000500003>

Center for Food Safety, & Nutrition, A. (2021, February 9). *Almacene alimentos en forma segura*.

<https://www.fda.gov/consumers/articulos-en-espanol/esta-almacenando-los-alimentos-en-forma-segura>

Chan, Y. C., & Wiedmann, M. (2009). Physiology and genetics of *Listeria monocytogenes* survival and growth at cold temperatures. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 49(3), 237–253.

Chaturongakul, S., Raengpradub, S., Wiedmann, M., & Boor, K. J. (2008). Modulation of stress and virulence in *Listeria monocytogenes*. *Trends in Microbiology*, 16(8), 388–396.

Chen, M., Cheng, J., Zhang, J., Chen, Y., Zeng, H., Xue, L., Lei, T., Pang, R., Wu, S., Wu, H., Zhang, S., Wei, X., Zhang, Y., Ding, Y., & Wu, Q. (2019). Isolation, Potential Virulence, and Population Diversity of *Listeria monocytogenes* From Meat and Meat Products in China. *Frontiers in Microbiology*, 10. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00946>

Chen, Y., & Knabel, S. J. (2007). Multiplex PCR for Simultaneous Detection of Bacteria of the Genus *Listeria*, *Listeria monocytogenes*, and Major Serotypes and Epidemic Clones of L.

- monocytogenes. *Applied and Environmental Microbiology*, 73(19), 6299–6304.
- Chen, Y., Luo, Y., Curry, P., Timme, R., Melka, D., Doyle, M., Parish, M., Hammack, T. S., Allard, M. W., Brown, E. W., & Strain, E. A. (2017). Assessing the genome level diversity of *Listeria monocytogenes* from contaminated ice cream and environmental samples linked to a listeriosis outbreak in the United States. *PLoS One*, 12(2), e0171389.
- Chen, Y., Zhang, W., & Knabel, S. J. (2005). Multi-Virulence-Locus Sequence Typing Clarifies Epidemiology of Recent Listeriosis Outbreaks in the United States. *Journal of Clinical Microbiology*, 43(10), 5291–5294.
- Chikindas, M. L., Weeks, R., Drider, D., Chistyakov, V. A., & Dicks, L. M. (2018). Functions and emerging applications of bacteriocins. *Current Opinion in Biotechnology*, 49, 23–28.
- Código Alimentario Argentino. (2018, May 7).
<https://www.argentina.gob.ar/anmat/codigoalimentario>
- Cordero, N., Maza, F., Navea-Perez, H., Aravena, A., Marquez-Fontt, B., Navarrete, P., Figueroa, G., González, M., Latorre, M., & Reyes-Jara, A. (2016). Different Transcriptional Responses from Slow and Fast Growth Rate Strains of *Listeria monocytogenes* Adapted to Low Temperature. *Frontiers in Microbiology*, 7, 229.
- D'Arrigo, M., Mateo-Vivaracho, L., Guillamón, E., Fernández-León, M. F., Bravo, D., Peirotén, Á., Medina, M., & García-Lafuente, A. (2020). *Characterization of persistent Listeria monocytogenes strains from ten dry-cured ham processing facilities*.
<https://pubag.nal.usda.gov/catalog/7007861>
- Delgado, A. B. M., Chaves, J. A., Rodríguez, E. C., & Realpe, M. E. (2012). *Listeria monocytogenes* en manipuladores de alimentos: un nuevo enfoque para tener en cuenta en los peligros de la industria alimentaria. In *Biomédica* (Vol. 33, Issue 2).
<https://doi.org/10.7705/biomedica.v33i2.716>

- den Bakker, H. C., Didelot, X., Fortes, E. D., Nightingale, K. K., & Wiedmann, M. (2008). Lineage specific recombination rates and microevolution in *Listeria monocytogenes*. *BMC Evolutionary Biology*, *8*, 277.
- Doan, N. T. L., Van Hoorde, K., Cnockaert, M., De Brandt, E., Aerts, M., Le Thanh, B., & Vandamme, P. (2012). Validation of MALDI-TOF MS for rapid classification and identification of lactic acid bacteria, with a focus on isolates from traditional fermented foods in Northern Vietnam. *Letters in Applied Microbiology*, *55*(4), 265–273.
- Doumith, M., Buchrieser, C., Glaser, P., Jacquet, C., & Martin, P. (2004). Differentiation of the major *Listeria monocytogenes* serovars by multiplex PCR. *Journal of Clinical Microbiology*, *42*(8), 3819–3822.
- Doumith, M., Cazalet, C., Simoes, N., Frangeul, L., Jacquet, C., Kunst, F., Martin, P., Cossart, P., Glaser, P., & Buchrieser, C. (2004). New aspects regarding evolution and virulence of *Listeria monocytogenes* revealed by comparative genomics and DNA arrays. *Infection and Immunity*, *72*(2), 1072–1083.
- European Food Safety Authority. (n.d.). Retrieved April 30, 2021, from <https://www.efsa.europa.eu/en>
- Fallah, A. A., Saei-Dehkordi, S. S., Rahnama, M., Tahmasby, H., & Mahzounieh, M. (2012). *Prevalence and antimicrobial resistance patterns of Listeria species isolated from poultry products marketed in Iran*. <https://pubag.nal.usda.gov/catalog/571420>
- Farfour, E., Leto, J., Barritault, M., Barberis, C., Meyer, J., Dauphin, B., Le Guern, A.-S., Leflèche, A., Badell, E., Guiso, N., Leclercq, A., Le Monnier, A., Lecuit, M., Rodriguez-Nava, V., Bergeron, E., Raymond, J., Vimont, S., Bille, E., Carbonnelle, E., ... Join-Lambert, O. (2012). Evaluation of the Andromas matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry system for identification of aerobically

