



Facultad de Veterinaria
Universidad Zaragoza



Trabajo Fin de Máster en Calidad, Seguridad y Tecnología de los Alimentos

**Estudio epidemiológico de brotes de listeriosis: interés de técnicas
moleculares**

**Epidemiological study of listeriosis outbreaks: interest in molecular
techniques**

Autor/es

Clara Grau Bañolas

Director/es

M^a Carmen Rota García

Cristina Escolar Miñana

Facultad de Veterinaria

2020

Agradecimientos:

Quisiera expresar mi agradecimiento a M^a Carmen Rota García y Cristina Escolar Miñana, mis directoras del trabajo de fin de máster, por su dedicación, paciencia y supervisión del mismo en este curso académico tan peculiar.

ÍNDICE:

1. RESUMEN	1
2. ABSTRACT	2
3. INTRODUCCIÓN	3
3.1. <i>Listeria monocytogenes</i>	3
3.1.1. Alimentos implicados	4
3.1.2. Fuentes de contaminación y rutas de transmisión.....	5
3.1.3. <i>Listeria monocytogenes</i> en la industria alimentaria	6
3.1.4. Capacidad de formar biofilms	7
3.1.5. Normativa legal.....	8
3.2. Listeriosis.....	10
3.2.1. Listeriosis: infección alimentaria	10
3.2.2. Patogenicidad y factores de virulencia.....	11
3.2.3. Epidemiología, casos y brotes, prevalencia y control	13
4. OBJETIVOS	16
5. METODOLOGÍA.....	17
6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	20
6.1. Subtipos moleculares	20
6.1.1. Serotipos	20
6.1.2. Pulsotipos	21
6.1.3. Secuencia tipo (STs)	21
6.1.4. Secuencia tipo de virulencia (VTs)	21
6.2. Información epidemiológica de los brotes de listeriosis.....	22
6.2.1. Brotes de listeriosis a nivel mundial	23
6.2.2. Brotes de listeriosis a nivel europeo.....	27
6.2.3. Brotes de listeriosis a nivel nacional.....	29
6.3. Revisión de los principales subtipos moleculares de <i>L. monocytogenes</i> aislados de la industria alimentaria y su relación epidemiológica con brotes	32
6.3.1. Industria de productos vegetales	32
6.3.2. Industria de productos lácteos	33
6.3.3. Industria de productos cárnicos.....	34
6.3.4. Industria de productos de la pesca	35
6.4. Técnicas moleculares utilizadas para la caracterización del patógeno implicado en los brotes	36
6.4.1. PCR múltiple (mPCR)	36
6.4.2. Electroforesis en Gel de Campo Pulsado (PFGE)	36
6.4.3. Secuenciación de múltiples genes (MLST)	38
6.4.4. Secuenciación de múltiples genes de virulencia (MVLST)	40
6.4.5. Secuenciación del genoma completo (WGS)	40
7. CONCLUSIONES.....	42
8. BIBLIOGRAFÍA	43

1. RESUMEN:

Listeria monocytogenes es un patógeno ubiquitario con capacidad para sobrevivir y multiplicarse en condiciones ambientales adversas y formar biofilms en el entorno de procesado de los alimentos favoreciendo una posible contaminación cruzada. Este patógeno es el agente causal de la listeriosis, una enfermedad grave con una alta tasa de letalidad en personas de riesgo, cuya incidencia a nivel mundial es baja. La principal vía de transmisión es el consumo de alimentos, generalmente alimentos LPC (listos para el consumo), por lo que su control en la industria representa una gran preocupación.

La caracterización molecular de los aislados de *L. monocytogenes*, durante el procesado de los alimentos, permite la identificación de nichos y reservorios del patógeno en el ambiente de la industria y, su posible transferencia entre el ambiente y el producto. Además, aporta información de interés para el estudio epidemiológico de casos y brotes de listeriosis.

