

Mirian Labrador Bernad

Desarrollo de métodos rápidos
para el análisis de *Listeria*
monocytogenes y su aplicación al
proceso de evaluación del riesgo
en la industria cárnica

Departamento

Producción Animal y Ciencia de los Alimentos

Director/es

Rota García, Carmen

Bayarri Fernández, Susana

<http://zaguan.unizar.es/collection/Tesis>

© Universidad de Zaragoza
Servicio de Publicaciones

ISSN 2254-7606



Tesis Doctoral

DESARROLLO DE MÉTODOS RÁPIDOS PARA EL
ANÁLISIS DE LISTERIA MONOCYTOGENES Y SU
APLICACIÓN AL PROCESO DE EVALUACIÓN DEL
RIESGO EN LA INDUSTRIA CÁRNICA

Autor

Mirian Labrador Bernad

Director/es

Rota García, Carmen
Bayarri Fernández, Susana

UNIVERSIDAD DE ZARAGOZA

Producción Animal y Ciencia de los Alimentos

2018



Facultad de Veterinaria
Universidad Zaragoza



TESIS DOCTORAL

Desarrollo de métodos rápidos para el análisis de *Listeria monocytogenes* y su aplicación al proceso de evaluación del riesgo en la industria cárnica

Memoria presentada por:

Mirian Labrador Bernad

Para optar al Grado de Doctor por la Universidad de Zaragoza

Directoras:

Dra. María Carmen Rota García

Dra. Susana Bayarri Fernández

Zaragoza, octubre de 2018

Agradecimientos

Esta Tesis Doctoral se ha desarrollado gracias a la financiación del proyecto “Evaluación y control del riesgo de Toxoplasma gondii en jamón y desarrollo de métodos rápidos para el análisis de Listeria monocytogenes” (INNPACTO IPT-2012-0189060000, MINECO/FEDER), del Grupo de Investigación de Referencia reconocido por el Gobierno de Aragón A06_17R “Análisis y Evaluación de la Seguridad Alimentaria” (Gobierno de Aragón/FEDER), así como del Gobierno de Aragón/FSE mediante la concesión de mi Contrato Predoctoral de Personal Investigador en Formación (C091/2014).

Asimismo, mi agradecimiento a:

- *La Red de Excelencia Consolider “Productos cárnicos seguros, nutritivos y saludables” (AGL2014-51742-REDC) y a la Red de Excelencia Consolider “Innovación en Productos Cárnicos Seguros y Saludables” (AGL2017-90699-REC) financiado por MINECO.*
- *La Fundación Ibercaja, Fundación CAI y Universidad de Zaragoza por la beca concedida (CA 3/17) para la realización de mi estancia predoctoral en la Universidad Ludwig Maximilians de Múnich (Alemania).*
- *Las empresas Bio-Rad y Bioser por apoyarnos durante este trabajo.*

Gracias a la Unidad de Nutrición y Bromatología y al Departamento de Producción Animal y Ciencia de los Alimentos de la Facultad de Veterinaria (Universidad de Zaragoza) por acogerme en su gran familia y proporcionarme los medios necesarios para llevar a cabo este trabajo de investigación.

La realización de esta Tesis Doctoral ha sido posible gracias al apoyo y colaboración de muchas personas, sin las cuales no habría podido conseguirlo. Por ello, quiero ofrecerles a todas ellas mi más sincero agradecimiento.

En primer lugar, quiero dar las gracias a la Dra. Carmina Rota García y la Dra. Susana Bayarri Fernández, directoras de esta Tesis Doctoral, por haberme dado esta oportunidad y apoyarme desde el principio. Ambas habéis contribuido a mi desarrollo académico, profesional y personal, ofreciéndome vuestra sabiduría, tiempo, apoyo, confianza y mucho cariño a lo largo de estos años. Carmina, muchas gracias por alentarme a seguir adelante y buscar soluciones a los problemas, escuchar todas mis ideas, ayudarme a ser más fuerte y apoyarme en los momentos más difíciles siempre con una sonrisa. Susana, muchas gracias por toda la confianza que has depositado en mi, por enseñarme a valorar mi trabajo y la tranquilidad que da cuando está bien hecho, y por animarme y apoyarme en todas las etapas de esta Tesis Doctoral siempre con

cariño. A las dos, muchas gracias por todo lo que me habéis dado durante estos años, no lo olvidaré nunca.

Quiero expresar mi agradecimiento al Catedrático Dr. Antonio Herrera todo el esfuerzo, trabajo y dedicación llevado a cabo desde hace muchos años, gracias al cual, tanto el Grupo de Investigación de Referencia "Análisis y Evaluación de la Seguridad Alimentaria", como el Área de Nutrición y Bromatología (Universidad de Zaragoza) presentan una elevada calidad científica, docente y humana.

Muchas gracias al Catedrático Dr. Agustín Ariño, investigador principal del Grupo de Investigación de Referencia "Análisis y Evaluación de la Seguridad Alimentaria", por permitirme formar parte del mismo, y por su apoyo y buen humor a lo largo de esta Tesis Doctoral.

Al resto de profesores del Área de Nutrición y Bromatología por su cariño, ayuda, generosidad y alegría que se respira desde que entras por el pasillo: gracias a Juanjo, a Domingo por todo lo que me ha enseñado de microbiología y su simpatía, a Marta y Susana Lorán por su alegría, apoyo y buenos consejos, a Consuelo y Regina por el cariño que me han dado en todo momento y a Pilar por su cariño, sus buenas ideas y sus conocimientos infinitos. A Nieves por estar siempre dispuesta a ayudar en todo, por su buen humor y sus canciones navideñas que nos alegran un poquito más el corazón. A Presen por su ayuda con todos los trámites y su paciencia. A todos ellos GRACIAS.

A todos mis compañeros de laboratorio y de pasillo que han estado a mi lado en estos años: a Patri por estar siempre con una sonrisa dispuesta a ayudar, a Laura, Noemí y Natalia por su amistad, cariño, apoyo, alegría y conversaciones para solucionar el mundo, a Héctor por los buenos momentos que hemos compartido, por las conversaciones científicas y, por todo el cariño y ayuda que me has dado estos años, y en especial gracias a Paula, por apoyarme en los momentos más difíciles, alegrarse de mis logros y convertirse en una gran amiga...querida mía, ¡nos quedan infinitas risas por compartir!.

Al Departamento de Seguridad Alimentaria de la Universidad Ludwig Maximilians de Múnich y en especial al Prof. Dr. Dr. habil. M. Gareis, por recibirme con los brazos abiertos y permitir mi formación en la técnica de electroforesis en gel en campo pulsante. A Vreni por su tiempo, generosidad y paciencia, y a Irene, por su ayuda, dedicación, alegría, cariño durante mi estancia en Múnich, de la que me lleve una amiga para siempre.

A todos mis amigos que, aunque no supieran muy bien de que les estaba hablando, me han apoyado con todo su cariño durante estos años.

Quiero darles las infinitas gracias a mis padres, Vidal y María Luisa, los pilares de mi vida, por

todo el amor, confianza, apoyo y valores que me han dado desde niña, sin su ayuda no sería la persona en la que me he convertido y voy estarles eternamente agradecida por todo lo que me han enseñado. A mis hermanos Luis, Jesús, David, Belén y Dulcis, mis cuñados Carlos, Javi, Cris y Vero por su amor, alegría y porque somos un piña llena de piñones. A mis sobrinos Rubén, Adrián, Raúl, Marcos, Almudena, Jorge, Alba y Nicolás porque son un rayo de luz en mi corazón y sacan una sonrisa de mi cara con solo pensar en ellos.

Por último, quiero darle las gracias a David porque sin tu ayuda nada de esto habría sido posible. Infinitas gracias por animarme y apoyarme en todas mis decisiones, por estar a mi lado y no soltarme de tu mano en los momentos más difíciles, por saber sacarme una sonrisa, por tu confianza, respeto y amor incondicional....no podría imaginar mejor compañero de viaje en la vida. GRACIAS.

A David

A mi familia

Índice general

Índice de Tablas.....	i
Índice de Figuras.....	iv
Resumen	1
Summary	5
Capítulo I: Introducción y objetivos.....	9
Capítulo II: Revisión bibliográfica	13
1. Productos cárnicos curado-madurados: datos de producción y consumo	13
2. <i>Listeria monocytogenes</i>	14
2.1. Taxonomía	15
2.2. Características generales y condiciones de supervivencia	16
2.3. Serotipos, linajes y clones epidémicos	18
2.4. Factores de virulencia.....	19
2.5. Patogénesis	20
2.6. Tipos de listeriosis	24
2.7. Epidemiología.....	25
2.7.1. Brotes de listeriosis.....	27
2.7.2 Factores de riesgo.....	28
2.8. Fuentes de contaminación.....	29
2.8.1 Biofilms	30
2.9. Principales alimentos relacionados	32
2.10. Importancia de <i>L. monocytogenes</i> en la industria cárnica	34
2.10.1. <i>L. monocytogenes</i> en productos cárnicos curado-madurados.....	34
2.10.2. <i>L. monocytogenes</i> en ambientes de procesado de la industria cárnica	34
2.11. Criterios microbiológicos	36
3. Métodos de detección y cuantificación de <i>L. monocytogenes</i>	40
3.1. Método de referencia ISO 11290-1:2017	40
3.2. Método de referencia ISO 11290-2:2017	41
3.3. Métodos alternativos	41
3.3.1. Impedanciometría	41
3.3.2. PCR a tiempo real	45
3.3.3. Validación de métodos alternativos	51
4. Caracterización genotípica de <i>L. monocytogenes</i>	52
4.1. Serotipo molecular	53

4.2. Electroforesis en gel en campo pulsante (PFGE).....	54
Capítulo III. Puesta a punto y evaluación de métodos alternativos para la detección de <i>L. monocytogenes</i> en jamón curado: impedanciometría y PCR a tiempo real.....	58
1. Puesta a punto de la impedanciometría combinada con agar cromogénico para la detección de <i>L. monocytogenes</i> en jamón curado	58
1.1. Material y métodos	58
1.1.1. Puesta a punto de la impedanciometría.....	58
1.1.1.1. Cultivo bacteriano y preparación del inóculo.....	59
1.1.1.2. Elaboración de curvas de calibración y estudio de los tiempos de detección	59
1.1.2. Evaluación preliminar de la impedanciometría combinada con agar cromogénico para la detección de <i>L. monocytogenes</i> en jamón curado	60
1.1.2.1. Cepas utilizadas para la contaminación experimental y preparación del inóculo bajo condiciones de estrés	60
1.1.2.2. Matriz alimentaria: jamón curado	60
1.1.2.3. Detección de <i>L. monocytogenes</i> en la matriz alimentaria	61
1.1.2.4. Parámetros de evaluación.....	64
1.2. Resultados y discusión.....	67
1.2.1. Curvas de calibración.....	67
1.2.2. Tiempos de generación.....	69
1.2.3. Efecto de las condiciones de estrés del inóculo de <i>Listeria</i> spp. en el tiempo de detección	70
1.2.4. Evaluación de la impedanciometría combinada con OCLA para la detección de <i>L. monocytogenes</i> en jamón curado	71
1.2.5. Características de la impedanciometría combinada con OCLA para la detección de <i>L. monocytogenes</i>	73
2. Evaluación de mejoras de la impedanciometría y de otros métodos alternativos (PCR a tiempo real) para la detección de <i>L. monocytogenes</i> en jamón curado	74
2.1. Material y métodos	74
2.1.1. Método A: impedanciometría (One Broth + BacTrac 4300) combinada con agares cromogénicos OCLA y Rapid L. mono.....	77
2.1.2. Método B: impedanciometría (One Broth + BacTrac 4300) combinada con RiboFlow® <i>Listeria</i> Twin	78
2.1.3. Método C: PCR a tiempo real (iQ-Check® <i>Listeria monocytogenes</i> II Kit)	79
2.1.4. Método de referencia ISO 11290-1/A1:2004.....	80

2.1.5. Evaluación de los métodos alternativos	81
2.1.5.1. ISO 16140-2:2016	81
2.1.5.2. NordVal International	85
2.1.5.3. Parámetros de la bibliografía científica (Anderson et al., 2011; Tomas et al., 2009).....	85
2.1.6. Análisis estadístico.....	85
2.2. Resultados y discusión.....	86
2.2.1. Exclusividad e inclusividad	86
2.2.2. Nivel de detección 50 y nivel de detección relativo	86
2.2.3. Estudio de sensibilidad, sensibilidad y especificidad relativas, índice kappa de Cohen, y valores predictivos positivos y negativos.....	88
2.2.4. Influencia de la presencia de <i>Listeria</i> spp. no patógenas en la detección de <i>L. monocytogenes</i> en jamón curado.....	91
2.2.5. Características de los métodos alternativos	92
Capítulo IV. Puesta a punto y evaluación de un método qPCR para la cuantificación de <i>L. monocytogenes</i> en productos cárnicos LPC.....	94
1. Material y métodos	95
1.1. Puesta punto de la metodología qPCR para la cuantificación de <i>L. monocytogenes</i> en jamón curado.....	95
1.1.1. Optimización de la reacción de amplificación de qPCR.....	95
1.1.1.1. Cultivo bacteriano.....	95
1.1.1.2. Extracción de DNA	95
1.1.1.3. Optimización de las condiciones de PCR.....	95
1.1.2. Curva estándar de DNA de <i>L. monocytogenes</i>	96
1.1.3. Curva estándar celular de <i>L. monocytogenes</i>	97
1.1.4. Desarrollo de un método qPCR para la cuantificación de <i>L. monocytogenes</i> en jamón curado contaminado experimentalmente.....	97
1.1.4.1. Cultivo bacteriano.....	98
1.1.4.2. Contaminación de muestras de jamón curado	98
1.1.4.3. Procedimiento de lisis de matriz combinado con qPCR (Método A).....	98
1.1.4.4. Procedimiento de lisis de matriz combinado con agar cromogénico (Método B)	99
1.1.4.5. Método de referencia ISO 11290-2/A1:2004.....	99
1.1.4.6. Curva estándar de <i>L. monocytogenes</i> en jamón curado	100
1.1.4.7. Parámetros evaluados	100

1.2. Evaluación del método qPCR en comparación al método de referencia para la cuantificación de <i>L. monocytogenes</i> en jamón curado contaminado experimentalmente	101
1.2.1. Cultivo bacteriano	101
1.2.2. Muestras de jamón curado contaminadas experimentalmente.....	101
1.2.3. Exactitud relativa.....	101
1.3. Método qPCR para la cuantificación de <i>L. monocytogenes</i> aplicado al análisis de productos cárnicos LPC	102
1.3.1. Productos cárnicos comerciales	102
1.3.2. Detección de <i>L. monocytogenes</i>	102
1.3.3. Cuantificación de <i>L. monocytogenes</i>	103
2. Resultados y discusión.....	104
2.1. Optimización de la reacción de amplificación de qPCR.....	104
2.2. Resultados de la curva estándar de DNA de <i>L. monocytogenes</i>	105
2.3. Resultados de la curva estándar celular de <i>L. monocytogenes</i>	106
2.4. Recuperación de <i>L. monocytogenes</i> tras el procedimiento de lisis de matriz.....	107
2.5. Resultados de la curva estándar de <i>L. monocytogenes</i> en jamón curado.....	108
2.6. Exactitud relativa del método qPCR en jamón curado contaminado experimentalmente	113
2.7. Cuantificación de <i>L. monocytogenes</i> en productos cárnicos LPC comerciales	114
Capítulo V. Detección y caracterización de la contaminación por <i>L. monocytogenes</i> en el proceso de elaboración de jamón curado loncheado y envasado al vacío.....	116
1. Material y métodos	116
1.1. Muestras de jamón curado	116
1.2. Plan de muestreo de superficies	117
1.3. Metodología para la detección de <i>L. monocytogenes</i> en jamón curado y superficies	119
1.4. Metodología para la cuantificación de <i>L. monocytogenes</i> en jamón curado y superficies	120
1.5. Identificación <i>Listeria</i> spp. <i>no monocytogenes</i>	120
1.5.1. Extracción de las proteínas bacterianas	120
1.5.2. MALDI-TOF MS	121
1.5. Caracterización genotípica de los aislados de <i>L. monocytogenes</i>	121
1.6.1. Serotipo molecular	121
1.6.1.1. Extracción de DNA	122

1.6.1.2. Amplificación del DNA	122
1.6.1.3. Preparación del gel y electroforesis convencional	124
1.6.2. Electroforesis en gel en campo pulsante (PFGE).....	125
1.6.2.1. Preparación de la suspensión bacteriana	125
1.6.2.2. Preparación de los bloques de agarosa	125
1.6.2.3. Lisis celular	126
1.6.2.4. Lavado de los bloques de agarosa	126
1.6.2.5. Restricción del DNA	126
1.6.2.6. Electroforesis en gel de campos pulsantes (PFGE)	127
1.6.2.7. Análisis del patrón de bandas.....	128
1.6.2.8. Evaluación de la diversidad genética de los pulsotipos	128
1.7. Análisis estadístico	129
2. Resultados y discusión.....	130
2.1. Detección de <i>L. monocytogenes</i> en jamón curado loncheado y envasado al vacío ..	130
2.2. Detección de <i>L. monocytogenes</i> en superficies relacionadas con el procesado de jamón curado loncheado y envasado al vacío.....	132
2.3. Detección de <i>Listeria spp.</i> (no <i>L. monocytogenes</i>) en el procesado del jamón curado loncheado y envasado al vacío	141
2.4. Serotipos moleculares de los aislados de <i>L. monocytogenes</i>	144
2.5. Subtipificación de los aislados de <i>L. monocytogenes</i> mediante PFGE	148
2.6.. Medidas de control en la industria cárnica.....	156
Capítulo VI. Conclusiones	158
Conclusions	161
Referencias bibliográficas.....	164
Anexos.....	201

Índice de tablas

Tabla 1. Especies pertenecientes al G ^o <i>Listeria</i> (ITIS, 2018; Leibniz Institute DSMZ-German Collection of Microorganisms and Cell Cultures, 2017)	16
Tabla 2. Principales factores de virulencia de <i>L. monocytogenes</i> y sus funciones (de las Heras, Cain, Bielecka, & Vázquez-Boland, 2011; Liu, 2008a; Ray & Bhunia, 2008; Vázquez-Boland et al., 2001)	20
Tabla 3. Factores de riesgo asociados a la listeriosis (Liu, 2008a; Ricci et al., 2018; Ryser & Marth, 2007)	28
Tabla 4. Factores de la formación de biofilm de <i>L. monocytogenes</i> (Kocot & Olszewska, 2017)	32
Tabla 5. Criterios microbiológicos para <i>L. monocytogenes</i> en alimentos listos para el consumo (Reglamento CE nº 2073/2005 modificado por Reglamento CE nº 1441/2007).	37
Tabla 6. Criterios microbiológicos para <i>L. monocytogenes</i> en alimentos listos para el consumo aplicables en Australia y Nueva Zelanda (The Australian and New Zealand food standards system, 2014)	39
Tabla 7. Criterios microbiológicos para <i>L. monocytogenes</i> en alimentos listos para el consumo aplicables en Canadá (Health Canada, 2011)	39
Tabla 8. Distribución de las muestras de jamón curado utilizadas para la evaluación de la impedanciometría combinada con agar cromogénico para la detección de <i>L. monocytogenes</i> (n=119)	61
Tabla 9. Tabla de resultados emparejados obtenidos por los métodos de referencia y alternativo (ISO 2016; NordVal, 2017)	64
Tabla 10. Tiempos de generación de las cepas de <i>Listeria</i> spp. ensayadas.	69
Tabla 11. Tiempo de detección (TD) de diferentes cepas de <i>Listeria</i> spp. en jamón curado, sometidas a diferentes condiciones de estrés.....	70
Tabla 12. Resultados de la detección de <i>L. monocytogenes</i> en jamón curado mediante ambas metodologías.	71
Tabla 13. Coeficientes de variación intra e interensayo (expresados en %) de los tiempos de detección	73
Tabla 14. Cepas y concentraciones microbianas (log ufc/muestra) utilizados para el estudio de la exclusividad e inclusividad	82

Tabla 15. Distribución de las muestras de jamón curado contaminadas artificialmente analizadas por los métodos alternativos y de referencia para la detección de <i>L. monocytogenes</i> (n=49)...	84
Tabla 16. Estudio de exclusividad e inclusividad de los métodos alternativos evaluados.....	86
Tabla 17. Nivel de detección 50 (LOD ₅₀) y nivel de detección relativo (RLOD) de los tres métodos alternativos y de referencia en la detección de <i>L. monocytogenes</i>	87
Tabla 18. Detección de <i>L. monocytogenes</i> en jamón curado mediante los tres métodos alternativos y de referencia (n=93).....	89
Tabla 19. Cebadores y sondas utilizadas en este estudio	96
Tabla 20. Productos cárnicos listos para el consumo y número de muestras analizados en este estudio.....	102
Tabla 21. Valores Cq y <i>Endpoint</i> obtenidos en las diferentes condiciones de temperatura de hibridación y concentración de cebadores y sonda.....	104
Tabla 22. Valores de Cq medios ± desviación estándar obtenidos mediante qPCR para cada concentración de DNA de <i>L. monocytogenes</i> CECT 934.....	105
Tabla 23. Cq medios ± desviación estándar y ratio de la señal obtenidos mediante qPCR para cada concentración celular de <i>L. monocytogenes</i> CECT 934.....	106
Tabla 24. Exactitud relativa del método B con respecto al método de referencia para la cuantificación de <i>L. monocytogenes</i> en jamón curado	108
Tabla 25. Resultados obtenidos del análisis de las muestras de jamón contaminadas para la realización de la curva estándar de <i>L. monocytogenes</i> en jamón curado (n=10).....	109
Tabla 26. Exactitud relativa del método qPCR en jamón curado contaminado experimentalmente	114
Tabla 27. Distribución y características físico-químicas de los lotes de jamón curado analizados	117
Tabla 28. Distribución de las muestras de diferentes superficies de la industria para la detección de <i>L. monocytogenes</i> (n=281).....	119
Tabla 29. Cebadores utilizados para la realización del serotipo molecular de <i>L. monocytogenes</i>	123
Tabla 30. Genes diana de <i>L. monocytogenes</i> y sus correspondientes serotipos moleculares ..	123
Tabla 31. Detección de <i>L. monocytogenes</i> en el ambiente de procesado	133

Tabla 32. Resultados estadísticos de las asociaciones entre la presencia de <i>L. monocytogenes</i> y las principales variables estudiadas	134
Tabla 33. Detección de <i>L. monocytogenes</i> en los distintos equipamientos analizados.....	136
Tabla 34. Coexistencia de <i>Listeria</i> spp. no <i>monocytogenes</i> y <i>L. monocytogenes</i> en las superficies del procesado	144

Índice de figuras

Figura 1. Esquema del ciclo intracelular e invasión célula a célula de <i>L. monocytogenes</i> . 1: Entrada de <i>L. monocytogenes</i> a la célula. 2: Formación de la vacuola. 3: Ruptura de la vacuola y liberación al citoplasma. 4: Multiplicación bacteriana. 5: Formación de colas de actina y movimiento. 6: Invasión de la célula vecina. 7: Supervivencia en el fagosoma secundario. 8: Ruptura de la membrana, liberación del microorganismo y comienzo de un nuevo ciclo celular (Modificado del publicado por Vera, González, Domínguez, & Bello, 2013).	22
Figura 2. Esquema de la fisiopatología de la infección por <i>L. monocytogenes</i> (Modificado del publicado por Vázquez-Boland et al., 2001).....	23
Figura 3. Etapas de la formación del biofilm (Gupta, Sarkar, Das, Bhattacharjee, & Tribedi, 2016)	31
Figura 4. Sistema de dos electrodos para la medición de impedancia	42
Figura 5. Curva típica de cambio en la impedancia relativa obtenida en un equipo BacTrac 4300	44
Figura 6. Representación esquemática del fundamento de la PCR.....	46
Figura 7. Diagrama de funcionamiento de las sondas Taqman.....	48
Figura 8. Curva de amplificación obtenida mediante PCR a tiempo real.....	49
Figura 9. Esquema de distribución de electrodos en sistema CHEF en la técnica PFGE. El ángulo de 120° es el ángulo de reorientación entre el campo eléctrico A y el B.....	56
Figura 10. A. Equipo μ -Trac 4200 y B. celdilla de dos electrodos utilizada para la impedanciometría.....	59
Figura 11. Etapas de los métodos alternativo (impedanciometría combinada con agar cromogénico OCLA) y de referencia, utilizados para la detección de <i>L. monocytogenes</i> en muestras de jamón curado. OCLA: Oxoid Chromogenic Listeria Agar; TSA: Tryptone Soya Agar	62
Figura 12. Colonias típicas de <i>L. monocytogenes</i> en agar OCLA.....	63
Figura 13. Curvas de calibración de las diferentes cepas de <i>Listeria</i> spp. obtenidas mediante impedanciometría en cultivo puro. Cada punto está formado por la media de la concentración inicial del inóculo en log ufc/ml (eje y) y la media \pm desviación estándar del Tiempo de Detección	

(TD) de dos replicados (eje x). Se muestra el coeficiente de determinación (R^2) y la ecuación de regresión lineal de cada cepa ensayada (A-F).	67
Figura 14. Tiempos de detección de los tres niveles de contaminación inicial (10^2 , 10^1 y 1 ufc <i>Listeria spp./ml</i>) en cultivo puro. Cada barra indica la media \pm desviación estándar de dos replicados para cada cepa.	68
Figura 15. Esquema de las cuatro metodologías ensayadas para la detección de <i>L. monocytogenes</i> . Método A: impedanciometría combinada con OCLA y Rapid L. mono. Método B: impedanciometría combinada con <i>RiboFlow</i> [®] <i>Listeria Twin</i> . Método C: PCR a tiempo real (<i>iQ-Check</i> [®] <i>Listeria monocytogenes</i> II Kit). OB: One Broth <i>Listeria</i> ; LSB: <i>Listeria Special Broth</i> ; HF: Half Fraser; OCLA: Oxoid Chromogenic <i>Listeria Agar</i>	76
Figura 16. Equipo de impedanciometría BacTrac 4300.....	77
Figura 17. Colonias típicas de <i>L. monocytogenes</i> en agar Rapid L. mono	78
Figura 18. Identificación de <i>L. monocytogenes</i> en el dispositivo <i>RiboFlow</i> [®] <i>Listeria Twin</i>	79
Figura 19. Curvas de amplificación de <i>L. monocytogenes</i> y control interno mediante PCR a tiempo real	80
Figura 20. Curva estándar de DNA de <i>L. monocytogenes</i> CECT 934 obtenida mediante qPCR. Se muestran los valores C_q medios \pm desviación estándar de nueve replicados vs log fg DNA <i>L. monocytogenes</i> en la reacción qPCR. Ecuación de la recta: $y = -3,3574x + 41,155$. Coeficiente de determinación $R^2 = 0,9995$	105
Figura 21. Curva estándar celular de <i>L. monocytogenes</i> CECT 934 mediante qPCR. En ella se muestran los valores C_q medios \pm desviación estándar de nueve replicados vs log ufc <i>L. monocytogenes</i> CECT 934 obtenidos tras el recuento en agar BHI. Ecuación de la recta: $y = -3,5039x + 45,057$. Coeficiente de determinación $R^2 = 0,998$	107
Figura 22. Curva estándar de <i>L. monocytogenes</i> CECT 934 en jamón curado mediante qPCR. Se muestran los valores C_q medios \pm desviación estándar de nueve replicados vs log ufc <i>L. monocytogenes</i> CECT 934 obtenidos por el método de referencia ISO 11290-2/A1:2004. Ecuación de la recta: $y = -3,313x + 43,937$. Coeficiente de determinación $R^2 = 0,9875$	111
Figura 23. Curvas estándar de DNA, celular y en jamón curado de <i>L. monocytogenes</i> CECT 934. Se muestran los C_q medios \pm desviación estándar de los replicados vs log equivalentes genómicos de <i>L. monocytogenes</i> /reacción	113

Figura 24. A: Desgubidora utilizada en el proceso de deshuesado del jamón curado. B: Cinta transportadora articulada ubicada en el deshuesado (imágenes cedidas por la empresa colaboradora)	118
Figura 25. Detección de <i>L. monocytogenes</i> en la zona de deshuesado. B. Detección de <i>L. monocytogenes</i> en la zona de loncheado	134
Figura 26. Presencia de <i>L. monocytogenes</i> en los distintos tipos de superficies analizadas.....	137
Figura 27. Presencia de <i>L. monocytogenes</i> en los distintos tipos de cintas transportadoras ...	138
Figura 28. Presencia de <i>L. monocytogenes</i> en las distintas estaciones del año.	141
Figura 29. A. Espectro obtenido de un aislado de <i>L. innocua</i> y B. <i>L. welshimeri</i> mediante MALDI-TOF MS	142
Figura 30. A Presencia de <i>Listeria</i> spp. no <i>monocytogenes</i> en las dos zonas de procesado. B. Presencia de <i>Listeria</i> spp. no <i>monocytogenes</i> en relación al estado de la superficie.	143
Figura 31. Presencia de <i>Listeria</i> spp. no <i>monocytogenes</i> en los distintos tipos de superficies analizadas	143
Figura 32. Patrones de bandas obtenidos tras la primera reacción PCR multiplex. Líneas 1 y 7: marcador de peso molecular (100-1000 bp); línea 2: <i>L. monocytogenes</i> CECT 911 (serotipo 1/2c); línea 3: <i>L. monocytogenes</i> CECT 934 (serotipo 4a); línea 4: <i>L. monocytogenes</i> CECT 935 (serotipo 4b); línea 5: <i>L. monocytogenes</i> CECT 936 (serotipo 1/2b); línea 6: <i>L. monocytogenes</i> CECT 4031 (serotipo 1/2a).....	145
Figura 33. Patrón de bandas de la segunda reacción PCR para diferenciar los serotipos moleculares 1/2a y 1/2c. Línea 1: <i>L. monocytogenes</i> CECT 4031 (serotipo 1/2a); línea 2: <i>L. monocytogenes</i> CECT 911 (serotipo 1/2c); línea 3: marcador de peso molecular (100-1000 bp).	145
Figura 34. Serotipos moleculares de los aislados de <i>L. monocytogenes</i> procedentes de superficies y jamón curado (n=25).	146
Figura 35. Serotipos moleculares de los aislados procedentes de jamón curado (n=4)	146
Figura 36. Serotipos moleculares de los aislados procedentes de superficies (n=21).....	146
Figura 37. Dendrograma de los perfiles obtenidos mediante <i>Ascl</i> de los 25 aislados de <i>L. monocytogenes</i> . Los % de similitud y coeficiente de correlación cofenético se indican a la izquierda y derecha de las bifurcaciones de las ramas, respectivamente. Se muestra la zona, el	

estado de la superficie, la fuente, la fecha de aislamiento y el serotipo molecular de cada aislado149

Figura 38. Dendrograma de los perfiles obtenidos mediante *Apal* de los 25 aislados de *L. monocytogenes*. Los % de similitud y coeficientes de correlación cofenético se indican a la izquierda y derecha de las bifurcaciones de las ramas, respectivamente. Se muestra la zona, el estado de la superficie, la fuente, la fecha de aislamiento y el serotipo molecular de cada aislado. Se indican los clusters obtenidos (similitud ≥ 70 %).150

Figura 39. Número de aislados por pulsotipo, y su distribución en ambas zonas del procesado y jamón curado.....151

Figura 40. Número de aislados por pulsotipo y su distribución en función del estado de la superficie152

RESUMEN

Resumen

La industria cárnica se enfrenta al reto de ofrecer productos de calidad, económicamente competitivos y que cumplan con estrictos criterios de seguridad alimentaria. *L. monocytogenes* es el agente causal de la listeriosis, una enfermedad grave producida por el consumo de alimentos contaminados, principalmente alimentos listos para el consumo (LPC), y que presenta una elevada letalidad en determinados grupos de riesgo. Esta bacteria es ubiquitaria y sobrevive en condiciones ambientales adversas, por lo que se encuentra de forma habitual en los entornos de procesado de alimentos, suponiendo un riesgo de contaminación cruzada con los mismos. En a los datos de letalidad, países como Estados Unidos aplican la política de la “tolerancia cero” (*i.e.* ausencia en 25 g) en relación a la presencia de este patógeno en productos LPC, incluso para aquellos que no favorecen el crecimiento del patógeno, como el jamón curado.

España es un país con una tradición muy rica en la elaboración y consumo de embutidos curados y jamones. De los diferentes productos cárnicos derivados de cerdo, el jamón curado destaca por ser un producto de alta calidad muy apreciado por los consumidores. En la actualidad, este sector está experimentando un fenómeno de internacionalización, con gran aceptación entre los consumidores de otros países.

El Reglamento (CE) Nº 2073/2005 y sus posteriores modificaciones establece criterios microbiológicos de seguridad alimentaria relativos a *L. monocytogenes* en alimentos LPC (ausencia en 25 g y ≤ 100 ufc/g) dependiendo de si pueden favorecer o no el desarrollo del patógeno. Además, en industrias productoras de este tipo de alimentos exige realizar un control de superficies. Los métodos de referencia para la detección (ISO 11290-1:2017) y cuantificación (ISO 11290-2:2017) de este microorganismo son largos y costosos. Por ello, las industrias demandan metodologías alternativas fiables, rápidas y que permitan el análisis de un elevado número de muestras para mejorar el control del patógeno y posibilitar la toma de decisiones de una manera más rápida y eficaz, evitando así la llegada de alimentos contaminados a los consumidores.

Por otro lado, la caracterización genotípica de los aislados de *L. monocytogenes* procedentes del proceso de elaboración del jamón curado aporta información de gran importancia tanto para las autoridades sanitarias como para la industria. Gracias a ella pueden determinarse rutas y nichos de contaminación, así como detectar la presencia de cepas del patógeno esporádicas y persistentes. Con toda esta información pueden tomarse medidas correctoras y/o de control cuyo objetivo es lograr la eliminación eficaz del patógeno de la industria.

Por ello, los objetivos de esta Tesis Doctoral han sido la puesta a punto y evaluación de métodos alternativos rápidos para la detección y cuantificación de *L. monocytogenes* en jamón curado loncheado y envasado al vacío, así como la detección del patógeno en el proceso de elaboración de este producto cárnico y posterior caracterización genotípica de los aislados obtenidos, para así poder contribuir al proceso de evaluación del riesgo y aportar medidas de control de *L. monocytogenes* a la industria cárnica.

Se ha realizado la puesta a punto y evaluación de la impedanciometría combinada con agar cromogénico OCLA (Oxoid Chromogenic Listeria Agar) en comparación con el método de referencia para la detección de *L. monocytogenes* en jamón curado. Este estudio se ha desarrollado en base a parámetros reconocidos internacionalmente, establecidos en la norma ISO 16140-2:2016 entre otros. En la evaluación de la metodología alternativa en matriz se han obtenido resultados muy satisfactorios ya que se observó una concordancia excelente entre los resultados obtenidos por el método alternativo y de referencia, no apareciendo falsos positivos y negativos, siendo capaz de detectar 1 ufc/25 g de alimento. Este método permite obtener un resultado positivo confirmado en 4-5 días, y resultados negativos a *Listeria spp.* en menos de 3 días, lo que supone un ahorro considerable de tiempo con respecto al método de referencia. Además, es sencillo y permite el análisis simultáneo de 21 muestras, facilitando el flujo de trabajo en el laboratorio.

Asimismo, se ha evaluado la impedanciometría incluyendo mejoras del mercado orientadas a reducir el tiempo de análisis, simplificar la metodología y análisis de un mayor número de muestras de forma simultánea. Estas mejoras han consistido en el ensayo de un medio de cultivo diferente (One Broth Listeria), un equipo de mayores prestaciones (BacTrac 4300) y distintos sistemas de identificación del patógeno: agar cromogénico Rapid L. mono y un kit de hibridación de RNA (RiboFlow Listeria Twin). Además, se ha evaluado otra metodología alternativa como es la PCR a tiempo real (iQ-Check® *Listeria monocytogenes* II Kit) para la detección del patógeno en jamón curado.

El estudio de la exclusividad e inclusividad de los métodos alternativos ha dado muy buenos resultados ya que no se han mostrado interferencias en la detección del patógeno. Además, los métodos alternativos han sido capaces de detectar concentraciones muy bajas de *L. monocytogenes* (<1 ufc/25 g). La impedanciometría combinada con Rapid L. mono así como la PCR a tiempo real han presentado una concordancia excelente con el método de referencia, no observándose falsos positivos ni negativos, por lo que se han considerado métodos fiables. Sin embargo, esta concordancia fue menor en la impedanciometría combinada con RiboFlow

Listeria Twin ya que aparecieron falsos positivos y negativos, afectando negativamente a la sensibilidad, veracidad y especificidad de la metodología.

La impedanciometría combinada con Rapid L. mono necesitó de 2,5 a 4 días para obtener un resultado positivo confirmado a *L. monocytogenes* y 48 h para un resultado negativo a *Listeria* spp. La PCR a tiempo real ofreció un resultado positivo confirmado en 48 h y negativo en 24 h. Sin embargo, debido a su fiabilidad, sencillez y a que es más económica en relación a la PCR a tiempo real, se seleccionó la impedanciometría combinada con Rapid L. mono para el análisis de *L. monocytogenes* en el proceso de elaboración del jamón curado loncheado y envasado al vacío.

Asimismo, y debido a la importancia de cuantificar los resultados de una detección positiva en base al cumplimiento de los criterios microbiológicos, se ha evaluado un método qPCR para la cuantificación de *L. monocytogenes* en jamón curado. Para ello, se ha optimizado la reacción PCR, así como las curvas estándar de DNA, celular (cultivo puro) y en jamón curado de *L. monocytogenes*. Al igual que para las metodologías anteriores, el método qPCR se ha evaluado conforme a parámetros internacionalmente reconocidos. Este método permite la detección y cuantificación de muy bajas concentraciones del microorganismo ($30,1 \pm 6,2$ ufc/g), con una elevada precisión, cumpliendo con los parámetros de aceptación. La concordancia de los resultados obtenidos por el método qPCR y el de referencia fue excelente por lo que este método alternativo es fiable, rápido y facilita el trabajo en el laboratorio permitiendo el análisis de un número elevado de muestras simultáneamente.

Finalmente, se ha realizado un estudio de la contaminación por *Listeria monocytogenes* en la industria de elaboración del jamón curado. Así, se han analizado 120 muestras de este producto loncheado y envasado al vacío y 281 muestras de superficies relacionadas con el proceso de elaboración de este producto cárnico y procedentes de una misma industria. Las muestras de superficies se han tomado en diferentes días a lo largo de seis meses en dos zonas del procesado: 1) deshuesado y 2) loncheado y envasado a vacío. Las muestras procedieron de las superficies antes (limpias) y después (sucias) de la jornada de trabajo. Se muestrearon diferentes tipos de equipos, cintas transportadoras y accesorios. La identificación de otras especies no patógenas de *Listeria* se ha llevado a cabo mediante MALDI-TOF MS. La determinación del serotipo molecular y la subtipificación de los aislados de *L. monocytogenes* se ha realizado mediante PCR multiplex y electroforesis en gel en campo pulsante (PFGE), respectivamente.

Se ha detectado la presencia de otras especies apatógenas de *Listeria* en el 10,8 % y en el 33,4 % de las muestras de jamón curado y de superficies, respectivamente. *L. monocytogenes* ha sido

detectada en cuatro muestras de 25 g de jamón curado (3,3 %) y en 26 muestras de superficies (9,3 %). Concretamente, se ha observado la presencia de la bacteria en cintas transportadoras (15), desgubadora (5), mesas (3), moldeadora (2) y deshuesadoras (1). La zona de deshuesado se ha presentado como la de mayor riesgo de contaminación con el patógeno. Sin embargo, la probabilidad de encontrar la presencia de *L. monocytogenes* ha sido la misma independientemente del estado de las superficies (limpia o sucia) ($p \geq 0,05$). Las superficies limpias de la zona de deshuesado han presentado mayor riesgo de estar contaminadas con *L. monocytogenes*, que las homólogas de la zona de loncheado y envasado ($p < 0,05$). Se ha observado que las cintas articuladas y las desgubadoras fueron las superficies de mayor riesgo de contaminación con *L. monocytogenes*. En este estudio, se ha observado que en el alimento no ha habido coexistencia de *L. monocytogenes* con otras especies de su género, al contrario de lo observado en las superficies.

El serogrupo predominante de los 25 aislados analizados ha sido el 1/2a (84 %), seguido por el 1/2b (8 %) y 1/2c (8 %). Esta predominancia del serogrupo 1/2a se observó tanto en los aislados procedentes de jamón curado como de las superficies.

Se han obtenido seis pulsotipos diferentes: S1, S2-1, S2-2, S3, S4 y S5. Los seis pulsotipos aparecieron en diferentes superficies de la zona de deshuesado. Sin embargo, en la zona de loncheado únicamente se aisló el pulsotipo S2-1. Todos los pulsotipos procedentes del jamón curado fueron aislados de las superficies en algún momento del estudio, mostrando la elevada importancia del ambiente de procesado como fuente de contaminación de los alimentos. El pulsotipo S2-1 mostró un carácter persistente y predominante a lo largo del estudio.

De los resultados obtenidos, la propuesta de medidas de control va dirigida a optimizar el protocolo de limpieza y desinfección en la zona de deshuesado y mejorar el diseño higiénico de determinados tipos de superficies como las cintas transportadoras y la desgubadora, así como de las instalaciones.

SUMMARY

Summary

The meat industry faces the challenge of seeking to offer products that meet consumer quality expectations, are economically competitive, and adhere to strict food safety criteria. *L. monocytogenes* is the causal agent for listeriosis, a serious disease arising from the consumption of contaminated foodstuffs, particularly ready-to-eat (RTE) foods, and can lead to an elevated rate of mortality in certain risk groups. This bacterium is ubiquitous and survives under the most adverse environmental circumstances, thus, it can be detected in the immediate surroundings of processed foods, thereby representing a risk of cross-contamination with them. In terms of lethality, countries such as the United States apply a “zero tolerance” policy: a total absence of *L. monocytogenes* (absence in 25g) in RTE products, even in those such as cured ham which do not even encourage the pathogen’s growth.

Spain is a country which can look back on an outstanding tradition in the elaboration and consumption of dry sausage and ham. Among all the meat products derived from pork, cured ham stands out as a high-quality product that is highly appreciated by consumers. The sector is currently internationalizing itself; consumers in other countries are displaying increasing interest for such products.

The European Commission Regulation (EC) Nº. 2073/2005 and its subsequent amendments establish microbiological food safety criteria regarding *L. monocytogenes* in RTE foodstuffs (absence in 25 g and ≤ 100 ufc/g) to ensure avoidance of the pathogen’s development. Moreover, in industries that produce this type of foodstuffs, meticulous control of all surfaces is required. The reference methods for detection (ISO 11290-1:2017) and quantification (ISO 11290-2:2017) of *L. monocytogenes* are time-consuming and expensive. The food industry is therefore constantly on the lookout for rapid and reliable alternative methodologies capable of analyzing a great number of samples in order to improve control of the pathogen and to enable acceleration and improved efficiency in the making of decisions, thereby avoiding that contaminated foodstuffs reach the consumer.

On the other hand, genotypic characterization of *L. monocytogenes* isolates stemming from the elaboration of cured ham can provide the sanitary authorities and the industry with information of major importance. Such characterization can help detect contamination routes and niches, thereby ascertaining the presence of sporadic, yet persistent strains. This information can enable authorities and the industry to apply a series of corrective control measures with the objective of efficiently eliminating the pathogen from the industry.

The present Doctoral Thesis therefore had the following objectives: 1) the evaluation and

elaboration of rapid alternative methods for the detection and quantification of *L. monocytogenes* in sliced, vacuum-packaged cured ham, as well as for detecting its presence in the product's elaboration process; 2) the subsequent implementation of a genotypic characterization of the obtained isolates; 3) the elaboration of recommendations to improve the risk evaluation process and the recommendation of control measures to ensure the elimination of *L. monocytogenes* from the meat industry's chain of production.

In this thesis, an impedance method combined with OCLA (Oxoid Chromogenic Listeria Agar) was elaborated and evaluated in comparison with the reference method for detection of *L. monocytogenes* in cured ham. The study was carried out on the basis of internationally valid parameters which are established in the ISO 16140-2:2016 norm, among others. In the matrix evaluation of the alternative methodology, very satisfactory results were obtained, since an excellent agreement between results obtained by the alternative method and the reference method was observed, without the presence of false positives or negatives. The alternative method is capable of detecting 1 ufc in 25 g of food. This method can guarantee a positive confirmed result in 4-5 days, and negative results for *Listeria spp.* in less than three days, which represents a considerable economization of time compared with the reference method. Moreover, the method is easy to apply, and permits simultaneous analysis of 21 samples, thereby considerably improving overall laboratory workflow.

The impedance method was likewise evaluated, including the application of a series of market-based improvements designed to reduce analysis time, simplify the methodology, and simultaneously analyze a larger quantity of samples. These improvements consisted in trying out a different culture medium (One Broth Listeria), testing equipment with better performance (BacTrac 4300), and applying a series of systems for the identification of the pathogen: rapid *L. mono* chromogenic agar, and a RNA hybridization kit (RiboFlow Listeria Twin). Also, other alternative methodology for detecting *L. monocytogenes* in cured ham was evaluated: real-time PCR (the iQ-Check® *Listeria monocytogenes* II kit).

Inclusivity/exclusivity testing of the alternative methods yielded good results: no interferences emerged in the detection of the pathogen. Furthermore, the alternative methods herein assayed were able to detect very low concentrations of *L. monocytogenes* (<1 ufc/2.5g). The impedance measurement combined with Rapid *L. mono* and the real-time PCR method display high agreement with the reference method: no false positives or negatives are observed. Therefore, these methods can be regarded as trustworthy and reliable. However, agreement was lower when combining impedance with RiboFlow Listeria Twin: in this case, false positives and negatives emerged, and they exerted a negative effect on the sensitivity, veracity and

specificity of the methodology.

Impedance combined with Rapid L. mono required a period of 2.5 to 4 days to obtain a positive confirmed result for *L. monocytogenes*, and 48 h for a negative result for *Listeria* spp. Real-time PCR displayed a confirmed positive result in 48 h and a negative one in 24 h. However, due to its reliability, simplicity and low cost compared with real-time PCR, the impedanciometry combined with Rapid L. mono was selected for the analysis of *L. monocytogenes* in the elaboration process of sliced and vacuum-packaged cured ham.

Likewise, due to the importance of being able to quantify the results of a positive detection – thereby fulfilling microbiological criteria – we evaluated a qPCR method for the quantification of *L. monocytogenes* in cured ham. To achieve this, we optimized the PCR reaction as well as the standard DNA, cellular (pure-culture method) and cured ham curves for *L. monocytogenes*. As for the previous methodologies, the result of our evaluation is that the qPCR method is indeed in accordance with internationally established parameters. With great precision, this method enables the detection and quantification of very low concentrations of *L. monocytogenes* (30.1 ± 6.2 ufc/g), thereby fulfilling the parameters required for its adoption. Agreement between results obtained via qPCR method and the reference method was excellent; thus, we can conclude that the alternative method is rapid and reliable, and that it simplifies laboratory tasks by permitting the simultaneous analysis of samples.

Finally, we carried out a study of *Listeria monocytogenes* contamination in the cured ham industry. We analyzed 120 samples of the product in sliced, vacuum-packed condition, and 281 samples of surfaces that had come in contact with the elaboration process, all stemming from the same factory. The surface samples were taken on different days over a six-month period in two processing zones: 1) deboning and 2) slicing and vacuum packaging. The samples from surfaces were taken before and after the workday. We collected samples on several kind of equipment, conveyor belts, and accessories. The identification of other non-pathogenic species of *Listeria* was carried out via MALDI-TOF MS. The determination of the molecular serotype and the sub-typifying of the isolates of *L. monocytogenes* was carried out via PCR multiplex and Pulsed-Field Gel Electrophoresis (PFGE), respectively.

The presence of other, non-pathogenic species of *Listeria* was detected in 10.8% and 33.4% of the samples of cured ham and of surfaces, respectively. *L. monocytogenes* was detected in four 25 g samples of cured ham (3.3 %) and in 26 surface samples (9.3%). Concretely, the presence of bacteria was observed on conveyor belts (15), gouging machine (5), tables (3), molders (2) and deboning machines (1). As it turns out, the deboning room is the zone displaying the

greatest risk of contamination with the pathogen. However, the possibility of encountering *L. monocytogenes* bacteria was shown to be invariable, independently of the degree of surface cleanliness (cleaned or dirty) ($p \geq 0.05$). Clean surfaces in the deboning room presented a greater risk of contamination with *L. monocytogenes* than the equivalent surfaces in the slicing and packaging zone ($p < 0.05$). Modular conveyor belts and gouging machine were observed to be the surfaces with the greatest risk of *L. monocytogenes* contamination. In this study, there was no coexistence of *L. monocytogenes* with other species of its genus in the meat itself, as opposed to what was observed on surfaces.

In the 25 analyzed isolates, the most commonly observed molecular serotype was 1/2a (84 %), followed by 1/2b (8 %) and 1/2c (8 %). This predominance of serotype 1/2a was observed in isolates from cured ham as well as in isolates stemming from the surfaces.

Six different pulsetypes were obtained: S1, S2-1, S2-2, S3, S4 and S5. These six pulsetypes occurred on different surfaces in the deboning room. However, in the slicing zone, only one pulsetype was isolated, namely S2-1. All pulsetypes stemming from cured ham were isolated on the surfaces at one point or another in our study, thereby underscoring the substantial role played by the processing stage as a source of foodstuff contamination. Pulsetype S2-1 proved to be persistent and predominant in different stages of our study.

From results obtained, the recommendation of control measures goes toward optimizing the cleaning protocol in the deboning room, and toward improving the hygienic design of certain types of surfaces such as conveyor belts, the gouging machine, and other zones in the processing plant.

CAPÍTULO I

INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

Capítulo I. Introducción y objetivos

La industria cárnica es uno de los pilares de la economía española, destacando el sector porcino como uno de los principales productores a nivel mundial, con una tendencia ascendente año tras año (Asociación Nacional de Industrias de la Carne de España (ANICE), 2018).

España posee una gran tradición gastronómica en la que destacan, por su calidad y aceptación, los productos cárnicos curado-madurados como el jamón curado. Además, la industria cárnica se ha dirigido hacia la internacionalización de sus productos con un elevado éxito. Actualmente, España es uno de los principales exportadores de carne y elaborados cárnicos, solo por detrás de Alemania y Estados Unidos (ANICE, 2018). Concretamente, nuestro país, se sitúa como los principales productores y exportadores de jamón curado a nivel mundial. Durante el año 2017 se exportaron más de 44.000 toneladas de jamón curado, teniendo como principal destino la Unión Europea (UE), principalmente Alemania y Francia. Asimismo, la exportación a terceros países como México y Estados Unidos ha aumentado la demanda de estos productos en los últimos años (Rodríguez, 2018). La estrategia española radica en la producción de alimentos de elevada calidad, incluyendo la seguridad de sus productos.

En este sentido, la industria cárnica se encuentra en constante desafío ya que debe realizar el control efectivo de diversos microorganismos patógenos de transmisión alimentaria, entre los que se encuentra *Listeria monocytogenes*. Este microorganismo posee una elevada importancia nivel mundial tanto desde punto de vista de salud pública como económico. *L. monocytogenes* es el agente causal de la listeriosis, una enfermedad grave que afecta a determinados grupos de riesgo (ancianos, embarazadas, niños de corta edad y personas inmunocomprometidas) con una letalidad del 20-30 % (Lomonaco, Nucera, & Filipello, 2015).

L. monocytogenes es ubicuo y posee capacidad de formación de biofilms, pudiendo sobrevivir y multiplicarse en condiciones desfavorables (baja a_w , amplio rango de pH, elevadas concentraciones de NaCl, presencia de agentes antimicrobianos, etc.). Estas características le permiten encontrarse de forma habitual en entornos de procesado de alimentos, suponiendo un riesgo de contaminación cruzada a los productos que allí se elaboren. Los alimentos listos para el consumo (LPC) son los principales alimentos de riesgo asociados a *L. monocytogenes*. Esto se debe a que tienen una relativamente larga vida útil, se mantienen en refrigeración y se consumen sin ningún tratamiento que elimine al patógeno si está presente. La llegada de *L. monocytogenes* a estos alimentos suele ser por recontaminación post-tratamiento listericida. Concretamente, en productos cárnicos se produce durante operaciones del proceso de elaboración, como deshuesado, corte, loncheado o envasado. La prevalencia de *L.*

monocytogenes en productos como el jamón curado es variable, encontrándose entre el 2 % y el 24,3 %, dependiendo en gran medida de las condiciones higiénicas durante su producción (Gómez et al., 2015; Prencipe et al., 2012). Sin embargo, *L. monocytogenes* se encuentra en concentraciones bajas, siendo escaso el porcentaje de muestras en los que se excede el límite de 100 ufc de *L. monocytogenes*/g (European Food Safety Authority (EFSA)/European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC), 2016; EFSA/ECDC, 2017; Ricci et al., 2018).

La legislación europea (Reglamento CE Nº 2073/2005; Reglamento CE Nº 1441/2007) establece criterios de seguridad alimentaria para *L. monocytogenes* en alimentos LPC (ausencia en 25 g y ≤ 100 ufc/g) dependiendo de las características del alimento. Por otro lado, obliga a las industrias productoras de alimentos LPC susceptibles de plantear un riesgo de *L. monocytogenes* a realizar controles de las zonas y equipos de producción, para detectar la presencia de este patógeno. En terceros países como Estados Unidos, se aplica la política de “tolerancia cero” tanto en este tipo de alimentos como en las superficies donde se procesan, exigiendo la ausencia de *L. monocytogenes* en 25 g de alimento y en superficies. Para exportar a estos países, la industria cárnica española debe cumplir con estos requisitos legales.

Por ello, el control de *L. monocytogenes* en la industria cárnica es un tema prioritario, tanto para reducir el riesgo de listeriosis, como para incrementar competitividad en los mercados tanto europeos como de terceros países, y evitar cuantiosas pérdidas económicas. En este sentido, la industria alimentaria precisa de herramientas que le permitan monitorizar y controlar la presencia del patógeno de una manera rápida y eficaz, mejorando el flujo de trabajo, para su integración dentro de su sistema de autocontrol APPCC (Análisis de Peligros y Puntos de Control Crítico). Estas herramientas incluyen el desarrollo y/o evaluación de métodos rápidos para el análisis de *L. monocytogenes* ya que los métodos de referencia presentan algunos inconvenientes de uso. El método de referencia para la detección (ISO 11290-1:2017) es largo, costoso, y no permite el análisis de múltiples muestras. Asimismo, el método de referencia para la cuantificación del patógeno (ISO 11290-2:2017) presenta un límite de cuantificación de 10-100 cfu/g o ml, y cuando los niveles de contaminación son bajos, esta metodología puede no ser adecuada para la cuantificación precisa del patógeno (Auvolat & Besse, 2016).

Como alternativas a los métodos de referencia, se han estudiado distintas metodologías electroquímicas, moleculares, o inmunoquímicas para la detección y recuento de *L. monocytogenes* en alimentos. Entre los métodos electroquímicos destaca la impedanciometría. Esta técnica se basa en el cambio de la impedancia del medio de cultivo a consecuencia de la multiplicación de los microorganismos presentes. La impedanciometría ofrece numerosas ventajas que radican en su sencillez de uso, reducción del tiempo de análisis, así como por la

posibilidad de analizar un elevado número de muestras simultáneamente (Yang & Bashir, 2007). Esta metodología ha sido evaluada para la detección del patógeno en diversas matrices como leche y carne picada (Ruan, Wang, Yang, & Li, 2003), sin embargo, no se ha evaluado su utilización en productos cárnicos como el jamón curado.

En los últimos años, se han desarrollado métodos moleculares basados en la PCR a tiempo real para el control de *L. monocytogenes* en la industria alimentaria, tanto para la detección como para la cuantificación. Las principales ventajas de la PCR a tiempo real se basan en la fiabilidad, sencillez, rapidez y mejora del flujo de trabajo mediante la automatización y el análisis de múltiples muestras de forma simultánea (de Oliveira, Abeid Ribeiro, Morato Bergamini, & Pereira De Martinis, 2010; Fuchizawa, Shimizu, Ootsubo, Kawai, & Yamazaki, 2009; O'Grady et al., 2009; Rantsiou, Alessandria, Urso, Dolci, & Cocolin, 2008; Witte, Fister, Mester, Schoder, & Rossmanith, 2016). Sin embargo, una limitación de esta técnica se presenta por la necesidad de dilución de la muestra previamente al análisis, con el fin de homogenizar el alimento y reducir la concentración de inhibidores que afectan a la eficiencia de la reacción PCR, influyendo de manera negativa sobre el límite de detección. Por ello, la mejora de esta fase mediante un pretratamiento de la muestra permitiría concentrar el microorganismo reduciendo los límites de detección y cuantificación.

Para asegurar la calidad de los resultados obtenidos por los métodos alternativos, éstos deben validarse o evaluarse en comparación con el método de referencia. Para ello, organizaciones internacionalmente reconocidas como ISO (*International Organization for Standardization*) o NordVal International (entidad evaluadora perteneciente a los países nórdicos), han publicado protocolos de validación de métodos alternativos para el análisis microbiológico de alimentos. Por otro lado, la bibliografía científica ofrece información fiable acerca de parámetros de interés para la evaluación de dichos métodos.

En la actualidad, la utilización de métodos moleculares para la caracterización genotípica de aislados ambientales y de alimentos de *L. monocytogenes* es una herramienta de gran utilidad. Entre los distintos métodos moleculares, destaca la electroforesis en gel en campo pulsante (PFGE), considerado como el método de referencia por el CDC (*Centers for Disease Control and Prevention*). Este organismo creó un sistema de sub-tipificación y vigilancia para la detección y seguimiento de brotes producidos por patógenos alimentarios a nivel mundial, denominado PulseNet. Gracias a la utilización de la PFGE, se permite el intercambio rápido de información entre laboratorios facilitando el conocimiento de la "epidemiología global". Otra aplicación importante de esta metodología es la detección de nichos de contaminación persistente y vías de contaminación dentro de la industria alimentaria. Toda esta información permite tomar

medidas de prevención y control de *L. monocytogenes* de manera más dirigida y eficaz, con el objetivo de conseguir la eliminación del patógeno y así producir alimentos seguros.

La PFGE permite detectar pequeños cambios genéticos en el DNA, y en ocasiones esto puede suponer una desventaja, ya que se puede perder la capacidad de analizar el origen común de los aislados de *L. monocytogenes*. Para ello, se han desarrollado otros métodos como el *MultiLocus Sequence Typing* (MLST) que permite establecer relaciones filogenéticas entre los aislados.

La presente Tesis Doctoral se ha realizado en el Área de Nutrición y Bromatología del Departamento de Producción Animal y Ciencia de los Alimentos de la Facultad de Veterinaria de la Universidad de Zaragoza. El trabajo de investigación se ha desarrollado en el seno del Grupo de Investigación de Referencia reconocido por el Gobierno de Aragón A06_17R “Análisis y Evaluación de la Seguridad Alimentaria”, encuadrado en las actividades del proyecto “Evaluación y control del riesgo de *Toxoplasma gondii* en jamón y desarrollo de métodos rápidos para el análisis de *Listeria monocytogenes*” (INNPACTO IPT-2012-0189060000, MINECO/FEDER).

El principal objetivo de esta Tesis Doctoral es desarrollar y evaluar una metodología rápida para el análisis de *L. monocytogenes* que permita el control de este patógeno en la industria de elaboración de jamón curado. Asimismo, se pretende contribuir al proceso de evaluación del riesgo de *L. monocytogenes* por consumo de este producto cárnico, aportando datos científicos sobre la prevalencia, nivel de contaminación y caracterización genética de este patógeno.

Para alcanzar este objetivo general, se han planteado los siguientes **objetivos específicos**:

- 1) Puesta a punto y evaluación de métodos alternativos para la detección de *L. monocytogenes* en jamón curado: impedanciometría y PCR a tiempo real.
- 2) Puesta a punto y evaluación de un método qPCR para la cuantificación de *L. monocytogenes* en productos cárnicos.
- 3) Caracterización de la contaminación por *L. monocytogenes* en el proceso de elaboración de jamón curado loncheado y envasado al vacío.
- 4) Contribución al proceso de evaluación del riesgo de *L. monocytogenes* por consumo de jamón curado loncheado y envasado al vacío y aportación de medidas de control a la industria cárnica.

La metodología, así como los resultados obtenidos en la consecución de los tres primeros objetivos se describen en los capítulos III, IV y V de la presente memoria. Asimismo, el objetivo 4 se describe de forma integrada en el capítulo V.

CAPÍTULO II

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

Capítulo II. Revisión bibliográfica

1. Productos cárnicos curado-madurados: datos de producción y consumo

La industria cárnica tiene una gran importancia en nuestro país, siendo el cuarto sector industrial de España. Está formada por más de 3.000 empresas entre las que se encuentran mataderos, salas de despiece y plantas de productos elaborados, ocupando el primer puesto en el sector alimentario español. La industria cárnica genera más de 24 millones de euros y produce más del 22,3 % de volumen de negocio de dicho sector (ANICE, 2018). En 2017, la producción porcina fue la primera actividad cárnica española, representando la carne de esta especie el 64,1 % en relación a otras producidas en nuestro país. La producción de carne de cerdo mantuvo la tendencia ascendente observada durante los últimos años, creciendo un 10,2 % con respecto a 2015 y, alcanzándose por segunda vez consecutiva los cuatro millones de toneladas de carne (ANICE, 2018). Gracias a esta tendencia ascendente, España se ha situado como el cuarto mayor productor mundial de carne porcina (3,75 % de la producción mundial), por detrás de China, Estados Unidos y Alemania. A nivel europeo, España se sitúa en segunda posición, con una producción del 17,5 % del total de la Unión Europea (ANICE, 2018).

España es un país con una gran tradición gastronómica, en la que el jamón curado y los embutidos (chorizo, salchichón) tienen una elevada aceptación por los consumidores, debido a su palatabilidad y la nula o poca preparación previa al consumo. Durante el año 2015, se produjeron 299.000 toneladas de jamones y paletas curadas (ANICE, 2018). El jamón curado representó más de 25 % de los volúmenes comercializados de elaborados cárnicos en los diferentes canales de alimentación, y el 43,3 % en cuanto al valor durante 2016 (ANICE, 2018). Sin embargo, se ha observado un ligero descenso del consumo desde el año 2013, alcanzando valores de 2,04 kg de jamón curado/persona en 2017 (Ministerio de Agricultura Pesca y Alimentación, 2017). Por ello, la industria cárnica ha buscado la comercialización de sus productos fuera de las fronteras de nuestro país, para así compensar las pérdidas económicas producidas.

En los últimos 25 años, el sector cárnico español ha sufrido una importante transformación gracias a la internacionalización de sus productos. En la actualidad, se mantiene una tendencia ascendente en cuanto a exportación de carne y elaborados cárnicos de origen porcino, situándose como el tercer país a nivel mundial, por detrás de Alemania y Estados Unidos (ANICE, 2018).

El destino de las exportaciones españolas es principalmente países de la Unión Europea (Francia, Alemania, Portugal e Italia) (ANICE, 2018). Sin embargo, un objetivo del sector es incrementar

las ventas exteriores a mercados extracomunitarios, e impulsar las exportaciones de productos de valor añadido, que diferencien España de otros mercados internacionales; en este contexto el jamón curado es considerado de gran importancia para su exportación. Este producto está presente en más de 100 países y durante el año 2017 se exportaron más de 44.000 toneladas. Los principales destinos siguen siendo la Unión Europea, que recibe entre el 82-84 % de jamones exportados. Dentro de la Unión Europea destacan Alemania y Francia como principales importadores de este alimento, mientras que México y Estados Unidos son los terceros países que más jamón curado importan de nuestro país.

Este alimento es un producto cárnico que se somete a un proceso de salazón y de curado-maduración, suficiente para conferirle las características organolépticas propias y de estabilidad a temperatura ambiente (Real Decreto nº 474/2014). Este producto se incluye dentro de la categoría de alimentos Listos Para el Consumo (LPC) definidos como “Alimentos destinados por el productor o fabricante al consumo humano directo sin necesidad de cocinado u otro tipo de transformación eficaz para eliminar o reducir a un nivel aceptable los microorganismos peligrosos” (Reglamento CE Nº 2073/2005).

Los alimentos LPC han sido responsables de casos y brotes de toxiinfecciones alimentarias, siendo *L. monocytogenes* uno de los principales patógenos implicados. La presencia de este microorganismo en la industria cárnica provoca elevadas pérdidas económicas y supone una importante barrera comercial para la exportación de alimentos. Este hecho es de especial consideración en países como Estados Unidos, donde está instaurada la política de “tolerancia cero”, exigiendo ausencia del patógeno en 25 g de alimento, así como un control exhaustivo de las superficies relacionadas con el procesado.

Para incrementar la seguridad de los productos que llegan al consumidor, y mejorar la competitividad de las empresas en mercados nacionales e internacionales, las industrias cárnicas necesitan herramientas que permitan un control rápido y eficaz del patógeno, tanto en alimentos como en el ambiente de las salas de procesado.

2. *Listeria monocytogenes*

L. monocytogenes es una bacteria patógena, principalmente de transmisión alimentaria y de gran importancia en salud pública y en la industria alimentaria. Es el agente causal de la listeriosis humana, una enfermedad grave que afecta a determinados grupos de riesgo con una elevada letalidad entre los individuos enfermos.

2.1. Taxonomía

La especie *L. monocytogenes* fue descrita por primera vez en 1926 como el agente causal de un brote epizootico de listeriosis en conejos y cerdos de guinea. Fue diagnosticada en un laboratorio de Cambridge, denominándola *Bacterium monocytogenes* (Murray, Webb, & Swann, 1926). Posteriormente, se detectó un brote de similares características en jerbos sudafricanos en las que al microorganismo aislado se le denominó como *Listerella hepatolytica*. Más tarde, se determinó que ambos brotes estuvieron causados por el mismo microorganismo.

En 1929, la bacteria fue aislada por primera vez de la sangre de una persona enferma con sintomatología similar a la mononucleosis y en 1940 se pasó a denominar *Listeria monocytogenes* (Pirie, 1940). Pero no fue hasta 1980, cuando esta denominación apareció en la “*Approved List of Bacterial Names*” publicada en el *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* (Skerman, McGowan, & Sneath, 1980). En 1981 se consideró este patógeno como un grave problema de salud pública, a raíz de la aparición de un brote de listeriosis por consumo de ensalada de coles en Canadá, que afectó a 41 personas produciendo 18 muertes (Swaminathan & Gerner-Smidt, 2007).

El Genero *Listeria* está relacionado genéticamente con *Clostridium*, *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Lactobacillus* y *Brochotrix*. *Listeria* pertenece a la clase Bacilli, orden Bacillales y Familia Listeriaceae. Actualmente, el Genero está compuesto por 18 especies diferentes (Tabla 1) (Integrated Taxonomic Information System (ITIS), 2018; Leibniz Institute DSMZ-German Collection of Microorganisms and Cell Cultures, 2017).

De todas las especies, sólo *L. monocytogenes* es patógena para el hombre y animales, siendo el agente causal del 99,9 % de los casos de listeriosis humana (Buchanan, Gorris, Hayman, Jackson, & Whiting, 2017; Guillet et al., 2010; Orsi, Bakker, & Wiedmann, 2011). La especie *L. ivanovii* es patógena únicamente para animales (Liu, 2006).

Tabla 1. Especies pertenecientes al G^o *Listeria* (ITIS, 2018; Leibniz Institute DSMZ-German Collection of Microorganisms and Cell Cultures, 2017).

Especie	Referencia
<i>Listeria aquatica</i>	(den Bakker et al., 2014)
<i>Listeria booriae</i>	(Weller, Andrus, Wiedmann, & den Bakker, 2015)
<i>Listeria cornellensis</i>	(den Bakker et al., 2014)
<i>Listeria fleischmannii</i>	(Bertsch et al., 2013)
<i>Listeria floridensis</i>	(den Bakker et al., 2014)
<i>Listeria grandensis</i>	(den Bakker et al., 2014)
<i>Listeria grayi</i>	(Skerman et al., 1980)
<i>Listeria innocua</i>	(Krieg, & Holt, 1984)
<i>Listeria ivanovii</i>	(Seeliger, Rocourt, Schrettenbrunner, Grimont, & Jones, 1984)
<i>Listeria rocourtiae</i>	(Leclercq et al., 2010)
<i>Listeria marthii</i>	(Graves et al., 2010)
<i>Listeria monocytogenes</i>	(Skerman et al., 1980)
<i>Listeria newyorkensis</i>	(Weller et al., 2015)
<i>Listeria riparia</i>	(den Bakker et al., 2014)
<i>Listeria seeligeri</i>	(Rocourt & Grimont, 1983)
<i>Listeria welshimeri</i>	(Rocourt & Grimont, 1983)
<i>Listeria weihenstephanensis</i>	(Halter, Neuhaus, & Scherer, 2013)
<i>Listeria welshimeri</i>	(Rocourt & Grimont, 1983)

El análisis filogenético de las especies de *Listeria*, sugieren la existencia de un grupo antecesor que contenía las especies *L. monocytogenes* y *L. innocua*, mientras que *L. seeligeri*, *L. ivanovii* y *L. welshimeri* pertenecían a otro grupo diferente (Graves et al., 2010).

2.2. Características generales y condiciones de supervivencia

L. monocytogenes es un bacilo corto, regular, con un tamaño de 0,4-0,5 X 1-2 μm , con lados paralelos y extremos redondeados. Generalmente, esta bacteria se encuentra sola o formando cadenas cortas (Ray & Bhunia, 2008).

Es un microorganismo Gram-positivo aero-anaerobio facultativo y no esporulado. Presenta entre uno y cinco flagelos peritricos que le confieren movilidad de tipo “barrilete” cuando se cultiva a temperaturas de entre 20-28°C, en la que la expresión de los flagelos es máxima.

En cuanto a la estructura celular, este patógeno no es encapsulado. Sin embargo, posee una pared celular formada principalmente por multicapas de peptidoglicanos entrecruzados entre sí y, unidos a su vez a ácidos teicoicos y lipoteicoicos (Ray & Bhunia, 2008).

En relación a sus características bioquímicas, *L. monocytogenes* es catalasa positivo, oxidasa negativo, rojo metilo positivo, Voges-Proskauer positivo e indol negativo. Posee un catabolismo

anaeróbico homofermentativo de la glucosa que resulta en producción de ácido láctico, ácido acético y otros productos finales, pero sin formación de gas. Es capaz de producir ácidos a partir de los azúcares: L-ramnosa, α -metil-D-manósido, trealosa, lactosa, amigdalina, celobiosa, fructosa, manosa y salicina. Por el contrario, no es capaz de utilizar carbohidratos como el manitol, ribosa o D-xilosa (McLauchlin & Rees, 2015). No utiliza el citrato exógeno ni hidroliza la urea, pero si hidroliza la esculina presente en el medio. Este microorganismo es hemolítico y posee actividad β -hemolítica cuando se cultiva en agar sangre de oveja o caballo. Basado en esta característica, el test de CAMP (Crisitie, Atkinson, Munch, Peterson) permite diferenciar las especies *L. monocytogenes* y *L. ivanovii*, dando *L. monocytogenes* un resultado positivo (Ray & Bhunia, 2008).

L. monocytogenes es un microorganismo psicrótrofo, pudiendo crecer en temperaturas de refrigeración. Además tiene capacidad para multiplicarse en un amplio rango de temperaturas (0-45°C), siendo la óptima de 30-37°C (Gandhi & Chikindas, 2007; Ray & Bhunia, 2008). Asimismo, es capaz de sobrevivir a temperaturas de congelación en alimentos como carne, lácteos, vegetales y pescado, llegando incluso a sobrevivir seis meses a una temperatura de -18°C en helados (Flessa, Lusk, & Harris, 2005; Mastronicolis et al., 2011). Sin embargo, es un microorganismo sensible a los tratamientos térmicos, como puede ser la pasteurización (71,1°C/15 s o 62,8°C/30 s) (Ray & Bhunia, 2008).

Este microorganismo es capaz de multiplicarse en un amplio rango de pH (4,4 a 9,4), siendo el óptimo de crecimiento 7,0. El pH mínimo de crecimiento de una bacteria está en función de la temperatura de incubación, composición general de nutrientes del sustrato de crecimiento, actividad de agua (a_w), y, presencia y cantidad de NaCl y otras sales o inhibidores (Jay, Loessner, & Golden, 2005). En el caso de *L. monocytogenes*, se ha observado que puede sobrevivir en medios con valores de pH de hasta 4,3 (Renier, Hébraud, & Desvaux, 2011).

L. monocytogenes presenta un crecimiento óptimo con valores de $a_w \geq 0,97$, aunque es capaz de multiplicarse en entornos con a_w 0,92 y sobrevivir en medios con una a_w tan baja como 0,79. Se ha demostrado su supervivencia en productos cárnicos fermentados curados como el salami, en el que sobrevivió durante 12 semanas a 5°C con una a_w de 0,79 a 0,86 (Magalhaes, Mena, Ferreira, Silva, Almeida & Gibbs, 2014; Montville & Matthews, 2008).

Este microorganismo patógeno crece de manera rápida en medios con moderadas concentraciones de sal (6,5 %), e incluso se ha observado crecimiento con concentraciones de 10 a 15 %. Esta capacidad para sobrevivir durante largos periodos de tiempo en presencia de altas concentraciones de sal, dificulta su control en alimentos con estas características (Gandhi

& Chikindas, 2007; Montville & Matthews, 2008). Asimismo, los ácidos orgánicos como el acético, cítrico y láctico en concentraciones del 0,1 %, pueden inhibir el crecimiento del patógeno (Montville & Matthews, 2008). Por otro lado, se ha observado que los nitratos y nitritos, utilizados como agentes de conservación en productos cárnicos, tienen un poder bactericida y/o bacteriostático sobre *L. monocytogenes*, dependiendo de la concentración a la que se utilicen (Christieans, Picgirard, Parafita, Lebert, & Gregori, 2018; Reynolds, Harrison, Rose-Morrow, & Lyon, 2001).

2.3. Serotipos, linajes y clones epidémicos

El serotipado de *L. monocytogenes* se basa en el análisis de los antígenos somáticos (O) y flagelares (H), dando lugar a 13 serotipos diferentes: 1/2a, 1/2b, 1/2c, 3a, 3b, 3c, 4a, 4b, 4c, 4d, 4e, 4ab y 7 (Seeliger & Höhne, 1979).

El 95 % de los aislados de *L. monocytogenes* procedentes de alimentos y personas enfermas pertenecen a los serotipos 1/2a, 1/2b, 1/2c y 4b (Yin et al., 2015). Los serotipos 1/2a y 1/2b han estado más relacionados con casos de listeriosis humana en Europa (Lukinmaa, Miettinen, Nakari, Korkeala, & Siitonen, 2003; Parihar et al., 2008), mientras que, el serotipo 4b ha tenido mayor presencia en Estados Unidos y Canadá (Jeffers et al., 2001). La asociación del serotipo 1/2c con brotes es baja en comparación a los serotipos 1/2a, 1/2b y 4b, no guardando relación con áreas geográficas (Yin et al., 2015).

Estudios filogenéticos y de sub-tipificación, han mostrado que los aislados de *L. monocytogenes* forman una población estructurada, compuesta por linajes divergentes divergentes (Den Bakker, Didelot, Fortes, Nightingale, & Wiedmann, 2008; Liu, 2006; Orsi, Sun, & Wiedmann, 2008; Ragon et al., 2008; Roberts et al., 2006; Ward, Ducey, Usgaard, Dunn, & Bielawski, 2008; Ward et al., 2004). Hasta el momento se han descrito cuatro linajes para dicha especie, denominados I, II, III y IV. La mayoría de aislados del patógeno se encuentran dentro de los linajes I y II, identificados por primera vez por Piffaretti et al. (1989) mientras que en los linajes III y IV, se engloban aislados de serotipos raramente encontrados en alimentos o en humanos (Rasmussen, Skouboe, Dons, Rossen, & Olsen, 1995; Roberts et al., 2006; Ward et al., 2008).

En el linaje I se encuentran los aislados pertenecientes a los serotipos 1/2b, 3b, 3c, 4b, 4d y 4e, que presentan una baja diversidad genética dentro del linaje y bajos niveles de recombinación. El origen de estos aislados es muy diverso, incluyendo el humano, animales, alimentos y ambiente. Los aislados del serotipo 4b de este linaje han sido los responsables de la mayoría de brotes de listeriosis y casos esporádicos de la enfermedad (Cheng, Siletzky, & Kathariou, 2008;

Lomonaco et al., 2015). Si bien, el serotipo 1/2b también ha sido identificado, aunque en menor proporción (Orsi et al., 2011).

El linaje II está formado por aislados de los serotipos 1/2a, 1/2c y 3a. En este caso la diversidad genética es muy elevada, así como los niveles de recombinación entre los aislados. Principalmente el origen de los aislados son alimentos, entornos relacionados con el procesado de los mismos y el medio ambiente. Este linaje guarda menor relación con casos descritos de listeriosis, siendo el serotipo 1/2a el más frecuentemente implicado (Lukinmaa et al., 2003; Orsi et al., 2011).

Los linajes III y IV los conforman aislados de los serotipos 4a, 4b y 4c, que son detectados con menor frecuencia y presentan una gran diversidad genética. Están frecuentemente asociados a rumiantes (Chen, Cheng, Lv, & Fang, 2013; Kathariou, 2002; Nightingale et al., 2005; Ward, Usgaard, & Evans, 2010).

En base a estudios epidemiológicos, un bajo número de clones de *L. monocytogenes*, con una relación genética muy estrecha, han sido los agentes causales de numerosos brotes de listeriosis a nivel mundial en los últimos 30 años. A éstos se les denomina clones epidémicos (ECs) y, se definen como un grupo de aislados del patógeno, genéticamente relacionados (presumiblemente con un ancestro común) que han estado involucrados en brotes diferentes, geográfica y temporalmente no relacionados (Chen, Zhang, & Knabel, 2007; Cheng et al., 2008; Kathariou, 2002; Knabel et al., 2012). Hasta la actualidad se han identificado cinco ECs, tres de ellos pertenecientes al serotipo 4b (ECI, ECII y ECIV) y dos al 1/2a (ECIII y ECIV), aislándose repetidamente en diferentes lugares del mundo (Chen et al., 2007; Kathariou, 2002; Lomonaco, Knabel, Dalmaso, Civera, & Bottero, 2011; Mammina et al., 2013; Neves, Lourenço, Silva, Coutinho, & Brito, 2008).

2.4. Factores de virulencia

L. monocytogenes posee numerosos factores de virulencia que son los responsables de su entrada, multiplicación y diseminación en las células del hospedador (Tabla 2). Los genes que codifican algunos de los factores de virulencia claves para el parasitismo intracelular de *L. monocytogenes*, forman un *cluster* de 9,6 kb denominado “*Listeria Pathogenic Island 1*” o *LPI-1*. Este *cluster* está formado por los genes que codifican la fosfatidil-inositol fosfolipasa C, listeriolisina O, metaloproteasas, proteína polimerizante de actina y fosfatidil-colina fosfolipasa C. El gen *hly* se encuentra en este cluster, codificando listeriolisina O (Liu, 2008a; Vázquez-Boland et al., 2001).

Tabla 2. Principales factores de virulencia de *L. monocytogenes* y sus funciones (de las Heras, Cain, Bielecka, & Vázquez-Boland, 2011; Liu, 2008a; Ray & Bhunia, 2008; Vázquez-Boland et al., 2001).

Factor de virulencia	Funciones
Hidrolasa de Sales biliares (BSH)	Supervivencia en el intestino
Factor regulador de proteínas (PrfA)	Regulación de la expresión de las proteínas de virulencia
Proteína de adhesión de Listeria (LAP)	Adhesión a las células epiteliales intestinales
Internalina A (InIA)	Permite la entrada a las células epiteliales intestinales y placentarias
Internalina B (InIB)	Permite la entrada a los hepatocitos en la fase hepática de la infección
Proteína de invasión de virulencia (Vip)	Invasión de las células epiteliales
Listeriolisina O (LLO)	Lisis de la membrana vacuolar que permite la salida de la bacteria al citosol. Hemólisis de los glóbulos rojos
Fosfatidilinositol fosfolipasa C (PIPLC)	Lisis de la membrana vacuolar junto con la LLO
Proteína polimerizante de actina (ActA)	Nucleación de la cola de actina para el movimiento bacteriano dentro del citoplasma
Fosfatidilcolina fosfolipasa C (PCPLC)	Lisis de los fagosomas secundarios que permite la dispersión de la bacteria de célula a célula
Metaloproteasas (Mpl)	Necesarias para la acción de la PlcA en la lisis de la membrana vacuolar

El factor regulador de proteínas PrfA (codificado por el gen *prfA*) junto con el factor de regulación del estrés σ_B , son los encargados de regular la expresión de los genes que codifican estas proteínas de forma coordinada durante la infección celular. Asimismo, evitan la expresión innecesaria de estos genes cuando el microorganismo se encuentra en el ambiente, alimentos, etc. (de las Heras et al., 2011; Liu, 2008a). Así pues, la disponibilidad de fuentes de carbono, la temperatura, sales, sales biliares, ambientes ácidos o anaerobios pueden influir en la expresión de los genes virulencia y por lo tanto, afectar a la severidad de la infección en el hospedador (Ray & Bhunia, 2008).

2.5. Patogénesis

La principal vía de transmisión de listeriosis es el consumo de alimentos contaminados con *L. monocytogenes*, por lo que el tracto gastrointestinal es la principal puerta de entrada del patógeno al hospedador. Otras posibles rutas de infección incluyen la transmisión cutánea, ocular o transmisión vertical transplacentaria. Ésta última se produce tras una infección primaria en la madre tras el consumo de alimentos contaminados.

En la transmisión alimentaria, tras la ingestión, la bacteria pasa por el estómago y llega al intestino delgado. La supervivencia del patógeno en los órganos es gracias a la enzima glutamato descarboxilasa y la enzima hidrolasa de sales biliares.

Se han descrito dos mecanismos por lo que *L. monocytogenes* puede entrar en el hospedador a través de la mucosa intestinal. El primero, se basa en una invasión directa de los enterocitos que recubren el epitelio de absorción de las microvellosidades, mediante interacciones específicas ligando-receptor. Solo se produce en hospedadores (humanos, cerdos de guinea, rumiantes, etc) que presenten los receptores específicos de las proteínas de adhesión de *L. monocytogenes* (proteína de adhesión de listeria, proteína de adhesión a la fibronectina y la amidasa). Posteriormente, penetra en la célula mediante la internalina A y la proteína de invasión de virulencia, donde es atrapada por una vacuola celular. El otro mecanismo de entrada es inespecífico, ya que el patógeno penetra en la célula mediante fagocitosis por las células M de las placas de Peyer.

Independientemente del mecanismo utilizado, el microorganismo comienza su ciclo intracelular en los macrófagos y las células presentadoras de antígenos de las placas de Peyer. Dentro de la vacuola, la bacteria produce listeriolisina O y fosfatidilinositol fosfolipasa C, que forman poros en la membrana vacuolar, rompiéndola y liberándose al citoplasma, donde se multiplica. De forma paralela, induce la expresión de la proteína de polimerización de la actina, que, a través de la activación del complejo celular Arp 2/3, induce la nucleación de filamentos de actina en la célula del huésped. La formación de una cola de actina polar, y la polimerización continua de la F-actina, da lugar a un movimiento de propulsión que permite el desplazamiento de las bacterias a través del citoplasma. Éstas alcanzan la membrana plasmática e induce la formación de pseudopodos que invaden la célula vecina.