- growing Gram-positive bacilli. *Journal of Clinical Microbiology*, 50(8), 2702–2707.
- Fernández, A. M. C., Durán, E. M., & Jiménez, M. R. (2012). *Contaminantes biológicos: Toxicología alimentaria*. Ediciones Díaz de Santos.
- Fernández-No, I. C., Böhme, K., Gallardo, J. M., Barros-Velázquez, J., Cañas, B., & Calo-Mata, P. (2010). Differential characterization of biogenic amine-producing bacteria involved in food poisoning using MALDI-TOF mass fingerprinting. *Electrophoresis*, 31(6), 1116–1127.
- Ferri, E. F. R. (2018). Ciencias Veterinarias y una salud. *Anales de la Real Academia de Medicina y Cirugía de Valladolid*, 55, 337–357.
- Flanders, K. J., & Donnelly, C. W. (1994). Injury, resuscitation and detection of *Listeria* spp. from frozen environments. In *Food Microbiology* (Vol. 11, Issue 6, pp. 473–480). <https://doi.org/10.1006/fmic.1994.1053>
- Food and Agriculture Organization of the United Nations. (2004). *Evaluación de Riesgos de Listeria Monocytogenes en Alimentos Listos Para El Consumo: Resumen Interpretativo*. Food & Agriculture Org.
- Gan, L., Mao, P., Jiang, H., Zhang, L., Liu, D., Cao, X., Wang, Y., Wang, Y., Sun, H., Huang, Y., & Ye, C. (2020). Two Prevalent subsp Clonal Strains With Different Virulence Exist in Wild Rodents and Pikas of China. *Frontiers in Veterinary Science*, 7, 88.
- Gharsallaoui, A., Oulahal, N., Joly, C., & Degraeve, P. (2016). Nisin as a Food Preservative: Part 1: Physicochemical Properties, Antimicrobial Activity, and Main Uses. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 56(8), 1262–1274.
- Gould, L. H., Mungai, E., & Behravesh, C. B. (2014). Outbreaks attributed to cheese: differences between outbreaks caused by unpasteurized and pasteurized dairy products, United States, 1998-2011. *Foodborne Pathogens and Disease*, 11(7),

545–551.

- Graves, L., Hunter, S., & Swaminathan, B. (2007). Subtyping *Listeria monocytogenes*. In *Food Science and Technology* (pp. 283–304). <https://doi.org/10.1201/9781420015188.ch9>
- Handbook of Listeria Monocytogenes*. (2008). <https://doi.org/10.1201/9781420051414>
- Henriques, A. R., Gama, L. T., & Fraqueza, M. J. (2017). Tracking *Listeria monocytogenes* contamination and virulence-associated characteristics in the ready-to-eat meat-based food products industry according to the hygiene level. *International Journal of Food Microbiology*, 242, 101–106.
- Hernandez-Milian, A., & Payeras-Cifre, A. (2014). What Is New in Listeriosis? *BioMed Research International*, 2014. <https://doi.org/10.1155/2014/358051>
- Hill, D., Sugrue, I., Arendt, E., Hill, C., Stanton, C., & Ross, R. P. (2017). Recent advances in microbial fermentation for dairy and health. *F1000Research*, 6, 751.
- Hoelzer, K., Oliver, H. F., Kohl, L. R., Hollingsworth, J., Wells, M. T., & Wiedmann, M. (2012). Structured expert elicitation about *Listeria monocytogenes* cross-contamination in the environment of retail deli operations in the United States. *Risk Analysis: An Official Publication of the Society for Risk Analysis*, 32(7), 1139–1156.
- Hossain, M. I., Mizan, M. F. R., Roy, P. K., Nahar, S., Tushik, S. H., Ashrafudoulla, M., Jahid, I. K., Lee, J., & Ha, S.-D. (2021). *Listeria monocytogenes* biofilm inhibition on food contact surfaces by application of postbiotics from *Lactobacillus curvatus* B.67 and *Lactobacillus plantarum* M.2. In *Food Research International* (Vol. 148, p. 110595). <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2021.110595>
- Iacumin, L., Cappellari, G., Colautti, A., & Comi, G. (2020). *Listeria monocytogenes* Survey in Cubed Cooked Ham Packaged in Modified Atmosphere and Bioprotective Effect of Selected Lactic Acid Bacteria. *Microorganisms*, 8(6), 898.

In Lee, S. H., Barancelli, G. V., de Camargo, T. M., Corassin, C. H., Rosim, R. E., da Cruz, A. G.,

Cappato, L. P., & de Oliveira, C. A. F. (2017). *Biofilm-producing ability of Listeria*

monocytogenes isolates from Brazilian cheese processing plants.