- El objetivo general de este trabajo es realizar el análisis y discusión de la información epidemiológica asociada a brotes de listeriosis humana producidos por el consumo de alimentos a nivel mundial, aportando información sobre las técnicas de caracterización molecular de los aislados, así como los principales subtipos implicados en los brotes.

Para ello se ha realizado una profunda revisión bibliográfica en la que se ha seguido la metodología descrita para este tipo de trabajos, mediante la selección de publicaciones científicas e informes de agencias internacionales, tras aplicar unos criterios de inclusión/exclusión.

Actualmente, la técnica de referencia para la caracterización molecular de *L. monocytogenes* es la Electroforesis en Gel de Campo Pulsado (PFGE) establecida por el CDC (Centers for Disease Control and Prevention) y el Laboratorio de Referencia de la Unión Europea de *L. monocytogenes*.

Palabras clave: *Listeria monocytogenes*, serotipos, listeriosis, brotes de listeriosis.

2. ABSTRACT:

Listeria monocytogenes is a ubiquitous pathogen with the ability to survive and multiply under adverse conditions and form biofilms in the food processing environment, favoring possible cross contamination. This pathogen is the causative agent of listeriosis, a serious disease with a high fatality rate in people at risk, and the incidence of which is low (0.3 cases per 100,000 inhabitants/year). The main route of transmission is food consumption, mainly by ready-to-eat foods (RTE), so its control in the industry represents a great concern.

The molecular characterization of *L. monocytogenes* isolates, during food processing, allows the identification of niches and reservoirs of the pathogen in the industrial environment and its possible transfer between the environment and the product. In addition, it provides information of interest for the epidemiological study of cases and outbreaks of listeriosis.

- The aim of this dissertation is to analyse and discussion of the epidemiological information associated with outbreaks of human listeriosis caused by food consumption worldwide, providing information on the molecular characterization techniques of the isolates, as well as the main subtypes involved in the outbreaks.

For this, a thorough bibliographic review has been carried out in which the methodology described for this type of dissertation has been followed, by selecting scientific publications and reports from international agencies, after applying inclusion/exclusion criteria.

Currently, the reference technique for the molecular characterization of *L. monocytogenes* is Pulsed Field Gel Electrophoresis (PFGE) established by the CDC (Centers for Disease Control and Prevention) and the European Union Reference Laboratory for *L. monocytogenes*.

Key words: *Listeria monocytogenes*, serotypes, listeriosis, listeriosis outbreaks.

3. INTRODUCCIÓN

3.1. *Listeria monocytogenes*

Listeria monocytogenes se descubrió en 1926 por Murray, Webb y Swann, quienes la denominaron *Bacterium monocytogenes* debido a que infectaba a los leucocitos sanguíneos, pero no fue hasta 1940 cuando se acordó el nombre actual, *L. monocytogenes* (Walter, 2008).

El género de *Listeria* incluye bacterias Gram positivas, anaerobias facultativas y no esporuladas. Hasta el año 2010, habían sido publicadas por el *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* (IJSEM) 6 especies de *Listeria*. Pero, actualmente, en el género de *Listeria* se reconocen 22 especies (DSMZ, 2020). De todas las especies descritas, sólo *L. monocytogenes* es responsable de causar enfermedad grave en el hombre por el consumo de alimentos (EFSA, 2013 y Den Bakker et al., 2010). La especie *L. ivanovii* produce infecciones especialmente en rumiantes y rara vez se ha asociado con infecciones en humanos.

La clasificación taxonómica de este patógeno es: Dominio: *Bacteria*, Filo: *Firmicutes*, Clase: *Bacilli*, Orden: *Bacillales*, Familia: *Listeriaceae*, Género: *Listeria*.