En esta nueva célula invadida, las bacterias se encuentran atrapadas en el citoplasma dentro de una doble membrana. *L. monocytogenes* produce listeriolisina O y fosfatidilcolina fosfolipasa C, que rompen la doble membrana y se liberan al citoplasma de la nueva célula, donde inician un nuevo ciclo de replicación y motilidad basada en la actina. Este mecanismo de invasión directa célula a célula permite que las bacterias se propaguen a través de los tejidos del huésped sin salir del compartimento citosólico de las células. En la Figura 1 se muestra el ciclo intracelular e invasión célula a célula de *L. monocytogenes*.

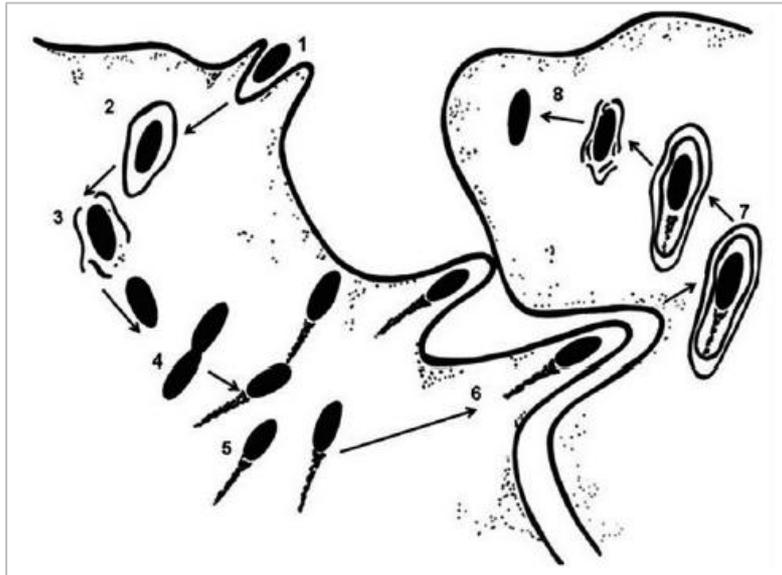


Figura 1. Esquema del ciclo intracelular e invasión célula a célula de *L. monocytogenes*. 1: Entrada de *L. monocytogenes* a la célula. 2: Formación de la vacuola. 3: Ruptura de la vacuola y liberación al citoplasma. 4: Multiplicación bacteriana. 5: Formación de colas de actina y movimiento. 6: Invasión de la célula vecina. 7: Supervivencia en el fagosoma secundario. 8: Ruptura de la membrana, liberación del microorganismo y comienzo de un nuevo ciclo celular (Modificado del publicado por Vera, González, Domínguez, & Bello, 2013).

Tras la replicación en las placas de Peyer, pasa a la lámina propia del tejido folicular subepitelial, donde continúa multiplicándose produciendo focos inflamatorios piogranulomatosos. Se considera que este momento podría ser crucial para obtener una respuesta inmunitaria protectora frente al patógeno.

Posteriormente, *L. monocytogenes* se traslada de los nódulos linfáticos mesentéricos al bazo e hígado (órganos diana primarios) vía hemolinfática. Según lo observado en modelos de infección en animales, este evento ocurre en las primeras 24 h tras la ingestión del patógeno. En esta fase, el microorganismo se introduce y replica en los hepatocitos, considerándose el principal sitio de multiplicación después del epitelio intestinal. En el hígado van a apareciendo pequeños focos de infección, probablemente producidos por la diseminación del patógeno célula a célula. Estos focos son rodeados inmediatamente por neutrófilos y macrófagos, dando lugar a lesiones piogranulomatosas.

En un individuo inmunocompetente, los piogranulomatosis en los órganos primarios son contenidos de manera eficiente por los linfocitos T citotóxicos (CD8+), dando lugar a una completa eliminación de los mismos pasados 6-7 días de la infección. Generalmente, estas etapas iniciales de la infección por *L. monocytogenes* son subclínicas. Dada la elevada prevalencia del patógeno en los alimentos, estas infecciones subclínicas podrían ocurrir de forma regular. Esto podría contribuir a generar una inmunidad antilisteria en individuos sanos y

por ello, se evidencia una baja incidencia de la enfermedad en este grupo poblacional. Sin embargo, en individuos con un sistema inmune deficiente, los focos de infección primarios en hígado y bazo no son contenidos de manera eficiente dando lugar a una liberación de la bacteria al torrente sanguíneo. Si esta bacteriemia es lo suficientemente prolongada se produce una listeriosis clínica, en la que se puede producir septicemia o infecciones localizadas en el cerebro o placentofetales. A modo esquemático se muestra la fisiopatología de la infección por *L. monocytogenes* en la Figura 2.

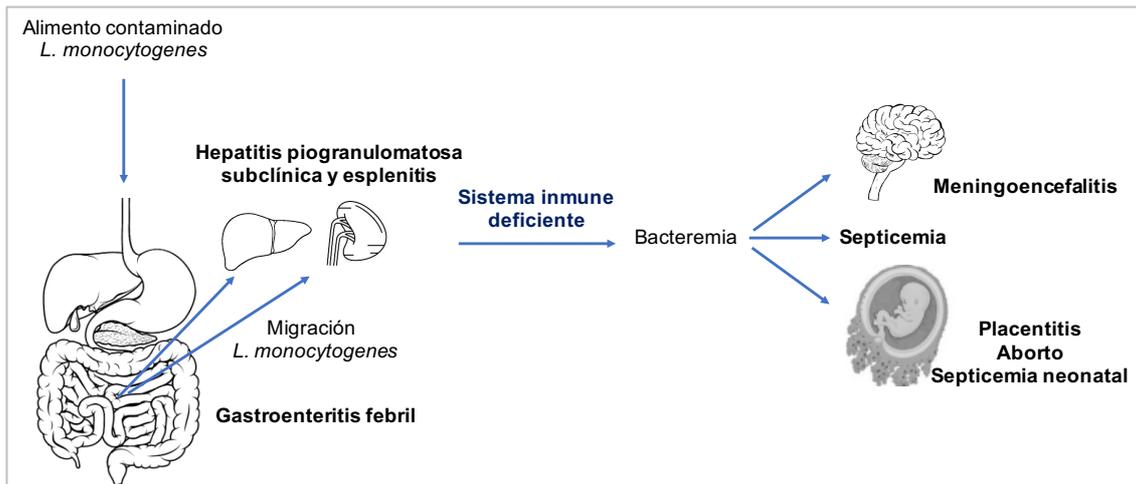


Figura 2. Esquema de la fisiopatología de la infección por *L. monocytogenes* (Modificado del publicado por Vázquez-Boland et al., 2001).

La prolongada fase inicial de la infección está relacionada con el largo periodo de incubación de la listeriosis clínica, que varía entre 20-30 días, después del consumo del alimento contaminado. En algunas ocasiones, este periodo ha llegado a prolongarse hasta 90 días, dificultando la investigación epidemiológica, y el conocimiento preciso de la dosis infectiva en humanos (Liu, 2008a; Ray & Bhunia, 2008).

Diversas referencias bibliográficas indican que la dosis infectiva puede ser de 10^8 - 10^{10} ufc para individuos inmunocompetentes y, entre 10^2 - 10^3 ufc/g para los grupos de riesgo (Liu, 2008a; Ray & Bhunia, 2008). En esa misma línea, Food and Drug Administration (FDA)/Center for Food Safety and Applied Nutrition (CFSAN) determinaron que no hay casos documentados de listeriosis en los que la dosis infectiva fuera inferior a 10^3 ufc/g (Food and Drug Administration/Center for Food Safety and Applied Nutrition, 2003). Los últimos datos aportados para la UE en el periodo 2008-2012 indicaron que la dosis infectiva del 92 % de las listeriosis invasivas fue de 10^5 ufc (2×10^3 ufc/g suponiendo una ración de 50 g de alimento) (Ricci et al., 2018).

Sin embargo, no es posible establecer una única dosis infectiva para *L. monocytogenes*, ya que la respuesta de la población a la exposición de un patógeno transmitido por los alimentos es

altamente variable. La incidencia de una enfermedad es dependiente de las interacciones entre el patógeno, alimento y hospedador, conformando lo que se conoce como triángulo epidemiológico (Food and Agriculture Organization (FAO)/World Health Organization (WHO), 2004). Según McLauchlin, Mitchell, Smerdon, & Jewell (2004), los factores más importantes que influyen en la listeriosis son la virulencia de la cepa, la matriz alimentaria y, la susceptibilidad y estado inmune del hospedador.

2.6. Tipos de listeriosis

La infección por *L. monocytogenes* en el hombre puede tener dos tipos de presentación:

- **Listeriosis no invasiva:** Esta forma se da en individuos sanos, en los que la gastroenteritis febril es la presentación clínica de infección por *L. monocytogenes*. Esta forma de la enfermedad puede manifestarse como brotes o casos esporádicos. Los síntomas incluyen diarreas, vómitos, náuseas, dolor muscular y fiebre. En niños se producen vómitos y fiebre, mientras que en adultos se presentan diarrea y dolor muscular. Generalmente, esta forma de la enfermedad se resuelve de manera favorable en unos pocos días sin necesidad de tratamiento.
- **Listeriosis invasiva:** En esta forma se producen síndromes clínicos sistémicos con una infección generalizada del organismo (sepsis y bacteriemia) o bien, infecciones localizadas en determinados órganos. En función de la edad o estado de gestación de los afectados, la listeriosis invasiva se presenta como:

Listeriosis en adultos no gestantes: Afecta a adultos mayores de 65 años y personas inmunocomprometidas (trasplantados, enfermos de cáncer, VIH, diabéticos, etc.). Se considera que más del 50 % de las listeriosis afectan a adultos mayores de 65 años. La bacteriemia es la manifestación más común de esta forma de la enfermedad. Sin embargo, *L. monocytogenes* posee tropismo por el SNC, por lo que el 30-55 % de los adultos afectados presentan meningitis.

Los síntomas suelen ser dolor de cabeza, rigidez en el cuello y fiebre. Como resultado de la bacteriemia, pueden aparecer focos de infección en diversos órganos produciendo endocarditis, conjuntivitis, coleocistitis, peritonitis, artritis séptica y abscesos esplénicos. La tasa de mortalidad es elevada y, los supervivientes, si ha existido afectación del SNC, suelen presentar secuelas de por vida. Concretamente, la mortalidad debido a la infección cerebral por *L. monocytogenes* se encuentra entre el 20 % y 60 % dependiendo de la severidad del proceso y la condición subyacente del paciente. Este microorganismo es el tercer agente implicado en

meningitis bacteriana en la población adulta después de *Streptococcus pneumoniae* y *Neisseria meningitidis*.

Listeriosis materno-fetal y neonatal: La bacteriemia es la manifestación clínica más común en mujeres embarazadas infectadas con *L. monocytogenes*. La listeriosis materno-fetal supone entre un 10-20 % del total de las listeriosis clínicas, y de ellas, el 30 % finaliza en aborto.

El microorganismo se distribuye por todo el organismo a través de la sangre y atraviesa la barrera placentaria, donde la respuesta inmune local está suprimida para evitar el rechazo del feto. El patógeno se multiplica en la placenta e invade el feto, produciendo abortos, nacimiento de fetos muertos o partos de bebés con graves síndromes septicémicos, la mayoría fatales. La ratio listeriosis materno-fetal-aborto es inversamente proporcional al mes de gestación en el que se produzca la infección. En la fase de bacteriemia, la madre experimenta síntomas leves como fiebre, dolor de cabeza o mialgia. Debido a la ausencia de síntomas específicos se cree que está sub-diagnosticada, sobre todo en mujeres que se encuentren en los primeros estadios del embarazo.

La listeriosis neonatal puede presentarse de dos formas: de inicio temprano y de inicio tardío. La primera se produce en recién nacidos que muestran síntomas entre el nacimiento y las primeras 48 h. La listeriosis es adquirida a través del útero vía transplacentaria, probablemente por aspiración de líquido amniótico contaminado. Las manifestaciones clínicas son severas produciéndose meningitis, septicemia o neumonía, con una mortalidad muy elevada. La listeriosis de inicio tardío aparece en recién nacidos pasadas 48 h del nacimiento. La infección se produce durante el nacimiento en el paso del bebé por el canal del parto o bien, es de tipo nosocomial. La manifestación clínica más común es la meningitis (94 %). La mortalidad de esta presentación de la enfermedad es del 10 %, pero los bebés suelen presentar secuelas neurológicas severas.

2.7. Epidemiología

La listeriosis humana es una enfermedad de gran importancia en salud pública, debido a su gravedad en determinados grupos de riesgo de la población, como son los ancianos, embarazadas, niños de corta edad y personas inmunocomprometidas (VIH, trasplantados, enfermos de cáncer etc.). Esta enfermedad presenta una baja incidencia en la población y puede tratarse de forma satisfactoria con antibióticos. Sin embargo, posee una elevada letalidad entre

los individuos enfermos con valores del 20-30 % (Lomonaco et al., 2015; Zunabovic, Domig, & Kneifel, 2011). *L. monocytogenes* es el agente causal del 99,9 % de las listeriosis humanas, si bien, unos pocos casos han sido producidos por las especies *L. ivanovii* y *L. seeligeri* (Guillet et al., 2010; Orsi et al., 2011; Rocourt, Schrettenbrunner, Hof, & Espaze, 1987). Como se ha mencionado anteriormente, la listeriosis es transmitida principalmente por el consumo de alimentos contaminados con *L. monocytogenes* (Mead et al., 1999; Swaminathan & Gerner-Smidt, 2007), siendo los alimentos LPC los principalmente implicados en los casos de listeriosis, tanto esporádicos como brotes. Esto se debe a que estos alimentos se conservan en refrigeración, tienen una relativamente larga vida útil, y se consumen sin ningún tipo de tratamiento listericida que permita la eliminación del patógeno (FAO/WHO, 2004).

Los datos reportados por la EFSA con respecto al año 2016, indican que la listeriosis es una de las enfermedades transmitidas por alimentos más graves que se encuentran bajo vigilancia en la UE. Además, presentó la mayor tasa de letalidad comparada con los otros agentes zoonóticos analizados en el informe (*Salmonella*, *Campylobacter*, *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* productor de Shiga-toxina (STEC), *Mycobacterium bovis*, *Brucella*, *Trichinella* y *Echinococcus*) (EFSA/ECDC, 2017).

Durante el año 2016, en la UE se han producido 2.536 casos de listeriosis, manteniendo una tendencia ascendente desde el año 2008. Las muertes causadas por esta enfermedad fueron 247, por lo que la letalidad de la enfermedad fue del 16,2 %. (EFSA/ECDC, 2017). La ratio de notificación en la UE se estableció en 0,47 casos/100.000 habitantes, lo que supone un incremento del 9,3 % con respecto al año 2015 (EFSA/ECDC, 2017). Los datos más recientes en España pertenecen al año 2015, donde se observó una relación de 0,99 casos/100.000 habitantes, ocupando el primer puesto de la UE en cuanto a ratio de notificaciones durante ese mismo año (EFSA/ECDC, 2016). En el periodo 2008-2016 se ha observado una tendencia estacional de la enfermedad, con picos en los meses de verano y una disminución durante el invierno. Asimismo, el grupo de edad más afectado fue el de mayores de 64 años, suponiendo el 61,4 % de los casos (EFSA/ECDC, 2017). La mayoría de los casos de listeriosis son esporádicos, y generalmente, el número de brotes notificado es bajo. Este hecho junto con el largo periodo de incubación de la enfermedad, dificulta establecer una relación entre el alimento causante y el paciente, así como la investigación epidemiológica de la enfermedad (Ricci et al., 2018).

Los costes económicos derivados de esta enfermedad son muy elevados. Por ejemplo, en EEUU, se ha estimado que suponen 2.600 millones de dólares de pérdidas en concepto de costes médicos, pérdida de productividad y pérdida de años de vida (Hoffmann, Batz, & Morris, 2012).

2.7.1. Brotes de listeriosis

Durante la década de 1920 a 1930 se observó que *L. monocytogenes*, además de afectar a animales, podía afectar al hombre. Sin embargo, no fue hasta el año 1981 cuando se consideró como un grave problema de salud pública, a raíz de la aparición de un brote de listeriosis por consumo de ensalada de coles en Canadá, que afectó a 41 personas produciendo 18 muertes (Swaminathan & Gerner-Smidt, 2007). A partir de ese momento, *L. monocytogenes* ha sido el agente causal de numerosos brotes a nivel mundial con una elevada letalidad. Generalmente, los brotes de listeriosis se han asociado a alimentos LPC, como productos lácteos (principalmente quesos), productos cárnicos (principalmente embutidos y salchichas) y, pescados y mariscos (Cartwright et al., 2013; Lomonaco et al., 2015; Swaminathan & Gerner-Smidt, 2007).

En Estados Unidos, entre 1998 y 2008 se describieron 24 brotes de listeriosis, que produjeron 359 casos, 215 hospitalizaciones y 38 muertes. De ellos, 11 estuvieron relacionados con carne y productos cárnicos (principalmente embutidos y salchichas tipo Frankfurt), seis con productos lácteos (quesos) y tres con ensaladas (Cartwright et al., 2013).

En la UE, durante el periodo de 2008 a 2012, se produjeron 37 brotes de listeriosis con 525 casos, 182 personas hospitalizadas y 37 muertes. De esos 37 brotes, 22 estuvieron asociados a alimentos LPC de origen animal (cuatro relacionados con quesos, siete con pescado y mariscos y, 11 con carne y productos cárnicos). El resto se asociaron a vegetales, frutas, ensaladas y otros productos LPC (sándwiches, pudding de arroz, comida de buffets) (Ricci et al., 2018). En el 2012 apareció un brote de listeriosis en España causado por el consumo de un queso fresco estilo latino, afectando a una mujer embarazada y un bebé recién nacido. La investigación epidemiológica determinó el consumo de este tipo de queso entre 1,5 y dos meses antes de la aparición de los síntomas (de Castro et al., 2012). Desde 2015, las autoridades sanitarias europeas se enfrentan a un brote de listeriosis, que ha afectado a varios países de la UE por el consumo de vegetales congelados contaminados de una industria de Hungría. Hasta la actualidad, este brote cuenta con 47 personas enfermas, de las que nueve han fallecido (EFSA/ECDC, 2018).

En los últimos años, se han producido brotes de la enfermedad ligados a alimentos que habían sido considerados de bajo riesgo. Desde el año 2010, Estados Unidos ha sufrido seis brotes relacionados con el consumo de helados y, frutas y hortalizas (apio, lechuga, melón cantaloupe, brotes, frutas de hueso y manzanas de caramelo), con 206 casos y 43 muertes (Buchanan et al., 2017).

En relación al lugar de exposición, predominan los brotes relacionados con la adquisición doméstica y hospitalaria. Las autoridades sanitarias muestran una especial preocupación ya que un número importante de brotes son de origen nosocomial donde la proporción de individuos susceptibles a la enfermedad es elevada (Silk, McCoy, Iwamoto, & Griffin, 2014).

Durante los años 1980-2000 el serotipo 4b estuvo implicado en la mayoría de brotes de listeriosis. Sin embargo, se ha observado un cambio en los últimos 10 años ya que el serotipo 1/2a ha sido el más frecuentemente relacionado con brotes de listeriosis en Europa y Norteamérica (Bille et al., 2006; Cartwright et al., 2013; Kathariou, 2002; Knabel et al., 2012; Lomonaco et al., 2013; Lyytikäinen et al., 2006; Parihar et al., 2008).

2.7.2 Factores de riesgo

Son varios los factores descritos en la literatura que afectan al riesgo de listeriosis. Dichos factores están relacionados con el microorganismo, la matriz alimentaria, y el hospedador (Tabla 3).

Tabla 3. Factores de riesgo asociados a la listeriosis (Liu, 2008a; Ricci et al., 2018; Ryser & Marth, 2007).

Incrementan el riesgo	Contaminación de las materias primas Contaminación cruzada Multiplicación durante la cadena alimentaria Concentración elevada del patógeno en el alimento Contaminación de instalaciones y equipos Cepas más virulentas Cepas adaptadas a la cadena alimentaria Incorrecto procesado y venta al por menor No adecuada conservación del alimento Tratamiento térmico insuficiente Consumo de alimentos de riesgo (listos para el consumo) Incremento de la susceptibilidad del hospedador: Edad (recién nacidos, niños, ancianos), embarazadas, inmunocomprometidos
Disminuyen el riesgo	Eliminación de <i>L. monocytogenes</i> de la cadena alimentaria y prevención de su multiplicación mediante el control de: <ul style="list-style-type: none"> - la temperatura de conservación - la vida útil - diseño de las instalaciones y equipos - higiene medioambiental - calidad de las materias primas Cepas menos virulentas o no patógenas Tipificación de cepas e identificación de las relacionadas con la contaminación o infecciones APPCC, control de los procesos, regulaciones, estándares de calidad y legislación alimentaria Educación de todos los agentes y consumidores implicados en la cadena alimentaria Estudio de casos clínicos Estudio de presencia del patógeno en alimentos Retirada de alimentos contaminados Aconsejar a los grupos de riesgo que deben evitar determinados alimentos Estado inmunitario competente

El *Codex Alimentarius* considera los alimentos LPC como los de mayor riesgo por los siguientes motivos (Codex Alimentarius, 2007):

- Frecuencia y cantidad de consumo del alimento: en los últimos años se han experimentado cambios en las tendencias de consumo de la población. Determinados factores demográficos, sociales y económicos han influenciado en los hábitos de vida de los consumidores. Actualmente, se demandan alimentos que sean de preparación rápida, fácil, y mínimamente procesados, por lo que se ha aumentado el consumo de alimentos LPC. A nivel mundial, durante los años 2016-2026 se prevee que el gasto estimado en este tipo de productos será de 195,3 billones de dólares, incrementando su consumo en un 7,3 % (Anónimo, 2013).
- Frecuencia y grado de contaminación del alimento con *L. monocytogenes*: el patógeno ha sido aislado frecuentemente de alimentos LPC tanto de origen animal (productos cárnicos, lácteos, pescados y mariscos) como vegetal (frutas y hortalizas) (Ray & Bhunia, 2008; Ricci et al., 2018). Sin embargo, el nivel de contaminación encontrado en ellos es muy bajo y raramente excede 100 ufc/g (EFSA/ECDC, 2016; EFSA/ECDC, 2017; Ricci et al., 2018; Roussel et al., 2012).
- Capacidad de multiplicación de *L. monocytogenes* en el alimento: este microorganismo puede multiplicarse y sobrevivir en condiciones adversas como son las bajas temperaturas, pH ácidos y altas concentraciones de NaCl (Carpentier & Cerf, 2011). Sin embargo, debido a la gran heterogeneidad de productos LPC disponibles, es necesario llevar a cabo estudios de vida útil que permitan, entre otras aportaciones, establecer si un alimento permite o no el crecimiento del microorganismo.
- La temperatura y tiempo del almacenamiento en refrigeración de los alimentos: generalmente, los alimentos LPC tienen una relativamente larga vida útil, la cual depende de las características del alimento. Si éstas permiten la multiplicación de *L. monocytogenes*, se puede alcanzar un nivel de contaminación que suponga un riesgo para el consumidor (Ray & Bhunia, 2008).

2.8. Fuentes de contaminación

L. monocytogenes es una bacteria ubicua, ampliamente distribuida en suelos, agua, aguas residuales, vegetación, materia fecal y ambientes relacionados con el procesamiento de alimentos (Henriques, Telo da Gama, & Fraqueza, 2014; McLaughlin, Casey, Cotter, Gahan, & Hill, 2011; Strawn et al., 2013). Se ha demostrado su presencia en granjas, así como en materias primas, suelos, agua, ensilado, etc. (Fox, Hunt, O'Brien, & Jordan, 2011). Este patógeno es un residente

transitorio del tracto intestinal de humanos siendo, aproximadamente, el 2-10 % de la población portadora asintomática de este microorganismo (Buchanan et al., 2017). La bacteria se encuentra de forma habitual en ambientes relacionados con el procesado de alimentos. Diversos autores han demostrado la alta capacidad del patógeno para la colonización, resistencia y persistencia en dichos ambientes en forma de biofilms, lo que facilita la contaminación del producto final a la vez que dificulta su control (Bolocan et al., 2016; D'Ostuni et al., 2016; Henriques et al., 2014; Ortiz, López-Alonso, Rodríguez, & Martínez-Suárez, 2016). Por otro lado, el microorganismo también está presente en entornos domésticos y establecimientos de venta al por menor (Evans & Redmond, 2014; Hoelzer, Pouillot, Dennis, Gallagher, & Kause, 2014). En estos últimos, su presencia es preocupante, ya que se considera que el 83 % de las listeriosis en Estados Unidos tienen como origen el consumo de alimentos procedentes de este tipo de establecimientos (Cartwright et al., 2013).

2.8.1 Biofilms

Una de las estrategias que posee *L. monocytogenes* para su resistencia y/o persistencia es la formación de matrices tridimensionales de sustancias poliméricas extracelulares denominadas biofilms (Carpentier & Cerf, 2011). El patógeno es capaz de formar una comunidad madura en el biofilm en 24 h, lo que dificulta su eliminación del entorno de procesado mediante las operaciones de limpieza y desinfección (Carpentier & Cerf, 2011; Ferreira et al., 2011).

Se ha demostrado que *L. monocytogenes* es capaz de unirse y formar biofilms en una gran variedad de superficies como acero inoxidable, polímeros de plásticos, gomas y cristal (Bonsaglia et al., 2014; Carpentier & Cerf, 2011). Esta capacidad depende de diferentes factores como son: la cepa, el tipo de superficie, la fase de crecimiento, la temperatura, el medio de crecimiento y la presencia de otros microorganismos (Bonsaglia et al., 2014; Borucki, Peppin, White, Loge, & Call, 2003; Chae & Schraft, 2000; Harvey, Keenan, & Gilmour, 2007; Koo, Ndahetuye, O'Bryan, Ricke, & Crandall, 2014).

Generalmente, la formación de biofilm se divide en cuatro etapas (Figura 3) (Srey, Jahid, & Ha, 2013):

1. **Adhesión reversible:** la célula se sitúa a una determinada distancia de la superficie (>50 nm) y comienza a interactuar con ella, mediante fuerzas de gravitación, electroestáticas y Van der Waals. En esta etapa tienen una gran importancia los apéndices extracelulares (flagelos y fimbrias).

2. **Adhesión irreversible:** la distancia entre la célula y las superficies es muy corta (<1,5 nm). Existe una fuerte interacción célula-superficie a través de las adhesinas de la superficie de los microorganismos, fijando las células al sustrato. De forma adicional, las células secretan a su alrededor polímeros extracelulares.
3. **Maduración del biofilm:** formación de microcolonias y aumento del volumen del biofilm.
4. **Dispersión celular:** migración de las células al ambiente como consecuencia del aumento de la densidad del biofilm.

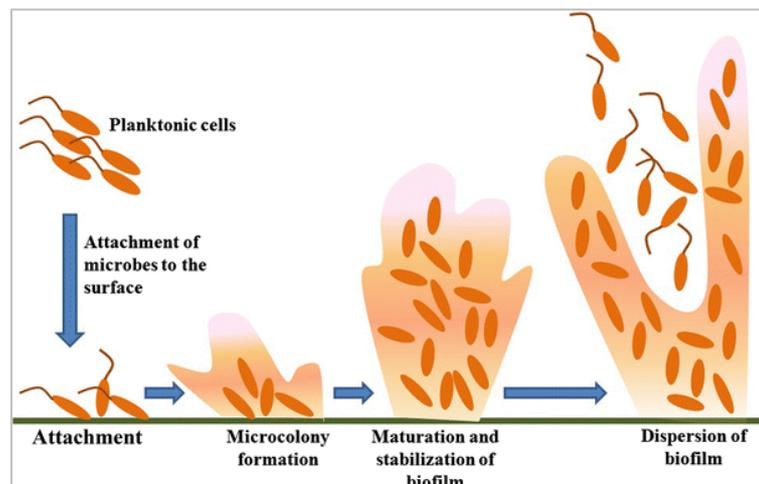


Figura 3. Etapas de la formación del biofilm (Gupta, Sarkar, Das, Bhattacharjee, & Tribedi, 2016)

La clave del éxito en la formación de biofilm radica en la comunicación célula-célula (Kolenbrander et al., 2002). Las bacterias coordinan sus actividades a través de señales químicas que son captadas por receptores propios de la bacteria y de las bacterias vecinas. La señal es amplificada y transmitida mediante sistemas de regulación, lo que causa la expresión de genes diana (Daniels, Vanderleyden, & Michiels, 2004; de Kievit, 2009). En el proceso de formación de biofilm por *L. monocytogenes* tienen una elevada importancia los flagelos, las proteínas asociadas al biofilm (BapL), las proteínas SecA2, la comunicación célula-célula y el DNA extracelular (Tabla 4) (Guilbaud, Piveteau, Desvaux, Brisse, & Briandet, 2015; Renier et al., 2014).

Tabla 4. Factores de la formación de biofilm de *L. monocytogenes* (Kocot & Olszewska, 2017).

Factor	Acción
Flagelos	Adherencia a la superficie
PfrA	Factor de virulencia y regulador de la síntesis de flagelos
LuxS	Inhibición de la formación de biofilm por conversión de la molécula de autoinductor Ai-2
agrA	Adherencia y regulación en las primeras etapas de la formación del biofilm
relA	Regulación de las respuestas de inanición
hpt	Regulación de las respuestas de inanición
SecA2	Inactivación de la promoción de agregación celular, impacto en la arquitectura del biofilm e induce la formación de biofilm
BapL	Proteína asociada al biofilm necesaria para la fijación de las células a la superficie

En comparación con las células planctónicas, las células embebidas en la matriz del biofilm presentan mayor resistencia a agentes antimicrobianos, luz UV, desecación y agentes de limpieza y desinfección (Jadhav, Shah, Bhave, & Palombo, 2013; Olszewska, Zhao, & Doyle, 2016; Ortiz, López, López, & Martínez-Suárez, 2014). Las condiciones encontradas por el patógeno en el biofilm permiten su supervivencia y multiplicación, pudiendo diseminarse a localizaciones adyacentes y ser un foco de recontaminación del alimento o de otras zonas del procesado.

2.9. Principales alimentos relacionados

L. monocytogenes se ha encontrado frecuentemente en alimentos crudos (carne, pescado, vegetales, leche etc.) y en alimentos procesados LPC, a los que puede llegar de las siguientes formas:

- A partir de la materia prima, puede permanecer en el producto final si el procesado no incluye un tratamiento térmico u otro tratamiento tecnológico de inactivación.
- Contaminación cruzada con superficies y el ambiente durante el procesado de los mismos. Se produce durante las etapas del procesado posteriores al tratamiento listericida como el loncheado, cortado, picado o envasado (Lambertz et al., 2012; Muhterem-Uyar et al., 2015; Myers, Montoya, Cannon, Dickson, & Sebranek, 2013; Prencipe et al., 2012).

En 2016, este patógeno fue detectado en el 2,1 % de los productos cárnicos LPC analizados en la UE, valor que se mantiene estable en los últimos años (EFSA/ECDC, 2016, 2017). La prevalencia encontrada en estos productos es variable, observando valores más elevados (35 %)

en embutidos cocidos, jamón cocido, salchicha tipo Frankfurt y paté (Johansson, 1998; Kerr, Rotowa, Hawkey, & Lacey, 1990; Little, Sagoo, Gillespie, Grant, & Mclauchlin, 2009; Uyttendaele et al., 2009).

Asimismo, *L. monocytogenes* se ha aislado de productos de la pesca LPC como pescados ahumados (en frío o en caliente), moluscos, surimi, pescados marinados, etc. Los últimos datos aportados por la UE muestran una prevalencia del 4,6 % en este tipo de alimentos, un valor significativamente más bajo que el observado en los últimos años en la UE (10,4 %) (EFSA/ECDC, 2017). En el estudio realizado por Beaufort et al. (2007) encontraron una prevalencia del 18 % de muestras de salmón ahumado. Valores superiores fueron los obtenidos por Mędrala et al. (2003), detectando *L. monocytogenes* en 27 de 44 muestras de salmón ahumado loncheado y envasado al vacío (61,4 %). En productos marinados también se han encontrado valores altos entre el 11 % y el 37 % (Jemmi, Pak, & Salman, 2002; Soutos et al., 2014).

Los productos lácteos LPC han sido asociados en numerosas ocasiones a brotes de listeriosis, principalmente quesos de pasta semi-blanda y blanda (Cartwright et al., 2013; Ricci et al., 2018). La prevalencia del patógeno en muestras de productos lácteos analizadas por la UE en 2016 fue de 0,7 % a 2,5 %. El valor superior correspondió a quesos de pasta blanda y semi-blanda hechos de leche no pasteurizada o con bajo tratamiento térmico (EFSA/ECDC, 2017). Estos valores coinciden con los observados por Busani et al. (2005) en 13858 muestras de quesos donde obtuvieron una prevalencia del 1 %. En otro producto lácteo como la mantequilla, *L. monocytogenes* fue detectada en el 26 % de las muestras (Verraes et al., 2015). Los helados han adquirido protagonismo en los últimos años debido a un brote de listeriosis en Estados Unidos entre 2010-2015. La prevalencia observada en este tipo de alimentos ha sido de 2-7 %, llegando en algunos estudios al 15 % (Art & Andre, 1991; Kiss, Tirczka, Szita, Bernáth, & Csikó, 2006; Matyar, Guzeldag, & Mercimek, 2010).

En alimentos vegetales LPC el patógeno suele tener una prevalencia baja, entorno al 1 % (Elmali, Oner, & Yaman, 2013; Francis & O'beirne, 2006; Johannessen, Loncarevic, & Kruse, 2002). Sin embargo, la presencia es mayor en determinados alimentos como puede ser la fruta precortada y envasada o las ensaladas, donde los valores encontrados para este alimento son superiores, siendo entre el 7 % y 30 % (Badosa, Trias, Parés, Pla, & Montesinos, 2008; García-Gimeno, Zurera-Cosano, & Amaro-López, 1996; Sireli & Gücükoglu, 2008).

De especial interés son también otros tipos de alimentos, cuyo consumo se ha elevado en los últimos años como sándwiches, ensaladas preparadas con carne o pescados, platos preparados o productos de pastelería con cremas (EFSA/ECDC, 2017). Los estudios realizados en

sándwiches, muestran una prevalencia entre el 3 % y 22 % (Gusman et al., 2014; Kotzekidou, 2013b, 2013a; Little, Barrett, Grant, & McLauchlin, 2008). Di Pinto, Novello, Montemurro, Bonerba, & Tantillo (2010) señalaron una elevada presencia en ensaladas preparadas con mayonesa (27 %), mientras que, en un estudio realizado en ensaladas con pescado el porcentaje se elevó al 36 % (Van Coillie, Werbrouck, Heyndrickx, Herman, & Rijpens, 2004).

2.10. Importancia de *L. monocytogenes* en la industria cárnica

Este microorganismo tiene además de un elevado impacto sanitario, una alta repercusión económica a nivel mundial. Concretamente, su presencia en la industria cárnica produce pérdidas millonarias debido a la retirada de productos, cierre y limpieza de las industrias tras la retirada del alimento, sanciones, dificultades para la comercialización de sus productos y pérdida de confianza del consumidor.

2.10.1. *L. monocytogenes* en productos cárnicos curado-madurados

En el proceso de elaboración de estos productos cárnicos (jamón curado, salchichón, chorizo etc.) en los que no hay tratamiento térmico, la estabilidad microbiológica del alimento se obtiene mediante el descenso del pH y/o a_w en la fase de fermentación y secado del producto (Hospital et al., 2017; Leistner, 2000).

El nivel de riesgo de listeriosis asociado a productos que hayan sufrido alguna manipulación como loncheado, cortado o envasado, depende de la concentración del patógeno, la temperatura de almacenamiento y el tiempo que transcurre entre la contaminación y el consumo. Por lo tanto, la presencia de *L. monocytogenes* en estos productos debería ser considerada e investigada (Simpson et al., 2008). En el caso del jamón curado, la pieza entera se considera un producto estable debido a las interacciones de factores intrínsecos como pH (5,5 aproximadamente), baja a_w (<0,90), elevado contenido en sal (NaCl >15 % de materia seca), así como la acción de los nitratos y nitritos (Food Safety and Inspection Service, 2005; Reynolds, Harrison, Rose-Morrow, & Lyon, 2001). Sin embargo, este alimento también puede ser comercializado loncheado y envasado, lo que conlleva una manipulación post-procesado. Estas acciones pueden dar lugar a contaminaciones cruzadas del alimento con superficies, que sirven como vector para la llegada de *L. monocytogenes*, suponiendo un riesgo para el consumidor (Henriques et al., 2014; Vorst, Todd, & Ryser, 2006). Mena et al. (2004) observaron una prevalencia del 2 % en jamón curado loncheado y envasado comercializado en Portugal, mientras que Gómez et al. (2015), en un estudio realizado en muestras de este producto, procedente de diferentes provincias españolas, presentaron valores más elevados (24,3 %), aunque los recuentos fueron inferiores a 100 ufc/g en la mayoría de ellas. Giovannini et al.

(2007) y Prencipe et al. (2012), detectaron la presencia de *L. monocytogenes* en el 2 y en el 4 % de las muestras de jamón de Parma loncheado y envasado, respectivamente.

2.10.2. *L. monocytogenes* en el ambiente del procesado de la industria cárnica

La presencia de *L. monocytogenes* es habitual en entornos de procesado de productos cárnicos debido a su carácter ubicuitario, capacidad de supervivencia en el ambiente (formación de biofilms), adquisición de resistencias a agentes antimicrobianos como desinfectantes, y mecanismos de resistencia al estrés (Fox, Leonard, & Jordan, 2011; Nakamura, Takakura, Sone, Itano, & Nishikawa, 2013).

El ingreso de *L. monocytogenes* en las instalaciones de la industria se puede producir a través de la materia prima contaminada, ropa y zapatos de los trabajadores o vehículos de transporte (Bolocan et al., 2016; Liu, 2008a; Montville & Matthews, 2008). Bolocan et al. (2016) demostraron la alta capacidad de colonización de *L. monocytogenes* en una industria cárnica antes y después de iniciar su actividad por primera vez. La bacteria fue detectada, a los 144 días del inicio de la actividad en el 38 % de las superficies muestreadas, tanto superficies en contacto como no en contacto con alimentos.

La diseminación del patógeno en la industria se produce a través de vestuario contaminado, flujos de trabajo incorrectos, fallo en las barreras de higiene, corrientes de agua contaminada, etc. (Bolocan et al., 2016; Henriques et al., 2014; Montville & Matthews, 2008). La elevada humedad y la disponibilidad de nutrientes en los ambientes de procesado de alimentos promueven la multiplicación y el asentamiento de la bacteria (Montville & Matthews, 2008). *L. monocytogenes* ha sido frecuentemente aislada de drenajes, condensaciones de agua, suelos, residuos, cintas transportadoras, mesas de corte y equipos relacionados con el procesado de alimentos (Henriques et al., 2014; Montville & Matthews, 2008; Muhterem-Uyar et al., 2015).

Generalmente, se forman nichos bacterianos en lugares de difícil acceso a los agentes de limpieza y desinfección como juntas, interior de equipos, ranuras, condensadores, etc. Esto permite a la bacteria permanecer durante largos periodos de tiempo en los entornos de procesado de alimentos (Keto-Timonen, Tolvanen, Lundén, & Korkeala, 2007; Schmitz-Esser, Gram, & Wagner, 2015). Asimismo, se ha observado la transmisión del patógeno de su hábitat original (biofilms, agua o residuos orgánicos en el suelo) en el que no está en contacto directo con el alimento, a superficies que si lo están o, directamente al alimento durante el procesado (da Silva & De Martinis, 2013).

Durante los últimos años, se ha observado que ciertos subtipos moleculares de *L. monocytogenes* pueden persistir durante años en el ambiente de la industria. El concepto de

persistencia, más comúnmente aceptado, se refiere a una misma cepa aislada repetidamente (tres veces o más) en el ambiente o equipo durante un mínimo de 3 meses (Carpentier & Cerf, 2011; Keto-Timonen et al., 2007; Ortiz et al., 2010). De hecho, ciertas cepas persistentes han sido identificadas como las más frecuentemente implicadas en la recontaminación de productos LPC, así como su implicación en algunos brotes de listeriosis (Lyytikäinen et al., 2000; Nakari et al., 2014; Orsi, Borowsky, et al., 2008).

Así pues, la prevalencia del patógeno en una industria cárnica está íntimamente relacionada con factores como la insuficiente calidad de la materia prima, el mal diseño de superficies y equipos, limpieza y desinfección deficiente, malas prácticas de higiene así como la existencia de cepas persistentes (Bolocan et al., 2016; Carpentier & Cerf, 2011; Fox et al., 2011; Gómez, Ariño, Carramiñana, Rota, & Yangüela, 2012; Hoelzer et al., 2014; Muhterem-Uyar et al., 2015). Debido a esto, la presencia de *L. monocytogenes* en superficies del procesado de la industria cárnica es variable, con valores entre el 10-30 % hasta el 50 % de superficies positivas (Gómez et al., 2015; Henriques et al., 2014; Muhterem-Uyar et al., 2015). Por ello, es fundamental que el operador implante un programa de vigilancia para monitorizar y controlar las rutas de contaminación, limitando así el riesgo de *L. monocytogenes* en el producto final.

2.11. Criterios microbiológicos

El Reglamento (CE) Nº 2073/2005 (y posteriores modificaciones), relativo a los criterios microbiológicos aplicables a los productos alimenticios, establece los criterios microbiológicos para determinados microorganismos, así como las normas de aplicación, que deben cumplir los explotadores de empresas alimentarias al aplicar las medidas de higiene generales y específicas contempladas en el Reglamento (CE) Nº 852/2004 y Reglamento (CE) Nº 853/2004.

Para *L. monocytogenes* se establecen tres categorías de alimentos con diferentes criterios de seguridad alimentaria (Tabla 5):

1. Alimentos listos para el consumo destinados a lactantes, y alimentos LPC destinados para usos médicos especiales.
2. Alimentos listos para el consumo que pueden favorecer el desarrollo de *L. monocytogenes*, que no sean los destinados a los lactantes ni para usos médicos especiales.
3. Alimentos listos para el consumo que no pueden favorecer el desarrollo de *L. monocytogenes*, que no sean los destinados a los lactantes ni para usos médicos especiales. Se considera automáticamente que pertenecen a esta categoría los productos con $\text{pH} \leq 4,4$ o $a_w \leq 0,92$, productos con $\text{pH} \leq 5,0$ y $a_w \leq 0,94$, y los productos

con una vida útil inferior a 5 días. Otras categorías de productos también pueden pertenecer a esta categoría, siempre que se justifique científicamente.

Tabla 5. Criterios microbiológicos para *L. monocytogenes* en alimentos listos para el consumo (Reglamento CE Nº 2073/2005 modificado por Reglamento CE Nº 1441/2007).

Categoría de alimentos	Plan de muestreo		Límites	Método analítico	Fase en la que se aplica el criterio
	n	c			
1. Alimentos listos para el consumo destinados a los lactantes, y alimentos listos para el consumo destinados a usos médicos especiales.	10	0	Ausencia en 25 g	EN/ISO 11290-1	Productos comercializados durante su vida útil
2. Alimentos listos para el consumo que pueden favorecer el desarrollo de <i>L. monocytogenes</i> , que no sean los destinados a los lactantes ni para usos médicos especiales.	5	0	100 UFC/g ¹	EN/ISO 11290-2	Productos comercializados durante su vida útil
	5	0	Ausencia en 25 g ²	EN/ISO 11290-1	Antes de que el alimento haya dejado el control inmediato del explotador de la empresa alimentaria que lo ha producido
3. Alimentos listos para el consumo que no pueden favorecer el desarrollo de <i>L. monocytogenes</i> , que no sean los destinados a los lactantes ni para usos médicos especiales	5	0	100 ufc/g	EN/ISO 11290-2	Productos comercializados durante su vida útil

¹ El fabricante puede demostrar que el producto no superará el límite de 100 ufc/g durante su vida útil

² El fabricante no puede demostrar que el producto no superará el límite de 100 ufc/g durante su vida útil

En el caso de que los resultados sean insatisfactorios, la legislación establece que los explotadores de las empresas alimentarias deberán retirar o recuperar el producto o lote de los mismos. No obstante, los alimentos comercializados que todavía no se hallen a nivel de comercio al por menor podrán ser sometidos a una transformación posterior mediante un tratamiento que elimine el riesgo en cuestión. Dicho tratamiento sólo podrán realizarlo explotadores de empresas alimentarias que no sean vendedores al por menor.

El explotador de la empresa alimentaria podrá utilizar el lote para fines distintos a los previstos originalmente, siempre que este uso no plantee un riesgo para la salud pública o la salud animal. Dicho uso debe estar establecido dentro de los procedimientos basados en los principios APPCC y en las prácticas correctas de higiene, estando siempre permitido por la autoridad competente. Asimismo, el explotador tomará medidas para detectar la causa de los resultados insatisfactorios, con el fin de corregir la causa. Dichas medidas podrán incluir modificaciones de los procedimientos basados en los principios de APPCC u otras medidas de control de la higiene de los productos alimentarios.

Además, el Reglamento (CE) Nº 2073/2005 establece que los explotadores de las empresas alimentarias que produzcan alimentos LPC susceptibles de plantear un riesgo de *L. monocytogenes* para la salud pública, deberán tomar siempre muestras de las zonas y el equipo de producción como parte de su plan de muestreo, con el fin de detectar la posible presencia de dicha bacteria. Este proceso de toma de muestras debe realizarse siguiendo el método de referencia ISO 18593. Si bien, esta normativa legal no especifica el momento de la toma de muestra o las áreas a analizar. Por ello, el Laboratorio Europeo de Referencia de *L. monocytogenes* (EURL Lm) ha publicado una guía en la que se establecen directrices específicas para llevar a cabo el muestreo de superficies, y así aumentar la probabilidad de detección del patógeno (Carpentier & Barre, 2012). Asimismo, la Agencia Española de Consumo, Seguridad alimentaria y Nutrición (AECOSAN) ha elaborado un documento en que se establecen las directrices para el muestro oficial de las zonas de producción de empresas alimentarias que produzcan alimentos LPC susceptibles de plantear un riesgo de *L. monocytogenes*. En este documento se establece el criterio de aceptabilidad (ausencia de *L. monocytogenes*/superficie), así como las actuaciones que deben realizarse en caso de encontrar la presencia del patógeno (Agencia Española de Consumo, Seguridad alimentaria y Nutrición (AECOSAN), 2015).

Las industrias alimentarias que tengan como objetivo exportar sus productos a terceros países deben de cumplir con los criterios establecidos para *L. monocytogenes* en su legislación. En Estados Unidos la normativa es más estricta, exigiendo ausencia del patógeno en cualquier categoría de alimento LPC, así como en las superficies del procesado. Se considera que un alimento LPC no es apto para el consumo si se detecta *L. monocytogenes* en el producto o en una superficie que esté en contacto directo con el alimento. Asimismo, consideran la presencia de *Listeria* spp. como indicador de contaminación con *L. monocytogenes*, ya que comparten el nicho ecológico. Por lo que, si se detecta *Listeria* spp. en el alimento, se puede considerar no apto para el consumo si se detectan condiciones higiénicas del procesado deficientes (Code of Federal Regulations, 2015; FSIS, 2014; 2017).

En Australia, Nueva Zelanda y Canadá la legislación es similar a la aplicada en la UE, con distinción de categorías de productos en función de si el alimento permite o no la multiplicación del microorganismo (Tablas 6 y 7).

Tabla 6. Criterios microbiológicos para *L. monocytogenes* en alimentos listos para el consumo aplicables en Australia y Nueva Zelanda (The Australian and New Zealand food standards system, 2014).

Categoría de alimentos	Nº de muestras	Límites	Fase en la que se aplica el criterio
Alimentos listos para el consumo que pueden favorecer el desarrollo de <i>L. monocytogenes</i>	5 X 25 g	Ausencia en 25 g	Productos comercializados durante su vida útil
Alimentos listos para el consumo que no pueden favorecer el desarrollo de <i>L. monocytogenes</i> ¹	5	100 ufc/g	Productos comercializados durante su vida útil

¹ Alimentos con las siguientes características: pH < 4.4; a_w < 0.92; pH < 5.0 y a_w < 0.94; alimentos listos para el consumo con una vida útil ≤ 5 días; alimentos congelados; alimento en el que se haya demostrado que no hay un incremento > 0,5 log UFC *L. monocytogenes*/g a lo largo de su vida útil.

Tabla 7. Criterios microbiológicos para *L. monocytogenes* en alimentos listos para el consumo aplicables en Canadá (Health Canada, 2011).

Categoría de alimentos	Nº de muestras	Límites	Fase en la que se aplica el criterio
Categoría 1 Alimentos listos para el consumo que pueden favorecer el desarrollo de <i>L. monocytogenes</i>	5 X 25 g	Ausencia en 125 g	Productos comercializados durante su vida útil
Categoría 2A Alimentos listos para el consumo en los que se puede presentar un potencial limitado para el crecimiento de <i>L. monocytogenes</i> a niveles no superiores a 100 UFC/g a lo largo de la vida útil indicada y/o alimentos listos para el consumo con una vida útil ≤ 5 días	5 X 10 g	100 ufc/g	Productos comercializados durante su vida útil
Categoría 2B ¹ Alimentos listos para el consumo que no pueden favorecer el desarrollo de <i>L. monocytogenes</i>			

¹ Alimentos con las siguientes características: pH < 4.4; a_w < 0.92; pH < 5.0 y a_w < 0.94 y alimentos congelados.

En relación a las superficies, la legislación canadiense establece que para las tres categorías de alimentos LPC se debe incluir (Health Canada, 2011):

- La investigación de *Listeria* spp. en productos, en superficies y áreas de trabajo en contacto directo con el alimento.
- Las acciones correctoras ante la detección de positivos en superficies en contacto con alimentos.
- La verificación del producto ante la detección de *Listeria* spp. en superficies en contacto.

- Las pruebas de verificación en superficies que no están en contacto con los alimentos. En este caso, si se detecta *Listeria spp.*, debe de reforzarse el muestreo.

3. Métodos de detección y cuantificación de *L. monocytogenes*

Durante las últimas décadas, las autoridades sanitarias y las industrias alimentarias han utilizado diversos métodos de detección y recuento del patógeno en alimentos y superficies del procesado de los mismos. Las normativas en la UE y en otros países, como Estados Unidos, Canadá, Australia y Nueva Zelanda establecen la utilización de microbiología convencional.

En la UE, los métodos de referencia para la detección y cuantificación se basan en la normativa ISO 11290-1:2017 e ISO 11290-2:2017, respectivamente (Reglamento CE Nº 2073/2005, modificado por Reglamento CE Nº 1441/2007).

3.1. Método de referencia ISO 11290-1:2017

Este método de detección incluye cuatro etapas, en el que las dos primeras son enriquecimientos selectivos. El objetivo es lograr la total recuperación de las células viables presentes en la muestra para poder ser detectadas. Esta metodología ha sido diseñada para permitir la detección fiable de una única célula del patógeno presente en una muestra. Sin embargo, es larga y laboriosa, siendo necesarios entre cuatro y seis días para obtener un resultado confirmado. Las etapas del método de referencia son las siguientes:

1. **Enriquecimiento primario:** se utiliza el caldo Half Fraser, con agentes selectivos (cloruro de litio, ácido nalidíxico, acriflavina y citrato de amonio y hierro) a concentración reducida. Este paso permite la revivificación de células de *L. monocytogenes* dañadas para su posterior multiplicación, además de la dilución de los inhibidores presentes en la muestra (Dwivedi & Jaykus, 2011).
2. **Enriquecimiento secundario:** en este paso se usa el caldo Fraser con agentes selectivos a mayor concentración. Con este paso se consigue inhibir el crecimiento de la microbiota acompañante y favorecer la multiplicación del patógeno, para su posterior aislamiento o detección (Jasson, Jaxsens, Luning, Rajkovic, & Uyttendaele, 2010).
3. **Siembra en placa e identificación:** Los cultivos anteriores (etapas 1 y 2) se siembran en agar ALOA (Agar *Listeria* conforme Ottaviani y Agosti) y en un segundo medio selectivo para *Listeria*.
4. **Confirmación:** Se realizan subcultivos de las presuntas colonias de *L. monocytogenes* en agar TSAYE (Tryptone Soya Agar Yeast Extract). Posteriormente, se realizan las siguientes pruebas obligatorias: aspecto microscópico (sólo si el medio selectivo utilizado no

permite diferenciar entre *Listeria* spp. patógenas y no patógenas), β -hemólisis, L-ramnosa, D-xilosa, y opcionales: catalasa, movilidad a 25 °C, test de CAMP

La duración de este paso es variable en función de las pruebas realizadas.

3.2. Método de referencia ISO 11290-2:2017

En este método de recuento se realiza la dilución de la muestra y siembra en agar selectivo ALOA. Tras el recuento de las colonias presuntivas de *L. monocytogenes*, se lleva a cabo su confirmación, mediante las pruebas descritas en el método ISO 11290-1:2017.

Esta metodología es costosa y además, son varios los estudios que señalan que puede no tener una precisión y sensibilidad adecuada en alimentos con baja concentración del patógeno, por lo que podría no ser adecuado para para cuantificar de forma fiable 100 ufc/g (Auvolat & Besse, 2016; Jasson et al., 2010; Loncarevic, Økland, Sehic, Norli, & Johansson, 2008).

3.3. Métodos alternativos

Los métodos de referencia presentan una serie de desventajas como su lentitud, laboriosidad, coste, y en el caso del método de recuento, inadecuada precisión en bajos niveles de contaminación. Como consecuencia, la respuesta puede no ser lo suficientemente rápida y fiable para actuar de manera dinámica y eficaz frente al riesgo del patógeno. A consecuencia de esto, las industrias demandan metodologías alternativas que proporcionen resultados fiables, en menor tiempo y de una manera sencilla, permitiendo el análisis de múltiples muestras de forma simultánea (Jasson et al., 2010; Wiedmann, Wang, Post, & Nightingale, 2014).

Es fundamental que los métodos alternativos desarrollados garanticen la sensibilidad y veracidad a bajos niveles de concentración, ya que los alimentos suelen estar contaminados con un bajo número de células de *L. monocytogenes* (EFSA/ECDC, 2017). En esta línea se han desarrollado múltiples métodos alternativos de detección y cuantificación del patógeno basados en el cultivo, métodos electroquímicos, inmunológicos y moleculares (Berrada, Soriano, Picó, & Mañes, 2006; de Oliveira et al., 2010; Gianfranceschi et al., 2014; Paul, Baranzoni, Albonetti, & Brewster, 2015; Portanti et al., 2011; Radhakrishnan, Jahne, Rogers, & Suni, 2013; Rantsiou et al., 2008; Rodríguez-Lázaro, Gonzalez-García, Gattuso, Gianfranceschi, & Hernandez, 2014; Witte et al., 2016).

3.3.1 Impedanciometría

Dentro de los métodos electroquímicos, son muchos los estudios que consideran la impedanciometría como un método rápido de gran interés, tanto para la detección como para la cuantificación microbiana.

Este método se basa en la medida de la impedancia (Z), o resistencia al flujo de una corriente alterna. Cuando la conductividad del medio aumenta, disminuye la impedancia y viceversa. La impedancia puede medirse de forma indirecta y directa. En el primer caso, el cambio de impedancia se mide cuando los electrodos están inmersos en una solución (generalmente de hidróxido potásico). Los gases producidos por el metabolismo microbiano (principalmente CO_2) son absorbidos por la solución de hidróxido potásico, lo que causa una disminución de la conductancia de la solución alcalina, que es medida a través de los electrodos inmersos en ella. En la forma directa los electrodos están inmersos en un medio de cultivo donde se encuentra el microorganismo diana (Figura 4).

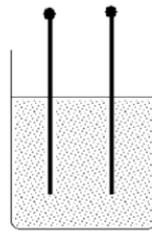


Figura 4. Sistema de dos electrodos para la medición de impedancia (Talaro, 2005).

En la forma directa, el cambio de impedancia se produce por la multiplicación de los microorganismos que transforman sustratos moleculares neutros o débilmente cargados (carbohidratos, proteínas y lípidos) en metabolitos iónicos altamente cargados (lactato, aminoácidos y acetato), así como por la liberación de iones debido al intercambio iónico (K^+ y Na^+) a través de la membrana celular de los microorganismos.

La impedancia de un sistema (Z) depende de la resistencia del mismo (R_s), la capacitancia de la doble capa (C_{dl}) y la frecuencia aplicada (f), tal y como se expresa en la siguiente ecuación:

$$Z = \sqrt{R_s^2 + \left(\frac{1}{\pi f C_{dl}}\right)^2}$$

Con esta ecuación se explica la disminución de la impedancia del medio cuando el microorganismo crece y se multiplica. Cuando los microorganismos metabolizan las moléculas no cargadas eléctricamente en iones, disminuye la resistencia del medio (R_s). Adicionalmente, se produce un aumento de la capacitancia de la doble capa (C_{dl}), relacionado con el cambio en la composición iónica del entorno cercano a la superficie del electrodo, y subsecuentemente, disminuye la impedancia (Yang & Bashir, 2007). La impedancia está relacionada con la frecuencia. Mientras que la mayoría de los métodos miden la impedancia del método del medio de cultivo a una frecuencia fija, diversos estudios han demostrado que la impedancia total está formada por dos componentes, que pueden ser medidos en diferentes rangos de frecuencia

(Futschik & Pfutzner, 1995; Pless, Futschik, & Schopf, 1994). Uno de ellos es denominado impedancia del medio, se mide alta frecuencia (>10 kHz) y está proporcionada por el medio de cultivo. El otro componente se denomina impedancia del electrodo, proviene del electrodo y de la interfaz electrodo/electrolito, y se mide a bajas frecuencias (10 Hz-10 kHz).

La identificación de estas dos impedancias ha permitido el desarrollo de equipos que pueden medir ambas, mejorando el tiempo de detección de microorganismos con una multiplicación más lenta, como *L. monocytogenes*. Más específicamente, el equipo BacTrac 4300 (SY-LAB) permite medir el cambio tanto de la impedancia del electrodo (E-value) como del medio (M-Value) utilizando una frecuencia fija de 1 KHz.

Los sistemas de medida de impedancia pueden determinar cambios absolutos o relativos en la conductancia, capacitancia e impedancia, en función del equipo utilizado. El fenómeno de cambio de impedancia es monitorizado con el tiempo, medido a intervalos regulares y a una temperatura de incubación constante, lo que proporciona una lectura a tiempo real del crecimiento microbiano. Este cambio puede representarse gráficamente situando en el eje de abscisas el tiempo y, en el eje de ordenadas, la medida de la señal eléctrica obtenida.

La curva de cambio de impedancia típica presenta un paralelismo con la curva de crecimiento microbiano. En la Figura 5 se muestra la curva obtenida, donde se representa el % de cambio de la impedancia del medio (%M) con respecto al tiempo (horas). Se observa que la fase de latencia en la que no hay multiplicación microbiana coincide con una región inicial donde la impedancia se mantiene constante. En esta etapa los microorganismos adaptan su metabolismo a los sustratos presentes en el caldo, y su tasa de crecimiento es muy baja. Posteriormente, se observa una fase de crecimiento exponencial donde los microorganismos comienzan a multiplicarse, metabolizando pequeñas moléculas cargadas que modifican drásticamente la impedancia del medio, provocando una disminución de la impedancia, que se traduce en un aumento exponencial del %M. En la última fase, a consecuencia de la limitación de nutrientes o debido a la acumulación de productos tóxicos del metabolismo, el crecimiento exponencial cesa dando lugar a un periodo de transición denominado fase estacionaria. En esta fase final, la concentración del microorganismo es muy elevada ($>10^8$ ufc/ml), y todos los sustratos del medio se han metabolizado en productos finales (Talaro, 2005). En esta fase no se generan nuevos metabolitos, motivo por el cual la curva de impedancia avanza paralela al eje del tiempo.

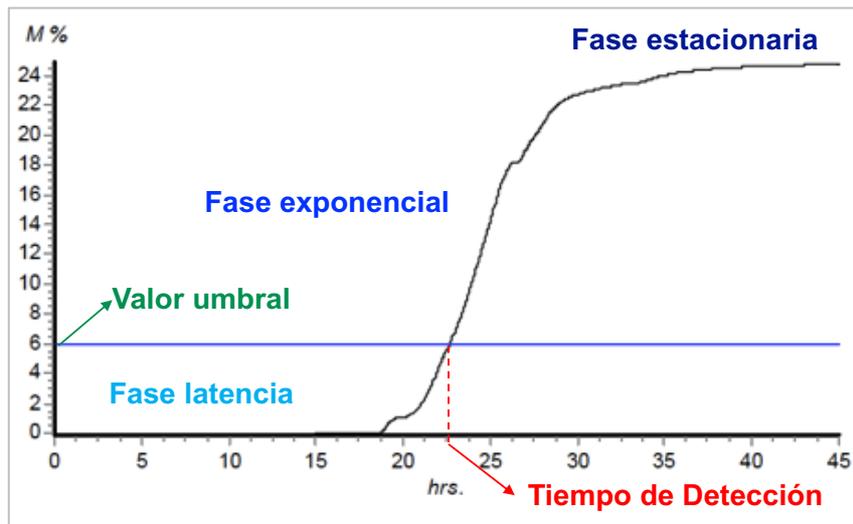


Figura 5. Curva típica de cambio en la impedancia relativa obtenida en un equipo BacTrac 4300.

El tiempo que se corresponde al punto en el que el cambio de impedancia supera un determinado valor umbral se denomina tiempo de detección (TD). Generalmente, este aumento exponencial se produce cuando el microorganismo ha alcanzado valores de 10^6 - 10^7 ufc/ml. El TD es inversamente proporcional a la concentración inicial de microorganismos en la muestra, es decir, TD muy bajos se corresponden con recuentos iniciales muy altos y viceversa. El TD está influido por la temperatura de incubación, por el medio de cultivo, grado de reparación que necesiten los microorganismos, el tiempo de generación de la bacteria en ese medio de cultivo y la presencia de inhibidores del crecimiento en la muestra o en el medio.

Una de las principales ventajas de la impedanciometría es que se basa en el crecimiento microbiano. Diferentes técnicas inmunológicas o moleculares pueden detectar tanto células vivas como muertas, dando lugar a falsos positivos. En el caso de la impedanciometría, detecta únicamente células vivas, ya que su multiplicación es la responsable del cambio de impedancia del medio de cultivo (Wawerla, Stolle, Schalch, & Eisgruber, 1999; Yang & Bashir, 2007). El éxito de esta metodología se basa en el correcto diseño tanto del medio de medio de cultivo, como de las condiciones del análisis, ya que deben favorecer la multiplicación del microorganismo diana. El medio debe ser selectivo permitiendo el crecimiento del microorganismo diana e inhibiendo la multiplicación de la microbiota acompañante. Asimismo, el medio debe estar desarrollado para obtener la mejor señal eléctrica (Davda & Pugh, 1991; Smith, Bolton, Gayner, & Eccles, 1990).

Diferentes autores han aplicado la impedanciometría para la detección de *L. monocytogenes* en alimentos como leche o carne picada, obteniendo muy buenos resultados en cuanto al límite de detección (1-9 ufc/ml) y grado de concordancia con el método de referencia (Ruan et al., 2003). La metodología puede ofrecer muchas ventajas, entre las que se encuentra la rapidez,

sensibilidad, procesado de un número elevado de muestras y detección únicamente de células vivas y dañadas.

3.3.2 PCR a tiempo real

La PCR a tiempo real es una técnica molecular sensible que permite detectar un bajo número de copias del microorganismo diana, incluso en alimentos con abundante microbiota acompañante. Asimismo, es una técnica rápida en la que no hay etapas post-PCR, disminuyendo el riesgo de contaminación de la muestra (Oravcová, Kuchta, & Kaclíková, 2007; Rodríguez-Lázaro, Jofre, Aymerich, Hugas, & Pla, 2004; Rodríguez-Lázaro et al., 2005; Rossmannith, Mester, Wagner, & Schoder, 2010).

La PCR a tiempo real se basa en el fundamento de la PCR desarrollada por Kary Mullis en 1983, la cual revolucionó el campo de las ciencias de la vida y se situó como una herramienta fundamental en biología molecular. Mediante la PCR, se obtiene la amplificación de una o varias copias de una secuencia específica de DNA, dando lugar a billones de copias de este fragmento al final de la reacción de amplificación. El proceso se basa en la acción de la enzima DNA polimerasa y la repetición de un ciclo térmico integrado por tres etapas (Figura 6):

- **Desnaturalización del DNA molde** mediante incremento de la temperatura a 94-98°C/20-30 s. Ello produce ruptura de los enlaces puentes de hidrógeno entre las bases complementarias y separación de las hebras de la doble cadena de DNA.
- **Hibridación de los cebadores**, a temperaturas entre 50-65°C/20-40 s, en la que los cebadores se unen de manera específica al DNA diana. Se utilizan dos cebadores, denominados *forward* y *reverse*, que se unen a los extremos 3' y 5' de la región que se quiere amplificar. Se forma una unión mediante enlaces puentes de hidrógeno entre el DNA del cebador y el DNA molde. La doble cadena formada por el cebador y el DNA molde sirve de sustrato para la DNA polimerasa.
- **Elongación** a una temperatura que varía en función a la DNA polimerasa utilizada, siendo generalmente, una temperatura óptima de 72°C. Para añadir el primer dNTP (desoxinucleótido trifosfato), la DNA polimerasa une el grupo fosfato 5' del dNTP con el grupo 3'-OH del cebador. La DNA polimerasa sintetiza una nueva cadena de DNA complementaria al DNA molde por adición de dNTPs en dirección 5'-3'.

Estas fases se repiten n número de veces o ciclos que oscilan entre 20 y 40 veces. Bajo condiciones óptimas, en cada ciclo de amplificación la cantidad de DNA diana se duplica,

produciendo un incremento exponencial de las copias del fragmento diana. La cantidad de DNA obtenida tras la reacción PCR, se corresponde con el valor 2^n , siendo n el número de ciclos.

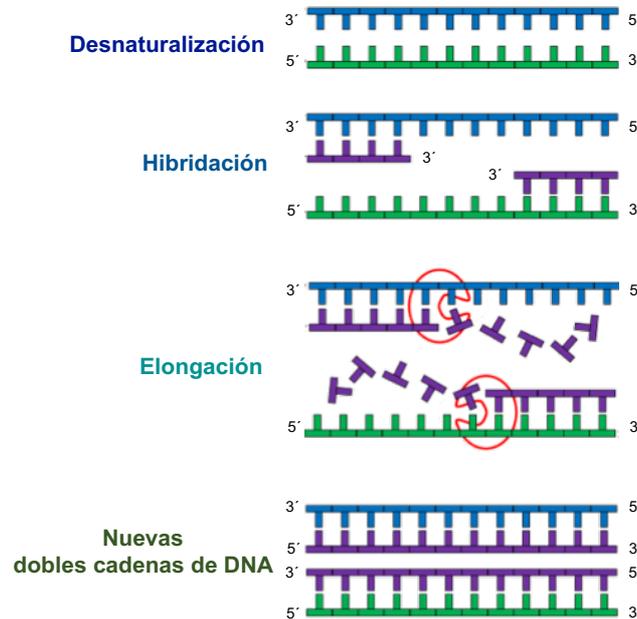


Figura 6. Representación esquemática del fundamento de la PCR.

En la PCR convencional la detección de DNA amplificado se realiza a punto final, y se visualiza en gel de agarosa sometido a electroforesis. Es una técnica cualitativa ya que la cantidad de producto final no es proporcional a la cantidad inicial de DNA, debido a la limitación de reactivos y acumulación de sustancias inhibitoras en los ciclos finales. La PCR convencional es laboriosa y difícilmente automatizable. Además, existe un riesgo de contaminación cruzada en los pasos post-PCR, así como es imposible su aplicación para la cuantificación de DNA. Para solucionar estas limitaciones aplicando el fundamento de la PCR, se desarrolló la PCR a tiempo real (Rijpens & Herman, 2002).

En la técnica PCR a tiempo real, la amplificación y la detección se realiza dentro del termociclador, por lo que se evita la contaminación post-PCR. La detección se basa en la medición a tiempo real del incremento de la intensidad de una señal fluorescente. Esta señal es generada por un fluoróforo que se une a la doble cadena de DNA, o por la rotura de una sonda fluorescente unida a un dos fluoróforos, durante la amplificación de una secuencia diana de DNA. El sistema de detección de la fluorescencia puede ser de dos tipos:

- **Agentes intercalantes** que se unen a la doble cadena de DNA, como el SYBR Green, utilizados por su sencillez y bajo coste. Este fluoróforo en solución emite muy poca fluorescencia, sin embargo, unido a la doble cadena de DNA, incrementa hasta en 1000 veces su emisión de fluorescencia. Cuanta mayor sea la cantidad de DNA amplificado,

más sitios de unión tendrá el agente, por lo que el incremento de la fluorescencia es directamente proporcional a la cantidad de DNA de doble cadena (Popping, Diaz-Amigo, & Hoenicke, 2010). Uno de los inconvenientes que presentan los agentes intercalantes es la inespecificidad. Éstos se unen a cualquier doble cadena de DNA presente en la muestra, ya sea DNA diana o algún producto inespecífico. Esto limita su utilización en PCR a tiempo real, ya que pueden aparecer hibridaciones inespecíficas, dando lugar a una la señal de fluorescencia que no se correspondería con el DNA diana.

- **Sondas de fluorescencia** que se unen de manera específica a un fragmento del DNA diana, en el que el fluoróforo (*reporter*) queda libre y emite fluorescencia. En el caso de que no se hibride, el fluoróforo (*reporter*) se mantiene “apagado” por la influencia del *quencher* (silenciador) y no emite fluorescencia.

Dependiendo del tipo de sonda, la medida de la fluorescencia se puede realizar durante la etapa de hibridación (sondas Molecular beacon) o al final de la etapa de elongación (sondas de hidrólisis).

Las sondas de hidrólisis (también llamadas 5'-nucleasas o TaqMan) son las sondas de fluorescencia más frecuentemente utilizadas en PCR a tiempo real (Popping, Diaz-Amigo, & Hoenicke, 2010). Este tipo de sondas son oligonucleótidos de 20-26 bp que poseen en su extremo 5', un fluoróforo *reporter* y, en su extremo 3' un fluoróforo *quencher*.

Las sondas TaqMan se basan en la Transferencia de Energía de Resonancia Fluorescente (FRET), un mecanismo de bloqueo de la fluorescencia que depende del *reporter* y *quencher* utilizados. Siempre que ambos fluoróforos se mantengan muy cercanos (en el mismo oligonucleótido), la fluorescencia emitida por el *reporter* es bloqueada por el *quencher* y, no puede ser detectada a la longitud de onda de emisión del *reporter*. Las sondas TaqMan están diseñadas para hibridarse específicamente a la cadena simple de DNA diana, en una posición muy cercana a uno de los cebadores. Así, cuando enzima Taq DNA polimerasa (que posee actividad nucleasa 5'→3') realiza la extensión del cebador, se encuentra con el extremo 5' de la sonda de fluorescencia y lo degrada, produciendo la liberación del *reporter* en la solución (Popping, Diaz-Amigo, & Hoenicke, 2010). Tras la separación del *reporter* y el *quencher*, la fluorescencia emitida por el primero puede ser detectada a su longitud de onda de emisión (Figura 7).

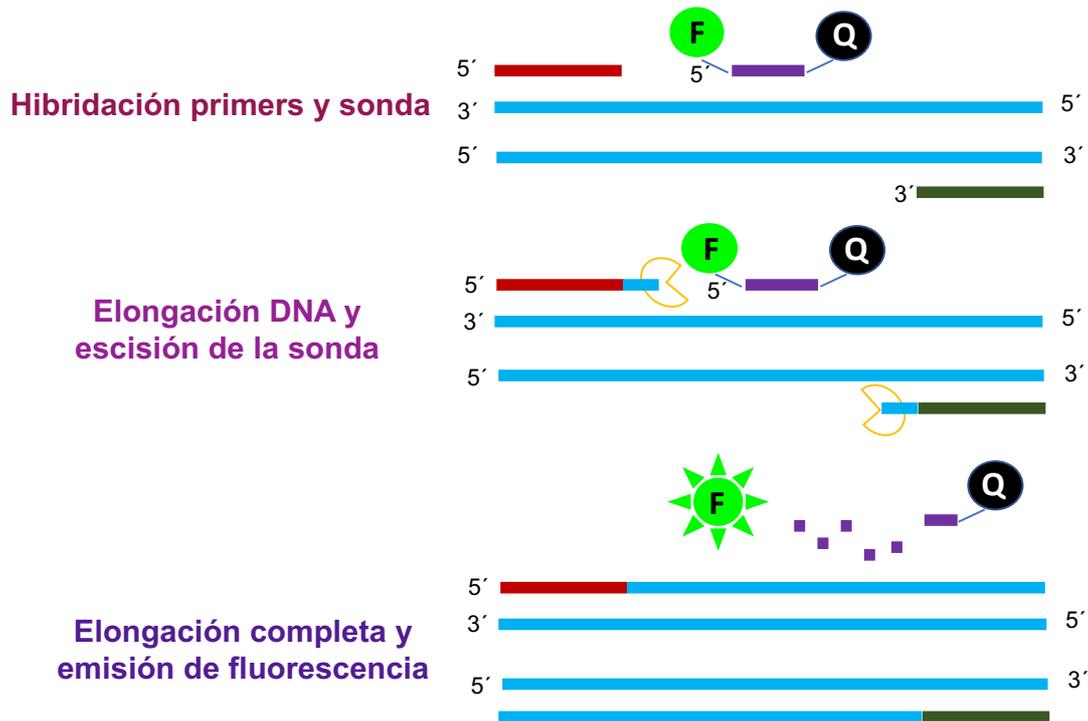


Figura 7. Diagrama de funcionamiento de las sondas Taqman.

La medición de la señal de fluorescencia es monitorizada a tiempo real, generando la curva de amplificación, en la que se diferencian cuatro fases (Figura 8). La primera de ellas se denomina línea base y se corresponde con el ruido de fondo del equipo antes de que se detecte una señal suficiente de fluorescencia. La segunda se corresponde con el incremento exponencial de la amplificación del DNA diana, donde la cantidad de producto PCR producido es directamente proporcional al incremento de la señal de fluorescencia. En esta fase se obtiene el valor C_q (*quantification cycle*), o ciclo en el que la señal de fluorescencia obtenida supera un determinado valor umbral (*threshold*). El C_q es inversamente proporcional a la cantidad inicial de DNA diana presente en la muestra (Popping, Diaz-Amigo, & Hoenicke, 2010). La tercera fase es denominada fase lineal, en la que los componentes de la reacción comienzan a agotarse y la amplificación no sigue una cinética exponencial. La última fase es la de meseta, donde la señal de fluorescencia se mantiene estable. En esta fase la amplificación se ralentiza por agotamiento de reactivos o presencia de inhibidores de la reacción (Biassoni & Raso, 2014).

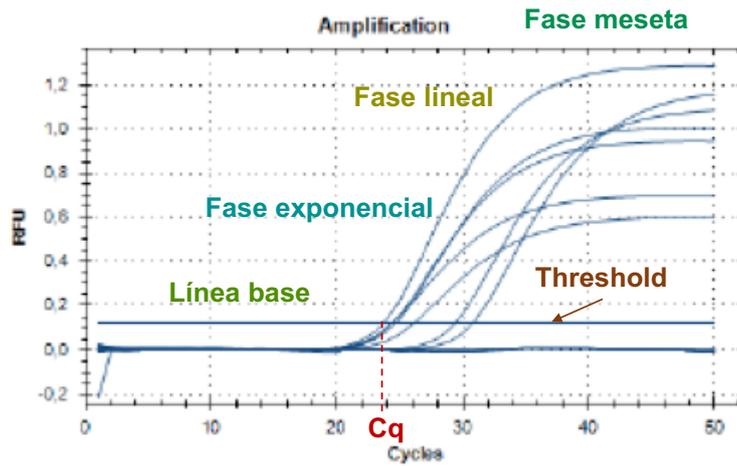


Figura 8. Curva de amplificación obtenida mediante PCR a tiempo real.

Tanto para la optimización de la técnica PCR a tiempo real para la detección del patógeno, como para la cuantificación de *L. monocytogenes* en alimentos es necesario realizar una curva de calibración estándar de DNA. Para ello, se realizan diluciones seriadas de DNA diana de concentración conocida y se analizan mediante PCR a tiempo real. Posteriormente, se representa gráficamente para cada muestra, el valor Cq obtenido (eje y) vs el logaritmo de la cantidad inicial de DNA (eje x).

Para evaluar el correcto funcionamiento de la reacción PCR, se calcula la eficiencia de la amplificación (E). Este parámetro mide la capacidad de la PCR para duplicar las moléculas del amplicón en cada ciclo de PCR y, habitualmente, se expresa como un porcentaje. Se calcula a través de la pendiente de la curva estándar mediante la ecuación (Bustin, et al., 2009):

$$E = \left(\left(10^{(-1/\text{pendiente})} \right) - 1 \right) \times 100$$

Cuando la reacción de amplificación es óptima el valor de la pendiente es -3,32. Por lo que, en cada ciclo PCR la cantidad de DNA diana se duplica en la fase exponencial, y la eficiencia de la reacción es del 100 %. Si bien, en la aplicación práctica, se acepta un valor E entre el 90-105 % (Bustin et al., 2009). Factores como la presencia de inhibidores en la muestra o un pipeteo incorrecto disminuyen la eficiencia de la reacción.

La técnica PCR a tiempo real se ha evaluado para la detección y cuantificación de *L. monocytogenes* en diferentes matrices alimentarias (Berrada et al., 2006; Cobo Molinos, Abriouel, Ben Omar, Martínez-Canamero, & Gálvez, 2010; D'Urso et al., 2009; Oravcová et al., 2007).

Los genes diana más frecuentemente utilizados han sido (Chen, Healey, Regan, Laksanalamai, & Hu, 2017; Churchill, Lee, & Hall, 2006):

- Gen *hlyA*: codifica la LLO.
- Gen *prfA*: codifica el regulador de la expresión transcripcional de seis genes de virulencia.
- Gen *iap*: codifica la p60, que posee actividad bacteriolítica esencial para la viabilidad celular.
- Gen hemolisina: codifica la hemolisina.
- Gen *inLAB*: codifica las internalinas A y B.
- Gen Lm00733: codifica la aminopeptidasa
- Gen 16s rRNA

La técnica de la PCR a tiempo real se ha utilizado tanto para la detección como para la cuantificación de *L. monocytogenes* en diversos productos cárnicos (Liu et al., 2015; O'Grady et al., 2009; Rodríguez-Lázaro et al., 2004; Rossmanith, Krassnig, Wagner, & Hein, 2006). Rodríguez-Lázaro et al. (2004) utilizaron esta técnica para la cuantificación del patógeno en jamón cocido, salchichas tipo Frankfurt y embutidos fermentados, utilizando como DNA diana un fragmento del gen *hlyA*. Éstos obtuvieron buenos resultados en cuanto a linealidad, eficiencia de la reacción PCR y, límites de detección y cuantificación. Estos valores son similares a los obtenidos por otros autores en este tipo de alimentos (Rantsiou et al., 2008; Rodríguez-Lázaro & Hernández, 2006). Sin embargo, en estos trabajos los límites de cuantificación obtenidos están por encima del límite establecido por la legislación. Para conseguir reducir el límite de cuantificación (≤ 100 ufc/g), el método debería aplicarse directamente en el alimento (sin diluirlo) o incluir un paso que permita concentrar los microorganismos presentes en el alimento (Mester, Schoder, Wagner, & Rossmanith, 2014).

Analizar la muestra sin diluir puede producir una inhibición total o parcial de la reacción de amplificación, por una concentración elevada de inhibidores presentes en los alimentos. Por ello, la correcta preparación de la muestra previa al análisis para eliminar estos compuestos, es la clave del éxito para obtener buenos resultados en un método PCR a tiempo real (Mester et al., 2014; Rijpens & Herman, 2002; Rossmanith et al., 2010). Con este objetivo, diversos estudios incluyen pasos de centrifugación, membranas de filtración o buffers específicos previos a la cuantificación de *L. monocytogenes* mediante PCR a tiempo real (D'Urso et al., 2009; Mester et al., 2014; Rossmanith et al., 2010). En este contexto, Mester et al. (2014) estudiaron un protocolo de preparación de muestras utilizando un buffer de lisis de matriz basado en el $MgCl_2$, para la cuantificación de *L. monocytogenes* en productos lácteos y huevos. Con este protocolo

se consiguió cuantificar *L. monocytogenes* de manera fiable en unos niveles muy bajos de contaminación, además de ser económico y con bajo potencial toxicológico. El uso de este buffer en combinación con la PCR a tiempo real no está descrito para su utilización en jamón curado, por lo que sería de gran interés su evaluación para la cuantificación de *L. monocytogenes* en este producto. Con ello, se proporcionaría a la industria cárnica de una herramienta para mejorar el control y la vigilancia del patógeno, así como se obtendrían datos fiables en estudios de vida útil.

3.3.3. Validación de métodos alternativos

El Reglamento (CE) Nº 2073/2005 permite el uso de metodologías alternativas siempre y cuando estén validadas, certificadas y registradas, con respecto al método de referencia, según la norma ISO 16140-2:2016, u otros protocolos internacionalmente aceptados. Esta validación se debe realizar por organizaciones como AFNOR (*Association Française de Normalisation*), NordVal o MicroVal.

La norma **ISO 16140-2:2016** “Microbiología de la cadena alimentaria. Validación de métodos. Parte 2: protocolo para la validación de métodos alternativos (registrados) frente a los métodos de referencia” establece los parámetros que deben calcularse, las directrices para llevarlos a cabo y los límites de aceptabilidad que se deben cumplir para demostrar que un método alternativo es válido. Según esta norma, en los métodos alternativos cualitativos se deben estudiar la inclusividad y exclusividad, el nivel de detección 50 y el nivel de detección relativo, así como el estudio de sensibilidad. Para los métodos cuantitativos, esta norma se establece el parámetro de la exactitud relativa, entre otros.

La norma ISO 16140-2:2016 está dirigida a las organizaciones dedicadas a la validación de métodos. Actualmente, no hay ninguna norma para realizar la validación de métodos alternativos a nivel de usuario o de laboratorio individual. Si bien se están elaborando diversas normas que describirán, entre otros, el protocolo para llevar a cabo la verificación del método de referencia y alternativo validado a nivel de usuario (ISO 16140-3), así como el protocolo para realizar la validación de un método desarrollado a nivel de un único laboratorio (ISO 16140-4). Previsiblemente, el número de parámetros a analizar será menor, así como el protocolo para llevarlos a cabo será menos costoso que el descrito en la norma ISO 16140-2:2016.

Nordval International es una organización vinculada a los países nórdicos que establece un protocolo de validación basado en la norma ISO 16140-2:2016, al que añaden el estudio de la sensibilidad y especificidad relativas, así como el Índice kappa de Cohen.

Por otro lado, la **bibliografía científica y las guías especializadas** ofrecen parámetros adicionales para completar la evaluación de metodologías alternativas, como son los Valores predictivos

positivos y negativos (Anderson et al., 2011; Tomás, Rodrigo, Hernández, & Ferrús, 2009) y la precisión (European Pharmacopeia, 2015). Asimismo, hay guías para métodos concretos como es la publicada por Bustin et al. (2009) para métodos qPCR titulada “The MIQE Guidelines: Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiment”, en la que se disponen los parámetros y la información mínima que deben ser proporcionados por los autores para garantizar la calidad, veracidad, precisión y correcta interpretación de resultados obtenidos en un experimento qPCR. Esta guía establece los parámetros de linealidad, eficiencia, rango dinámico lineal, límites de detección y cuantificación, precisión y variabilidad analítica, entre otros.