<https://pubag.nal.usda.gov/catalog/5598795>

Isequilla, A. H. (2018). *Estudio microbiológico de Listeria monocytogenes en cámaras de*

maduración [Universidad Nacional de La Plata].

<http://sedici.unlp.edu.ar/handle/10915/76494>

ISO 11290-1:2017. (2017).

<https://www.iso.org/cms/render/live/en/sites/isoorg/contents/data/standard/06/03/6>

0313.html

Jadhav, S., Vandana GulatiaauthorDepartment of Chemistry and Biotechnology, Faculty of

Science, Engineering and Technology, Swinburne University of Technology, P. O. Box

218, Hawthorn 3122, Victoria, Edward M. FoxauthorFood and Nutrition,

Commonwealth Scientific and Industrial Research Organisation, Avinash

KarpeauthorDepartment of Chemistry and Biotechnology, Faculty of Science,

Engineering and Technology, Swinburne University of Technology, P. O. Box 218,

Hawthorn 3122, Victoria, AustraliaLand and Water Flagship, David J. BealeauthorLand

and Water Flagship, Commonwealth Scientific and Industrial Research Organisation,

Danielle SevioreauthorbioMrieux Australia Pty Ltd, Unit 25 Parkview Business Centre, 1

Maitland Place, Baulkham Hills, NSW, Mrinal BhaveauthorDepartment of Chemistry and

Biotechnology, Faculty of Science, Engineering and Technology, Swinburne University of

Technology, P. O. Box 218, Hawthorn 3122, Victoria, & Enzo A.

PalomboauthorDepartment of Chemistry and Biotechnology, Faculty of Science,

Engineering and Technology, Swinburne University of Technology, P. O. Box 218,

- Hawthorn 3122, Victoria. (2015). *Rapid identification and source-tracking of Listeria monocytogenes using MALDI-TOF mass spectrometry*.
<https://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=US201600252522>
- Jamali, H., Chai, L. C., & Thong, K. L. (2013). *Detection and isolation of Listeria spp. and Listeria monocytogenes in ready-to-eat foods with various selective culture media*.
<https://pubag.nal.usda.gov/catalog/1124721>
- Jamshidi, A., & Zeinali, T. (2019). Significance and Characteristics of Listeria monocytogenes in Poultry Products. *International Journal of Food Science, 2019*.
<https://doi.org/10.1155/2019/7835253>
- Jeffers, G. T., Bruce, J. L., McDonough, P. L., Scarlett, J., Boor, K. J., & Wiedmann, M. (2001). Comparative genetic characterization of Listeria monocytogenes isolates from human and animal listeriosis cases. *Microbiology, 147*(Pt 5), 1095–1104.
- Jemmi, T., & Stephan, R. (2006). Listeria monocytogenes: food-borne pathogen and hygiene indicator. *Revue Scientifique et Technique, 25*(2), 571–580.
- Jimenez, C. A. B., Saldarriaga, M. M., & Velez, V. P. (2017). Meningitis por Listeria monocytogenes con ADA elevado en paciente inmunocompetente. In *Acta Médica Colombiana* (Vol. 41, Issue 2). <https://doi.org/10.36104/amc.2016.626>
- Jørgensen, F., Stephens, P. J., & Knøchel, S. (1995). The effect of osmotic shock and subsequent adaptation on the thermotolerance and cell morphology of Listeria monocytogenes. *The Journal of Applied Bacteriology, 79*(3), 274–281.
- Kadam, S. R., den Besten, H. M. W., van der Veen, S., Zwietering, M. H., Moezelaar, R., & Abee, T. (2013). *Diversity assessment of Listeria monocytogenes biofilm formation: Impact of growth condition, serotype and strain origin*.
<https://pubag.nal.usda.gov/catalog/600688>

- Kathariou, S. (2002). *Listeria monocytogenes* Virulence and Pathogenicity, a Food Safety Perspective. *Journal of Food Protection*, 65(11), 1811–1829.
- Kevenk, T. O., & Gulel, G. T. (2016). Prevalence, Antimicrobial Resistance and Serotype Distribution of *Listeria monocytogenes* Isolated from Raw Milk and Dairy Products. In *Journal of Food Safety* (Vol. 36, Issue 1, pp. 11–18). <https://doi.org/10.1111/jfs.12208>
- Konar, H. (2017). Listeriosis in Pregnancy. In *Manual of Obstetrics and Gynecology for the Postgraduates* (pp. 540–540). https://doi.org/10.5005/jp/books/12992_79
- Kuch, A., Goc, A., Belkiewicz, K., Filipello, V., Ronkiewicz, P., Gołębiewska, A., Wróbel, I., Kiedrowska, M., Waśko, I., Hryniewicz, W., Lomonaco, S., & Skoczyńska, A. (2018). Molecular diversity and antimicrobial susceptibility of *Listeria monocytogenes* isolates from invasive infections in Poland (1997–2013). *Scientific Reports*, 8(1), 1–11.
- Kurpas, M., Wieczorek, K., & Osek, J. (2018). Ready-to-eat Meat Products As a Source of *Listeria Monocytogenes*. *Journal of Veterinary Research*, 62(1), 49.
- Laciar, A. L., Vaca, L., & P. de Centorbi, O. N. (1999). *Listeria* spp. en alimentos de origen animal. *Revista Argentina de microbiologia*, 25–30.
- Laciar, A., Vaca, L., Lopresti, R., Vega, A., Mattana, C., & de Centorbi, O. N. P. (2006). DNA fingerprinting by ERIC-PCR for comparing *Listeria* spp. strains isolated from different sources in San Luis, Argentina. *Revista Argentina de Microbiología*, 38(2), 55–60.
- Latorre, A. A., Van Kessel, J. A. S., Karns, J. S., Zurakowski, M. J., Pradhan, A. K., Zadoks, R. N., Boor, K. J., & Schukken, Y. H. (2009). Molecular ecology of *Listeria monocytogenes*: evidence for a reservoir in milking equipment on a dairy farm. *Applied and Environmental Microbiology*, 75(5), 1315–1323.
- Leclercq, A., Moura, A., Vales, G., Tessaud-Rita, N., Aguilhon, C., & Lecuit, M. (2019). *Listeria thailandensis* sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary*