El análisis filogenético de múltiples genes agrupa las cepas de *L. monocytogenes* en cuatro grandes grupos genéticos denominados linajes (I, II, III y IV) (Figura 2), dentro de éstos las cepas se diferencian en 13 serotipos distintos: 1/2a, 1/2b, 1/2c, 3a, 3b, 3c, 4a, 4ab, 4b, 4c, 4d, 4e y 7 (Wai et al., 2019).

El tamaño del genoma de *L. monocytogenes* oscila entre 2,89 y 3,11 Mb, y el contenido promedio de G+C es de 37,9%. Dicho patógeno está representado principalmente por complejos clonales (CCs) distribuidos por todo el mundo e involucrados en casos y brotes de infecciones en humanos (Toledo et al., 2018).

L. monocytogenes es un patógeno ubicuitario ampliamente distribuido, característica que le confiere una importante oportunidad de llegar a los alimentos, junto con su resistencia y multiplicación en condiciones extremas (bajo pH o alta concentración de sal) (Wai et al., 2019). Los factores que favorecen el crecimiento y supervivencia de *L. monocytogenes* vienen recogidos en la Tabla 1.

Tabla 1. Factores que favorecen el crecimiento y supervivencia de *Listeria monocytogenes*

Factor	Puede crecer			Puede sobrevivir, pero no crecer
	Límite inferior	Óptimo	Límite superior	
Temperatura (°C)	-1,5 a +3,0	30,0 a 37,0	45,0	-18,0
pH	4,2 a 4,3	7,0	9,4 a 9,5	3,3 a 4,2
Actividad de agua (a _w)	0,90 a 0,93	0,99	>0,99	<0,90
Concentración de sal (%)	<0,5	0,7	12 a 16	≥20
Atmósfera	Anaerobio facultativo que puede crecer en ausencia de oxígeno.			

Fuente: AESAN, 2011

3.1.1. Alimentos implicados

Según datos aportados por el Sistema de Alerta Rápida para los Productos Alimentación y los Alimentos para animales (RASFF), durante el año 2018 y los 8 primeros meses de 2019, se observó que los lácteos y los vegetales fueron los alimentos con un mayor número de notificaciones en este periodo de tiempo. Sin embargo, hay que estar muy atentos a los productos listos para el consumo (LPC) de cualquier origen, ya que estos pueden provocar graves consecuencias en las personas que pertenecen a grupos de riesgo (RASFF, 2018).

En general, la principal fuente de infección por *L. monocytogenes* es el consumo de alimentos, siendo los de mayor riesgo los alimentos listos para el consumo (LPC) debido, en parte, a que este patógeno se inactiva con tratamientos térmicos como la pasteurización. Dichos alimentos han estado implicados en casos y brotes de listeriosis en todo el mundo (Martín et al., 2014). El Reglamento (CE) n°2073/2005 define los alimentos LPC como alimentos destinados por el productor o el fabricante al consumo humano directo sin necesidad de cocinado u otro tipo de transformación eficaz para eliminar o reducir los microorganismos patógenos a un nivel aceptable. Este reglamento clasifica los alimentos LCP en dos categorías:

- a. **Alimentos LPC en los que *L. monocytogenes* puede multiplicarse.** En esta categoría destacan alimentos como leches y derivados lácteos (quesos frescos y

de pasta blanda), pescados ahumados, mariscos, vegetales, frutas ácidas, carnes y derivados cárnicos, entre otros.

- b. Alimentos LPC que no facilitan el crecimiento de dicho patógeno.** Se consideran que pertenecen a esta categoría los productos con $\text{pH} \leq 4,4$ o $\text{aW} \leq 0,92$, productos con $\text{pH} \leq 5,0$ y $\text{aW} \leq 0,94$, 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. Se incluyen alimentos como helados o productos congelados, alimentos marinados, encurtidos, alimentos que emplean el ácido cítrico o benzoatos como conservante, quesos curados, leches fermentadas como el yogurt, entre otros.