4. Caracterización genotípica de *L. monocytogenes*

La gran variabilidad de cepas de *L. monocytogenes* con diferente poder de virulencia, así como el largo periodo de incubación de la enfermedad, dificultan el trabajo de epidemiólogos y autoridades sanitarias en el control y prevención de brotes de listeriosis. Además, los brotes son difíciles de detectar ya que los casos asociados a un solo brote pueden estar separados geográfica y/o temporalmente (Graves et al., 2005). Por ello, es vital conocer la identidad de la cepa causante del brote mediante técnicas de subtipificación, con el fin de realizar el seguimiento de la cepa e identificar el alimento responsable (Graves et al., 2005; Graves & Swaminathan, 2001; Olsen et al., 2005; Swaminathan & Gerner-Smidt, 2007). Gracias a estas técnicas, las autoridades sanitarias pueden actuar de una manera rápida y eficaz, protegiendo la salud del consumidor.

Asimismo, la subtipificación de aislados de *L. monocytogenes* puede ser una herramienta de gran interés para la industria alimentaria. Ésta posibilita la identificación de nichos de contaminación persistente, así como rutas de contaminación del patógeno dentro de las instalaciones de la industria (Autio et al., 2002; Vogel, Huss, Ojeniyi, Ahrens, & Gram, 2001). Esta información permitiría a los operadores desarrollar estrategias para su eliminación, y su incorporación en el sistema APPCC de la industria mejoraría el control y la vigilancia del patógeno (Chen et al., 2007). Con todo ello, se lograría disminuir el riesgo de listeriosis con la llegada al consumidor de productos seguros, así como se aumentaría la competitividad de la industria en el mercado.

Las metodologías utilizadas para la caracterización fenotípica y genotípica deben ser sensibles, robustas, reproducibles y rápidas. Deben tener un alto poder de discriminación para poder discernir entre diferentes cepas del patógeno y, permitir la transferencia rápida de información entre las autoridades sanitarias de los diferentes países, contribuyendo así a la “epidemiología global” (Datta & Burall, 2017). La subtipificación incluye tanto métodos fenotípicos como

genotípicos. Los primeros son, generalmente, menos sensibles y tienen menor poder de discriminación, mientras que los genotípicos son más sensibles y fiables (Shuckken, Grohn, & Wiedmann, 2003).

4.1. Serotipo molecular

El serotipado representa el primer nivel de tipificación de *L. monocytogenes*. En dicha especie se incluyen 13 serotipos diferentes (Seeliger & Höhne, 1979). Este método se basa en la detección de antígenos somáticos (O) y flagelares (H) del microorganismo. El serotipado convencional se realiza mediante la aglutinación de estos antígenos, utilizando un antisuero mono o polivalente. Este método presenta limitaciones ya que es caro, laborioso y la exactitud de los resultados depende la utilización de un suero de elevada calidad. Además, pueden darse posibles reacciones cruzadas con otras especies del género *Listeria*. Por ello, Borucki & Call (2003) desarrollaron una metodología para conocer el serotipo mediante PCR, pudiendo diferenciar los serotipos más frecuentemente asociados a alimentos, personas y ambiente (1/2a, 1/2b, 1/2c 4b). En este estudio inicial utilizaron de dos o tres reacciones de amplificación para clasificar los aislados, pero no permitió la diferenciación de la especie *L. innocua* del serotipo 4b de la especie patógena. Por ello, Doumith, Buchrieser, Glaser, Jacquet, & Martin (2004) diseñaron un método PCR multiplex con el que los trece serotipos se englobaron en cinco serogrupos moleculares:

- Serogrupo IIa: 1/2a-3a
- Serogrupo IIb: 1/2b-3b-7
- Serogrupo IIc: 1/2c-3c
- Serogrupo IVa: 4a-4c
- Serogrupo IVb: 4b-4ab-4d-4e

Sin embargo, este método no consiguió diferenciar de forma definitiva los serogrupos 1/2a-3a de 1/2c-3c. Para ello, Kérouanton et al. (2010) incluyeron una segunda reacción de amplificación que permitió diferenciar entre aislados de los grupos 1/2a-3a y 1/2c-3c. Este método PCR múltiple no discrimina los serotipos 1/2a y 3a; 1/2c y 3c; 1/2b, 3b y 7; 4a y 4c; y 4b, 4d y 4e. Sin embargo, los serotipos 3a, 3c, 3b, 7, 4a, 4c, 4d y 4e raramente están asociados a listeriosis humana, por lo que esta metodología se considera muy adecuada para la detección rápida de los principales serotipos de la especie patógena.

Debido a su bajo poder discriminatorio, el serotipado debe acompañarse de otras metodologías de genotipado. Éstas pueden ser clasificados en cinco categorías dependiendo de los marcadores genéticos y tecnologías utilizadas (Liu, 2008b):

- PCR: *Random amplified polymorphic DNA* (RAPD).
- Patrones de restricción: *Pulsed Field Gradient Electrophoresis* (PFGE), *Amplified fragment length polymorphism* (AFLP), *Restriction fragment length polymorphism* (RFLP).
- Elementos repetitivos: *Repetitive-PCR* (Rep-PCR), *Multiple-locus variable-number tandem repeat analysis* (MLVA).
- Hibridación: *DNA microarrays*.
- Secuenciación: *MultiLocus Sequence Typing* (MLST), *Multivirulence-Locus Sequence Typing* (MVLST), *Whole Genome Sequencing* (WGS).

De todos ellos, el método PFGE es el método de referencia debido a su excelente poder de discriminación y reproducibilidad (Chenal-Francisque et al., 2013; Graves & Swaminathan, 2001; Halpin, Garrett, Ribot, Graves, & Cooper, 2009). Esta técnica es utilizada tanto en investigación epidemiológica, como para establecer patrones de contaminación dentro de una industria alimentaria.

4.2. Electroforesis en gel en campo pulsante (PFGE)

Esta técnica electroforética se basa en la separación de fragmentos de DNA generados tras la digestión del genoma completo mediante enzimas endonucleasas de restricción. Esta separación proporciona un patrón de bandas de DNA específico para cada cepa, lo que permite establecer relaciones genéticas entre los aislados. Este método presenta numerosas ventajas para la subtipificación de *L. monocytogenes*, ya que es sensible, robusta, con alto poder de discriminación, reproducible y estandarizable (Fugett, Schoonmaker-Bopp, Dumas, Corby, & Wiedmann, 2007; Graves & Swaminathan, 2001; Neves et al., 2008; Su et al., 2016). Por todo ello, en el año 2000 el CDC estableció la PFGE como el método de referencia para la subtipificación de *L. monocytogenes*.

La PFGE implica las siguientes etapas: extracción del DNA genómico, digestión del DNA, separación de los fragmentos de DNA mediante PFGE y análisis del patrón de bandas mediante un software informático. Las enzimas nucleasas seleccionadas para la digestión del DNA deben presentar baja frecuencia de corte, es decir, enzimas cuyo lugar de restricción, por su longitud y secuencia, se encuentran raramente a lo largo del DNA cromosómico del microorganismo (Coll, Coque, Domínguez, Vázquez, & Vila, 2005). En el caso de *L. monocytogenes*, su genoma

tiene un tamaño de aproximadamente 3 Mb y un bajo contenido de GC (Cardozo-Bernal, Ramón, Poutou-Piñales, Carrascal-Camacho, & Zambrano, 2013). Las enzimas utilizadas para la subtipificación del patógeno tienen secuencias de reconocimiento ricas en estos nucleótidos (GC), por lo que, tras la digestión del DNA, se habrán obtenido pocos fragmentos de DNA. Esto genera patrones de PFGE con pocas bandas (10-20), lo que facilita su análisis. Se han utilizado diversas enzimas para la restricción del DNA de *L. monocytogenes* (Brosch, Buchrieser, & Rocourt, 1991; Katsuda et al., 2000; Liu, 2008a). De todas ellas, las enzimas *Ascl* y *Apal* son las establecidas por el protocolo estandarizado para la subtipificación de *L. monocytogenes* mediante PFGE publicado por el CDC (Graves & Swaminathan, 2001). *Ascl* es la enzima primaria que proporciona patrones de pocas bandas, pero de gran tamaño. La enzima *Apal* es la secundaria, generando patrones con mayor número de bandas. Por lo tanto, los patrones obtenidos con la enzima *Ascl* son más fáciles de analizar, siendo los primeros que se realizan. La enzima *Apal* se utiliza para confirmar los resultados obtenidos por *Ascl* y para alcanzar mayor poder de discriminación (Chenal-Francisque et al., 2013; Fugett et al., 2007; Graves & Swaminathan, 2001).

Los fragmentos de DNA obtenidos tras la digestión tienen un gran tamaño (>40 kb), y su separación se realiza en función de su peso molecular. La PFGE es una variación de la electroforesis convencional que permite separar los fragmentos de DNA de gran tamaño. En 1984, Schwartz y Cantor desarrollaron esta técnica, que incorpora un cambio periódico de la dirección del campo eléctrico entre dos o más ángulos preestablecidos, lo que se denomina un pulso. Tras el cambio de orientación del campo eléctrico, las moléculas grandes tardan más tiempo en poder alinearse y comenzar el avance a través del gel que las moléculas de DNA más pequeñas. Siempre que los cambios eléctricos que se alternen tengan la misma intensidad y voltaje, la migración final del DNA se recogerá en línea recta, aunque el patrón final de separación de los fragmentos revelará la suma de todos los avances cortos en “zig-zag” que ha realizado el DNA (Coll, Coque, Domínguez, Vázquez, & Vila, 2005). Mediante esta técnica se consiguen separar moléculas de DNA de hasta 2×10^6 bp (2 Mb).

Existen diversos sistemas de PFGE que se diferencian en función de la forma de modificación de la dirección del campo eléctrico, velocidad de migración de DNA y resolución de las bandas obtenidas (Cardozo-Bernal, Ramón, Poutou-Piñales, Carrascal-Camacho, & Zambrano, 2013):

- OFAGE (*Orthogonal Field Alternating Gel Electrophoresis*)
- FIGE (*Field Inversion Gel Electrophoresis*)
- TAFE (*Transverse Alternating- Field Electrophoresis*)
- **CHEF (*Contour-Clamped Homogeneous Electric Field*)**

- PACE (*Programmable Autonomously Controlled Electrodes*)
- RGE (*Rotating Gel Electrophoresis*).
- CFGE (*Continuous Field Gel Electrophoresis*)
- ZIFE (*Zero-Integrated Field Electrophoresis*)
- ST/RIDE (*Simultaneous Tangential/Rectangular Inversion Decussate Electrophoresis*).

De todos ellos, la variante CHEF es la más utilizada. Esta variante está formada por 24 electrodos dispuestos periféricamente formando un hexágono. El voltaje producido por el generador de corriente se divide entre los electrodos, creando un gradiente constante a lo largo de todo el gel. El ángulo de reorientación debe ser superior a 90° . De forma general se trabaja con ángulos de 120° (Figura 9).

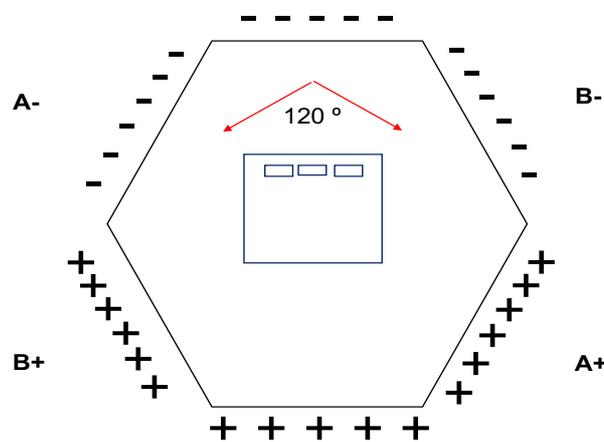


Figura 9. Esquema de distribución de electrodos en sistema CHEF en la técnica PFGE. El ángulo de 120° es el ángulo de reorientación entre el campo eléctrico A y el B.

La variante CHEF es fácil de usar y posee una excelente capacidad de separar múltiples muestras generando patrones de bandas rectos, lo que facilita la comparación entre ellos. Por estos motivos, es la variante utilizada para llevar a cabo el protocolo estandarizado publicado por el CDC para la subtipificación de *L. monocytogenes* mediante PFGE (Graves & Swaminathan, 2001).

En 1996, el organismo CDC estadounidense conformó la red PulseNet, un sistema nacional de subtipificación y vigilancia para la detección y seguimiento de brotes producidos por patógenos alimentarios en Estados Unidos. Esta red está formada por los laboratorios de salud pública y de agencias relacionadas con la seguridad alimentaria. En la actualidad, la red PulseNet se ha expandido con éxito a Canadá, Europa, Asia y América Latina. Gracias a su creación, los patrones de PFGE obtenidos son electrónicamente compartidos en una base de datos gestionada por el CDC, lo que permite el intercambio rápido de información y la comparación a nivel mundial de datos de subtipificación. Por ello, esta técnica es utilizada rutinariamente en los brotes e

investigaciones que conlleven el rastreo del microorganismo a lo largo de la cadena alimentaria, estableciendo relaciones genéticas entre aislados de origen clínico, alimentarios y ambientales (Gerner-Smidt et al., 2006; Ribot & Hise, 2016).

CAPÍTULO III

PUESTA A PUNTO Y EVALUACIÓN DE MÉTODOS ALTERNATIVOS PARA LA DETECCIÓN DE *L. MONOCYTOGENES* EN JAMÓN CURADO: IMPEDANCIOMETRÍA Y PCR A TIEMPO REAL

Capítulo III. Puesta a punto y evaluación de métodos alternativos para la detección de *L. monocytogenes* en jamón curado: impedanciometría y PCR a tiempo real

En este capítulo se describe la puesta a punto y evaluación de diferentes métodos rápidos para la detección de *L. monocytogenes* jamón curado. De forma preliminar, se evaluó la impedanciometría combinada con agar cromogénico en comparación con el método de referencia (ISO 11290-1/A1:2004). Asimismo, se llevó a cabo la evaluación de diferentes mejoras relacionadas con la impedanciometría; además de otros métodos alternativos como la PCR a tiempo real. Este estudio nos ha permitido valorar las ventajas de las distintas metodologías en cuanto a fiabilidad, rapidez y sencillez.

La evaluación de los métodos alternativos se ha realizado en base a diferentes parámetros de validación establecidos por la norma ISO 16140-2:2016, NordVal International, así como a otros parámetros definidos en la bibliografía científica (Anderson et al., 2011; Tomás, Rodrigo, Hernández, & Ferrús, 2009) y en guías especializadas (European Pharmacopoeia, 2015).

1. Puesta a punto de la impedanciometría combinada con agar cromogénico para la detección de *L. monocytogenes* en jamón curado

1.1. Material y métodos

1.1.1. Puesta a punto de la impedanciometría

El estudio se realizó en cultivo puro utilizando un equipo μ -Trac 4200 (SY-LAB Geräte GmbH, Neupurkersdorf, Austria) (Figura 10.A) que mide la variación en el valor M (impedancia del medio) entre dos electrodos sumergidos en un medio de cultivo dispuestos en una celdilla específica de dos electrodos (SY-LAB Geräte GmbH) (Figura 10.B). La variación del valor M (M %) es la reducción relativa de la impedancia del medio (expresada en %) comparada con el valor inicial de impedancia (M₀). El M % se monitoriza con el tiempo a una temperatura de incubación constante.

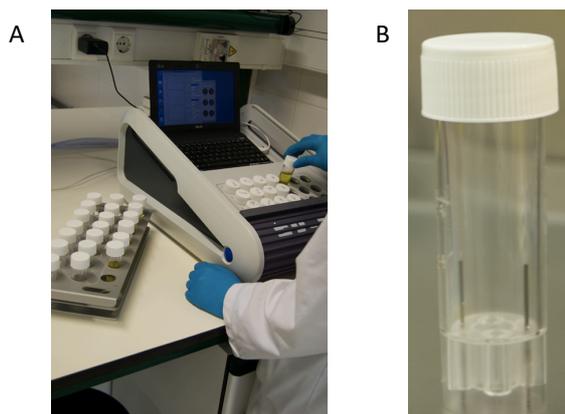


Figura 10. A. Equipo μ -Trac 4200 y B. celdilla de dos electrodos utilizada para la impedanciometría.

1.1.1.1. Cultivo bacteriano y preparación del inóculo

En este estudio se utilizaron seis cepas de *Listeria* spp.: *L. monocytogenes* CECT 4031, *L. monocytogenes* CECT 934, *L. monocytogenes* UZ64 y UZ12, y *L. innocua* UZ63 y UZ65. Las dos primeras cepas se adquirieron de la Colección Española de Cultivos Tipo, mientras que las cuatro últimas fueron aisladas de la industria cárnica en estudios previos realizados en nuestro laboratorio (Gómez et al., 2015).

Una colonia de cada cepa se incubó a 37°C/17 h en 10 ml de caldo BHI (*Brain Heart Infusion*) (Merck KGaA, Darmstadt, Germany), alcanzando una concentración aproximada de 10^9 ufc/ml. Posteriormente, se realizaron diluciones decimales en agua de peptona 0,1 % hasta alcanzar 10^2 , 10^1 y 1 ufc/ml, siendo las concentraciones utilizadas en el ensayo.

1.1.1.2. Elaboración de curvas de calibración y estudio de los tiempos de detección

Se han analizado tres niveles de contaminación: 10^2 , 10^1 y 1 ufc *Listeria* spp. En cada nivel, se dispuso 1 ml del inóculo en 9 ml de caldo *Listeria*-selective BiMedia 401A base plus *Listeria*-selective 401A additive (SY-LAB Geräte GmbH) en las celdillas específicas.

Los tres niveles se analizaron en el equipo μ -Trac 4200 con incubación a 37°C durante un máximo de 40 h, seleccionando el 5 % como valor umbral de M %, para así evitar el ruido de fondo del equipo. El tiempo (horas) en el que la curva supera el valor umbral se define como Tiempo de Detección (TD). Los ensayos se realizaron por duplicado y en tres días diferentes, incluyendo un control negativo en cada ensayo. Se comprobó la concentración microbiana mediante recuento en agar BHI (37°C/24 h) de cada uno de los inóculos utilizados.

Para elaborar las curvas de calibración, se representaron gráficamente el recuento obtenido en agar BHI (log ufc/ml) y los tiempos de detección (TD) en horas.

A partir de los TD obtenidos, se determinaron los tiempos de generación de las cepas de *Listeria* spp. ensayadas. El tiempo de generación se corresponde con el intervalo de tiempo requerido para duplicar la población microbiana, y se calculó como el cociente entre la media de la diferencia en el TD entre dos diluciones decimales consecutivas, y el log2 del factor de dilución (aproximadamente 3,322) (Capell, Kirby, & Moss, 1995). El objetivo fue determinar si las diferencias en los TD se debían a diferentes velocidades de multiplicación.

1.1.2. Evaluación preliminar de la impedanciometría combinada con agar cromogénico para la detección de *L. monocytogenes* en jamón curado

Para este estudio se analizaron muestras de jamón curado comerciales, así como muestras contaminadas de forma experimental con *L. monocytogenes*, mediante los métodos de referencia y alternativo.

1.1.2.1. Cepas utilizadas para la contaminación experimental y preparación del inóculo bajo condiciones de estrés

Se seleccionaron tres cepas de origen cárnico: *L. monocytogenes* UZ64, *L. monocytogenes* UZ12 y *L. innocua* UZ63. El cultivo bacteriano se realizó como se describe en el apartado 1.1.1.1. De cada una de ellas se utilizó la dilución 10^1 ufc/ml para la inoculación experimental de las muestras de jamón, con el fin de obtener una concentración final de 1-2 ufc/25 g jamón. En base a las directrices de la norma ISO 16140-2:2016 la dilución de estudio (10^1 ufc/ml) se sometió a unas condiciones similares a las encontradas en el alimento. Los dos tipos de condiciones ensayadas fueron:

- Condiciones A: Agua de peptona 0,1 %, pH 5,5, 4 % NaCl e incubación a 4°C/96 h.
- Condiciones B: Agua de peptona 0,1 %, pH 6,5, 4 % NaCl e incubación a 4°C/96 h.

Se realizó el recuento en placa de esta dilución de trabajo, antes y después de aplicar las condiciones de estrés, mediante siembra en agar BHI (37°C/24 h), para comprobar la concentración microbiana.

1.1.2.2. Matriz alimentaria: jamón curado

Para evaluar el método alternativo se analizaron un total de 119 muestras de jamón curado. De ellas, 65 fueron muestras comerciales de las que se desconocía su contaminación, y 36 contaminadas de forma artificial con las distintas cepas objeto de estudio. La distribución de las muestras se muestra en la Tabla 8.

Tabla 8. Distribución de las muestras de jamón curado utilizadas para la evaluación de la impedanciometría combinada con agar cromogénico para la detección de *L. monocytogenes* (n=119).

Tipo de muestra	Número de muestras
Contaminación natural (comerciales)	65
Inoculadas con <i>L. monocytogenes</i> UZ64 (A)	6
Inoculadas con <i>L. monocytogenes</i> UZ64 (B)	6
Inoculadas con <i>L. monocytogenes</i> UZ12 (A)	6
Inoculadas con <i>L. monocytogenes</i> UZ12 (B)	6
Inoculadas con <i>L. innocua</i> UZ63 (A)	6
Inoculadas con <i>L. innocua</i> UZ63 (B)	6
Controles negativos	18
Total	119

(A): Condiciones de estrés previas del inóculo pH 5,5, 4 % NaCl and 96 h/4 °C.

(B): Condiciones de estrés previas del inóculo pH 6,5, 4 % NaCl and 96 h/4 °C.

Se tomaron 25 g de jamón de cada una de las muestras y se dispusieron en una bolsa de homogeneización. En las muestras que se contaminaron experimentalmente, se inocularon 100 µl de la dilución de trabajo (10^1 ufc/ml) de las diferentes cepas de *Listeria* spp., obtenida bajo condiciones de estrés A o B. El análisis de las muestras se realizó inmediatamente tras la inoculación. En cada ensayo, se utilizó un control negativo.

Para confirmar el nivel de inóculo, se determinó la concentración de *Listeria* spp. en cada suspensión mediante recuento en agar BHI (37°C/24 h).

1.1.2.3. Detección de *L. monocytogenes* en la matriz alimentaria

La detección del patógeno en todas las muestras de jamón curado se realizó de forma paralela mediante los métodos alternativo (impedanciometría combinada con agar cromogénico OCLA) y de referencia (ISO 11290-1/A1:2004). El esquema de las metodologías se muestra en la Figura 11.

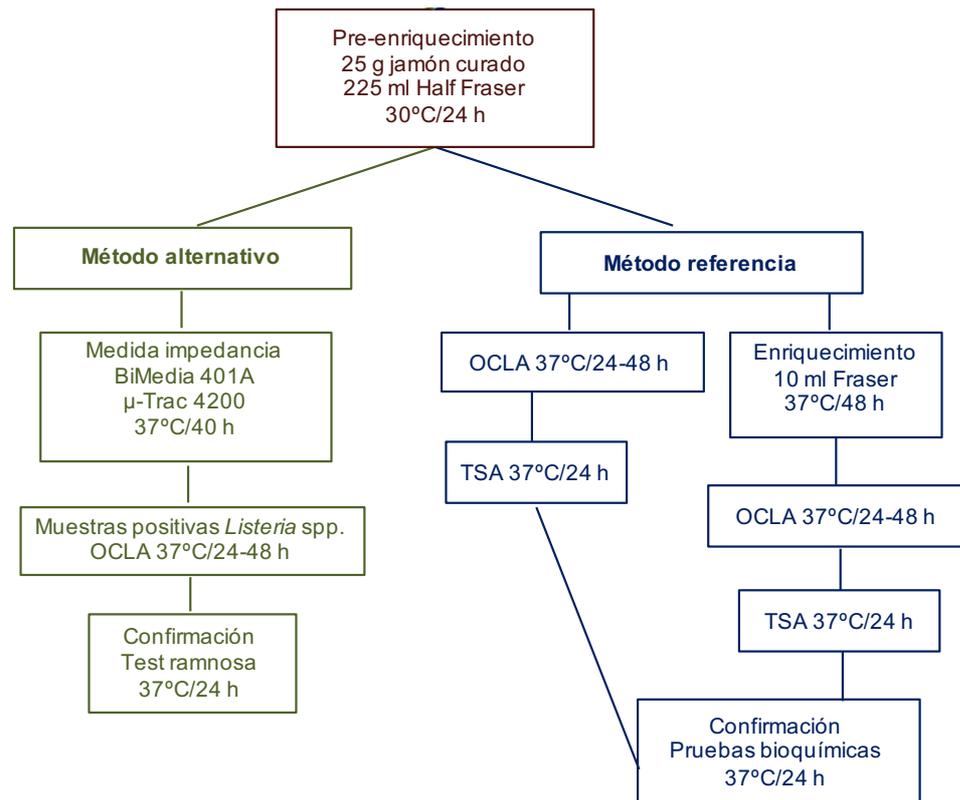


Figura 11. Etapas de los métodos alternativo (impedanciometría combinada con agar cromogénico OCLA) y de referencia, utilizados para la detección de *L. monocytogenes* en muestras de jamón curado. OCLA: Oxoid Chromogenic *Listeria* Agar; TSA: Tryptone Soya Agar.

- **Método alternativo: impedanciometría combinada con agar cromogénico**

La muestra de 25 g se homogeneizó con 225 ml de caldo Half Fraser (Oxoid, Basingstoke, England), durante 260 rpm/2 min en un equipo Stomacher 400 Circulator (Seward, Worthing, England), seguido de incubación a 30 °C/24 h (pre-enriquecimiento).

Tras esta etapa, 1 ml del pre-enriquecimiento se añadió a 9 ml de caldo *Listeria*-selective BiMedia 401A base plus *Listeria*-selective 401A suplementado con un vial de suplemento PALCAM (Oxoid), contenidos en las celdillas específicas de impedanciometría. La medida de la impedancia se realizó con los mismos parámetros descritos en el apartado 1.1.1.2. Todas las muestras se analizaron por sextuplicado. En el caso de las muestras contaminadas experimentalmente, el ensayo completo se repitió en tres días diferentes.

En el momento en el que se observó una curva típica de cambio de impedancia superando el valor umbral, la muestra se sembró en agar cromogénico OCLA (Oxoid Chromogenic *Listeria* Agar, Oxoid) para la identificación de la especie patógena. La siembra se realizó por duplicado y las placas fueron incubadas a 37°C/24-48 h.

Las colonias típicas de *L. monocytogenes* en OCLA presentan un color verde azulado y están rodeadas de un halo opaco. La coloración se debe a la acción de la enzima β -glucosidasa sobre el sustrato cromogénico X-glucósido presente en el medio. El halo opaco se produce por la hidrólisis del fosfatidilinositol del medio mediante la fosfatidilinositol fosfolipasa C (Figura 12). A excepción de *L. ivanovii*, que al igual que *L. monocytogenes*, presenta un halo opaco a su alrededor, el resto de las especies de *Listeria* poseen la misma coloración verdosa, pero sin halo.

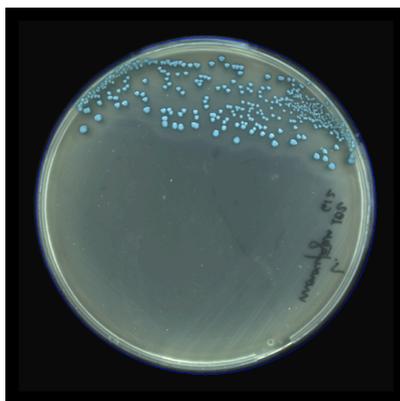


Figura 12. Colonias típicas de *L. monocytogenes* en agar OCLA.

Las colonias de *L. monocytogenes* presuntivas se confirmaron con el test de la ramnosa (Bio-Rad, Marnes-La-Coquette, France). La especie *monocytogenes* metaboliza la ramnosa del medio produciendo un viraje del color del medio de violeta a amarillo, mientras que *L. ivanovii* no es capaz, por lo que permanece violeta.

El análisis estadístico de los TDs obtenidos en el equipo μ -Trac 4200 para las muestras positivas (presencia de *Listeria* spp./25 g) se realizó mediante el programa SPSS 22.0.0 (SPSS, Inc., IBM, Armonk, NY).

- **Método de referencia: ISO 11290-1/A1:2004**

Paralelamente, las muestras fueron analizadas siguiendo el protocolo establecido por la norma ISO 11290-1/A1:2004, en vigor en el momento del estudio. Este método incluye cuatro etapas: pre-enriquecimiento, enriquecimiento, identificación y confirmación.

Como se ha visto en la Figura 11, la fase de pre-enriquecimiento es común para el método de referencia y alternativo. Posteriormente, 0,1 ml del pre-enriquecimiento se inoculó en 10 ml de caldo Fraser (Oxoid), seguido de incubación a 37°C/48 h (enriquecimiento). De forma paralela, el pre-enriquecimiento y el enriquecimiento se sembraron en OCLA por duplicado (37°C/24-48 h). Las colonias de *L. monocytogenes* presuntivas fueron sub-cultivadas en TSA (Tryptone Soya Agar, Oxoid) y, confirmadas bioquímicamente mediante galerías API Listeria (BioMerieux).

1.1.2.4. Parámetros de evaluación

Los resultados obtenidos del análisis de las muestras de jamón por ambas metodologías se dispusieron en una tabla de resultados emparejados, tal y como establecen la norma ISO 16140-2:2016 y NordVal International en su protocolo de validación de métodos alternativos para el análisis de alimentos (Tabla 9).

Tabla 9. Tabla de resultados emparejados obtenidos por los métodos de referencia y alternativo (ISO 2016; NordVal, 2017).

Respuestas	Método referencia positivo (R+)	Método referencia negativo (R-)
Método alternativo positivo (A+)	R+/A+ Concordancia positiva (PA)	R-/A+ Desviación positiva (PD)
Método alternativo negativo (A-)	R+/A- Desviación negativa (ND)	R-/A- Concordancia negativa (NA)

- **Parámetros estudiados según ISO 16140-2:2016**

El estudio de sensibilidad del método alternativo se realizó mediante el cálculo de los siguientes parámetros:

- **Sensibilidad del método alternativo (SE_{alt})** para determinar la capacidad del método alternativo para detectar el analito,

$$SE_{alt} = \frac{PA + PD}{PA + ND + PD} \times 100$$

donde PA es la concordancia positiva, PD es la desviación positiva y ND es la desviación negativa.

- **Veracidad relativa (RT)** para conocer el grado de concordancia entre la respuesta obtenida por el método de referencia y la respuesta obtenida por el método alternativo con muestras idénticas,

$$\% RT = \frac{PA + NA}{N} \times 100$$

donde PA es la concordancia positiva, NA es la concordancia negativa y N es el número total muestras analizadas.

- **Ratio de falsos positivos del método alternativo (FPR)** mediante la fórmula

$$FPR = \frac{PD}{NA} \times 100$$

donde PD es la desviación positiva y NA es la concordancia negativa.

- **Suma de las desviaciones negativa y positiva (ND+PD)**

- **Diferencia entre las desviaciones positiva y negativa (ND-PD)**

La metodología alternativa y de referencia comparten la etapa de pre-enriquecimiento, por lo que se trata de un estudio pareado. Para este tipo de estudio, el límite de aceptabilidad para la suma de la desviaciones negativa y positiva (ND+PD) es 6. En el caso de la diferencia entre las desviaciones negativa y positiva (ND-PD) el límite es de 3. Por encima de estos valores, el método alternativo no se considera válido.

• **Parámetros estudiados según NordVal International**

Los parámetros evaluados fueron (NordVal, 2017):

- **Especificidad relativa (SP)** para determinar la capacidad del método alternativo para no detectar el analito cuando no es detectado por el método de referencia.

$$\% SP = \frac{NA}{N-} \times 100$$

donde $N-$ es el número total de resultados negativos con el método de referencia

- **Sensibilidad relativa (SE)** con el fin de conocer la capacidad del método alternativo para detectar el analito cuando es detectado por el método de referencia.

$$\% SE = \frac{PA}{N+} \times 100$$

donde $N+$ es el número total de resultados positivos con el método de referencia. El límite de aceptabilidad para este parámetro es >95 %.

- **Índice kappa de Cohen (k)** es un parámetro que se utiliza para cuantificar el grado de concordancia entre el método alternativo y el método de referencia.

$$k = \frac{po - pe}{1 - pe}$$

donde po es la concordancia observada y pe es la concordancia esperada.

Los valores k se categorizan en: $\leq 0,20$ concordancia pobre; entre 0,20-0,40 concordancia débil; entre 0,41-0,60 concordancia moderada; entre 0,61-<0,80 concordancia buena; $\geq 0,80$ muy buena concordancia. El límite de aceptabilidad del valor k es $>0,80$.

• **Parámetros de la bibliografía científica (Anderson et al., 2011; Tomás et al., 2009) y de guías especializadas (European Pharmacopoeia, 2015).**

Se estudiaron los siguientes parámetros:

- **Valor Predictivo Positivo (PPV)** para determinar la probabilidad de que una muestra sea verdadera positiva cuando el método alternativo proporciona un resultado positivo (Anderson et al., 2011; Tomas et al., 2009).

$$PPV = \frac{PA}{PA + PD} \times 100$$

- **Valor Predictivo Negativo (NPV)** considerado como la probabilidad de que una muestra sea verdadera negativa cuando el método alternativo proporciona un resultado negativo (Anderson et al., 2011; Tomas et al., 2009)

$$NPV = \frac{NA}{NA + ND} \times 100$$

- **Precisión del método alternativo** para calcular el grado de concordancia entre resultados analíticos independientes, obtenidos en condiciones de repetibilidad y reproducibilidad. Se utilizaron los datos de los TD de las muestras contaminadas artificialmente y se estudió a través de los coeficientes de variación intraensayo (repetibilidad) e interensayo (reproducibilidad) expresados en %.

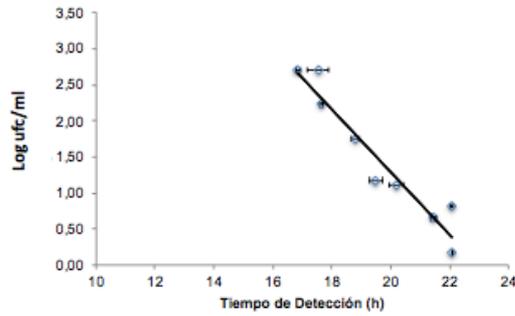
$$CV = \frac{\text{desviación estándar}}{\text{media}} \times 100$$

Los valores de CVs comprendidos entre 10-15 % se consideraron aceptables (European Pharmacopoeia, 2015).

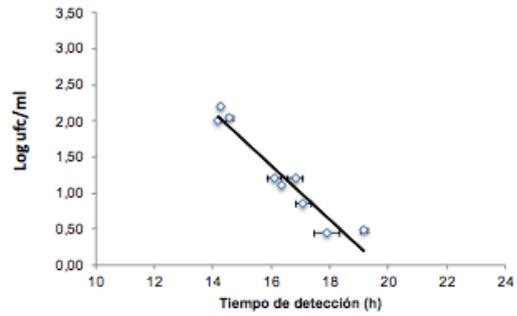
1.2. Resultados y discusión

1.2.1. Curvas de calibración

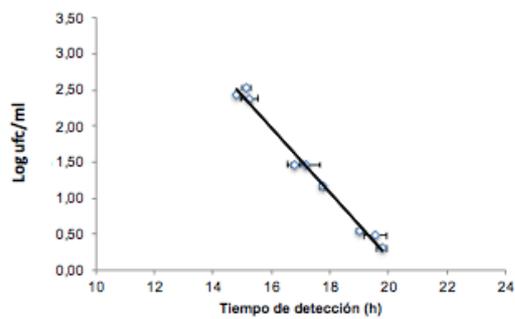
Las curvas de calibración obtenidas para cada microorganismo en cultivo puro se muestran en la Figura 13.



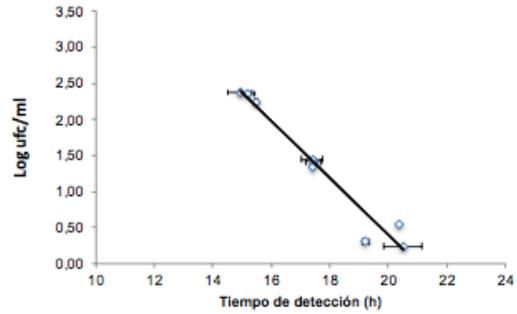
A. *L. monocytogenes* CECT 4031
 $y = -0,44x + 10,091$ $R^2=0,93$



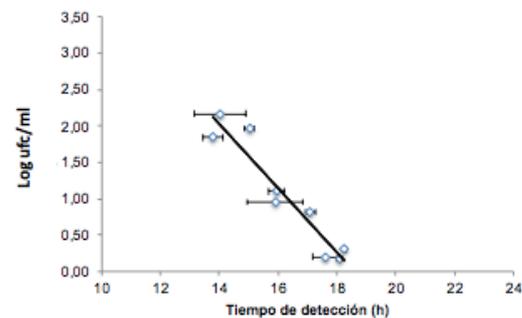
B. *L. monocytogenes* CECT 934
 $y = -0,3754x + 7,3925$ $R^2=0,93$



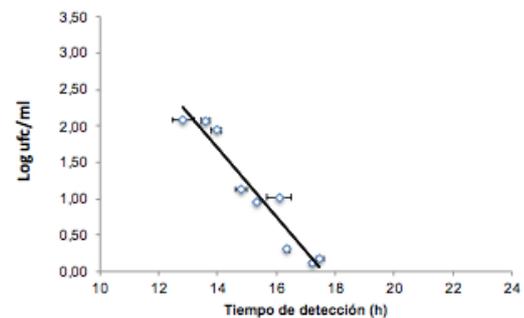
C. *L. monocytogenes* UZ64
 $y = -0,4549x + 9,2645$ $R^2=0,99$



D. *L. monocytogenes* UZ12
 $y = -0,3945x + 8,2874$ $R^2=0,96$



E. *L. innocua* UZ65
 $y = -0,4416x + 8,2082$ $R^2=0,91$



F. *L. innocua* UZ63
 $y = -0,4726x + 8,3209$ $R^2=0,93$

Figura 13. Curvas de calibración de las diferentes cepas de *Listeria* spp. obtenidas mediante impedanciometría en cultivo puro. Cada punto está formado por la media de la concentración inicial del inóculo en log ufc/ml (eje y) y la media \pm desviación estándar del Tiempo de Detección (TD) de dos replicados (eje x). Se muestra el coeficiente de determinación (R^2) y la ecuación de regresión lineal de cada cepa ensayada (A-F).

Todas las curvas se ajustaron a un modelo lineal, presentando excelentes coeficientes de correlación ($r > 0,95$). Los coeficientes de determinación obtenidos (R^2) estuvieron entre 0,91 y 0,99. Otros autores, como Ruan et al. (2003) realizaron curvas de calibración del patógeno por este método en caldo LEB (*Listeria Enrichment Broth*), con un rango de respuesta lineal de 10^0 a 10^5 ufc/ml y elevado coeficiente de determinación ($R^2 > 0,98$). Sin embargo, al igual que en nuestro estudio, los tiempos de detección obtenidos para cada cepa no permitieron distinguir entre las diferentes especies de *Listeria*.

De forma global, los TD de *Listeria* spp. obtenidos estuvieron comprendidos entre $12,82 \pm 1,94$ h y $21,87 \pm 0,35$ h. Conforme a lo descrito en la literatura científica, los TDs aumentaron cuando disminuyó la concentración inicial de microorganismos (Yang & Bashir, 2007). Los TDs de todas las cepas ensayadas presentaron un incremento medio de $2,37 \pm 0,93$ h cuando la concentración inicial disminuyó 1 log ufc/ml. Gracias a esta aproximación en cultivo puro, se observó que la impedanciometría fue capaz de detectar bajas concentraciones iniciales (1-2 ufc/ml) de las diferentes cepas de *Listeria* spp. en el medio de cultivo.

Los tiempos de detección obtenidos para cada cepa se muestran en la Figura 14. Se observó una variabilidad moderada entre cepas. Para los tres niveles de contaminación ensayados (10^2 , 10^1 y 1 ufc/ml), *L. monocytogenes* CECT 4031 presentó los TDs más largos ($17,34 \pm 0,43$ h, $19,50 \pm 0,70$ h, y $21,87 \pm 0,35$ h, respectivamente), con hasta dos horas de diferencia con el resto de las cepas de su misma especie.

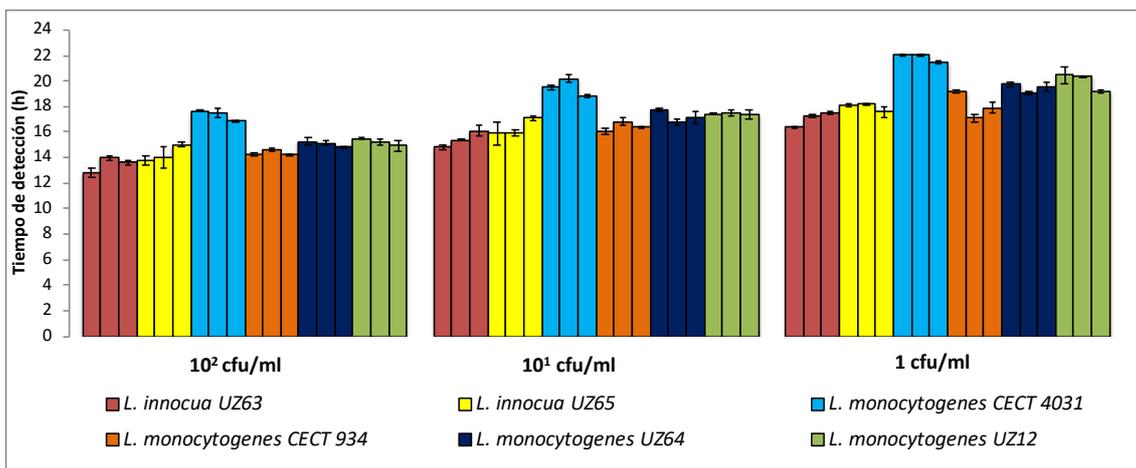


Figura 14. Tiempos de detección de los tres niveles de contaminación inicial (10^2 , 10^1 y 1 ufc *Listeria* spp./ml) en cultivo puro. Cada barra indica la media \pm desviación estándar de dos replicados para cada cepa.

De forma similar a los resultados de nuestro estudio, otros autores han observado una variabilidad moderada en el crecimiento entre cepas de *Listeria* spp., asociada a diferentes tiempos de generación, fase de latencia y velocidad de crecimiento exponencial (Barbosa,

Cabedo, Wederquist, Sofos, & Schmidt, 1994; Guillier & Augustin, 2006; Nufer, Stephan, & Tasara, 2007). En nuestro estudio, a pesar de la variabilidad observada, la impedanciometría fue capaz de detectar todas las cepas de *L. monocytogenes* y *L. innocua* ensayadas en cultivo puro, con un TD máximo de $22,07 \pm 0,03$ h en la concentración más baja ensayada.

1.2.2. Tiempos de generación

L. innocua UZ65 presentó el tiempo de generación más corto, seguido de *L. monocytogenes* CECT 934, *L. innocua* UZ63, *L. monocytogenes* UZ64, *L. monocytogenes* CECT 4031 y *L. monocytogenes* UZ12 (Tabla 10).

Tabla 10. Tiempos de generación de las cepas de *Listeria* spp. ensayadas.

Cepa	Tiempo de generación (min) ^a
<i>L. monocytogenes</i> CECT 4031	40,76±0,88
<i>L. monocytogenes</i> CECT 934	33,47±7,95
<i>L. monocytogenes</i> UZ64	38,91±3,39
<i>L. monocytogenes</i> UZ12	43,48±4,21
<i>L. innocua</i> UZ63	38,56±0,64
<i>L. innocua</i> UZ65	32,12±2,76

^aMedia ± Desviación estándar.

Los tiempos de generación observados son similares entre las cepas ensayadas, no encontrando diferencias estadísticamente significativas entre ellos ($p \geq 0,05$, nivel de confianza 95 %). Por ello, las diferencias de los tiempos de detección no pudieron ser explicados por los distintos tiempos de generación de cada cepa. Así pues, estas diferencias en los TD podrían estar relacionadas con fases de latencia de menor duración en los microorganismos con los tiempos de detección más cortos.

Diversos estudios han observado una elevada variabilidad en el tiempo de generación en función de la cepa y el medio ensayado. Así, Carvalheira, Eusébio, Silva, Gibbs, & Teixeira (2010) obtuvieron tiempos mayores a los observados en nuestro estudio entre cepas de *L. innocua* (124 a 167 min) y *L. monocytogenes* (119 a 130 min) en caldo TSB-YE (*Trypone Soya Broth-Yeast Extract*). Cornu, Kalmokoff, & Flandrois (2002) también encontraron diferencias en los tiempos de generación entre cepas de ambas especies, ensayando diferentes medios de cultivo (caldo BHI y BCM *Listeria*). Los tiempos de generación fueron similares a los observados en nuestro estudio.

1.2.3. Efecto de las condiciones de estrés de *Listeria* spp. en el tiempo de detección

Los TD (horas) de las tres cepas de *Listeria* spp. obtenidos por impedanciometría y bajo las dos condiciones de estrés aplicadas (A: pH 5,5, 4 % NaCl y 96 h/4°C; B: pH 6,5; 4 % NaCl y 96 h/4°C) se muestran en la Tabla 11.

Tabla 11. Tiempo de detección (TD) de diferentes cepas de *Listeria* spp. en jamón curado, sometidas a diferentes condiciones de estrés.

	Condiciones	TD (h)
<i>L. monocytogenes</i> UZ64	A	21,28 – 22,73
	B	18,60 – 19,69
<i>L. monocytogenes</i> UZ12	A	28,41 – 30,44
	B	24,04 – 25,27
<i>L. innocua</i> UZ63	A	27,56 – 30,10
	B	30,50 – 32,59

TD = Tiempo de detección con un intervalo de confianza del 95 %.

Condiciones A: pH 5,5, 4 % NaCl y 96 h/4 °C.

Condiciones B: pH 6,5, 4 % NaCl y 96 h/4 °C.

Como se puede observar, las condiciones de estrés previas a las que fueron sometidas las cepas de estudio influyeron en los tiempos de detección obtenidos. En el caso de las dos cepas de *L. monocytogenes*, las condiciones A incrementaron el TD en relación a las condiciones B. Concretamente, esta diferencia para las cepas *L. monocytogenes* UZ64 y UZ12 fue de $2,66 \pm 0,02$ h y $4,77 \pm 0,04$ h, respectivamente. Sin embargo, *L. innocua* UZ63 no mostró diferencias significativas entre los TD en las condiciones A y B.

Algunos autores han señalado que el efecto de condiciones estresantes como un pH desfavorable y baja a_w puede alargar la fase de latencia, ya que los microorganismos necesitan más tiempo para adaptarse a las nuevas condiciones. Esto puede afectar a los tiempos de detección e incluso puede dar lugar a la aparición de falsos negativos (Francois et al., 2006; Nufer et al., 2007). En nuestro estudio, las condiciones A previas a la inoculación pudieron alargar más la fase de latencia del microorganismo, con respecto a las condiciones B, afectando negativamente a la concentración final del patógeno al finalizar el pre-enriquecimiento. A consecuencia de ello, el número de microorganismos inoculados para la medida de la impedancia pudo ser menor, dando lugar a tiempos de detección más largos. A pesar de ello, en nuestro estudio, este hecho no afectó a la detección del patógeno, ya que el microorganismo fue detectado en todas las muestras inoculadas, no apareciendo falsos negativos.

Independientemente de las condiciones previas de estrés, *L. monocytogenes* UZ64 presentó tiempos de detección más cortos que *L. monocytogenes* UZ12 (nivel de confianza del 95 %, $p < 0,05$).

$p < 0,05$). En este caso, *L. monocytogenes* UZ64 podría adaptarse mejor a las condiciones de estrés previas a la inoculación y/o la matriz ensayada que *L. monocytogenes* UZ12, y por lo tanto, acortar su fase de latencia.

En condiciones de estrés extremas este patógeno es capaz de pasar a un estado viable pero no cultivable. Esta habilidad podría hacer al patógeno no detectable por metodologías basadas en el cultivo (Ayrapetyan & Oliver, 2016; Besnard, Federighi, & Cappelier, 2000; Guresch, Gerner, Pin, Wagner, & Hein, 2016). Sin embargo, en nuestro estudio, este hecho no afectó al resultado (presencia o ausencia de *L. monocytogenes* en 25 g). El pre-enriquecimiento en caldo half Fraser y el enriquecimiento en el medio de impedanciometría BiMedia 401A permitió la recuperación del microorganismo, independientemente de las condiciones de estrés previo, con tiempos de detección que oscilaron entre 17,6 y 32,6 h.

1.2.4. Evaluación de la impedanciometría combinada con OCLA para la detección de *L. monocytogenes* en jamón curado

Los resultados obtenidos de las 119 muestras de jamón analizadas por ambas metodologías se muestran en la Tabla 12.

Tabla 12. Resultados de la detección de *L. monocytogenes* en jamón curado mediante ambas metodologías.

Respuestas	Método referencia positivo (R+)	Método referencia negativo (R-)
Método alternativo positivo (A+)	24 (PA)	0 (PD)
Método alternativo negativo (A-)	0 (ND)	95 (NA)

PA: concordancia positiva; PD: desviación positiva; ND: desviación negativa; NA: concordancia negativa.

Con respecto a los parámetros establecidos a la norma ISO 16140-2:2016, los valores obtenidos para la sensibilidad del método alternativo y la veracidad relativa fueron del 100 %. El método alternativo mostró una elevada concordancia con el método de referencia, no apareciendo falsos positivos y negativos. Debido a la ausencia de los primeros, la ratio de falsos positivos del método alternativo fue 0 %, siendo el mejor valor posible. La suma de las desviaciones negativa y positiva (ND+PD) y, la diferencia entre las desviaciones negativa y positiva (ND+PD) fue de 0 para ambos parámetros. Estos valores cumplieron con los límites de aceptabilidad, por lo que la evaluación preliminar de este método alternativo se consideró muy positiva.

En relación a los parámetros estudiados de NordVal, la sensibilidad y especificidad relativas fueron del 100 % y el valor kappa de Cohen fue de 1. Así pues, este método cumplió con los límites de aceptabilidad establecidos para todos los parámetros ensayados (NordVal, 2017).

En cuanto a los parámetros extraídos de la bibliografía científica, los valores predictivo positivo y predictivo negativo fueron del 100 % para ambos, indicando la elevada probabilidad de que método alternativo sea capaz de detectar un verdadero positivo y negativo, respectivamente.

No se detectó la presencia del patógeno en ninguna de las 65 muestras de jamón curado comercial analizadas por los métodos de referencia y alternativo, indicando su baja prevalencia en este alimento.

En las muestras contaminadas de forma experimental, el método alternativo fue capaz de detectar 1 ufc *L. monocytogenes*/25 g, indicando su adecuada capacidad para la detección de patógeno en muestras de jamón curado. La composición del medio de cultivo y el microorganismo diana son factores que pueden tener una elevada influencia en la medida de la impedancia, ya que están relacionados con el tiempo de detección y la sensibilidad del método. En nuestro estudio, el medio utilizado permitió la multiplicación *Listeria* spp. así como la inhibición de la flora acompañante presente en el jamón, proporcionando una señal eléctrica adecuada.

Los resultados obtenidos demuestran la utilidad de la impedanciometría para la detección del patógeno en jamón curado, ya que hasta la fecha no ha sido evaluada esta técnica en matriz cárnica. Sin bien, esta metodología fue estudiada por Ruan et al. (2003) en leche, obteniendo bajos niveles de detección (0-0,3 ufc/ml) y una elevada concordancia con el método de referencia. En este mismo trabajo, los TD obtenidos para un nivel de inóculo de 1 ufc/ml fueron de 17 h, similares a los obtenidos en una de las cepas de nuestro estudio (17,6 h).

Otras metodologías alternativas como la PCR han presentado buenos valores de veracidad, especificidad y sensibilidad relativas (>80 %), así como han aportado rapidez y sencillez al análisis de patógeno (Dalmasso et al., 2014; Gianfranceschi et al., 2014). Capita, Alonso-Calleja, Moreno, & García-Fernandez (2001) realizó una comparativa entre un método basado en el cultivo con identificación en agar PALCAM y Oxford, y un método de inmunoensayo para la detección de *Listeria* spp. En este trabajo, el límite de detección fue de 3-7 log ufc/ml, siendo superior a lo observado en nuestro estudio. El inmunoensayo presentó una veracidad (92,5 %), especificidad (80 %) y sensibilidad (94,3 %) inferiores a nuestro estudio, apareciendo falsos positivos y negativos. En este tipo de metodologías, Välimaa, Tilsala-Timisjärvi, & Virtanen (2015) señalaron la importancia de un diseño correcto del ensayo para evitar reacciones cruzadas, ya que disminuyen la especificidad del método.

Los resultados del estudio de la precisión del método alternativo, a través del cálculo de los coeficientes de variación intra e interensayo de los TD, se presentan en la Tabla 13. Dicha tabla

muestra los resultados obtenidos en %, para cada cepa y en las dos condiciones de estrés ensayadas.

Tabla 13. Coeficientes de variación intra e interensayo (expresados en %) de los tiempos de detección.

Microorganismo	CV intraensayo ^a (%)		CV interensayo ^b (%)	
	Condiciones A	Condiciones B	Condiciones A	Condiciones B
<i>L. monocytogenes</i> UZ64	3,2	5,4	6,2	5,6
<i>L. monocytogenes</i> UZ12	6,1	5,1	6,9	5,2
<i>L. innocua</i> UZ63	3,7	0,8	5,7	6,5

Coeficiente de variación intraensayo.

Coeficiente de variación interensayo.

Condiciones A: pH 5,5, 4 % NaCl y 96 h/4°C; Condiciones B: pH 6,5, 4 % NaCl y 96 h/4°C.

Los coeficientes de variación intra e interensayo estuvieron comprendidos entre 0,8 % y 6,9. % En todos los ensayos los coeficientes de variación fueron inferiores al 10 %, indicando una adecuada precisión del método alternativo ya que se adecúan al criterio de aceptación establecido por European Pharmacopoeia (2015). No existen en la literatura científica estudios de precisión de esta metodología para la detección de *Listeria* spp. en matrices cárnicas. Sin embargo, Barreiros dos Santos et al. (2013) desarrollaron un método basado en esta técnica para la detección de *E. coli* O157:H7, obteniendo resultados similares a los de nuestro estudio (CV <7 %).

1.2.5. Características de la impedanciometría combinada con OCLA para la detección de *L. monocytogenes*

Mediante el método alternativo, se obtuvo un resultado positivo confirmado entre cuatro y cinco días. Ésto supuso un ahorro de hasta cuatro días con respecto al método de referencia. El método alternativo proporcionó resultados negativos a *Listeria* spp. en un corto periodo de tiempo (<3 días). El método es sencillo y permite el análisis simultáneo de 21 muestras, facilitando el flujo de trabajo en el laboratorio.

La impedanciometría combinada con agar cromogénico OCLA podría ser una herramienta útil para mejorar el control del patógeno en jamón curado, facilitando la toma rápida de decisiones por parte de la industria y de esta manera, garantizar la salud pública. Asimismo, la obtención de resultados en menor tiempo permitiría a la industria liberar de manera más ágil los lotes de alimentos, disminuyendo los costes e incrementando su competitividad.

2. Evaluación de mejoras de la impedanciometría y de otros métodos alternativos (PCR a tiempo real) para la detección de *L. monocytogenes* en jamón curado

La aparición en el mercado de mejoras relacionadas con la impedanciometría dirigidas a simplificar la metodología, reducir el tiempo de análisis e incrementar el número de muestras analizadas de forma simultánea, implicó su evaluación en el presente estudio. Dichas modificaciones fueron las siguientes:

- Medio de cultivo: utilización del caldo One Broth Listeria (Oxoid) tanto para el pre-enriquecimiento como para la medida de la impedancia.
- Equipo: cambio al equipo BacTrac 4300 (SY-LAB Geräte GmbH), que presenta mayores prestaciones, reduciendo el tiempo de medida de la impedancia de 40 a 24 h y permite el análisis de 64 muestras de forma simultánea.
- Métodos de identificación de la especie *L. monocytogenes*, mediante:
 - a) Agar cromogénico (Rapid L. mono) con un periodo de incubación menor con respecto al OCLA.
 - b) Kit basado en la hibridación específica de RNA (RiboFlow® Listeria Twin, SY-LAB Geräte GmbH).

Por otro lado, se evaluó la técnica PCR a tiempo real, como un método molecular que permite reducir el tiempo de análisis, así como analizar un número elevado de muestras simultáneamente.

2.1. Material y métodos

Los parámetros estudiados de la norma ISO fueron la exclusividad e inclusividad, el nivel de detección 50 y el nivel de detección relativo, así como el estudio de sensibilidad. Por otro lado, se evaluaron los parámetros de sensibilidad y especificidad relativas establecidos por NordVal International. Los valores predictivos positivos y valores predictivos negativos se determinaron siguiendo la bibliografía científica (Anderson et al., 2011; Tomás et al., 2009).

La exclusividad e inclusividad se determinaron en cultivo puro, mientras que para el resto de parámetros, se utilizaron muestras de jamón curado comerciales, de las que se desconocía la presencia natural de *L. monocytogenes*, así como muestras de jamón curado contaminadas experimentalmente con el patógeno.

Los métodos alternativos evaluados fueron los siguientes:

- Método A: Impedanciometría (One Broth + BacTrac 4300) combinada con siembra en agares cromogénicos OCLA y Rapid L. mono.
- Método B: Impedanciometría (One Broth + BacTrac 4300) combinada con hibridación de RNA (RiboFlow® *Listeria* Twin).
- Método C: PCR a tiempo real (iQ-Check® *Listeria monocytogenes* II Kit, Bio-Rad).

En la Figura 15 se muestra un esquema de las metodologías alternativas y de referencia utilizadas para la detección de *L. monocytogenes*, tanto en cultivo puro como en jamón curado.

Dado que la exclusividad e inclusividad se determinan en cultivo puro y, el resto de parámetros citados anteriormente en matriz alimentaria, la muestra a analizar fue diferente para cada parámetro. Para determinar la exclusividad e inclusividad, el caldo de pre-enriquecimiento fue inoculado directamente (sin matriz). Para la determinación del límite de detección 50 y el límite de detección relativo, la muestra fue de 100 g de jamón curado y para el resto de parámetros de 25 g de jamón curado comercial o contaminado experimentalmente.

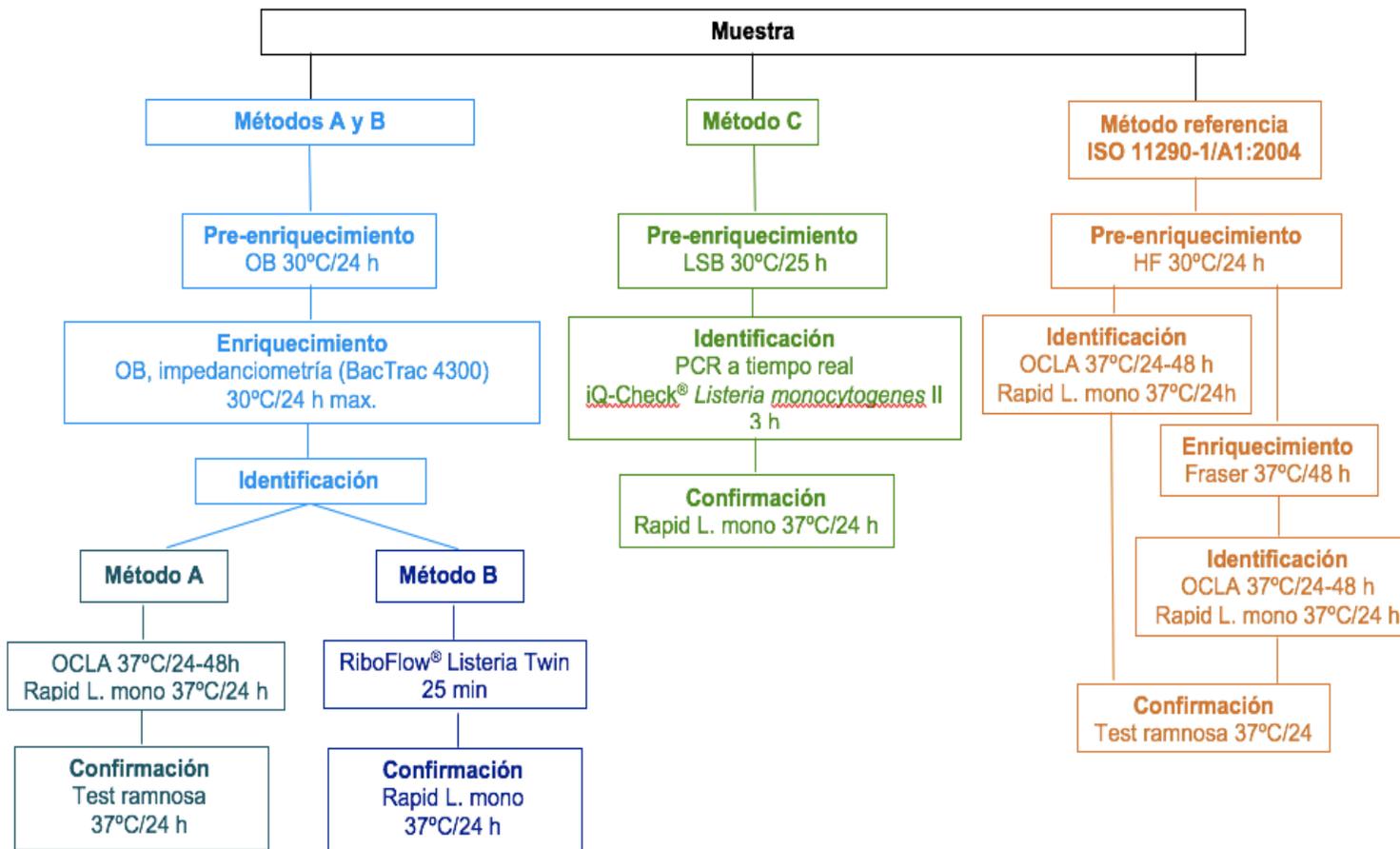


Figura 15. Esquema de las cuatro metodologías ensayadas para la detección de *L. monocytogenes*. Método A: impedanciometría combinada con OCLA y Rapid L. mono. Método B: impedanciometría combinada con *RiboFlow*® *Listeria Twin*. Método C: PCR a tiempo real (*iQ-Check*® *Listeria monocytogenes II* Kit). OB: One Broth Listeria; LSB: Listeria Special Broth; HF: Half Fraser; OCLA: Oxoid Chromogenic Listeria Agar.

A continuación, se describen los protocolos de los métodos alternativos y de referencia.

2.1.1. Método A: impedanciometría (One Broth + BacTrac 4300) combinada con agares cromogénicos OCLA y Rapid L. mono

El fundamento de la impedanciometría ha sido descrito anteriormente en el apartado 1.1.1. del presente capítulo, si bien, en este estudio, la medición de la impedancia se realizó en un equipo BacTrac 4300, que permite el análisis de un mayor número de muestras en menor tiempo. (Figura 16).



Figura 16. Equipo de impedanciometría BacTrac 4300.

Este aparato mide el E %, que es la reducción relativa de la impedancia de los electrodos (valor E), comparada con el valor inicial de impedancia (E0). La muestra se considera positiva (presencia de *Listeria* spp.) cuando se observa una curva típica de cambio de impedancia (E %) superando el valor umbral establecido.

En la etapa de pre-enriquecimiento, la muestra se incubó a 30°C/24 h en caldo One Broth *Listeria* (OB). Posteriormente, 1 ml del pre-enriquecimiento se añadió a 9 ml de caldo OB en celdillas específicas de cuatro electrodos (SY-LAB Geräte GmbH). Las celdillas se introdujeron en el BacTrac 4300 y el análisis se realizó a 30°C durante un máximo de 24 h. El valor umbral de E % se fijó en el 5 % para evitar el ruido de fondo del equipo. En las muestras en las que se observa una curva típica de cambio, se identifica la especie patógena, mediante siembra en OCLA y Rapid L. mono con posterior incubación a 37°C/24-48 h y a 37°C/24 h, respectivamente.

En el agar Rapid L. mono, las colonias típicas de *L. monocytogenes* son de color azul, azul-grisáceo sin viraje del color del medio. El medio contiene un sustrato cromogénico de la enzima fosfatidilinositol-fosfolipasa C (PIPLC), xilosa e indicador de pH rojo fenol. El color de las colonias se debe a la actividad de la enzima PIPLC sobre el sustrato cromogénico. *L. monocytogenes* no puede fermentar la xilosa, por lo que el medio permanece rojo al no disminuir el pH del medio alrededor de la colonia (Figura 17). En el caso de *L. ivanovii*, las colonias típicas presentan la misma morfología que *L. monocytogenes*, sin embargo, el medio a su alrededor vira a color amarillo. El resto de especies de *Listeria* se visualizan como colonias de color blanco. En el caso de *L. innocua*, *L. seeligeri* y *L. grayi* no hay viraje del color del medio, permaneciendo rojo; mientras que en las colonias de *L. welshimeri*, el medio cambia a amarillo alrededor de la colonia.

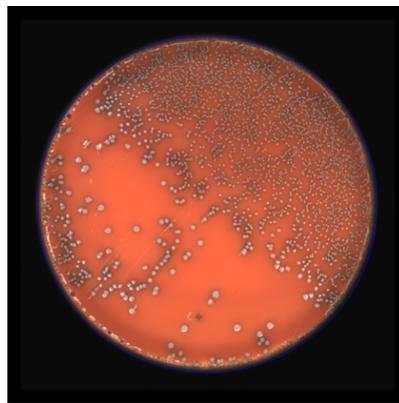


Figura 17. Colonias típicas de *L. monocytogenes* en agar Rapid L. mono.

Las colonias de *L. monocytogenes* presuntivas de ambos medios se confirmaron mediante el test de la ramnosa, descrito en el método de referencia ISO 11290-1 (apartado 1.1.2.3.) (37°C/24 h).

2.1.2. Método B: impedanciometría (One Broth + BacTrac 4300) combinada con RiboFlow® *Listeria Twin*

En esta metodología, las etapas de pre-enriquecimiento e impedanciometría son comunes al método A, descrito previamente (apartado 2.1.1.). Tras la impedanciometría, las muestras en las que se detecta *Listeria* spp. se identifica la especie de *L. monocytogenes* mediante el kit RiboFlow® *Listeria Twin*, basado en la hibridación específica de una secuencia de rRNA diana de *L. monocytogenes*. El método está basado en la inmunocromatografía de flujo lateral.

Para ello, se tomaron 0,5 ml de la muestra positiva y se centrifugaron a 7.000 g/5 min. El sobrenadante se eliminó y se siguió con el análisis siguiendo las instrucciones del fabricante.

En la ventana de este dispositivo, la identificación de la especie patógena se observa con tres líneas de color rojo en el siguiente orden descendente: control, *L. monocytogenes* y *Listeria spp.* (Figura 18).

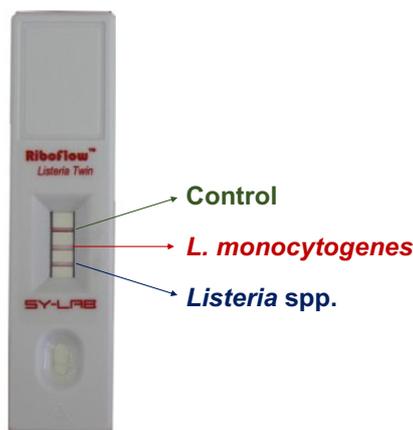


Figura 18. Identificación de *L. monocytogenes* en el dispositivo RiboFlow[®] Listeria Twin.

De forma paralela, todas las muestras positivas a *L. monocytogenes* se confirmaron en agar Rapid L. mono (37°C/24 h).

2.1.3. Método C: PCR a tiempo real (iQ-Check[®] Listeria monocytogenes II Kit)

El fundamento del kit iQ-Check[®] *Listeria monocytogenes* II se basa en la amplificación de una secuencia específica del gen *hlyA* de *L. monocytogenes*. La señal de fluorescencia está producida por una sonda que se hibrida específicamente con un fragmento de dicho gen. Esta sonda se encuentra unida de forma covalente al fluoróforo FAM (6-carboxifluoresceína), que emite fluorescencia cuando la sonda está hibridada. Por otro lado, este kit dispone de un control interno de amplificación (CIA), cuya sonda está unida al fluoróforo HEX (6-carboxi-2,4,4',5',7,7'-hexaclorofluoresceína succinimidil ester) y que sirve para detectar posibles inhibiciones en la reacción PCR. En PCR a tiempo real, se considera una muestra positiva cuando la señal de fluorescencia aumenta de forma exponencial, superando un determinado valor umbral. El ciclo en el que la fluorescencia supera el valor umbral se define como C_q (*quantification cycle*).

En la primera etapa del análisis (pre-enriquecimiento), las muestras se incubaron en caldo Listeria Special Broth (LSB, Bio-Rad) a 37°C/25 h. Posteriormente, se llevó a cabo la extracción del DNA mediante lisis química y mecánica. Para ello, se tomaron 100 µl del pre-enriquecimiento y 100 µl del reactivo de lisis y se dispusieron en el equipo Disruptor Genie[®] Cell Disruptor durante 4 min. Tras este paso, el pre-enriquecimiento se mantuvo en refrigeración hasta su utilización en la etapa de confirmación (<5 h). Después, se incubaron en un bloque térmico (SBH 130/Stuart[®], Staffordshire, UK) a 98°C/15 min y se centrifugaron en la microcentrífuga

Microfuge 18 Centrifuge (Beckman Coulter™, Nyon, Switzerland) a 11.000 g durante 4 min. Se recogió el sobrenadante en un tubo libre de DNA y se mantuvo en frío (-20°C) hasta su análisis.

Para la amplificación mediante PCR a tiempo real se añadieron 5 µl del DNA extraído a 45 µl de mezcla de amplificación (proporcionada por el kit). El protocolo de amplificación constó de una desnaturalización inicial a 95°C/10 min, seguido de 49 ciclos de desnaturalización a 94°C/15 s, hibridación a 58°C/20 s y extensión a 72°C/30 s. La amplificación tuvo lugar en el equipo MiniOpticon® Real Time PCR System (Bio-Rad). El software utilizado fue el CFX Manager™ Bio-Rad versión 4.5 (Bio-Rad). En todos los ensayos se incorporaron controles positivos y negativos, tanto de extracción como de la reacción PCR.

La muestra se consideró positiva (presencia de *L. monocytogenes*) cuando el valor Cq ≥10 para la diana de *L. monocytogenes* (canal FAM) y Cq ≥28 para el CIA (canal HEX) (Figura 19).

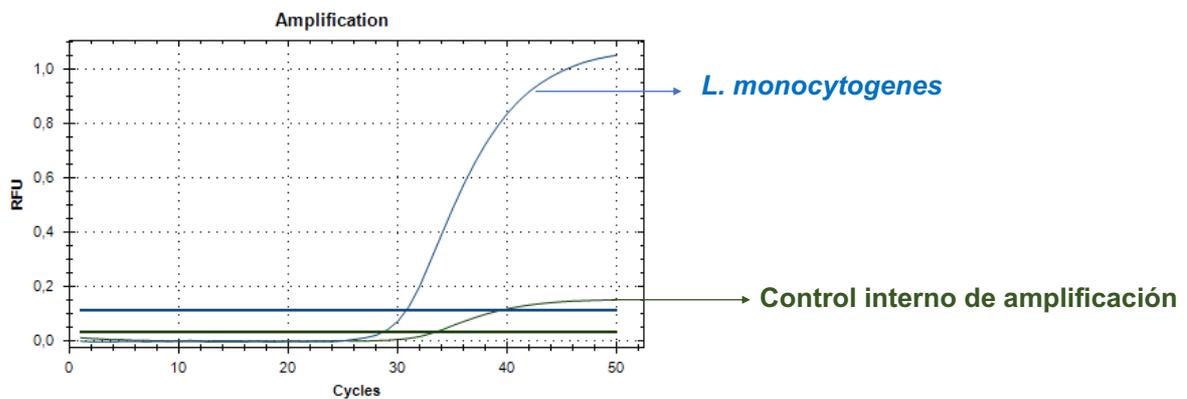


Figura 19. Curvas de amplificación de *L. monocytogenes* y control interno mediante PCR a tiempo real.

Las muestras positivas por PCR a tiempo real se confirmaron mediante la siembra de 0,1 ml del pre-enriquecimiento en agar Rapid L. mono (37°C/24 h). La morfología característica de *L. monocytogenes* en este medio se ha descrito en el apartado 2.1.1.

2.1.4. Método de referencia ISO 11290-1/A 1:2004

Las muestras se analizaron conforme a la norma ISO 11290-1/A 1:2004 descrita en el 1.1.2. En la identificación de *L. monocytogenes* se incorporó el agar Rapid L. mono junto con el OCLA, y para la confirmación de la especie patógena, se utilizó el test de la ramnosa como prueba bioquímica.

2.1.5. Evaluación de los métodos alternativos

Los parámetros de validación ensayados fueron: inclusividad y exclusividad, nivel de detección 50 y nivel de detección relativo, y el estudio de sensibilidad (ISO 16140-2:2016), la sensibilidad y especificidad relativas e índice kappa de Cohen (NordVal, 2017), así como los valores predictivos positivos y negativos (Anderson et al., 2011; Tomas et al., 2009).

2.1.5.1. ISO 16140-2:2016

- **Exclusividad e inclusividad**

Se determinó la ausencia de interferencia en la detección del analito diana entre un grupo de cepas no diana (exclusividad) y entre un amplio grupo de cepas diana (inclusividad). La norma ISO establece que las cepas no diana seleccionadas deben ser filogenéticamente cercanas al microorganismo diana y/o estar presentes de forma habitual en el alimento.

Por ello, se utilizaron 11 cepas de diferentes especies y géneros de microorganismos relacionados con *L. monocytogenes* o con el jamón curado: seis cepas de *L. monocytogenes*, tres cepas de *L. innocua*, una cepa de *L. welshimeri* y *Enterococcus durans* CECT 411. Las 10 cepas de *Listeria* spp. utilizadas en este estudio fueron aisladas de diferentes alimentos en trabajos previos realizados en nuestro laboratorio (Tabla 14).

Se realizó la contaminación artificial en cultivo puro (sin matriz) de los medios de pre-enriquecimiento de los métodos alternativos y de referencia. Para ello, una colonia aislada de cada cepa se incubó durante 17 h a 37°C en 10 ml de caldo BHI. Posteriormente, se realizaron diluciones decimales seriadas en agua de peptona 0,1 %. Se inocularon 100 µl de la dilución adecuada en 225 ml de cada uno de los caldos de pre-enriquecimiento (OB, LSB, HF). En el caso de *Enterococcus durans* CECT 411, se inocularon 100 µl de la dilución adecuada en 225 ml de caldo BHI. Esto se realizó con el objetivo de evitar la inhibición del crecimiento del microorganismo en los diferentes caldos de pre-enriquecimiento, tal y como dicta la norma ISO. La concentración final de cada microorganismo inoculado en el caldo de pre-enriquecimiento se muestra en la Tabla 14. Cada cepa se analizó de forma independiente.

Tabla 14. Cepas y concentraciones microbianas (log ufc/muestra) utilizados para el estudio de la exclusividad e inclusividad.

Cepa	Origen	log ufc/muestra ^a
<i>L. monocytogenes</i> UZ22	Longaniza fresca	1,05±0,19
<i>L. monocytogenes</i> UZ64	Jamón curado	1,46±0,13
<i>L. monocytogenes</i> UZ102	Longaniza fresca	1,38±0,08
<i>L. monocytogenes</i> UZ104	Longaniza fresca	1,37±0,12
<i>L. monocytogenes</i> UZ106	Jamón curado	1,03±0,30
<i>L. monocytogenes</i> UZ108	Longaniza	1,33±0,10
<i>L. innocua</i> UZ1	Longaniza fresca	2,37±0,08
<i>L. innocua</i> UZ65	Superficie	1,81±0,14
<i>L. innocua</i> UZ68	Queso	2,17±0,14
<i>L. welshimeri</i> UZ40	Longaniza	2,33±0,08
<i>E. durans</i> CECT 411	Leche deshidratada	7,81±0,09

^amedia ± desviación estándar de seis replicados obtenidos mediante recuento en placa de agar BHI

La concentración de microorganismos en el inóculo se determinó mediante el recuento en placa de agar BHI (37°C/24 h). En cada ensayo, se incluyeron controles positivos y negativos. Para cada metodología, los controles estuvieron formados por 225 ml de medio de pre-enriquecimiento contaminado experimentalmente con 2X10³ ufc *L. monocytogenes* UZ64 (control positivo) y 225 ml de medio de pre-enriquecimiento sin contaminación (control negativo).

Todas las muestras se analizaron por triplicado por cada metodología.

- **Nivel de detección 50 (LOD₅₀) y Nivel de Detección Relativo (RLOD)**

Se determinó el Nivel de detección 50 (LOD₅₀) como el menor número de microorganismos cultivables que pueden detectarse en la muestra en un 50 % de las veces mediante los métodos alternativos y de referencia, y el Nivel de Detección Relativo (RLOD) como la relación entre el LOD₅₀ del método alternativo y el LOD₅₀ del método de referencia (Norma ISO 16140 2:2016):

$$RLOD = \frac{LOD50_{alt}}{LOD50_{ref}}$$

Estos parámetros se determinaron para cada metodología, mediante el análisis de muestras de jamón curado contaminadas experimentalmente en tres niveles de contaminación.

Se realizó la contaminación artificial de las muestras con *L. monocytogenes* UZ64 a partir de la dilución con una concentración de 2X10¹ ufc/ml. Los tres niveles de contaminación ensayados fueron: 0 ufc/25 g (Nivel 1), 0,3 ufc/25 g (Nivel 2) y 0,9 ufc/25 g (Nivel 3). Para cada metodología y nivel de contaminación, 100 g de jamón curado se homogeneizaron con 900 ml de caldo de pre-enriquecimiento en el equipo Stomacher a 260 rpm/2,5 min. Para evaluar los niveles 2 y 3

se inocularon 60 y 180 μl (2×10^1 ufc/ml), respectivamente. Tras la inoculación, se realizó una homogeneización adicional en el equipo Stomacher a 260 rpm/2,5 min.

Cada muestra se analizó por sextuplicado por cada metodología. Se utilizaron controles positivos y negativos para cada método. Para el control positivo, 25 g de jamón curado se inocularon con 2×10^3 ufc *L. monocytogenes* UZ64. Como control negativo se utilizaron las muestras del nivel 1 analizadas por cada método.

Ninguna de las metodologías alternativas comparte la etapa de pre-enriquecimiento con el método de referencia, por lo que se trata de un estudio no pareado. El límite de aceptabilidad del RLOD en estudios no pareados es 2,5. Si los valores son superiores a 2,5 se consideran métodos no válidos.

- **Estudio de sensibilidad**

Para realizar el estudio de sensibilidad, se analizaron muestras de jamón curado comerciales y contaminadas artificialmente por los métodos alternativos y de referencia. Para determinar una posible influencia de otras especies del género *Listeria* en el crecimiento de *L. monocytogenes*, se realizó la contaminación experimental de jamón curado con *L. monocytogenes* y *L. innocua* o *L. welshimeri* a diferentes concentraciones.

Para realizar esta parte del estudio, se analizaron 93 muestras de 25 g de jamón curado loncheado y envasado al vacío mediante los métodos A, B, C y de referencia, de forma paralela. De ellas, 44 fueron muestras comerciales y 49 de contaminación experimental. Estas muestras fueron diferentes a las del estudio de LOD_{50} y RLOD.

Para el análisis de las muestras de jamón comerciales, se tomaron 75 g de jamón curado y se homogeneizaron con 75 ml de agua destilada estéril en un equipo Stomacher a 260 rpm/2,5 min, obteniéndose una pasta homogénea. La muestra se subdividió en tres porciones de 50 g cada una. Para cada metodología, se homogeneizó una porción de 50 g con 200 ml del caldo de pre-enriquecimiento correspondiente (10 % más concentrado) en el equipo Stomacher a 260 rpm/2,5 min.

Para llevar a cabo la contaminación artificial, se seleccionaron las siguientes cepas de origen alimentario: *L. monocytogenes* UZ64, *L. monocytogenes* UZ108, *L. innocua* UZ1, *L. innocua* UZ68 y *L. welshimeri* UZ40. Se realizaron diluciones decimales seriadas en agua de peptona 0,1 %, hasta llegar a las concentraciones de 2×10^3 , 2×10^2 , 2×10^1 ufc/ml. Se prepararon 10 mezclas de *Listeria* spp. en proporciones 1:1 y 1:100 (*L. monocytogenes*:*Listeria* spp. no *monocytogenes*)

para inocular las muestras de jamón curado. La concentración de las diluciones utilizadas se confirmó mediante el recuento en agar BHI (37°C/24 h).

Posteriormente, se tomaron 100 g de jamón curado y se homogeneizaron con 100 ml de agua destilada estéril, siguiendo el procedimiento descrito anteriormente. En este caso, cada muestra se subdividió en cuatro porciones de 50 g. Tres de ellas fueron contaminadas con el inóculo seleccionado, mientras que la porción restante no se inoculó (control negativo). La concentración final de *Listeria* spp. (log ufc/25 g) en las muestras de jamón curado se observa en la Tabla 15.

Tabla 15. Distribución de las muestras de jamón curado contaminadas artificialmente analizadas por los métodos alternativos y de referencia para la detección de *L. monocytogenes* (n=49).

Microorganismos	Proporción de la mezcla	Contaminación Log ufc/25 g ^a	n	
<i>L. monocytogenes</i> UZ64	-	0,58±0,01	20	
<i>L. monocytogenes</i> UZ64 <i>L. innocua</i> UZ1	1:1	<i>L. monocytogenes</i> UZ64 <i>L. innocua</i> UZ1	0,42±0,07 0,32±0,09	3
	1:100	<i>L. monocytogenes</i> UZ64 <i>L. innocua</i> UZ1	0,42±0,07 2,32±0,09	3
<i>L. monocytogenes</i> UZ64 <i>L. innocua</i> UZ68	1:1	<i>L. monocytogenes</i> UZ64 <i>L. innocua</i> UZ68	0,42±0,07 0,19±0,13	3
	1:100	<i>L. monocytogenes</i> UZ64 <i>L. innocua</i> UZ68	0,42±0,07 2,19±0,13	3
<i>L. monocytogenes</i> UZ64 <i>L. welshimeri</i> UZ40	1:1	<i>L. monocytogenes</i> UZ64 <i>L. welshimeri</i> UZ40	0,42±0,07 0,40±0,06	3
	1:100	<i>L. monocytogenes</i> UZ64 <i>L. welshimeri</i> UZ40	0,42±0,07 2,40±0,06	3
<i>L. monocytogenes</i> UZ108 <i>L. innocua</i> UZ1	1:1	<i>L. monocytogenes</i> UZ108 <i>L. innocua</i> UZ1	0,29±0,12 0,32±0,09	2
	1:100	<i>L. monocytogenes</i> UZ108 <i>L. innocua</i> UZ1	0,29±0,12 0,32±0,09	3
<i>L. monocytogenes</i> UZ108 <i>L. welshimeri</i> UZ40	1:1	<i>L. monocytogenes</i> UZ108 <i>L. welshimeri</i> UZ40	0,29±0,12 0,40±0,06	3
	1:100	<i>L. monocytogenes</i> UZ108 <i>L. welshimeri</i> UZ40	0,29±0,12 2,40±0,06	3
Total			49	

^amedia ± desviación estándar de seis replicados obtenidos mediante recuento en placa del inóculo en agar BHI.