Microbiology, 69(1), 74–81.

Lee, D. Y., Ha, J. H., Lee, M. K., & Cho, Y. S. (2017). Antimicrobial susceptibility and serotyping of *Listeria monocytogenes* isolated from ready-to-eat seafood and food processing environments in Korea. *Food Science and Biotechnology*, 26(1), 287–291.

Lepe, J. A. (2020). Aspectos actuales de la listeriosis. In *Medicina Clínica* (Vol. 154, Issue 11, pp. 453–458). <https://doi.org/10.1016/j.medcli.2020.02.001>

Le, S., Bazger, W., Hill, A. R., & Wilcock, A. (2014). *Awareness and perceptions of food safety of artisan cheese makers in Southwestern Ontario: A qualitative study*. <https://pubag.nal.usda.gov/catalog/5430406>

Lewis, G., Schweig, M., Guillén-Pinto, D., & Rospigliosi, M. L. (2017). Meningitis neonatal en un hospital general de Lima, Perú, 2008 al 2015. In *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública* (Vol. 34, Issue 2, p. 233). <https://doi.org/10.17843/rpmesp.2017.342.2297>

Liu, D., Lawrence, M. L., Wiedmann, M., Gorski, L., Mandrell, R. E., Ainsworth, A. J., & Austin, F. W. (2006). *Listeria monocytogenes* subgroups IIIA, IIIB, and IIIC delineate genetically distinct populations with varied pathogenic potential. *Journal of Clinical Microbiology*, 44(11), 4229–4233.

Liu, Y., Sun, W., Sun, T., Gorris, L. G. M., Wang, X., Liu, B., & Dong, Q. (2019). *The prevalence of Listeria monocytogenes in meat products in China: A systematic literature review and novel meta-analysis approach*. <https://pubag.nal.usda.gov/catalog/6721781>

Li, W., Bai, L., Fu, P., Han, H., Liu, J., & Guo, Y. (2018). The Epidemiology of *Listeria monocytogenes* in China. *Foodborne Pathogens and Disease*, 15(8), 459–466.

Lomonaco, S., Nucera, D., & Filipello, V. (2015). *The evolution and epidemiology of Listeria monocytogenes in Europe and the United States*.

<https://pubag.nal.usda.gov/catalog/5438931>

- Londero, A., Costa, M., Galli, L., Brusa, V., Linares, L., Prieto, M., & Leotta, G. (2019). Characterization and subtyping of *Listeria monocytogenes* strains from butcher shops. In *LWT* (Vol. 113, p. 108363). <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2019.108363>
- Londero, A., Costa, M., Sucari, A., & Leotta, G. (2019). Comparison of three molecular subtyping techniques for *Listeria monocytogenes*. In *Revista Argentina de Microbiología* (Vol. 51, Issue 4, pp. 359–362). <https://doi.org/10.1016/j.ram.2019.01.003>
- López, V., Suárez, M., Chico-Calero, I., Navas, J., & Martínez-Suárez, J. V. (2006). *Listeria monocytogenes* en alimentos: ¿son todos los aislamientos igual de virulentos? *Revista Argentina de Microbiología*, 38(4), 224–234.
- Lopez, V., Villatoro, D., Ortiz, S., Lopez, P., Navas, J., & Davila, J. C. (2008). Molecular tracking of *Listeria monocytogenes* in an Iberian pig abattoir and processing plant. *Symposium on Meat Safety: From Abattoir to Consumer*, 78, 130–134.
- Lundén, J., Autio, T., Markkula, A., Hellström, S., & Korkeala, H. (2003). Adaptive and cross-adaptive responses of persistent and non-persistent *Listeria monocytogenes* strains to disinfectants. *International Journal of Food Microbiology*, 82(3), 265–272.
- Maldonado, N., Robledo, C., & Robledo, J. (2017). La espectrometría de masas MALDI-TOF en el laboratorio de microbiología clínica. In *Infectio*. <https://doi.org/10.22354/in.v0i0.703>
- Margineda, C. A., Cantón, G., Lischinsky, L., Moreira, A., & Campero, C. M. (2012). Listeriosis en bovinos de la Provincia de Buenos Aires, Argentina. *Revista Veterinaria*, 23(1), 32–37.
- Martins, E. A., & Leal Germano, P. M. (2011). *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat, sliced, cooked ham and salami products, marketed in the city of São Paulo, Brazil:

- Occurrence, quantification, and serotyping*. <https://pubag.nal.usda.gov/catalog/400824>
- Mathakiya, R., & Nayak, A. (2011). Characterization of *Listeria monocytogenes* isolates by CAMP test. In *Veterinary World* (p. 301). <https://doi.org/10.5455/vetworld.4.301>
- Matto, C., Rodríguez, V., Giles, M., Varela, G., Braga, V., Mota, M. I., Vico, V., Adrien, M. L., Giannechini, E., & Rivero, R. (2019). Detección de *Listeria monocytogenes* en un rodeo de bovinos de carne en el que previamente ocurrió un caso clínico de listeriosis nerviosa. *Veterinaria*, *55*(211), 14–20.
- Melo, J., Andrew, P. W., & Faleiro, M. L. (2015). *Listeria monocytogenes* in cheese and the dairy environment remains a food safety challenge: The role of stress responses. <https://pubag.nal.usda.gov/catalog/5432576>
- Meloni, D. (2015). Presence of *Listeria monocytogenes* in Mediterranean-Style Dry Fermented Sausages. *Foods*, *4*(1), 34–50.
- Mercado, M., Avila, J., Rey, M., Montoya, M., Gamboa, A., Carrascal, A. K., & Correa, D. X. (2012). Brotes por *Salmonella* spp., *Staphylococcus aureus* y *Listeria monocytogenes* asociados al consumo de pollo. Revisión sistemática de la literatura. In *Biomédica* (Vol. 32, Issue 3). <https://doi.org/10.7705/biomedica.v32i3.697>
- Merino, L. A. (2011). *Manual de métodos moleculares para estudios microbiológicos*.
- Messenger, A. M., Barnes, A. N., & Gray, G. C. (2014). Reverse zoonotic disease transmission (zooanthroponosis): a systematic review of seldom-documented human biological threats to animals. *PloS One*, *9*(2), e89055.
- Milillo, S. R., Friedly, E. C., Saldivar, J. C., Muthaiyan, A., O'Bryan, C., Crandall, P. G., Johnson, M. G., & Ricke, S. C. (2012). A review of the ecology, genomics, and stress response of *Listeria innocua* and *Listeria monocytogenes*. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, *52*(8), 712–725.

- Mohammed, H. O., Stipetic, K., McDonough, P. L., Gonzalez, R. N., Nydam, D. V., & Atwill, E. R. (2009). Identification of potential on-farm sources of *Listeria monocytogenes* in herds of dairy cattle. *American Journal of Veterinary Research*, *70*(3), 383–388.
- Moreno, Y., Sánchez-Contreras, J., Montes, R. M., García-Hernández, J., Ballesteros, L., & Antonia Ferrús, M. (2012). Detection and enumeration of viable *Listeria monocytogenes* cells from ready-to-eat and processed vegetable foods by culture and DVC-FISH. In *Food Control* (Vol. 27, Issue 2, pp. 374–379).
<https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2012.04.017>
- Muñoz, A. I. (2012). Distribución de serotipos de *Listeria monocytogenes* aislados de alimentos, Colombia, 2000-2009. In *Biomédica* (Vol. 32, Issue 3).
<https://doi.org/10.7705/biomedica.v32i3.709>
- Neunlist, M. R., Federighi, M., Laroche, M., Sohier, D., Delattre, G., Jacquet, C., & Chihib, N.-E. (2005). Cellular lipid fatty acid pattern heterogeneity between reference and recent food isolates of *Listeria monocytogenes* as a response to cold stress. *Antonie van Leeuwenhoek*, *88*(3-4), 199–206.
- Nüesch-Inderbinen, M., Bloemberg, G. V., Müller, A., Stevens, M. J. A., Cernela, N., Kollöffel, B., & Stephan, R. (2021). Listeriosis Caused by Persistence of *Listeria monocytogenes* Serotype 4b Sequence Type 6 in Cheese Production Environment. *Emerging Infectious Diseases*, *27*(1), 284–288.
- Nyarko, E. B., & Donnelly, C. W. (2015). *Listeria monocytogenes*: Strain Heterogeneity, Methods, and Challenges of Subtyping. *Journal of Food Science*, *80*(12), M2868–M2878.
- Orsi, R. H., den Bakker, H. C., & Wiedmann, M. (2011). *Listeria monocytogenes* lineages: Genomics, evolution, ecology, and phenotypic characteristics. *International Journal of Medical Microbiology: IJMM*, *301*(2), 79–96.