3.1.2. Fuentes de contaminación y rutas de transmisión

La principal fuente de transmisión de *L. monocytogenes* a los humanos es a través del consumo de alimentos contaminados, ya que el patógeno puede encontrarse en alimentos crudos y en alimentos procesados contaminados durante y/o después del procesamiento. El patógeno ingresa en los alimentos en diferentes fases del proceso de la cadena alimentaria (Figura 1) (EFSA, 2013).

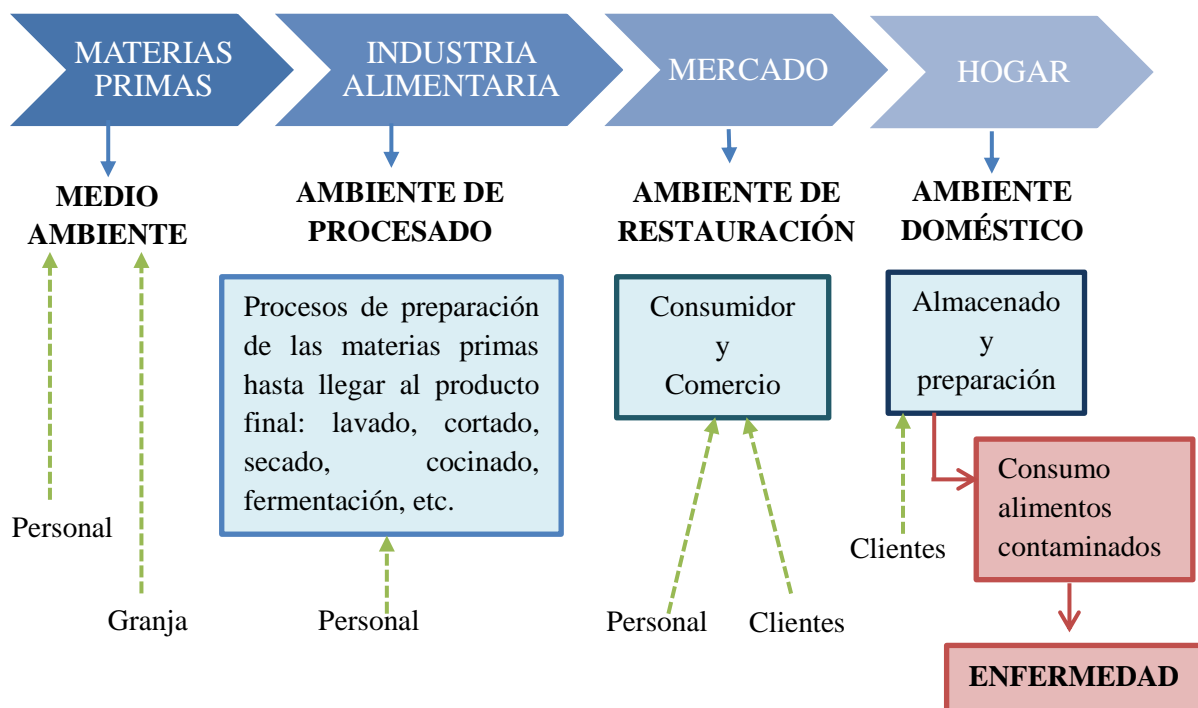


Figura 1. Esquema de las rutas de transmisión de *L. monocytogenes* en los alimentos LPC (adaptación)

Fuente. EFSA, 2018

El patógeno ingresa en el huésped principalmente a través del tracto gastrointestinal donde cruza la barrera intestinal gracias a la invasión de las células epiteliales intestinales (IEC). Tras esta invasión, *L. monocytogenes* llega a través del sistema linfático y la sangre a los órganos diana donde se multiplica activamente (Regan et al., 2014).

3.1.3. *Listeria monocytogenes* en la industria alimentaria

L. monocytogenes es un organismo ubiquitario, por lo que está ampliamente distribuido en la naturaleza, destacando: materias primas, agua, personas, animales e incluso equipos de plantas de procesamiento de alimentos. Este patógeno puede detectarse en la industria alimentaria como consecuencia de la contaminación cruzada. Siendo las materias primas utilizadas la principal causa de contaminación tanto de las plantas de procesamiento de alimentos como de los productos elaborados a partir de éstas (Figura 1).