^bnúmero de muestras de jamón curado.

Tras este paso, las muestras se homogeneizaron con 200 ml del pre-enriquecimiento correspondiente a cada metodología (10 % más concentrado) en el Stomacher a 260 rpm/2,5 min. Todas las muestras (comerciales y de contaminación experimental) fueron analizadas por los métodos A, B, C y de referencia por triplicado.

. Los datos obtenidos del análisis de las muestras, se dispusieron en una tabla de resultados emparejados y se calcularon los siguientes parámetros (definidos en el apartado 1.1.2.4.):

- Sensibilidad del método alternativo (SE_{alt})
- Veracidad relativa (RT)
- Ratio de falsos positivos (FPR)
- Diferencia entre las desviaciones negativa y positiva (ND-PD).

Al tratarse de un estudio no pareado, el único límite de aceptabilidad que se aplica es para la diferencia entre las desviaciones positiva y negativa. Si los valores ND-PD son superiores a 3 se considera que el método no es válido.

2.1.5.2. NordVal International

A partir de la tabla de resultados emparejados obtenido en el estudio de sensibilidad se determinaron la sensibilidad y especificidad relativas, así como el índice kappa de Cohen. Estos parámetros y sus límites de aceptabilidad están descritos en el apartado 1.1.2.4.

2.1.5.3. Parámetros de la bibliografía científica (Anderson et al., 2011; Tomas et al., 2009)

Asimismo, se calcularon los valores predictivos positivos y negativos, extraídos de la bibliografía científica y definidos en el apartado 1.1.2.4.

2.1.6. Análisis estadístico

El análisis de los datos se llevó a cabo mediante los programas Excel 14.2.0, (Microsoft Corporation, Redmond, WA, USA) y SPSS statistics 22.0.0 (SPSS. Inc., Chicago, IL, USA). Para el estudio estadístico de los TD obtenidos por impedanciometría se utilizó el test t-student.

El LOD_{50} y RLOD se calcularon mediante el archivo Excel disponible para su descarga en la página <http://standards.iso.org/iso/16140/-2/ed-1/en>.

2.2. Resultados y discusión

2.2.1. Exclusividad e inclusividad

Todas las cepas ensayadas de *L. monocytogenes* fueron detectadas por los métodos A, B y C, mientras que estos métodos mostraron la exclusión de las otras especies (Tabla 16). Por lo que podemos confirmar que no existieron interferencias en la detección del patógeno por las tres metodologías en cultivo puro.

Tabla 16. Estudio de exclusividad e inclusividad de los métodos alternativos evaluados.

Microorganismo	Método A ^a	Método B ^b	Método C ^c
<i>L. monocytogenes</i> UZ22	+	+	+
<i>L. monocytogenes</i> UZ64	+	+	+
<i>L. monocytogenes</i> UZ102	+	+	+
<i>L. monocytogenes</i> UZ104	+	+	+
<i>L. monocytogenes</i> UZ106	+	+	+
<i>L. monocytogenes</i> UZ108	+	+	+
<i>L. innocua</i> UZ1	-	-	-
<i>L. innocua</i> UZ65	-	-	-
<i>L. innocua</i> UZ68	-	-	-
<i>L. welshimeri</i> UZ40	-	-	-
<i>E. durans</i> CECT 411	-	-	-

Cada microorganismo se analizó por triplicado (n=3).

^aMétodo A: impedanciometría combinada con ágar cromogénico OCLA y Rapid L. mono.

^bMétodo B: impedanciometría combinada con hibridación de RNA (*RiboFlow*[®] *Listeria Twin*).

^cMétodo C: PCR a tiempo real (*iQ-Check*[®] *Listeria monocytogenes* II Kit).

Discriminar *L. monocytogenes* de otras especies del género *Listeria* es uno de los principales inconvenientes a las que se enfrentan las metodologías de análisis. Esto se debe a que todas las especies son muy similares tanto filogenética como fenotípicamente (Graves et al., 2010).

En este sentido, los tres métodos alternativos fueron evaluados con resultados satisfactorios ya que no se observaron reacciones cruzadas con otras cepas ensayadas, incluyendo *L. innocua*, la especie más estrechamente relacionada con *L. monocytogenes* (Quero, Santovito, Visconti, & Fusco, 2014; Schmid et al., 2005).

2.2.2. Nivel de detección 50 y nivel de detección relativo

Tal y como se observa en la Tabla 17, todas las metodologías detectaron *L. monocytogenes* en todos los replicados del nivel de contaminación superior (0,9 ufc/25 g), mientras que en el nivel intermedio (0,3 ufc/25 g), el número de muestras positivas detectadas fue menor. Ninguno de los métodos detectó la presencia del patógeno en el nivel de contaminación 1 (0 ufc/25 g), por

lo que todos los métodos arrojaron un resultado negativo en las muestras en las que el patógeno no estaba presente.

El nivel de detección 50 (LOD₅₀) fue similar para los tres métodos alternativos, así como para el de referencia, siendo en todos los casos <1 ufc/25 g, y con valores muy similares para todas ellas. La impedanciometría combinada con OCLA y Rapid L. mono o combinada con Riboflow Listeria Twin mostraron un valor de RLOD de 1,265. En el método PCR a tiempo real, el RLOD fue de 1,000 ya que coincidieron los resultados de los tres niveles de contaminación con los obtenidos por el método de referencia.

Tabla 17. Nivel de detección 50 (LOD₅₀) y nivel de detección relativo (RLOD) de los tres métodos alternativos y de referencia en la detección de *L. monocytogenes*.

	Ratio ^b				
	0 ^c	0,3 ^c	0,9 ^c	LOD ₅₀ ^d	RLOD ^e
Método A^a	0/6	1/6	6/6	(0,3-0,7)	1,265
Método B^a	0/6	1/6	6/6	(0,3-0,7)	1,265
Método C^a	0/6	2/6	6/6	(0,2-0,6)	1,000
Método de referencia	0/6	2/6	6/6	(0,2-0,6)	1,000

^aMétodo A: impedanciometría combinada con ágaros cromogénicos OCLA y Rapid L. mono; Método B: impedanciometría combinada con hibridación de RNA (*RiboFlow*[®] *Listeria Twin* kit); Método C: PCR a tiempo real (*iQ-Check*[®] *Listeria monocytogenes* II Kit).

^bResultados positivos obtenidos de 6 replicados.

^cufc/25 g.

^dNivel de detección 50 (LOD₅₀) calculado como un intervalo de confianza del 95 %.

^eNivel de detección relativo (RLOD).

En base a la norma ISO, el límite de aceptabilidad para el RLOD en estudios no pareados es de 2,5. Este límite indica que el LOD₅₀ del método alternativo no debe ser más de 2,5 veces superior al LOD₅₀ del método de referencia. Como se observa, los RLOD obtenidos en todas las metodologías alternativas se situaron entre 1,000 y 1,265, cumpliendo con lo establecido en dicha norma.

Generalmente, la concentración de *L. monocytogenes* en alimentos es baja (<100 ufc/g), por lo que alcanzar un bajo límite de detección es clave para conseguir resultados fiables (Ricci et al., 2018). Por otro lado, la célula puede estar estresada y haber sufrido daños subletales debido al calor, la desecación o la presencia de componentes antimicrobianos, afectando negativamente a su crecimiento y, en consecuencia, a su detección (Wu, 2008). Por ello, los métodos de análisis deben permitir su revivificación, así como favorecer su multiplicación hasta alcanzar niveles adecuados para su detección. En este sentido, el pre-enriquecimiento es una etapa diseñada

para lograr la revivificación de los microorganismos, previa a la exposición a agentes selectivos utilizados para inhibir la flora acompañante (Delibato et al., 2009; Oravcová et al., 2007; Oravcová, Trnčíková, Kuchta, & Kaclíková, 2008; Rodriguez-Lazaro, Gonzalez-García, Gattuso, Gianfranceschi, & Hernandez, 2014). Si se produjera un fallo en esta etapa, la metodología arrojaría falsos negativos en alimentos contaminados con el patógeno, incrementando el riesgo de listeriosis en el consumidor, así como importantes pérdidas económicas en la industria productora.

En nuestro estudio, el LOD₅₀ se determinó siguiendo las directrices establecidas por la norma ISO 16140-2:2016. Sin embargo, en la bibliografía científica, los límites de detección son calculados y presentados desde diferentes aproximaciones, dificultando así la comparación entre los resultados obtenidos. Portanti et al. (2011) validaron un método ELISA para detectar *L. monocytogenes* en alimentos (carne, productos de la pesca y productos lácteos), obteniendo un valor de LOD₅₀ de 5-10 ufc/g, superior al observado en nuestro estudio. Gattuso et al. (2014) obtuvieron un límite de detección de 8 ufc/25 g, analizando carne de cerdo mediante pre-enriquecimiento en half Fraser y PCR a tiempo real, siendo superior a los obtenidos en nuestro estudio. Ruiz-Rueda, Soler, Calvó, & García-Gil (2011), establecieron un límite de detección de 5 ufc/25 g analizando 22 matrices diferentes, mediante pre-enriquecimiento en half Fraser combinado con PCR a tiempo real. Sin embargo, en alimentos como huevos y salmón ahumado únicamente consiguieron detectar 100 ufc/25 g. O'Grady et al. (2009) obtuvieron bajos límites de detección (1-5 ufc/25 g) analizando 175 muestras (carne, pescado, productos lácteos y postres) mediante pre-enriquecimiento en half Fraser combinado con PCR a tiempo real. Rossmanith, Krassnig, Wagner, & Hein (2006) observaron diferencias entre los límites de detección obtenidos en diferentes tipos de alimentos, analizados mediante pre-enriquecimiento en half Fraser junto con PCR a tiempo real. Los límites de detección fueron de 7,5 ufc/25 ml en leche en polvo, y de 1-9 ufc/15 g en salmón, paté y queso. Según estos autores, el límite de detección puede verse afectado por el tipo de alimento analizado, siendo necesario evaluar las metodologías para cada categoría de alimentos, y dentro de cada categoría, diferentes tipos de productos, tal y como describe la norma ISO 16140-2:2016.

2.2.3. Estudio de sensibilidad, sensibilidad y especificidad relativas, índice kappa de Cohen, y valores predictivos positivos y negativos

Los resultados emparejados de las 93 muestras de jamón curado, analizadas por los métodos A, B, C y de referencia se muestran en la Tabla 18. *L. monocytogenes* no fue detectada en ninguna de las muestras de jamón curado comercial analizadas (ausencia/25 g).

Tabla 18. Detección de *L. monocytogenes* en jamón curado mediante los tres métodos alternativos y de referencia (n=93).

Respuestas	Método referencia positivo	Método referencia negativo
Método A positivo	49 (PA)	0 (PD)
Método A negativo	0 (ND)	44 (NA)
Método B positivo	39 (PA)	1 (PD)
Método B negativo	10 (ND)	43 (NA)
Método C positivo	49 (PA)	0 (PD)
Método C negativo	0 (ND)	44 (NA)

Método A: impedanciometría combinada con ágar cromogénicos OCLA y Rapid L. mono.

Método B: impedanciometría combinada con hibridación de RNA (*RiboFlow*® *Listeria Twin*).

Método C: PCR a tiempo real (*iQ-Check*® *Listeria monocytogenes II*).

PA: concordancia positiva; NA: concordancia negativa; PD: desviación positiva; ND: desviación negativa.

La impedanciometría combinada con OCLA y Rapid L. mono, así como el método PCR a tiempo real, mostraron unos excelentes resultados en el **estudio de sensibilidad**, indicando una elevada concordancia entre ambos métodos y el de referencia. En estos dos métodos alternativos, la sensibilidad del método y la veracidad relativa presentaron valores del 100 %, ya que no aparecieron falsos positivos y negativos. Debido a esto, la ratio de falsos positivos fue 0 %. La diferencia de las desviaciones negativa y positiva (ND-PD) presentó un valor de 0, cumpliendo con el límite de aceptabilidad (<3) para estudios no pareados establecido por dicha norma.

Sin embargo, los resultados obtenidos por la impedanciometría combinada con *RiboFlow*® *Listeria Twin* mostraron una fiabilidad menor, presentando 10 falsos negativos y un falso positivo. A consecuencia de ello, la sensibilidad del método alternativo fue del 80 % y la veracidad relativa del 88,2 %. En este método, la ratio de falsos positivos presentó un valor del 2 %, mientras que la diferencia entre las desviaciones negativa y positiva fue 9, un valor muy superior al límite de aceptabilidad establecido por la norma ISO.

En la impedanciometría combinada con OCLA y Rapid L. mono, se observó una excelente concordancia entre los dos ágar cromogénicos, ya que en todas las muestras positivas a *L. monocytogenes*, el patógeno creció tanto en OCLA como en Rapid L. mono. Estos resultados coinciden con los obtenidos en estudios de comparación entre ambos, en los que se demuestran la adecuada fiabilidad del agar Rapid L. mono para la detección de *L. monocytogenes* (Becker et al., 2006; Garrec, Sutra, Picard, & Pourcher, 2003).

En relación a los parámetros establecidos por NordVal, la impedanciometría combinada con OCLA y Rapid L. mono, y el método de PCR a tiempo real presentaron valores del 100 % para la

sensibilidad y la especificidad relativas. Estos valores de sensibilidad relativa cumplieron con el límite de aceptabilidad establecido (>95 %). En ambos métodos, el **índice kappa de Cohen** fue de 1, señalando una muy buena concordancia de los resultados entre el método alternativo y de referencia.

En el caso la impedanciometría combinada con *RiboFlow*[®] *Listeria Twin*, la sensibilidad relativa fue 79,6 %, viéndose afectada negativamente por el elevado número de falsos negativos, por lo que no cumplió con el límite de aceptabilidad. En el caso de la especificidad relativa, la disminución fue menor (99,7 %), ya que solo se obtuvo un falso positivo. El índice kappa de Cohen fue de 0,7, considerado como de buena concordancia. Sin embargo, no cumplió con el criterio establecido por NordVal ($\geq 0,80$) para la validación de métodos microbiológicos alternativos.

En cuanto a los parámetros extraídos de la bibliografía científica, los **valores predictivos positivos y negativos** de la impedanciometría combinada con OCLA y Rapid L. mono, y del método PCR a tiempo real fueron del 100 % para ambos métodos. En cambio, en la impedanciometría combinada con *RiboFlow*[®] *Listeria Twin* estos valores fueron inferiores siendo el PPV 97,5 % y el NPV 81,1 %. Este último parámetro indicó una disminución en la probabilidad de que una muestra sea verdadera negativa cuando este método alternativo da un resultado negativo.

La detección de *L. monocytogenes* puede estar influenciada por características tanto intrínsecas como extrínsecas del alimento. El jamón curado es una matriz compleja, con un alto contenido en NaCl, grasa, y presencia de microbiota acompañante que podría afectar a la detección del patógeno (Barros et al., 2007; O'Grady et al., 2009; Suh & Knabel, 2001). En la puesta a punto de la impedanciometría combinada con OCLA, se observó que las condiciones de estrés a las que se sometió a *L. monocytogenes* previa inoculación no afectó a la detección del patógeno (Labrador, Rota, Pérez, Herrera, & Bayarri, 2018). Esto demostró que el medio de pre-enriquecimiento permitió la recuperación y multiplicación del patógeno. En el presente estudio, la impedanciometría combinada con OCLA y Rapid L. mono, y el método PCR a tiempo real no se vieron afectados por la matriz, detectando al patógeno en concentraciones muy bajas.

Hasta el momento, no se han publicado estudios en los que evalúen la impedanciometría combinada con hibridación de RNA, para la detección de *L. monocytogenes* en jamón curado, por lo que nuestro estudio es novedoso. En cambio, el uso de la PCR a tiempo real para este propósito ha sido estudiada en diversos productos cárnicos, encontrando resultados similares a nuestro estudio. Garrido et al. (2013) desarrolló un nuevo método PCR multiplex a tiempo real

para la detección de *Salmonella* spp. (gen *inv*) y *L. monocytogenes* (gen *hlyA*) en diferentes productos cárnicos, obteniendo valores del 100 % para la veracidad, sensibilidad y especificidad relativas. En cuanto a la amplificación del gen (*hlyA*) utilizado en nuestro estudio, ha sido ensayado por otros autores; así Rodríguez-Lázaro et al. (2014) analizaron 100 muestras de carne fresca de porcino y pollo mediante el método de referencia y PCR a tiempo real con este gen diana, presentando una veracidad relativa de 100 a 113,6 %, mejorando incluso los resultados obtenidos con el método de referencia. Al igual que en nuestro estudio, estos autores utilizaron un control interno de amplificación para confirmar que el resultado negativo no estuvo producido por una inhibición durante la amplificación. El uso de controles internos de amplificación permiten reducir la ratio de falsos negativos, siendo de gran importancia para garantizar la seguridad de los alimentos (Hoorfar et al., 2004).

2.2.4. Influencia de la presencia de *Listeria* spp. no patógena en la detección de *L. monocytogenes* en jamón curado

Diversos autores señalan que *L. monocytogenes* comparte nicho ecológico con otras especies del Género *Listeria*, especialmente, *L. innocua* y *L. welshimeri* (Sauders et al., 2012; Simmons et al., 2014; Vongkamjan et al., 2016). La contaminación de *L. monocytogenes* junto con otras especies de su género realizada en nuestro estudio permitió simular el posible escenario encontrado en el alimento. Los resultados obtenidos presentaron una gran importancia en la evaluación de las metodologías alternativas.

La impedanciometría combinada con OCLA y Rapid L. mono, el método PCR a tiempo real y el método de referencia no se vieron afectados por la presencia de otras especies de *Listeria* en la muestra. Estos métodos fueron capaces de detectar el microorganismo patógeno en todas las ocasiones en las que estuvo presente, independientemente de presencia de *L. innocua* o *L. welshimeri* a cualquiera de las concentraciones analizadas.

Sin embargo, la presencia de otras especies no patógenas en la muestra influyó negativamente en la impedanciometría combinada con *RiboFlow*[®] *Listeria Twin*. Los 10 falsos negativos obtenidos se correspondieron con muestras contaminadas de forma experimental con *L. monocytogenes* junto con otras cepas de *Listeria* spp.. En siete de ellos, la especie acompañante fue *L. innocua*, mientras que, en los otros tres, fue con *L. welshimeri*. En este método, el 90 % de los falsos negativos se observaron en muestras contaminadas con mezclas de proporción 1:100 (*L. monocytogenes*:*L. innocua* o *L. welshimeri*). Esto pudo estar debido a un alto límite de detección del kit de hibridación de RNA *RiboFlow*[®] *Listeria Twin* y la existencia de una influencia negativa en el crecimiento de *L. monocytogenes* por la presencia de *L. innocua* o *L. welshimeri*.

Durante el pre-enriquecimiento e impedanciometría en el caldo OB, el crecimiento de *L. monocytogenes* llegó a una concentración suficiente para su identificación mediante siembra en OCLA y Rapid L. mono. Sin embargo, podría no haberse multiplicado hasta niveles suficientes que pudieran ser detectados por el *RiboFlow*[®] *Listeria Twin*. Diferentes estudios han señalado la influencia negativa en el crecimiento de *L. monocytogenes* durante las etapas de pre-enriquecimiento y enriquecimiento, debido a la presencia de otras especies más competitivas de *Listeria* y/o por la producción de sustancias inhibitorias durante estas etapas (Besse et al., 2010; Keys, Dailey, Hitchins, & Derike Smiley, 2013; Oravcová et al., 2008; Zitz, Zunabovic, Domig, Wilrich, & Kneifel, 2011). A consecuencia de ello, se podría subestimar su presencia, dando lugar a falsos negativos.

2.2.5. Características de los métodos alternativos

En la impedanciometría (etapa común en los métodos A y B), los tiempos de detección de *L. monocytogenes* en las muestras contaminadas con esta especie fueron de 0,64 a 14,80 h, siendo menores en las muestras contaminadas junto con *L. innocua* o *L. welshimeri*, con respecto a las que el patógeno se encontraba de forma individual (nivel de confianza del 95 %, $p < 0,05$). De hecho, los tiempos de detección fueron de 0,64 a 13,95 h en muestras contaminadas con más de una especie de *Listeria* y de 7,19 a 14,80 h en muestras contaminadas con *L. monocytogenes* en solitario. Esto pudo deberse a que, en el primer caso la señal producida por *L. monocytogenes* se agregó a la generada por *L. innocua* o *L. welshimeri*.

La impedanciometría demostró ser un excelente método de *screening* inicial para muestras negativas (ausencia de *Listeria* spp.), ya que permitió conocer esta información en un tiempo de 48 h. Este método basado en el crecimiento microbiano permite diferenciar entre células vivas y muertas, siendo de gran utilidad para reducir la aparición de falsos positivos.

En la impedanciometría combinada con OCLA y Rapid L. mono, la evaluación en base a los diferentes parámetros de validación estudiados fue excelente, considerándose una metodología fiable. Destaca que ambos agares ofrecieron los mismos resultados con respecto a los parámetros de validación evaluados para la identificación del patógeno. Sin embargo, Rapid L. mono fue más rápido, ya que el periodo de incubación fue de 24 h, mientras que el OCLA necesitó 48 h. Con la impedanciometría combinada con Rapid L. mono se necesitaron de 2,5 a 4 días para obtener un resultado positivo confirmado. Este método mejoró el flujo de trabajo debido a que permitió el análisis simultáneo de hasta 64 muestras de una manera sencilla, eliminando las muestras negativas a *Listeria* spp. en 48 h.

La impedanciometría combinada con *RiboFlow*[®] *Listeria Twin* fue más rápida que el método de referencia, proporcionando resultados positivos confirmados en 48-72 h. Sin embargo, la mayor parte de los parámetros de validación estudiados fueron insatisfactorios, por lo que no se consideró una metodología fiable.

El método basado en la PCR a tiempo real permitió la obtención de un resultado negativo y positivo confirmado en 26 y 48 h, respectivamente. Generalmente, los métodos basados en PCR a tiempo real son muy sensibles y específicos. La principal desventaja de esta técnica radica en la no diferenciación entre el DNA procedente de microorganismos vivos y muertos. Sin embargo, una manera de disminuir los falsos positivos puede ser a través del pre-enriquecimiento. En esta etapa, se favorece la multiplicación de los microorganismos vivos para alcanzar el límite de detección de la técnica, así como la dilución 1/10 de la muestra (25 g de alimento en 225 ml pre-enriquecimiento) reduce en una décima parte la concentración de células muertas, dificultando su detección (Krascsenicsová, Piknová, Kačíková, & Kuchta, 2008). En nuestro estudio, este método PCR a tiempo real se presentó como una herramienta eficaz que proporcionó resultados fiables de manera rápida y sencilla. Además, puede ser monitorizado y automatizado, mejorando el flujo de trabajo y con costes reducidos en comparación con el método de referencia (Rodríguez-Lazaro et al., 2014; Välimaa, Tilsala-Timisjärvi, & Virtanen, 2015).

Tras la realización de este estudio de puesta a punto y evaluación de métodos alternativos para la detección de *L. monocytogenes* en jamón curado, tanto la impedanciometría combinada con Rapid L. mono como la PCR a tiempo real demostraron ser fiables y sencillas, permitiendo el análisis de un número elevado de muestras de manera simultánea.

Desde un punto económico y práctico para la industria, la impedanciometría combinada con Rapid L. mono resultó ser más económica que la PCR a tiempo real. En nuestro estudio se consideró que el porcentaje de muestras positivas en este alimento sería bajo ya que no se obtuvo ninguna muestra contaminada de forma natural con *L. monocytogenes*. Por ello, se seleccionó la impedanciometría combinada con Rapid L. mono para la detección de *L. monocytogenes* en el proceso de elaboración del jamón curado tanto por la fiabilidad demostrada en la evaluación, como por su sencillez, rapidez y coste económico reducido.

CAPÍTULO IV

PUESTA A PUNTO Y EVALUACIÓN DE UN MÉTODO QPCR PARA LA CUANTIFICACIÓN DE *L. MONOCYTOGENES* EN PRODUCTOS CÁRNICOS LPC

Capítulo IV. Puesta a punto y evaluación de un método qPCR para la cuantificación de *L. monocytogenes* en productos cárnicos LPC

Actualmente, la cuantificación precisa y fiable de un nivel bajo de *L. monocytogenes* en los alimentos es de gran importancia, no solo para cumplir con requisitos legales, sino también para llevar a cabo estudios de vida útil, microbiología predictiva o evaluaciones del riesgo. El método de referencia para el recuento de *L. monocytogenes* tiene una serie de limitaciones relacionadas con el límite de cuantificación y la precisión en alimentos con bajas concentraciones del mismo. Por ello, en este capítulo se presenta el desarrollo y evaluación de un procedimiento de pretratamiento de la muestra (lisis de matriz) combinado con qPCR para la cuantificación de *L. monocytogenes* en jamón curado, así como su aplicación en muestras comerciales de productos cárnicos LPC.

En primer lugar, se llevó a cabo la optimización de la reacción de amplificación para determinar las condiciones óptimas de funcionamiento de la PCR, ensayando diferentes concentraciones de cebadores y sonda, así como distintas temperaturas de hibridación.

Posteriormente, se realizaron las curvas estándar de DNA y celular mediante las condiciones de qPCR previamente optimizadas. Tras este paso, se desarrolló una metodología completa para la cuantificación de *L. monocytogenes* en jamón curado, que incluyó un pretratamiento de la muestra de alimento previo a su análisis por qPCR. Para ello, se analizó jamón curado contaminado experimentalmente a diferentes niveles mediante los métodos qPCR y el de referencia, obteniendo la curva estándar de *L. monocytogenes* en esta matriz. Ésta fue evaluada en base diferentes parámetros de validación siguiendo la guía publicada por Bustin et al. (2009) “The MIQE Guidelines: Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments”. Dicha guía fue desarrollada por un grupo de investigadores bajo la coordinación del MBBI (*Minimum Information for Biological and Biomedical Investigations*). Su objetivo es establecer la información mínima que debe ser proporcionada de un experimento qPCR para garantizar su relevancia, eficacia, precisión y correcta interpretación. Para ello, los parámetros calculados fueron: linealidad, eficiencia, límites de cuantificación y detección, precisión y variabilidad analítica, entre otros.

Una vez establecida la curva estándar en matriz, se evaluó la metodología qPCR en comparación con el método de referencia en base al estudio de la exactitud relativa, parámetro establecido en la norma ISO 16140:2003, en vigor en el momento del estudio.

Tras la obtención de los resultados de la evaluación, se realizó la cuantificación muestras de productos cárnicos LPC comerciales mediante esta metodología alternativa y la de referencia .

1. Material y métodos

1.1. Puesta a punto de la metodología qPCR para la cuantificación de *L. monocytogenes* en jamón curado

1.1.1. Optimización de la reacción de amplificación de qPCR

Se optimizaron los componentes de la mezcla de amplificación, así como las condiciones de amplificación de la misma, para la cuantificación de *L. monocytogenes* por qPCR.

1.1.1.1. Cultivo bacteriano

Se partió de una colonia de *L. monocytogenes* CECT 934 se incubó en 10 ml de caldo BHI a 37°C/17 h (*overnight*), donde alcanzó $2-3 \times 10^9$ ufc/ml.

1.1.1.2. Extracción de DNA

Se extrajo el DNA de 1 ml del cultivo *overnight* de *L. monocytogenes* CECT 934 mediante el kit DNeasy Blood & Tissue Kit (Qiagen), siguiendo las instrucciones del fabricante. El DNA fue eluido por centrifugación a 10.000 g/1 min en 75 µl de buffer de elución. Este paso se realizó dos veces, por lo que todo el DNA extraído se eluyó en un volumen final de 150 µl.

La concentración de DNA (ng/µl) y la pureza del mismo se midió por espectrofotometría mediante el equipo Nanodrop 2000 (Thermofisher) y se analizaron los valores obtenidos de absorbancia mediante el software NanoDrop 2000/2000c (versión 1.3.1). La cantidad y calidad se evaluó con las ratios A260/A280, siendo aceptables los valores entre 1,8-2,0 y 2,0-2,2, respectivamente. Posteriormente, se realizaron diluciones decimales seriadas del DNA en agua (grado de biología molecular).

1.1.1.3. Optimización de las condiciones de PCR

El DNA diana de *L. monocytogenes* utilizado fue un fragmento de 113 bp del gen *hlyA* que codifica la listeriolisina O. La secuencia de los cebadores y la sonda Taqman utilizados en este trabajo se seleccionaron del estudio publicado por Nogva, Rudi, Naterstad, & Lillehaug, (2000). Éstos han sido evaluados positivamente en diversos trabajos en cuanto a la especificidad y sensibilidad (Barbau-Piednoir, Botteldoorn, Yde, Mahillon, & Roosens, 2013; Paul et al., 2015). Las secuencias de los cebadores y la sonda se muestran en la Tabla 19.

Tabla 19. Cebadores y sondas utilizadas en este estudio.

	Secuencia (5'-3')	Amplificación (bp)
Forward <i>hlyA</i>	5'-TGCAAGTCCTAAGACGCCA-3'	113
Reverse <i>hlyA</i>	5'-CACTGCATCTCCGTGGTATACTAA-3'	
Sonda TaqMan	FAM-5'CGATTCATCCGCGTGTTCCTTTTCG-BkFQ	

Se ensayó un rango de temperaturas de hibridación de 60 a 65°C y diferentes concentraciones de cebadores/sonda; las combinaciones estudiadas fueron: 350/250, 350/125, 250/250 y 250/125 nM.

Cada reacción PCR (volumen final 25 µl) estuvo compuesta por:

- 12,5 µl Taq Master Mix (BIORON, Alemania)
- 0,25 µl de cebador *forward*
- 0,25 µl de cebador *reverse*
- 0,25 µl de sonda Taqman
- 5 µl DNA (3 pg DNA)
- 6,75 µl agua

El programa de amplificación incluyó una desnaturalización inicial 94°C/3 min seguida de 45 ciclos de desnaturalización a 95°C/20 s, hibridación en un rango de 60 a 65°C/20 s y extensión a 72°C/20 s. Los ensayos fueron realizados por triplicado y en todos ellos se incluyó un control negativo de la extracción y, un control negativo y positivo de la PCR.

Los criterios utilizados para seleccionar la temperatura de hibridación y la concentración de cebador óptimas fueron: mayor producto final (*Endpoint*) y menor valor de Cq (*quantification cycle*).

1.1.2. Curva estándar de DNA de *L. monocytogenes*

Con las condiciones optimizadas de la reacción PCR, se realizó la curva estándar de DNA de *L. monocytogenes*. Para ello, se extrajo el DNA de 1 ml de un cultivo *overnight* de *L. monocytogenes* CECT 934 en 10 ml de BHI (apartado 1.1.1.2.). Posteriormente, se realizaron diluciones decimales del DNA en agua (grado biología molecular).

Las concentraciones de DNA ensayadas mediante qPCR fueron: 3,1X10⁶, 3,1X10⁵, 3,1X10⁴, 3,1X10³, 3,1X10², 3,1X10¹ and 3,1 fg/reacción PCR, que equivale a un rango de 9,8X10⁵ a 0,98 equivalentes genómicos de *L. monocytogenes*/reacción. Cada una de las concentraciones se ensayó por triplicado y en tres días diferentes. En todos los ensayos se incluyó un control negativo de la extracción y, un control positivo y negativo de la PCR.

Se representaron gráficamente los valores Cq medios \pm desviación estándar de los nueve replicados vs log fg DNA *L. monocytogenes*/reacción PCR.

El número de equivalentes genómicos de *L. monocytogenes* se determinó asumiendo que en 1 ng de DNA hay aproximadamente 3×10^5 copias del genoma completo de *L. monocytogenes*, y que sólo hay una copia gen *hlyA* en su genoma. Por lo que una copia del gen *hlyA* se corresponde con un equivalente genómico de *L. monocytogenes*, y a su vez con una ufc de la bacteria (Quero et al., 2014).

1.1.3. Curva estándar celular de *L. monocytogenes*

Tras el cultivo *overnight* de una colonia aislada de *L. monocytogenes* CECT 934 en 10 ml de BHI a 37°C, se realizaron diluciones decimales seriadas en agua de peptona 0,1 %. Las concentraciones obtenidas fueron 2×10^7 , 2×10^6 , 2×10^5 , 2×10^4 , 2×10^3 , 2×10^2 , 1×10^2 , 5×10^1 y 2×10^1 ufc/ml, aproximadamente. Se extrajo el DNA de 1 ml de cada una de las diluciones (apartado 1.1.1.2). Se analizaron 5 μ l del DNA extraído de cada una de las diluciones mediante qPCR, con las condiciones previamente optimizadas. Cada dilución se analizó por triplicado en tres días diferentes, lo que supuso un total de 81 análisis. En todos los ensayos se analizó un control negativo de la extracción y, un control negativo y positivo de la PCR.

De forma paralela, se determinó la concentración microbiana de cada una de las diluciones mediante recuento en agar BHI (37°C/24 h) y se representaron gráficamente los valores Cq medios \pm desviación estándar de los nueve replicados obtenidos por qPCR vs log ufc *L. monocytogenes* CECT 934/ml.

1.1.4. Desarrollo de un método qPCR para la cuantificación de *L. monocytogenes* en jamón curado contaminado experimentalmente

Se desarrolló un método basado en un pretratamiento de la muestra con un buffer de lisis de matriz, previo al análisis por qPCR. Para ello, se analizaron muestras de jamón curado contaminadas con distintos niveles de *L. monocytogenes* mediante tres metodologías:

- Método A: Procedimiento de lisis de matriz combinado con qPCR.
- Método B: Procedimiento de lisis de matriz combinado con agar cromogénico.
- Método de referencia ISO 11290-2/A1:2004.

El método B se realizó para comparar el recuento de *L. monocytogenes* en la muestra tras el pretratamiento de la matriz, con respecto al método de referencia.

1.1.4.1. Cultivo bacteriano

Se tomó una colonia aislada de *L. monocytogenes* CECT 934 y se incubó a 37°C/17 h, alcanzando aproximadamente $2-3 \times 10^9$ ufc/ml. Posteriormente, se realizaron diluciones seriadas en agua de peptona 0,1 %. Se llevó a cabo la técnica de recuento en placa para determinar la concentración bacteriana, mediante siembra en BHIA (37°C/24 h).

1.1.4.2. Contaminación de muestras de jamón curado

Para llevar a cabo este estudio, 30 muestras de 6 g de jamón curado se dividieron en tres lotes (10 muestras/lote). De cada lote, nueve muestras se contaminaron experimentalmente con diferentes concentraciones de *L. monocytogenes* CECT 934, y una muestra se utilizó como control negativo.

Para la contaminación de las muestras, se tomaron 100 µl de la dilución apropiada de *L. monocytogenes* y se añadieron a los 6 g de jamón curado. Para cada lote de muestras, las concentraciones ensayadas fueron: 3×10^6 , 3×10^5 , 3×10^4 , 3×10^3 , 3×10^2 , 3×10^1 , $1,5 \times 10^1$, $7,5 \times 10^0$, 3 ufc/g, aproximadamente

El lote 1 se analizó mediante el procedimiento de lisis de matriz combinado con qPCR (Método A), el lote 2 por el procedimiento de lisis de matriz combinado con agar cromogénico (Método B), y el lote 3 mediante el método de referencia.

1.1.4.3. Procedimiento de lisis de matriz combinado con qPCR (Método A)

- **Pretratamiento de la matriz**

El pretratamiento de la muestra se realizó utilizando un protocolo modificado del descrito previamente por Mester et al. (2014) y Witte et al. (2016). En una bolsa de homogeneización para Stomacher con filtro de 51 µm de tamaño de poro, se pesaron 6 g de jamón y se añadieron 30 ml de buffer de lisis (1 M MgCl₂ y 50 mM Tris pH 7,6). La muestra fue homogeneizada en el mezclador Stomacher 400 Circulator durante 2 min a 260 rpm. El líquido del homogeneizado se transfirió a tubos estériles de 50 ml y se añadió buffer de lisis hasta los 45 ml. Las muestras se incubaron a 37°C/30 min en un baño con agitación. Posteriormente, las muestras fueron centrifugadas a 3.300 g/30 min a 30°C. Se eliminó el sobrenadante, y el pellet se resuspendió en 45 ml de buffer de lavado (0.5 % Tween 20 y 1X PBS). Las muestras se incubaron de nuevo en un baño con agitación a 37°C /30 min y posteriormente, se centrifugaron a 3.300 g/30 min a 30°C. Se eliminó el sobrenadante y el pellet se resuspendió en 750 µl de 1X PBS y se centrifugó a 9.000 g/5 min. Este último paso se repitió una vez más. Se eliminó el sobrenadante y se procedió a la extracción del DNA.

- **Extracción del DNA y reacción de amplificación**

Se extrajo el DNA de los pellets, obtenidos tras el pretratamiento de la muestra, mediante el kit DNeasy Blood & Tissue Kit (Qiagen), tal y como se describe en el apartado 1.1.1.2. Todo el DNA presente en la muestra se eluyó en 150 µl de buffer de elución.

Se analizaron 5 µl del DNA extraído de cada muestra mediante qPCR en las condiciones previamente optimizadas. De forma adicional, a la mezcla de amplificación se le añadió un CIA (Control Interno de Amplificación) comercial (Exopol, España) con el objetivo de detectar inhibiciones de la reacción de amplificación. El CIA estuvo compuesto por una pareja de cebadores y una sonda unida al fluoróforo HEX que tuvieron como DNA diana un fragmento del gen de la actina. La composición de la mezcla de amplificación por muestra (volumen final de 25 µl) fue la siguiente:

- 12,5 µl Taq Master Mix (BIORON)
- 0,25 µl de cebador forward (350 nM)
- 0,25 µl de cebador reverse (350 nM)
- 0,25 µl de sonda Taqman (250 nM)
- 1 µl CIA
- 5 µl DNA
- 5,75 µl agua (grado biología molecular)

Las muestras se analizaron por triplicado en tres días diferentes, suponiendo un total de 90 análisis mediante qPCR. En todos los ensayos se incluyeron un control negativo y positivo de la PCR.

1.1.4.4. Procedimiento de lisis de matriz combinado con agar cromogénico (Método B)

El pretratamiento de las muestras de jamón curado fue el mismo que el descrito en el apartado 1.1.4.4. El pellet resultante se resuspendió en 2,4 ml de 1X PBS y se realizó el recuento en placa de agar cromogénico Rapid L. mono agar por duplicado (37°C/24h). Las colonias presuntivas de *L. monocytogenes* fueron confirmadas con el test de la ramnosa (37°C/24 h).

1.1.4.5. Método de referencia ISO 11290-2/A1:2004

Las muestras de 6 g de jamón curado se mezclaron con 24 ml de agua de peptona tamponada (dilución 1/5) y se homogeneizaron en el mezclador Stomacher 400 Circulator durante 2 min a 260 rpm. Posteriormente, las muestras se sembraron en agar OCLA y Rapid L. mono por triplicado, y se incubaron a 37°C/24-48 h y a 37°C/24 h, respectivamente. Las colonias presuntivas a *L. monocytogenes* se confirmaron mediante el test de la ramnosa (37°C/24 h).

1.1.4.6. Curva estándar de *L. monocytogenes* en jamón curado

Para cada muestra, se representó gráficamente la media \pm desviación estándar de los valores Cq de los nueve replicados obtenidos mediante qPCR (eje y) vs la media del recuento obtenido (log ufc/g) por el método de referencia (eje x).

1.1.4.7. Parámetros evaluados

Se determinaron los siguientes parámetros establecidos en la guía “The MIQE Guidelines: Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments” publicada por Bustin et al., (2009):

- **Linealidad:** se determinó en las curvas estándar de DNA, celular y en jamón curado mediante el coeficiente de determinación R^2 . Valores de $R^2 \geq 0,985$ se consideraron como muy buena correlación lineal.
- **Eficiencia de la reacción PCR (E):** se calculó este parámetro para cada una de las curvas estándar (DNA, celular y jamón) mediante la siguiente fórmula:

$$E = \left(\left(10^{(-1/\text{pendiente})} \right) - 1 \right) \times 100$$

Se consideró aceptable una eficiencia entre 90 % y 105 %, siendo el 100 % el valor óptimo.

- **Rango dinámico lineal:** para conocer el intervalo de concentraciones que se encuentra dentro de la regresión lineal de la curva estándar. Se determinó para las curvas estándar de DNA, celular y jamón curado. El rango dinámico lineal óptimo debe ser de superior a cinco órdenes de magnitud.
- **Límites de detección (LOD) y de cuantificación (LOQ):** para conocer la concentración más baja en la que el 95 % de las muestras positivas son detectadas y cuantificadas, respectivamente. Estos parámetros se determinaron en las curvas estándar de DNA, celular y en matriz alimentaria.
- **Precisión:** este parámetro se calculó a través de la repetibilidad y reproducibilidad, mediante la determinación del Coeficiente de Variación (CV) intra e interensayo, respectivamente.

Para ello, se interpolaron los Cq medios en la curva estándar de jamón, obteniendo los valores de log ufc/g y, a partir de ellos, se calcularon los CV intra e interensayo. Cuanto más bajos son estos valores, más preciso es el método. Se consideraron aceptables valores de hasta el 15 % (European Pharmacopoeia, 2015).

- **Variabilidad analítica:** este parámetro es adecuado cuando los valores de las desviaciones estándar del número de copias/reacción son inferiores a 0,25 log copias/reacción (Quero et al., 2014).

1.2. Evaluación del método qPCR en comparación al método de referencia para la cuantificación de *L. monocytogenes* en jamón curado contaminado experimentalmente

Para llevar a cabo la evaluación de la metodología qPCR con respecto al método de referencia, se utilizaron muestras de jamón curado contaminado experimentalmente con *L. monocytogenes*.

Todas las muestras fueron analizadas mediante los métodos A, B y de referencia. El método B se llevo a cabo para comprobar la posible pérdida en el número de *L. monocytogenes* tras el procedimiento de lisis de matriz. El método de referencia se realizó para comparar los recuentos obtenidos (log ufc/g) con los resultantes de la interpolación de los Cq obtenidos por el método A, en la curva estándar de jamón curado.

1.2.1. Cultivo bacteriano

El cultivo bacteriano y preparación del inóculo se llevó a cabo tal y como se describe en el apartado 1.1.4.1.

1.2.2. Muestras de jamón curado contaminadas experimentalmente

Se realizaron seis lotes de muestras. Cada lote constó de 10 muestras de 6 g de jamón curado. De las 10 muestras, nueve fueron contaminadas artificialmente con distintas concentraciones de *L. monocytogenes* CECT 934, y una se utilizó como control negativo. Los niveles de concentración ensayados fueron: 3×10^6 , 3×10^5 , 3×10^4 , 3×10^3 , 3×10^2 , 3×10^1 ufc/g aproximadamente. Se analizaron dos lotes de muestras (n=20) por cada una de las metodologías de referencia, A y B.

1.2.3. Exactitud relativa

Se calculó la exactitud relativa de los métodos A y B tal y como establece la norma ISO 16140. Este parámetro se utilizó para determinar el grado de correspondencia entre los resultados obtenidos con los métodos alternativos y el de referencia. Se calculó como el porcentaje del número de células calculadas por el método alternativo vs el número de células calculadas por el método de referencia. El valor de exactitud relativa del 100 % se consideró el óptimo. En el

caso del método B, este parámetro se utilizó para determinar la pérdida de microorganismos durante el pre-tratamiento de matriz.

1.3. Método de qPCR para la cuantificación de *L. monocytogenes* aplicado al análisis de productos cárnicos LPC

Se aplicó el método qPCR evaluado para la cuantificación de *L. monocytogenes* en aquellas muestras de productos cárnicos en las que previamente se detectó el patógeno (presencia/25 g).

1.3.1. Productos cárnicos comerciales

Se analizaron un total de 39 productos cárnicos LPC procedentes de establecimientos de venta al por menor de Aragón y La Rioja (Tabla 20).

Tabla 20. Productos cárnicos listos para el consumo y número de muestras analizados en este estudio.

Tipo de producto	Número de muestras (n)
Jamón curado	10
Chorizo	8
Salchichón	7
Longaniza de Aragón	8
Secallona	1
Paleta cocida	1
Cabeza cocida	1
Chopped	1
Mortadela	2
Total	39

Se tomaron 37 g de muestra y se mezclaron en una bolsa estéril sin filtro en el equipo Stomacher Circulator 400 (260 rpm/2 min). Posteriormente, la muestra se dividió en una porción de 25 g, y dos porciones de 6 g. Las dos porciones de 6 g se guardaron en refrigeración (máximo 48 h) para la cuantificación de *L. monocytogenes* en el caso de que se detectara la presencia del patógeno en la muestra de 25 g.

1.3.2. Detección de *L. monocytogenes*

La detección de *L. monocytogenes* se realizó mediante el método de PCR a tiempo real iQ-Check *L. monocytogenes* II kit (Bio-Rad), evaluado positivamente en el capítulo III. Para ello, se analizó la porción de 25 g tal y como se describe en el apartado 2.1.3 del capítulo III.

1.3.3. Cuantificación de *L. monocytogenes*

En las muestras en las que se detectó *L. monocytogenes*, se realizó el recuento del patógeno. Una de las porciones de 6 g se analizó mediante el método qPCR desarrollado, mientras que el análisis de la otra porción de 6 g, se llevó a cabo por el método de referencia ISO 11290-2/A1:2004.

2. Resultados y discusión

2.1. Optimización de la reacción de amplificación de qPCR

Los valores *Cq* y *Endpoint* obtenidos de las reacciones de amplificación en el rango de temperaturas de hibridación de 60-65°C, y con diferentes concentraciones de cebadores y sonda se muestran en la Tabla 21.

Tabla 21. Valores *Cq* y *Endpoint* obtenidos en las diferentes condiciones de temperatura de hibridación y concentración de cebadores y sonda.

Hibridación (°C)	350/250 ¹ (nM)		350/125 ¹ (nM)		250/250 ¹ (nM)		250/125 ¹ (nM)	
	<i>Cq</i> ²	<i>Endpoint</i> ³						
65	31,18±0,05	0,21±0,02	32,91±0,28	0,07±0,01	32,50±0,13	0,15±0,00	32,48±0,55	0,12±0,03
64,7	30,77±0,02	0,27±0,01	32,17±0,24	0,10±0,01	31,88±0,40	0,20±0,02	31,87±0,10	0,15±0,01
64	30,31±0,03	0,34±0,09	31,59±0,05	0,13±0,01	30,81±0,52	0,27±0,08	31,07±0,29	0,19±0,03
63,1	31,56±0,42	0,16±0,04	31,97±0,05	0,10±0,00	31,99±0,69	0,13±0,08	31,27±0,03	0,17±0,00
62	30,59±0,45	0,33±0,10	32,04±0,29	0,11±0,01	30,75±0,57	0,26±0,09	31,09±0,01	0,20±0,01
61,1	30,89±0,20	0,31±0,00	31,88±0,06	0,13±0,00	31,06±0,12	0,25±0,02	31,19±0,01	0,19±0,01
60,4	31,05±0,00	0,30±0,02	32,16±0,04	0,12±0,00	31,18±0,13	0,23±0,02	31,43±0,07	0,18±0,01
60	31,87±0,24	0,18±0,03	32,77±0,88	0,09±0,04	32,08±0,47	0,14±0,02	31,90±0,79	0,15±0,07

¹ Concentración de cebadores y sonda utilizados en la qPCR (nM).

² *Cq* medio ± desviación estándar de tres replicados.

³ *Endpoint* medio ± estándar de tres replicados.

A pesar de no existir grandes diferencias entre los diferentes valores de *Cq* y *Endpoint*, se seleccionó la combinación de temperatura de hibridación y concentración de cebadores y sonda marcada en rojo, que se corresponde a un menor valor *Cq* (30,31±0,03) y mayor cantidad de producto final (*Endpoint*) (0,34±0,09). Dicha combinación se correspondió con una temperatura de hibridación de 64°C y una concentración de cebadores y sonda de 350 nM y 250 nM, respectivamente. De este modo, la composición definitiva de la mezcla de amplificación fue:

- 12,5 µl Taq Master Mix (BIORON)
- 0,25 µl de cebador forward (350 nM)
- 0,25 µl de cebador reverse (350 nM)
- 0,25 µl de sonda Taqman (250 nM)
- 5 µl DNA
- 6,75 µl agua (grado biología molecular)

Se seleccionó una temperatura de hibridación de 64°C. El programa de amplificación optimizado constó de una desnaturalización inicial a 94°C/3 min, seguida de 45 ciclos de desnaturalización a 95°C/20 s, hibridación a 64°C/20 s y elongación a 72°C/20 s.

2.2. Resultados de la curva estándar de DNA de *L. monocytogenes*

La calidad del DNA obtenida evaluada a través de la relación A260/A280 estuvo dentro de los valores aceptables ($1,80 \pm 0,02$). La cantidad de DNA extraída fue de $63,5 \pm 0,01$ ng/ μ l. Los resultados obtenidos para la realización de la curva estándar de DNA de *L. monocytogenes* se muestran en la Tabla 22.

Tabla 22. Valores de Cq medios \pm desviación estándar obtenidos mediante qPCR para cada concentración de DNA de *L. monocytogenes* CECT 934.

fg DNA/reacción PCR	log fg DNA/reacción PCR	Cq \pm DE ¹
$3,1 \times 10^6$	6,5	$19,44 \pm 0,09$
$3,1 \times 10^5$	5,5	$22,74 \pm 0,25$
$3,1 \times 10^4$	4,5	$25,91 \pm 0,19$
$3,1 \times 10^3$	3,5	$29,21 \pm 0,21$
$3,1 \times 10^2$	2,5	$32,75 \pm 0,30$
$3,1 \times 10^1$	1,5	$36,27 \pm 0,25$
3,1	0,5	N.A. ²

¹Valores Cq \pm (DE) desviación estándar de nueve replicados obtenidos por qPCR.

²N.A.: no amplifica.

La curva estándar de DNA de *L. monocytogenes* CECT 934 (Figura 20) presentó una excelente **linealidad** con un valor R² de 0,9995 y un **rango dinámico lineal** de cinco órdenes de magnitud.

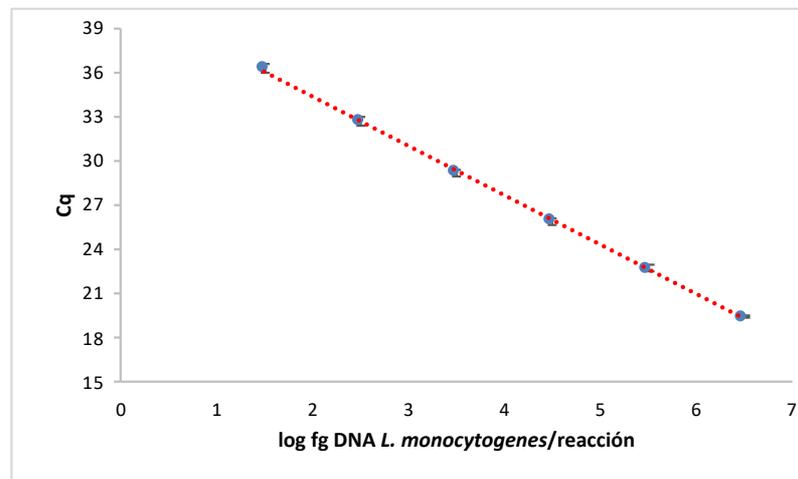


Figura 20. Curva estándar de DNA de *L. monocytogenes* CECT 934 obtenida mediante qPCR. Se muestran los valores Cq medios \pm desviación estándar de nueve replicados vs log fg DNA *L. monocytogenes* en la reacción qPCR. Ecuación de la recta: $y = -3,3574x + 41,155$. Coeficiente de determinación R² = 0,9995.

La pendiente de la curva fue muy similar al óptimo teórico de -3,32 (Rodríguez-Lázaro & Hernández, 2006; Rodríguez-lázaro et al., 2005), por lo que la **eficiencia** de reacción de amplificación (E=98,5 %) estuvo en el rango aceptado (90-105 %) (Bustin et al., 2009). Tanto el **LOD** como el **LOQ** fueron de 3×10^1 fg DNA/reacción PCR, ya que en esta concentración

amplificaron los nueve replicados analizados. Este valor se correspondió con 9,5 equivalentes genómicos de *L. monocytogenes*/reacción PCR.

Nuestros resultados son similares a los obtenidos en otros estudios; así Quero et al. (2014) determinaron una curva estándar lineal en cinco órdenes de magnitud, $R^2 \geq 0,987$ y eficiencia 99,22 %. Los LOD y LOQ fueron ligeramente inferiores a los obtenidos en nuestro estudio, de 1 a 5 ufc/reacción PCR, respectivamente. Berrada et al. (2006) mostraron una eficiencia (102 %) y buena linealidad ($R^2 > 0,98$) y Nogva et al. (2000) obtuvieron un R^2 similar a nuestro estudio, sin embargo, la eficiencia fue inferior (90,94 %).

2.3. Resultados de la curva estándar celular de *L. monocytogenes*

Los Cq medios \pm desviación estándar de cada una de las concentraciones celulares ensayadas se muestran en la Tabla 23.

Tabla 23. Cq medios \pm desviación estándar y ratio de la señal obtenidos mediante qPCR para cada concentración celular de *L. monocytogenes* CECT 934.

log ufc <i>L. monocytogenes</i> /ml ²	Ratio ³	Cq \pm DE ⁴
7,43 \pm 0,05	9/9	19,18 \pm 0,23
6,42 \pm 0,04	9/9	22,50 \pm 0,31
5,47 \pm 0,10	9/9	25,39 \pm 0,31
4,43 \pm 0,05	9/9	30,02 \pm 0,60
3,41 \pm 0,03	9/9	32,84 \pm 0,34
2,47 \pm 0,10	9/9	36,59 \pm 0,69
2,17 \pm 0,10	9/9	37,66 \pm 0,66
1,88 \pm 0,10	9/9	38,24 \pm 0,48
1,48 \pm 0,11	8/9	Nd ⁵

¹valores ufc medios \pm desviación estándar de tres replicados obtenidos por la técnica del recuento en placa.

²log ufc medios \pm desviación estándar de tres replicados obtenidos por la técnica del recuento en placa.

³Ratio: señales positivas/total reacciones.

⁴Valores Cq \pm desviación estándar de nueve replicados obtenidos por qPCR.

Nd: No determinado.

En la curva estándar celular de *L. monocytogenes* se observó una adecuada **linealidad** con un valor R^2 de 0,9965, y un **rango dinámico lineal** de seis órdenes de magnitud (Figura 21).

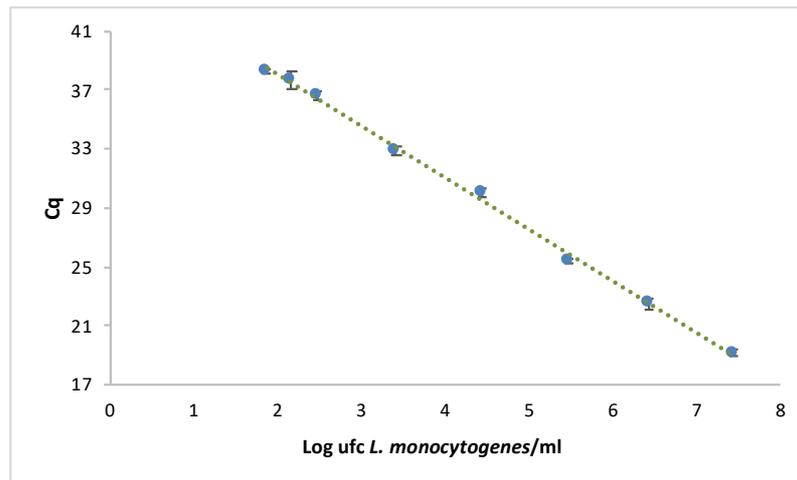


Figura 21. Curva estándar celular de *L. monocytogenes* CECT 934 mediante qPCR. En ella se muestran los valores Cq medios \pm desviación estándar de nueve replicados vs log ufc *L. monocytogenes* CECT 934 obtenidos tras el recuento en agar BHI. Ecuación de la recta: $y = -3,5039x + 45,057$. Coeficiente de determinación $R^2 = 0,998$.

La **eficiencia** de la reacción fue de 92,9 %, por lo que se encontró dentro de los límites de aceptabilidad. En la curva celular, el **LOD** y el **LOQ** fue de $1,88 \pm 0,10$ log ufc/ml ($75,8 \pm 19,6$ ufc/ml) para ambos parámetros, amplificando nueve de los nueve replicados. Esta concentración se correspondió con $2,4 \pm 0,6$ ufc de *L. monocytogenes*/reacción PCR. En el caso de la concentración más baja analizada ($30,9 \pm 6,5$ ufc/ml), el patógeno se detectó en ocho de los nueve replicados, por lo que no cumplió con el criterio del LOD. Además, los valores Cq obtenidos se encontraron fuera del rango de respuesta lineal.

Los resultados observados por D'Urso et al. (2009) son similares a los obtenidos en nuestro estudio, donde presentaron una curva estándar celular de *L. monocytogenes* con una eficiencia del 100,5 % y linealidad con $R^2=0,9969$. El LOD y LOQ presentado fue bajo ($1,86$ ufc/reacción PCR). Sin embargo, Paul et al. (2015) determinaron un LOD superior a nuestro estudio de 10 ufc/reacción. Rantsiou et al. (2008) obtuvieron una curva estándar celular con un rango lineal de 10^8 - 10^2 ufc/ml, con una eficiencia ligeramente superior (95 %), pero con peor linealidad ($R^2=0,970$) que la obtenida en nuestro estudio.

Tanto en la curva estándar de DNA, como en la celular, los resultados obtenidos se consideraron satisfactorios. Estos señalaron la idoneidad del método qPCR para su desarrollo, evaluación y aplicación en la cuantificación de *L. monocytogenes* en jamón curado.

2.4. Recuperación de *L. monocytogenes* tras el procedimiento de lisis de matriz

Se evaluó la pérdida de células de *L. monocytogenes* tras el procedimiento de lisis de matriz. Para ello, se calculó el valor de exactitud relativa del método B (procedimiento de lisis de matriz

combinado con Rapid L. mono) con respecto al método de referencia, en 30 muestras de jamón curado contaminadas experimentalmente (Tabla 24).

Tabla 24. Exactitud relativa del método B con respecto al método de referencia para la cuantificación de *L. monocytogenes* en jamón curado.

Nivel de contaminación	Método referencia (log ufc/g)	Método B ¹ (log ufc/g)	Exactitud relativa (%)
1	6,41±0,38	6,54±0,49	102,03
2	5,38±0,25	5,45±0,42	101,30
3	4,36±0,70	4,70±0,15	92,70
4	3,15±0,17	3,21±0,18	101,90
5	2,15±0,09	2,23±0,13	103,72
6	1,80±0,21	1,93±0,11	97,80
7	1,55±0,23	1,65±0,12	107,22
8	1,18±0,29	1,34±0,33	113,56
9	0,69±0,44	0,75±0,21	108,69

¹Procedimiento de lisis de matriz combinado con agar Rapid L. mono.

Los valores de **exactitud relativa** del método B estuvieron en un rango de 92,70 % a 108,69 %, presentando los valores más elevados en las concentraciones más bajas del patógeno. Mester et al. (2014), utilizaron un pretratamiento de matriz muy similar al de este estudio, obteniendo una tasa de recuperación del patógeno en diferentes matrices (leche, productos lácteos y huevo), ligeramente inferiores a lo presentado en el presente trabajo, pero considerándose satisfactorias.

Una correcta preparación de la muestra previa al análisis qPCR es fundamental para evitar la reducción microbiana (Rossmanith et al., 2010), que daría lugar a una subestimación de los microorganismos, y por lo tanto, resultados erróneos. En el presente estudio, no hubo pérdida de células de *L. monocytogenes* posterior al pretratamiento de las muestras (lisis de matriz). Por ello, esta preparación de la muestra se consideró adecuada para su utilización en la cuantificación de *L. monocytogenes* en esta matriz alimentaria mediante qPCR.

2.5. Resultados de la curva estándar de *L. monocytogenes* en jamón curado

En la Tabla 25 se muestran los resultados obtenidos del análisis de jamón contaminado artificialmente mediante el método de lisis de matriz combinado con qPCR (valores C_q, ratio de señal, CV intra e interensayo y variabilidad analítica), y de referencia (log ufc/g).

Tabla 25. Resultados obtenidos del análisis de las muestras de jamón contaminadas para la realización de la curva estándar de *L. monocytogenes* en jamón curado (n=10).

Nivel ¹	Método referencia ²	Método qPCR							
		log ufc/g	Cq ³	Ratio ⁴	CV Intraensayo ⁵			CV interensayo ⁶	Variabilidad ⁷
1	6,82±0,11	20,85±0,39	9/9	0,43	0,42	2,81	1,91	0,12	1,57
2	5,85±0,03	25,49±0,39	9/9	0,90	0,25	2,28	1,54	0,16	1,22
3	4,86±0,05	27,12±0,22	9/9	0,89	1,03	0,61	0,84	0,07	1,09
4	3,87±0,06	30,98±0,58	9/9	0,06	1,79	0,46	1,88	0,18	0,80
5	2,80±0,03	35,56±0,39	9/9	0,82	0,97	1,08	1,12	0,12	0,46
6	1,48±0,10	38,35±0,56	9/9	0,94	2,49	0,98	1,48	0,17	0,24
7	1,25±0,06	39,44±0,23	5/9	NA	NA	NA	NA	NA	NA
8	1,18±0,21	40,03±1,17	5/9	NA	NA	NA	NA	NA	NA
9	0,40±0,71	40,47±0,64	4/9	NA	NA	NA	NA	NA	NA
Control	ND	ND	0/9	NA	NA	NA	NA	NA	NA

¹Nivel de contaminación ensayado.

²media ± desviación estándar de dos replicados analizados mediante el método de referencia ISO 11290-2/A1:2004.

³media ± desviación estándar de los Cq obtenidos de nueve replicados.

⁴Ratio: señales positivas/total reacciones.

⁵CV intraensayo de la concentración en log ufc/g determinada por PCR expresado en porcentaje.

⁶CV interensayo de la concentración en log ufc/g determinada por PCR expresado en porcentaje.

⁷desviación estándar del log copias del gen *hlyA*/reacción.

⁸Valor máximo que puede alcanzar la desviación estándar de cada nivel de contaminación, calculado como 0,25 log copias gen *hlyA*/reacción.

ND: no detectado.

NA: no aplicado.

La concentración más baja en la que se amplificaron nueve de los nueve replicados fue 1,48±0,10 log ufc/g jamón (nivel 6). En los tres niveles inferiores de contaminación (7, 8 y 9) no amplificaron todos los replicados (ratio de señal de 4-5/9), por lo que no se aplicó el cálculo de los CVs y la variabilidad analítica.

La **precisión** del método qPCR se determinó mediante la repetibilidad y reproducibilidad, a través de los CV intra e interensayo. Los CV intraensayo presentaron un rango de 0,06 % a 2,81 %, mientras que los CV interensayo estuvieron comprendidos entre 0,84 % y 1,91 %. Estos valores se encuentran dentro de los límites aceptados (<15 %). Asimismo, en el rango de concentraciones de 6,82±0,11 a 1,48±0,10 log ufc/g (niveles del 1 al 6) la **variabilidad analítica** fue inferior al límite de 0,25 log copias/reacción.

La legislación europea establece un límite de ≤100 ufc *L. monocytogenes*/g en determinados productos LPC y, de forma general, el patógeno se encuentra en el alimento por debajo de esta concentración. Por ello, el desarrollo de métodos de cuantificación precisos a esos niveles es

fundamental (Auvolat & Besse, 2016; Ricci et al., 2018). Se ha observado que el método de referencia, puede no tener una precisión y sensibilidad adecuadas en alimentos con baja concentración del patógeno (Auvolat & Besse, 2016; Jasson et al., 2010; Loncarevic et al., 2008). Scotter, Langton, Lombard, Schulten, & Nagelkerke (2001) llevaron a cabo un estudio de validación de la norma ISO 11290-2, utilizando PALCAM como agar selectivo. Los resultados obtenidos mostraron que para una contaminación de la muestra real de 100 ufc/g, un laboratorio podía encontrar un resultado que podía variar entre 15 y 646 ufc/g. Más recientemente, se ha realizado una nueva validación de norma ISO 11290-2 introduciendo el uso de ALOA (ISO, 2017). Las matrices analizadas fueron salmón ahumado en frío, formulas alimenticias infantiles en polvo, ensaladas y queso. Los resultados obtenidos mostraron que una contaminación real de 100 ufc/g de estos alimentos, un laboratorio podía encontrar un valor entre 37 y 269 ufc/g; a excepción de las fórmulas infantiles, en las que los valores estuvieron entre 20 y 501 ufc/g (ISO, 2017).

La precisión y variabilidad presentadas en nuestro estudio fueron similares a las obtenidas por otros autores en la cuantificación de *L. monocytogenes* por qPCR en diferentes matrices; Berrada et al. (2006) obtuvieron una precisión inferior a nuestro estudio con coeficientes de variación más elevados (CV 9-22 %) en la cuantificación del patógeno mediante qPCR en ensaladas. Por ello, debemos destacar que el método qPCR desarrollado para la cuantificación de *L. monocytogenes* en jamón curado se consideró preciso en un rango de concentraciones de $6,82 \pm 0,11$ a $1,48 \pm 0,10$ log ufc/g.

La curva estándar de *L. monocytogenes* en jamón curado se obtuvo tras la representación gráfica de los Cq medios \pm desviación estándar vs log *L. monocytogenes* ufc/g de muestras de jamón curado contaminadas artificialmente a diferentes niveles, obtenidos mediante los métodos qPCR y de referencia, respectivamente (Figura 22).

Se obtuvo una adecuada **linealidad** con un valor $R^2=0,9875$ y un **rango dinámico lineal** de cinco órdenes de magnitud, encontrándose dentro de los límites de aceptabilidad para la linealidad (Bustin et al., 2009). El rango dinámico lineal fue de $6,82 \pm 0,11$ a $1,48 \pm 0,10$ log ufc/g. La **eficiencia** de la reacción fue de 100,4 %, considerándose un resultado excelente (Bustin et al., 2009). El **LOD** y el **LOQ** del método qPCR desarrollado para la cuantificación de *L. monocytogenes* en jamón curado fue de $1,48 \pm 0,10$ log ufc/g ($30,1 \pm 6,2$ ufc/g), para ambos parámetros. Este valor equivale a $6,0 \pm 1,2$ ufc de *L. monocytogenes*/reacción PCR, ya que todo DNA presente en los 6 g de jamón fue eluído en 150 μ l de buffer de elución, y se amplificaron 5 μ l de DNA mediante qPCR.

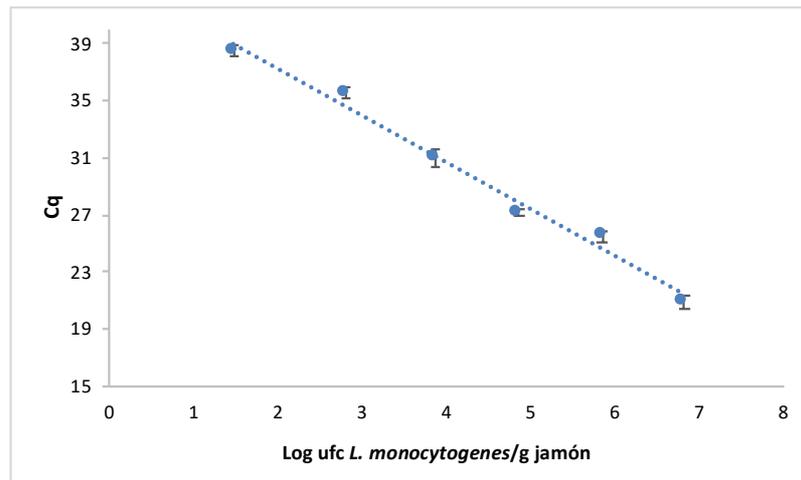


Figura 22. Curva estándar de *L. monocytogenes* CECT 934 en jamón curado mediante qPCR. Se muestran los valores Cq medios \pm desviación estándar de nueve replicados vs log ufc *L. monocytogenes* CECT 934 obtenidos por el método de referencia ISO 11290-2/A1:2004. Ecuación de la recta: $y = -3,313x + 43,937$. Coeficiente de determinación $R^2 = 0,9875$.

Rantsiou et al. (2008) desarrollaron un método qPCR para la cuantificación del patógeno en diversas matrices cárnicas, entre ellas el jamón curado. En este alimento, la linealidad observada fue de $R^2=0,9993$, con una eficiencia del 107 %. Sin embargo, la curva estándar en jamón fue lineal en un intervalo de 10^3 - 10^8 ufc/g, logrando un LOD y LOQ de 10^3 ufc/g, valor superior al obtenido en nuestro trabajo.

La linealidad determinada en nuestro método fue similar a la obtenida por Rodríguez-lázaro et al. (2005) en salchichón, salchichas tipo Frankfurt o jamón cocido ($R^2 >0,998$). Sin embargo, la eficiencia varió del 93 al 104 % en función del alimento analizado. El rango de respuesta lineal fue limitado (3×10^5 a 3×10^7 ufc/g), mientras que los LOD y LOQ (3×10^5 ufc/g) fueron muy superiores a los obtenidos en nuestro estudio. Por otro lado, Rodríguez-Lázaro et al. (2004) evaluaron el efecto de diferentes tratamientos de filtración de la muestra pre-PCR. En este estudio ensayaron un rango de respuesta lineal más amplio (10^3 - 10^6 ufc/g), con adecuada linealidad ($R^2 >0,984$) y eficiencia variable (83-121 %), en función del tratamiento pre-PCR realizado. En todos estos trabajos, los límites de cuantificación se encuentran por encima del límite legal establecido (≤ 100 ufc/g).

En la mayoría de los estudios de cuantificación mediante qPCR, el alimento sólido se homogeneiza con un líquido, como el agua de peptona tamponada, dando lugar a una dilución 1:10 del alimento. Posteriormente, se toma una alícuota del homogeneizado (generalmente 1 ml), se extrae el DNA y se analiza mediante qPCR. Con estos pasos, la concentración de DNA del microorganismo diana en la reacción PCR se reduce hasta en cinco log con respecto a su concentración inicial en el alimento (Rodríguez-lázaro et al., 2005).

Por ello, para conseguir detectar y cuantificar un menor número de células mediante qPCR, la preparación de la muestra previa al análisis se ha convertido en un tema de gran importancia. Ésta es considerada un requisito indispensable para la obtención de resultados fiables mediante esta técnica (Rossmanith & Wagner, 2011). Una de las alternativas posibles para lograr LOD y LOQ más bajos, es la concentración del microorganismo diana previo al análisis. Hough, Harbison, Savill, Melton, & Fletcher (2002) desarrollaron un método qPCR para la cuantificación de *L. monocytogenes* en col, que incluía un paso de centrifugación de la muestra para así concentrar a los microorganismos. Este paso les permitió obtener una respuesta lineal en siete órdenes de magnitud, y bajos LOD y LOQ, resaltando la importancia del pretratamiento de la muestra.

Por otro lado, es importante tener en cuenta que la concentración microbiana puede aumentar la concentración de inhibidores en la muestra, afectando negativamente a la extracción del DNA y/o la reacción PCR. Por ello, hay estudios que incluyen pasos orientados a disminuir la presencia de estos inhibidores, a la vez que se concentran los microorganismos. D'Urso et al. (2009) introdujeron un paso de filtración tras una centrifugación de la muestra, logrando alcanzar un bajo LOD (10 ufc/10 g yogur). Rossmanith et al. (2006) desarrollaron un protocolo basado en la lisis de la matriz para la concentración de *L. monocytogenes*, así como para eliminar inhibidores (proteínas, grasas y carbohidratos), detectando 7,3 ufc/ml leche cruda. Con esta misma tendencia, Mester et al. (2014) y Witte et al. (2016) desarrollaron un protocolo de lisis de matriz para la cuantificación del patógeno en productos lácteos y huevos, disminuyendo los LOD y LOQ a <10 ufc/g.

En el presente trabajo, se adaptó el protocolo descrito por Witte et al. (2016) para el pretratamiento del jamón curado. Este procedimiento de lisis de matriz fue clave para obtener un LOD y LOQ muy por debajo de 100 ufc/g. La lisis de la matriz se basó en la utilización del MgCl₂ como agente solubilizador de proteínas y Tween 20 como surfactante no-iónico hidrofílico para facilitar la eliminación de la grasa de la muestra. Este pretratamiento permitió extraer el DNA directamente de la muestra (sin realizar diluciones previas), concentrar los microorganismos y eliminar inhibidores presentes en el jamón, obteniendo unos buenos resultados.

Se representaron gráficamente las tres curvas estándar obtenidas (DNA, celular y en jamón curado) para evaluar la existencia de diferencias entre ellas (Figura 23).

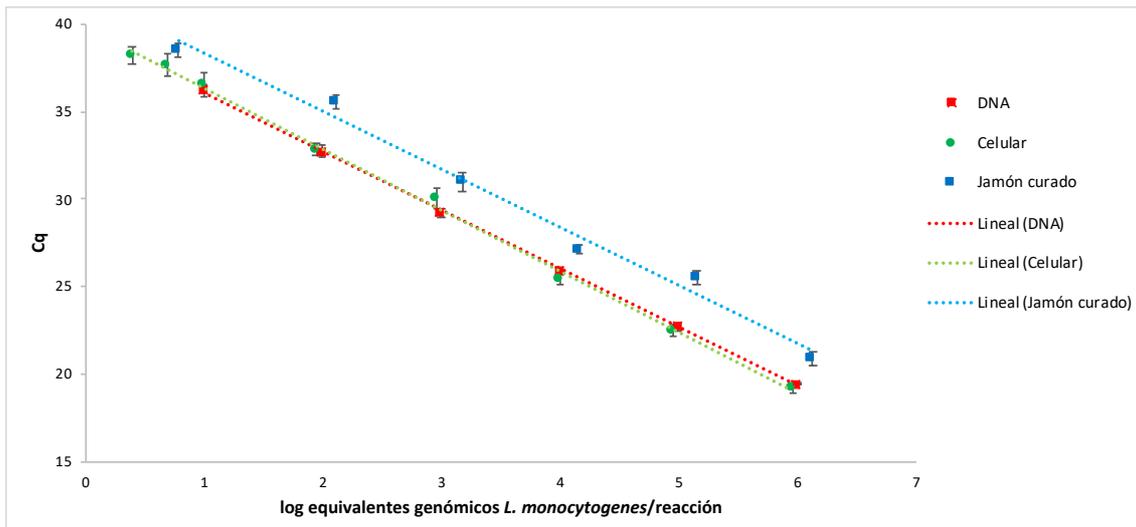


Figura 23. Curvas estándar de DNA, celular y en jamón curado de *L. monocytogenes* CECT 934. Se muestran los Cq medios \pm desviación estándar de los replicados vs log equivalentes genómicos de *L. monocytogenes*/reacción.

Las curvas estándar de DNA y celular no mostraron diferencias entre ellas, al contrario de lo observado en la matriz alimentaria. El cambio en el Cq medio fue de 2,6 unidades con respecto a las curvas estándar de DNA y celular. Este fenómeno fue observado por Quero et al. (2014), presentando una diferencia mayor de 5 unidades en el Cq entre las curvas estándar de DNA y celular de *L. monocytogenes* con respecto a la obtenida en queso, determinando el efecto matriz como la causa más probable. En nuestro estudio, esta diferencia pudo estar debida a la mayor complejidad, en términos de composición y estructura, del jamón curado, pudiendo afectar a la extracción del DNA y su amplificación. Esta observación demostró que, aunque se realicen ensayos con DNA o en cultivo puro de modo preliminar, los métodos qPCR deben desarrollarse y evaluarse en la matriz alimentaria en la que se tenga prevista su aplicación.

2.6. Exactitud relativa del método qPCR en jamón curado contaminado experimentalmente

Los resultados obtenidos del cálculo de la **exactitud relativa** del método qPCR se observan en la Tabla 26. Como se puede observar, la concordancia entre el método desarrollado en el estudio y el de referencia fue muy satisfactoria, ya que los valores de exactitud relativa estuvieron comprendidos entre $95,83 \pm 1,22$ % y $105,20 \pm 2,43$ %.

Tabla 26. Exactitud relativa del método qPCR en jamón curado contaminado experimentalmente.

Nivel de contaminación	Método referencia ¹ (log ufc/g)	Método qPCR ² (log ufc/g)	Exactitud relativa±DE ³ (%)
1	6,41±0,38	6,38±0,42	99,49±0,92
2	5,38±0,25	5,51±0,19	102,47±1,74
3	4,36±0,45	4,31± 0,29	99,22±5,08
4	3,15±0,17	3,02±0,19	95,83±1,22
5	2,15±0,09	2,13±0,07	99,11±1,26
6	1,80±0,11	1,89±0,09	105,02±2,02

¹media ± desviación estándar de los recuentos obtenidos mediante el método de referencia ISO 11290-2/A1:2004 (log ufc/g).

²media ± desviación estándar de los recuentos obtenidos mediante qPCR (log ufc/g).

³media ± desviación estándar de la exactitud relativa en cada nivel de contaminación (2 muestras/nivel).

Nuestros valores son mejores a los publicados para la cuantificación de *L. monocytogenes* por qPCR en matrices cárnicas, donde obtuvieron valores de AC entre 89,12 a 116,33 % (Rodríguez-Lázaro et al., 2004; Rodríguez-Lázaro et al., 2005). El método qPCR fue capaz de cuantificar 77,6±14,5 ufc/g con una mejora en el flujo de trabajo, analizándose múltiples muestras de manera simultánea con un bajo límite de cuantificación. Por otro lado, se redujo el tiempo de análisis con respecto al método de referencia, ya que se obtuvieron resultados en menos de un día. Por todo ello, se procedió a su aplicación para la cuantificación de *L. monocytogenes* en diferentes productos cárnicos.

2.7. Cuantificación de *L. monocytogenes* en productos cárnicos LPC comerciales

De las 39 muestras analizadas, se detectó la presencia de *L. monocytogenes*/25 g en siete de ellas (dos de longaniza y cinco de chorizo), correspondiendo al 17,9 % de positividad. De estas siete muestras, se realizó la cuantificación de *L. monocytogenes* mediante los métodos qPCR y de referencia.

Todas las muestras estuvieron por debajo del límite de detección del método de referencia (<5 ufc/g). En el caso del método qPCR, seis de las muestras presentaron un recuento inferior al límite de cuantificación (<30,1±6,2 ufc/g) y solo una de las muestras pudo ser cuantificada. En dicha muestra el valor Cq medio ± desviación estándar fue de 37,84±0,28. La concentración obtenida tras la interpolación en la curva estándar de matriz fue de 1,84±0,08 log ufc/g (69,1±13,9 ufc/g), cuyo recuento estuvo por debajo del límite legal establecido de 100 ufc/g (Reglamento CE Nº 2073/2007). En esta muestra, el recuento por el método de referencia fue <5 ufc/g ya que no se observó crecimiento en los agares cromogénicos.

Coincidiendo con nuestros resultados, Mester et al. (2014) obtuvieron diferencias significativas entre los recuentos obtenidos por un método qPCR desarrollado por ellos y el método de referencia en muestras de queso positivas a la presencia de *L. monocytogenes*. Como se ha mencionado anteriormente, en alimentos con baja concentración del patógeno, el método de referencia podría no ser lo suficientemente sensible y preciso, tal y como observaron Loncarevic et al. (2008) en un estudio en el que para una contaminación real de 100 ufc *L. monocytogenes*/g, un laboratorio podía obtener un resultado de 13 cfu/g a 741 ufc/g. Por otro lado, la presencia de bacterias viables no cultivables, dañadas o estresadas en el alimento, que pueden presentar dificultades para crecer en medios de cultivo con agentes selectivos, afectaría negativamente a la cuantificación mediante el método de referencia, subestimando la concentración del patógeno (Jadhav, Bhave, & Palombo, 2012). La cuantificación mediante el método qPCR permite la detección del DNA de la bacteria independientemente de su estado fisiológico, así como no se ve afectado por la presencia de abundante microbiota acompañante. Sin embargo, el método qPCR no permite la diferenciación de microorganismos vivos y muertos, por lo que, en ocasiones, el resultado obtenido por qPCR puede sobreestimarse y ser superior a la concentración real en el alimento. Sin embargo, tal y como se describe en la literatura científica, el DNA extragenómico de bacterias muertas se muestra más susceptible a su degradación, por lo que no puede ser detectado en la amplificación por PCR.

Los bajos recuentos obtenidos estuvieron en concordancia con los observados por otros autores en este tipo de productos. Gómez et al. (2015) detectaron el patógeno en 27,9 % de muestras de productos cárnicos LPC, mientras que obtuvieron recuentos <100 ufc/g en la mayoría de ellos. Thévenot, Delignette-Muller, Christieans, & Vernozzy-Rozand (2005) detectaron el patógeno en el 10 % de las muestras de salchichón, siendo los recuentos <3 ufc/g en todas ellas. Rodríguez-Lázaro et al. (2014) observaron una mayor presencia de la bacteria en chorizo con respecto a otros productos cárnicos LPC, detectando un 77 % de muestras positivas. Sin embargo, los recuentos en todas ellas fueron <10 ufc/g.

CAPÍTULO V

DETECCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE LA CONTAMINACIÓN POR *L. MONOCYTOGENES* EN EL PROCESO DE ELABORACIÓN DE JAMÓN CURADO LONCHEADO Y ENVASADO AL VACÍO

Capítulo V. Detección y caracterización de la contaminación por *L. monocytogenes* en el proceso de elaboración de jamón curado loncheado y envasado al vacío

Se llevó a cabo el análisis de diferentes lotes de jamón curado loncheado y envasado al vacío, así como de las superficies de la industria relacionadas con el procesado del mismo para la detección de *L. monocytogenes*. Las muestras de superficies se tomaron de diferentes zonas, antes y después del proceso de limpieza y desinfección, así como en diferentes estaciones del año, con el fin de establecer relaciones estadísticas entre la presencia de *Listeria* spp. y las diferentes variables. Las muestras se analizaron mediante la metodología de la impedanciometría combinada con agar Rapid L. mono, seleccionada por sus resultados óptimos en el proceso de evaluación del método llevado a cabo en el capítulo III.

Los aislados de *L. monocytogenes* fueron caracterizados genotípicamente a través del serotipo molecular, y se determinaron los perfiles genéticos mediante electroforesis en gel en campo pulsante (PFGE). Este estudio, nos permitió identificar diferentes cepas en el ambiente de la industria, determinar la presencia de nichos de contaminación, así como detectar cepas persistentes del patógeno.

1. Material y métodos

Para llevar a cabo este estudio se analizaron muestras de jamón curado loncheado y envasado al vacío, así como de superficies del ambiente de procesado de una misma industria dedicada a la producción de este alimento, situada en la provincia de Zaragoza.

1.1. Muestras de jamón curado

Se analizaron un total de 120 muestras de jamón curado loncheado y envasado al vacío, pertenecientes a 19 lotes de fabricación. De 14 de los lotes se analizaron cinco muestras/lote y de cinco lotes se analizaron 10 muestras/lote. Las muestras analizadas de cada lote se tomaron al inicio, mitad y final del proceso de loncheado y envasado. Las muestras se almacenaron en refrigeración (4°C) y se analizaron en un máximo de 48 h tras su obtención, estando todas ellas dentro de su vida útil.

En la Tabla 27 se muestra la distribución de muestras con sus características físico-químicas (datos aportados por la empresa productora).

Tabla 27. Distribución y características físico-químicas de los lotes de jamón curado analizados.