- Osaili, T. M., Alaboudi, A. R., & Nesiari, E. A. (2011). *Prevalence of Listeria spp. and antibiotic susceptibility of Listeria monocytogenes isolated from raw chicken and ready-to-eat chicken products in Jordan*. <https://pubag.nal.usda.gov/catalog/535075>
- Pamer, E. G. (2004). Immune responses to *Listeria monocytogenes*. *Nature Reviews Immunology*, 4(10), 812–823.
- Panadero, I. G., Álvarez-Ortí, M., Rabadán, A., & Pardo, J. E. (2019). El sistema APPCC como herramienta para reducir el riesgo de aparición de *Listeria monocytogenes* en vegetales congelados. In *Congreso Ibérico de Agroingeniería*. https://doi.org/10.26754/c_agroing.2019.com.3357
- Patel, R. (2015). MALDI-TOF MS for the Diagnosis of Infectious Diseases. In *Clinical Chemistry* (Vol. 61, Issue 1, pp. 100–111). <https://doi.org/10.1373/clinchem.2014.221770>
- Phadtare, S., Alsina, J., & Inouye, M. (1999). Cold-shock response and cold-shock proteins. *Current Opinion in Microbiology*, 2(2), 175–180.
- P., M. S. C., Centurión P., M. S., Takajara S., M. E., & López F., B. C. (2006). Frecuencia de *Listeria monocytogenes* y otras listerías en carne de pollo fresco y verduras frescas obtenidas en mercados y centros de abasto de Lima Metropolitana. In *Ciencia e Investigación* (Vol. 9, Issue 2, pp. 83–85). <https://doi.org/10.15381/ci.v9i2.6053>
- Pohl, M. A., Wiedmann, M., & Nightingale, K. K. (2006). Associations among *Listeria monocytogenes* genotypes and distinct clinical manifestations of listeriosis in cattle. *American Journal of Veterinary Research*, 67(4), 616–626.
- Prencipe, V. A., Rizzi, V., Acciari, V., Iannetti, L., Giovannini, A., Serraino, A., Calderone, D., Rossi, A., Morelli, D., Marino, L., Migliorati, G., & Caporale, V. (2012). *Listeria monocytogenes* prevalence, contamination levels and strains characterization throughout the Parma ham processing chain.

<https://pubag.nal.usda.gov/catalog/576678>

Prieto, M. (2008). *Manual de Procedimientos Listeria monocytogenes*. <http://dx.doi.org/>

Prieto, M., Martínez, C., Aguerre, L., Rocca, M. F., Cipolla, L., & Callejo, R. (2016). Antibiotic susceptibility of *Listeria monocytogenes* in Argentina. In *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica* (Vol. 34, Issue 2, pp. 91–95).

<https://doi.org/10.1016/j.eimc.2015.03.007>

Ragon, M., Wirth, T., Hollandt, F., Lavenir, R., Lecuit, M., Le Monnier, A., & Brisse, S. (2008). A new perspective on *Listeria monocytogenes* evolution. *PLoS Pathogens*, 4(9), e1000146.

Ramírez, R. C., Aguilar, S. Á., Juárez, G. S., Pulido, W. C., Sánchez, G. R., & García, V. B. (2007). Detección de *Listeria* sp y *Listeria monocytogenes* en muestras de pollo crudo y de cuerpos de agua de la región mediante PCR. *Bioquímica*, 32(SuA), 115.

Ramos, B., Brandão, T. R. S., Teixeira, P., & Silva, C. L. M. (2014). Balsamic vinegar from Modena: An easy and effective approach to reduce *Listeria monocytogenes* from lettuce. In *Food Control* (Vol. 42, pp. 38–42).

<https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2014.01.029>

Ranjbar, R., & Halaji, M. (2018). Epidemiology of *Listeria monocytogenes* prevalence in foods, animals and human origin from Iran: a systematic review and meta-analysis. *BMC Public Health*, 18(1), 1–12.

Ray, B., & Bhunia, A. (2013). *Fundamental Food Microbiology*.

<https://doi.org/10.1201/b16078>

Reyes, C., Linares, L. H., Moredo, F., Lirón, J. P., Brusa, V., Londero, A., Galli, L., Oteiza, J. M., Costa, M., & Leotta, G. A. (2018). Development and In-House Validation of a Real-Time Polymerase Chain Reaction for the Detection of *Listeria monocytogenes* in Meat.

Foodborne Pathogens and Disease, 15(1), 55–57.

- Roberts, A., Nightingale, K., Jeffers, G., Fortes, E., Kongo, J. M., & Wiedmann, M. (2006). Genetic and phenotypic characterization of *Listeria monocytogenes* lineage III. *Microbiology*, *152*(Pt 3), 685–693.
- Rocca, M. F., Almuzara, M., Barberis, C., Vay, C., Viñes, P., & Prieto, M. (2020). Presentación del sitio web de la Red Nacional de Identificación Microbiológica por Espectrometría de Masas. Manual para la interpretación de resultados de MALDI-TOF MS. In *Revista Argentina de Microbiología* (Vol. 52, Issue 1, pp. 83–84).
<https://doi.org/10.1016/j.ram.2019.03.001>
- Rocca, M. F., Barrios, R., Zintgraff, J., Martínez, C., Irazu, L., Vay, C., & Prieto, M. (2019). Utility of platforms Vitek5 MS and Microflex LT for the identification of complex clinical isolates that require molecular methods for their taxonomic classification. *PLoS One*, *14*(7), e0218077.
- Rodríguez-Auad, J. P. (2018). Panorama de la infección por *Listeria monocytogenes*. *Revista Chilena de Infectología: Órgano Oficial de La Sociedad Chilena de Infectología*, *35*(6), 649–657.
- Ryu, S., Kim, B. I., Lim, J.-S., Tan, C. S., & Chun, B. C. (2017). One Health Perspectives on Emerging Public Health Threats. *Journal of Preventive Medicine and Public Health = Yebang Uihakhoe Chi*, *50*(6), 411–414.
- Saludes, M., Troncoso, M., & Figueroa, G. (2015). Presence of *Listeria monocytogenes* in Chilean food matrices. <https://pubag.nal.usda.gov/catalog/5430772>
- Sanz, A., & Luis, J. (2017). *Seguridad e higiene en la manipulación de alimentos 3.ª edición*. Editorial Paraninfo.
- Schäfer, D. F., Steffens, J., Barbosa, J., Zeni, J., Paroul, N., Valduga, E., Junges, A., Backes, G. T., & Cansian, R. L. (2017). Monitoring of contamination sources of *Listeria monocytogenes*