Estos equipos de procesamiento, así como las cámaras de refrigeración o congelación juegan un papel muy importante en la contaminación del producto por este patógeno. Para evitar la presencia de *L. monocytogenes* en el producto final es muy importante evitar la contaminación cruzada mediante medidas como la compartimentalización de las líneas de procesamiento y la separación de las áreas donde se manipulan los alimentos ya procesados. La eliminación completa de este microorganismo en el ambiente de las plantas de procesamiento es muy difícil a pesar del sistema de autocontrol (APPCC) que deben tener establecido las industrias (Reglamento 852/2004), por ello se hace obligatorio la toma de muestras para el control de dicho microorganismo en el ambiente y equipos de procesamiento de alimentos LPC como se indica en el Reglamento (CE) n^o 2073/2005.

En ocasiones, se ha comprobado que la misma cepa de *L. monocytogenes* se ha identificado en diferentes plantas de procesamiento, existiendo un fenómeno de persistencia de dicha cepa. Este fenómeno fue descrito por primera vez en 1944 por Joseph Bigger, siendo el concepto de persistencia, más comúnmente aceptado, una misma cepa aislada repetidamente (tres veces o más) en el ambiente o equipo durante un mínimo de 3 meses (Carpentier y Cerf, 2011; Ortiz et al., 2010). En determinadas cepas la persistencia está relacionada con factores asociados a la supervivencia a los procesos de desinfección, es decir, resistencia a desinfectantes, así como a la formación de biofilms.

Por ello, la importancia de tener validados los procesos de limpieza y desinfección son necesarios para eliminar el máximo número de microorganismos patógenos de las plantas de procesado, utilizando siempre los compuestos específicos que inhiban la acción del patógeno de estudio.

3.1.4. Capacidad de formar biofilms

L. monocytogenes es particularmente problemática en la industria alimentaria donde puede adherirse y formar biofilms en superficies que están en contacto con alimentos. Estas estructuras como forma de vida aumentan la persistencia y resistencia de este patógeno en las líneas de producción industrial (Ortiz, 2016).

La formación de biofilms representa una forma habitual de crecimiento de las bacterias en la naturaleza, las cuales crecen adheridas a superficies y embebidas en matrices extracelulares que ellas mismas sintetizan. En el caso de *L. monocytogenes*, se ha descrito que, los polisacáridos como parte de la matriz extracelular tienen un papel importante en la formación de estas estructuras, además de la participación de los flagelos en dicha formación, siendo la movilidad un factor importante ya que permite al patógeno formar dichas estructuras y adherirse a la superficie. Otro factor importante es el serotipo al que pertenezcan, ya que se ha constatado que los serotipos 1/2a producen más biofilms que el resto de serotipos, debido a la producción de material extracelular que les hace resistir a cantidades subletales de desinfectante al que se ven sometidas las bacterias durante la limpieza y desinfección. En cada planta de procesado de alimentos, un número limitado de clones de *L. monocytogenes* puede establecerse y persistir durante años a causa de la formación de estos biofilms (Renier et al., 2011).

En la industria alimentaria la presencia de estos biofilms puede detectarse en diferentes superficies, equipos y utensilios. La no eliminación de estas estructuras puede ser responsable de producir la contaminación cruzada en el producto final. El control y eliminación de los biofilms del ambiente de la industria representa un importante problema siendo una tarea muy difícil y exigente que puede resultar muy cara y complicada. Además, desde el punto de vista tecnológico, los biofilms pueden ocasionar reducción del flujo de líquidos y de la transmisión de calor, pérdidas energéticas, bloqueo de los poros de membranas e incluso la corrosión de metales (AESAN, 2010).