Lote	n	Meses curación	Nitratos (mg/kg)	Nitritos (mg/kg)	Humedad (%)	Grasa (%)	NaCl (%)	pH	a _w (20°C)
1	5	12	82	<4	53,6	10,4	2,5	6,2	0,938
2	5	10	76	<4	51,3	14,1	3,3	5,9	0,934
3	5	10	76	<4	44,9	17,9	3,1	5,75	0,912
4	5	12	116	<4	49,3	11,8	4,4	5,75	0,911
5	5	7	80	8,1	52,3	12,7	3,9	6,00	0,921
6	5	10	160	<4	45,1	19,9	4,1	5,75	0,902
7	5	12	78	<4	50,9	12,1	2,9	5,95	0,913
8	5	12	<40	<4	51,9	10,7	3,3	5,95	0,899
9	5	12	62	<4	50,7	20,1	2,8	5,85	0,928
10	5	10	95	<4	48,8	16,9	4,2	6,05	0,905
11	5	12	<40	<4	44,0	14,5	3,5	5,90	0,901
12	5	7	-	-	-	-	-	-	-
13	5	7	70	<4	54,0	10,9	3,1	6,05	0,920
14	5	7	74	<4	58,9	8,1	2,9	6,10	0,936
15	10	10	86	<6	54,1	6,3	5,2	5,35	0,903
16	10	12	139	<6	39,9	27,2	3,5	5,45	0,896
17	10	10	141	<6	49,9	13,0	3,7	5,45	0,908
18	10	10	-	-	-	-	-	-	-
19	10	12	119	<6	49,9	10,3	3,9	5,6	0,911
Total	120								

n: número de muestras; a_w: actividad de agua; -: datos no disponibles.

El mismo día en que se lonchearon y envasaron los lotes 15, 16, 17, 18 y 19, se tomaron muestras de superficies del procesado, con el fin de observar una posible contaminación cruzada entre el producto y la superficie.

1.2. Plan de muestreo de superficies

Las muestras ambientales fueron tomadas en ocho días, distribuidos periódicamente entre los meses de mayo a noviembre de 2015 (seis meses). Se analizaron un total de 281 muestras procedentes de diferentes superficies en contacto con el alimento. El proceso de elaboración incluye desde el pernil fresco (materia prima) hasta el loncheado y envasado del jamón (producto final). Se tomaron muestras de las dos zonas consideradas de mayor riesgo de recontaminación:

- **Zona de deshuesado** donde se incluyen las operaciones de deshuesado, descortezado, moldeado y desmoldeado,
- **Zona de loncheado** donde se realiza el loncheado y envasado del jamón.

Ambas zonas estaban separadas físicamente por un tabique y comunicadas mediante una puerta de acceso.

Los tipos de superficies en contacto con el alimento fueron: cintas transportadoras articuladas (Figura 24.A), continuas y con relieve, plataforma circular, desgubadora (Figura 24.B), moldeadora, desmoldeadora, deshuesadoras, moldes y tapas de prensado, mesas y cuchilla de loncheado.

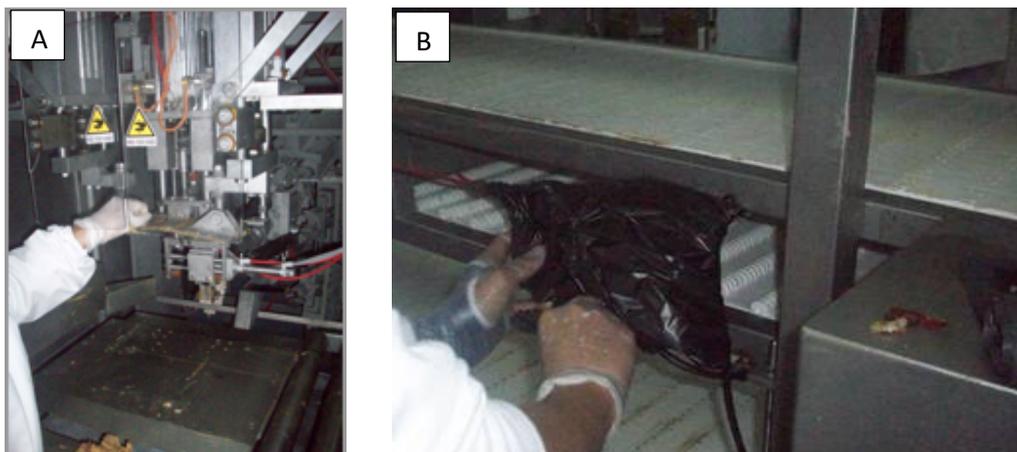


Figura 24. A: Desgubadora utilizada en el proceso de deshuesado del jamón curado. B: Cinta transportadora articulada ubicada en el deshuesado (imágenes cedidas por la empresa colaboradora).

Las muestras fueron tomadas en dos momentos del procesado: antes de iniciar la jornada laboral, pasadas 2-3 h de la finalización de la limpieza y desinfección (superficies limpias), y al finalizar la jornada laboral (superficies sucias).

Para la toma de muestras se siguió la norma ISO 18593:2004 (ISO, 2004). De forma adicional, se siguieron las directrices de la guía específica publicada por Carpentier & Barre (2012) sobre este procedimiento para la detección de *L. monocytogenes* en superficies. Para ello se utilizaron esponjas húmedas con agua de peptona tamponada como agente neutralizante (3M Hydra Sponge, 3M, St. Paul, Minnesota, USA). Todas las muestras se tomaron de manera aséptica, utilizándose guantes y ropa de protección adecuada. Se muestreó la mayor área posible de cada una de las superficies con el fin de incrementar la probabilidad de detección del patógeno. Para ello, se realizó un movimiento de zigzag por toda la superficie elegida y en dos direcciones perpendiculares. Posteriormente, éstas fueron transportadas y mantenidas en frío (4-8 °C) hasta el momento del análisis, que en ningún caso superó las 12 h.

En la Tabla 28 se refleja la distribución de las 281 muestras de superficies analizadas, zona, equipo y momento de la toma de muestras.

Tabla 28. Distribución de las muestras de diferentes superficies de la industria para la detección de *L. monocytogenes* (n=281).

Zona deshuesado (n=173)			Zona loncheado (n=108)		
	L	S		L	S
Cintas transportadoras	18	18	Cintas transportadoras	41	42
Plataforma circular	6	6	Cuchilla de loncheado	6	1
Desgubadoras	9	9	Mesas	8	10
Moldeadora	6	4			
Desmoldeadora	6	5			
Deshuesadoras	36	25			
Moldes y tapas de prensado	8	5			
Mesas	6	6			
Total	95	78		55	53

L: superficie limpia; S: superficie sucia.

1.3. Metodología para la detección de *L. monocytogenes* en jamón curado y superficies

La detección de *L. monocytogenes* se realizó mediante impedanciometría combinada con siembra en el agar cromogénico Rapid L. mono, metodología previamente evaluada de forma satisfactoria el capítulo III.

Para el análisis de muestras de jamón curado, se tomaron 37 g de alimento y se homogeneizaron en el mezclador Stomacher 400 Circulator durante 2 min/260 rpm. Posteriormente, la muestra se subdividió en una porción de 25 g y dos porciones de 6 g. A los 25 g se le añadieron 225 ml de caldo OB. La muestra fue homogeneizada en el mezclador Stomacher 400 Circulator durante 2 min/260 rpm. Las muestras de 6 g se guardaron en refrigeración durante un máximo de 72 h para realizar la cuantificación en el caso de que se detectara la presencia del patógeno.

Para las muestras procedentes de superficies, la esponja humedecida con agua de peptona tamponada (volumen total 10 ml), fue homogeneizada con 90 ml de caldo OB en el Stomacher 400 Circulator durante 2 min/260 rpm.

Tras la homogeneización de las muestras, todas ellas se incubaron a 30°C durante 24 h (pre-enriquecimiento). Posteriormente, 1 ml del pre-enriquecimiento fue añadido a 9 ml de caldo OB, contenido en celdillas estériles con cuatro electrodos. La impedanciometría se llevó a cabo

en el equipo BacTrac 4300 a 30°C durante un máximo de 24 h. El valor umbral seleccionado para el valor E fue del 5 %. Todas las muestras en las que se observó una curva de impedancia típica, superando el umbral establecido, se interpretaron como presencia de *Listeria* spp./25 g de jamón o presencia de *Listeria* spp./superficie analizada. Para identificar la especie patógena se sembró 0,1 ml del inóculo en agar Rapid L. mono, seguido de incubación a 37°C/24 h. Las colonias típicas de *L. monocytogenes* (gris azuladas sin viraje del color del medio) se confirmaron mediante el test de la ramnosa (37°C/24 h máximo).

1.4. Metodología para la cuantificación de *L. monocytogenes* en jamón curado

Las muestras de jamón curado en las que se detectó la presencia de *L. monocytogenes*/25 g fueron cuantificadas mediante el método qPCR desarrollado en este trabajo (apartado 1.1.4.4. del capítulo IV) y el método de referencia ISO 11290-2/A1:2004 (apartado 1.1.4.5. del capítulo IV).

1.5. Identificación *Listeria* spp. no *monocytogenes*

Por otro lado, las colonias del medio Rapid L. mono pertenecientes a otras especies del género *Listeria*, se identificaron mediante la técnica MALDI-TOF MS (*Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization-Time Of Flight Mass Spectrometry*).

El grupo de investigación inició una colaboración con el Departamento de Seguridad Alimentaria de la Universidad Ludwig Maximilians de Múnich (Alemania), gracias a la cual esta parte del estudio se realizó durante una estancia pre-doctoral de tres meses en dicho departamento.

1.5.1. Extracción de las proteínas bacterianas

Los aislados de *Listeria* spp. no *monocytogenes* se revivificaron en 10 ml de caldo BHI (37°C/24 h). Posteriormente, se sembraron en agar BHI y se incubaron a 37°C/24 h.

De cada aislado de *Listeria* spp. se tomaron 2-3 colonias y se resuspendieron en 300 µl de agua destilada estéril. Se añadieron 900 µl de etanol y se mezclaron vigorosamente en un vortex. Las muestras se centrifugaron a 14.100 g/2 min, el sobrenadante fue eliminado y se volvieron a centrifugar a 14.100 g/2 min. Se eliminó todo el sobrenadante y se realizó el secado del pellet a temperatura ambiente durante 3 min. Posteriormente, se resuspendió el pellet con 20 µl de ácido fórmico 70 % y se añadieron 20 µl de acetonitrilo. Se mezclaron en el vortex y se centrifugaron a 14.100 g/2 min.

Se tomó 1 µl del sobrenadante y se dispuso sobre los pocillos de una placa de acero pulido, dejándose secar a temperatura ambiente. Posteriormente, se añadió 1 µl de la matriz de lisis CHCA (agua destilada estéril desionizada, acetonitrilo, ácido trifluoroacético y α-Ciano-4-ácido

hidroxicinámico), manteniéndose a temperatura ambiente hasta su secado completo. Cada uno de los aislados se analizó por triplicado.

1.5.2. MALDI-TOF MS

Para realizar el análisis de los aislados se utilizó un equipo Autoflex Speed MALDI-TOF MS (Bruker Daltonik GmbH, Alemania). El equipo MALDI-TOF MS fue utilizado en posición lineal y se seleccionaron los siguientes parámetros de medida:

- Laser initial power: 30 %
- Maximum laser power: 40 %
- Laser configuration: Fuzzy control, weight 2.00
- Mass range (m/z): 4000 – 10000 Da
- Processing method: MBT_Process
- Minimal resolution: 400
- Cumulated spectra: 1200
- Laser shots per spot: 200
- Movement: Raster spiral small

La medición se llevó a cabo mediante el software flexControl Version 3.4 (Bruker Daltonik GmbH), mientras que el análisis del espectro se realizó a través del software flexAnalysis Version 3.4 (Bruker Daltonik GmbH). Los espectros fueron comparados con espectros de referencia contenidos en el software MBT Compass 4.1 (Bruker Daltonik GmbH).

La puntuación (*score*) obtenida tras el análisis y comparación de los espectros con valores inferiores a 2.000 no fueron considerados. Valores entre 2.000 y 2.299 fueron aceptables para la identificación del género, pero no para la especie. Para los valores entre 2.300 y 3.000 se consideró la identificación de la especie con una alta probabilidad. Únicamente fueron aceptables las identificaciones con alta consistencia (A).

1.6. Caracterización genotípica de los aislados de *L. monocytogenes*

La caracterización genotípica de los aislados de *L. monocytogenes* se realizó mediante la determinación del serotipo molecular y los perfiles obtenidos por electroforesis en gel en campo pulsante (PFGE).

1.6.1. Serotipo molecular

El serotipo molecular se realizó mediante PCR multiplex, siguiendo los protocolos establecidos por Borucki & Call (2003), Doumith et al. (2004) y Kérouanton et al. (2010).

En cada reacción PCR se incluyeron como controles positivos, las siguientes cepas de referencia:

- *L. monocytogenes* CECT 4031 serogrupo IIa (1/2a-3a)
- *L. monocytogenes* CECT 936 serogrupo IIb (1/2b-3b-7)
- *L. monocytogenes* CECT 911 serogrupo IIc (1/2c-3c)
- *L. monocytogenes* CECT 934 serogrupo IVa (4a-4c)
- *L. monocytogenes* CECT 935 serogrupo IVb (4ab-4b, 4d-4e)

Esta técnica no permite diferenciar todos los serotipos de cada grupo, sin embargo, los serotipos 1/2a, 1/2b, 1/2c y 4b representan más del 95 % de los aislados procedentes de alimentos y humanos, mientras que serotipos 3a, 3c, 3b, 7, 4a, 4c, 4d y 4e raramente están asociados a ellos (Doumith *et al.* 2004). Por este motivo, se consideraron únicamente los serotipos moleculares 1/2a, 1/2b, 1/2c, 4a y 4b dentro de cada serogrupo.

1.6.1.1. Extracción de DNA

Se tomó 1 ml del cultivo *overnight* en BHI (37°C/17 h) de cada uno de los aislados y las cepas de referencia. Se centrifugó en la microcentrífuga Microfuge 18 Centrifuge a 16.000 g/2 min. Se eliminó el sobrenadante y el pellet se resuspendió con 100 µl del reactivo Prepman Ultra Sample Preparation (Applied Biosystems, Estados Unidos). Las muestras se incubaron a 100°C durante 10 min. Posteriormente, se dejaron atemperar a temperatura ambiente durante 2 min y se centrifugaron a 16.000 g/2 min. Se tomaron 50 µl de la zona media del sobrenadante y se dispusieron en tubos estériles y libres de DNA.

La calidad y cantidad del DNA extraído se midió por espectrofotometría en un equipo Nanodrop 2000 evaluando los siguientes parámetros:

- Cantidad de DNA (ng/µl)
- Relación A280/A260, se considera adecuado un valor entre 1,8-2,0

En cada ensayo de extracción se incluyó un control negativo de la extracción, realizando el mismo proceso con 1 ml de caldo BHI estéril.

1.6.1.2. Amplificación del DNA

La determinación del serotipo molecular se llevó a cabo a través de dos reacciones PCR múltiplex. La segunda PCR se realiza para diferenciar entre los serotipos moleculares 1/a y 1/2c, ya que pueden existir cepas atípicas en ambos serotipos que muestren un mismo perfil genético en la primera PCR (Kérouanton *et al.*, 2010). En la Tabla 29 se muestran las secuencias de los cebadores utilizados y el tamaño del amplicón para cada uno de ellos.

Tabla 29. Cebadores utilizados para la realización del serotipo molecular de *L. monocytogenes*.

Gen diana	Secuencia del cebador (5´-3´)	Amplicón (bp)	Referencia
<i>prs</i> ^a	F: GCT GAA GAG ATT GCG AAA GAA G R: CAA AGA AAC CTT GGA TTT GCG G	370	(Doumith et al., 2004)
<i>prfA</i> ^a	F: GAT ACA GAA ACA TCG GTT GGC R: GTG TAA TCT TGA TGC CAT CAG G	274	(Kérouanton et al., 2010)
<i>lmo0737</i> ^a	F: AGG GCT TCA AGG ACT TAC CC R: ACG ATT TCT GCT TGC CAT TC	691	(Doumith et al., 2004)
<i>orf2819</i> ^a	F: AGC AAA ATG CCA AAA CTC GT R: CAT CAC TAA AGC CTC CCA TTG	471	(Doumith et al., 2004)
<i>lmo1118</i> ^a	F: AGG GGT CTT AAA TCC TGG AA R: CGG CTT GTT CGG CAT ACT TA	906	(Doumith et al., 2004)
<i>orf2110</i> ^a	F: AGT GGA CAA TTG ATT GGT GAA R: CAT CCA TCC CTT ACT TTG GAC	597	(Doumith et al., 2004)
<i>flaA</i> ^b	F: TTA CTA GAT CAA ACT GCT CC R: AAG AAA AGC CCC TCG TCC	538	(Borucki & Call, 2003)

F: forward; R: reverse.

^agenes testados en la 1ª PCR.

^bgenes testados en la 2ª PCR.

En la Tabla 30 se muestran los genes diana amplificados para cada serotipo molecular de *L. monocytogenes*.

Tabla 30. Genes diana de *L. monocytogenes* y sus correspondientes serotipos moleculares.

Serotipo molecular	Genes amplificados 1ªPCR	Genes amplificados 2ª PCR
1/2a	<i>prs</i> <i>prfA</i> <i>lmo0737</i> <i>lmo1118</i>	<i>flaA</i>
1/2b	<i>prs</i> <i>prfA</i> <i>orf2819</i>	-
1/2c	<i>prs</i> <i>prfA</i> <i>lmo0737</i> <i>lmo1118</i>	-
4a	<i>prs</i> <i>prfA</i>	<i>flaA</i>
4b	<i>prs</i> <i>prfA</i> <i>orf2110</i>	-

- No amplifica.

La mezcla de amplificación para la primera PCR (volumen final de 25 µl) estuvo compuesta por:

- 12,5 µl Master Mix IBIAN HotTaq (IBIANLab, Zaragoza, Spain).
- 0,5 µl de cada uno de los cebadores para los genes *lmo0737*, *orf2819*, *lmo1118* y *orf2110* (concentración final 0,4 µM/cebador).

- 0,5 µl de cada uno de los cebadores para los genes *prs* y *prfA* (concentración final 0,2 µM/cebador).
- 0,5 µl MgCl₂ (concentración final 2 µM)
- 3,5 µl de agua
- 2,5 µl del DNA extraído (40 ng/µl)

En cada ensayo se incluyeron dos controles negativos (extracción y PCR), en los que se añadió agua en lugar de DNA. Las reacciones de amplificación se llevaron a cabo en un termociclador MiniOpticon. El programa de amplificación de la primera PCR consistió en una desnaturalización inicial a 94°C/3 min, seguido de 35 ciclos de desnaturalización a 94°C/40 s, hibridación a 53°C/45 s y elongación a 72°C/1 min 15 s, con una extensión final a 72°C/7 min.

Se realizó una segunda reacción PCR del DNA de los aislados que mostraron los siguientes perfiles genéticos: *lmo0737*, *prs* y *prfA*; *lmo1118*, *lmo0737*, *prs* y *prfA*; o los genes *prs* y *prfA*. Ésta se llevó a cabo para detectar la presencia del gen *flaA*, que codifica la proteína flagelar de *L. monocytogenes*, siguiendo el protocolo descrito por Borucki & Call (2003). La mezcla de amplificación para la segunda PCR se realizó en un volumen de 25 µl, formada por:

- 12,5 µl de IBIAN HotTaq Master Mix (IBIANLab).
- 0,2 µl de cada uno de los cebadores para el gen *flaA* (concentración final 0,8 µM)
- 2,5 µl de MgCl₂ (concentración final 4 µM)
- 7,1 µl de agua
- 2,5 µl de DNA (40 ng/µl)

El programa de amplificación de la segunda reacción PCR incluyó una desnaturalización inicial a 94°C/3 min, seguido de 40 ciclos de desnaturalización a 94°C/30 s, hibridación a 61°C/40 s y extensión a 72°C/1 min, con una extensión final de 72°C/7 min.

1.6.1.3. Preparación del gel y electroforesis convencional

Los fragmentos de DNA amplificados se separaron mediante electroforesis en un gel de agarosa al 1,5 %. Para la preparación del gel, se pesaron 1,5 g de agarosa (Molecular Biology Grade, 50 bp-50 kb, BIORON) y se disolvieron en 100 ml de buffer 1X TBE. Se llevó a ebullición y se dejó atemperar en un baño termostático a 54°C durante 1 h. Posteriormente, se añadieron 5 µl de tinte *Midori Green Advanced DNA Stain* (Nippon Genetics Europe GmbH, Alemania) y se dispuso en un molde, se colocó un peine para la formación de pocillos en el gel y se dejó solidificar a temperatura ambiente durante 30 min.

El gel se introdujo en la cubeta electroforética Wide-Mini Subcell GT base (Bio-Rad). Cinco μl del DNA amplificado se mezclaron con 1 μl de 6X Loading Buffer II (IBIANLab) y se añadieron a cada pocillo. Para determinar el peso molecular de los fragmentos de DNA amplificado, se utilizó un marcador de peso molecular de 100 bp hasta 1000 bp (IBIANLab). Se añadió buffer 1X TBE a la cubeta electroforética hasta cubrir por completo el gel. La electroforesis se realizó en un equipo electroforético PowerPac Basic power Supply 100-120/220V (Bio-Rad), a 90 V durante 60 min. La visualización de las bandas se realizó en el equipo GelDoc 2000 (Bio-Rad) y el software de adquisición de imágenes Quantity One v.4.4.0 (Bio-Rad).

1.6.2. Electroforesis en gel en campo pulsante (PFGE)

Esta parte de la caracterización genotípica de los aislados de *L. monocytogenes* se realizó durante una estancia predoctoral de tres meses, gracias a la colaboración entre nuestro grupo de investigación y el Departamento de Seguridad Alimentaria de la Universidad Ludwig Maximilians de Múnich (Alemania).

Los aislados de *L. monocytogenes* procedentes del proceso de elaboración del jamón curado loncheado se analizaron mediante PFGE, de acuerdo con el protocolo estándar internacional de PulseNet (PulseNet, 2013). *Salmonella* Braenderup H9812 se utilizó como microorganismo de referencia para estandarizar los patrones de bandas.

1.6.2.1. Preparación de la suspensión bacteriana

En relación a *L. monocytogenes*, se seleccionaron colonias del agar BHI incubado a 37°C/24h y se resuspendieron en 2 ml de buffer 1X TE. Se midió la concentración celular en un espectrofotómetro a 600 nm y se ajustó la concentración celular a una OD₆₀₀ de 1,0.

En el caso de *S. Braenderup H9812*, las colonias aisladas de agar sangre de cordero (Oxoid) incubadas a 37°C/18-24 h, se resuspendieron en 2 ml CSB (Cell Suspension Buffer) y la concentración celular se ajustó a un valor OD₆₀₀ de 1,3-1,4.

1.6.2.2. Preparación de los bloques de agarosa

Para *L. monocytogenes*, se tomaron 400 μl de la suspensión bacteriana de cada aislado, se añadieron 20 μl de lisozima (20 mg/ml) y se incubaron a 55°C/20 min. Posteriormente, se añadieron 20 μl de proteinasa K (20 mg/ml). En el caso de *S. Braenderup H9812*, 400 μl de la suspensión bacteriana se mezcló con 20 μl de proteinasa K (20 mg/ml).

Se transfirieron 400 μl de la suspensión de ambos microorganismos a tubos estériles y se añadieron 400 μl de una mezcla compuesta por 1 % Biozym Gold agarosa (Biozym Scientific GmbH, Germany) + 0,5 % SDS (Carl ROTH, Germany). Inmediatamente, se dispensó la mezcla

en cinco moldes (90 μ l/molde) para bloques de agarosa (Bio-Rad). Se dejaron solidificar a temperatura ambiente durante 15 min, obteniéndose cinco bloques por aislado.

1.6.2.3. Lisis celular

Los bloques de agarosa se desmoldaron y se depositaron en un tubo de 50 ml. A cada tubo se le añadió 5 ml de buffer de lisis celular (50 mM Tris:50 mM EDTA, pH 8,0 + 1 % Sarcosyl) y 25 μ l de proteinasa K (20 mg/ml). Las muestras se incubaron en un baño termostático con agitación a 54°C/2 h.

1.6.2.4. Lavado de los bloques de agarosa

Tras la lisis celular, se procedió al lavado de los bloques de *L. monocytogenes* y *S. Braenderup*. Para ello, se eliminó el buffer de lisis, y se añadieron 15 ml de agua (grado biología molecular) precalentada a 54°C. Las muestras se incubaron a 54°C durante 10 min en un baño con agitación. Este paso se repitió una vez más.

Tras la eliminación del agua de lavado, se añadieron 15 ml de buffer 1X TE (precalentado a 54°C) y se incubaron en un baño con agitación a 54°C /15 min. Este paso se repitió cuatro veces. Finalmente, los bloques de agarosa se introdujeron en 10 ml de buffer 1X TE y se mantuvieron a 4°C hasta su utilización.

1.6.2.5. Restricción del DNA

La restricción del genoma de *L. monocytogenes* se realizó con las enzimas endonucleasas de restricción *Ascl* y *Apal*. Se seleccionó un bloque de agarosa por aislado y se cortó longitudinalmente, dando lugar a dos láminas de 2-2,5 mm de anchura. Cada lámina se introdujo en 200 μ l de buffer de equilibrio que contenía: 179 μ l de agua, 20 μ l de 10X CutSmart buffer (New England Biolabs, Estados Unidos) y 1 μ l de 20 mg/ml BSA (Bovine Serum Albumin, New England Biolabs). Se incubaron a 37°C durante 10 min.

Se eliminó el buffer de equilibrio y se añadió el buffer de restricción. En cada lámina destinada a ser digerida con el enzima *Ascl*, se añadieron 200 μ l del buffer de restricción que contenía: 176,5 μ l de agua, 20 μ l de 10X CutSmart buffer, 1 μ l de 20 mg/ml BSA y 2,5 μ l de enzima *Ascl* (10 U/ μ l; New England Biolabs).

En el caso de las láminas digeridas con la enzima *Apal*, para cada muestra se añadieron 200 μ l del siguiente buffer de restricción: 178,5 μ l de agua, 20 μ l de 10X CutSmart buffer, 1 μ l de 20 mg/ml BSA y 0,5 μ l de enzima *Apal* (50 U/ μ l; New England Biolabs).

Para la restricción del DNA con los enzimas *Ascl* y *Apal*, las muestras se incubaron a 37°C/2 h y 25°C/2 h, respectivamente. Para la restricción del genoma de *S. Braenderup* H9812, el corte de los bloques de agarosa y la adición e incubación con buffer de equilibrio, se siguió la metodología descrita anteriormente.

Una vez eliminado el buffer de equilibrio, en cada lámina se añadieron 200 µl del buffer de restricción, que en este caso estuvo compuesto por: 175 µl de agua, 20 µl de 10X CutSmart buffer, y 5 µl de enzima *XbaI* (10 U/µl; New England Biolabs). Las muestras se incubaron a 37°C durante 2 h.

1.6.2.6. Electroforesis en gel en campo pulsante (PFGE)

Para la preparación del gel de agarosa, se pesaron 1,2 g de agarosa Pulsed Field Certified Agarose Ultra pure DNA Grade (Bio-Rad) y se mezclaron con 120 ml de 0,5X TBE buffer. La mezcla se calentó hasta la completa disolución de la agarosa, y se mantuvo en un baño a 54°C durante un mínimo de 1 h. Posteriormente, la solución de agarosa se vertió en el molde del gel, se dispuso un peine para crear los pocillos (15 líneas) y se dejó solidificar durante 30 min a temperatura ambiente.

Una vez finalizada la restricción, se eliminó el buffer, y se añadieron 200 µl de buffer 0,5X TBE a cada lámina, manteniéndose durante 5 min a temperatura ambiente. Se extrajo el buffer 0,5X TBE y las láminas se dispusieron cuidadosamente en el interior de pocillos del gel de agarosa.

La distribución de las muestras en los geles fue la siguiente:

- Líneas 1, 8 y 15: *S. Braenderup* H9812, como patrón estándar.
- Línea 2: control positivo de *L. monocytogenes* (preparación de los bloques de agarosa).
- Línea 3: control positivo de *L. monocytogenes* (restricción del DNA)
- Resto de las líneas: aislados de *L. monocytogenes* objeto de estudio.

Los pocillos se sellaron con agarosa 1 % fundida y se dejó solidificar 5 min a temperatura ambiente. La electroforesis se realizó en un equipo CHEF Mapper (Bio-Rad). Previamente a la introducción del gel, tanto la cubeta electroforética como los conductos fueron limpiados con agua durante 15 minutos. Treinta minutos antes de introducir el gel, se añadieron 2,4 l de buffer 0,5X TBE y se seleccionó 1 l/min de flujo en la bomba y una temperatura de 14°C. El gel fue desmoldado y se introdujo en la cubeta del equipo, donde permaneció 10 min antes de iniciar el programa de electroforesis.

Las condiciones electroforéticas seleccionadas en el equipo fueron las siguientes:

- Autoalgorithm
- Peso molecular bajo (*Low MW*): 49 kb
- Peso molecular alto (*High MW*): 450 kb
- Tiempo de cambio inicial (*Initial switch time*): 4,0 s
- Tiempo de cambio final (*Final switch time*): 40,0 s
- Voltaje: 6 V/cm
- Ángulo incluido (*Included angle*): 120°
- Tiempo: 23 h
- Temperatura: 14°C

Posteriormente, el gel fue teñido con el tinte GelRed® (Biotium, Estados Unidos). Para ello, se añadieron 15 µl de GelRed® 10.000X a 500 ml de agua, se introdujo el gel en esta solución y se mantuvo en ella durante 30 min en agitación constante.

Las imágenes del gel fueron tomadas en un equipo GelDoc 2000 y el software de adquisición de imágenes Quantity One v.4.4.0.

1.6.2.7. Análisis del patrón de bandas

El análisis del patrón de bandas obtenido de cada aislado se realizó mediante el software BioNumerics Versión 5.0 (Applied Maths, Bélgica). El perfil de bandas obtenido de la cepa *S. Braenderup* H9812 se utilizó como patrón de referencia.

Los subtipos obtenidos por PFGE (pulsotipos) se designaron con la letra S y un número identificativo de los perfiles obtenidos. En determinados casos, este número se acompañó de un segundo número precedido por un guión para identificar diferentes perfiles obtenidos con el enzima de restricción *Apal* de un mismo perfil obtenido con el enzima *Ascl*.

El dendrograma de los perfiles de PFGE obtenidos por las dos enzimas se realizó mediante el método de agrupamiento de pares no ponderados usando la media aritmética (UPGMA, *unweighted pair group method with arithmetic mean*). Para ello, se utilizó el coeficiente de similitud de Dice con una optimización y posición de tolerancia máxima del 1 % (Martin et al., 2006).

1.6.2.8. Evaluación de la diversidad genética de los pulsotipos

La diversidad genética se determinó a través del índice de diversidad de Simpson (D). Este índice determina la probabilidad de que dos aislados con distintos orígenes se identifiquen como pulsotipos diferentes (Hunter & Gaston, 1988).

Dicha diversidad genética se calcula según la ecuación:

$$D = 1 - \frac{\sum_{i=1}^S n_i (n_i - 1)}{N(N - 1)}$$

donde N es el número total de aislados, S es el número de pulsotipos y n_i es el número de aislados pertenecientes al pulsotipo i .

Los pulsotipos (o cepas) de *L. monocytogenes* detectados en el ambiente o los equipos de forma repetida (tres o más veces) durante un periodo mínimo de tres meses, se consideraron persistentes (Keto-Timonen et al., 2007).

1.7. Análisis estadístico

Los datos obtenidos de la detección de *L. monocytogenes* en las muestras de jamón curado se analizaron mediante un estudio descriptivo de los mismos. El análisis estadístico de los datos de superficies se realizó con el software SPSS statistics 22.0.0. A través de la prueba Chi-Cuadrado o Razón de Verosimilitudes se estudió la relación estadística entre las variables presencia de *L. monocytogenes* y:

- Zona de procesado
- Estado de la superficie
- Tipo de superficie
- Estación del año

En las variables asociadas ($p < 0,05$) se estimó el riesgo mediante el cálculo del Odds Ratio (OR).

2. Resultados y discusión

2.1. Detección de *L. monocytogenes* en jamón curado loncheado y envasado al vacío.

Se detectó la presencia de *L. monocytogenes*/25 g en cuatro de las muestras de jamón curado (3,3 %). Estas muestras formaban parte de tres lotes de fabricación: dos del lote 5, una del lote 13 y una del lote 15; por lo que la bacteria estuvo presente en un 15,8 % de los lotes analizados.

Tres de las muestras positivas procedieron de jamón de siete meses de curación, mientras que una de ellas fue de jamón de 10 meses de curación. Las muestras de siete meses de curación tenían una a_w mayor (0,920 y 0,921) que la de 10 meses (0,903), si bien *L. monocytogenes* fue capaz de sobrevivir en todas ellas. La a_w más baja en la cual *L. monocytogenes* puede multiplicarse se ha fijado en 0,90-0,93, pudiendo sobrevivir en $a_w < 0,90$ (EFSA/ECDC, 2008; Schwartzman, Belessi, Butler, Skandamis, & Jordan, 2011). Las muestras de este estudio se encuentran dentro de este rango, por lo que el microorganismo podría sobrevivir en estas condiciones. El pH de las muestras positivas (6,05, 6,00 y 5,35) no fue limitante para la supervivencia del microorganismo, encontrándose por encima del pH establecido por la legislación europea como limitante para su crecimiento ($pH \leq 4,4$).

Asimismo, la concentración máxima de NaCl en la que el patógeno es capaz de crecer se ha establecido entre 12-16 % (EFSA/ECDC, 2008; Shabala, Lee, Cannesson, & Ross, 2008), por lo que el contenido en NaCl de las muestras de nuestro estudio (5,2 %, 3,9 % y 3,1 %) podría no ser limitante para la supervivencia y multiplicación del patógeno, pero sí actuar como una barrera complementaria a la baja a_w y el pH. Con respecto a las sales nitrificantes, la Unión Europea fija en jamón curado al final del proceso unos contenidos máximos de 250 mg/kg y 100 mg/kg de nitratos y nitritos, respectivamente (Reglamento UE N° 1129/2011). Estos niveles podrían ser revisados, ya que las autoridades europeas están considerando la posibilidad de reducir las cantidades de sales nitrificantes utilizadas en productos cárnicos. Sin embargo, cualquier reducción del uso de estos compuestos debe alcanzar un equilibrio entre la seguridad microbiológica, toxicológica y calidad organoléptica. Hospital et al. (2017) determinaron que *L. innocua* puede crecer en presencia de un rango de concentraciones de 600 mg/kg a 150 mg/kg KNO_3 , así como en las condiciones de a_w , pH y temperatura habituales en el proceso de elaboración de jamón curado. Además, comprobaron que en el producto final, *L. innocua* se multiplicó en rangos de a_w de 0,930 a 0,911 y de pH de 5,90 a 6,08. Estos datos son similares a

los observados en el presente estudio, mostrando que estos valores podrían no ser limitantes para el crecimiento de la bacteria patógena.

El Reglamento (CE) N° 2073/2005 establece que los alimentos con $a_w \leq 0,92$, o $pH \leq 4,4$ o una combinación de $a_w \leq 0,94$ o $pH \leq 5$ no pueden favorecer el desarrollo de *L. monocytogenes*, fijando un límite de ≤ 100 ufc/g en productos comercializados a lo largo de su vida útil. En nuestro estudio, los valores de a_w de las muestras positivas fueron $\leq 0,92$, por lo que pertenecieron a esta categoría. Las muestras en las que se detectó la presencia del patógeno presentaron unos recuentos por debajo de los límites de cuantificación del método de referencia (< 5 ufc/g) y del qPCR ($< 30,1 \pm 6,2$ ufc/g), siendo unos niveles bajos de contaminación y cumpliendo con el límite establecido. Sin embargo, el operador debe demostrar que el recuento no supera el límite de 100 ufc/g a lo largo de la vida útil del alimento. Si no puede demostrarlo, se considera un resultado insatisfactorio y los productos o lotes de productos afectados deberán ser retirados o recuperados del comercio. Si todavía no se encuentran en el comercio de venta al por menor podrán someterse a un tratamiento que elimine el riesgo de *L. monocytogenes* o bien, destinarse a otros fines previamente establecidos en el programa APPCC de la empresa sin que supongan un riesgo para la salud pública y animal.

Sin embargo, en nuestro estudio se aplicó el límite más restrictivo (ausencia/25 g), por la posibilidad de que la empresa colaboradora exporte su producto a terceros países, principalmente Estados Unidos. Según los requisitos estadounidenses, estas muestras se considerarían como “caso positivo indicador” detectado en el autocontrol. La industria debería de disponer de procedimientos documentados que detallaran cuáles van a ser las acciones a adoptar tras la detección de *L. monocytogenes*. Tras la finalización de dichas acciones, se procede a un chequeo de la línea de producción (producto, superficie en contacto y no contacto con el alimento) y se evaluarían los lotes exportados a Estados Unidos potencialmente implicados (Ministerio de Sanidad, Servicios Sociales e Igualdad, 2015).

Generalmente, la prevalencia de *L. monocytogenes* en jamón curado observada por otros autores suele ser baja. Los datos obtenidos en el presente estudio concuerdan con Jemmi et al. (2002), donde encontraron una positividad del 3 % en productos cárnicos LPC curado-madurados analizados por el método de referencia. Mena et al. (2004) obtuvieron una prevalencia ligeramente inferior (2,3 %), ya que de las 44 muestras de jamón curado analizadas mediante el método ELFA (*Enzyme-linked fluorescence immunoassay*) mini-VIDAS LMO, detectaron *L. monocytogenes* en solo una de ellas. Los datos obtenidos en el presente estudio son ligeramente superiores a los publicados por Prencipe et al. (2012), con una prevalencia del 2 % en jamón de Parma deshuesado y envasado al vacío, y los de Wagner, Auer, Trittmittel,

Hein, & Schoder (2007), con una presencia de *L. monocytogenes* en el 1,3 % de los productos cárnicos curados adquiridos en tiendas de venta al por menor, ambos mediante el método de referencia. Este porcentaje se incrementó al 8,9 % cuando las muestras procedieron del ámbito doméstico, indicando la importancia de este entorno en el riesgo de transmisión del patógeno. Gómez et al. (2015) detectaron el patógeno en el 24,3 % de muestras de jamón curado analizadas por el método de referencia inmediatamente tras su compra. Si bien, este porcentaje disminuyó (2,7 %) en las muestras de este producto analizadas al final de la vida útil. Se ha observado que el patógeno puede estar presente en este alimento, sin embargo, los niveles de contaminación de *L. monocytogenes* en jamón curado suelen ser bajos (10-30 ufc/g), no superando el límite de 100 ufc/g (Gómez et al., 2015; López et al., 2008; Ortiz et al., 2010; Prencipe et al., 2012).

Diversos autores han señalado que la presencia de *L. monocytogenes* en jamón curado puede darse por contaminación cruzada con equipos o cintas transportadoras durante operaciones como el deshuesado, loncheado y envasado (Chaitiemwong, Hazeleger, & Beumer, 2010; Chaitiemwong, Hazeleger, Beumer, & Zwietering, 2014). Tanto las acciones post-procesado, como el almacenamiento del alimento en temperaturas inadecuadas durante un tiempo prolongado, pueden suponer un aumento del riesgo para el consumidor debido a la multiplicación del microorganismo (Chaitiemwong, Hazeleger, Beumer, & Zwietering, 2014).

2.2. Detección de *L. monocytogenes* en superficies relacionadas con el procesado de jamón curado loncheado y envasado al vacío

Del total de muestras de superficies analizadas (n=281), *L. monocytogenes* se detectó en el 9,3 % de ellas (n=26). Según el documento publicado en el año 2015 por la AECOSAN "Directrices para el muestreo oficial de líneas de producción de alimentos Listos Para el Consumo que pueden plantear riesgo de *Listeria monocytogenes* y actuaciones consiguientes", estos resultados no cumplirían con el criterio de aceptabilidad (ausencia *L. monocytogenes*/superficie). En este caso, la autoridad competente requerirá al operador de la empresa la investigación de las causas de la contaminación, así como será necesaria la aplicación de medidas correctoras para evitar la repetición de la no conformidad. Asimismo, el APPCC del operador debe contemplar las medidas a tomar ante la detección de *L. monocytogenes* en superficies del ambiente de procesado, y activarlas tras la valoración de los resultados y de los registros procedentes de su autocontrol.

Nuestros resultados en cuanto al % de presencia coinciden con otros autores, como López et al. (2008), donde determinaron la presencia de patógeno en el 9 % de muestras de superficies de

un matadero e industria de productos cárnicos de cerdo ibérico; Ortiz et al. (2010) detectaron un 10 % de muestras positivas en diferentes zonas del procesado durante tres años y Gudbjörnsdóttir et al. (2004) observaron la presencia del patógeno en el 8,3 % de las superficies en contacto directo con el alimento procedentes de industrias de carne de cerdo, de pollo y productos de la pesca.

Nuestros valores son superiores a los encontrados por Leong et al. (2017) en el que obtuvieron un 4,3 % de muestras positivas de superficies de diferentes industrias cárnicas e inferiores a los estudios de Gómez et al. (2015) y Muhterem-Uyar et al. (2015), con una prevalencia del 22,7 % y 50,5 %, respectivamente, en superficies de diferentes industrias de productos cárnicos LPC. Por ello, la contaminación detectada en nuestro estudio se consideró moderada.

En la Tabla 31 se muestran los datos obtenidos del análisis de superficies del ambiente de procesado.

Tabla 31. Detección de *L. monocytogenes* en el ambiente de procesado.

Zona deshuesado (n+/n)	21/173		Zona loncheado (n+/n)		Estación del año (n+/n)			
	L	S	L	S	Primavera	Verano	Otoño	
Cintas transportadoras	8/18	3/18	Cintas transportadoras	2/41	2/42	11/73	2/38	13/170
Plataforma circular	0/6	0/6	Cuchilla de loncheado	0/6	0/1			
Desgubadoras	5/9	0/9	Mesas	0/8	1/10			
Moldeadora	0/6	2/4						
Desmoldeadora	0/6	0/5						
Deshuesadoras	0/36	1/25						
Moldes y tapas de prensado	0/8	0/5						
Mesas	1/6	1/6						
Total	14/95	7/78		2/55	3/53			

(n+/n): número de muestras positivas/número de muestras analizadas.

L: Superficies limpias; S: superficies sucias.

Los resultados del análisis estadístico sobre la asociación de la presencia de *L. monocytogenes* y las principales variables estudiadas se muestran en la Tabla 32. En rojo se destacan las variables que estuvieron asociadas a la presencia del patógeno con un nivel de confianza del 95 %.

Tabla 32. Resultados estadísticos de las asociaciones entre la presencia de *L. monocytogenes* y las principales variables estudiadas.

Variables		Chi-cuadrado	Razón de verosimilitudes	p-valor ^a
Presencia <i>L. monocytogenes</i>	Zona de procesado	4,465	-	0,035
	Estado de la superficie	0,766	-	0,381
	Tipo de superficie	-	37,204	<0,001
	Estación del año	4,183	-	0,124

- no aplicado.

^a nivel de confianza del 95 %.

De las 173 muestras pertenecientes a la **zona de deshuesado**, *L. monocytogenes* estuvo presente en 21 de ellas (Figura 25.A). Mientras que, en las 108 muestras de la **zona de loncheado**, la positividad fue inferior con cinco muestras positivas (Figura 25.B).

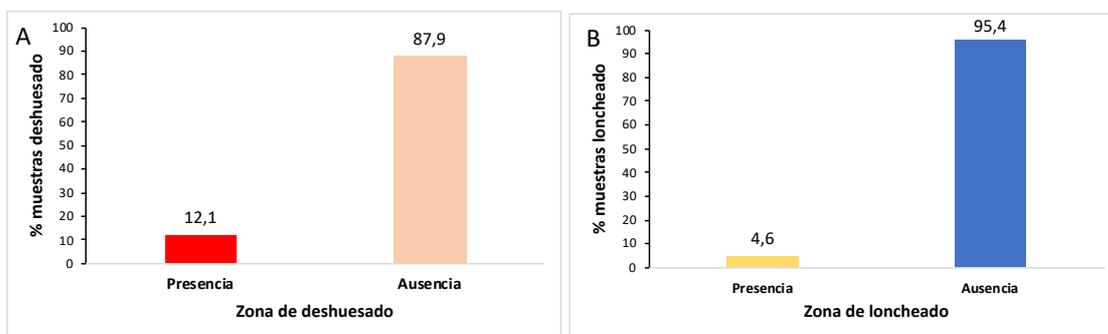


Figura 25. A. Detección de *L. monocytogenes* en la zona de deshuesado. B. Detección de *L. monocytogenes* en la zona de loncheado.

Como se ha visto, se encontró una relación con significación estadística entre la presencia de *L. monocytogenes* y la zona de procesado (Tabla 32). La probabilidad de detectar *L. monocytogenes* en una muestra no fue la misma en ambas zonas. De hecho, con un nivel de confianza del 95 %, la probabilidad de que se detectara *L. monocytogenes* en una superficie fue entre 1,04 y 7,79 veces superior cuando la muestra procedió de la zona de deshuesado.

Si se analiza el **estado de las superficies** (limpias y sucias), *L. monocytogenes* se detectó en el 5,7 % de las superficies limpias y en el 3,6 % de las superficies sucias. No se evidenció asociación estadísticamente significativa entre la presencia del patógeno y el estado de las superficies (Tabla 32). Por ello, la probabilidad de encontrar *L. monocytogenes* fue la misma tanto en superficies limpias como en sucias.

Son varios los trabajos en los que se comprueba la no eliminación del patógeno tras las operaciones de limpieza y desinfección (L+D). Así, Campdepadrós, Stchigel, Romeu, Quilez, & Solà (2012) observaron una disminución significativa de *L. monocytogenes* (de 15,2 % a 6,9 %)

en superficies antes y después de este procedimiento. Este hecho se acompañó de una reducción del recuento de aerobios mesófilos totales, enterobacterias, mohos y levaduras. Sin embargo, no consiguieron la eliminación total del patógeno. Talon et al. (2007) analizaron la presencia de *L. monocytogenes* en diferentes industrias cárnicas, obteniendo 6,7 % de superficies positivas tras el procedimiento de L+D. Henriques et al. (2014) observaron que tras la L+D del ambiente y superficies de diferentes empresas de productos cárnicos LPC, no se logró la erradicación total del patógeno.

El procedimiento de L+D debería ser efectivo para la reducción de la microbiota autóctona de los ambientes de procesado de alimentos, y por lo tanto, disminuir el riesgo de contaminación cruzada con el alimento. Sin embargo, existen numerosos factores que pueden disminuir la eficiencia de este procedimiento en la industria alimentaria. En ocasiones, la temperatura, la dureza del agua, el tipo de superficie y los residuos dejados por los alimentos durante el procesado, dificultan la efectividad de los procedimientos de higienización, particularmente frente a *L. monocytogenes* (Campdepadrós et al., 2012; Gram, Bagge-Ravn, Ng, Gymoese, & Vogel, 2007).

En cuanto a las **superficies limpias**, se obtuvo una relación estadísticamente significativa (Chi-cuadrado=4,504 y p=0,034) entre la presencia de *L. monocytogenes* y la zona de procesado. La probabilidad de encontrar *L. monocytogenes* en una superficie limpia fue entre 1,1 y 20,97 veces superior en la zona de deshuesado que en la de loncheado.

En nuestro estudio, la manipulación del jamón curado en la zona de deshuesado fue muy elevada en comparación con la zona de loncheado. En esta área se realizó el deshuesado, descortezado, moldeado y desmoldeado de las piezas de jamón, generándose una gran cantidad de restos de materia orgánica (grasa y jamón) a lo largo de la jornada de trabajo. Por ello, la L+D podría ser más compleja en esta zona disminuyendo la eficacia de la misma. Además, en esta zona se observó que tras el procedimiento de L+D, algunas de las superficies presentaban acumulaciones de agua que no habían sido eliminadas en el secado, favoreciendo la supervivencia y multiplicación del patógeno (Carpentier & Cerf, 2011)

Esta hipótesis coincidiría con lo observado por diversos autores, como Gram et al. (2007), donde observaron que la eficiencia de la L+D estaba fuertemente influenciada por el tipo de matriz alimentaria procesada. En presencia de restos de matriz cárnica, se obtuvo una menor reducción de la carga microbiana del patógeno en superficies. Asimismo, Chaitiemwong, Hazeleger, & Beumer (2010) determinaron que la presencia de materia orgánica en la superficie disminuía el efecto antimicrobiano del agente desinfectante utilizado. Por otro lado, Chaturongkasumrit,

Takahashi, Keeratipibul, Kuda, & Kimura (2011) comprobaron que, tras la L+D sobre un biofilm de *L. monocytogenes* en presencia de restos de matriz cárnica, la población se redujo hasta 1-3 log ufc de *L. monocytogenes* pero no la eliminó completamente, permitiendo su posterior multiplicación hasta los niveles de contaminación inicial.

Con respecto al **tipo de superficie** analizada, se detectó la presencia de *L. monocytogenes* en las cintas transportadoras (articuladas y continuas), las desgubadoras, la moldeadora, las deshuesadoras y las mesas (Tabla 33).

Tabla 33. Detección de *L. monocytogenes* en los distintos equipamientos analizados.

Tipo de superficie	Muestras positivas/tipo superficie	% muestras positivas total (n=281)
Cintas articuladas	11/36	3,9
Cintas continuas	4/71	1,4
Cintas con relieve	0/12	0
Plataforma circular	0/12	0
Desgubadoras	5/18	1,8
Moldeadora	2/10	0,7
Desmoldeadora	0/11	0
Deshuesadoras	1/61	0,4
Moldes y tapas de prensado	0/13	0
Mesas	3/30	1,1
Cuchilla	0/7	0
Total	26/281	9,3

Se determinó con un 95 % de probabilidad, la asociación entre las variables presencia de *L. monocytogenes* y tipo de superficie (Tabla 32). Esto indicó que la probabilidad de encontrar *L. monocytogenes* no fue la misma en los diferentes tipos de superficies muestreados. Hecho demostrado por otros autores, destacando la detección del patógeno en cintas transportadoras, picadoras, mesas, suelos y drenajes (Henriques et al., 2014; Muhterem-Uyar et al., 2015; Simmons & Wiedmann, 2017).. Esto coincide con los resultados obtenidos en nuestro estudio, ya que, del total de muestras positivas de superficies, el 57,7 % correspondieron con cintas transportadoras, 19,2 % con desgubadoras y el 11,5 % con mesas (Figura 26).

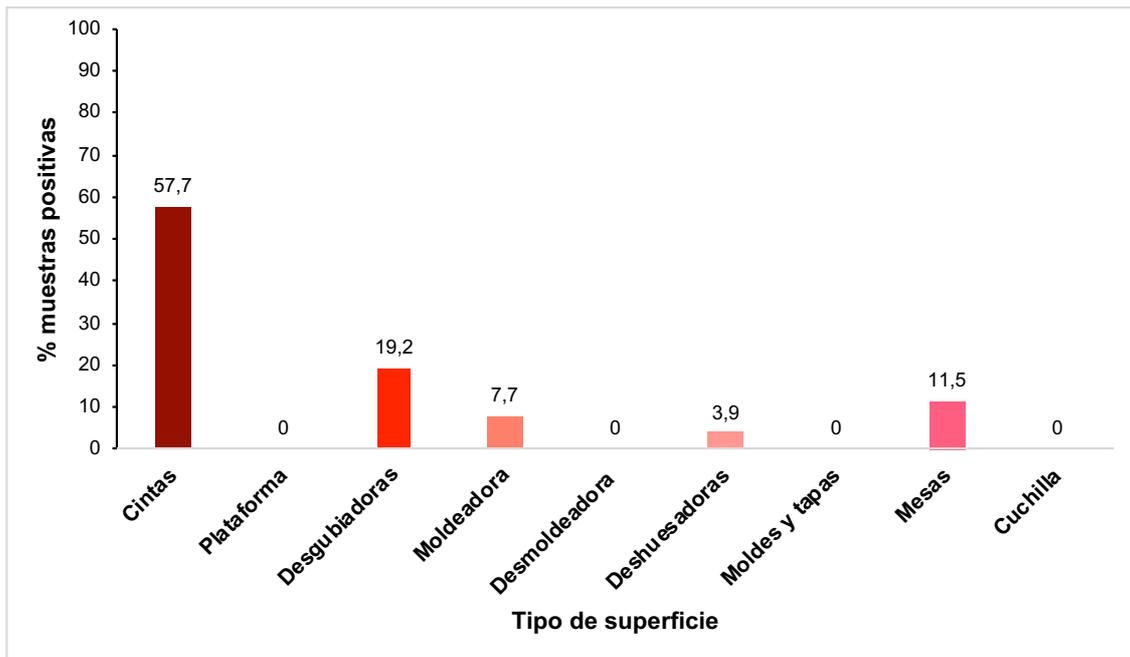


Figura 26. Presencia de *L. monocytogenes* en los distintos tipos de superficies analizadas.

Coincidiendo con nuestros resultados, Henriques et al. (2014) detectaron una mayor presencia del microorganismo en cintas transportadoras, carros y mesas de corte. Resultados similares fueron los presentados por Luning et al. (2011), mostrando como principales puntos de contaminación las cintas transportadoras, tablas y mesas. Asimismo, Meloni et al. (2014) encontraron una positividad del 6 % en superficies en contacto con alimentos principalmente en carros, picadoras de carne y mesas de trabajo. Barros et al. (2007) señalan como puntos importantes de contaminación por *L. monocytogenes* las picadoras de carne, sierras y cajas de plástico. Gudbjörnsdóttir et al. (2004) encontraron una prevalencia del 1,2 % al 7 % en muestras procedentes de cintas transportadoras, equipos y bandejas.

En relación a los **equipos** utilizados en la **zona de deshuesado** (plataforma circular, desgubadoras, moldeadora, desmoldeadora y deshuesadoras), se encontró una relación estadísticamente significativa (nivel de confianza 95 %) entre el tipo de equipo utilizado en esta zona y la presencia de *L. monocytogenes* (Razón de verosimilitud=16,156 y $p=0,003$). Por ello, no existió la misma probabilidad de encontrar *L. monocytogenes* entre los diferentes equipos de esta zona. La probabilidad de que el patógeno estuviera presente fue de 2,48 a 214,43 veces superior en el caso de que la muestra procediera de una desgubadora, con respecto a una deshuesadora.

Las desgubadoras son equipos de acero inoxidable con zonas de muy difícil acceso, en los cuales se acumulaba una gran cantidad de materia orgánica (principalmente grasa) tras la jornada de trabajo. En este equipo, el patógeno siempre se detectó en superficies limpiadas (tras el

procedimiento de L+D). Como se ha descrito anteriormente, la materia orgánica disminuye la eficacia de los agentes antimicrobianos, favoreciendo la supervivencia del patógeno. Asimismo, las zonas de difícil acceso pueden servir como reservorios donde el microorganismo queda acantonado. Todo ello, dificulta la eliminación completa de la bacteria, por lo que se consideró la existencia de uno o varios nichos de contaminación de *L. monocytogenes* en este equipo.

Tras los resultados obtenidos en las cintas transportadoras, y considerando que es una de las superficies más problemáticas contaminadas con *L. monocytogenes* en la industria cárnica, se decidió investigar la relación de *L. monocytogenes* con el **diseño de la cinta**. Se observó una mayor presencia de *L. monocytogenes* en cintas articuladas que en los otros dos diseños (Figura 27).

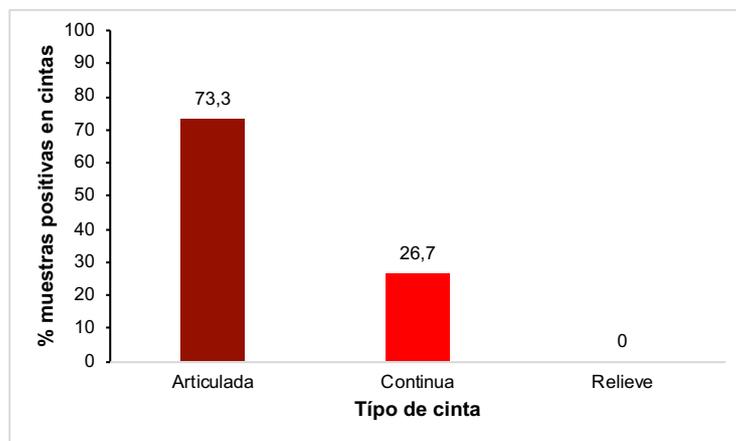


Figura 27. Presencia de *L. monocytogenes* en los distintos tipos de cintas transportadoras.

Existió una asociación significativa (nivel de confianza del 95 %, Razón de verosimilitud=15,059 y $p=0,001$) entre las variables presencia de *L. monocytogenes* y los diferentes diseños de las cintas transportadoras (articuladas, continuas y con relieve). Por ello, el riesgo de contaminación con *L. monocytogenes* no fue el mismo para los distintos tipos de cintas, siendo entre 2,15 y 25,29 veces superior cuando la muestra procedió de una cinta articulada que de una continua (95 % de nivel de confianza). Además, se observó que el 73 % de las muestras positivas en este tipo de cintas articuladas provenían de superficies limpias.

Las cintas articuladas eran de poliuretano, de superficie rugosa y uniones entre las láminas que la formaban. El diseño inadecuado de estas cintas complicó tanto la eliminación completa de materia orgánica (disminuyendo la acción de los agentes desinfectantes), como la llegada de los agentes antimicrobianos a las zonas más complejas. Todo ello, permitió la supervivencia de *L. monocytogenes* en nichos o reservorios en este equipo, tal y como demostró su detección repetida en estas superficies a lo largo de este estudio.

Chaturongkasumrit et al. (2011) estudiaron el efecto en la formación de biofilms de *L. monocytogenes* y la eficiencia de la higienización sobre diferentes rugosidades de cintas transportadoras de poliuretano. La rugosidad del material presentó una elevada influencia en la eficacia de la L+D, con una mayor eficacia cuanto menor fue la rugosidad. Sin embargo, es destacable que incluso en cintas nuevas con una rugosidad muy baja (0,05 µm) el biofilm de *L. monocytogenes* no pudo ser completamente eliminado. Chaitiemwong et al. (2010) determinaron el efecto de distintos materiales antimicrobianos de recubrimiento (zeolita de plata, óxido de aluminio, óxido de calcio o óxido de magnesio, piritiona de zinc y oxibisfenoxarsina) en cintas transportadoras de poliuretano para el control de *L. monocytogenes*. Estos autores observaron que solo conseguían reducir la concentración de *L. monocytogenes* a bajas temperaturas, en ausencia de materia orgánica y con las cintas secadas inmediatamente tras la desinfección.

El incorrecto diseño higiénico de los equipos (piezas huecas o soldaduras sin pulir), su falta de mantenimiento (grietas o corrosión) y el difícil acceso a determinadas partes durante la L+D (engranajes o juntas), permite albergar elevadas cargas microbianas y servir como fuente potencial de contaminación cruzada con el alimento u otras superficies (Chasseignaux et al., 2002; Hingston, Stea, Knøchel, & Hansen, 2013; Keto-Timonen et al., 2007; Le Gentil, Sylla, & Faille, 2010).

La capacidad de *L. monocytogenes* de fijarse a las superficies relacionadas con el procesado de alimentos, la formación de biofilms en localizaciones inaccesibles, y su supervivencia durante largos periodos de tiempo en los entornos de procesado de alimentos, son hechos de gran importancia para la industria alimentaria (Chaitiemwong et al., 2010; Ortiz et al., 2010; Tompkin, 2002). Se ha observado que las bacterias son capaces de moverse por sí mismas en líquidos o bien, se desplazan en aerosoles creados durante las operaciones de L+D (cepillado, lavado con baja o alta presión). Gracias a ello, *L. monocytogenes* puede refugiarse, junto con agua y materia orgánica, en zonas de difícil acceso a los agentes de L+D, formando nichos o reservorios (Carpentier & Cerf, 2011). En estas localizaciones, *L. monocytogenes* encuentra las condiciones adecuadas para la formación de biofilm. Se ha descrito que las células de *L. monocytogenes* que se encuentran formando esta estructura polimérica son más resistentes a los biocidas que las células en estado planctónico (Aarnisalo et al., 2000; Chavant, Gaillard-Martinie, & Hébraud, 2004; Gram et al., 2007; Pan, Breidt, & Kathariou, 2006). Esto puede sugerir un vínculo entre la capacidad de formación de biofilm y la resistencia antimicrobiana, sin embargo, se han encontrado estudios con resultados contradictorios (Harvey et al., 2007; Pan et al., 2006; van der Veen & Abee, 2011).

En la resistencia a los biocidas, se ha observado la influencia de diversos factores como las características físicas y químicas de la superficie, la temperatura, el medio de crecimiento, la fase de crecimiento de la bacteria, las características de la célula, la presencia de residuos de alimentos o de otros microorganismos (Chavant et al., 2004; Gram et al., 2007; Pan et al., 2006). Esta resistencia ha sido asociada a una acción mecánica protectora de los polímeros extracelulares y de los nutrientes del biofilm alrededor de la célula, así como a factores fisiológicos intrínsecos de la bacteria que le permiten adaptarse a condiciones estresantes (Chaitiemwong et al., 2010; Pan et al., 2006). Ibusquiza, Herrera, & Cabo (2011) relacionaron una mayor complejidad de la estructura microscópica de un biofilm maduro de *L. monocytogenes* con una mayor resistencia a determinados biocidas, por lo que en la optimización de los protocolos de L+D, se deben tener en cuenta los biofilms maduros en lugar de las células planctónicas o las biopelículas en etapas iniciales.

Los desinfectantes más ampliamente utilizados en la industria alimentaria son los amonios cuaternarios (QACs). En las superficies o las aguas residuales pueden quedar restos de estos agentes tras un aclarado insuficiente o por una biodegradación incompleta del desinfectante. Asimismo, se puede crear un gradiente de concentración del desinfectante en la matriz del biofilm (Martínez-Suárez, Ortiz, & López-Alonso, 2016). Todo ello permite que el patógeno se encuentre de forma habitual con concentraciones subletales de estos agentes en el ambiente de procesado de alimentos, lo que podría producir un aumento de su resistencia a los mismos. Por ello, la resistencia fenotípica o genotípica a los desinfectantes podría ser un factor importante en la supervivencia de *L. monocytogenes*.

De hecho, la única resistencia genotípica frente a desinfectantes descrita en *L. monocytogenes* ha sido para los QACs, principalmente, el BAC (Cloruro de Benzalconio) (Gerba, 2015; Hegstad et al., 2010). Sin embargo, esta resistencia al BAC se ha considerado como de bajo nivel (Ebner et al., 2015; Ortiz et al., 2016; Ortiz, López, & Martínez-Suárez, 2014b). Es importante destacar que la concentración en la que se aplican estos desinfectantes en la industria (200-1000 ppm) es muy superior a la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) de las cepas resistentes (4-32 ppm), por lo que los QACs se han considerado efectivos para la eliminación de *L. monocytogenes* (Ferreira, Wiedmann, Teixeira, & Stasiewicz, 2014; Tezel & Pavlostathis, 2015). Sin embargo, debido al factor protector que ejercen los biofilm sobre las bacterias, es posible que las dosis utilizadas no sean efectivas. Dada la diferente sensibilidad de las células bacterianas en función de su estado, diversos autores destacan la importancia de aplicar tanto el agente antimicrobiano adecuado como la dosis correcta (Kim, Pitts, Stewart, Camper, & Yoon, 2008; Olszewska et al., 2016; Simões, Simões, & Vieira, 2010).

En la Figura 28 se muestran los resultados obtenidos en relación a la presencia de *L. monocytogenes* en las diferentes **estaciones del año**. No se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los resultados obtenidos en primavera, verano y otoño.

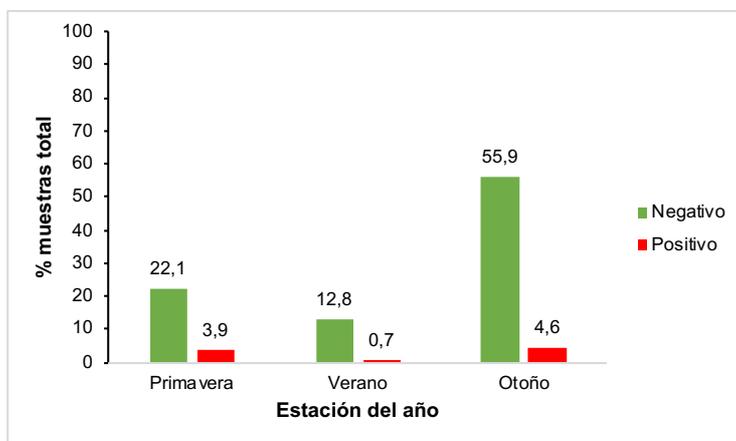


Figura 28. Presencia de *L. monocytogenes* en las distintas estaciones del año.

Esto coincidió con lo observado por Leong et al. (2017), donde no encontraron estacionalidad en la presencia de *L. monocytogenes* en superficies y alimentos, a lo largo de tres años, en 54 pequeñas industrias alimentarias irlandesas. Sin embargo, Madden et al. (2018) observaron diferencias significativas entre las estaciones de invierno y verano, con un mayor porcentaje de muestras positivas en los meses de verano. Si bien, los ambientes cálidos y/o húmedos pueden favorecer el incremento de la presencia de *L. monocytogenes* (Hellberg & Chu, 2016). La mayor presencia del patógeno en los meses más cálidos podría deberse a una pérdida del control de la temperatura ambiente de las industrias. Si bien, el Reglamento (CE) N° 853/2004 establece que la temperatura ambiente no debe ser superior a 12°C (o sistema alternativo de efectos equivalentes) en las salas donde se realiza el despique, deshuesado, recorte, corte en rebanadas, corte en dados, envasado y embalado de la carne.

2.3. Detección de *Listeria spp.* (no *L. monocytogenes*) en el procesado del jamón curado loncheado y envasado al vacío

De las 120 muestras de jamón curado analizadas, en 13 de ellas (10,8 %) se detectó la presencia de *Listeria spp.* no *monocytogenes*. En ninguna de las muestras en las que se identificó *L. monocytogenes* se detectó la presencia de otra especie de su género.

Tras el análisis mediante MALDI-TOF MS de los 13 aislados, las dos especies identificadas fueron *L. welshimeri* y *L. innocua*, suponiendo el 69 % y 31 % de los aislados, respectivamente. En la Figura 29, se muestran, a modo de ejemplo, espectros de *L. innocua* y *L. welshimeri* obtenidos mediante esta técnica.

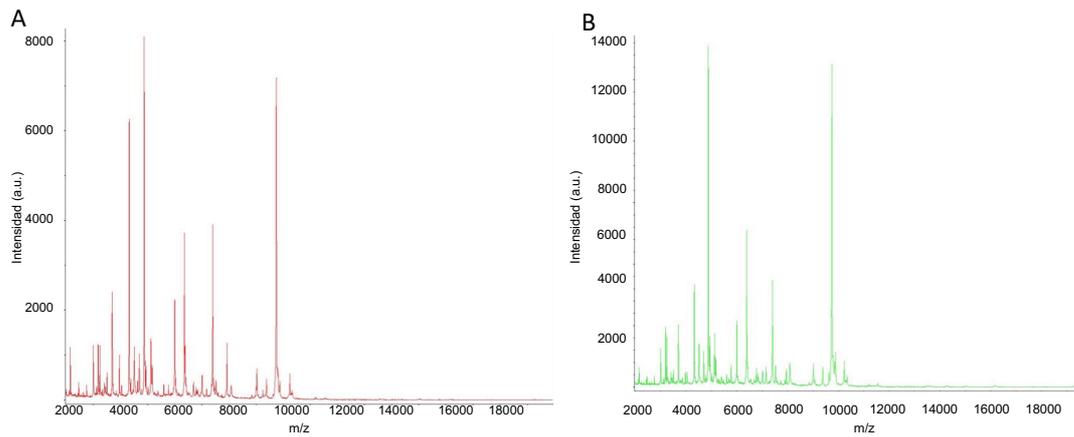


Figura 29. A. Espectro obtenido de un aislado de *L. innocua* y B. *L. welshimeri* mediante MALDI-TOF MS

La detección de estas dos especies no patógenas en jamón coincide con otros estudios, como Pesavento, Ducci, Nieri, Comodo, & Lo Nostro (2010) que determinaron una prevalencia *Listeria spp.* del 5,2 %, identificando sólo las especies *L. innocua* y *L. welshimeri*; Trimoulinard et al. (2017) observaron una prevalencia mayor de *Listeria spp.* en productos cárnicos LPC (30,1 %), predominando también estas mismas especies.

En relación al análisis de las superficies, de las 281 muestras se detectó *Listeria spp.* no *monocytogenes* en el 33,4 % de las muestras (n=95). Al contrario de lo observado en el jamón curado, en las superficies fue *L. innocua* la especie predominante suponiendo el 76,8 % de los aislados, mientras que el 23,2 % restante fueron identificados como *L. welshimeri*. Estas dos especies de *Listeria* fueron detectadas tanto en la zona de deshuesado como en loncheado (Figura 30.A) siendo la de mayor riesgo de contaminación la de deshuesado ($p < 0,001$, nivel de confianza 95 %) al igual que lo observado para *L. monocytogenes*. De igual manera, no se encontraron diferencias significativas entre la presencia de *Listeria spp.* no *monocytogenes* y el estado de las superficies, por lo que la probabilidad de contaminación con *Listeria spp.* no patógenas fue la misma independientemente del estado de las superficies ($p = 0,8074$, nivel de confianza 95 %) (Figura 30.B). Este hecho indica que el procedimiento L+D no permitió la eliminación completa de estas especies de *Listeria*.

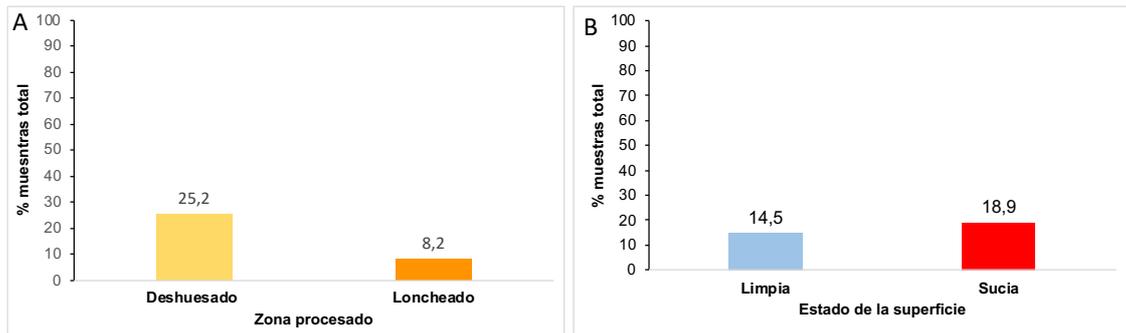


Figura 30. A. Presencia de *Listeria* spp. no *monocytogenes* en las dos zonas de procesado. B. Presencia de *Listeria* spp. no *monocytogenes* en relación al estado de la superficie.

Además, en todos los tipos de superficies analizadas se detectó una o las dos especies de *Listeria* spp. avirulentas, por lo menos en una ocasión, siendo de nuevo las cintas transportadoras y las desgubadoras las variables asociadas a un mayor riesgo de contaminación con estas especies ($p < 0,001$) (Figura 31).

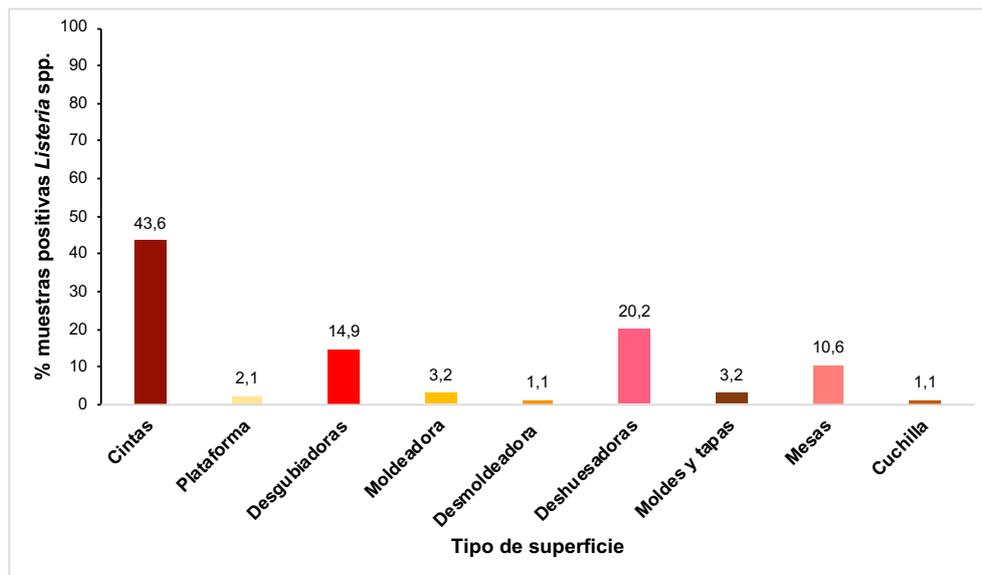


Figura 31. Presencia de *Listeria* spp. no *monocytogenes* en los distintos tipos de superficies analizadas.

Keeratipibul & Techaruwichit (2012) obtuvieron valores inferiores a los presentados, detectando *Listeria* spp. en el 5,2 % de las muestras ambientales de una industria de productos cárnicos LPC. *L. innocua* y *L. welshimeri* fueron las más frecuentemente identificadas con un 82,3 % y 11,2 %, respectivamente, siendo estos valores similares a los observados en nuestro estudio. Barros et al. (2007) obtuvieron un 49,2 % de superficies contaminadas con *Listeria* spp. en industrias cárnicas, donde las especies apatógenas predominantes fueron *L. innocua* (77,4 %) y *L. welshimeri* (7,5 %).

En nuestro estudio, tanto *L. innocua* como *L. welshimeri* fueron detectadas en la mayoría de las muestras en las que se detectó *L. monocytogenes* (80,8 %), lo que sugiere que estas especies encontraron unas condiciones comunes favorables que permitieron su supervivencia y persistencia junto con el patógeno en el mismo ambiente (Tabla 34).

Tabla 34. Coexistencia de *Listeria* spp. no *monocytogenes* y *L. monocytogenes* en las superficies del procesado.

Tipo de superficie	Coexistencia ^a (%)
Cintas	13/15 (86,7)
Desgubadoras	4/5 (80,0)
Moldeadora	1/2 (50,0)
Deshuesadoras	0/1 (0,0)
Mesas	3/3 (100,0)
Total	21/26 (80,8)

^apresencia de *Listeria* spp. no *monocytogenes* en muestras positivas a *L. monocytogenes*

Este fenómeno de coexistencia se ha observado tanto en alimentos como en el ambiente de procesado de alimentos (Jamali, Radmehr, & Thong, 2013). Tompkin (2002) determinaron que la presencia de *Listeria* spp. podría ser un indicador fiable de la presencia de la bacteria patógena ya que comparten nichos ecológicos. Así pues, la detección temprana y la monitorización de la contaminación de *Listeria* spp. en el ambiente de las plantas de procesado es crucial para reducir la incidencia de la contaminación en el producto final, así como cumplir con determinadas normativas legales establecidas en Estados Unidos o Canadá (Vongkamjan, Fuangpaiboon, Jirachotrapee, & Turner, 2015).

2.4. Serotipos moleculares de los aislados de *L. monocytogenes*

Se analizó el serotipo molecular de 25 aislados de *L. monocytogenes*, procedentes de superficies (n=21) y de jamón curado loncheado y envasado al vacío (n=4), mediante PCR multiplex.

En la Figura 32 se muestra un ejemplo del patrón de bandas de los distintos serotipos moleculares de los productos de DNA generados tras la primera reacción PCR. En la Figura 33 se puede observar un ejemplo de los patrones obtenidos con respecto al gen *flaA* en aislados de los serotipos moleculares 1/2a y 1/2c.

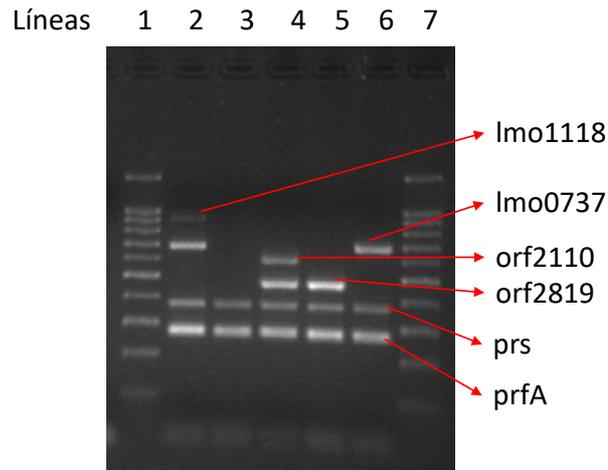


Figura 32. Patrones de bandas obtenidos tras la primera reacción PCR multiplex. Líneas 1 y 7: marcador de peso molecular (100-1000 bp); línea 2: *L. monocytogenes* CECT 911 (serotipo 1/2c); línea 3: *L. monocytogenes* CECT 934 (serotipo 4a); línea 4: *L. monocytogenes* CECT 935 (serotipo 4b); línea 5: *L. monocytogenes* CECT 936 (serotipo 1/2b); línea 6: *L. monocytogenes* CECT 4031 (serotipo 1/2a).

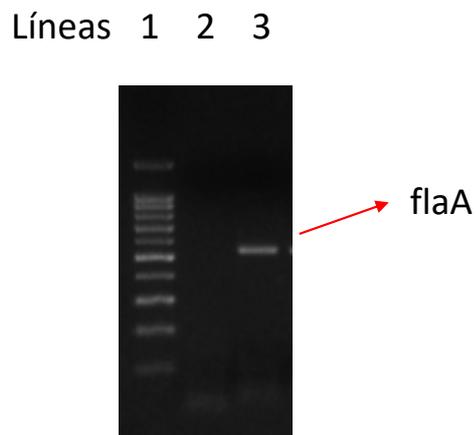


Figura 33. Patrón de bandas de la segunda reacción PCR para diferenciar los serotipos moleculares 1/2a y 1/2c. Línea 1: *L. monocytogenes* CECT 4031 (serotipo 1/2a); línea 2: *L. monocytogenes* CECT 911 (serotipo 1/2c); línea 3: marcador de peso molecular (100-1000 bp).

De los aislados procedentes de jamón curado y superficies (n=25), el serotipo molecular predominante obtenido fue el 1/2a con 21 aislados, seguido por el 1/2b (2 aislados) y 1/2c (2 aislados) (Figura 34). No se encontró ningún aislado perteneciente al serotipo 4b.

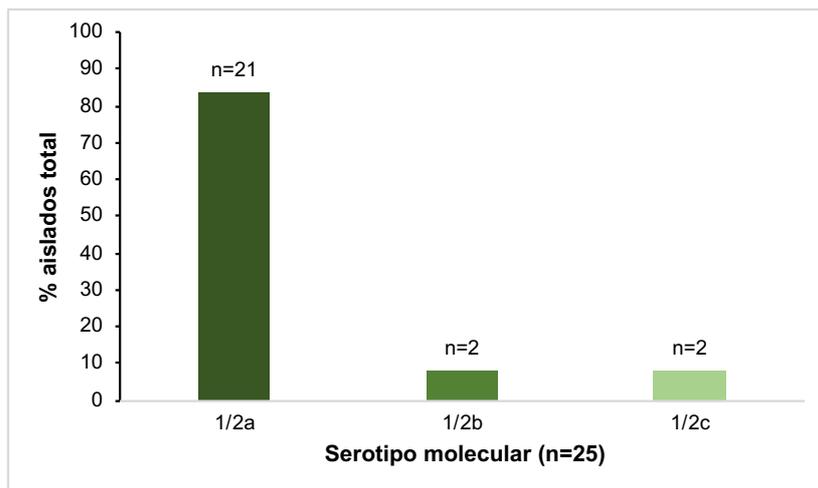


Figura 34. Serotipos moleculares de los aislados de *L. monocytogenes* procedentes de superficies y jamón curado (n=25).

En cuanto a los cuatro aislados procedentes de jamón curado, dos de ellos fueron del serotipo 1/2a (50 %), uno del serotipo 1/2b (25 %) y uno del 1/2c (25 %) (Figura 35).

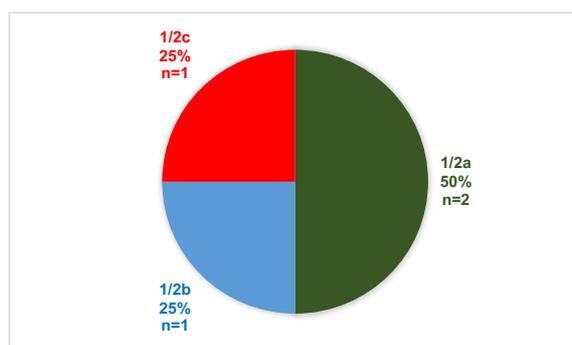


Figura 35. Serotipos moleculares de los aislados procedentes de jamón curado (n=4).

De los 21 aislados de superficies, 19 (90,5 %) pertenecieron al serotipo molecular 1/2a, mientras que solo se identificó un aislado de cada uno de los serotipos 1/2b y 1/2c (4,7 % para ambos) (Figura 36).

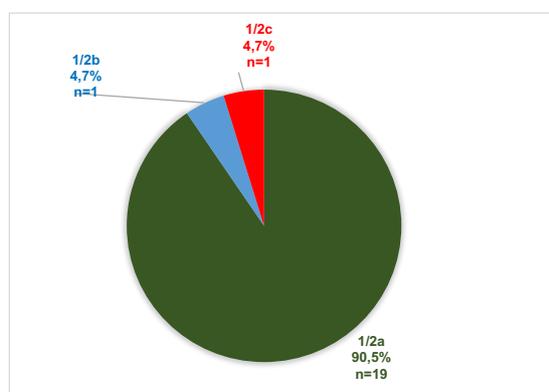


Figura 36. Serotipos moleculares de los aislados procedentes de superficies (n=21).

Se quiere destacar que en los aislados de la zona de deshuesado se detectaron los tres serotipos moleculares. Sin embargo, en los procedentes de la zona de loncheado sólo se detectó el serotipo molecular 1/2a.

Coincidiendo con nuestros resultados, López et al. (2008) determinaron una presencia predominante de aislados de *L. monocytogenes* del serotipo 1/2a (72 %) y 1/2b (21 %) procedentes de superficies y, carne y productos cárnicos de industrias de cerdo ibérico. En el estudio de Ortiz et al. (2010) realizado a lo largo de tres años en estas mismas industrias, se determinó que los serotipos 1/2a y 1/2b fueron los predominantes, con un 68 % y 21 % de los aislados, respectivamente.

Thévenot et al. (2006) llevaron a cabo un estudio de subtipificación de aislados de *L. monocytogenes* en 13 industrias de productos cárnicos de origen porcino. La distribución de los aislados de las superficies mostró una predominancia del serotipo 1/2a (56,9 %) mientras que otros serotipos estuvieron en menor proporción (1/2c, 8,9 %; 1/2b, 8,9 %; 4b, 5 %; y 4e, 0,1 %). En los aislados de los productos cárnicos (salchichas fermentadas-curadas), observaron una mayor presencia del serotipo 1/2a, aunque en un porcentaje menor (35,2 %). A consecuencia de ello, la frecuencia de los serotipos 1/2b (17,9 %), 4b (16,3 %) y 1/2c (11 %) se incrementó en estos alimentos.