in a poultry slaughterhouse. <https://pubag.nal.usda.gov/catalog/5819713>

Schlech, W. F., Lavigne, P. M., Bortolussi, R. A., Allen, A. C., Vanora Haldane, E., John Wort, A.,

Hightower, A. W., Johnson, S. E., King, S. H., Nicholls, E. S., & Broome, C. V. (1983).

Epidemic Listeriosis — Evidence for Transmission by Food. In *New England Journal of Medicine* (Vol. 308, Issue 4, pp. 203–206).

<https://doi.org/10.1056/nejm198301273080407>

Schönberg, A., Bannerman, E., Courtieu, A. L., Kiss, R., McLauchlin, J., Shah, S., & Wilhelms,

D. (1996). Serotyping of 80 strains from the WHO multicentre international typing study of *Listeria monocytogenes*. *International Journal of Food Microbiology*, 32(3).

[https://doi.org/10.1016/s0168-1605\(96\)01142-7](https://doi.org/10.1016/s0168-1605(96)01142-7)

Sedano, R., Fica, A., Guiñez, D., Braun, S., Porte, L., Dabanch, J., Weitzel, T., & Soto, A. (2013).

Infecciones por *Listeria monocytogenes*, una experiencia de dos décadas: A two decade experience. In *Revista chilena de infectología* (Vol. 30, Issue 4, pp. 417–425).

<https://doi.org/10.4067/s0716-10182013000400011>

Seeliger, H. P. R., & Höhne, K. (1979). Chapter II Serotyping of *Listeria monocytogenes* and

Related Species. In *Methods in Microbiology* (pp. 31–49).

[https://doi.org/10.1016/s0580-9517\(08\)70372-6](https://doi.org/10.1016/s0580-9517(08)70372-6)

Shamloo, E., Hosseini, H., Abdi Moghadam, Z., Halberg Larsen, M., Haslberger, A., &

Alebouyeh, M. (2019). Importance of in food safety: a review of its prevalence,

detection, and antibiotic resistance. *Iranian Journal of Veterinary Research*, 20(4), 241–254.

Shebuski, J. R., Vilhelmsson, O., & Miller, K. J. (2000). Effects of growth at low water activity

on the thermal tolerance of *Staphylococcus aureus*. *Journal of Food Protection*, 63(9),

1277–1281.

- Shen, Q., Jangam, P. M., Soni, K. A., Nannapaneni, R., Schilling, W., & Silva, J. L. (2014). Low, medium, and high heat tolerant strains of *Listeria monocytogenes* and increased heat stress resistance after exposure to sublethal heat. *Journal of Food Protection*, 77(8), 1298–1307.
- Shimajima, Y., Miki, I. D. A., Nakama, A., Nishino, Y., Fukui, R., Kuroda, S., Hirai, A., Akemi, K. A. I., & Sadamasu, K. (2016). Prevalence and contamination levels of *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat foods in Tokyo, Japan. *The Journal of Veterinary Medical Science / the Japanese Society of Veterinary Science*, 78(7), 1183–1187.
- Silva, C. C. G., Silva, S. P. M., & Ribeiro, S. C. (2018). Application of Bacteriocins and Protective Cultures in Dairy Food Preservation. *Frontiers in Microbiology*, 9, 594.
- Sofos, J. N. (2009). Biofilms: our constant enemies. *Foodsafety Magazine*.
<https://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=US201301637987>
- Sofos, J. N., & Geornaras, I. (2010). Overview of current meat hygiene and safety risks and summary of recent studies on biofilms, and control of *Escherichia coli* O157:H7 in nonintact, and *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat, meat products. *Meat Science*, 86(1), 2–14.
- Struijk, C. B., & Mossel, D. A. A. (2003). Detection and enumeration of *Listeria monocytogenes* in foods. In *Food Control* (Vol. 14, Issue 1, p. 61).
[https://doi.org/10.1016/s0956-7135\(02\)00089-0](https://doi.org/10.1016/s0956-7135(02)00089-0)
- Tappero, J. W. (1995). Reduction in the incidence of human listeriosis in the United States. Effectiveness of prevention efforts? The Listeriosis Study Group. In *JAMA: The Journal of the American Medical Association* (Vol. 273, Issue 14, pp. 1118–1122).
<https://doi.org/10.1001/jama.273.14.1118>
- Tasara, T., & Stephan, R. (2006). Cold stress tolerance of *Listeria monocytogenes*: A review of

molecular adaptive mechanisms and food safety implications. *Journal of Food Protection*, 69(6), 1473–1484.