El crecimiento de las bacterias en biofilms ofrece inconvenientes para su eliminación ya que éstos:

- Protegen a los microorganismos de la acción de los agentes adversos
- Incrementan la disponibilidad de nutrientes para su crecimiento
- Facilitan el aprovechamiento del agua, reduciendo la posibilidad de deshidratación
- Posibilitan la transferencia de material genético

Por ello, los biofilms son una estrategia adaptativa de los microorganismos que permite incrementar sus posibilidades de supervivencia en el medio ambiente. Lo que conlleva a que los métodos habituales de control y eliminación de las formas libres de las bacterias, como son las operaciones de limpieza y desinfección, se puedan mostrar a menudo ineficaces frente a las bacterias del biofilm (Renier et al., 2011).

3.1.5. Normativa legal

El criterio establecido por países como EEUU, Japón y Canadá para *L. monocytogenes* en alimentos LPC es tolerancia cero: tanto en alimentos (no detectado en 25 gramos) como en superficies de procesado de alimentos.

En el ámbito de la Unión Europea (UE), el Reglamento Comunitario 852/2004 relativo a la higiene de los productos alimenticios, contempla la obligatoriedad que tienen los operadores de las empresas alimentarias de aplicar y mantener un sistema de autocontrol basado en los principios del “Análisis de Peligros y de los Puntos Críticos de Control” (APPCC).

En este ámbito los criterios microbiológicos de *L. monocytogenes* están regulados por el Reglamento (CE) nº 2073/2005 relativo a los criterios microbiológicos aplicables a los productos alimenticios y sus posteriores modificaciones.

En este Reglamento se establecen criterios microbiológicos para *L. monocytogenes* en tres categorías de alimentos (Tabla 2).

Tabla 2. Criterios microbiológicos aplicables a los productos alimenticios

	Alimentos LPC destinados a lactantes o usos médicos	Alimentos LPC que puedan favorecer el desarrollo de <i>L. monocytogenes</i> que no sean los destinados a los lactantes ni para usos médicos especiales		Alimentos LPC que no pueden favorecer el desarrollo de <i>L. monocytogenes</i>, no destinados a lactantes ni a usos médicos especiales
N	10	5	5	5
C	0	0	0	0
m ó M	No detectado en 25 gramos	100 ufc/g	No detectado en 25 gramos	100 ufc/g (*)
	El criterio se aplica en productos comercializados durante su vida útil	Este criterio se aplica durante la vida útil de productos comercializados	Este criterio se aplica antes de que el alimento haya dejado el control inmediato del explotador de la empresa alimentaria que lo ha producido	Pertenecen a esta categoría productos con $pH \leq 4$, o $a_w \leq 0,92$, productos con $pH \leq 5$ y $a_w \leq 0,94$, productos con una vida útil < 5 días, cualquier otro producto, siempre que se justifique científicamente. Este criterio se aplica a los productos comercializados durante su vida útil

Fuente: Reglamento (CE) n^o 2073/2005

(*) En el caso de que el operador no pueda garantizar el cumplimiento de este criterio a lo largo de la vida útil del producto, el criterio será no detectado en 25 gramos al abandonar la industria

Siendo: n, número de unidades de que se compone la muestra; c, número de unidades de la muestra cuyo número de bacterias podrá situarse entre m y M; m, valor umbral del número de bacterias; M, valor límite del número de bacterias.

Además, en este Reglamento se establece el requisito de tomar muestras de las zonas de producción para aquellos establecimientos que elaboren alimentos susceptibles de plantear un riesgo por *L. monocytogenes* para la salud pública. Este aspecto se ve reflejado en el Artículo 5 (normas específicas para las pruebas y la toma de muestras) donde se especifica que la toma de muestras se realizará, siguiendo el método de

referencia de la norma ISO 18593, en las zonas de trabajo y equipos utilizados en la producción de los productos alimenticios cuando la toma sea necesaria para garantizar el cumplimiento de los criterios, siendo el criterio de aceptabilidad ausencia en la superficie muestreada, ya que no puede darse por satisfactorias las superficies preparadas para su uso con presencia de *Listeria*. La toma de muestras será un instrumento útil para identificar y prevenir la presencia de microorganismos patógenos en los productos alimenticios (Reglamento (CE) n^o 2073/2005).