Asimismo, Lambertz, Ivarsson, Lopez-Valladares, Sidstedt, & Lindqvist (2013) realizaron la subtipificación de aislados de *L. monocytogenes* procedentes de alimentos LPC y plantas de procesado, encontrando una mayor presencia de aislados del serotipo 1/2a tanto en este tipo de alimentos de origen cárnico (100 %), como en las plantas de procesado (87 %). Siguiendo esta tendencia, Iannetti et al. (2016) observaron que el 84,7 % de aislados procedentes de productos cárnicos y, quesos blandos y semi-blandos presentaron el serotipo 1/2a, seguido en menor frecuencia por el 1/2b (7,1 %), 1/2c (3,5 %) y 4b (3,5 %). Gianfranceschi, D'Ottavio, Gattuso, Bella, & Aureli (2009) determinaron que los serotipos 1/2a y 1/2c fueron los más frecuentes en carne y productos cárnicos, mientras que el serotipo 1/2a y 4b fueron los más frecuentes en tanto en aislados de superficies (industrias cárnicas, queseras y restaurantes), como de personas enfermas. Kramarenko et al. (2016, 2013) observaron que el 93 % de los aislados procedentes de productos cárnicos se correspondían con los serotipos 1/2a y 1/2c, mientras que el 7 % restante fueron los serotipos 1/2b y 4b.

En la actualidad, las causas de la mayor prevalencia de aislados de *L. monocytogenes* del serotipo 1/2a tanto en alimentos como en superficies, está todavía sin determinar. Algunos autores sugieren que este serotipo puede presentar unas características particulares que les hicieran

más resistentes a las condiciones encontradas en los entornos de procesado. Buncic, Avery, Rocourt, & Dimitrijevic (2001) observaron una elevada resistencia a antimicrobianos como las bacteriocinas en aislados del serotipo 1/2a. Otros autores como Huang et al. (2018) y Pan, Breidt, & Gorski (2010), determinaron que algunas cepas del serotipo 1/2a fueron capaces de formar un biofilm de mayor densidad que el formado por las cepas del serotipo 4b, pudiendo esto aumentar su capacidad de resistencia a condiciones ambientales adversas.

Desde el punto de vista de la seguridad alimentaria, se consideró importante la identificación de los serotipos 1/2a, 1/2b y 1/2c tanto en superficies como en jamón curado, ya que estos tres serotipos, junto con el serotipo 4b han estado asociados al 98 % de los casos de listeriosis a nivel mundial (Lomonaco et al., 2015). En los últimos años, se está observando un incremento del serotipo 1/2a en aislados procedentes de personas con listeriosis, acompañado de una disminución del serotipo 4b. Esto podría sugerir un reemplazo entre ambos serotipos, dado que el serotipo 4b ha sido en muchas ocasiones el más frecuentemente aislado (Gianfranceschi et al., 2009). Actualmente, la manifestación clínica de la listeriosis más frecuente es la septicemia, en la que los serotipos 1/2a y 1/2b son los más frecuentemente aislados, mientras el serotipo 4b se asocia a sintomatología de meningoencefalitis (Swaminathan & Gerner-Smidt, 2007).

2.5. Subtipificación de los aislados de *L. monocytogenes* mediante PFGE

Todos los aislados previamente serotipados (n=25) se sometieron a la restricción del DNA con las enzimas de restricción *AscI* y *ApaI* y separación de los fragmentos mediante PFGE, obteniéndose diferentes patrones de bandas.

Tras la restricción del DNA con la enzima *AscI* se obtuvieron cinco perfiles de restricción o pulsotipos (S1, S2, S3, S4 y S5). El dendrograma de los perfiles generados con la enzima *AscI* y analizados mediante UPGMA, se muestra en la Figura 37.

Gracias a la restricción del DNA con la enzima secundaria *ApaI*, se logró un mayor poder de discriminación entre los aislados de S2, diferenciando dos pulsotipos distintos (S2-1 y S2-2). En la Figura 38 se observa el dendrograma de los patrones de bandas PFGE obtenidos con la enzima *ApaI* y analizados a través de UPGMA.

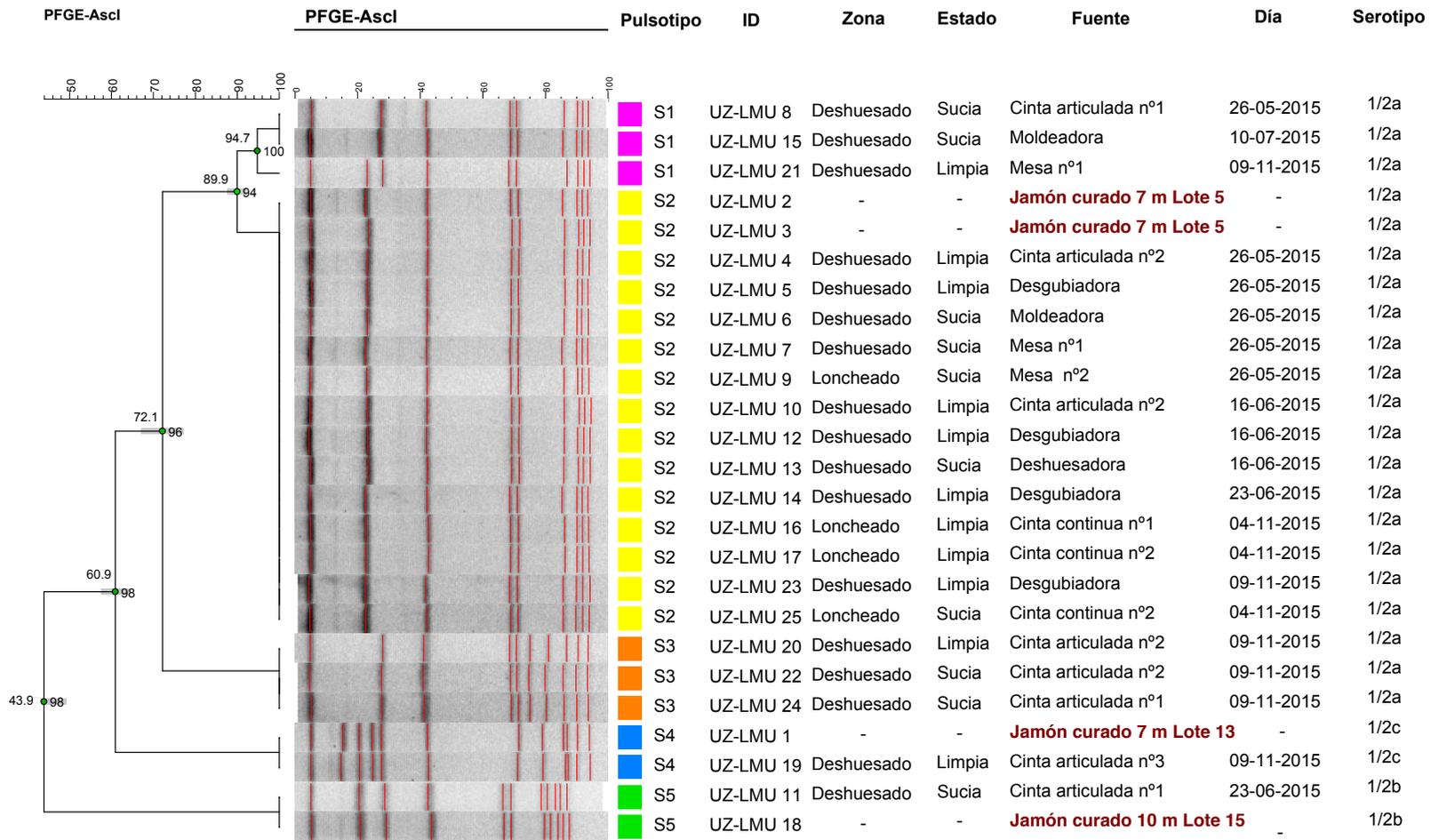


Figura 37. Dendrograma de los perfiles obtenidos mediante Ascl de los 25 aislados de *L. monocytogenes*. Los % de similitud y coeficiente de correlación cofenético se indican a la izquierda y derecha de las bifurcaciones de las ramas, respectivamente. Se muestra la zona, el estado de la superficie, la fuente, la fecha de aislamiento y el serotipo molecular de cada aislado.

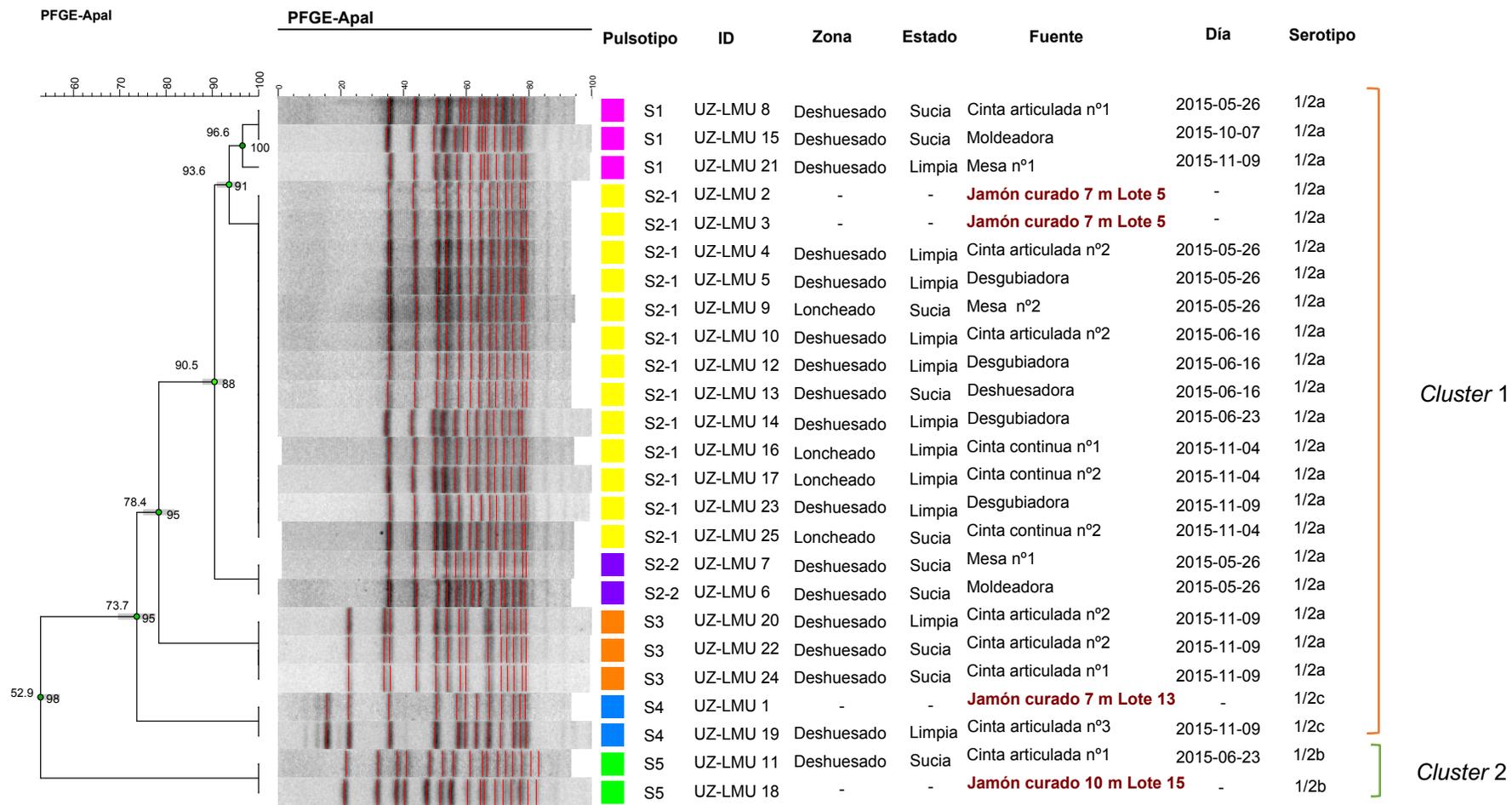


Figura 38. Dendrograma de los perfiles obtenidos mediante *Apal* de los 25 aislados de *L. monocytogenes*. Los % de similitud y coeficientes de correlación cofenético se indican a la izquierda y derecha de las bifurcaciones de las ramas, respectivamente. Se muestra la zona, el estado de la superficie, la fuente, la fecha de aislamiento y el serotipo molecular de cada aislado. Se indican los clusters obtenidos (similitud ≥ 70 %).

Tras la combinación de los perfiles obtenidos por las enzimas *Ascl* y *Apal*, se obtuvieron seis pulsotipos. Esto proporcionó un mayor poder de discriminación de la técnica, en comparación del uso de *Ascl* como única enzima. Con ello, se observó la importancia de realizar la tipificación con ambas enzimas. Esta recomendación se debería aplicar tanto en estudios de investigación desarrollados en laboratorios no oficiales, como en la investigación y vigilancia de brotes de listeriosis llevados a cabo por las autoridades sanitarias (Fugett et al., 2007; Iannetti et al., 2016; Ortiz et al., 2010).

Los pulsotipos S1, S2-1, S2-2 y S3 estuvieron formados sólo por aislados del serotipo 1/2a, mientras que S4 y S5 se correspondieron con aislados de los serotipo 1/2c y 1/2b, respectivamente. Los seis pulsotipos se distribuyeron en dos *clusters* (similitud $\geq 70\%$) (Meloni et al., 2014). El *cluster* 1 englobó los pulsotipos S1, S2-1, S2-2, S3 y S4 (linaje II), y el *cluster* 2 estuvo integrado por el S5 (linaje I).

El número de aislados de cada pulsotipo, así como su distribución en ambas zonas del procesado y en el jamón curado se muestran en la Figura 39. Como se observa, el pulsotipo S2-1 engloba un número elevado de aislados, siendo detectados tanto en ambas zonas de procesado como en el producto. En la Figura 40 se observa el número de aislados por pulsotipo y su distribución en relación al estado de las superficies.

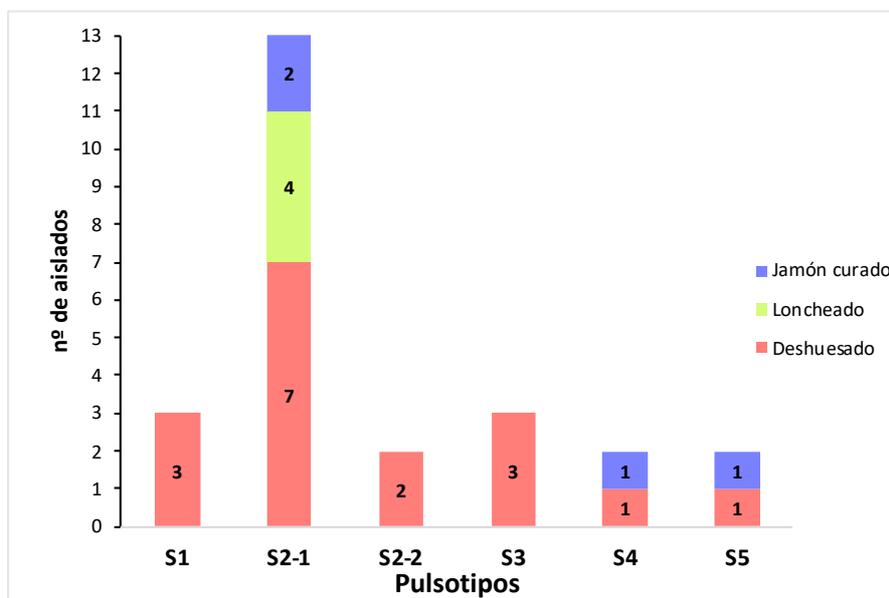


Figura 39. Número de aislados por pulsotipo, y su distribución en ambas zonas del procesado y jamón curado.

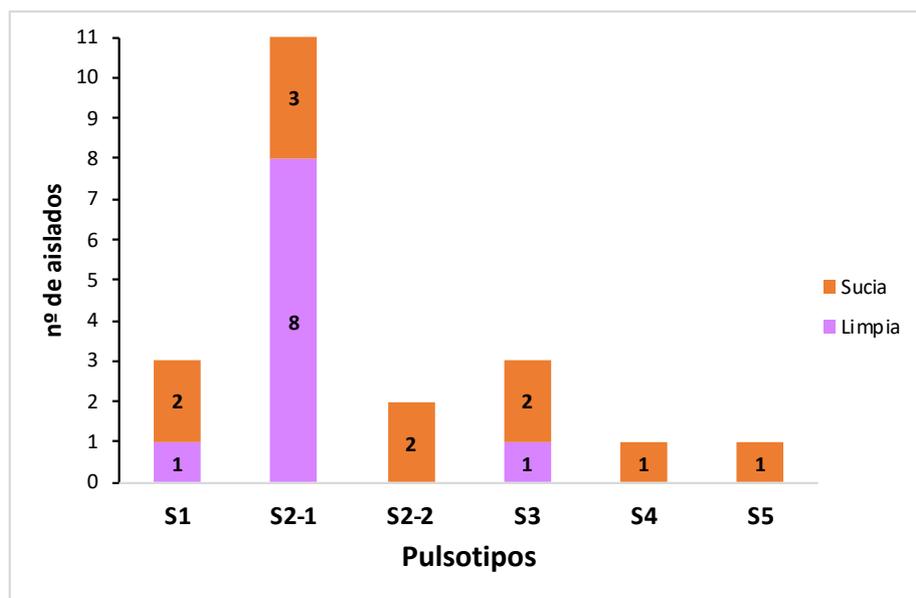


Figura 40. Número de aislados por pulsotipo y su distribución en función del estado de la superficie.

El **pulsotipo S1** únicamente estuvo presente en superficies de la zona de deshuesado, y se aisló tanto de superficies limpias como sucias. Este pulsotipo fue detectado en la moldeadora, una cinta articulada y una mesa, en un periodo de tiempo de 6 meses.

El **pulsotipo S2-1** se observó tanto en aislados de las zonas de deshuesado y loncheado, como en jamón curado (lote 5). Se identificó en superficies limpias y en sucias, predominando en las superficies limpias, y fue detectado en cintas, equipos (principalmente la desgubadora) y mesas. Es destacable que S2-1 fue el único pulsotipo identificado en la zona de loncheado y que en la zona de deshuesado fue detectado de forma repetida durante todo el periodo de estudio. Los dos aislados de las muestras de jamón curado pertenecientes al lote 5 se identificaron como pulsotipo S2-1. La fecha de loncheado de ese lote fue seis meses antes de que se detectara en las superficies, por lo que podía encontrarse en el ambiente del procesado durante prolongados periodos de tiempo.

El **pulsotipo S2-2** fue detectado en dos superficies sucias de la zona de deshuesado. Este pulsotipo se aisló en la primera toma de muestras (mayo) y no se volvió a detectar en todo el estudio, por lo que se podríamos clasificarla como cepa de carácter esporádico.

En relación al **pulsotipo S3**, solo se detectó en la zona de deshuesado, tanto en superficies limpias como sucias. Si bien, se quiere destacar que este pulsotipo se halló en la misma cinta articulada, después del proceso de L+D (superficie limpia) y al finalizar la jornada laboral (superficie sucia), permaneciendo a lo largo de la jornada de producción. Al igual que S2-2, se identificó únicamente en una de las tomas de muestra (noviembre), lo que indicó que, en nuestro estudio, se podía tratar de una cepa esporádica.

El **pulsotipo S4** se aisló tanto de una superficie limpia de la zona de deshuesado como de jamón curado de siete meses de curación (lote 13). La fecha de loncheado del lote 13 fue siete meses anterior a su detección en la superficie, por lo que podría ser una cepa que hubiera llegado a la industria de manera recurrente a través de la materia prima, trabajadores, utensilios etc.

Por último, el **pulsotipo S5** se detectó en una superficie sucia de la zona de deshuesado, así como de jamón curado de 10 meses de curación (lote 15). La fecha de loncheado de esta muestra fue posterior (cuatro meses) al primer aislamiento de esta cepa en una superficie. En este caso, al igual que S4, no parece ser una cepa persistente, sino con carácter esporádico que llegó a las superficies y producto mediante las fuentes anteriormente citadas.

La subtipificación de *L. monocytogenes* mediante PFGE fue una herramienta de gran utilidad ya que permitió diferenciar los aislados a nivel de cepa y rastrear el origen de la contaminación del jamón loncheado y envasado. Se quiere destacar que todos los pulsotipos identificados en jamón curado fueron a su vez detectados en alguna de las superficies del procesado. Estos resultados concuerdan con diversos autores que han estudiado la trazabilidad de la contaminación con *L. monocytogenes* en busca de patrones de contaminación. Henriques, Gama, & Fraqueza (2017) observaron que las cepas procedentes de productos cárnicos LPC eran clones de las aisladas de las superficies de la misma industria. Además, comprobaron que las cepas aisladas de superficies limpias fueron diferentes que las presentes en la misma superficie sucia. Esto sugirió que estas cepas podían haber sido transferidas a las superficies a través de ingredientes contaminados, utensilios de limpieza o trabajadores. En el trabajo realizado por Leong et al. (2017) en 12 industrias (cárnicas, lácteas, pesqueras y de vegetales) evidenciaron una contaminación cruzada con *L. monocytogenes* entre el ambiente de procesado y el alimento. Asimismo, Madden et al. (2018) identificaron un fenómeno de contaminación cruzada con *L. monocytogenes* entre el ambiente de procesado y alimentos LPC en cuatro pequeñas industrias. En ambos trabajos, se destacó que la dirección de la contaminación puede ser de la superficie al alimento o viceversa, siendo necesarios más estudios para distinguir entre estos dos escenarios de contaminación. Iannetti et al. (2016) detectaron el mismo pulsotipo en aislados de *L. monocytogenes* de diferentes productos cárnicos procedentes de una misma industria, destacando el ambiente como principal foco de contaminación. Los resultados obtenidos en el presente estudio han corroborado que el ambiente de procesado fue la principal fuente de contaminación del producto final.

Se ha demostrado la contaminación cruzada como causa de brotes de listeriosis, siendo este hecho de gran importancia para la salud pública. McCollum et al. (2013) investigaron el origen de la contaminación del brote ocurrido en Estados Unidos en 2011 por consumo de melón

cantaloupe. Los cinco pulsotipos clínicos causantes del brote coincidieron tanto con aislados de melones, como del ambiente de procesado, de una única industria productora de este alimento. Se identificaron deficiencias en las condiciones sanitarias de la industria, que probablemente condujeron a la contaminación cruzada de los melones con el patógeno. En el brote ocurrido en Canadá durante el año 2008, Currie et al. (2015) demostraron que los pulsotipos clínicos coincidieron con aislados procedentes de fiambres y del ambiente de procesado de una única industria cárnica, indicando una contaminación cruzada con el producto. Por ello, se consideró esta industria y sus productos como el origen de este brote de listeriosis.

Para reducir el riesgo de contaminación cruzada es esencial un plan de higiene cuidadosamente diseñado, gestionado y validado que permita la eliminación de la contaminación por *L. monocytogenes* de las instalaciones alimentarias (Muhterem-Uyar et al., 2015). Sin embargo, en la actualidad las industrias se enfrentan a un desafío a la hora de abordar la eliminación del patógeno, ya que hay cepas de *L. monocytogenes* que contaminan el ambiente de forma esporádica, pero en otros casos, las cepas son persistentes.

La aparición de contaminación esporádica puede producirse por una ruptura puntual de las barreras de higiene que permiten la llegada de diferentes cepas de *L. monocytogenes*, pero que posteriormente, son eliminadas tras la L+D. Sin embargo, la detección de cepas persistentes podría indicar un fallo global en el control del patógeno y/o el desarrollo de resistencias a los agentes de L+D utilizados en la industria. En este caso, la contaminación por *L. monocytogenes* no es eliminada y persiste en el ambiente de procesado durante largos periodos de tiempo, incluso años. En nuestro estudio, el pulsotipo S2-1 fue persistente, aislándose de la desgubadora en cuatro ocasiones durante los seis meses de estudio. El resto de pulsotipos se consideraron esporádicos. Son numerosos los trabajos en los que se han observado cepas persistentes en industrias cárnicas. Este tipo de cepas han sido más frecuentemente asociadas a ambientes del procesado que a materias primas (Ferreira et al., 2014; Vogel et al., 2001). Thévenot et al. (2006) identificaron 80 pulsotipos procedentes de 13 industrias de productos cárnicos fermentado-curados, de los cuales cinco fueron persistentes. Ortiz et al. (2010) encontraron ocho pulsotipos persistentes, suponiendo el 91 % de los aislados, de un total de 29 pulsotipos identificados durante tres años en una industria de productos cárnicos de origen porcino. Ferreira et al. (2011) detectaron 32 pulsotipos en 11 industrias productoras de productos cárnicos fermentado-curados, siendo ocho de ellos persistentes. En este estudio, observaron que la misma cepa estuvo presente de manera persistente en tres industrias diferentes. Por otro lado, cuatro cepas que fueron persistentes de manera individual en diferentes industrias, fueron aisladas de forma esporádica en otras plantas. Una posible

explicación dada por los autores sería la proximidad geográfica de las industrias estudiadas, así como un posible origen común de la materia prima utilizada. Otra hipótesis a tener en cuenta podría ser que algunos pulsotipos fueran cepas comunes y ampliamente distribuidas, coincidiendo con lo publicado por Fugett et al. (2007).

El aislamiento de cepas persistentes tras la L+D enfatiza el riesgo del crecimiento y asentamiento de *L. monocytogenes* en ambientes y equipos, particularmente en sitios de difícil acceso, permitiendo una posible contaminación continua de los alimentos (Ferreira et al., 2014). Esto se observó en nuestro estudio, ya que S2-1 se aisló tanto de superficies limpias como de jamón curado. Existen diversas teorías que explicarían el fenómeno de la persistencia. Wulff, Gram, Ahrens, & Vogel (2006) indicaron que estas cepas son más comunes o quizás colonicen el ambiente en primer lugar. Lundén, Autio, Sjöberg, & Korkeala (2003) apuntaron que podían ser mejores colonizadoras (mayor capacidad de adherencia a todo tipo de superficies). Heir et al. (2004) y Pan et al. (2006) sugirieron que éstas podían ser más resistentes a agentes desinfectantes o bien, ser mejores competidoras en el crecimiento y la formación de biofilms que otras cepas del patógeno en el ambiente de procesado.

La hipótesis de que la persistencia de ciertos subtipos de *L. monocytogenes* está unida a la resistencia a desinfectantes ha sido investigada en numerosos estudios. En alguno de ellos se han encontrado bajos niveles de resistencia en cepas persistentes (Fox et al., 2011; Ortiz, López, & Martínez-Suárez, 2014a). Sin embargo, Lourenço, Neves, & Brito (2009) no encontraron una mayor resistencia a agentes desinfectantes en cepas persistentes aisladas de diferentes industrias alimentarias. Asimismo, en la revisión realizada por Carpentier & Cerf (2011) no encontraron evidencias de que *L. monocytogenes* difiera de otras especies o cepas tanto a la densidad microbiana en el biofilm, como a la resistencia y adaptación a diferentes condiciones de estrés y concentraciones subletales de agentes biocidas. Por ello, se concluyó que no hay cepas de *L. monocytogenes* con propiedades únicas que le permitan resistir en el ambiente de procesado durante largos periodos de tiempo. Sin embargo, sí que existen sitios de difícil acceso dentro de los equipos y ambiente de la industria que sirven de refugio para que la bacteria pueda persistir. Por ello, postulan que la persistencia de *L. monocytogenes* se debe a la incapacidad de llegar a los nichos de contaminación con la concentración adecuada de agentes antimicrobianos.

De manera interesante, S2-1 englobó el 52 % de los aislados durante el periodo del estudio, considerándose predominante. Estos resultados son similares a los publicados por Ortiz et al. (2010), en el que encontraron tres pulsotipos predominantes, suponiendo el 45 % de los aislados de *L. monocytogenes* procedentes de carne fresca, superficies y producto cárnico. La relación existente entre dominancia y persistencia ha sido observada en determinados pulsotipos de *L.*

monocytogenes tanto en alimentos como en superficies, coincidiendo con lo obtenido en el presente trabajo (Gianfranceschi et al., 2009; Kramarenko et al., 2016; López et al., 2008; Ortiz et al., 2010).

La diversidad genética se calculó a través del índice Simpson (D). El valor obtenido fue de 0,710, considerándose un valor bajo. Estos resultados se hallan en concordancia lo obtenido por López et al. (2008), donde encontraron solo 9 pulsotipos de 161 aislados procedentes de una industria cárnica de porcino a lo largo de un año de estudio, considerándolo una baja diversidad. Ortiz et al. (2010) estudiaron los patrones de contaminación de *L. monocytogenes* en una industria de porcino durante 3 años, detectando 29 pulsotipos diferentes procedentes de 500 aislados. La diversidad se consideró baja (D=0,749), coincidiendo con los resultados obtenidos en nuestro estudio.

Sin embargo, en trabajos realizados con aislados procedentes de diversas industrias y alimentos han mostrado una mayor diversidad (Lambertz et al., 2013; Meloni et al., 2014; Thévenot et al., 2006). Esta diferencia en relación a nuestro estudio podría deberse a que los aislados procedieron de dos únicas zonas del procesado y de un solo tipo de alimento junto con la existencia de un pulsotipo predominante (S2-1), que englobó un elevado porcentaje de los aislados.

2.6. Medidas de control en la industria cárnica

En base a los resultados procedentes del análisis de las muestras de jamón curado y superficies implicadas en su procesado, así como de la caracterización genotípica de los aislados de *L. monocytogenes*, se ha obtenido información científica que nos permite aportar **medidas de control** del patógeno que pueden ser incorporadas en el sistema de autocontrol de dicha industria cárnica. Estas medidas se engloban en:

- **Optimización del protocolo de limpieza y desinfección de la zona de deshuesado.**
 - Eliminación completa de la materia orgánica de las superficies del procesado previa a la utilización del agente desinfectante, para así asegurar la eficacia de los mismos.
 - Aplicar la concentración adecuada de los principios activos, así como realizar una rotación de los mismos. Con ello se podría lograr una limpieza y desinfección más eficaz frente al patógeno y evitar la aparición de resistencias a los agentes antimicrobianos utilizados.

- Uso de productos específicos para la prevención y eliminación de biofilms. Con esta medida se dificultaría el acantonamiento del microorganismo patógeno en las superficies.
 - Secado completo de las superficies tras la desinfección, evitando la aparición de zonas con acumulación de agua tras el aclarado. Con ello se dificultaría el crecimiento de la bacteria tras el procedimiento de limpieza y desinfección.
 - Realizar una limpieza y desinfección intermedia durante la jornada de trabajo, para así evitar la acumulación de gran cantidad de materia orgánica y reducir la carga microbiana de las superficies.
 - Desmontaje de la desgubadora para acceder a zonas de difícil acceso, o realizar L+D intermedias, ya que en este equipo se detectó un nicho de contaminación persistente.
- **Diseño higiénico de instalaciones y superficies.**
- Disponer un sistema de desinfección tanto del calzado como de las manos en el acceso entre la zona de deshuesado y la de loncheado y envasado, para así evitar la entrada de contaminación.
 - Cambio de las tablas de las mesas de corte con mayor frecuencia para evitar el desgaste de las mismas y la aparición de zonas de difícil acceso a los agentes de limpieza y desinfección, donde el patógeno pueda acantonarse y formar biofilms.
 - Sustitución de las cintas transportadoras articuladas por cintas transportadoras lisas, sin engranajes ni relieves. Con ello se eliminarían zonas de difícil acceso en las que la bacteria puede sobrevivir y multiplicarse durante largos periodos de tiempo, además de facilitar la limpieza y desinfección de las mismas.

Asimismo, se recomienda a la empresa realizar un estudio de la eficacia de distintos agentes desinfectantes frente a la cepa persistente S2-1 aislada en nuestro trabajo. Dicho estudio se debería realizar tanto en forma planctónica como en biofilm, con el objetivo de desarrollar un procedimiento de limpieza y desinfección específico para esta industria.

CAPÍTULO VI

CONCLUSIONES

Capítulo VI. Conclusiones

Primera.- La puesta punto y evaluación de la impedanciometría combinada con Rapid L. mono y la PCR a tiempo real han mostrado unos excelentes resultados para la detección de *L. monocytogenes* en la industria cárnica, cumpliendo los parámetros de validación de métodos alternativos establecidos por las organizaciones internacionales y en la bibliografía. Además, ambos métodos presentan una serie de ventajas como la rapidez y el análisis de un elevado número de muestras de manera simultánea, por lo que son una buena alternativa al método de referencia ISO 11290-1:2017.

Segunda.- Los resultados obtenidos tras la evaluación del método de la impedanciometría combinada con el kit de hibridación de RNA para la identificación de la especie *L. monocytogenes* no han sido satisfactorios, debido principalmente a su baja sensibilidad presentando falsos negativos. Este hecho se manifiesta cuando *L. monocytogenes* comparte nicho ecológico con otras especies del género.

Tercera.- De las dos metodologías evaluadas positivamente, la impedanciometría ha sido la seleccionada para la detección de *L. monocytogenes* en jamón curado y en superficies relacionadas con su proceso de elaboración, por ser el método más sencillo, económico y permitir la obtención de resultados negativos en menor tiempo. Por ello, se propone como herramienta alternativa al método de referencia (ISO 11290-1:2017) para el control del patógeno dentro del sistema APPCC (Análisis de Peligros y Puntos de Control Crítico) de la industria cárnica.

Cuarta.- El método qPCR para la cuantificación de *L. monocytogenes* desarrollado en este trabajo, cumple con todos los parámetros de validación ensayados: linealidad, eficiencia, repetibilidad, reproducibilidad, variabilidad y exactitud relativa. Además, el pre-tratamiento de las muestras cárnicas, previo al análisis PCR, ha permitido diluir los inhibidores de la reacción de amplificación y reducir de manera significativa el límite de detección y cuantificación de la técnica, hecho destacable en el análisis molecular de muestras complejas como las matrices cárnicas. Por ello, esta metodología, se presenta como una excelente alternativa al método de referencia (ISO 11290-2:2017) para la cuantificación de *L. monocytogenes* en aquellos productos cárnicos en los que se ha detectado el patógeno.

Quinta.- En el desarrollo del método qPCR, la diferencia entre los recuentos de *L. monocytogenes* en la curva celular con respecto a la curva con matriz, pone de manifiesto la necesidad de realizar el estudio para cada categoría de alimentos en los que se tenga prevista

su aplicación. En nuestro estudio, el efecto matriz ha sido bajo, con tan sólo una unidad logarítmica de diferencia, hecho justificado por un adecuado pretratamiento de las muestras.

Sexta.- El recuento de *L. monocytogenes* tanto por el método qPCR como por el de referencia en aquellos productos cárnicos comerciales con presencia del patógeno/25g, han sido inferiores a 100 ufc/g. Todas las muestras estuvieron por debajo de los límites de cuantificación de las técnicas, excepto una de ellas, que solo pudo ser cuantificada por el método qPCR. Este hecho puede ser justificado bien por la presencia de bacterias viables no cultivables, muertas o por la baja sensibilidad del método de referencia a concentraciones por debajo de 100 ufc/g.

Séptima.- Los resultados obtenidos nos permiten concluir que el método qPCR desarrollado en este trabajo se presenta como una herramienta rápida y sencilla para la cuantificación de *L. monocytogenes* en productos cárnicos, que puede ser utilizada por la industria para el cumplimiento de los criterios microbiológicos establecidos en el Reglamento (CE) Nº 2073/2005 para alimentos LPC (≤ 100 ufc/g).

Octava.- Los resultados obtenidos tras el análisis de muestras de jamón curado loncheado y envasado al vacío procedentes de una industria cárnica, muestran la presencia de *Listeria monocytogenes* en un bajo porcentaje de las mismas (3,3 %). Asimismo, la concentración del patógeno en dichas muestras ha sido en todos los casos por debajo del criterio microbiológico establecido en la Unión Europea (Reglamento CE Nº 2073/2005). No obstante, estos productos no podrían ser exportados a terceros países con política de “tolerancia cero”.

Novena.- La contaminación por *L. monocytogenes* de las superficies de la industria cárnica implicadas en el proceso de elaboración del jamón curado ha sido moderada (9,3 %), detectándose tanto antes como después de las operaciones de limpieza y desinfección. La zona de mayor riesgo ha sido la de deshuesado, siendo las cintas transportadoras articuladas y la desgubadora las superficies en las que se ha detectado el patógeno con mayor frecuencia. De ello se deduce tanto un fallo en la limpieza y desinfección, como un diseño inadecuado de los equipos, impidiendo la eliminación de *L. monocytogenes* y favoreciendo la formación de nichos de contaminación.

Décima.- La coexistencia de la especie *L. monocytogenes* con las especies *L. welshimeri* y *L. innocua* en las superficies de procesado de la industria, corroboran la importancia de monitorizar la presencia de *Listeria* spp. en superficies como indicador de contaminación por la especie patógena.

Undécima.-La identificación de serotipos de los aislados de *L. monocytogenes* en el proceso de elaboración de jamón curado mostró el predominio del serotipo molecular 1/2a, tanto en el jamón como en las superficies. Este hecho confirma una mayor capacidad de supervivencia de los aislados del linaje II (1/2 a y 1/2c) en el ambiente del procesado de alimentos. Se quiere resaltar la importancia en salud pública del aislamiento del serotipo 1/2a en productos LPC, ya que este serotipo se asocia frecuentemente con brotes y casos esporádicos de listeriosis humana.

Duodécima.- La subtipificación molecular de los aislados de *L. monocytogenes* ha mostrado una diversidad genética baja con la identificación de seis pulsotipos diferentes en la industria, siendo uno de ellos considerado persistente y predominante. El conocimiento de la distribución de este pulsotipo en el ambiente y en el producto final ha permitido identificar los reservorios de contaminación específica. En este sentido, el pulsotipo S2-1 ha sido identificado como persistente de la zona de deshuesado, concretamente en cintas transportadoras articuladas, desgubadora, mesa y deshuesadora. Además, también ha sido detectado de forma esporádica en la zona de loncheado (cintas transportadoras continuas y mesa) y en un lote de jamón curado.

Decimotercera.- Los pulsotipos S2-1, S4 y S5 de *L. monocytogenes* aislados de las muestras de jamón curado también han sido identificados de diversas superficies de la zona de deshuesado (cintas transportadoras articuladas, desgubadora, mesas y deshuesadora). Este hecho demuestra el peligro de contaminación cruzada en la industria.

Decimocuarta.-La detección y caracterización genética de la contaminación por *L. monocytogenes* en el proceso de elaboración de jamón curado loncheado y envasado al vacío, nos ha permitido proponer medidas específicas a esta industria para el control del patógeno. Entre estas medidas se incluye un procedimiento de limpieza y desinfección específico frente a cepas esporádicas y persistentes de la industria, así como el diseño higiénico de determinados equipos y superficies. La aplicación de estas medidas favorecerá el cumplimiento tanto de la normativa europea como la de terceros países, y aportarán a la empresa herramientas para la reducción significativa del riesgo que le permitirán competir en los mercados internacionales, siendo que los requisitos para la exportación son cada vez más exigentes en materia de seguridad alimentaria.

Conclusions

First.- Optimization and evaluation of the impedanciometry combined with Rapid L. mono and real-time PCR yielded excellent results in the detection of *L. monocytogenes* in the meat industry, complying with the validation parameters for alternative methods as established by international organizations and in the literature. Furthermore, both methods offer a series of advantages: speed, and the capacity of simultaneously analyzing a great number of samples. Thus, they represent a viable alternative to the ISO 11290-1:2017 reference method.

Second.- Results obtained from the evaluation of the impedanciometry combined with the RNA hybridization method were not satisfactory, mainly due to their low sensitivity: they yielded false negatives. This phenomenon is observed whenever *L. monocytogenes* shares an ecological niche with other species of its genus.

Third.- Of the two positively evaluated methodologies, the impedanciometry combined with Rapid L. mono was selected for the detection of *L. monocytogenes* in cured ham and in surfaces associated with its processing: this method is simpler to apply, it is inexpensive, and it yields negative results in a shorter period of time. Thus, it is herein proposed as an alternative to the reference method (ISO 11290-1:2017) for controlling the pathogen in accordance with the HACCP system (Hazard Analysis and Critical Control Points).

Fourth.- The qPCR method for quantifying *L. monocytogenes* elaborated in this thesis complies with all assayed validation parameters: linearity, efficiency, repeatability, reproducibility, variability, and relative accuracy. Furthermore, pre-treatment of meat samples prior to PCR analysis enabled us to dilute the inhibitors of the amplification reaction and thereby significantly reduce the technique's detection and quantification limit, a notable advantage in analyzing complex molecular samples such as meat matrices. Thus this methodology proves to be an excellent alternative to the reference method (ISO 11290-2:2017) for the quantification of *L. monocytogenes* in meat products in which the pathogen has been detected previously.

Fifth.- In the elaboration of the qPCR method, the difference between *L. monocytogenes* counts in the cellular curve with respect to the matrix curve points toward the need of carrying out studies for each category of foods where its application is foreseen. In our study, the matrix effect was low, with only one logarithmic unit of difference – a finding that is justified by the fact that the samples had been adequately pre-treated.

Sixth.- In commercial meat products displaying the presence of *L. monocytogenes*/25g, the count of the pathogen via the qPCR method and via the reference method was lower than 100

ufc/g. All samples lay below the techniques' respective quantification limits, except for one sample which could only be quantified by using the qPCR method. This finding is explained either by the presence of viable, non-cultivable, dead bacteria, or by the reference method's low sensitivity to concentrations inferior to 100 ufc/g.

Seventh.- The results obtained allow us to conclude that the qPCR method elaborated in this thesis can be regarded as a rapid, simple-to-use tool for the quantification of *L. monocytogenes* in meat products. It can therefore be applied in the meat industry to comply with the microbiological criteria established by European Commission Regulation (EC) No. 2073/2005 regarding RTE foodstuffs (≤ 100 ufc/g).

Eighth.- Results obtained from analysis of sliced, vacuum-packed cured ham from a meat processing plant reveal a presence of *Listeria monocytogenes* in a low percentage of samples (3.3 %). At the same time, the degree of concentration of the pathogen in those samples lies below the tolerance criterion established by the European Union (EC Regulation No. 2073/2005) in all cases. However, it must be noted that these products cannot be exported to countries with a "zero tolerance" policy.

Ninth.- *L. monocytogenes* contamination of surfaces in the meat industry associated with the processing of cured ham was shown to be moderate (9.3 %), and was detected both before and after the cleaning and disinfection stages. The greatest risk zone is the deboning room, where modular conveyor belts and the gouging machine were shown to be the surfaces on which the pathogen was detected with the greatest frequency. We deduce that mistakes must have been committed in the application of the cleaning and disinfection protocols, and also that the equipment may be inadequately designed, thereby preventing the elimination of *L. monocytogenes* and encouraging the buildup of contamination niches.

Tenth.- The coexistence of the *L. monocytogenes* with the species *L. welshimeri* and *L. innocua* on meat industry processing surfaces confirms the importance of monitoring the presence of *Listeria* spp. on such surfaces as an indicator of general contamination on the part of the pathogen species.

Eleventh.- The identification of the serotypes of the isolates of *L. monocytogenes* in the processing stages of cured ham showed that the molecular serotype 1/2a was predominant in the meat as well as on the surfaces. This finding confirms that isolates of lineage II (1/2 a y 1/2c) have an improved survival capacity in the food processing environment. Therefore, we wish to point out to the health sector the importance of consistently isolating serotype 1/2a in RTE products, since this serotype is frequently associated with outbreaks as well as with individual

cases of listeriosis in humans.

Twelfth.- The molecular sub-typification of isolates of *L. monocytogenes* displayed a low genetic diversity: six different pulsetypes were identified in the processing plant, one of which can be regarded as persistent and predominant. Ascertaining the distribution of that pulsetype in the plant and in the final product enabled us to identify specific contamination reservoirs. In this sense, the S2-1 pulsetype was identified as persistent in the deboning room, particularly on the modular conveyor belts, in the gouging machine and in the boning machine. Furthermore, it was also sporadically detected in the slicing zone (continual conveyor belts and table) and in a batch of cured ham.

Thirteenth.- The *L. monocytogenes* pulsetypes S2-1, S4 and S5 of isolates from cured ham samples were also detected on several surfaces in the deboning area (modular conveyor belts, gouging machine, tables, and boning machine). This finding underscores the danger of cross-contamination in the meat industry.

Fourteenth.- The detection and genetic characterization of contamination by *L. monocytogenes* in the processing of sliced, vacuum-packed cured ham enables us to propose pathogen control measures that are specific to this particular industry. They include cleaning and disinfection procedures specifically directed against strains that are sporadic and persistent in the meat industry, along with pursuing the goal of elaborating a more hygienic design of surfaces and certain pieces of equipment. The application of these recommended measures will facilitate compliance with the European norm as well as with those of third-party countries, and they will provide the meat sector with tools enabling it to significantly reduce the bacterial contamination risk, thereby enabling Spanish firms to become more competitive on international markets, since export requirements for foodstuffs have become increasingly strict in recent years

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Referencias bibliográficas

- Aarnisalo, K., Salo, S., Miettinen, H., Suihko, M.-L., Wirtanen, G., Autio, T., ... Sjöberg, A.-M. (2000). Bactericidal Efficiencies Of Commercial Disinfectants Against *Listeria monocytogenes* On Surfaces. *Journal of Food Safety*, 20(4), 237–250. <https://doi.org/10.1111/j.1745-4565.2000.tb00302.x>
- Agencia Española de Consumo, Seguridad Alimentaria y Nutrición (AECOSAN). (2015). Directrices para el muestreo oficial de líneas de producción de alimentos Listos Para el Consumo que pueden plantear riesgo de *Listeria monocytogenes* y actuaciones consiguientes. Rev.0. Retrieved from http://www.aecosan.mssi.gob.es/AECOSAN/docs/documentos/seguridad_alimentaria/interpretaciones/biologicas/listeria_anexo.pdf
- Anderson, A., Pietsch, K., Zucker, R., Mayr, A., Müller-Hohe, E., Messelhäuser, U., ... Huber, I. (2011). Validation of a Duplex Real-Time PCR for the Detection of *Salmonella* spp. in Different Food Products. *Food Analytical Methods*, 4(3), 259–267. <https://doi.org/10.1007/s12161-010-9142-8>
- Anónimo. (2013). Productos Listos Para el Consumo. Retrieved September 5, 2018, from <http://www.alimentacion.enfasis.com/articulos/66803-productos-listos-consumo>
- Art, D., & Andre, P. (1991). Comparison of Three Selective Isolation Media for the Detection of *L. monocytogenes* in Foods. *Zentralblatt Für Bakteriologie*, 275(1), 79–84. [https://doi.org/10.1016/S0934-8840\(11\)80770-X](https://doi.org/10.1016/S0934-8840(11)80770-X)
- Asociación Nacional de industrias de la Carne de España (ANICE). (2018). El sector cárnico español. Retrieved September 3, 2018, from https://www.anice.es/industrias/area-de-prensa/el-sector-carnico-espanol_213_1_ap.html
- Autio, T., Lundén, J., Fredriksson-Ahomaa, M., Björkroth, J., Sjöberg, A.-M., & Korkeala, H. (2002). Similar *Listeria monocytogenes* pulsotypes detected in several foods originating from different sources. *International Journal of Food Microbiology*, 77(1–2), 83–90. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12076041>
- Auvolat, A., & Besse, N. G. (2016). The challenge of enumerating *Listeria monocytogenes* in food. *Food Microbiology*, 53, 135–149. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2015.09.003>
- Ayrapetyan, M., & Oliver, J. D. (2016). The viable but non-culturable state and its relevance in food safety. *Current Opinion in Food Science*. Elsevier. <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2016.04.010>

- Badosa, E., Trias, R., Parés, D., Pla, M., & Montesinos, E. (2008). Microbiological quality of fresh fruit and vegetable products in Catalonia (Spain) using normalised plate-counting methods and real time polymerase chain reaction (QPCR). *Journal of the Science of Food and Agriculture*, *88*(4), 605–611. <https://doi.org/10.1002/jsfa.3124>
- Barbau-Piednoir, E., Botteldoorn, N., Yde, M., Mahillon, J., & Roosens, N. H. (2013). Development and validation of qualitative SYBR®Green real-time PCR for detection and discrimination of *Listeria* spp. and *Listeria monocytogenes*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *97*(9), 4021–4037. <https://doi.org/10.1007/s00253-012-4477-2>
- Barbosa, W. B., Cabedo, L., Wederquist, H. J., Sofos, J. N., & Schmidt, G. R. (1994). Growth Variation Among Species and Strains of *Listeria* in Culture Broth. *Journal of Food Protection*, *57*(9), 765–769. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-57.9.765>
- Barreiros dos Santos, M., Agusil, J. P., Prieto-Simón, B., Sporer, C., Teixeira, V., & Samitier, J. (2013). Highly sensitive detection of pathogen *Escherichia coli* O157:H7 by electrochemical impedance spectroscopy. *Biosensors and Bioelectronics*, *45*, 174–180. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2013.01.009>
- Barros, M. D. A. F., Nero, L. A., Manoel, A. V.-B., D’Ovidio, L., Da Silva, L. C., Franco, B. D. G. D. M., & Beloti, V. (2007). *Listeria* spp. associated to different levels of autochthonous microbiota in meat, meat products and processing plants. *Brazilian Journal of Microbiology*, *38*(4), 603–609.
- Beaufort, A., Rudelle, S., Gnanou-Besse, N., Toquin, M. T., Kerouanton, A., Bergis, H., ... Cornu, M. (2007). Prevalence and growth of *Listeria monocytogenes* in naturally contaminated cold-smoked salmon. *Letters in Applied Microbiology*, *44*(4), 406–411. <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2006.02096.x>
- Becker, B., Schuler, S., Lohneis, M., Sabrowski, A., Curtis, G., & Holzapfel, W. (2006). Comparison of two chromogenic media for the detection of *Listeria monocytogenes* with the plating media recommended by EN/DIN 11290-1. *International Journal of Food Microbiology*, *109*(1–2), 127–131. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2006.01.030>
- Berrada, H., Soriano, J. M., Picó, Y., & Mañes, J. (2006). Quantification of *Listeria monocytogenes* in salads by real time quantitative PCR. *International Journal of Food Microbiology*, *107*(2), 202–206. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2005.07.006>
- Bertsch, D., Rau, J., Eugster, M. R., Haug, M. C., Lawson, P. A., Lacroix, C., & Meile, L. (2013). *Listeria fleischmannii* sp. nov., isolated from cheese. *International Journal Of Systematic*

- And Evolutionary Microbiology*, 63(Pt 2), 526–532. <https://doi.org/10.1099/ijms.0.036947-0>
- Besnard, V., Federighi, M., & Cappelier, J. M. (2000). Development of a direct viable count procedure for the investigation of VBNC state in *Listeria monocytogenes*. *Letters in Applied Microbiology*, 31(1), 77–81.
- Besse, N. G., Barre, L., Buhariwalla, C., Vignaud, M. L., Khamissi, E., Decourseulles, E., ... Kalmokoff, M. (2010). The overgrowth of *Listeria monocytogenes* by other *Listeria* spp. in food samples undergoing enrichment cultivation has a nutritional basis. *International Journal of Food Microbiology*, 136, 345–351. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2009.10.025>
- Biassoni, R., & Raso, A. (Eds.). (2014). *Quantitative Real-Time PCR* (Vol. 1160). New York, NY: Springer New York. 15-19. <https://doi.org/10.1007/978-1-4939-0733-5>
- Bille, J., Blanc, D. S., Schmid, H., Boubaker, K., Baumgartner, A., Siegrist, H. H., ... Waespi, U. (2006). Outbreak of human listeriosis associated with tomme cheese in northwest Switzerland, 2005. *Euro Surveillance : Bulletin Europeen Sur Les Maladies Transmissibles = European Communicable Disease Bulletin*, 11(6), 91–93.
- Bolocan, A. S., Nicolau, A. I., Alvarez-Ordóñez, A., Borda, D., Oniciuc, E. A., Stessl, B., ... Jordan, K. (2016). Dynamics of *Listeria monocytogenes* colonisation in a newly-opened meat processing facility. *Meat Science*, 113, 26–34. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2015.10.016>
- Bonsaglia, E. C. R., Silva, N. C. C., Fernades Júnior, A., Araújo Júnior, J. P., Tsunemi, M. H., & Rall, V. L. M. (2014). Production of biofilm by *Listeria monocytogenes* in different materials and temperatures. *Food Control*, 35(1), 386–391. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2013.07.023>
- Borucki, M. K., & Call, D. R. (2003). *Listeria monocytogenes* Serotype Identification by PCR. *Journal of Clinical Microbiology*, 41(12), 5537–5540. <https://doi.org/10.1128/JCM.41.12.5537-5540.2003>
- Borucki, M. K., Peppin, J. D., White, D., Loge, F., & Call, D. R. (2003). Variation in biofilm formation among strains of *Listeria monocytogenes*. *Applied and Environmental Microbiology*, 69(12), 7336–7342. <https://doi.org/10.1128/AEM.69.12.7336>
- Brosch, R., Buchrieser, C., & Rocourt, J. (1991). Subtyping of *Listeria monocytogenes* serovar 4b by use of low-frequency-cleavage restriction endonucleases and pulsed-field gel electrophoresis. *Research in Microbiology*, 142(6), 667–675.

[https://doi.org/10.1016/0923-2508\(91\)90080-T](https://doi.org/10.1016/0923-2508(91)90080-T)

Buchanan, R. L., Gorris, L. G. M., Hayman, M. M., Jackson, T. C., & Whiting, R. C. (2017). A review of *Listeria monocytogenes*: An update on outbreaks, virulence, dose-response, ecology, and risk assessments. *Food Control*, 75, 1–13. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2016.12.016>

Buncic, S., Avery, S. M., Rocourt, J., & Dimitrijevic, M. (2001). Can food-related environmental factors induce different behaviour in two key serovars, 4b and 1/2a, of *Listeria monocytogenes*? *International Journal of Food Microbiology*, 65(3), 201–212. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11393689>

Busani, L., Cigliano, A., Taioli, E., Caligiuri, V., Chiavacci, L., Di Bella, C., ... Italian Group of Veterinary Epidemiology. (2005). Prevalence of *Salmonella enterica* and *Listeria monocytogenes* contamination in foods of animal origin in Italy. *Journal of Food Protection*, 68(8), 1729–1733. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21132987>

Bustin, S. A., Benes, V., Garson, J. A., Hellems, J., Huggett, J., Kubista, M., ... Wittwer, C. T. (2009). The MIQE Guidelines: Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments. *Clinical Chemistry*, 55(4), 611–622. <https://doi.org/10.1373/clinchem.2008.112797>

Campdepadrós, M., Stchigel, A. M., Romeu, M., Quilez, J., & Solà, R. (2012). Effectiveness of two sanitation procedures for decreasing the microbial contamination levels (including *Listeria monocytogenes*) on food contact and non-food contact surfaces in a dessert-processing factory. *Food Control*, 23(1), 26–31. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2011.05.017>

Capell, C. O., Kirby, R. M., & Moss, M. (1995). A method and medium for the electrical detection of. *International Journal of Food Microbiology*, 1605(94), 169–177. Retrieved from [https://repositorio.ucp.pt/bitstream/10400.14/5939/4/A method and medium .pdf](https://repositorio.ucp.pt/bitstream/10400.14/5939/4/A%20method%20and%20medium.pdf)

Capita, R., Alonso-Calleja, C., Moreno, B., & García-Fernandez, M. C. (2001). Occurrence of *Listeria* species in retail poultry meat and comparison of a cultural/immunoassay for their detection. *International Journal of Food Microbiology*, 65(1–2), 75–82. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11322703>

Cardozo-Bernal, Á. M., Ramón, L. F., Poutou-Piñales, R. A., Carrascal-Camacho, A. K., & Zambrano, D. C. (2013). Electroforesis en Gel de Campo Pulsado (PFGE) para la diferenciación molecular de *Listeria monocytogenes*. *Universitas Scientiarum*, 18(2), 203–222. <https://doi.org/10.11144/Javeriana.SC18-2.egcp>

- Carpentier, B., & Barre, L. (2012). Guidelines on sampling the food processing area and equipment for the detection of *Listeria monocytogenes*, 1-15. Retrieved from www.anses.fr
- Carpentier, B., & Cerf, O. (2011). Review - Persistence of *Listeria monocytogenes* in food industry equipment and premises. *International Journal of Food Microbiology*, *145*(1), 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2011.01.005>
- Cartwright, E. J., Jackson, K. A., Johnson, S. D., Graves, L. M., Silk, B. J., & Mahon, B. E. (2013). Listeriosis outbreaks and associated food vehicles, United States, 1998-2008. *Emerging Infectious Diseases*, *19*(1), 1–9. <https://doi.org/10.3201/eid1901.120393>
- Carvalho, A., Eusébio, C., Silva, J., Gibbs, P., & Teixeira, P. (2010). Influence of *Listeria innocua* on the growth of *Listeria monocytogenes*. *Food Control*, *21*(11), 1492–1496. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2010.04.021>
- Centre for Food Safety and Applied Nutrition, F. S. and I. S. (2003). Quantitative Assessment of Relative Risk to Public Health From Foodborne *Listeria monocytogenes* Among Selected Categories of Ready-to-Eat Foods. Retrieved from <https://www.fda.gov/downloads/Food/FoodScienceResearch/UCM197330.pdf>
- Chae, M. S., & Schraft, H. (2000). Comparative evaluation of adhesion and biofilm formation of different *Listeria monocytogenes* strains, *62*, 103–111.
- Chaitiemwong, N., Hazeleger, W. C., & Beumer, R. R. (2010). Survival of *Listeria monocytogenes* on a conveyor belt material with or without antimicrobial additives. *International Journal of Food Microbiology*, *142*(1–2), 260–263. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2010.06.021>
- Chaitiemwong, N., Hazeleger, W. C., Beumer, R. R., & Zwietering, M. H. (2014). Quantification of transfer of *Listeria monocytogenes* between cooked ham and slicing machine surfaces. *Food Control*, *44*, 177–184. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2014.03.056>
- Chasseignaux, E., G rault, P., Toquin, M. T., Salvat, G., Colin, P., & Ermel, G. (2002). Ecology of *Listeria monocytogenes* in the environment of raw poultry meat and raw pork meat processing plants. *FEMS Microbiology Letters*, *210*(2), 271–275. [https://doi.org/10.1016/S0378-1097\(02\)00637-7](https://doi.org/10.1016/S0378-1097(02)00637-7)
- Chaturongkasumrit, Y., Takahashi, H., Keeratipibul, S., Kuda, T., & Kimura, B. (2011). The effect of polyesterurethane belt surface roughness on *Listeria monocytogenes* biofilm formation and its cleaning efficiency. *Food Control*, *22*(12), 1893–1899.

- <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2011.04.032>
- Chavant, P., Gaillard-Martinie, B., & Hébraud, M. (2004). Antimicrobial effects of sanitizers against planktonic and sessile *Listeria monocytogenes* cells according to the growth phase. *FEMS Microbiology Letters*, 236(2), 241–248. <https://doi.org/10.1016/j.femsle.2004.05.040>
- Chen, J.-Q., Healey, S., Regan, P., Laksanalamai, P., & Hu, Z. (2017). PCR-based methodologies for detection and characterization of *Listeria monocytogenes* and *Listeria ivanovii* in foods and environmental sources. *Food Science and Human Wellness*, 6(2), 39–59. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.fshw.2017.03.001>
- Chen, J., Cheng, C., Lv, Y., & Fang, W. (2013). Genetic diversity of internalin genes in the *ascB* - *dapE* locus among *Listeria monocytogenes* lineages III and IV strains. *Journal of Basic Microbiology*, 53(9), 778–784. <https://doi.org/10.1002/jobm.201200137>
- Chen, Y., Zhang, W., & Knabel, S. J. (2007). Multi-virulence-locus sequence typing identifies single nucleotide polymorphisms which differentiate epidemic clones and outbreak strains of *Listeria monocytogenes*. *Journal of Clinical Microbiology*, 45(3), 835–846. <https://doi.org/10.1128/JCM.01575-06>
- Chenal-Francois, V., Diancourt, L., Cantinelli, T., Passet, V., Tran-Hykes, C., Bracq-Dieye, H., ... Brissed, S. (2013). Optimized multilocus variable-number tandem-repeat analysis assay and its complementarity with pulsed-field gel electrophoresis and multilocus sequence typing for *Listeria monocytogenes* clone identification and surveillance. *Journal of Clinical Microbiology*, 51(6), 1868–1880. <https://doi.org/10.1128/JCM.00606-13>
- Cheng, C.-M., Lin, W., Van, K. T., Phan, L., Tran, N. N., & Farmer, D. (2008). Rapid detection of *Salmonella* in foods using real-time PCR. *Journal of Food Protection*, 71(12), 2436–2441. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19256088>
- Cheng, Y., Siletzky, R., & Kathariou, S. (2008). Genomic Divisions/Lineages, Epidemic Clones, and Population Structure. *Handbook of Listeria monocytogenes*. <https://doi.org/10.1201/9781420051414.ch11>
- Christieans, S., Picgirard, L., Parafita, E., Lebert, A., & Gregori, T. (2018). Impact of reducing nitrate/nitrite levels on the behavior of *Salmonella Typhimurium* and *Listeria monocytogenes* in French dry fermented sausages. *Meat Science*, 137(May 2017), 160–167. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2017.11.028>
- Churchill, R. L. T., Lee, H., & Hall, J. C. (2006). Detection of *Listeria monocytogenes* and the toxin

- listeriolysin O in food. *Journal of Microbiological Methods*, 64(2), 141–170.
<https://doi.org/10.1016/j.mimet.2005.10.007>
- Cobo Molinos, A., Abriouel, H., Ben Omar, N., Martínez-Canamero, M., & Gálvez, A. (2010). A Quantitative Real-time PCR Assay for Quantification of Viable *Listeria Monocytogenes* Cells After Bacteriocin Injury in Food-First Insights. *Current Microbiology*, 61(6), 515–519.
<https://doi.org/10.1007/s00284-010-9646-x>
- Code of Federal Regulations. (2015). Title 9: Animals and animals products. Ch III: Food safety and inspection service. Department of Agriculture. Subch E: regulatory requirements under the federal meat inspection act and the poultry poultry inspection. Part 430 - Requirements for specific classes of products. Section 430.1-Definition 430-4- Control of *Listeria monocytogenes* in post lethality exposed ready-to-eat products.
- Codex Alimentarius. (2007). Directrices sobre la aplicación de principios generales de higiene de los alimentos para el control de *L. monocytogenes* en los alimentos. Codex Alimentarius, CAC/GL 61.
- Coll, P., Coque, M. T., Domínguez, M. A., Vázquez, J., & Vila, J. (2005). *Procedimientos en Microbiología Clínica*.
<https://www.seimc.org/contenidos/documentoscientificos/procedimientosmicrobiologia/seimc-procedimientomicrobiologia18.pdf>
- Cornu, M., Kalmokoff, M., & Flandrois, J.-P. (2002). Modelling the competitive growth of *Listeria monocytogenes* and *Listeria innocua* in enrichment broths. *International Journal of Food Microbiology*, 73(2), 261–274. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(01\)00658-4](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0168-1605(01)00658-4)
- Currie, A., Farber, J. M., Nadon, C., Sharma, D., Whitfield, Y., Gaulin, C., ... Sierpiska, U. (2015). Multi-Province Listeriosis Outbreak Linked to Contaminated Deli Meat Consumed Primarily in Institutional Settings, Canada, 2008. *Foodborne Pathogens and Disease*, 12(8), 645–652.
<https://doi.org/10.1089/fpd.2015.1939>
- D'Ostuni, V., Tristezza, M., De Giorgi, M. G., Rampino, P., Grieco, F., & Perrotta, C. (2016). Occurrence of *Listeria monocytogenes* and *Salmonella* spp. in meat processed products from industrial plants in Southern Italy. *Food Control*, 62, 104–109.
<https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2015.10.025>
- D'Urso, O. F., Poltronieri, P., Marsigliante, S., Storelli, C., Hernández, M., & Rodríguez-Lázaro, D. (2009). A filtration-based real-time PCR method for the quantitative detection of viable

- Salmonella enterica* and *Listeria monocytogenes* in food samples. *Food Microbiology*, 26(3), 311–316. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2008.12.006>
- da Silva, E. P., & De Martinis, E. C. P. (2013). Current knowledge and perspectives on biofilm formation: the case of *Listeria monocytogenes*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 97(3), 957–968. <https://doi.org/10.1007/s00253-012-4611-1>
- Dalmasso, M., Bolocan, A. S., Hernandez, M., Kapetanakou, A. E., Kuchta, T., Manios, S. G., ... Rodríguez-Lázaro, D. (2014). Comparison of polymerase chain reaction methods and plating for analysis of enriched cultures of *Listeria monocytogenes* when using the ISO11290-1 method. *Journal of Microbiological Methods*, 98(1), 8–14. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2013.12.018>
- Daniels, R., Vanderleyden, J., & Michiels, J. (2004). Quorum sensing and swarming migration in bacteria. *FEMS Microbiology Reviews*, 28(3), 261–289. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15449604>
- Datta, A. R., & Burall, L. S. (2017). Serotype to genotype: The changing landscape of listeriosis outbreak investigations. *Food Microbiology*. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2017.06.013>
- Davda, C., & Pugh, S. J. (1991). An improved protocol for the detection and rapid confirmation within 48 h of Salmonellas in confectionery products. *Letters in Applied Microbiology*, 13(6), 287–290. <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.1991.tb00630.x>
- de Castro, V., Escudero, J. M., Rodriguez, J. L., Muniozguren, N., Uribarri, J., Saez, D., & Vazquez, J. (2012). Listeriosis outbreak caused by Latin-style fresh cheese, Bizkaia, Spain, August 2012. *Eurosurveillance*, 17(42), 3–5.
- de Kievit, T. R. (2009). Quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Environmental Microbiology*, 11(2), 279–288. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2008.01792.x>
- de las Heras, A., Cain, R. J., Bielecka, M. K., & Vázquez-Boland, J. A. (2011). Regulation of *Listeria* virulence: PrfA master and commander. *Current Opinion in Microbiology*, 14(2), 118–127. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2011.01.005>
- de Oliveira, M. A., Abeid Ribeiro, E. G., Morato Bergamini, A. M., & Pereira De Martinis, E. C. (2010). Quantification of *Listeria monocytogenes* in minimally processed leafy vegetables using a combined method based on enrichment and 16S rRNA real-time PCR. *Food Microbiology*, 27(1), 19–23. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2009.07.003>
- Delibato, E., Gattuso, A., Minucci, A., Auricchio, B., De Medici, D., Toti, L., ... Gianfranceschi, M.

- V. (2009). PCR experion automated electrophoresis system to detect *Listeria monocytogenes* in foods. *Journal of Separation Science*, 32(21), 3817–3821. <https://doi.org/10.1002/jssc.200900166>
- 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(1), 1–13. <https://doi.org/10.1186/1471-2148-8-277>
- den Bakker, H. C., Warchocki, S., Wright, E. M., Allred, A. F., Ahlstrom, C., Manuel, C. S., ... Wiedmann, M. (2014). *Listeria floridensis* sp. nov., *Listeria aquatica* sp. nov., *Listeria cornellensis* sp. nov., *Listeria riparia* sp. nov. and *Listeria grandensis* sp. nov., from agricultural and natural environments. *International Journal Of Systematic And Evolutionary Microbiology*, 64(Pt 6), 1882–1889. <https://doi.org/10.1099/ij.s.0.052720-0>
- Di Pinto, A., Novello, L., Montemurro, F., Bonerba, E., & Tantillo, G. (2010). Occurrence of *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat foods from supermarkets in Southern Italy. *The New Microbiologica*, 33(3), 249–252.
- Doumith, M., Buchrieser, C., Glaser, P., Jacquet, C., & Martin, P. (2004). Differentiation of the Major *Listeria monocytogenes* Serovars by Multiplex PCR Differentiation of the Major *Listeria monocytogenes* Serovars by Multiplex PCR. *Journal of Clinical Microbiology*, 42(8), 3819–3822. <https://doi.org/10.1128/JCM.42.8.3819>
- Dwivedi, H. P., & Jaykus, L.-A. (2011). Detection of pathogens in foods: the current state-of-the-art and future directions. *Critical Reviews in Microbiology*, 37(1), 40–63. <https://doi.org/10.3109/1040841X.2010.506430>
- Ebner, R., Stephan, R., Althaus, D., Brisse, S., Maury, M., & Tasara, T. (2015). Phenotypic and genotypic characteristics of *Listeria monocytogenes* strains isolated during 2011-2014 from different food matrices in Switzerland. *Food Control*, 57, 321–326. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2015.04.030>
- European Food Safety Authority (EFSA) and European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC). (2018). Multi-country outbreak of *Listeria monocytogenes* serogroup IVb, multi-locus sequence type 6, infections linked to frozen corn and possibly to other frozen vegetables – first update. *EFSA Supporting Publications*, 15(7). <https://doi.org/10.2903/sp.efsa.2018.EN-1448>
- European Food Safety Authority (EFSA) and European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC) (2017). The European Union summary report on trends and sources of zoonoses,

- zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2016. *EFSA Journal*, 15(12), 5077. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2016.4634>
- European Food Safety Authority (EFSA) and European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC). (2016). The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2015. *EFSA Journal*, 14(12), 4634. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2016.4634>
- European Food Safety Authority (EFSA) and European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC). (2008). Request for updating the former SCVPH opinion on *Listeria monocytogenes* risk related to ready-to-eat foods and scientific advice on different levels of *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat foods and the related risk for human illness - Scientific Opinion. *EFSA Journal*, 6(1), 599. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2008.599>
- Elmali, M., Oner, S., & Yaman, H. (2013). Detection of *Listeria monocytogenes* by using PCR method in refrigerated ready-to-eat food consumed in Turkey. *Medycyna Weterynaryjna*, 69(1), 36–39.
- European Pharmacopoeia. (2015). Alternative methods for control of microbiological quality. In Phareuropa (Ed.), *European Pharmacopoeia*.
- Evans, E. W., & Redmond, E. C. (2014). Behavioral Risk Factors Associated with Listeriosis in the Home: A Review of Consumer Food Safety Studies. *Journal of Food Protection*, 77(3), 510–521. <https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-13-238>
- Ferreira, V., Barbosa, J., Stasiewicz, M., Vongkamjan, K., Switt, A. M., Hogg, T., ... Wiedmann, M. (2011). Diverse geno- and phenotypes of persistent *Listeria monocytogenes* isolates from fermented meat sausage production facilities in Portugal. *Applied and Environmental Microbiology*, 77(8), 2701–2715. <https://doi.org/10.1128/AEM.02553-10>
- Ferreira, V., Wiedmann, M., Teixeira, P., & Stasiewicz, M. J. (2014). *Listeria monocytogenes* Persistence in Food-Associated Environments: Epidemiology, Strain Characteristics, and Implications for Public Health. *Journal of Food Protection*, 77(1), 150–170.
- Flessa, S., Lusk, D. M., & Harris, L. J. (2005). Survival of *Listeria monocytogenes* on fresh and frozen strawberries. *International Journal of Food Microbiology*, 101(3), 255–262. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2004.11.010>
- Vogel, B., Huss, H. H., Ojeniyi, B., Ahrens, P., & Gram, L. (2001). Elucidation of *Listeria monocytogenes* Contamination Routes in Cold-Smoked Salmon Processing Plants Detected by DNA-Based Typing Methods. *Applied and Environmental Microbiology*, 67(6), 2586–

2595. <https://doi.org/10.1128/AEM.67.6.2586-2595.2001>

Food and Drug Administration (FDA)/Center for Food Safety and Applied Nutrition (CFSAN). (2003). Quantitative Assessment of Relative Risk to Public Health From Foodborne *Listeria monocytogenes* Among Selected Categories of Ready-to-Eat Foods. Retrieved from <https://www.fda.gov/downloads/food/foodscienceresearch/ucm197330.pdf>

Food and Agriculture Organization/World Health Organization. (2004). Risk assessment of *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat foods. *FAO/WHO Microbiological Risk Assessment Series.*, 4, 1–48. Retrieved from <http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/42875/1/9241562625.pdf?ua=1>

Food Safety and Inspection Service. (2014). FSIS Compliance Guideline: Controlling *Listeria monocytogenes* in Post-lethality Exposed Ready-to-Eat Meat and Poultry Products. Retrieved from <https://www.fsis.usda.gov/wps/wcm/connect/d3373299-50e6-47d6-a577-e74a1e549fde/Controlling-Lm-RTE-Guideline.pdf?MOD=AJPERES>

Food Safety and Inspection Service. (2017). Directive 5000.1 Verifying An Establishment's Food Safety System. Revisión 5. Retrieved from: <https://www.fsis.usda.gov/wps/wcm/connect/e8133c3c-d9b8-4a58-ab14-859e3e9c8a52/5000.1.pdf?MOD=AJPERES>

Fox, E., Hunt, K., O'Brien, M., & Jordan, K. (2011). *Listeria monocytogenes* in Irish Farmhouse cheese processing environments. *International Journal of Food Microbiology*, 145(SUPPL. 1), S39–S45. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2010.10.012>

Fox, E. M., Leonard, N., & Jordan, K. (2011). Physiological and transcriptional characterization of persistent and nonpersistent *Listeria monocytogenes* isolates. *Applied and Environmental Microbiology*, 77(18), 6559–6569. <https://doi.org/10.1128/AEM.05529-11>

Francis, G. A., & O'beirne, D. (2006). Isolation and Pulsed-Field Gel Electrophoresis Typing of *Listeria monocytogenes* from Modified Atmosphere Packaged Fresh-Cut Vegetables Collected in Ireland. *Journal of Food Protection* (Vol. 69).

Francois, K., Devlieghere, F., Standaert, A. R., Geeraerd, A. H., Van Impe, J. F., & Debevere, J. (2006). Effect of environmental parameters (temperature, pH and aw) on the individual cell lag phase and generation time of *Listeria monocytogenes*. *International Journal of Food Microbiology*, 108(3), 326–335. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2005.11.017>

Fuchizawa, I., Shimizu, S., Ootsubo, M., Kawai, Y., & Yamazaki, K. (2009). Specific and Rapid

- Quantification of Viable *Listeria monocytogenes* Using Fluorescence in situ Hybridization in Combination with Filter Cultivation. *Microbes and Environments*, 24(3), 273–275. <https://doi.org/10.1264/jsme2.ME09102>
- Fugett, E. B., Schoonmaker-Bopp, D., Dumas, N. B., Corby, J., & Wiedmann, M. (2007). Pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) analysis of temporally matched *Listeria monocytogenes* isolates from human clinical cases, foods, ruminant farms, and urban and natural environments reveals source-associated as well as widely distributed PFGE types. *Journal of Clinical Microbiology*, 45(3), 865–873. <https://doi.org/10.1128/JCM.01285-06>
- Futschik, K., & Pfutzner, H. (1995). *Electrode and media impedance for detection and characterization of microorganisms*. <https://doi.org/10.1109/RCEMBS.1995.508697>
- Gandhi, M., & Chikindas, M. L. (2007). *Listeria*: A foodborne pathogen that knows how to survive. *International Journal of Food Microbiology*, 113(1), 1–15. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2006.07.008>
- García-Gimeno, R. M., Zurera-Cosano, G., & Amaro-López, M. (1996). Incidence, Survival And Growth Of *Listeria Monocytogenes* In Ready-To-Use Mixed Vegetable Salads In Spain. *Journal of Food Safety*, 16(1), 75–86. <https://doi.org/10.1111/j.1745-4565.1996.tb00152.x>
- Garrec, N., Sutra, L., Picard, F., & Pourcher, A.-M. (2003). Development of a protocol for the isolation of *Listeria monocytogenes* from sludge. *Water Research*, 37(19), 4810–4814. [https://doi.org/10.1016/S0043-1354\(03\)00397-X](https://doi.org/10.1016/S0043-1354(03)00397-X)
- Garrido, A., Chapela, M. J., Román, B., Fajardo, P., Lago, J., Vieites, J. M., & Cabado, A. G. (2013). A new multiplex real-time PCR developed method for *Salmonella* spp. and *Listeria monocytogenes* detection in food and environmental samples. *Food Control*, 30(1), 76–85. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2012.06.029>
- Gattuso, A., Gianfranceschi, M. V., Sonnessa, M., Delibato, E., Marchesan, M., Hernandez, M., ... Rodriguez-Lazaro, D. (2014). Optimization of a Real Time PCR based method for the detection of *Listeria monocytogenes* in pork meat. *International Journal of Food Microbiology*, 184, 106–108. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2014.04.015>
- Gerba, C. P. (2015). Quaternary ammonium biocides: efficacy in application. *Applied and Environmental Microbiology*, 81(2), 464–469. <https://doi.org/10.1128/AEM.02633-14>
- Gerner-Smidt, P., Hise, K., Kincaid, J., Hunter, S., Rolando, S., Hyytiä-Trees, E., ... PulseNet Taskforce. (2006). PulseNet USA: A Five-Year Update. *Foodborne Pathogens and Disease*, 3(1), 9–19. <https://doi.org/10.1089/fpd.2006.3.9>

- Gianfranceschi, M. V., D'Ottavio, M. C., Gattuso, A., Bella, A., & Aureli, P. (2009). Distribution of serotypes and pulsotypes of *Listeria monocytogenes* from human, food and environmental isolates (Italy 2002-2005). *Food Microbiology*, 26(5), 520–526. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2009.03.003>
- Gianfranceschi, M. V., Rodriguez-Lazaro, D., Hernandez, M., González-García, P., Comin, D., Gattuso, A., ... De Medici, D. (2014). European validation of a real-time PCR-based method for detection of *Listeria monocytogenes* in soft cheese. *International Journal of Food Microbiology*, 184, 128–133. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2013.12.021>
- Giovannini, A., Migliorati, G., Prencipe, V., Calderone, D., Zuccolo, C., & Cozzolino, P. (2007). Risk assessment for listeriosis in consumers of Parma and San Daniele hams. *Food Control*, 18(7), 789–799. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2006.03.014>
- Gómez, D., Ariño, A., Carramiñana, J. J., Rota, C., & Yangüela, J. (2012). Sponge versus mini-roller for the surface microbiological control of *Listeria monocytogenes*, total aerobic mesophiles and Enterobacteriaceae in the meat industry. *Food Control*, 27(1), 242–247. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2012.03.031>
- Gómez, D., Iguácel, L. P., Rota, M. C., Carramiñana, J. J., Ariño, A., & Yangüela, J. (2015). Occurrence of *Listeria monocytogenes* in Ready-to-Eat Meat Products and Meat Processing Plants in Spain. *Foods (Basel, Switzerland)*, 4(3), 271–282. <https://doi.org/10.3390/foods4030271>
- Gram, L., Bagge-Ravn, D., Ng, Y. Y., Gyomoese, P., & Vogel, B. F. (2007). Influence of food soiling matrix on cleaning and disinfection efficiency on surface attached *Listeria monocytogenes*. *Food Control*, 18(10), 1165–1171. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2006.06.014>
- Graves, L. M., Helsel, L. O., Steigerwalt, A. G., Morey, R. E., Daneshvar, M. I., Roof, S. E., ... Sauders, B. D. (2010). *Listeria marthii* sp. nov., isolated from the natural environment, Finger Lakes National Forest. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 60(6), 1280–1288. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.014118-0>
- Graves, L. M., Hunter, S. B., Ong, A. R., Schoonmaker-Bopp, D., Hise, K., Kornstein, L., ... Swaminathan, B. (2005). Microbiological Aspects of the Investigation That Traced the 1998 Outbreak of Listeriosis in the United States to Contaminated Hot Dogs and Establishment of Molecular Subtyping-Based Surveillance for *Listeria monocytogenes* in the PulseNet Network. *Journal of Clinical Microbiology*, 43(5), 2350–2355. <https://doi.org/10.1128/JCM.43.5.2350-2355.2005>

- Graves, L. M., & Swaminathan, B. (2001). PulseNet standardized protocol for subtyping *Listeria monocytogenes* by macrorestriction and pulsed-field gel electrophoresis. *International Journal of Food Microbiology*, 65(1–2), 55–62. [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(00\)00501-8](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(00)00501-8)
- Gudbjörnsdóttir, B., Suihko, M. L., Gustavsson, P., Thorkelsson, G., Salo, S., Sjöberg, A. M., ... Bredholt, S. (2004). The incidence of *Listeria monocytogenes* in meat, poultry and seafood plants in the Nordic countries. *Food Microbiology*, 21(2), 217–225. [https://doi.org/10.1016/S0740-0020\(03\)00012-1](https://doi.org/10.1016/S0740-0020(03)00012-1)
- Guilbaud, M., Piveteau, P., Desvaux, M., Brisse, S., & Briandet, R. (2015). Exploring the Diversity of *Listeria monocytogenes* Biofilm Architecture by High-Throughput Confocal Laser Scanning Microscopy and the Predominance of the Honeycomb-Like Morphotype. *Applied and Environmental Microbiology*, 81(5), 1813–1819. <https://doi.org/10.1128/AEM.03173-14>
- Guillet, C., Join-Lambert, O., Le Monnier, A., Leclercq, A., Mecha??, F., Mamzer-Bruneel, M. F., ... Lecuit, M. (2010). Human listeriosis caused by *Listeria ivanovii*. *Emerging Infectious Diseases*, 16(1), 136–138. <https://doi.org/10.3201/eid1601.091155>
- Guillier, L., & Augustin, J. C. (2006). Modelling the individual cell lag time distributions of *Listeria monocytogenes* as a function of the physiological state and the growth conditions. *International Journal of Food Microbiology*, 111(3), 241–251. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2006.05.011>
- Gupta, P., Sarkar, S., Das, B., Bhattacharjee, S., & Tribedi, P. (2016). Biofilm, pathogenesis and prevention—a journey to break the wall: a review. *Archives of Microbiology*, 198(1), 1–15. <https://doi.org/10.1007/s00203-015-1148-6>
- Gurresch, A., Gerner, W., Pin, C., Wagner, M., & Hein, I. (2016). Evidence of metabolically active but non-culturable *Listeria monocytogenes* in long-term growth at 10 °C. *Research in Microbiology*, 167(4), 334–343. <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2016.01.003>
- Gusman, V., Medic, D., Jelesic, Z., Mihajlovic-Ukropina, M., Milosevic, V., & Povazan, A. (2014). *Listeria monocytogenes* isolated in ready-to-eat food in South Backa region of Vojvodina province, Serbia. *Archives of Biological Sciences*, 66(1), 11–14. <https://doi.org/10.2298/ABS1401011G>
- Halpin, J. L., Garrett, N. M., Ribot, E. M., Graves, L. M., & Cooper, K. L. (2009). Re-evaluation, Optimization, and Multilaboratory Validation of the PulseNet-Standardized Pulsed-Field

- Gel Electrophoresis Protocol for *Listeria monocytogenes*. *Foodborne Pathogens and Disease*, 7(3), 293–298. <https://doi.org/10.1089/fpd.2009.0394>
- Halter, E. L., Neuhaus, K., & Scherer, S. (2013). *Listeria weihenstephanensis* sp. nov., isolated from the water plant *Lemna trisulca* taken from a freshwater pond. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 63(PART2), 641–647. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.036830-0>
- Harvey, J., Keenan, K. P., & Gilmour, A. (2007). Assessing biofilm formation by *Listeria monocytogenes* strains. *Food Microbiology*, 24(4), 380–392. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2006.06.006>
- Health Canada. (2011). *Policy on Listeria monocytogenes in Ready-to-Eat Foods Bureau of Microbial Hazards Food Directorate Health Products and Food Branch*. Retrieved from https://www.canada.ca/content/dam/hc-sc/migration/hc-sc/fn-an/alt_formats/pdf/legislation/pol/policy_listeria_monocytogenes_2011-eng.pdf
- Hegstad, K., Langsrud, S., Lunestad, B. T., Scheie, A. A., Sunde, M., & Yazdankhah, S. P. (2010). Does the Wide Use of Quaternary Ammonium Compounds Enhance the Selection and Spread of Antimicrobial Resistance and Thus Threaten Our Health? *Microbial Drug Resistance*, 16(2), 91–104. <https://doi.org/10.1089/mdr.2009.0120>
- Heir, E., Lindstedt, B.-A., Røtterud, O.-J., Vardund, T., Kapperud, G., & Nesbakken, T. (2004). Molecular epidemiology and disinfectant susceptibility of *Listeria monocytogenes* from meat processing plants and human infections. *International Journal of Food Microbiology*, 96(1), 85–96. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2004.03.014>
- Hellberg, R. S., & Chu, E. (2016). Effects of climate change on the persistence and dispersal of foodborne bacterial pathogens in the outdoor environment: A review. *Critical Reviews in Microbiology*, 42(4), 548–572. <https://doi.org/10.3109/1040841X.2014.972335>
- 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. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2016.11.020>
- Henriques, A. R., Telo da Gama, L., & Fraqueza, M. J. (2014). Assessing *Listeria monocytogenes* presence in Portuguese ready-to-eat meat processing industries based on hygienic and safety audit. *Food Research International*, 63, 81–88. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2014.03.035>

- Hingston, P. A., Stea, E. C., Knøchel, S., & Hansen, T. (2013). Role of initial contamination levels, biofilm maturity and presence of salt and fat on desiccation survival of *Listeria monocytogenes* on stainless steel surfaces. *Food Microbiology*, 36(1), 46–56. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2013.04.011>
- Hoelzer, K., Pouillot, R., Dennis, S., Gallagher, D., & Kause, J. (2014). *Update on Listeria monocytogenes: Reducing cross-contamination in food retail operations*. *Advances in Microbial Food Safety* (Vol. 2). Woodhead Publishing Limited. <https://doi.org/10.1533/9781782421153.1.149>
- Hoffmann, S., Batz, M. B., & Morris, J. G. (2012). Annual Cost of Illness and Quality-Adjusted Life Year Losses in the United States Due to 14 Foodborne Pathogens. *Journal of Food Protection*, 75(7), 1292–1302. <https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-11-417>
- Hospital, X. F., Hierro, E., Arnau, J., Carballo, J., Aguirre, J. S., Gratacós-Cubarsí, M., & Fernández, M. (2017). Effect of nitrate and nitrite on *Listeria* and selected spoilage bacteria inoculated in dry-cured ham. *Food Research International*, 101(July), 82–87. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2017.08.039>
- Hoorfar, J., Malorny, B., Abdulmawjood, A., Cook, N., Wagner, M., & Fach, P. (2004). MINIREVIEW Practical Considerations in Design of Internal Amplification Controls for Diagnostic PCR Assays. *Journal Of Clinical Microbiology*, 42(5), 1863–1868. <https://doi.org/10.1128/JCM.42.5.1863-1868.2004>
- Hough, A. J., Harbison, S.-A., Savill, M. G., Melton, L. D., & Fletcher, G. (2002). Rapid enumeration of *Listeria monocytogenes* in artificially contaminated cabbage using real-time polymerase chain reaction. *Journal of Food Protection*, 65(8), 1329–1332.
- Huang, Y., Morvay, A. A., Shi, X., Suo, Y., Shi, C., & Knøchel, S. (2018). Comparison of oxidative stress response and biofilm formation of *Listeria monocytogenes* serotypes 4b and 1/2a. *Food Control*, 85, 416–422. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2017.10.007>
- Iannetti, L., Acciari, V. A., Antoci, S., Addante, N., Bardasi, L., Bilei, S., ... Migliorati, G. (2016). *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat foods in Italy: Prevalence of contamination at retail and characterisation of strains from meat products and cheese. *Food Control*, 68, 55–61. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2016.03.036>
- Ibusquiza, P. S., Herrera, J. J. R., & Cabo, M. L. (2011). Resistance to benzalkonium chloride, peracetic acid and nisin during formation of mature biofilms by *Listeria monocytogenes*. *Food Microbiology*, 28(3), 418–425. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2010.09.014>

- Integrated Taxonomic Information System (ITIS). (2018). ITIS Standard Report Page: *Listeria monocytogenes*. Retrieved September 4, 2018, from https://www.itis.gov/servlet/SingleRpt/SingleRpt?search_topic=TSN&search_value=963001#null
- International Organization for Standardization. (2004) ISO 11290-1L./A1:2004 Microbiology of food and animal feeding stuffs -- Horizontal method for the detection and enumeration of *Listeria monocytogenes* -- Part 1: Detection method.
- International Organization for Standardization. (2004) ISO 11290-2/A1:2004 Microbiology of food and animal feeding stuffs -- Horizontal method for the detection and enumeration of *Listeria monocytogenes* -- Part 2: Enumeration method.
- International Organization for Standardization. (2016). ISO 16140-2:2016 Microbiology of the food chain -- Method validation -- Part 2: Protocol for the validation of alternative (proprietary) methods against a reference method.
- International Organization for Standardization. (2017). ISO 11290-1:2017 Microbiology of the food chain -- Horizontal method for the detection and enumeration of *Listeria monocytogenes* and of *Listeria* spp. -- Part 1: Detection method.
- International Organization for Standardization. (2017). ISO 11290-2:2017 Microbiology of the food chain -- Horizontal method for the detection and enumeration of *Listeria monocytogenes* and of *Listeria* spp. -- Part 2: Enumeration method.
- Jadhav, S., Shah, R., Bhave, M., & Palombo, E. A. (2013). Inhibitory activity of yarrow essential oil on *Listeria* planktonic cells and biofilms. *Food Control*, 29(1), 125–130. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2012.05.071>
- Jadhav, S., Bhave, M., & Palombo, E. A. (2012). Methods used for the detection and subtyping of *Listeria monocytogenes*. *Journal of Microbiological Methods*, 88(3), 327–341. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2012.01.002>
- Jamali, H., Radmehr, B., & Thong, K. L. (2013). Prevalence, characterisation, and antimicrobial resistance of *Listeria* species and *Listeria monocytogenes* isolates from raw milk in farm bulk tanks. *Food Control*, 34(1), 121–125. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2013.04.023>
- Jasson, V., Jacxsens, L., Luning, P., Rajkovic, A., & Uyttendaele, M. (2010). Alternative microbial methods: An overview and selection criteria. *Food Microbiology*, 27(6), 710–730. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2010.04.008>
- Jay, J. M., Loessner, M. J., & Golden, D. A. (2005). Foodborne Listeriosis. In *Modern Food*

- Microbiology* (pp. 591–617). Boston, MA: Springer US. https://doi.org/10.1007/0-387-23413-6_25
- 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 (Reading, England)*, 147(Pt 5), 1095–1104. <https://doi.org/10.1099/00221287-147-5-1095>
- Jemmi, T., Pak, S.-I., & Salman, M. D. (2002). Prevalence and risk factors for contamination with *Listeria monocytogenes* of imported and exported meat and fish products in Switzerland, 1992-2000. *Preventive Veterinary Medicine*, 54(1), 25–36. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12062517>
- Johannessen, G. S., Loncarevic, S., & Kruse, H. (2002). Bacteriological analysis of fresh produce in Norway. *International Journal of Food Microbiology*, 77(3), 199–204. [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(02\)00051-X](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(02)00051-X)
- Johansson, T. (1998). Enhanced detection and enumeration of *Listeria monocytogenes* from foodstuffs and food-processing environments. *International Journal of Food Microbiology*, 40(1–2), 77–85.
- Kathariou, S. (2002). *Listeria monocytogenes* Virulence and Pathogenicity, a Food Safety Perspective. *Journal of Food Protection*, 65(11), 1811–1829. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-65.11.1811>
- Katsuda, K., Iguchi, M., Tuboi, T., Nishimori, K., Tanaka, K., Uchida, I., & Eguchi, M. (2000). Rapid molecular typing of *Listeria monocytogenes* by pulsed-field gel electrophoresis. *Research in Veterinary Science*, 69(1), 99–100. <https://doi.org/10.1053/RVSC.2000.0394>
- Keeratipibul, S., & Techaruwichit, P. (2012). Tracking sources of *Listeria* contamination in a cooked chicken meat factory by PCR-RAPD-based DNA fingerprinting. *Food Control*, 27(1), 64–72. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2012.02.026>
- Kérouanton, A., Marault, M., Petit, L., Grout, J., Dao, T. T., & Brisabois, A. (2010). Evaluation of a multiplex PCR assay as an alternative method for *Listeria monocytogenes* serotyping. *Journal of Microbiological Methods*, 80(2), 134–137. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2009.11.008>
- Kerr, K. G., Rotowa, N. A., Hawkey, P. M., & Lacey, R. W. (1990). Incidence of *Listeria* spp. in Pre-cooked, Chilled Chicken Products as Determined by Culture and Enzyme-linked Immunoassay (ELISA). *Journal of Food Protection*, 53(7), 606–607.