Thevenot, D., Delignette-Muller, M. L., Christieans, S., & Vernozy-Rozand, C. (2005).

Prevalence of *Listeria monocytogenes* in 13 dried sausage processing plants and their products. *International Journal of Food Microbiology*.

<https://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=US201301008976>

Thévenot, D., Dernburg, A., & Vernozy-Rozand, C. (2006). An updated review of *Listeria*

monocytogenes in the pork meat industry and its products. *Journal of Applied Microbiology*, 101(1), 7–17.

Tompkin, R. B. (2002). Control of *Listeria monocytogenes* in the Food-Processing

Environment. In *Journal of Food Protection* (Vol. 65, Issue 4, pp. 709–725).

<https://doi.org/10.4315/0362-028x-65.4.709>

Torrens, H. R., Barreto Argilagos, G., Cabrera, M. S., Bertot Valdés, J., Martínez Sáez, S., &

Guevara Viera, G. (2015). Las enfermedades transmitidas por alimentos, un problema sanitario que hereda e incrementa el nuevo milenio. *REDVET. Revista Electrónica de Veterinaria*, 16(8), 1–27.

Valderrama, W. B., & Cutter, C. N. (2013). An ecological perspective of *Listeria*

monocytogenes biofilms in food processing facilities. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 53(8), 801–817.

van Boekel, M., Fogliano, V., Pellegrini, N., Stanton, C., Scholz, G., Lalljie, S., Somoza, V.,

Knorr, D., Jasti, P. R., & Eisenbrand, G. (2010). A review on the beneficial aspects of food processing. *Molecular Nutrition & Food Research*, 54(9), 1215–1247.

van der Veen, S., van Schalkwijk, S., Molenaar, D., de Vos, W. M., Abee, T., & Wells-Bennik,

M. H. J. (2010). The SOS response of *Listeria monocytogenes* is involved in stress

- resistance and mutagenesis. *Microbiology*, 156(Pt 2), 374–384.
- Velge, P., & Roche, S. M. (2010). Variability of *Listeria monocytogenes* virulence: a result of the evolution between saprophytism and virulence? *Future Microbiology*, 5(12), 1799–1821.
- Vera, A., González, G., Domínguez, M., & Bello, H. (2013). Principales factores de virulencia de *Listeria monocytogenes* y su regulación. *Revista Chilena de Infectología: Órgano Oficial de La Sociedad Chilena de Infectología*, 30(4), 407–416.
- Vermeiren, L., Devlieghere, F., & Debevere, J. (2004). Evaluation of meat born lactic acid bacteria as protective cultures for the biopreservation of cooked meat products. *International Journal of Food Microbiology*.
<https://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=US201300956390>
- Wałęcka-Zacharska, E., Kosek-Paszkowska, K., Bania, J., Staroniewicz, Z., Bednarski, M., & Wieliczko, A. (2015). Invasiveness of *Listeria monocytogenes* strains isolated from animals in Poland. *Polish Journal of Veterinary Sciences*, 18(4), 697–702.
- Wang, G., Qian, W., Zhang, X., Wang, H., Ye, K., Bai, Y., & Zhou, G. (2015). *Prevalence, genetic diversity and antimicrobial resistance of Listeria monocytogenes isolated from ready-to-eat meat products in Nanjing, China*.
<https://pubag.nal.usda.gov/catalog/5430758>
- Wisbaum, W. (2011). *La desnutrición infantil : causas, consecuencias y estrategias para su prevención y tratamiento*. <http://repositorio.minedu.gob.pe/handle/123456789/3713>
- Woraprayote, W., Malila, Y., Sorapukdee, S., Swetwivathana, A., Benjakul, S., & Visessanguan, W. (2016). Bacteriocins from lactic acid bacteria and their applications in meat and meat products. *Meat Science*, 120, 118–132.
- Wu, S., Wu, Q., Zhang, J., Chen, M., Yan, Z. A., & Hu, H. (2015). *Listeria monocytogenes*

- Prevalence and Characteristics in Retail Raw Foods in China. *PloS One*, 10(8), e0136682.
- Zaragoza, F. M., Guerrero, F. F., & García, S. V. (2019). *One health: Cambio climático, contaminación ambiental y el impacto sobre la salud humana y animal*. Amazing Books.
- Zeinali, T., Jamshidi, A., Bassami, M., & Rad, M. (2015). Serogroup identification and Virulence gene characterization of *Listeria monocytogenes* isolated from chicken carcasses. *Iranian Journal of Veterinary Science and Technology*, 7(2), 9–19.
- Zhao, T., Doyle, M. P., & Zhao, P. (2004). Control of *Listeria monocytogenes* in a Biofilm by Competitive-Exclusion Microorganisms. *Applied and Environmental Microbiology*, 70(7), 3996–4003.
- Zhu, Q., Gooneratne, R., & Hussain, M. A. (2017). *Listeria monocytogenes* in Fresh Produce: Outbreaks, Prevalence and Contamination Levels. *Foods (Basel, Switzerland)*, 6(3).
<https://doi.org/10.3390/foods6030021>
- Zunino, P. (2018). Historia y perspectivas del enfoque “Una Salud.” *Veterinaria*, 54(210), 46–51.