3.2. Listeriosis

La listeriosis, cuyo agente etiológico es *Listeria monocytogenes*, se sitúa entre las enfermedades transmitidas por alimentos de mayor relevancia en salud pública, por su gran impacto social y económico que se debe a la gravedad de su cuadro clínico (Muñoz et al., 2011). Hasta la década de 1980 no se reconoció la importancia de los alimentos como vía de transmisión de este patógeno a las personas. Década en la cual se produjeron varios brotes de listeriosis con origen común en Norteamérica y Europa (FAO/OMS, 2004).

La listeriosis es una enfermedad que tiene una morbilidad baja pero cuya letalidad es alta, hasta el 30%, en personas pertenecientes a grupos de riesgo: ancianos, embarazadas e inmunodeprimidos (Dellafiora et al., 2020). Esta bacteria sobrevive en condiciones de estrés lo que le permite colonizar diferentes nichos, especialmente espacios que se encuentran en el entorno de procesamiento de alimentos, por lo que se puede entender que la mayoría de las listeriosis humanas son transmitidas por los alimentos. Por ello, para comprender mejor la persistencia de este patógeno en la cadena alimentaria y su impacto sobre la salud pública, es necesario estudiar los casos recientes de listeriosis en todo el mundo (Wai et al., 2019).

3.2.1. Listeriosis: infección alimentaria

La listeriosis no se manifiesta clínicamente del mismo modo en todos los pacientes. Por ello, las manifestaciones clínicas de *L. monocytogenes* se pueden agrupar en dos categorías, dependiendo de las características de la persona afectada: listeriosis invasiva y listeriosis no invasiva.

- **Listeriosis invasiva** se produce cuando la infección alcanza sistemas y órganos diana como el sistema nervioso central (SNC) o el útero en mujeres embarazadas, debido a que las células bacterianas atraviesan la barrera intestinal. Este tipo de listeriosis afecta a los grupos de población más vulnerables con una ingestión de dosis del patógeno bajas. Ocasionando diversos cuadros clínicos como: meningitis, meningoencefalitis, bacteriemias, septicemias, absceso cerebral o espinal, listeriosis pontobulbar y romboencefalitis. En el caso de las mujeres embarazadas la bacteria se disemina por vía sanguínea atravesando la barrera transplacentaria pudiendo infectar al feto o causar abortos espontáneos, muerte fetal, septicemia neonatal grave, muerte neonatal, meningitis infantil y granulomatosis.
- **Listeriosis no invasiva** se caracteriza por afectar a personas sanas tras la ingestión de una alta dosis del patógeno. Los síntomas que manifiesta son más leves como gastroenteritis, fiebre, diarrea, cefalea y mialgias, tras un periodo de incubación corto, se produce en personas sanas. (Muñoz et al., 2011).

3.2.2. Patogenicidad y factores de virulencia

L. monocytogenes tiene la capacidad de invadir y replicarse en diferentes células, como son las epiteliales y los macrófagos, debido a que es un parásito intracelular (Ortiz, 2016). Normalmente, este patógeno invade el cuerpo humano gracias a la capacidad de atravesar la barrera gastrointestinal induciendo su propia endocitosis en las células epiteliales. Al cruzar la membrana celular se replica hasta que se extiende fuera de la célula pudiendo infectar así a las células vecinas. Cuando *L. monocytogenes* alcanza el torrente sanguíneo, la infección tiene una amplia difusión a través del organismo. Esta diseminación, que se da principalmente en los grupos de riesgo, ocurre debido a la capacidad del patógeno de atravesar la barrera intestinal, placentaria y hematoencefálica (Dellafiora et al., 2020).