<https://doi.org/10.4315/0362-028X-53.7.606>

- Keto-Timonen, R., Tolvanen, R., Lundén, J., & Korkeala, H. (2007). An 8-year surveillance of the diversity and persistence of *Listeria monocytogenes* in a chilled food processing plant analyzed by amplified fragment length polymorphism. *Journal of Food Protection*, *70*(8), 1866–1873. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-70.8.1866>
- Keys, A. L., Dailey, R. C., Hitchins, A. D., & Derike Smiley, R. (2013). Postenrichment Population Differentials Using Buffered *Listeria* Enrichment Broth: Implications of the Presence of *Listeria innocua* on *Listeria monocytogenes* in Food Test Samples. *Journal of Food Protection*, *76*(11), 1854–1862. <https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-13-089>
- Kim, J., Pitts, B., Stewart, P. S., Camper, A., & Yoon, J. (2008). Comparison of the antimicrobial effects of chlorine, silver ion, and tobramycin on biofilm. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, *52*(4), 1446–1453. <https://doi.org/10.1128/AAC.00054-07>
- Kiss, R., Tirczka, T., Szita, G., Bernáth, S., & Csikó, G. (2006). *Listeria monocytogenes* food monitoring data and incidence of human listeriosis in Hungary, 2004. *International Journal of Food Microbiology*, *112*(1), 71–74. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2006.06.013>
- Knabel, S. J., Reimer, A., Verghese, B., Lok, M., Ziegler, J., Farber, J., ... Gilmour, M. W. (2012). Sequence typing confirms that a predominant *Listeria monocytogenes* clone caused human listeriosis cases and outbreaks in Canada from 1988 to 2010. *Journal of Clinical Microbiology*, *50*(5), 1748–1751. <https://doi.org/10.1128/JCM.06185-11>
- Kocot, A. M., & Olszewska, M. A. (2017). Biofilm formation and microscopic analysis of biofilms formed by *Listeria monocytogenes* in a food processing context. *LWT - Food Science and Technology*, *84*, 47–57. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2017.05.042>
- Kolenbrander, P. E., Andersen, R. N., Blehert, D. S., Eglund, P. G., Foster, J. S., & Palmer, R. J. (2002). Communication among oral bacteria. *Microbiology and Molecular Biology Reviews: MMBR*, *66*(3), 486–505, table of contents. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12209001>
- Koo, O. K., Ndahetuye, J. B., O'Bryan, C. A., Ricke, S. C., & Crandall, P. G. (2014). Influence of *Listeria innocua* on the attachment of *Listeria monocytogenes* to stainless steel and aluminum surfaces. *Food Control*, *39*(1), 135–138. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2013.11.008>
- Kotzekidou, P. (2013a). Microbiological examination of ready-to-eat foods and ready-to-bake frozen pastries from university canteens. *Food Microbiology*, *34*(2), 337–343.

- <https://doi.org/10.1016/j.fm.2013.01.005>
- Kotzekidou, P. (2013b). Survey of *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* spp. and *Escherichia coli* O157:H7 in raw ingredients and ready-to-eat products by commercial real-time PCR kits. *Food Microbiology*, 35(2), 86–91. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2013.03.007>
- Kramarenko, T., Roasto, M., Keto-Timonen, R., Mäesaar, M., Meremäe, K., Kuningas, M., ... Korkeala, H. (2016). *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat vacuum and modified atmosphere packaged meat and fish products of Estonian origin at retail level. *Food Control*, 67, 48–52. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2016.02.034>
- Kramarenko, T., Roasto, M., Meremäe, K., Kuningas, M., Pölsama, P., & Elias, T. (2013). *Listeria monocytogenes* prevalence and serotype diversity in various foods. *Food Control*, 30(1), 24–29. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2012.06.047>
- Krascenicsová, K., Píknová, L., Kaclíková, E., & Kuchta, T. (2008). Detection of *Salmonella enterica* in food using two-step enrichment and real-time polymerase chain reaction. *Letters in Applied Microbiology*, 46(4), 483–487. <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2008.02342.x>
- Krieg, N.R., & Holt J.G. (1984), *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, vol. 1, The Williams & Wilkins Co., Baltimore. p. 1242.
- Labrador, M., Rota, M. C., Pérez, C., Herrera, A., & Bayarri, S. (2018). Evaluation of a Method for Rapid Detection of *Listeria monocytogenes* in Dry-Cured Ham Based on Impedanciometry Combined with Chromogenic Agar. *Journal of Food Protection*, 81(5), 705–712. <https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-17-380>
- Lambertz, S. T., Ivarsson, S., Lopez-Valladares, G., Sidstedt, M., & Lindqvist, R. (2013). Subtyping of *Listeria monocytogenes* isolates recovered from retail ready-to-eat foods, processing plants and listeriosis patients in Sweden 2010. *International Journal of Food Microbiology*, 166(1), 186–192. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2013.06.008>
- Lambertz, S. T., Nilsson, C., Brådenmark, A., Sylvén, S., Johansson, A., Jansson, L. M., & Lindblad, M. (2012). Prevalence and level of *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat foods in Sweden 2010. *International Journal of Food Microbiology*, 160(1), 24–31. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2012.09.010>
- Le Gentil, C., Sylla, Y., & Faille, C. (2010). Bacterial re-contamination of surfaces of food processing lines during cleaning in place procedures. *Journal of Food Engineering*, 96(1), 37–42. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2009.06.040>

- Leclercq, A., Clermont, D., Bizet, C., Grimont, P. A. D., Le Flèche-Matéos, A., Roche, S. M., ... Allerberger, F. (2010). *Listeria rocourtiae* sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, *60*(9), 2210–2214. <https://doi.org/10.1099/ij.s.0.017376-0>
- Leibniz Institute DSMZ-German Collection of Microorganisms and Cell Cultures, Germany, Prokaryotic Nomenclature Up-to-date [October 2017]. (<http://www.dsmz.de/bacterial-diversity/prokaryotic-nomenclature-up-to-date>).
- Leistner, L. (2000). Basic aspects of food preservation by hurdle technology. *International Journal of Food Microbiology*, *55*, 181–186.
- Leong, D., NicAogáin, K., Luque-Sastre, L., McManamon, O., Hunt, K., Alvarez-Ordóñez, A., ... Jordan, K. (2017). A 3-year multi-food study of the presence and persistence of *Listeria monocytogenes* in 54 small food businesses in Ireland. *International Journal of Food Microbiology*, *249*, 18–26. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2017.02.015>
- Little, C. L., Barrett, N. J., Grant, K., & McLauchlin, J. (2008). Microbiological safety of sandwiches from hospitals and other health care establishments in the United Kingdom with a focus on *Listeria monocytogenes* and other *Listeria* species. *Journal of Food Protection*, *71*(2), 309–318.
- Little, C. L., Sagoo, S. K., Gillespie, I. A., Grant, K., & Mclauchlin, J. (2009). Prevalence and Level of *Listeria monocytogenes* and Other *Listeria* Species in Selected Retail Ready-to-Eat Foods in the United Kingdom. *Journal of Food Protection*, *72*(9), 1869–1877. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-72.9.1869>
- Liu, D. (2006). Identification, subtyping and virulence determination of *Listeria monocytogenes*, an important foodborne pathogen. *Journal of Medical Microbiology*, *55*(6), 645–659. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.46495-0>
- Liu, D. (2008a). *Handbook of Listeria monocytogenes*. (D. Liu., Ed.), CRC Press. <https://doi.org/10.1201/9781420051414>
- Liu, D. (2008b). Preparation of *Listeria monocytogenes* specimens for molecular detection and identification. *International Journal of Food Microbiology*, *122*(3), 229–242. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2007.11.066>
- Liu, H., Lu, L., Pan, Y., Sun, X., Hwang, C. A., Zhao, Y., & Wu, V. C. H. (2015). Rapid detection and differentiation of *Listeria monocytogenes* and *Listeria* species in deli meats by a new multiplex PCR method. *Food Control*, *52*, 78–84. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2014.12.017>

- Lomonaco, S., Knabel, S. J., Dalmasso, A., Civera, T., & Bottero, M. T. (2011). Novel multiplex single nucleotide polymorphism-based method for identifying epidemic clones of *Listeria monocytogenes*. *Applied and Environmental Microbiology*, 77(17), 6290–6294. <https://doi.org/10.1128/AEM.00429-11>
- Lomonaco, S., Nucera, D., & Filippello, V. (2015). The evolution and epidemiology of *Listeria monocytogenes* in Europe and the United States. *Infection, Genetics and Evolution*, 35, 172–183. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2015.08.008>
- Lomonaco, S., Verghese, B., Gerner-Smidt, P., Tarr, C., Gladney, L., Joseph, L., ... Knabel, S. (2013). Novel Epidemic Clones of *Listeria monocytogenes*, United States, 2011. *Emerging Infectious Diseases*, 19(1), 147–150. <https://doi.org/10.3201/eid1901.121167>
- Loncarevic, S., Økland, M., Sehic, E., Norli, H. S., & Johansson, T. (2008). Validation of NMKL method No. 136 — *Listeria monocytogenes*, detection and enumeration in foods and feed. *International Journal of Food Microbiology*, 124(2), 154–163. <https://doi.org/10.1016/J.IJFOODMICRO.2008.03.032>
- López, V., Villatoro, D., Ortiz, S., López, P., Navas, J., Dávila, J. C., & Martínez-Suárez, J. V. (2008). Molecular tracking of *Listeria monocytogenes* in an Iberian pig abattoir and processing plant. *Meat Science*, 78(1–2), 130–134. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2007.05.002>
- Lourenço, A., Neves, E., & Brito, L. (2009). Susceptibility of *Listeria monocytogenes* from traditional cheese-dairies to in-use sanitizers. *Food Control*, 20(6), 585–589. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2008.08.009>
- Lukinmaa, S., Miettinen, M., Nakari, U.-M., Korkeala, H., & Siitonen, A. (2003). *Listeria monocytogenes* isolates from invasive infections: variation of sero- and genotypes during an 11-year period in Finland. *Journal of Clinical Microbiology*, 41(4), 1694–1700.
- Lundén, J. M., Autio, T. J., Sjöberg, A. M., & Korkeala, H. J. (2003). Persistent and nonpersistent *Listeria monocytogenes* contamination in meat and poultry processing plants. *Journal of Food Protection*, 66(11), 2062–2069.
- Luning, P. A., Jacxsens, L., Rovira, J., Osés, S. M., Uyttendaele, M., & Marcelis, W. J. (2011). A concurrent diagnosis of microbiological food safety output and food safety management system performance: Cases from meat processing industries. *Food Control*, 22(3–4), 555–565. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2010.10.003>
- Lytykäinen, O., Autio, T., Maijala, R., Ruutu, P., Honkanen-Buzalski, T., Miettinen, M., ... Siitonen, A. (2000). An Outbreak of *Listeria Monocytogenes* Serotype 3a Infections from Butter in

- Finland. *The Journal of Infectious Diseases*, 181(5), 1838–1841.
<https://doi.org/10.1086/315453>
- Lyytikäinen, O., Nakari, U. M., Lukinmaa, S., Kela, E., Nguyen Tran Minh, N., & Siitonen, A. (2006). Surveillance of listeriosis in Finland during 1995-2004. *Euro Surveillance : Bulletin European Sur Les Maladies Transmissibles = European Communicable Disease Bulletin*, 11(6), 82–85.
- Madden, R. H., Hutchison, M., Jordan, K., Pennone, V., Gundogdu, O., & Corcionivoschi, N. (2018). Prevalence and persistence of *Listeria monocytogenes* in premises and products of small food business operators in Northern Ireland. *Food Control*, 87, 70–78.
<https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2017.12.020>
- Magalhaes, C Mena, V Ferreira, J Silva, G Almeida, P Gibbs, and P. T. (2014). *Listeria monocytogenes*. In *Encyclopedia of Food Safety* (pp. 450–462).
- Mammaia, C., Parisi, A., Guaita, A., Aleo, A., Bonura, C., Nastasi, A., & Pontello, M. (2013). Enhanced surveillance of invasive listeriosis in the Lombardy region, Italy, in the years 2006-2010 reveals major clones and an increase in serotype 1/2a. *BMC Infectious Diseases*, 13, 152. <https://doi.org/10.1186/1471-2334-13-152>
- Martin, P., Jacquet, C., Goulet, V., Vaillant, V., De Valk, H., & PulseNet Europe Feasibility, S. (2006). Pulsed-Field Gel Electrophoresis of *Listeria monocytogenes* Strains: The PulseNet Europe Feasibility Study. *Foodborne Pathogens and Disease*, 3(3), 303–308.
- Martínez-Suárez, J. V., Ortiz, S., & López-Alonso, V. (2016). Potential impact of the resistance to quaternary ammonium disinfectants on the persistence of *Listeria monocytogenes* in food processing environments. *Frontiers in Microbiology*, 7 (MAY).
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00638>
- Mastronicolis, S. K., Diakogiannis, I., Berberi, A., Bisbiroulas, P., Soukoulis, C., & Tzia, C. (2011). Effect of cold adaptation on the survival of *Listeria monocytogenes* in ice-cream formulations during long-term frozen storage. *Annals of Microbiology*, 61(4), 931–937.
<https://doi.org/10.1007/s13213-011-0216-7>
- Matyar, F., Guzeldag, G., & Mercimek, H. A. (2010). Italian journal of food science : IJFS = Rivista italiana di scienza degli alimenti. Italian Journal of Food Science (Vol. 22). Chiriotti Editori.
- McCollum, J. T., Cronquist, A. B., Silk, B. J., Jackson, K. A., O'Connor, K. A., Cosgrove, S., ... Mahon, B. E. (2013). Multistate Outbreak of Listeriosis Associated with Cantaloupe. *New England Journal of Medicine*, 369(10), 944–953. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1215837>
- McLauchlin, J., Mitchell, R. T., Smerdon, W. J., & Jewell, K. (2004). *Listeria monocytogenes* and

- listeriosis: A review of hazard characterisation for use in microbiological risk assessment of foods. *International Journal of Food Microbiology*, 92(1), 15–33. [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(03\)00326-X](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(03)00326-X)
- McLauchlin, J., & Rees, C. E. D. (2015). *Listeria*. In *Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria* (pp. 1–29). Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd. <https://doi.org/10.1002/9781118960608.gbm00547>
- McLaughlin, H. P., Casey, P. G., Cotter, J., Gahan, C. G. M., & Hill, C. (2011). Factors affecting survival of *Listeria monocytogenes* and *Listeria innocua* in soil samples. *Archives of Microbiology*, 193(11), 775–785. <https://doi.org/10.1007/s00203-011-0716-7>
- Mead, P., Slutsker, L., Dietz, V., McCaig, L. F., Bresee, J. S., Shapiro, C., ... Tauxe, R. V. (1999). Food-Related Illness and Death in the United States. *Emerging Infectious Diseases*, 5(5), 607–625. <https://doi.org/10.3201/eid0505.990502>
- Mędrała, D., Dąbrowski, W., Czekajło-Kołodziej, U., Dackowska-Kozon, E., Koronkiewicz, A., Augustynowicz, E., & Manzano, M. (2003). Persistence of *Listeria monocytogenes* strains isolated from products in a Polish fish-processing plant over a 1-year period. *Food Microbiology*, 20(6), 715–724. [https://doi.org/10.1016/S0740-0020\(02\)00173-9](https://doi.org/10.1016/S0740-0020(02)00173-9)
- Meloni, D., Consolati, S. G., Mazza, R., Mureddu, A., Fois, F., Piras, F., & Mazzette, R. (2014). Presence and molecular characterization of the major serovars of *Listeria monocytogenes* in ten Sardinian fermented sausage processing plants. *Meat Science*, 97(4), 443–450. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2014.02.012>
- Mena, C., Almeida, G., Carneiro, L., Teixeira, P., Hogg, T., & Gibbs, P. A. (2004). Incidence of *Listeria monocytogenes* in different food products commercialized in Portugal. *Food Microbiology*, 21(2), 213–216. [https://doi.org/10.1016/S0740-0020\(03\)00057-1](https://doi.org/10.1016/S0740-0020(03)00057-1)
- Mester, P., Schoder, D., Wagner, M., & Rossmanith, P. (2014). Rapid Sample Preparation for Molecular Biological Food Analysis Based on Magnesium Chloride. *Food Analytical Methods*, 7(4), 926–934. <https://doi.org/10.1007/s12161-013-9774-6>
- Ministerio de Sanidad Servicios Sociales e Igualdad. (2015). Procedimiento de actuación ante casos positivos en líneas de producción RTE (establecimientos autorizados EEUU). Retrieved from https://www.mscbs.gob.es/ca/profesionales/saludPublica/sanidadExterior/docs/casos_positivos_RTE.pdf
- Ministerio de Agricultura Pesca y Alimentación (MAPAMA). (2017). *Informe del consumo de*

- alimentación en España. Retrieved from https://www.mapama.gob.es/es/alimentacion/temas/consumo-y-comercializacion-y-distribucion-alimentaria/informeannualdeconsumoalimentario2017_tcm30-456186.pdf
- Montville, T. J., & Matthews, K. R. (2008). *Food microbiology : an introduction*. Second Edition. ASM Press, 173-187.
- Moorman, M., Payton, P., & Weidman, M. (2010). Principles of microbiological troubleshooting in the industrial food processing environment. In J. L. (Jeffrey L. Kornacki (Ed.), *Principles of microbiological troubleshooting in the industrial food processing environment* (p. 193). Springer.
- Muhterem-Uyar, M., Dalmaso, M., Bolocan, A. S., Hernandez, M., Kapetanakou, A. E., Kuchta, T., ... Wagner, M. (2015). Environmental sampling for *Listeria monocytogenes* control in food processing facilities reveals three contamination scenarios. *Food Control*, *51*, 94–107. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2014.10.042>
- Murray, E. G. D., Webb, R. A., & Swann, M. B. R. (1926). A disease of rabbits characterised by a large mononuclear leucocytosis, caused by a hitherto undescribed bacillus *Bacterium monocytogenes* (n.sp.). *The Journal of Pathology and Bacteriology*, *29*(4), 407–439. <https://doi.org/10.1002/path.1700290409>
- Myers, K., Montoya, D., Cannon, J., Dickson, J., & Sebranek, J. (2013). The effect of high hydrostatic pressure, sodium nitrite and salt concentration on the growth of *Listeria monocytogenes* on RTE ham and turkey. *Meat Science*, *93*(2), 263–268. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2012.09.007>
- NAKAMURA, H., TAKAKURA, K.-I., SONE, Y., ITANO, Y., & NISHIKAWA, Y. (2013). Biofilm Formation and Resistance to Benzalkonium Chloride in *Listeria monocytogenes* Isolated from a Fish Processing Plant. *Journal of Food Protection*, *76*(7), 1179–1186. <https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-12-225>
- Nakari, U.-M., Rantala, L., Pihlajasaari, A., Toikkanen, S., Johansson, T., Hellsten, C., ... Rimhanen-Finne, R. (2014). Investigation of increased listeriosis revealed two fishery production plants with persistent *Listeria* contamination in Finland in 2010. *Epidemiology and Infection*, *142*(11), 2261–2269. <https://doi.org/DOI: 10.1017/S095026881300349X>
- Neves, E., Lourenço, A., Silva, A. C., Coutinho, R., & Brito, L. (2008). Pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) analysis of *Listeria monocytogenes* isolates from different sources and geographical origins and representative of the twelve serovars. *Systematic and Applied*

- Microbiology*, 31(5), 387–392. <https://doi.org/10.1016/j.syapm.2008.08.005>
- Nightingale, K. K., Windham, K., & Wiedmann, M. (2005). Evolution and Molecular Phylogeny of *Listeria monocytogenes* Isolated from Human and Animal Listeriosis Cases and Foods Evolution and Molecular Phylogeny of *Listeria monocytogenes* Isolated from Human and Animal Listeriosis Cases and Foods. *Journal of Bacteriology*, 187(16), 5537–5551. <https://doi.org/10.1128/JB.187.16.5537>
- Nogva, H. K., Rudi, K., Naterstad, K., & Lillehaug, D. (2000). Application of 5'-Nuclease PCR for Quantitative Detection of *Listeria monocytogenes* in Pure Cultures, Water, Skim Milk, and Unpasteurized Whole Milk. *Appl. Environ. Microbiol.*, 66(10), 4266–4271. <https://doi.org/10.1128/AEM.66.10.4266-4271.2000>.Updated
- NordVal. (2017). NordVal International Protocol for the validation of microbiological alternative (proprietary) methods against a reference method, (September 8th), 1–29.
- Nufer, U., Stephan, R., & Tasara, T. (2007). Growth characteristics of *Listeria monocytogenes*, *Listeria welshimeri* and *Listeria innocua* strains in broth cultures and a sliced bologna-type product at 4 and 7°C. *Food Microbiology*, 24(5), 444–451. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2006.10.004>
- O'Grady, J., Ruttledge, M., Sedanobalbas, S., Smith, T., Barry, T., & Maher, M. (2009). Rapid detection of *Listeria monocytogenes* in food using culture enrichment combined with real-time PCR. *Food Microbiology*, 26(1), 4–7. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2008.08.009>
- Olsen, S. J., Patrick, M., Hunter, S. B., Reddy, V., Kornstein, L., MacKenzie, W. R., ... Mead, P. (2005). Multistate outbreak of *Listeria monocytogenes* infection linked to delicatessen turkey meat. *Clinical Infectious Diseases: An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America*, 40(7), 962–967. <https://doi.org/10.1086/428575>
- Olszewska, M. A., Zhao, T., & Doyle, M. P. (2016). Inactivation and induction of sublethal injury of *Listeria monocytogenes* in biofilm treated with various sanitizers. *Food Control*, 70, 371–379. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2016.06.015>
- Oravcová, K., Kuchta, T., & Kaclíková, E. (2007). A novel real-time PCR-based method for the detection of *Listeria monocytogenes* in food. *Letters in Applied Microbiology*, 45(5), 568–573. <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2007.02234.x>
- Oravcová, K., Trnčíková, T., Kuchta, T., & Kaclíková, E. (2008). Limitation in the detection of *Listeria monocytogenes* in food in the presence of competing *Listeria innocua*. *Journal of Applied Microbiology*, 104(2), 429–437. <https://doi.org/10.1111/j.1365->

2672.2007.03554.x

- Orsi, R. H., Bakker, H. C. de., & Wiedmann, M. (2011). *Listeria monocytogenes* lineages: Genomics, evolution, ecology, and phenotypic characteristics. *International Journal of Medical Microbiology*, *301*(2), 79–96. <https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2010.05.002>
- Orsi, R. H., Borowsky, M. L., Lauer, P., Young, S. K., Nusbaum, C., Galagan, J. E., ... Wiedmann, M. (2008). Short-term genome evolution of *Listeria monocytogenes* in a non-controlled environment. *BMC Genomics*, *9*, 1–17. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-9-539>
- Orsi, R. H., Sun, Q., & Wiedmann, M. (2008). Genome-wide analyses reveal lineage specific contributions of positive selection and recombination to the evolution of *Listeria monocytogenes*. *BMC Evolutionary Biology*, *8*(1), 1–21. <https://doi.org/10.1186/1471-2148-8-233>
- Ortiz, S., López-Alonso, V., Rodríguez, P., & Martínez-Suárez, J. V. (2016). The connection between persistent, disinfectant-resistant *Listeria monocytogenes* strains from two geographically separate Iberian pork processing plants: Evidence from comparative genome analysis. *Applied and Environmental Microbiology*, *82*(1), 308–317. <https://doi.org/10.1128/AEM.02824-15>
- Ortiz, S., López, P., López, V., & Martínez-Suárez, J. V. (2014). Antibiotic Susceptibility in Benzalkonium Chloride-Resistant and -Susceptible *Listeria monocytogenes* Strains. *Foodborne Pathogens and Disease*, *11*(7), 517–519. <https://doi.org/10.1089/fpd.2013.1724>
- Ortiz, S., López, V., & Martínez-Suárez, J. V. (2014a). Control of *Listeria monocytogenes* contamination in an Iberian pork processing plant and selection of benzalkonium chloride-resistant strains. *Food Microbiology*, *39*, 81–88. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2013.11.007>
- Ortiz, S., López, V., & Martínez-Suárez, J. V. (2014b). The influence of subminimal inhibitory concentrations of benzalkonium chloride on biofilm formation by *Listeria monocytogenes*. *International Journal of Food Microbiology*, *189*, 106–112. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2014.08.007>
- Ortiz, S., López, V., Villatoro, D., López, P., Dávila, J. C., & Martínez-Suárez, J. V. (2010). A 3-year Surveillance of the genetic diversity and persistence of *Listeria monocytogenes* in an Iberian pig slaughterhouse and processing plant. *Food Pathogens and Disease*, *7*(10), 1177–1184. <https://doi.org/10.1089/fpd.2010.0535>
- Pan, Y., Breidt, F., & Gorski, L. (2010). Synergistic effects of sodium chloride, glucose, and

- temperature on biofilm formation by *Listeria monocytogenes* Serotype 1/2a and 4b Strains. *Applied and Environmental Microbiology*, 76(5), 1433–1441. <https://doi.org/10.1128/AEM.02185-09>
- Pan, Y., Breidt, F., & Kathariou, S. (2006). Resistance of *Listeria monocytogenes* Biofilms to Sanitizing Agents in a Simulated Food Processing Environment. *Applied and Environmental Microbiology*, 72(12), 7711–7717. <https://doi.org/10.1128/AEM.01065-06>
- Parihar, V. S., Lopez-Valladares, G., Danielsson-Tham, M.-L., Peiris, I., Helmersson, S., Unemo, M., ... Tham, W. (2008). Characterization of Human Invasive Isolates of *Listeria monocytogenes* in Sweden 1986–2007. *Foodborne Pathogens and Disease*, 5(6), 755–761. <https://doi.org/10.1089/fpd.2008.0123>
- Paul, M., Baranzoni, G. M., Albonetti, S., & Brewster, J. D. (2015). Direct, quantitative detection of *Listeria monocytogenes* in fresh raw whole milk by qPCR. *International Dairy Journal*, 41, 46–49. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2014.09.008>
- Pesavento, G., Ducci, B., Nieri, D., Comodo, N., & Lo Nostro, A. (2010). Prevalence and antibiotic susceptibility of *Listeria* spp. isolated from raw meat and retail foods. *Food Control*, 21(5), 708–713. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2009.10.012>
- Piffaretti, J. C., Kressebuch, H., Aeschbacher, M., Bille, J., Bannerman, E., Musser, J. M., ... Rocourt, J. (1989). Genetic characterization of clones of the bacterium *Listeria monocytogenes* causing epidemic disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 86(10), 3818–3822. <https://doi.org/10.1073/pnas.86.10.3818>
- Pirie, J. H. H. (1940). *Listeria*: Change of Name for a Genus Bacteria. *Nature*, 145(3668), 264–264. <https://doi.org/10.1038/145264a0>
- Pless, P., Futschik, K., & Schopf, E. (1994). Rapid Detection of Salmonellae by Means of a New Impedance-Splitting Method. *Journal of Food Protection*, 57(5), 369–376. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-57.5.369>
- Popping, B., Diaz-Amigo, C., & Hoenicke, K. (2010). *Molecular biological and immunological techniques and applications for food chemists*. Wiley.
- Portanti, O., Febo, T. Di, Luciani, M., Pompili, C., Lelli, R., & Semprini, P. (2011). Development and validation of an antigen capture ELISA based on monoclonal antibodies specific for *Listeria monocytogenes* in food. *Veterinaria Italiana Vet Ital*, 47(473).

- Prencipe, V. A., Rizzi, V., Acciari, V., Iannetti, L., Giovannini, A., Serraino, A., ... Caporale, V. (2012). *Listeria monocytogenes* prevalence, contamination levels and strains characterization throughout the Parma ham processing chain. *Food Control*, 25(1), 150–158. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2011.10.018>
- PulseNet. (2013). Standard operating procedure for pulsenet PFGE of *Listeria monocytogenes*, (April 2013), 1–13.
- Quero, G. M., Santovito, E., Visconti, A., & Fusco, V. (2014). Quantitative detection of *Listeria monocytogenes* in raw milk and soft cheeses: Culture-independent versus liquid- and solid-based culture-dependent real time PCR approaches. *LWT - Food Science and Technology*, 58(1), 11–20. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2014.03.005>
- Radhakrishnan, R., Jahne, M., Rogers, S., & Suni, I. I. (2013). Detection of *Listeria Monocytogenes* by Electrochemical Impedance Spectroscopy. *Electroanalysis*, 25(9), 2231–2237. <https://doi.org/10.1002/elan.201300140>
- Ragon, M., Wirth, T., Hollandt, F., Lavenir, R., Lecuit, M., Monnier, A. Le, & Brisse, S. (2008). A new perspective on *Listeria monocytogenes* evolution. *PLoS Pathogens*, 4(9). <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000146>
- Rantsiou, K., Alessandria, V., Urso, R., Dolci, P., & Cocolin, L. (2008). Detection, quantification and vitality of *Listeria monocytogenes* in food as determined by quantitative PCR. *International Journal of Food Microbiology*, 121(1), 99–105. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2007.11.006>
- Rasmussen, O. F., Skouboe, P., Dons, L., Rossen, L., & Olsen, J. E. (1995). *Listeria monocytogenes* exists in at least three evolutionary lines: evidence from flagellin, invasive associated protein and listeriolysin O genes. *Microbiology*, 141(9), 2053–2061. <https://doi.org/10.1099/13500872-141-9-2053>
- Ray, B., & Bhunia, A. K. (2008). *Fundamental food microbiology*. Fourth Edition. CRC Press, 288-294.
- Real Decreto 474/2014, de 13 de junio, por el que se aprueba la norma de calidad de derivados cárnicos. (2014). *Boletín Oficial del Estado*, 147, 46058-46078.
- Reglamento (CE) Nº 852/2004 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 29 de abril de 2004, relativo a la higiene de los productos alimenticios. (2004). *Diario Oficial de la Unión Europea*, L 139, 1-54.
- Reglamento (CE) Nº 853/2004 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 29 de abril de 2004,

- por el que se establecen normas específicas de higiene de los alimentos de origen animal. (2004). Diario oficial de la Unión Europea, L 139, 55-205.
- Reglamento (CE) Nº 2073/2005 de la Comisión, de 15 de noviembre de 2005, relativo a los criterios microbiológicos aplicables a los productos alimenticios. (2005). *Diario Oficial de la Unión Europea*, L 338, 1-26
- Reglamento (CE) Nº 1441/2007 de la Comisión, de 5 de diciembre de 2007, que modifica el Reglamento (CE) Nº 2073/2005 relativo a los criterios microbiológicos aplicables a los productos alimenticios. (2007). *Diario Oficial de la Unión Europea*, L 322, 12-29.
- Reglamento (UE) Nº 1169/2011 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 25 de octubre de 2011, sobre la información alimentaria facilitada al consumidor y por el que se modifican los Reglamentos (CE) Nº 1924/2006 y (CE) nº 1925/2006 del Parlamento Europeo y del Consejo, y por el que se derogan la Directiva 87/250/CEE de la Comisión, la Directiva 90/496/CEE del Consejo, la Directiva 1999/10/CE de la Comisión, la Directiva 2000/13/CE del Parlamento Europeo y del Consejo, las Directivas 2002/67/CE, y 2008/5/CE de la Comisión, y el Reglamento (CE) Nº 608/2004 de la Comisión. (2011). *Diario oficial de la Unión europea*, L 304, 16-63.
- Renier, S., Chagnot, C., Deschamps, J., Caccia, N., Szlavik, J., Joyce, S. A., ... Desvaux, M. (2014). Inactivation of the SecA2 protein export pathway in *Listeria monocytogenes* promotes cell aggregation, impacts biofilm architecture and induces biofilm formation in environmental condition. *Environmental Microbiology*, 16(4), 1176–1192. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.12257>
- Renier, S., Hébraud, M., & Desvaux, M. (2011). Molecular biology of surface colonization by *Listeria monocytogenes*: an additional facet of an opportunistic Gram-positive foodborne pathogen. *Environmental Microbiology*, 13(4), 835–850. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2010.02378.x>
- Reynolds, A. E., Harrison, M. A., Rose-Morrow, R., & Lyon, C. E. (2001). Validation of dry cured ham process for control of pathogens. *Journal of Food Science*, 66(9), 1373–1379. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2001.tb15217.x>
- Ribot, E. M., & Hise, K. B. (2016). Future challenges for tracking foodborne diseases. *EMBO Reports*, 17(11), 1499–1505. <https://doi.org/10.15252/embr.201643128>
- Ricci, A., Allende, A., Bolton, D., Chemaly, M., Davies, R., Escámez, P. S. F., ... Lindqvist, R. (2018). *Listeria monocytogenes* contamination of ready-to-eat foods and the risk for human health

- in the EU. *EFSA Journal*, 16(1). <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2018.5134>
- Rijpens, N. P., & Herman, L. M. F. (2002). Molecular methods for identification and detection of bacterial food pathogens. *Journal of AOAC International*, 85(4), 984–995. <https://doi.org/12180698>
- 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(3), 685–693. <https://doi.org/10.1099/mic.0.28503-0>
- Rocourt, J., Schrettenbrunner, A., Hof, H., Espaze, E. P. (1987). Une nouvelle espèce du genre *Listeria*: *Listeria seeligeri*. *Pathologie Biologie*, 35, 1075–1080.
- Rocourt, J., & Grimont, P. A. D. (1983). NOTES. *Internarional Journal of Systematic Bacteriology*, 33(4), 886–889.
- Rodriguez-Lazaro, D., Gonzalez-García, P., Gattuso, A., Gianfranceschi, M. V., & Hernandez, M. (2014). Reducing time in the analysis of *Listeria monocytogenes* in meat, dairy and vegetable products. *International Journal of Food Microbiology*, 184, 98–105. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2014.03.006>
- Rodríguez-Lázaro, D., & Hernández, M. (2006). Isolation Of *Listeria monocytogenes* DNA From Meat Products For Quantitative Detection By Real-Time Pcr. *Journal of Rapid Methods & Automation in Microbiology*, 14(4), 395–404. <https://doi.org/10.1111/j.1745-4581.2006.00058.x>
- Rodríguez-Lázaro, D., Jofre, A., Aymerich, T., Hugas, M., & Pla, M. (2004). Rapid Quantitative Detection of *Listeria monocytogenes* in Meat Products by Real-Time PCR. *Society*, 70(10), 6299–6301. <https://doi.org/10.1128/AEM.70.10.6299>
- Rodríguez-lázaro, D., Pla, M., Scotti, M., Monzó, J., Vázquez-boland, J. a, Rodri, D., & Monzo, J. (2005). A Novel Real-Time PCR for *Listeria monocytogenes* That Monitors Analytical Performance via an Internal Amplification Control A Novel Real-Time PCR for *Listeria monocytogenes* That Monitors Analytical Performance via an Internal Amplification Control. *Applied and Environmental Microbiology*, 71(12), 9008–9012. <https://doi.org/10.1128/AEM.71.12.9008>
- Rodríguez Marín, P. (2018). La exportación de jamón curado en España. *Distribución y Consumo*, 2(18). Retrieved from http://www.mercasa.es/files/multimedios/1528129362_La_exportacion_de_jamon_curado_en_Espana.pdf

- Rossmannith, P., Krassnig, M., Wagner, M., & Hein, I. (2006). Detection of *Listeria monocytogenes* in food using a combined enrichment/real-time PCR method targeting the prfA gene. *Research in Microbiology*, 157(8), 763–771. <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2006.03.003>
- Rossmannith, P., Mester, P., Wagner, M., & Schoder, D. (2010). Demonstration of the effective performance of a combined enrichment/real-time PCR method targeting the prfA gene of *Listeria monocytogenes* by testing fresh naturally contaminated acid curd cheese. *Letters in Applied Microbiology*, 51(4), 480–484. <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2010.02925.x>
- Rossmannith, P., & Wagner, M. (2011). The challenge to quantify *Listeria monocytogenes*- a model leading to new aspects in molecular biological food pathogen detection. *Journal of Applied Microbiology*, 110(3), 605–617. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2010.04915.x>
- Roussel, S., Leclercq, A., Santolini, J., Agbessi, A., Chenal-francisque, V., & Lailier, R. (2012). Surveillance des. *Bulletin Epidemiologique, Sante Animale et Alimentation*, 50, 51–56.
- Ruan, C., Wang, H., Yang, L., & Li, Y. (2003). Detection Of Viable *Listeria monocytogenes* In Milk Using An Electrochemical Method. *Journal of Rapid Methods & Automation in Microbiology*, 11(1), 11–22. <https://doi.org/10.1111/j.1745-4581.2003.tb00404.x>
- Ruiz-Rueda, O., Soler, M., Calvó, L., & García-Gil, J. L. (2011). Multiplex Real-time PCR for the Simultaneous Detection of *Salmonella* spp. and *Listeria monocytogenes* in Food Samples. *Food Analytical Methods*, 4(2), 131–138. <https://doi.org/10.1007/s12161-010-9163-3>
- Ryser, E. T., & Marth, E. H. (2007). *Listeria, listeriosis, and food safety*. Third Edition. CRC Press.1-869.
- Salcedo, C., Arreaza, L., Alcalá, B., de la Fuente, L., & Vázquez, J. A. (2003). Development of a multilocus sequence typing method for analysis of *Listeria monocytogenes* clones. *Journal of Clinical Microbiology*, 41(2), 757–762.
- Sauders, B. D., Overdeest, J., Fortes, E., Windham, K., Schukken, Y., Lembo, A., & Wiedmann, M. (2012). Diversity of *Listeria* species in urban and natural environments. *Applied and Environmental Microbiology*, 78(12), 4420–4433. <https://doi.org/10.1128/AEM.00282-12>
- Schmid, M. W., Ng, E. Y. W., Lampidis, R., Emmerth, M., Walcher, M., Kreft, J., ... Schleifer, K. H. (2005). Evolutionary history of the genus *Listeria* and its virulence genes. *Systematic and Applied Microbiology*, 28(1), 1–18. <https://doi.org/10.1016/j.syapm.2004.09.005>

- Schmitz-Esser, S., Gram, L., & Wagner, M. (2015). Complete Genome Sequence of the Persistent *Listeria monocytogenes* Strain R479a. *Genome Announcements*, 3(2), e00150-15. <https://doi.org/10.1128/genomeA.00150-15>
- Schvartzman, M. S., Belessi, C., Butler, F., Skandamis, P. N., & Jordan, K. N. (2011). Effect of pH and Water Activity on the Growth Limits of *Listeria monocytogenes* in a Cheese Matrix at Two Contamination Levels. *Journal of Food Protection*, 74(11), 1805–1813. <https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-11-102>
- Shabala, L., Lee, S. H., Cannesson, P., & Ross, T. (2008). Acid and NaCl limits to growth of *Listeria monocytogenes* and influence of sequence of inimical acid and NaCl levels on inactivation kinetics. *Journal of Food Protection*, 71(6), 1169–1177.
- Scotter, S. L., Langton, S., Lombard, B., Schulten, S., & Nagelkerke, N. (2001). Validation of ISO method 11290 Part 1—Detection of *Listeria monocytogenes* in foods. *International Journal of Food Microbiology*, 64(3), 295–306. [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(00\)00462-1](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(00)00462-1)
- Seeliger, H. P. R., & Höhne, K. (1979). Chapter II Serotyping of *Listeria monocytogenes* and Related Species. *Methods in Microbiology*, 13, 31–49. [https://doi.org/10.1016/S0580-9517\(08\)70372-6](https://doi.org/10.1016/S0580-9517(08)70372-6)
- Seeliger, H. P. R., Rocourt, J., Schrettenbrunner, A., Grimont, P. A. D., & Jones, D. (1984). Notes: *Listeria ivanovii* sp. nov. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 34(3), 336–337. <https://doi.org/10.1099/00207713-34-3-336>
- Shuckken, Y. H., Grohn, Y. T., & Wiedmann, M. (2003). Part VI: *Listeria monocytogenes*, epidemiology of listeriosis. In M. E. Torrence & R. E. Isaacson (Eds.), *Microbial Food Safety in Animal Agriculture: Current Topics*. (pp. 221–232). Wiley-Blackwell, Hoboken.
- Silk, B. J., McCoy, M. H., Iwamoto, M., & Griffin, P. M. (2014). Foodborne listeriosis acquired in hospitals. *Clinical Infectious Diseases*, 59(4), 532–540. <https://doi.org/10.1093/cid/ciu365>
- Simmons, C. K., & Wiedmann, M. (2017). Identification and classification of sampling sites for pathogen environmental monitoring programs for *Listeria monocytogenes*: Results from an expert elicitation. *Food Microbiology*. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2017.07.005>
- Simmons, C., Stasiewicz, M. J., Wright, E., Warchocki, S., Roof, S., Kause, J. R., ... Oliver, H. F. (2014). *Listeria monocytogenes* and *Listeria* spp. Contamination Patterns in Retail Delicatessen Establishments in Three U.S. States. *Journal of Food Protection*, 77(11), 1929–1939. <https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-14-183>
- Simões, M., Simões, L. C., & Vieira, M. J. (2010). A review of current and emergent biofilm control

- strategies. *LWT - Food Science and Technology*, 43(4), 573–583.
<https://doi.org/10.1016/j.lwt.2009.12.008>
- Simpson, C. A., Geornaras, I., Yoon, Y., Scanga, J. A., Kendall, P. A., & Sofos, J. N. (2008). Effect of inoculum preparation procedure and storage time and temperature on the fate of *Listeria monocytogenes* on inoculated salami. *Journal of Food Protection*, 71(3), 494–501.
<https://doi.org/10.4315/0362-028X-71.3.494>
- Sireli, U. T., & Gücükoglu, A. (2008). Prevalence and Antibiotic Resistance of *Listeria* Spp . Isolated from Ready-to-Eat Foods in Ankara *, 32(2), 131–135.
- Skerman, V. B. D., McGowan, V., & Sneath, P. H. A. (1980). Approved Lists of Bacterial Names. *Int.J.Syst.Bacteriol.*, 30, 225–420. <https://doi.org/10.1099/00207713-30-1-225>
- Smith, P. J., Bolton, F. J., Gayner, V. E., & Eccles, A. (1990). Improvements to a lysine medium for detection of salmonellas by electrical conductance. *Letters in Applied Microbiology*, 11(2), 84–86. <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.1990.tb01281.x>
- Soultos, N., Iossifidou, E., Tzikas, Z., Sergelidis, D., Lazou, T., Drakopoulos, G., & Konstantelis, I. (2014). Prevalence of *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat seafood marketed in Thessaloniki (Northern Greece). *Veterinary World*, 7(11), 1004–1009.
<https://doi.org/10.14202/vetworld.2014.1004-1009>
- Srey, S., Jahid, I. K., & Ha, S. Do. (2013). Biofilm formation in food industries: A food safety concern. *Food Control*, 31(2), 572–585. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2012.12.001>
- Strawn, L. K., Gröhn, Y. T., Warchocki, S., Worobo, R. W., Bihn, E. A., & Wiedmann, M. (2013). Risk factors associated with *Salmonella* and *Listeria monocytogenes* contamination of produce fields. *Applied and Environmental Microbiology*, 79(24), 7618–7627.
<https://doi.org/10.1128/AEM.02831-13>
- Su, X., Zhang, J., Shi, W., Yang, X., Li, Y., Pan, H., ... Meng, J. (2016). Molecular characterization and antimicrobial susceptibility of *Listeria monocytogenes* isolated from foods and humans. *Food Control*, 70, 96–102. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2016.04.020>
- Suh, J. H., & Knabel, S. J. (2001). Comparison of different enrichment broths and background flora for detection of heat-injured *Listeria monocytogenes* in whole milk. *Journal of Food Protection*, 64(1), 30–36.
- Swaminathan, B., & Gerner-Smidt, P. (2007). The epidemiology of human listeriosis. *Microbes and Infection*, 9(10), 1236–1243. <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2007.05.011>

- Talaro, K. (2005). *Foundations in microbiology*. Fifth Edition. New York: McGraw– Hill, 209-210.
- Talon, R., Lebert, I., Lebert, A., Leroy, S., Garriga, M., Aymerich, T., ... Lauková, A. (2007). Traditional dry fermented sausages produced in small-scale processing units in Mediterranean countries and Slovakia. 1: Microbial ecosystems of processing environments. *Meat Science*, 77(4), 570–579. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2007.05.006>
- Tezel, U., & Pavlostathis, S. G. (2015). Quaternary ammonium disinfectants: microbial adaptation, degradation and ecology. *Current Opinion in Biotechnology*, 33, 296–304. <https://doi.org/10.1016/J.COPBIO.2015.03.018>
- The Australian and New Zealand food standards system. (2014). Guidance on the application of microbiological criteria for *Listeria monocytogenes* in RTE food, 1–13. Retrieved from <http://www.foodsafety.govt.nz/policy->
- Thévenot, D., Delignette-Muller, M. L., Christieans, S., Leroy, S., Kodjo, A., & Vernozy-Rozand, C. (2006). Serological and molecular ecology of *Listeria monocytogenes* isolates collected from 13 French pork meat salting-curing plants and their products. *International Journal of Food Microbiology*, 112(2), 153–161. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2006.06.017>
- Thévenot, 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*, 102(1), 85–94. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2004.12.008>
- Tomás, D., Rodrigo, A., Hernández, M., & Ferrús, M. A. (2009). Validation of Real-Time PCR and Enzyme-Linked Fluorescent Assay-Based Methods for Detection of *Salmonella* spp. in Chicken Feces Samples. *Food Analytical Methods*, 2(3), 180–189. <https://doi.org/10.1007/s12161-009-9082-3>
- Tompkin, R. B. (2002). Control of *Listeria monocytogenes* in the food-processing environment. *Journal of Food Protection*, 65(4), 709–725. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-65.4.709>
- Trimoulinard, A., Beral, M., Henry, I., Atiana, L., Porphyre, V., Tessier, C., ... Cardinale, E. (2017). Contamination by *Salmonella* spp., *Campylobacter* spp. and *Listeria* spp. of most popular chicken- and pork-sausages sold in Reunion Island. *International Journal of Food Microbiology*, 250, 68–74. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2017.03.017>
- Uyttendaele, M., Busschaert, P., Valero, A., Geeraerd, A. H., Vermeulen, A., Jacxsens, L., ... Devlieghere, F. (2009). Prevalence and challenge tests of *Listeria monocytogenes* in Belgian

- produced and retailed mayonnaise-based deli-salads, cooked meat products and smoked fish between 2005 and 2007. *International Journal of Food Microbiology*, 133(1), 94–104. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2009.05.002>
- Välilmaa, A.-L., Tilsala-Timisjärvi, A., & Virtanen, E. (2015). Rapid detection and identification methods for *Listeria monocytogenes* in the food chain – A review. *Food Control*, 55, 103–114. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2015.02.037>
- Van Coillie, E., Werbrouck, H., Heyndrickx, M., Herman, L., & Rijpens, N. (2004). Prevalence and typing of *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat food products on the Belgian market. *Journal of Food Protection*, 67(11), 2480–2487. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15553631>
- Van der Veen, S., & Abee, T. (2011). Mixed species biofilms of *Listeria monocytogenes* and *Lactobacillus plantarum* show enhanced resistance to benzalkonium chloride and peracetic acid. *International Journal of Food Microbiology*, 144(3), 421–431. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2010.10.029>
- Vázquez-boland, J. a, Kuhn, M., Berche, P., Chakraborty, T., Domi, G., González-zorn, B., & Wehland, J. (2001). *Listeria* Pathogenesis and Molecular Virulence Determinants *Listeria* Pathogenesis and Molecular Virulence Determinants. *Clin. Microbiol. Rev.*, 14(3), 584–640. <https://doi.org/10.1128/CMR.14.3.584>
- Vera, Alejandra; González, Gerardo; Domínguez, Marlana; Bello, H. (2013). Principales factores de virulencia de *Listeria monocytogenes* y su regulación. *Revista Chilena de Infectología*, 30(4), 407–416.
- Verraes, C., Uyttendaele, M., Clinquart, A., Daube, G., Sindic, M., Berkvens, D., & Herman, L. (2015). Microbiological safety and quality aspects of the short supply chain. *British Food Journal*, 117(9), 2250–2264. <https://doi.org/10.1108/BFJ-04-2015-0122>
- Vongkamjan, K., Fuangpaiboon, J., Jirachotrapee, S., & Turner, M. P. (2015). Occurrence and diversity of *Listeria* spp. in seafood processing plant environments. *Food Control*, 50, 265–272. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2014.09.001>
- Vongkamjan, K., Fuangpaiboon, J., Turner, M. P., & Vuddhakul, V. (2016). Various Ready-to-Eat Products from Retail Stores Linked to Occurrence of Diverse *Listeria monocytogenes* and *Listeria* spp. Isolates. *Journal of Food Protection*, 79(2), 239–245. <https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-15-361>
- Vorst, K. L., Todd, E. C. D., & Ryser, E. T. (2006). Transfer of *Listeria monocytogenes* during slicing

- of turkey breast, bologna, and salami with simulated kitchen knives. *Journal of Food Protection*, 69(3), 2939–2946. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-69.12.2939>
- Wagner, M., Auer, B., Trittremmel, C., Hein, I., & Schoder, D. (2007). Survey on the *Listeria* Contamination of Ready-to-Eat Food Products and Household Environments in Vienna, Austria. *Zoonoses and Public Health*, 54(1), 16–22. <https://doi.org/10.1111/j.1863-2378.2007.00982.x>
- Ward, T. J., Ducey, T. F., Usgaard, T., Dunn, K. A., & Bielawski, J. P. (2008). Multilocus genotyping assays for single nucleotide polymorphism-based subtyping of *Listeria monocytogenes* isolates. *Applied and Environmental Microbiology*, 74(24), 7629–7642. <https://doi.org/10.1128/AEM.01127-08>
- Ward, T. J., Gorski, L., Borucki, M. K., Mandrell, R. E., Hutchins, J., & Pupedis, K. (2004). Intraspecific Phylogeny and Lineage Group Identification Based on the the prfA virulence gene cluster of *Listeria monocytogenes*. *Culture*, 186(15), 4994–5002. <https://doi.org/10.1128/JB.186.15.4994>
- Ward, T. J., Usgaard, T., & Evans, P. (2010). A targeted multilocus genotyping assay for lineage, serogroup, and epidemic clone typing of *Listeria monocytogenes*. *Applied and Environmental Microbiology*, 76(19), 6680–6684. <https://doi.org/10.1128/AEM.01008-10>
- Wawerla, M., Stolle, A., Schalch, B., & Eisgruber, H. (1999). Impedance Microbiology: Applications in Food Hygiene. *Journal of Food Protection*, 62(12), 1488–1496.
- Weller, D., Andrus, A., Wiedmann, M., & den Bakker, H. C. (2015). *Listeria booriae* sp. nov. and *Listeria newyorkensis* sp. nov., from food processing environments in the USA. *International Journal Of Systematic And Evolutionary Microbiology*, 65(Pt 1), 286–292. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.070839-0>
- Wiedmann, M., Wang, S., Post, L., & Nightingale, K. (2014). Assessment Criteria and Approaches for Rapid Detection Methods To Be Used in the Food Industry. *Journal of Food Protection*, 77(4), 670–690. <https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-13-138>
- Witte, A. K., Fister, S., Mester, P., Schoder, D., & Rossmanith, P. (2016). Evaluation of the performance of quantitative detection of the *Listeria monocytogenes* prfA locus with droplet digital PCR. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 408(27), 7583–7593. <https://doi.org/10.1007/s00216-016-9861-9>
- Wu, V. (2008). A review of microbial injury and recovery methods in food. *Food Microbiology*, 25(6), 735–744. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2008.04.011>

- Wulff, G., Gram, L., Ahrens, P., & Vogel, B. F. (2006). One Group of Genetically Similar *Listeria monocytogenes* Strains Frequently Dominates and Persists in Several Fish Slaughter- and Smokehouses. *Applied and Environmental Microbiology*, 72(6), 4313–4322. <https://doi.org/10.1128/AEM.02288-05>
- Yang, L., & Bashir, R. (2007). Electrical/electrochemical impedance for rapid detection of foodborne pathogenic bacteria. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2007.10.003>
- Yin, Y., Tan, W., Wang, G., Kong, S., Zhou, X., Zhao, D., ... Jiao, X. (2015). Geographical and longitudinal analysis of *Listeria monocytogenes* genetic diversity reveals its correlation with virulence and unique evolution. *Microbiological Research*, 175, 84–92. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2015.04.002>
- Zitz, U., Zunabovic, M., Domig, K. J., Wilrich, P.-T., & Kneifel, W. (2011). Reduced Detectability of *Listeria monocytogenes* in the Presence of *Listeria innocua*. *Journal of Food Protection*, 74(8), 1282–1287. <https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-11-045>
- Zunabovic, M., Domig, K. J., & Kneifel, W. (2011). Practical relevance of methodologies for detecting and tracing of *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat foods and manufacture environments - A review. *LWT - Food Science and Technology*, 44(2), 351–362. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2010.08.005>

Research Paper

Evaluation of a Method for Rapid Detection of *Listeria monocytogenes* in Dry-Cured Ham Based on Impedancimetry Combined with Chromogenic Agar

MIRIAN LABRADOR, MARÍA C. ROTA, CONSUELO PÉREZ, ANTONIO HERRERA, AND SUSANA BAYARRI*

Departamento de Producción Animal y Ciencia de los Alimentos, Facultad de Veterinaria, Instituto Agroalimentario de Aragón -IA2- (Universidad de Zaragoza-CITA), C/Miguel Servet 177, 50013 Zaragoza, Spain (ORCID: <http://orcid.org/0000-0001-9123-4037> [M.L.])

MS 17-380: Received 7 September 2017/Accepted 18 December 2017/Published Online 3 April 2018

ABSTRACT

The food industry is in need of rapid, reliable methodologies for the detection of *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat products, as an alternative to the International Organization of Standardization (ISO) 11290-1 reference method. The aim of this study was to evaluate impedancimetry combined with chromogenic agar culture for the detection of *L. monocytogenes* in dry-cured ham. The experimental setup consisted in assaying four strains of *L. monocytogenes* and two strains of *Listeria innocua* in pure culture. The method was evaluated according to the ISO 16140:2003 standard through a comparative study with the ISO reference method with 119 samples of dry-cured ham. Significant determination coefficients (R^2 of up to 0.99) for all strains assayed in pure culture were obtained. The comparative study results had 100% accuracy, 100% specificity, and 100% sensitivity. Impedancimetry followed by chromogenic agar culture was capable of detecting 1 CFU/25 g of food. *L. monocytogenes* was not detected in the 65 commercial samples tested. The method evaluated herein represents a promising alternative for the food industry in its efforts to control *L. monocytogenes*. Overall analysis time is shorter and the method permits a straightforward analysis of a large number of samples with reliable results.

Key words: Detection; Dry-cured ham; Impedance methodology; *Listeria monocytogenes*; Rapid measurement; RTE meat products

Listeria monocytogenes is a widespread foodborne bacterial pathogen of considerable significance for public health and the food industry. This microorganism causes listeriosis, a severe disease primarily associated with risk groups such as pregnant women, newborn infants, immunocompromised patients, and elderly individuals (16). Listeriosis is relatively rare but has a case fatality rate of up to 30%, which is the highest rate among foodborne pathogens, and is thereby one of the most frequent causes of human death due to foodborne illness (7, 29).

L. monocytogenes has a ubiquitous distribution, can grow under adverse conditions including refrigeration temperatures (2 to 4°C), a pH of 4.0 to 9.6, high salinity (up to 11.5 g kg⁻¹ NaCl), and low water activity (a_w ; 0.90 to 0.92), and can form biofilms (10, 18, 34, 40). Thus, this pathogen is able to survive and grow easily in foods and food processing environments, increasing the risk of food contamination (20). The presence of this pathogen should be monitored with particular care in ready-to-eat (RTE) meat, dairy products, vegetables, and fish products because these foods are not subjected to treatments capable of reducing *L. monocytogenes* loads prior to consumption (30). As a result,

L. monocytogenes in food products is a safety hazard that warrants attention and constant improvement in detection and tracking. Although several countries, including the United States, have adopted a zero tolerance attitude toward *L. monocytogenes* (i.e., absence of *L. monocytogenes* in a 25-g sample) in these food products, European Union (EU) legislation can be more flexible depending on the characteristics of the RTE product (14, 15).

Dry-cured ham is a commonly available RTE meat product. Spain, with its formidable gastronomic tradition, stands out as the world leader in the production of dry-cured ham and is the second place exporter of this product (11). Because of its high salt concentration (up to 15 g kg⁻¹ of dry matter) and low a_w (usually below 0.90), dry-cured ham is regarded as a shelf-stable product (46). However, this ham is also commercially distributed as a sliced RTE product. Postprocessing handling such as slicing and packaging can encourage cross-contamination and allow the spread of *L. monocytogenes* (26, 35). A series of studies have been conducted to determine the presence of this pathogen in dry-cured ham, and results have varied widely, with a prevalence of 2.3 to 24.3% (23, 31, 33).

To minimize the risk of listeriosis while encouraging exportation and providing consumers with safe products, the food industry needs to implement reliable food control

* Author for correspondence. Tel: +34 976 7610 00, Ext 4135; Fax: +34 976 7615 90-1612; E-mail: sbayarri@unizar.es.

methodologies, particularly regarding RTE products. EU legislation has thus established ISO 11290-1 (28) as the European reference method for the detection of *L. monocytogenes* in food and environment samples (14, 15). This reference method is time-consuming and labor intensive; over 7 days is required for final confirmation. Thus, other tools enabling the rapid detection of *L. monocytogenes* in food are currently needed in order to identify the source of foodborne outbreaks as quickly as possible and to attain commercial batch release within a minimum amount of time. Rapid methods should provide reliable results while saving time. A series of alternative methods are available for the detection of *L. monocytogenes* in food: immunoassays, gene amplification, and electrical methods (41, 44, 47). Among the electrical methods, impedance microbiology clearly stands out; it measures changes in the electrical impedance of a culture medium resulting from bacterial growth over time. As a result of the metabolic activity of the microorganisms in the sample, large molecules such as sugars are broken down into many smaller, electrically charged molecules, mainly ions. These ion-release processes cause changes in the ionic composition of the medium and, consequently, in its conductivity, which serves as the basis for the measurement of relative impedance changes. One of this method's outstanding advantages is that it detects only viable cells, because they are responsible for the variation in the impedance of the medium (48, 49). Other researchers have studied the development and evaluation of this methodology for detecting *L. monocytogenes* in several types of foods, such as milk and minced meat (3, 42). In these studies, a low limit of detection (1 to 9 CFU/mL) and good agreement with the reference method has been achieved for naturally contaminated samples. However, no studies have been conducted to evaluate this methodology in RTE meat products.

The main objective of this study was to evaluate impedanciometry combined with chromogenic agar culture for the detection of *L. monocytogenes* in dry-cured ham (a meat product of significant economic value) to increase the speed of analysis, simplify the methodology, and generate reliable results.

MATERIALS AND METHODS

Impedance technique setup. The assays were performed using a μ -Trac 4200 apparatus (SY-LAB Geräte GmbH, Neupurkersdorf, Austria) that provides relative impedance values. The variation in the M value (medium impedance) is the relative reduction of the medium impedance (expressed as a percentage) compared with the initial value (M_0). The time interval (hours) corresponding to a point at which the M value has exponentially increased until it has exceeded a threshold value is defined as the detection time (DT).

Bacterial strains and preparation of inoculum. Six *Listeria* strains were assayed: *L. monocytogenes* CECT 4031, *L. monocytogenes* CECT 934, *L. monocytogenes* UZ64 and UZ12 isolated from dry-cured ham, and *L. innocua* UZ63 and UZ65 isolated from meat industry surfaces. These last four strains were obtained from previous studies (23) and identified with the API *Listeria* gallery (bioMérieux, Marcy-l'Étoile, France). For each strain, an isolated colony was incubated overnight at 37°C in 10 mL of brain heart infusion (BHI) broth (Merck KGaA, Darmstadt, Germany), reaching 9 log CFU/mL. Subsequently, the broth was serial

diluted 10-fold in 0.1 g L⁻¹ peptone water to obtain 2, 1, and 0 log CFU/mL. The total level of bacteria in each suspension was determined on BHI agar (BHIA) plates (24 h at 37°C) to confirm the level of the inoculum.

Preliminary assay of the impedance technique with pure culture. Three inoculation levels of *Listeria* strains were assayed: 0, 1, and 2 log CFU per sample. One milliliter of the inoculum was added to 9 mL of *Listeria*-selective BiMedia 401A base with a *Listeria*-selective 401A additive (SY-LAB Geräte GmbH) for measuring specific cells with two electrodes (SY-LAB Geräte GmbH). The assays were performed with a μ -Trac 4200 at 37°C for a maximum of 40 h. To avoid background noise, we selected a threshold value of 6%. Results were considered positive when a typical impedance curve reaching the selected threshold could be observed. A sterile medium without inoculation was used as a negative control in each assay, and the assays were performed in duplicate on 3 days. The calibration curve for each strain was obtained by plotting the DT (hours) against the plate count (log CFU per milliliter) from the various assays.

To evaluate *Listeria* strain behavior, we estimated the generation time, i.e., the time interval required for the cell population to double, by averaging the difference in DT of consecutive dilutions and dividing the product by log₂ of the dilution factor (approximately 3.322) (5).

Evaluation of impedanciometry with chromogenic agar culture of a food matrix. The present study was performed following the ISO 16140:2003 standard (27). Dry-cured ham samples artificially contaminated with *L. monocytogenes* (36 samples) and naturally contaminated samples (65 samples) were analyzed in parallel via impedanciometry followed by chromogenic agar culture and the reference method. The results obtained for the same sample analyzed with both methods were compared to calculate the relative accuracy (AC), specificity (SP), and sensitivity (SE) of the alternative method.

Bacterial strains and preparation of stressed inoculum. The strains assayed were *L. monocytogenes* UZ64, *L. monocytogenes* UZ12, and *L. innocua* UZ63. An isolated colony was incubated overnight at 37°C in BHI broth, for a final inoculum level of 9 log CFU/mL. Serial 10-fold dilutions were prepared in 0.1 g L⁻¹ peptone water. To stress the microorganisms and simulate natural contamination, the dilutions containing 1 log CFU/mL were subjected to two sets of conditions: condition set A was pH 5.5 and 4 g L⁻¹ NaCl maintained at 4°C for 96 h, and condition set B was pH 6.5 and 4 g L⁻¹ NaCl maintained at 4°C for 96 h. The pH of the 0.1 g L⁻¹ peptone water was modified with a 0.01 M citric acid solution (Panreac Química S.L., Barcelona, Spain), and the NaCl concentration was increased to 4 g L⁻¹ by adding NaCl (Panreac Química S.L.) under aseptic conditions. Parallel to the use of the suspension as an inoculum, the total bacterial level in the inoculum was determined on BHIA plates (24 h at 37°C).

Dry-cured ham samples. The food matrix selected for this study was sliced dry-cured ham that had been cured for 7 months and then vacuum packed. The reference method was performed in parallel to the alternative method (Fig. 1).

A total of 119 25-g samples were analyzed with both methods for detection of *L. monocytogenes*. The sample distribution is shown in Table 1. All samples used for artificial contamination were previously analyzed with the reference method to ensure the absence of *L. monocytogenes*. In each assay, one negative control was used.

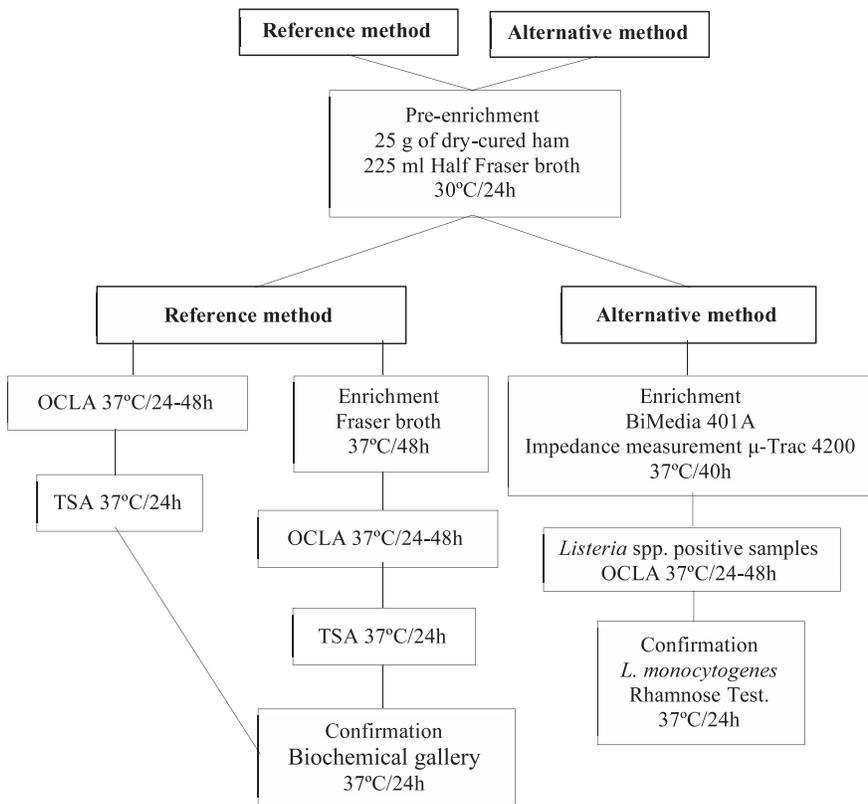


FIGURE 1. Flow diagram of the impedancimetry combined with chromogenic agar culture (alternative method) and the reference method for the detection of *L. monocytogenes* in dry-cured ham samples. OCLA, Oxoid chromogenic *Listeria* agar; TSA, tryptone soya agar.

For the experiments with artificial contamination, 36 samples (25 g) of dry-cured ham were spiked with 100 µL of a stressed dilution of 1 log CFU/mL *Listeria*. The level of bacteria in each suspension was determined on BHIA plates (24 h at 37°C) to confirm the inoculum level, and the final level was -1.40 to -1.10 log CFU/g (1 to 2 CFU/25 g). The samples were analyzed immediately after inoculation.

For experiments using naturally contaminated samples, 65 commercial samples (25 g) of dry-cured ham were analyzed. The commercial samples were purchased from the same production plant.

Application of impedancimetry and chromogenic agar culture for detection of *L. monocytogenes* in dry-cured ham samples. Twenty-five grams of spiked or commercial sample was homogenized with 225 mL of half-Fraser broth (Oxoid, Basing-

stoke, England) for 2 min at 250 rpm using a Stomacher 400 Circulator (Seward, Worthing, England) and incubated at 30°C for 24 h, and then 1 mL of this preenrichment culture was transferred into 9 mL of BiMedia 401A medium supplemented with a vial of PALCAM supplement (Oxoid). Impedance was measured at 37°C for 40 h with the µ-Trac 4200. For this evaluation, the threshold for the *M* value was 6%. The samples were analyzed in sextuplicate.

When the threshold value was reached, samples were subjected to further identification using Oxoid chromogenic *Listeria* agar (OCLA; Oxoid). The samples were plated in duplicate and incubated at 37°C for 24 to 48 h. Characteristic *L. monocytogenes* and *Listeria ivanovii* colonies on OCLA are blue-green and round and surrounded by an opaque halo. Other species of *Listeria* in this medium are blue-green and round but do not have an opaque halo. The presumptive *L. monocytogenes* colonies were confirmed by use of the rhamnose test (Bio-Rad, Marnes-La-Coquette, France).

Application of the reference method for detection of *L. monocytogenes* in dry-cured ham samples. The samples (25 g)

were analyzed according to the ISO 11290-1 standard (28). The method consisted of a double enrichment, using half-Fraser and Fraser selective broths. After preenrichment, which was identical to that used for the alternative method described above, 0.1 mL of the preenrichment culture was inoculated into 10 mL of Fraser broth and incubated at 37°C for 48 h. Cultures obtained in half-Fraser and Fraser broths were plated on OCLA in duplicate and incubated at 37°C for 24 to 48 h. The presumptive *L. monocytogenes* colonies were subcultured on tryptone soya agar (Oxoid) and biochemically confirmed using the API *Listeria* gallery.

Statistical analysis. Statistical analysis of the DT obtained with the µ-Trac 4200 was performed using SPSS 22.0.0 software (SPSS, Inc., IBM, Armonk, NY).

TABLE 1. Distribution of dry-cured ham samples used for the evaluation of impedancimetry combined with chromogenic agar culture to detect *Listeria* strains

Type of sample ^a	No. of samples
Commercial	65
Inoculated with <i>L. monocytogenes</i> UZ64, A conditions	6
Inoculated with <i>L. monocytogenes</i> UZ64, B conditions	6
Inoculated with <i>L. monocytogenes</i> UZ12, A conditions	6
Inoculated with <i>L. monocytogenes</i> UZ12, B conditions	6
Inoculated with <i>L. innocua</i> UZ63, A conditions	6
Inoculated with <i>L. innocua</i> UZ63, B conditions	6
Negative control	18
Total	119

^a Previous stress conditions of the inoculum: A, pH 5.5, 4 g L⁻¹ NaCl, and 96 h at 4°C; B, pH 6.5, 4 g L⁻¹ NaCl, and 96 h at 4°C.

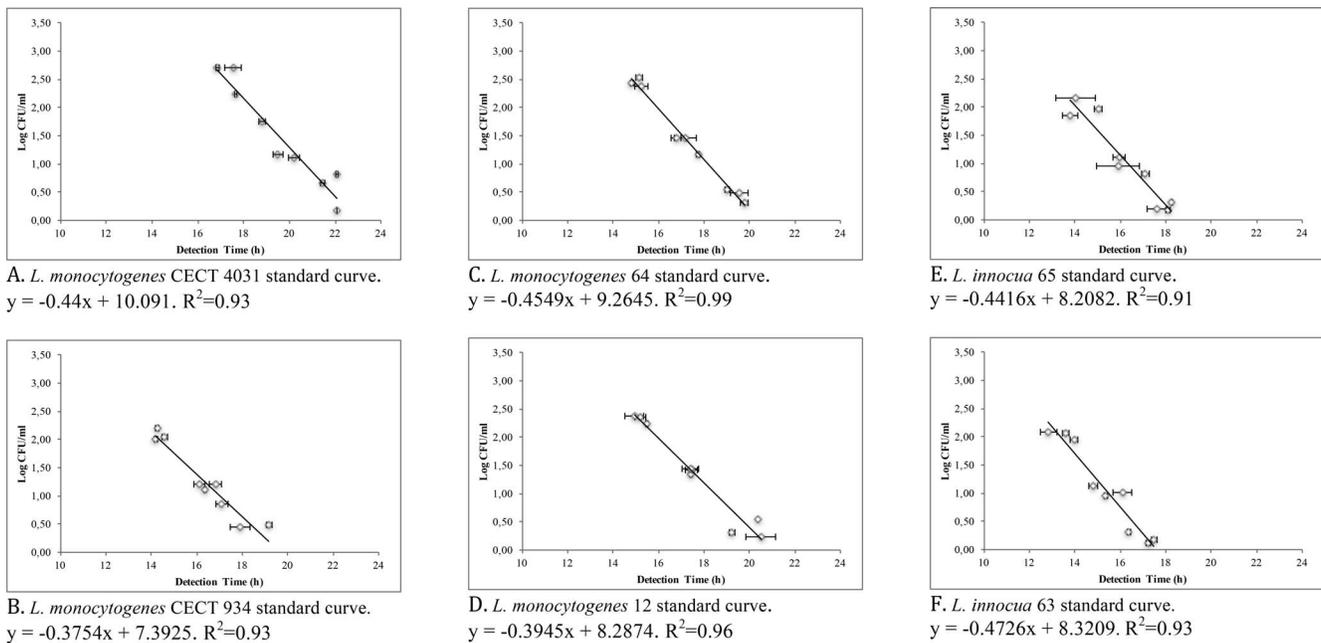


FIGURE 2. Impedance standard curves for pure broth culture of *Listeria* strains assayed. The mean detection time is shown (standard deviation as whiskers) of two replicates for each point and compared with the bacterial level (log CFU per milliliter). The coefficient of determination (R^2) and the linear regression equation for each strain (A through F) is shown under each graph.

Relative AC, SP, and SE of the alternative method. The results of the analysis of the dry-cured ham samples via both methods were used to calculate the relative AC, SP, and SE of the alternative method according to ISO 16140:2003 (27):

$$\%AC = [(PA + NA)/N] \times 100$$

where N is the total number of results by the reference method, PA is positive agreement, and NA is negative agreement;

$$\%SP = (NA/N-) \times 100$$

where $N-$ is the total number of negative results by the reference method and NA is negative agreement; and

$$\%SE = (PA/N+) \times 100$$

where $N+$ is the total number of positive results by the reference method and PA is positive agreement.

Accordance and precision of the alternative method. Accordance (repeatability of qualitative data) was calculated as the percentile likelihood of finding the same result (both positive or both negative) from two identical test materials analyzed in the same laboratory. Precision was evaluated by calculating the relative intraday and interday standard deviation of the DT of the analyzed samples. For both parameters, the assays were carried out using the impedancimetry combined with chromogenic agar culture of artificially contaminated samples analyzed in sextuplicate on three different days ($n = 18$). These results were obtained using Excel software, version 14.2.0 (Microsoft, Redmond, WA).

RESULTS AND DISCUSSION

Determination of calibration curves and generation times. Calibration curves obtained for each strain in pure culture are shown in Figure 2. Interpolation in the calibration curves revealed that DT increased by 2.37 ± 0.93 h when the initial concentration decreased by 1 log CFU/mL for all

strains assayed; the determination coefficients (R^2) were from 0.91 to 0.99, with the highest value for *L. monocytogenes* UZ64. All curves fitted a lineal model and were considered satisfactory. Dupont et al. (13) constructed calibration curves using the impedance method and the most-probable-number technique for enumeration of *Escherichia coli* in live marine bivalve mollusks, with R^2 values of 0.81 to 0.90 depending on the medium assayed. Yang et al. (50) obtained a higher R^2 value (0.98), similar to those in our results, detecting one viable cell of *Salmonella* Typhimurium in pure culture with the impedance method. The composition of the medium and the target microorganism are factors that can exert considerable influence on the impedance measurement because these factors are related to DT and the method SE. When the experiment is not correctly designed, the microorganisms can be unable to grow and thus would not be detected. Thus, to obtain optimal results, the composition of the medium must be adapted to each target microorganism.

The DTs obtained for each strain assayed are shown in Figure 3. A moderate variability in growth behavior was observed within each strain. For 2, 1, and 0 log CFU/mL, *L. monocytogenes* CECT 4031 had the longest DTs (17.34 ± 0.43 , 19.50 ± 0.70 , and 21.87 ± 0.35 h, respectively) with up to 2 h difference among the *L. monocytogenes* strains. Similar to our results, other researchers have found moderate variability in growth among *Listeria* strains (24, 37). Despite this variability in DT, *L. monocytogenes* was detected across all assays in a maximum time of 22.07 ± 0.03 h.

The impedance technique had a low detection limit (0 log CFU/mL) in pure culture. Generation time differed among the tested strains. *L. innocua* UZ65 had the shortest generation time (32.12 ± 2.76 min) followed by *L. monocytogenes* CECT 934 (33.47 ± 7.95 min), *L. innocua* UZ63 ($38.56 \pm$

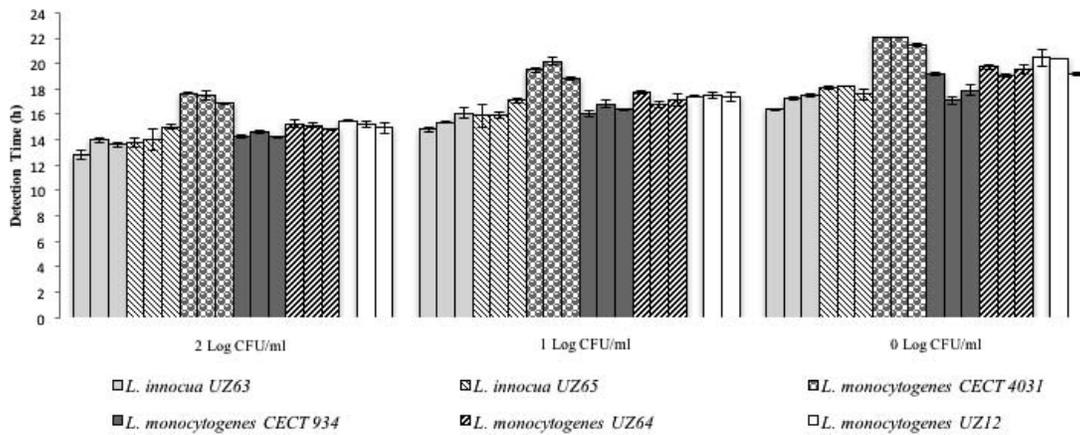


FIGURE 3. Detection times obtained with μ -Trac 4200 impedanciometry for an initial level of 2, 1, and 0 log CFU/mL *Listeria* strains assayed in pure culture. Each bar indicates the mean and standard deviation of two replicates for each strain.

0.64 min), *L. monocytogenes* UZ64 (38.91 ± 3.39 min), *L. monocytogenes* CECT 4031 (40.76 ± 0.88 min), and *L. monocytogenes* UZ12 (43.48 ± 4.21 min). These generation times cannot explain the differences between the obtained DTs, which may be associated with the different lag-phase durations of each strain. Carvalho et al. (8) observed different generation times in strains of *L. innocua* (124 to 167 min) and *L. monocytogenes* (119 to 130 min) that were higher than those obtained in the present study, thereby indicating a wide variety in the behavior of these strains.

Effect of stress conditions on the DT of *L. monocytogenes* in dry-cured ham samples. The DTs obtained for each strain are listed in Table 2, expressed as 95% confidence intervals. The DT obtained in the food matrix was affected by the microorganism's previous stress conditions. Significant differences in DTs of strains were observed under conditions A and B ($P \leq 0.05$) as determined with the μ -Trac 4200, but this finding had no influence on the final result, i.e., the presence or absence of the *Listeria* strain. Thus, for *L. monocytogenes* UZ64 and UZ12 previously subjected to A conditions, the DTs were approximately 3 h longer than those obtained under B conditions. The overlap of the confidence intervals for *L. innocua* UZ63 indicates that the DTs under the A and B conditions may not be different for this strain.

TABLE 2. Effect of previous stress conditions of inoculum on the detection time (DT) obtained by μ -Trac 4200 impedanciometry in spiked samples of dry-cured ham

Strain	Conditions ^a	DT
		(95% confidence interval, h)
<i>L. monocytogenes</i> UZ64	A	21.28–22.73
	B	18.60–19.69
<i>L. monocytogenes</i> UZ12	A	28.41–30.44
	B	24.04–25.27
<i>L. innocua</i> UZ63	A	27.56–30.10
	B	30.50–32.59

^a Previous stress conditions of the inoculum: A, pH 5.5, 4 g L⁻¹ NaCl, and 96 h at 4°C; B, pH 6.5, 4 g L⁻¹ NaCl, and 96 h at 4°C.

L. monocytogenes UZ64 had shorter DTs than did *L. monocytogenes* UZ12 ($P \leq 0.05$) under both types of stress conditions, and the difference was greater under A conditions (5.7 versus 4.4 h). This finding could be due to improved adaptation to previous stress conditions and/or to the food matrix used with the *L. monocytogenes* UZ64 strain; this strain had a short lag phase, which was reached before the exponential phase. The effects of stress conditions such as unfavorable pH and low a_w could lengthen the lag phase because bacteria need more time to adapt to new conditions, thereby affecting the DT (19). McKinney et al. (32) observed that mild stress conditions could result in adaptation to stress, the development of resistance, or tolerance to higher levels of that stress or unrelated stresses. However, in related studies on the survival of injured *L. monocytogenes* cells, the pathogen was able to form viable but nonculturable cells under extreme stress conditions (1, 4, 25). This ability might make the pathogen nondetectable by culture methods. However, impedanciometry followed by chromogenic agar culture allowed detection of the *L. monocytogenes* strains regardless of stress conditions prior to inoculation, with DTs of 17.6 to 32.6 h. Preenrichment culture in half-Fraser broth and enrichment and detection using BiMedia 401A and the μ -Trac 4200 allowed complete recovery of the pathogen. This finding is important for avoiding false-negative results, thereby demonstrating that the alternative method can be a useful tool for controlling *L. monocytogenes* in the food industry.

Relative AC, SP, and SE of the impedanciometry combined with chromogenic agar culture. Table 3 shows the results obtained for the 119 samples analyzed with both the reference and alternative methodologies. Compared with the reference method, impedance (combined with OCLA culture) had the highest AC, SP, and SE (100% for all), i.e., no false-positive or -negative results were obtained. Despite having been subjected to various previous stress conditions, *L. monocytogenes* was detected in all contaminated samples. The alternative method detection limit was -1.40 to -1.10 log CFU/g (1 to 2 CFU/25 g), confirming the suitability of

TABLE 3. Comparison of alternative method (impedanciometry combined with chromogenic agar culture) with the reference method for *Listeria* detection in dry-cured ham spiked with target strains ($n = 24$) and nontarget strains ($n = 12$) and in nonspiked commercial samples ($n = 65$)^a

Response	Reference method positive	Reference method negative
Alternative method positive	PA, 24 samples	PD, 0 samples
Alternative method negative	ND, 0 samples	NA, 95 samples

^a PA, positive agreement; PD, positive deviation; ND, negative deviation; NA, negative agreement.

this method for the detection of this pathogen in dry-cured ham samples.

A series of alternative methodologies, such as immunoassays, fluorescence in situ hybridization, and real-time PCR assays, for the rapid detection of *L. monocytogenes* in food have been developed, evaluated, and validated with the goal of obtaining reliable results, improved throughput, the ability to handle multiple samples, and work automation. However, the existing differences among methodological approaches and the effect of the food matrix analyzed make it difficult to compare results across those studies. Ruan et al. (42) developed a new method for the detection of viable *L. monocytogenes* in milk using an electrochemical procedure. They achieved a low detection limit (0 to 0.3 log CFU/mL) and a high concordance with the reference method in milk samples. The DT obtained for an initial level of 0 log CFU/mL was 17 h. One of the attractive advantages of the impedance method is that it allows growth-based detection of bacteria, permitting differentiation between dead and live cells. The ability to differentiate between dead and live cells is important because it could significantly improve food safety and security and could be useful in the health care sector. Some real-time PCR methods have high AC, SP, and SE values (>80%) (12, 21) and low detection limits. However, real-time PCR does not allow differentiation between dead and live cells without treating the cells before the DNA extraction step, thus making it possible to obtain false-positive results through amplification of the DNA of dead cells. To resolve this problem, researchers have applied a series of innovations such as dyes (e.g., propidium monoazide or ethidium monoazide bromide) that penetrate into cells with compromised membranes, thus eliminating the amplification of DNA from dead cells (38, 43, 51). Pan and Breidt (38) observed that propidium monoazide delivers better results than ethidium monoazide because the latter dye can penetrate viable cell membranes and covalently link DNA, thereby resulting in PCR inhibition and underestimation of counts. Capita et al. (6) compared a culture method using modified Oxford agar and PALCAM and an immunoassay method for the detection of *Listeria* spp., using a number of samples similar to that in our assays. The immunoassay method efficiency, SP, and SE were 92.5, 80.0, and 94.3%, respectively, because some false-positive and false-negative results were obtained. The detection limit was influenced by the antibody and the immunological assay

TABLE 4. Relative standard deviation (RSD) of the detection time obtained by μ -Trac 4200 impedanciometry in spiked samples of dry-cured ham^a

Strain	RSD intraday (%)		RSD interday (%)	
	A conditions	B conditions	A conditions	B conditions
<i>L. monocytogenes</i> UZ64	3.2	5.4	6.2	5.6
<i>L. monocytogenes</i> UZ12	6.1	5.1	6.9	5.2
<i>L. innocua</i> UZ63	3.7	0.8	5.7	6.5

^a RSD was calculated from means of the coefficient between the standard deviation and the mean of the samples. Previous stress conditions of the inoculum: A, pH 5.5, 4 g L⁻¹ NaCl, and 96 h at 4°C; B, pH 6.5, 4 g L⁻¹ NaCl, and 96 h at 4°C.

(3 to 7 log CFU/mL). Cross-reactions also can decrease the method SP (47).

Accordance and precision of the impedanciometry combined with chromogenic agar culture. Both methods had 100% accordance for positive and negative samples; thus, the alternative method offers excellent repeatability for qualitative data. Scotter et al. (45), using *L. monocytogenes* levels similar to those in our study, obtained 76% accordance with the reference method for detection of *L. monocytogenes* in meat, cheese, and reference materials, although an accordance of only 48.4% was achieved for egg powder.

The alternative method precision as determined based on the relative standard deviation (RSD) intraday ($n = 6$) and interday ($n = 18$) differed depending on the pH and the strain assayed (Table 4). The limit of acceptance of the RSD was 10 to 15% (17). Values obtained in this study were lower than 10% in all cases, indicating that the alternative method is adequately repeatable. Similar to the present study, the precision of impedance measurement has been evaluated for the detection of *E. coli* O157:H7, with an acceptable RSD (<7%) (2).

Detection of *L. monocytogenes* in dry-cured ham samples. In the present study, *L. monocytogenes* was not detected in any of the 65 commercial samples analyzed. However, other species of *Listeria* were detected in nine samples with the μ -Trac 4200 and confirmed by OCLA culture. The DTs in these samples were 22.21 ± 0.01 to 37.70 ± 0.13 h. All samples came from one supplier, so the results may not be representative of the pathogen's general occurrence in the dry-cured ham industry as a whole. Gómez et al. (23) used the reference method and obtained a high *L. monocytogenes* prevalence (24.3%) in 37 samples of sliced dry ham from various Spanish markets. In contrast, Mena et al. (33) found a 2.3% prevalence of *L. monocytogenes* in 44 samples of the same meat product analyzed by enzyme-linked immunosorbent assay and confirmed by the standard technique, and López et al. (31) found a 10% prevalence in Iberian dry-cured ham. In related products such as Parma

ham, the *L. monocytogenes* prevalence was similar, 2 to 4% (22, 39). Although the incidence of this pathogen is usually low, various researchers have determined that the prevalence of *L. monocytogenes* in the meat industry and in RTE meat products is variable and depends on hygienic conditions and equipment design (22, 31, 39). Thus, the main source of *L. monocytogenes* in food is recontamination before further processing (e.g., cutting, slicing, mincing, or packaging) (9, 36). Therefore, producers in the food industry must adopt correct hygiene procedures, including cleaning and disinfection, to control this pathogen.

In the present study, excellent agreement was observed between results from the impedance measurement with chromogenic agar culture and those from the reference method. For all samples containing *L. monocytogenes*, a confirmed positive result was obtained within 5 days in combination with OCLA culture, which enabled a final decision 4 days earlier than with the reference method. Future studies could be conducted to evaluate the effect of competing organisms or a mixed culture of *Listeria* spp. on the detection of *L. monocytogenes* and the ability of various identification systems to achieve useful results in even less time.

The major advantage of this alternative method is the reduced time required to obtain a negative *Listeria* result; only 2.5 days were necessary. Ease of use and the possibility of analyzing 21 samples simultaneously were other notable features. Thus, this methodology will be attractive for use in food industries with a low incidence of *Listeria* spp. in their RTE products, thereby allowing the rapid release of those products to the market.

In summary, the impedance measurement technique with chromogenic agar culture evaluated in the present study is thoroughly suitable for the detection of *L. monocytogenes* in dry-cured ham and could be useful for controlling this pathogen within the framework of the food industry's hazard analysis critical control point programs.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was financed by Spanish MINECO/FEDER (project INNPACTO IPT-2012-0189-060000). The authors are grateful for financial support from Gobierno de Aragón/FEDER (Grupo A01) and from Grupo Jorge, S.L. M. Labrador was supported by grant C091/2014 from Gobierno de Aragón/FSE.

REFERENCES

- Ayrapetyan, M., and J. D. Oliver. 2016. The viable but non-culturable state and its relevance in food safety. *Curr. Opin. Food Sci.* 8:127–133.
- Barreiros dos Santos, M., J. P. Aguil, B. Prieto-Simón, C. Sporer, V. Teixeira, and J. Samitier. 2013. Highly sensitive detection of pathogen *Escherichia coli* O157:H7 by electrochemical impedance spectroscopy. *Biosens. Bioelectron.* 45:174–180.
- Baumgart, J., S. Sieker, and B. Vogelsang. 1994. *Listeria monocytogenes* in Hackfleisch: Nachweis mit der Impedanz-Methode und einem neuen Selektivmedium. *Fleischwirtschaft* 74:647–648.
- Besnard, V., M. Federighi, and J. M. Cappelletti. 2000. Evidence of viable but non-culturable state in *Listeria monocytogenes* by direct viable count and CTC-DAPI double staining. *Food Microbiol.* 17:697–704.
- Capell, C. J., R. M. Kirby, and M. O. Moss. 1995. A method and medium for the electrical detection of *Listeria* spp. from food. *Int. J. Food Microbiol.* 25:169–177.
- Capita, R., C. Alonso-Calleja, B. Moreno, and M. C. García-Fernández. 2001. Occurrence of *Listeria* species in retail poultry meat and comparison of a cultural/immunoassay for their detection. *Int. J. Food Microbiol.* 65:75–82.
- Cardoen, S., X. Van Huffel, D. Berkvens, S. Quoilin, G. Ducoffre, C. Saegerman, N. Speybroeck, H. Imberechts, L. Herman, R. Ducatelle, and K. Dierick. 2009. Evidence-based semiquantitative methodology for prioritization of foodborne zoonoses. *Foodborne Pathog. Dis.* 6:1083–1096.
- Carvalho, A., C. Eusébio, J. Silva, P. Gibbs, and P. Teixeira. 2010. Influence of *Listeria innocua* on the growth of *Listeria monocytogenes*. *Food Control* 21:1492–1496.
- Chaitiemwong, N., W. C. Hazeleger, R. R. Beumer, and M. H. Zwietering. 2014. Quantification of transfer of *Listeria monocytogenes* between cooked ham and slicing machine surfaces. *Food Control* 44:177–184.
- Cotter, P. D., and C. Hill. 2003. Surviving the acid test: responses of gram-positive bacteria to low pH. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 67:429–453.
- Cruz, J. 2015. Informe sobre el sector del Jamón Curado en 2014. *Eurocarne* 237:41–52.
- Dalmasso, M., A. S. Bolocan, M. Hernandez, A. E. Kapetanidou, T. Kuchta, S. G. Manios, B. Melero, J. Minarovičová, M. Muhterem, A. I. Nicolau, J. Rovira, P. N. Skandamis, B. Stessl, M. Wagner, K. Jordan, and D. Rodríguez-Lázaro. 2014. Comparison of polymerase chain reaction methods and plating for analysis of enriched cultures of *Listeria monocytogenes* when using the ISO11290-1 method. *J. Microbiol. Methods* 98:8–14.
- Dupont, J., F. Dumont, C. Menanteau, and M. Pommepuy. 2004. Calibration of the impedance method for rapid quantitative estimation of *Escherichia coli* in live marine bivalve molluscs. *J. Appl. Microbiol.* 96:894–902.
- European Commission. 2005. Commission Regulation (EC) No 2073/2005 on microbiological criteria for foodstuffs. *Off. J. Eur. Union. L* 338:1–26.
- European Commission. 2007. Commission Regulation (EC) No 1441/2007 amending Regulation (EC) No 2073/2005 on microbiological criteria for foodstuffs. *Off. J. Eur. Union. L* 322:12–29.
- European Food Safety Authority. 2012. Scientific Opinion on a review on the European Union Summary Reports on trends and sources zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2009 and 2010—specifically for the data on *Salmonella*, *Campylobacter*, verotoxigenic *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes* and food-borne outbreaks. *EFSA J.* 10:2726.
- European Pharmacopoeia. 2015. Alternative methods for control of microbiological quality. European pharmacopoeia, chap. 5.1.6, revised. *Phareuropa* 27:1:8.
- Faleiro, M. L., P. W. Andrew and D. Power. 2003. Stress response of *Listeria monocytogenes* isolated from cheese and other foods. *Int. J. Food Microbiol.* 84:207–216.
- Francois, K., F. Devlieghere, A. R. Standaert, A. H. Geeraerd, J. F. Van Impe, and J. Debever. 2006. Effect of environmental parameters (temperature, pH and a_w) on the individual cell lag phase and generation time of *Listeria monocytogenes*. *Int. J. Food Microbiol.* 108:326–335.
- Gandhi, M., and M. Chikindas. 2007. *Listeria*: a foodborne pathogen who knows how to survive. *Int. J. Food Microbiol.* 113:1–15.
- Gianfranceschi, M. V., D. Rodríguez-Lázaro, M. Hernández, P. González-García, D. Comin, A. Gattuso, E. Delibato, M. Sonnessa, F. Pasquali, V. Prencipe, Z. Sreter-Lancz, M. J. Saiz-Abajo, J. Pérez-De-Juan, J. Butróhn, L. Kozačinski, D. Horvatek, N. Zdolec, G. S. Johannessen, D. Jakočiūnė, J. E. Olsen, P. D. De Santis, S. Lovari, B. Bertasi, E. Pavoni, A. Pausco, A. De Cesare, G. Manfreda, and D. De Medici. 2014. European validation of a real-time PCR-based method for detection of *Listeria monocytogenes* in soft cheese. *Int. J. Food Microbiol.* 184:128–133.

22. Giovannini, A., G. Migliorati, V. Prencipe, D. Calderone, C. Zuccolo, and P. Cozzolino. 2007. Risk assessment for listeriosis in consumers of Parma and San Daniele hams. *Food Control* 18:789–799.
23. Gómez, D., L. P. Iguácel, M. C. Rota, J. J. Carramiñana, A. Ariño, and J. Yangüela. 2015. Occurrence of *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat meat products and meat processing plants in Spain. *Food* 4:271–282.
24. Guillier, L., and J. C. Augustin. 2006. Modelling the individual cell lag time distributions of *Listeria monocytogenes* as a function of the physiological state and the growth conditions. *Int. J. Food Microbiol.* 111:241–251.
25. Gurreesch, A., W. Gerner, C. Pin, M. Wagner, and I. Hein. 2016. Evidence of metabolically active but non-culturable *Listeria monocytogenes* in long-term growth at 10°C. *Res. Microbiol.* 167:334–343.
26. Hoelzer, K., R. Pouillot, D. Gallagher, M. B. Silverman, J. Kause, and S. Dennis. 2012. Estimation of *Listeria monocytogenes* transfer coefficients and efficacy of bacterial removal through cleaning and sanitation. *Int. J. Food Microbiol.* 157:267–277.
27. International Organization for Standardization. 2003. Microbiology of food and animal feeding stuffs—protocol for the validation of alternative methods. EN ISO 16140:2003. International Organization for Standardization, Geneva.
28. International Organization for Standardization. 2004. Microbiology of food and animal feeding stuffs—horizontal method for the detection and enumeration of *Listeria monocytogenes*. Part 1. Detection method. EN ISO 11290-1:1996/A1:2004. International Organization for Standardization, Geneva.
29. Lecuit, M., and A. Leclercq. 2012. Rapport annuel d'activité du Centre National de Référence des *Listeria* e Année 2011. Institut Pasteur, Paris. Available at: <http://www.pasteur.fr/ip/resource/filecenter/document/01s-00004j-03q/ra-cnr-listeria-2011.pdf>. Accessed 7 March 2014.
30. Lianou, A., and J. N. Sofos. 2007. A review of the incidence and transmission of *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat products in retail and food service environments. *J. Food Prot.* 70:2172–2198.
31. López, V., D. Villatoro, S. Ortiz, P. López, J. Navas, J. C. Dálvila, and J. V. Martínez-Suárez. 2008. Molecular tracking of *Listeria monocytogenes* in an Iberian pig abattoir and processing plant. *Meat Sci.* 78:130–134.
32. McKinney, J. M., R. C. Williams, G. D. Boardman, J. D. Eifert, and S. S. Sumner. 2009. Effect of acid stress, antibiotic resistance, and heat shock on the resistance of *Listeria monocytogenes* to UV light when suspended in distilled water and fresh brine. *J. Food Prot.* 72:1634–1640.
33. Mena, C., G. Almeida, C. Carneiro, P. Teixeira, T. Hogg, and P. A. Gibbs. 2004. Incidence of *Listeria monocytogenes* in different food products commercialized in Portugal. *Food Microbiol.* 21:213–216.
34. Midelet, G., and B. Carpentier. 2002. Transfer of microorganisms, including *Listeria monocytogenes*, from various materials to beef. *Appl. Environ. Microbiol.* 68:4015–4024.
35. Muhterem-Uyar, M., M. Dalmaso, A. S. Bolocan, M. Hernández, A. E. Kapetanakou, T. Kuchta, S. G. Manios, B. Melero, J. Minarovičová, A. I. Nicolau, J. Rovira, P. N. Skandamis, K. Jordan, D. Rodríguez-Lázaro, B. Stessl, and M. Wagner. 2015. Environmental sampling for *Listeria monocytogenes* control in food processing facilities reveals three contamination scenarios. *Food Control* 51:94–107.
36. Myers, K., D. Montoya, J. Cannon, J. Dickson, and J. Sebranek. 2013. The effect of high hydrostatic pressure, sodium nitrite and salt concentration on the growth of *Listeria monocytogenes* on RTE ham and turkey. *Meat Sci.* 93:263–268.
37. Nufer, U., R. Stephan, and T. Tasara. 2007. Growth characteristics of *Listeria monocytogenes*, *Listeria welshimeri* and *Listeria innocua* strains in broth cultures and a sliced bologna-type product at 4°C and 7°C. *Food Microbiol.* 24:444–451.
38. Pan, Y., and F. Breidt. 2007. Enumeration of viable *Listeria monocytogenes* cells by real-time PCR with propidium monoazide and ethidium monoazide in the presence of dead cells. *Appl. Environ. Microbiol.* 73:8028–8031.
39. Prencipe, V., V. Rizzi, V. Acciari, L. Iannetti, A. Giovannini, A. Serraino, D. Calderone, A. Rossi, D. Morelli, L. Marino, G. Migliorati, and V. Caporale. 2012. *Listeria monocytogenes* prevalence, contamination levels and strains characterization throughout the Parma ham processing chain. *Food Control* 25:150–158.
40. Rocourt, J., and P. Cossart. 1997. *Listeria monocytogenes*, p. 337–352. In M. P. Doyle, L. R. Buechat, and T. J. Montville (ed.), *Food microbiology—fundamentals and frontiers*. ASM Press, Washington, DC.
41. Rodríguez-Lázaro, D., P. Gonzalez-Garcia, A. Valero, and M. Hernández. 2015. Application of the SureTect detection methods for *Listeria monocytogenes* and *Listeria* spp. in meat, dairy, fish, and vegetable products. *Food Anal. Methods* 8:1–6.
42. Ruan, C., H. Wang, L. Yang, and Y. Li. 2003. Detection of viable *Listeria monocytogenes* in milk using an electrochemical method. *J. Rapid Methods Autom. Microbiol.* 11:11–22.
43. Rudi, K., K. Naterstad, S. M. Dromtorp, and H. Holo. 2005. Detection of viable and dead *Listeria monocytogenes* on gouda-like cheeses by real-time PCR. *Lett. Appl. Microbiol.* 40:301–306.
44. Ruiz-Rueda, O., M. Soler, L. Calvo, and J. L. Garcia-Gil. 2011. Multiplex real-time PCR for the simultaneous detection of *Salmonella* spp. and *Listeria monocytogenes* in food samples. *Food Anal. Methods* 4:131–138.
45. Scotter, S. L., S. Langton, B. Lombard, S. Schulten, N. Nagelkerke, P. H. In 't Veld, P. Rollier, and C. Lahellec. 2001. Validation of ISO method 11290 part 1—Detection of *Listeria monocytogenes* in foods. *Int. J. Food Microbiol.* 64:295–306.
46. U.S. Department of Agriculture, Food Safety and Inspection Service. 2005. Principles of preservation of shelf-stable dried meat products. Available at: http://www.fsis.usda.gov/PDF/FSRE_SS_7Principles.pdf. Accessed 25 March 2014.
47. Välimaa, A. L., A. Tilsala-Timisjärvi, and E. Virtanen. 2015. Rapid detection and identification methods for *Listeria monocytogenes* in the food chain: a review. *Food Control* 55:103–114.
48. Wawerla, M., A. Stolle, B. Schalch, and H. Eisgruber. 1999. Impedance microbiology: applications in food hygiene. *J. Food Prot.* 62:1488–1496.
49. Yang, L., and R. Bashir. 2008. Electrical/electrochemical impedance for rapid detection of foodborne pathogenic bacteria. *Biotechnol. Adv.* 26:135–150.
50. Yang, L., C. Ruan, and Y. Li. 2003. Detection of viable *Salmonella* Typhimurium by impedance measurement of electrode capacitance and medium resistance. *Biosens. Bioelectron.* 19:495–502.
51. Yang, Y., F. Xu, H. Xu, Z. P. Aguilar, R. Niu, Y. Yuan, J. Sun, X. You, W. Lai, Y. Xiong, C. Wan, and H. Wei. 2013. Magnetic nano-beads based separation combined with propidium monoazide treatment and multiplex PCR assay for simultaneous detection of viable *Salmonella* Typhimurium, *Escherichia coli* O157:H7 and *Listeria monocytogenes* in food products. *Food Microbiol.* 34:418–424.



Comparative evaluation of impedanciometry combined with chromogenic agars or RNA hybridization and real-time PCR methods for the detection of *L. monocytogenes* in dry-cured ham

Mirian Labrador, María Carmen Rota, Consuelo Pérez-Arquillué, Antonio Herrera, Susana Bayarri*

Departamento de Producción Animal y Ciencia de los Alimentos, Facultad de Veterinaria, Instituto Agroalimentario de Aragón -IA2- (Universidad de Zaragoza-CITA), Zaragoza, Spain, C/Miguel Servet 177, 50013, Zaragoza, Spain

ARTICLE INFO

Keywords:

Listeria monocytogenes

Detection

Rapid methods

RTE meat products

ABSTRACT

Listeria monocytogenes is an important foodborne pathogen of particular relevance in “Ready To Eat” products. Food producers require rapid methods to detect *L. monocytogenes*, since the reference method (ISO 11290-1) is laborious, lengthy and costly. The aim of this study was to evaluate three alternative methods to detect *L. monocytogenes* in dry-cured ham following the ISO 16140-2:2016 standard: (A) impedance measurement followed by plating onto chromogenic agars; (B) impedance measurement followed by RNA hybridization, and (C) real-time PCR.

Inclusivity and exclusivity were evaluated. The limits of detection 50 (LOD₅₀) and the relative limits of detection (RLOD) were obtained by analysing dry-cured ham samples inoculated with *L. monocytogenes* at three different levels of contamination. The sensitivity study of alternative methods, as well as the relative specificity (SP), sensitivity (SE), and Kappa Cohen's index were calculated analysing 93 samples of sliced dry-cured ham. The inclusivity and exclusivity tests of three methods showed no interference in pathogen detection. LOD₅₀ were very low for the three methods evaluated (< 1 cfu/25 g dry-cured ham). The RLOD values of the three alternative methods were below the acceptability limit established by ISO 16140. For methods A and C, good results were obtained in the sensitivity study, as well as in the SP and SE. However, method B showed poorer results in the sensitivity study, along with lower results for SP (99.7%) and SE (79.6%), due to the occurrence of false positives and negatives in samples with presence of other *Listeria* spp.

Methods A and C were considered to be a thoroughly appropriate control tool for use in the meat industry to improve the detection of *L. monocytogenes*.

1. Introduction

Listeria monocytogenes is an important foodborne pathogen with a significant worldwide impact on public health and the economy. This bacterium causes listeriosis, a severe disease with a high fatality rate (20–30%) in specific risk groups such as pregnant women, neonates, the elderly and immunocompromised people (Zunabovic, Domig, & Kneifel, 2011). A total of 2206 confirmed human cases of listeriosis with a total of 270 deaths were reported in the European Union (UE) in 2015 (European Food Safety Authority (EFSA) and European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC), 2016). This was the highest number of deaths observed since 2008, representing one of the most frequent causes of human death due to foodborne illness (Cardoen et al., 2009; de Valk et al., 2005).

Owing to its elaborate physiological adaptation mechanisms, *L. monocytogenes* can survive and even proliferate under adverse environmental conditions such as refrigeration temperatures, low pH, high salinity and the presence of detergents (Gandhi & Chikindas, 2007; Pricope, Nicolau, Wagner, & Rychli, 2013). It can also adhere to abiotic surfaces and form biofilms, which increase the possibility of a continuous contamination of the product-processing environment (Alessandria, Rantsiou, Dolci, & Cocolin, 2010).

L. monocytogenes has been isolated from a wide variety of “Ready To Eat” (RTE) products. Such foodstuffs are considered a major risk, since they have a relative long shelf life and are consumed without any listericidal treatment that could reduce the *L. monocytogenes* loads before consumption (European Food Safety Authority (EFSA) and European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC), 2008; Lianou &

* Corresponding author.

E-mail address: sbayarri@unizar.es (S. Bayarri).

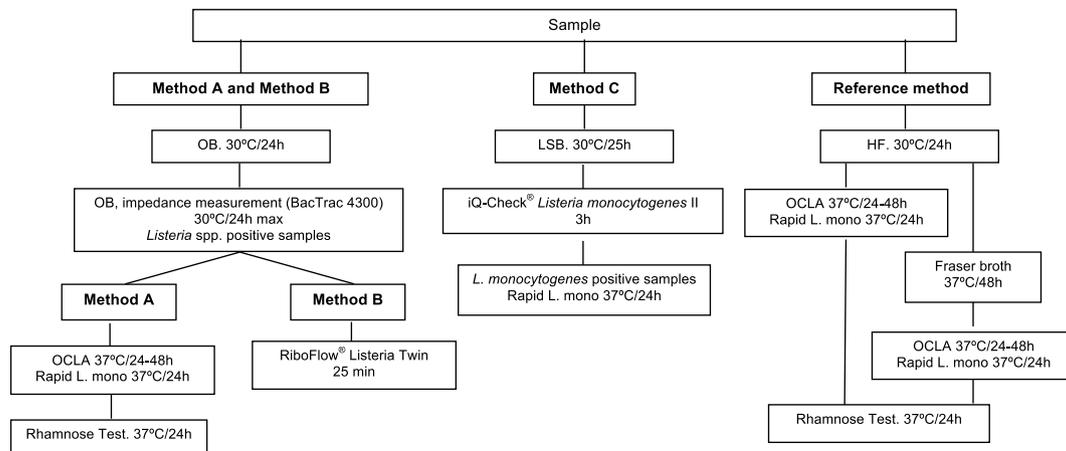


Fig. 1. Flow diagram of the four assayed methodologies for the detection *L. monocytogenes*: Method A: Impedance measurement followed by OCLA and Rapid *L. mono*; Method B: Impedance change measurement followed by *RiboFlow*[®] *Listeria Twin*; Method C: Real time PCR (*iQ-Check*[®] *Listeria monocytogenes* II Kit). OB: One Broth *Listeria*; LSB: *Listeria* Special Broth; HF: Half Fraser; OCLA (Oxoid Chromogenic *Listeria* Agar).

Sofos, 2007; Zhu, Du, Cordray, & Ahn, 2005). RTE meat products are very popular around the world due to their high palatability and convenience, as they need no cooking prior to eating (Awaisheh, 2010). Dry-cured ham is an important foodstuff in the Mediterranean area, and Spain is one of the major producers, consumers, and exporters. Dry-cured ham may be contaminated with *L. monocytogenes* during handling as a consequence of processing practices such as cutting, slicing, and packaging of finished products (Lambertz et al., 2012; Myers, Montoya, Cannon, Dickson, & Sebranek, 2013). Different studies have observed that the prevalence of this pathogen in this product varies widely: from 2% to 24.3%, although it is also present at low cell concentration (< 100 cfu/g) (Giovannini et al., 2007; Gómez et al., 2015; López et al., 2008; Mena et al., 2004; Prencipe et al., 2012).

The presence of this pathogen requires great care in order to minimize the risk and improve food safety. The reference method for detection of *L. monocytogenes* is ISO 11290-1 (International Organization for Standardization (ISO), 2004). It is labour-intensive and lengthy: the time necessary to obtain a confirmed positive result is up to 7 days. The development of alternative rapid methods to detect *L. monocytogenes* is essential for food producers. They need efficient tools to control this pathogen, in order to comply with food safety regulations while minimizing economic losses. Different rapid methods have been developed for detection of *L. monocytogenes* such as immunoassays, fluorescent *in situ* hybridization, amplification methods or impedance (Cho & Irudayaraj, 2013; Fuchizawa, Shimizu, Ootsubo, Kawai, & Yamazaki, 2009; Labrador, Rota, Pérez, Herrera, & Bayarri, 2018; Rodriguez-Lazaro, Gonzalez-Garcia, Gattuso, Gianfranceschi, & Hernandez, 2014). The impedance method is based on the measurement of changes in electrical impedance of a culture medium due to the growth of microorganisms. This growth-based method distinguishes between viable and dead cells (Wawerla, Stolle, Schalch, & Eisgruber, 1999; Yang & Bashir, 2007; Yang, Ruan, & Li, n.d.). Commercial impedance measurement equipment detects *Listeria* spp., so it is necessary to carry out a subsequent identification of *L. monocytogenes*. Different commercial alternatives designed to identify *L. monocytogenes* are available such as ELISA, chromogenic agars, and RNA hybridization kits. Real-time PCR may be used as an alternative method for rapid and specific identification, as well as avoiding cross-contamination since no post-PCR steps are needed (Amagliani, Giammarini, Omiccioli, Brandi, & Magnani, 2007; Fusco & Marina, 2012; Quero, Santovito, Visconti, & Fusco, 2014).

Impedance measurement followed by OCLA with the purpose of detecting *L. monocytogenes* in dry-cured ham has been previously studied in our laboratory (Labrador et al., 2018). Excellent values of relative trueness, specificity and sensitivity were obtained. This paper

expands on that work by shortening the detection time, and it includes a comparison with further rapid and confirmatory methods.

The aim of this study was to evaluate three alternative methods to detect *L. monocytogenes* in sliced dry-cured ham. These were: 1) impedance measurement followed by identification in chromogenic agars; 2) impedance measurement followed by RNA hybridization; and 3) the real-time PCR method. Results from the analysis of naturally contaminated samples of dry-cured ham could provide further valuable information for the process of risk assessment.

2. Materials and methods

The alternative methods were evaluated in comparison with the reference method (ISO 11290-1) following ISO 16140-2:2016 standard (ISO, 2016). Inclusivity, exclusivity, limit of detection 50 (LOD₅₀), relative limit of detection (RLOD), and a sensitivity study of the alternative methods were performed. Additionally, apart from the parameters established by ISO 16140-2:2016, other validation indicators were determined. The alternative methods evaluated were:

- Method A: Pre-enrichment combined with impedance measurement, followed by plating on OCLA (Oxoid Chromogenic *Listeria* Agar) and Rapid *L. mono*.
- Method B: Pre-enrichment combined with impedance measurement, followed by *RiboFlow*[®] *Listeria Twin* flow assay.
- Method C: Pre-enrichment combined with real-time PCR (*iQ-Check*[®] *Listeria monocytogenes* II Kit).

2.1. Description of methods

The three methods evaluated and the reference method are schematized in Fig. 1.

2.1.1. Method A

For the pre-enrichment step, the samples were incubated at 30 °C for 24 h in One Broth *Listeria* (OB, Oxoid, Hampshire, England). Then, one ml of the pre-enrichment was inoculated in nine ml of OB placed in a specific four-electrode cell (SY-LAB Geräte GmbH, Neupurkersdorf, Austria). The measurement of impedance change (E-value) was monitored using a BacTrac 4300 apparatus (SY-LAB Geräte GmbH). The assay was carried out at 30 °C for a maximum of 24 h. Detection time (DT) was established for an E-value threshold of 5% to avoid background noise. The result was considered positive to *Listeria* spp. when a typical impedance curve was observed and the selected threshold was reached.

Table 1
Target and non-target strains used for inclusivity and exclusivity tests.

Strain	Origin	Level of inoculum ^a (Log cfu/225 ml pre-enrichment)
<i>L. monocytogenes</i> UZ22	Fresh longaniza	1.05 ± 0.19
<i>L. monocytogenes</i> UZ64	Dry-cured ham	1.46 ± 0.13
<i>L. monocytogenes</i> UZ102	Fresh longaniza	1.38 ± 0.08
<i>L. monocytogenes</i> UZ104	Fresh longaniza	1.37 ± 0.12
<i>L. monocytogenes</i> UZ106	Dry-cured ham	1.03 ± 0.30
<i>L. monocytogenes</i> UZ108	Cured longaniza	1.33 ± 0.10
<i>L. innocua</i> UZ1	Fresh longaniza	2.37 ± 0.08
<i>L. innocua</i> UZ65	Surfaces from RTEMP	1.81 ± 0.14
<i>L. innocua</i> UZ68	Cheese	2.17 ± 0.14
<i>L. welshimeri</i> UZ40	Cured longaniza	2.33 ± 0.08
<i>E. durans</i> CECT 411	Dried milk	7.81 ± 0.09

^a Log cfu mean ± standard deviation from six replicates obtained by colony count on BHI agar.

As soon as the threshold value was attained, an identification step was performed. The enrichment was plated on OCLA (Oxoid) and Rapid L. mono agar (Bio-Rad, Marnes-La-Coquette, France), and incubated at 37 °C for 24–48 h and 24 h, respectively.

Characteristic colonies of *L. monocytogenes* in OCLA are blue/green surrounded by an opaque halo. Colonies in Rapid L. mono agar are blue or greyish-blue without a yellow halo.

Presumptive *L. monocytogenes* colonies were confirmed using the Rhamnose Test (Bio-Rad) (37 °C/24 h), since this pathogen is able to ferment that sugar, in contrast to *L. ivanovii*, which cannot.

2.1.2. Method B

The pre-enrichment and the impedance measurement steps were the same as in method A, described in section 2.1.1. For the identification of *L. monocytogenes*, a RiboFlow® *Listeria Twin* kit (SY-LAB Geräte GmbH) was used. This is a lateral flow assay based on a specific hybridization of a rRNA target sequence from *L. monocytogenes*.

To summarize, after incubation in BacTrac 4300, 0.5 ml of the sample positive to *Listeria* spp. was centrifuged at 7000 g/5 min. The supernatant was removed and the pellet was re-suspended with specific kit reaction buffers, and incubated at room temperature for 5 min. Then, the mix was placed in the lateral flow device and incubated for a maximum time of 15 min at 46 °C.

2.1.3. Method C

For the pre-enrichment step, the samples were incubated at 37 °C for 25 h in *Listeria* Special Broth (LSB) (Bio-Rad).

The detection of the pathogenic species was performed by an iQ-Chek® *Listeria monocytogenes* II Kit (Bio-Rad) and a MiniOpticon® (Bio-Rad) thermocycler. This kit's method is based in the PCR amplification of a specific sequence of the *hly* gene of *L. monocytogenes*.

For this purpose, 100 µl of the pre-enrichment was mixed with 100 µl of the lysis reactive, disrupted for 4 min and incubated at 98 °C for 15 min. The samples were centrifuged at 11,000 g for 4 min and the supernatant was collected. 5 µl of template DNA and 45 µl of reaction mix were used for the amplification reaction. A *L. monocytogenes*-specific DNA sequence probe was linked to fluorophore FAM. An internal amplification control (IAC) linked to fluorophore HEX was present in each reaction tube. The amplification protocol was: 95 °C for 10 min, followed by 49 cycles of denaturation at 94 °C for 15 s, annealing at 58 °C for 20 s and extension at 72 °C for 30 s.

PCR reaction positive and negative controls were included in each assay. The sample was considered positive when the Cq values were ≥ 10 and ≥ 28 for the target and the IAC, respectively.

The confirmation step for the positive sample was performed by plating 0.1 ml of the pre-enrichment onto Rapid L. mono agar, followed by incubation for 24 h at 37 °C.

2.1.4. Reference method (ISO 11290-1)

This study was performed under ISO 11290-1:1996/Amd 1:2004 (ISO, 2004), which was in force at that time.

For the pre-enrichment step, the samples were incubated in Half Fraser broth (HF, Oxoid) at 30 °C for 24 h. Then, the pre-enrichment was plated on OCLA and Rapid L. mono agar. The media were incubated under the conditions previously described. In parallel, 0.1 ml of pre-enrichment was transferred into 10 ml of Fraser broth (enrichment) (Oxoid) and incubated at 37 °C for 48 h. The enrichment was plated on OCLA and Rapid L. mono. The presumptive *L. monocytogenes* colonies were confirmed using a Rhamnose Test (37 °C/24 h).

2.2. Evaluation parameters following ISO 16140-2:2016

Following ISO 16140:2016-2 guidelines, different types of samples were analysed depending on the parameter evaluated. In each section, the samples used for the determination of the specific parameters are described.

2.2.1. Inclusivity and exclusivity tests

Inclusivity is defined as the ability of the alternative method to detect the target analyte from a wide range of strains. Exclusivity is the lack of interference in the alternative method from a relevant range of non-target strains, which are potentially cross-reactive.

In this study, the three pre-enrichment media previously described were inoculated with one of eleven strains: six strains of *L. monocytogenes*, three strains of *L. innocua*, one strain of *L. welshimeri*, and *Enterococcus durans* CECT 411. Table 1 shows the origin of the strains and the level of the inoculum used. For this purpose, an isolated colony of each strain was incubated overnight at 37 °C in 10 ml of Brain Heart Infusion (BHI) broth. Then, serial ten-fold dilutions in peptone water 0.1% were carried out. One hundred µl of selected dilution of each *Listeria* spp. strain were inoculated in 225 ml of the three different pre-enrichment broths previously described. *E. durans* CECT 411 was inoculated in 225 ml of BHI broth, in order not to inhibit the microorganism's growth, as required by ISO 16140. Colony counts of the selected dilution on BHIA (37 °C/24 h) was used to obtain the concentration of the microorganisms in the inoculum.

In each assay, positive and negative controls were included for each methodology. The positive control was performed by artificial contamination of 225 ml pre-enrichment medium with 2×10^3 cfu *L. monocytogenes* UZ64, while 225 ml pre-enrichment medium sterile without inoculation was used as negative control. The assays were performed in triplicate.

2.2.2. Limit of detection 50 and relative limit of detection

The LOD₅₀ value estimates the minimum level of contamination (cfu/25 g) resulting in positive detection in 50% of cases. The RLOD is defined as the relation between the LOD₅₀ values of alternative and reference methods. The assays were carried out for methods A, B, C and the reference method for the detection of *L. monocytogenes* in artificially contaminated dry-cured ham samples. The acceptability limits for RLOD was established by ISO 16140-2:2016.

2.2.2.1. Bacterial strain and preparation of inocula. An isolated colony of *L. monocytogenes* UZ64 was incubated at 37 °C/16 h in 10 ml of BHI broth, in order to obtain 2×10^9 cfu/ml. Serial ten-fold dilutions were performed in peptone water 0.1% to a cell concentration of 2×10^1 cfu/ml. Colony counting in BHIA (37 °C/24 h) was used in order to obtain the concentration of microorganisms in the inoculum.

2.2.2.2. Artificial contamination of dry-cured ham samples used for LOD₅₀ and RLOD. Sliced and vacuum-packed dry-cured ham samples were analysed at three levels of contamination: 0 cfu/25 g (Level 1), 0.3 cfu/25 g (Level 2) and 0.9 cfu/25 g (Level 3). For Level 1, 100 g of dry-cured ham were homogenised with 900 ml of each of the three different pre-

enrichment media previously described. For Levels 2 and 3, 100 g of dry-cured ham were homogenised with 900 ml of each of the three different pre-enrichment media, and they were inoculated with 60 µl and 180 µl of 2×10^1 *L. monocytogenes* UZ64 cfu/ml, respectively. After inoculation, additional homogenisation was carried out using a Stomacher® 400 Circulator (Seward Ltd, Worthing, UK) blender (260 rpm/2.5 min). In the case of each methodology, an individual sample was analysed six times.

Positive and negative controls were used for each methodology. For the positive controls, 25 g of dry-cured ham was inoculated with 2×10^3 cfu *L. monocytogenes* UZ64. The negative controls were the Level 1 samples analysed with each methodology.

2.2.3. Sensitivity study

To perform the sensitivity study of the alternative methods, ISO 16140-2:2016 required the determination of the following parameters: sensitivity of alternative (SE_{alt} , the ability of the alternative method to detect the analyte), relative trueness (RT, the degree of correspondence between the responses obtained by the alternative and reference methods), false positive rate (FPR), and the subtraction between negative deviation and positive deviation (ND-PD).

The acceptability limits for these parameters were established by ISO 16140-2:2016. In this study, the limits applied were for unpaired results, since the alternative and reference methods did not share the pre-enrichment step.

Additionally, relative specificity (SP) and sensitivity (SE), positive predictive value (PPV), and negative predictive value (NPV) were determined for the alternative methods (Anderson et al., 2011; NordVal, 2017; Tomás, Rodrigo, Hernández, & Ferrús, 2009). SP is defined as the alternative method's inability to detect the analyte when it is not detected by the reference method. SE determines the ability of the alternative method to detect the analyte when it is detected by the reference method. PPV and NPV were calculated as the method's measure of performance by assaying the probability of a sample being truly positive or negative when the method has a positive or negative result. The degree of agreement between the alternative methods and the reference method in dry-cured ham samples was quantified via Cohen's Kappa index. Kappa values are categorised as follows: ≤ 0.20 poor agreement; between 0.20 and 0.40 fair agreement; between 0.41 and 0.60

moderate agreement; between 0.61 and 0.80 good agreement; ≥ 0.81 very good agreement. The NordVal International organization requires $SE > 95\%$ and very good agreement between alternative and reference methods to obtain a method's validation (NordVal, 2017).

To carry out this sensitivity study, naturally and artificially contaminated samples were analysed. These samples were different from those used to determine LOD_{50} and RLOD.

2.2.3.1. Bacterial strains and preparation of inocula. The strains assayed were *L. monocytogenes* UZ64, *L. monocytogenes* UZ108, *L. innocua* UZ1, *L. innocua* UZ68, and *L. welshimeri* UZ40. An isolated colony of each strain was incubated overnight at 37 °C in 10 ml of BHI broth to reach 2×10^9 cfu/ml. Serial ten-fold dilutions of each strain in peptone water 0.1% were carried out in order to obtain concentrations of 2×10^3 cfu/ml, 2×10^2 cfu/ml and 2×10^1 cfu/ml.

Subsequently, ten mixtures of *Listeria* spp. strains at proportions of 1:1 and 1:100 (*L. monocytogenes*:other *Listeria* species) were performed to inoculate the dry-cured ham samples.

Colony counting of the inoculum on Rapid L. mono agar (37 °C/24 h) was used in order to ascertain the concentration of microorganisms in the inoculum.

2.2.3.2. Dry-cured ham samples used for the sensitivity study. A total of 93 samples of 25 g of sliced and vacuum-packed dry-cured ham were analysed by the methods A, B, C, and by the reference method. Forty-four of those samples were naturally contaminated. For assays using artificial contamination, 49 samples of 25 g were used: 20 were contaminated with *L. monocytogenes* and 29 were co-contaminated with mixes formed by *L. monocytogenes* and *Listeria innocua* or *Listeria welshimeri*, in the different proportions described above. The Log cfu of *Listeria* spp. in 25 g of dry-cured ham for each group of samples is described in Table 2.

For the analysis of naturally contaminated samples, 75 g of dry-cured ham were homogenised with 75 ml of sterile distilled water using a Stomacher® 400 Circulator blender (260 rpm/2.5 min). With this step, a homogeneous paste was obtained, which allowed the subdivision of the sample into three portions of 50 g each. Each portion of 50 g was mixed with 200 ml of each pre-enrichment (10% more concentrated) to obtain 25 g of dry-cured ham in 225 ml of medium. The samples were

Table 2

Distribution of dry-cured ham samples analysed by the three methods evaluated and reference method to detect *L. monocytogenes* (n = 93).

Type of sample	Log cfu/25 g of dry-cured ham ^a	Number of samples
Commercial dry-cured ham	Not contaminated	44
Dry-cured ham contaminated with <i>L. monocytogenes</i> UZ64	0.58 ± 0.01	20
Dry-cured ham contaminated with <i>L. monocytogenes</i> UZ64 and <i>L. innocua</i> UZ1 ^b	<i>L. monocytogenes</i> UZ64	0.42 ± 0.07
	<i>L. innocua</i> UZ1	0.32 ± 0.09
	<i>L. monocytogenes</i> UZ64	0.42 ± 0.07
	<i>L. innocua</i> UZ1	2.32 ± 0.09
Dry-cured ham contaminated with <i>L. monocytogenes</i> UZ64 and <i>L. innocua</i> UZ68 ^b	<i>L. monocytogenes</i> UZ64	0.42 ± 0.07
	<i>L. innocua</i> UZ68	0.19 ± 0.13
	<i>L. monocytogenes</i> UZ64	0.42 ± 0.07
	<i>L. innocua</i> UZ68	2.19 ± 0.13
Dry-cured ham contaminated with <i>L. monocytogenes</i> UZ64 and <i>L. welshimeri</i> UZ40 ^b	<i>L. monocytogenes</i> UZ64	0.42 ± 0.07
	<i>L. welshimeri</i> UZ40	0.40 ± 0.06
	<i>L. monocytogenes</i> UZ64	0.42 ± 0.07
	<i>L. welshimeri</i> UZ40	2.40 ± 0.06
Dry-cured ham contaminated with <i>L. monocytogenes</i> UZ108 and <i>L. innocua</i> UZ1 ^b	<i>L. monocytogenes</i> UZ108	0.29 ± 0.12
	<i>L. innocua</i> UZ1	0.32 ± 0.09
	<i>L. monocytogenes</i> UZ108	0.29 ± 0.12
	<i>L. innocua</i> UZ1	2.32 ± 0.09
Dry-cured ham contaminated with <i>L. monocytogenes</i> UZ108 and <i>L. welshimeri</i> UZ40 ^b	<i>L. monocytogenes</i> UZ108	0.29 ± 0.12
	<i>L. welshimeri</i> UZ40	0.40 ± 0.06
	<i>L. monocytogenes</i> UZ108	0.29 ± 0.12
	<i>L. welshimeri</i> UZ40	2.40 ± 0.06

^a Mean ± standard deviation from six replicates obtained by of colony count on Rapid L. mono agar.

^b Two different proportions *L. monocytogenes*:other *Listeria* species (1:1 and 1:100) were assayed for each pair of microorganisms.

Table 3
Inclusivity and exclusivity test of methods assayed.

	Method A ^a	Method B ^b	Method C ^c
<i>L. monocytogenes</i> UZ22	+	+	+
<i>L. monocytogenes</i> UZ64	+	+	+
<i>L. monocytogenes</i> UZ102	+	+	+
<i>L. monocytogenes</i> UZ104	+	+	+
<i>L. monocytogenes</i> UZ106	+	+	+
<i>L. monocytogenes</i> UZ108	+	+	+
<i>L. innocua</i> UZ1	–	–	–
<i>L. innocua</i> UZ65	–	–	–
<i>L. innocua</i> UZ68	–	–	–
<i>L. welshimeri</i> UZ40	–	–	–
<i>E. durans</i> CECT 411	–	–	–

Each microorganism was assayed in triplicate (n = 3).

^a Method A: Impedance measurement followed by OCLA and Rapid L. mono.

^b Method B: Impedance measurement followed by *RiboFlow*[®] *Listeria Twin*.

^c Method C: Real time PCR (iQ-Check[®] *Listeria monocytogenes* II Kit).

analysed by the A, B, C and reference methods. For artificially contaminated samples, 100 g of dry-cured ham were homogenised with 100 ml sterile distilled water, following the same procedure described above.

The sample was subdivided into four portions of 50 g each. Subsequently, three of them were inoculated with *Listeria* spp. inoculum, following the guidelines of ISO 16140:2016-2. After the inoculation, each portion was homogenised in a blender (260 rpm/2.5 min) with 200 ml of selected pre-enrichment medium (10% more concentrated), and analysed by the A, B, C and reference methods. The remaining portion was analysed by reference method as a negative control.

All samples were analysed in triplicate using all four methods.

2.3. Statistical analysis

Statistical analysis was performed using Excel software, Version 14.2.0 (Microsoft Corporation, Redmond, WA, USA) and SPSS statistics 22.0.0 software (SPSS, Inc., Chicago, IL, USA). LOD₅₀ was calculated using the Spearman & Karber test. The statistical study of detection times was carried out using the *t*-student test.

3. Results and discussion

3.1. Inclusivity and exclusivity

All the strains tested gave the expected results with methods A, B, and C in the inclusivity and exclusivity tests (Table 3). Discriminating *L. monocytogenes* from the other *Listeria* species is a challenge, since they

Table 4
Limit of detection 50 (LOD₅₀) and relative limit of detection (RLOD) of three methods evaluated and reference method for detection of *L. monocytogenes*.

	Signal ratio ^b			LOD ₅₀ ^d	RLOD ^e
	0 ^c	0.3 ^c	0.9 ^c		
Method A ^a	0/6	1/6	6/6	(0.3–0.7)	1.265
Method B ^a	0/6	1/6	6/6	(0.3–0.7)	1.265
Method C ^a	0/6	2/6	6/6	(0.2–0.6)	1.000
Reference method	0/6	2/6	6/6	(0.2–0.6)	1.000

^a Method A: Impedance measurement followed by OCLA and Rapid L. mono; Method B: Impedance measurement followed by *RiboFlow*[®] *Listeria Twin*; Method C: Real time PCR (iQ-Check[®] *Listeria monocytogenes* II Kit).

^b Positive results of 6 replicates.

^c cfu/25 g.

^d Limit of detection (LOD₅₀) was calculated as a confidence interval of 95%.

^e Relative limit of detection (RLOD).

are phylogenetically and phenotypically closely related. The three alternative methods evaluated were adequate due to the absence of cross-reaction with all the strains tested, including *L. innocua*, which is closely related to *L. monocytogenes* (Quero et al., 2014; Schmid et al., 2005).

3.2. Limit of detection 50 and relative limit of detection

The LOD₅₀ were similar for the three methods studied and for the reference method, showing low values (< 1 cfu of *L. monocytogenes*/25 g) for all, as displayed in Table 4. The acceptability limit of RLOD for unpaired studies is 2.5 (ISO, 2016). The RLODs for methods A and B were 1.265. The RLOD for the method C was 1.000. Thus, the RLODs of the three evaluated alternative methods complied with the established limits. Achieving a low limit of detection is an important challenge, since the concentration of *L. monocytogenes* in foods is usually low (< 100 cfu/g), and the cell may have suffered sub-lethal injury due to heat, drying or the presence of antimicrobial compounds (WU, 2008). The alternative methods should be able to resuscitate *L. monocytogenes* and support its replication up to adequate levels for detection. Pre-enrichment is a crucial step in order to assure this fact prior to exposure to selective agents (Delibato et al., 2009; Oravcová, Kuchta, & Kaclicková, 2007; Oravcová, Trnčíková, Kuchta, & Kaclicková, 2008; Rodriguez-Lazaro et al., 2014). If this is not possible, false-negative results can appear and contaminated products can reach the consumer, increasing the risk for public health as well as economic losses.

In the literature, the limits of detection are determined and presented from different approaches. In the present study, the LOD₅₀ were determined following the guidelines established in ISO 16140-2:2016. It might be of interest to point out that the limit of detection was calculated in a standardized way in order to compare results among methods. Portanti et al. (2011) developed and validated an ELISA method to detect *L. monocytogenes* in food, obtaining 5–10 cfu/g for LOD₅₀. Following the same trend, Ruiz-Rueda, Soler, Calvo, and García-Gil (2011) established a limit of detection of 5 cfu/25 g analysing 22 different matrices (eight times for each sample) via the real-time PCR method. Differences in the limits of detection among different types of foods were observed by Rossmanith, Krassnig, Wagner, and Hein (2006), combining real-time PCR with enrichment (24 h). These authors obtained a limit of detection of 7.5 cfu/25 ml and 1–9 cfu/15 g in artificially contaminated raw milk, and salmon, pâté and cheese, respectively. Also, O'Grady et al. (2009) observed a limit of detection of 1–5 cfu/25 g analysing 175 samples (meat, fish, dairy products, and desserts) combining enrichment (24 h) and real-time PCR. Therefore, as is reflected in ISO 16140-2:2016, it would be necessary to evaluate the

Table 5
Detection of *L. monocytogenes* by the three methods evaluated and reference method in dry-cured ham samples.

	Reference method	Reference method
	+	–
Method A	PA	PD
+	49	0
Method A	ND	NA
–	0	44
Method B	PA	PD
+	39	1
Method B	ND	NA
–	10	43
Method C	PA	PD
+	49	0
Method C	ND	NA
–	0	44

PA: Positive Accordance; PD: Positive Deviation; ND: Negative Deviation; NA: Negative Accordance.

Method A: Impedance measurement followed by OCLA and Rapid L. mono; Method B: Impedance measurement followed by *RiboFlow*[®] *Listeria Twin*; Method C: Real time PCR (iQ-Check[®] *Listeria monocytogenes* II Kit).

detection method for each category of food analysed.

3.3. Sensitivity study

The results of 93 analysed samples of dry-cured ham are shown in Table 5.

For methods A and C, SE_{alt} , RT, SP, SE, PPV and NPV were 100%. FPR values were 0% for both methods, due to absence of false-negative or false-positive results. The limit of acceptability of ND-PD for an unpaired study is set at 3 (ISO, 2016). The ND-PD values were 0 for methods A and C, therefore lying within the limits of acceptability. The Cohen's Kappa index for methods A and C was 1 in each case, thereby indicating very good agreement with the reference method. The pathogen grew on OCLA and Rapid L. mono in the *L. monocytogenes*-positive samples, providing an excellent correlation between those two agars. These results were in concordance with diverse authors, who observed the suitable correctness of Rapid L. mono (Becker et al., 2006).

On the other hand, ten false negatives and one false positive were obtained by method B in comparison with the reference method. As a consequence, a decrease of SE_{alt} (80%), RT (88.2%), SP (99.7%), SE (79.6%), PPV (97.5%), and NPV (81.1%) was observed. The FPR value (2%) was higher than for methods A and C. The ND-PD of method B was 9: this value was above the limit of acceptability as prescribed by the ISO 16140-2:2016 standard. Also, SE value was lower than the limit established by NordVal (NordVal, 2017). The Cohen's Kappa index for method B was 0.7, which can be considered to be in good agreement with the reference method, but did not comply with the limit ($\kappa > 0.80$) established by the guidelines of NordVal International for validation of alternative methods (NordVal, 2017).

Obtaining high values ($> 95\%$) for SE_{alt} , RT, SP, SE, PPV, NPV and, ND-PD value within the limits of acceptability is an important fact, since these parameters determine whether the developed method is suitable for analysing the target in the matrix.

In a previous study carried out by our research group, an impedance measurement combined with OCLA to detect *L. monocytogenes* in dry-cured ham offered excellent values for RT, SP and SE (Labrador et al., 2018), but the impedance measurement time was longer than in the present study (40 h vs 24 h).

As far as we know, no existing studies regarding the use of impedance measurement followed by RNA hybridization, for the detection of *L. monocytogenes* in dry-cured ham, since we are dealing here with a research novelty.

However, the use of real-time PCR for this purpose has been studied in meat products. Diverse studies have compared real-time PCR with the reference method to detect *L. monocytogenes*, obtaining results that were similar to our study. Garrido et al. (2013) developed a new multiplex real-time PCR method to detect *L. monocytogenes* (*hly* gene) and *Salmonella* spp. (*invA* gene) in diverse categories of food, finding values of 100% for SP, SE, and RT in meat products. A slightly lower value for RT ($< 90\%$) was observed by Delibato et al. (2009), who used conventional PCR with classical gel electrophoresis to detect *L. monocytogenes* in meat products. The detection of *L. monocytogenes* using the *hly* gene as a target has been evaluated or validated in several food matrices. Rodriguez-Lazaro et al. (2014) analysed 100 samples of meat via the real-time PCR (*hly* gene-IAC) and the reference method. These authors achieved a high RT value ranging between 100% and 113.6%. Similarly to our study, the real-time PCR method used was based on the co-amplification of a specific region of the *L. monocytogenes hly* gene and IAC. The positive IAC signal confirms that the negative result is not due to an inhibition during amplification, thus reducing the false-negative rate (Hoorfar et al., 2004). The need to reduce the occurrence of false negatives is a specific public health concern, since batches of food contaminated with *L. monocytogenes* would reach consumers.

In the present study, dry-cured ham samples were artificially contaminated with *L. monocytogenes* and co-contaminated with *L. innocua*

or *L. welshimeri* in order to reproduce as faithfully as possible the scenario that occurs in food samples (Sauders et al., 2012; Simmons et al., 2014; Vongkamjan, Fuangpaiboon, Turner, & Uddhakul, 2016). Method B were affected by the presence of other species. All the false-negative results obtained in method B corresponded to samples artificially co-contaminated with the mixes of *Listeria* spp., *L. innocua* and *L. welshimeri* were present in seven and three of false negatives observed, respectively. Among them, 90% of the false negatives were obtained from samples co-contaminated with mixes at a proportion of 1:100 (*L. monocytogenes*:other *Listeria* species.). In the current study, false-negatives may be caused by a possible low sensitivity of RiboFlow® *Listeria* Twin or/and by the negative influence of the presence of other species of *Listeria* on the growth of *L. monocytogenes* strains. Different studies have highlighted the possibility that the presence of other, more competitive species of *Listeria*, or the production of inhibitory substances during selective enrichment, could produce a decrease in the growth of *L. monocytogenes*. This fact could lead researchers or testing personnel to underestimate their presence and thereby increase the risk of listeriosis due to the non-detection of this pathogen in food (Besse et al., 2010; Keys, Dailey, Hitchins, & Derike Smiley, 2013; Oravcová et al., 2008; Zitz, Zunabovic, Domig, Wilrich, & Kneifel, 2011).

The detection of *L. monocytogenes* could be influenced by the food's intrinsic and extrinsic characteristics. Dry-cured ham matrix is complex, with high NaCl and fat content, and possesses abundant background flora that could affect the detection of the pathogen (Barros et al., 2007; O'Grady et al., 2009; Suh & Knabel, 2001). In a previous study carried out by our research group, the pathogen was subjected to stressful conditions before inoculation in dry-cured ham. The detection of *L. monocytogenes* was not influenced by previous stress (Labrador et al., 2018). This demonstrated that pre-enrichment media allowed the recovery and multiplication of the pathogen. In the current study, the alternative methods A and C were not affected by the food matrix, which allowed the detection of a low number of *L. monocytogenes*. Moreover, Prencipe et al. (2012) observed that the drying of the ham surface decreased the contamination levels, but the pathogen was able to survive and could be detected by the reference method. Similarly, Hospital et al. (2017) determined that the pH, a_w and temperature conditions during the entire experimental process of dry-cured ham elaboration would indeed allow the growth of *Listeria* and its detection.

3.4. Suitability of the evaluated methods

With respect to the impedance measurement carried out for the methods A and B, no signal was observed for samples that did not contain *Listeria* spp.

In all the *Listeria* spp. positive samples, the signal was due to the growth of the *Listeria* spp. present. Since for impedance measurement, the concentration of 10^6 - 10^7 cfu/ml is required for the typical curve to reach the threshold and for the DT to appear (Yang & Bashir, 2007), the DTs observed were shorter in the samples co-contaminated with *Listeria* spp. ($p \leq 0.05$). In the case of the co-contaminated samples, the signal produced by *L. monocytogenes* was added to that generated by the strains of *L. innocua* or *L. welshimeri*. Concretely, DTs obtained for samples contaminated with the pathogen species alone, were from 7.19 to 14.80 h, while, for co-contaminated samples, the DTs ranged from 0.64 to 13.95 h. Globally, the DTs obtained for samples with a presence of *L. monocytogenes* were from 0.64 to 14.80 h.

The impedance measurement proved to be an excellent screening for *Listeria* spp.-negative samples, since the absence of this species was obtained in 2 days. This is one of the few growth-based methods for detection of bacteria capable of differentiating dead cells from live cells, thereby significantly improving food safety.

In the case of method A, OCLA and Rapid L. mono offered the same results with respect to the parameters evaluated for identification *L. monocytogenes*. Rapid L. mono is faster, since the incubation time was 24 h compared to OCLA (48 h). Method A followed by Rapid L. mono

agar was selected, since it required 2.5–4 days to obtain a *L. monocytogenes*-positive confirmed result. However, the alternative method A is not always more rapid than the reference method, because the impedance measurement can take a few hours to one full day, depending on the cell concentration. Despite this, workflow was improved since this alternative method permitted the simultaneous analysis of multiple samples.

Method B was faster than the reference method and enabled the obtaining of a positive confirmed result in 48 h. However, the quality values obtained in the sensitivity study were not satisfactory.

Method C based on real-time PCR allowed the obtaining of negative- and positive-confirmed results in 26 and 48 h, respectively. Generally, nucleic-acid based methods are very specific and sensible, since they target a single specific sequence. The main drawback of PCR is that it generates false-positive results due to the fact that it can not distinguish between dead and live cells. However, the pre-enrichment step prior to PCR is used to reduce false positives, because this also involves diluting the sample and thus reducing the concentration of dead cells (Kracscenicsová, Píknová, Kacčíková, & Kuchta, 2008).

Attractively, real-time PCR can be monitored and automatized, improving the workflow and reducing the costs compared with the reference method (Rodríguez-Lazaro et al., 2014; Välimaa, Tilsala-Timisjärvi, & Virtanen, 2015).

3.5. Presence of *L. monocytogenes* in dry-cured ham commercial samples

In our study, 44 samples of sliced and packed dry-cured ham were analysed, and *L. monocytogenes* was not detected in any of them. Usually, the presence of the pathogen in this product is low. Giovannini et al. (2007) found 4% of prevalence of the pathogen analysing 490 samples of de-boned dry-cured ham, and Mena et al. (2004) detected 2% of positive samples, analysing 44 samples of dry-cured ham. However, Gómez et al. (2015) analysed 37 samples of dry-cured ham by the reference method. These authors detected the pathogen's presence in 24.3% of the samples at day 0, while the percentage decreased to 2.7% throughout the whole shelf-life of the product. The authors provided a partial explanation with the theory of metabolic exhaustion and stress response in hurdle technology applied to the manufacturing and storage of RTE meat products (Leistner, 2000). The presence of *L. monocytogenes* in dry-cured ham may be produced by a cross-contamination through operations such as deboning, slicing and packing (Chaitiemwong, Hazeleger, Beumer, & Zwietering, 2014; Myers et al., 2013; Ortiz et al., 2010). *L. monocytogenes* can be present in dry-cured ham, but its growth may be difficult due to the physicochemical characteristics of the product (low water activity, presence of nitrates, and high salinity). Thus, the concentration of the pathogen was usually low, never exceeding 100 cfu/g at the end of the shelf-life (Giovannini et al., 2007; Gómez et al., 2015).

4. Conclusions

The evaluation of the three methods assayed in this study showed that the impedance method followed by Rapid *L. mono* and real-time PCR method (iQ-Check *Listeria monocytogenes* II kit) were reliable, easy to use, and time-saving. Furthermore, the handling of multiple samples and the avoidance of cross contamination are attractive tools to help improve the routine control of *L. monocytogenes* in the meat industry.

Acknowledgements

This work was financed by Spanish MINECO/FEDER (project INNFACTO IPT-2012-0189-060000). The authors wish to thank the Gobierno de Aragón/FEDER (Grupo de referencia A06_17R) for financial support. Thanks likewise go to Grupo Jorge, S.L. Author M. Labrador was supported by Grant No. C091/2014 from Gobierno de Aragón/FSE.

References

- Alessandria, V., Rantsiou, K., Dolci, P., & Cocolin, L. (2010). Molecular methods to assess *Listeria monocytogenes* route of contamination in a dairy processing plant. *International Journal of Food Microbiology*, *141*, 156–162.
- Amagliani, G., Giammarini, C., Omiccioli, E., Brandi, G., & Magnani, M. (2007). Detection of *Listeria monocytogenes* using a commercial PCR kit and different DNA extraction methods. *Food Control*, *18*(9), 1137–1142.
- Anderson, A., Pietsch, K., Zucker, R., Mayr, A., Müller-Hohe, E., Messelhäuser, U., et al. (2011). Validation of a duplex real-time PCR for the detection of *Salmonella* spp. in different food products. *Food Analytical Methods*, *4*(3), 259–267.
- Awaishah, S. S. (2010). Incidence and contamination level of *Listeria monocytogenes* and other *Listeria* spp. in ready-to-eat meat products in Jordan. *Journal of Food Protection*, *73*(3), 535–540.
- Barros, M. D. A. F., Nero, L. A., Manoel, A. V.-B., D'Ovidio, L., Da Silva, L. C., Franco, B. D. G. D. M., et al. (2007). *Listeria* spp. associated to different levels of autochthonous microbiota in meat, meat products and processing plants. *Brazilian Journal of Microbiology*, *38*(4), 603–609.
- Becker, B., Schuler, S., Lohneis, M., Sabrowski, A., Curtis, G., & Holzapfel, W. (2006). Comparison of two chromogenic media for the detection of *Listeria monocytogenes* with the plating media recommended by EN/DIN 11290-1. *International Journal of Food Microbiology*, *109*(1–2), 127–131.
- Besse, N. G., Barre, L., Buhariwalla, C., Vignaud, M. L., Khamissi, E., Decourseulles, E., et al. (2010). The overgrowth of *Listeria monocytogenes* by other *Listeria* spp. in food samples undergoing enrichment cultivation has a nutritional basis. *International Journal of Food Microbiology*, *136*, 345–351.
- Cardoen, S., Van Huffel, X., Berkvens, D., Quoilin, S., Ducoffre, G., Saegerman, C., et al. (2009). Evidence-based semiquantitative methodology for prioritization of foodborne zoonoses. *Foodborne Pathogens and Disease*, *6*(9), 1083–1096.
- Chaitiemwong, N., Hazeleger, W. C., Beumer, R. R., & Zwietering, M. H. (2014). Quantification of transfer of *Listeria monocytogenes* between cooked ham and slicing machine surfaces. *Food Control*, *44*, 177–184.
- Cho, I.-H., & Irudayaraj, J. (2013). Lateral-flow enzyme immunoconcentration for rapid detection of *Listeria monocytogenes*. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, *405*(10), 3313–3319.
- Delibato, E., Gattuso, A., Minucci, A., Auricchio, B., De Medici, D., Toti, L., et al. (2009). PCR experion automated electrophoresis system to detect *Listeria monocytogenes* in foods. *Journal of Separation Science*, *32*(21), 3817–3821.
- European Food Safety Authority (EFSA) and European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC) (2008). Request for updating the former SCVPH opinion on *Listeria monocytogenes* risk related to ready-to-eat foods and scientific advice on different levels of *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat foods and the related risk for human illness - scientific Opinion. *EFSA Journal*, *6*(1), 599.
- European Food Safety Authority (EFSA) and European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC) (2016). The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2015. *EFSA Journal*, *14*(12), 4634.
- Fuchizawa, I., Shimizu, S., Ootsubo, M., Kawai, Y., & Yamazaki, K. (2009). Specific and rapid quantification of viable *Listeria monocytogenes* using fluorescence *in situ* hybridization in combination with filter cultivation. *Microbes and Environments*, *24*(3), 273–275.
- Fusco, V., & Marina, G. (2012). Nucleic acid-based methods to identify, detect and type pathogenic bacteria occurring in milk and dairy products. *Structure and function of food engineering*. InTech.
- Gandhi, M., & Chikindas, M. L. (2007). *Listeria*: A foodborne pathogen that knows how to survive. *International Journal of Food Microbiology*, *113*(1), 1–15.
- Garrido, A., Chapelá, M. J., Román, B., Fajardo, P., Lago, J., Vieites, J. M., et al. (2013). A new multiplex real-time PCR developed method for *Salmonella* spp. and *Listeria monocytogenes* detection in food and environmental samples. *Food Control*, *30*(1), 76–85.
- Giovannini, A., Migliorati, G., Prencipe, V., Calderone, D., Zuccolo, C., & Cozzolino, P. (2007). Risk assessment for listeriosis in consumers of Parma and San Daniele hams. *Food Control*, *18*(7), 789–799.
- Gómez, D., Iguácel, L. P., Rota, M. C., Carramiñana, J. J., Ariño, A., & Yangüela, J. (2015). Occurrence of *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat meat products and meat processing plants in Spain. *Foods*, *4*(3), 271–282.
- Hoorfar, J., Malorny, B., Abdulmawjood, A., Cook, N., Wagner, M., & Fach, P. (2004). Minireview practical considerations in design of internal amplification controls for diagnostic PCR assays. *Journal of Clinical Microbiology*, *42*(5), 1863–1868.
- Hospital, X. F., Hierro, E., Arnau, J., Carballo, J., Aguirre, J. S., Gratacós-Cubarsí, M., et al. (2017). Effect of nitrate and nitrite on *Listeria* and selected spoilage bacteria inoculated in dry-cured ham. *Food Research International*, *101*, 82–87.
- International Organization for Standardization (2004). *ISO 11290-1/Amd 1:2004. Microbiology of food and animal feeding stuffs – horizontal method for the detection and enumeration of Listeria monocytogenes – Part 1: Detection method. Modification of the isolation media and the haemolysis test, and inclusion of precision data.*
- International Organization for Standardization (2016). *ISO 16140-2:2016. Microbiology of the food chain – method validation – Part 2: Protocol for the validation of alternative (proprietary) methods against a reference method.*
- Keys, A. L., Dailey, R. C., Hitchins, A. D., & Dérique Smiley, R. (2013). Postenrichment population differentials using buffered *Listeria* enrichment Broth: Implications of the presence of *Listeria innocua* on *Listeria monocytogenes* in food test samples. *Journal of Food Protection*, *76*(11), 1854–1862.
- Kracscenicsová, K., Píknová, L., Kacčíková, E., & Kuchta, T. (2008). Detection of *Salmonella enterica* in food using two-step enrichment and real-time polymerase

- chain reaction. *Letters in Applied Microbiology*, 46(4), 483–487.
- Labrador, M., Rota, M. C., Pérez, C., Herrera, A., & Bayarri, S. (2018). Evaluation of a method for rapid detection of *Listeria monocytogenes* in dry-cured ham based on impedancimetry combined with chromogenic agar. *Journal of Food Protection*, 81(5), 705–712. <https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-17-380>.
- Lambert, S. T., Nilsson, C., Bråndenmark, A., Sylvén, S., Johansson, A., Jansson, L.-M., et al. (2012). Prevalence and level of *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat foods in Sweden 2010. *International Journal of Food Microbiology*, 160(1), 24–31.
- Leistner, L. (2000). Basic aspects of food preservation by hurdle technology. *International Journal of Food Microbiology*, 55, 181–186.
- Lianou, A., & Sofos, J. N. (2007). A review of the incidence and transmission of *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat products in retail and food service environments. *Journal of Food Protection*, 70(9), 2172–2198.
- López, V., Villatoro, D., Ortiz, S., López, P., Navas, J., Dávila, J. C., et al. (2008). Molecular tracking of *Listeria monocytogenes* in an Iberian pig abattoir and processing plant. *Meat Science*, 78(1–2), 130–134.
- Mena, C., Almeida, G., Carneiro, L., Teixeira, P., Hogg, T., & Gibbs, P. A. (2004). Incidence of *Listeria monocytogenes* in different food products commercialized in Portugal. *Food Microbiology*, 21(2), 213–216.
- Myers, K., Montoya, D., Cannon, J., Dickson, J., & Sebrank, J. (2013). The effect of high hydrostatic pressure, sodium nitrite and salt concentration on the growth of *Listeria monocytogenes* on RTE ham and Turkey. *Meat Science*, 93(2), 263–268.
- NordVal. (2017). *NordVal International Protocol for the validation of microbiological alternative (proprietary) methods against a reference method.* (September 8th).
- Oravcová, K., Kuchta, T., & Kacliková, E. (2007). A novel real-time PCR-based method for the detection of *Listeria monocytogenes* in food. *Letters in Applied Microbiology*, 45(5), 568–573.
- Oravcová, K., Trnčíková, T., Kuchta, T., & Kacliková, E. (2008). Limitation in the detection of *Listeria monocytogenes* in food in the presence of competing *Listeria innocua*. *Journal of Applied Microbiology*, 104(2), 429–437.
- Ortiz, S., López, V., Villatoro, D., López, P., Dávila, J. C., & Martínez-Suárez, J. V. (2010). A 3-year surveillance of the genetic diversity and persistence of *Listeria monocytogenes* in an Iberian pig slaughterhouse and processing plant. *Foodborne Pathogens & Disease*, 7(10), 1177–1184. <https://doi.org/10.1089/fpd.2010.0535>.
- O'Grady, J., Ruttledge, M., Sedanobalbas, S., Smith, T., Barry, T., & Maher, M. (2009). Rapid detection of *Listeria monocytogenes* in food using culture enrichment combined with real-time PCR. *Food Microbiology*, 26(1), 4–7.
- Portanti, O., Febo, T. D., Luciani, M., Pompili, C., Lelli, R., & Semprini, P. (2011). Development and validation of an antigen capture ELISA based on monoclonal antibodies specific for *Listeria monocytogenes* in food. *Veterinaria Italiana Vet Ital*, 47(473).
- Prencipe, V. A., Rizzi, V., Acciari, V., Iannetti, L., Giovannini, A., Serraino, A., et al. (2012). *Listeria monocytogenes* prevalence, contamination levels and strains characterization throughout the Parma ham processing chain. *Food Control*, 25(1), 150–158.
- Pricope, L., Nicolau, A., Wagner, M., & Rychli, K. (2013). The effect of sublethal concentrations of benzalkonium chloride on invasiveness and intracellular proliferation of *Listeria monocytogenes*. *Food Control*, 31(1), 230–235.
- Quero, G. M., Santovito, E., Visconti, A., & Fusco, V. (2014). Quantitative detection of *Listeria monocytogenes* in raw milk and soft cheeses: Culture-independent versus liquid- and solid-based culture-dependent real time PCR approaches. *Lebensmittel-Wissenschaft und -Technologie- Food Science and Technology*, 58(1), 11–20.
- Rodriguez-Lazaro, D., Gonzalez-Garcia, P., Gattuso, A., Gianfranceschi, M. V., & Hernandez, M. (2014). Reducing time in the analysis of *Listeria monocytogenes* in meat, dairy and vegetable products. *International Journal of Food Microbiology*, 184, 98–105.
- Rossmannith, P., Krassnig, M., Wagner, M., & Hein, I. (2006). Detection of *Listeria monocytogenes* in food using a combined enrichment/real-time PCR method targeting the prfA gene. *Research in Microbiology*, 157(8), 763–771.
- Ruiz-Rueda, O., Soler, M., Calvo, L., & García-Gil, J. L. (2011). Multiplex real-time PCR for the simultaneous detection of *Salmonella* spp. and *Listeria monocytogenes* in food samples. *Food Analytical Methods*, 4(2), 131–138.
- Sauders, B. D., Overdeest, J., Fortes, E., Windham, K., Schukken, Y., Lembo, A., et al. (2012). Diversity of *Listeria* species in urban and natural environments. *Applied and Environmental Microbiology*, 78(12), 4420–4433. <https://doi.org/10.1128/AEM.00282-12>.
- Schmid, M. W., Ng, E. Y. W., Lampidis, R., Emmerth, M., Walcher, M., Kreft, J., ... Schleifer, K. H. (2005). Evolutionary history of the genus *Listeria* and its virulence genes. *Systematic & Applied Microbiology*, 28(1), 1–18.
- Simmons, C., Stasiewicz, M. J., Wright, E., Warchocki, S., Roof, S., Kause, J. R., ... Oliver, H. F. (2014). *Listeria monocytogenes* and *Listeria* spp. Contamination patterns in retail delicatessen establishments in three U.S. States. *Journal of Food Protection*, 77(11), 1929–1939.
- Suh, J. H., & Knabel, S. J. (2001). Comparison of different enrichment broths and background flora for detection of heat-injured *Listeria monocytogenes* in whole milk. *Journal of Food Protection*, 64(1), 30–36.
- Tomás, D., Rodrigo, A., Hernández, M., & Ferrús, M. A. (2009). Validation of real-time PCR and enzyme-linked fluorescent assay-based methods for detection of *Salmonella* spp. in chicken feces samples. *Food Analytical Methods*, 2(3), 180–189. <https://doi.org/10.1007/s12161-009-9082-3>.
- Välimaa, A.-L., Tilsala-Timisjärvi, A., & Virtanen, E. (2015). Rapid detection and identification methods for *Listeria monocytogenes* in the food chain – a review. *Food Control*, 55, 103–114.
- de Valk, H., Jacquet, C., Goulet, V., Vaillant, V., Perra, A., Simon, F., et al. (2005). Surveillance of listeria infections in Europe. *Euro Surveillance: Bulletin European Sur Les Maladies Transmissibles = European Communicable Disease Bulletin*, 10(10), 251–255.
- Vongkamjan, K., Fuangpaiboon, J., Turner, M. P., & Vuddhakul, V. (2016). Various ready-to-eat products from retail stores linked to occurrence of diverse *Listeria monocytogenes* and *Listeria* spp. Isolates. *Journal of Food Protection*, 79(2), 239–245.
- Wawerla, M., Stolle, A., Schalh, B., & Eisgruber, H. (1999). Impedance Microbiology: Applications in food hygiene. *Journal of Food Protection*, 62(12), 1488–1496.
- WU, V. (2008). A review of microbial injury and recovery methods in food. *Food Microbiology*, 25(6), 735–744.
- Yang, L., & Bashir, R. (2007). *Electrical/electrochemical impedance for rapid detection of foodborne pathogenic bacteria.*
- Yang, L., Ruan, C., & Li, Y. (n.d.). Detection of viable *Salmonella typhimurium* by impedance measurement of electrode capacitance and medium resistance. *Biosensors and Bioelectronics*, 19(5), 495–502.
- Zhu, M., Du, M., Cordray, J., & Ahn, D. U. (2005). Control of *Listeria monocytogenes* contamination in ready-to-eat meat products. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 4(2), 34–42.
- Zitz, U., Zunabovic, M., Domig, K. J., Wilrich, P.-T., & Kneifel, W. (2011). Reduced detectability of *Listeria monocytogenes* in the presence of *Listeria innocua*. *Journal of Food Protection*, 74(8), 1282–1287.
- Zunabovic, M., Domig, K. J., & Kneifel, W. (2011). Practical relevance of methodologies for detecting and tracing of *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat foods and manufacture environments - a review. *Lebensmittel-Wissenschaft und -Technologie- Food Science and Technology*, 44(2), 351–362.