El éxito que tiene *L. monocytogenes* para infectar a la célula huésped no solo depende de la adherencia, invasión, multiplicación y capacidad del patógeno de extenderse a las demás células, sino que juegan un papel muy importante los reguladores de virulencia ya que están involucrados en cada uno de los pasos del ciclo infeccioso (Wai et al., 2019).

El ciclo de infección consta de cuatro fases diferentes en las cuales es importante la acción de diferentes proteínas codificadas por sus genes específicos. Las fases de este ciclo de infección son:

- Entrada de *L. monocytogenes* en la célula del hospedador: en esta fase es importante la acción tanto de la internalina A (*inlA*) la cual se une con su receptor específico y penetra en las células del epitelio intestinal, como la internalina B (*inlB*) la cual reacciona con unos receptores específicos (Met y Clq-R) haciendo posible la internalización del patógeno en diferentes células.
- Lisis de la membrana de las vacuolas fagocíticas que engloban al patógeno para supervivir: importantes en esta fase la acción de la Hemolisina LLO la cual libera al patógeno al citosol de la célula hospedadora, así como de las fosfolipasas C y de las proteínas PI-PLC y PC-PLC.
- Replicación intracelular de *L. monocytogenes* en el citoplasma para desplazarse en el interior de la célula: en este punto de la infección es importante la acción de la proteína actina A (*ActA*) la cual es una proteína de membrana que dirige el ensamblaje de monómeros de actina para dar lugar a filamentos los cuales ayudan a la movilidad del patógeno.
- Infección de las células vecinas: en esta última fase de la infección es importante la acción tanto de la Hemolisina LLO la cual ayuda a la formación de una portuberancia que envuelve al patógeno de la cual se origina una vacuola secundaria la cual se lisa y se inicia así un nuevo ciclo de infección, así como la acción de la lecitinasa PC-PLC la cual ayuda a la Hemolisina LLO a la formación de un nuevo ciclo de infección (Ortiz, 2016).

Los genes de virulencia de *Listeria* se organizan dentro de regiones del cromosoma conocidas como Islas de Patogenicidad (LIPI). La evolución bacteriana tiene un gran papel en estas regiones las cuales son adquiridas por la bacteria a través de mecanismos de transferencia genética horizontal. Una de las regiones que podemos destacar es la Isla 1 de Patogenicidad de *Listeria* (LIPI-1) donde se encuentran 6 factores de virulencia responsables del parasitismo intracelular del patógeno (*prfA*, *plcA*, *hly*, *mpl*, *actA* y *plcB*). Todos estos genes de virulencia situados en LIPI-1, junto con *inlA* e *inlB*, son regulados por la proteína reguladora PrfA.

En concreto, el regulador de virulencia PrfA, codificado por el Gen *prfA*, está compuesto por 10 genes de virulencia. Se encarga de la expresión de los principales determinantes de virulencia de las bacterias y de modular junto con el factor sigma alternativo (σ^B) la transcripción de los genes de virulencia. El factor sigma alternativo es un subconjunto de *prfA* y se encarga además de lo citado anteriormente, de la regulación de la expresión de genes de respuesta al estrés, el metabolismo de los carbohidratos, de la motilidad y del proceso de envoltura celular (Ortiz, 2016).

3.2.3. Epidemiología, casos y brotes, prevalencia y control

La listeriosis tiene una incidencia baja, de 0,3 por 100.000 habitantes y año a nivel mundial, y la mayoría de los casos se reportan en países industrializados. Concretamente, en Europa según datos de la EFSA, en el año 2018 la incidencia de la listeriosis fue de 0,47 por 100.000 habitantes y años (EFSA y ECDC, 2019).

Estos casos de listeriosis pueden ser aislados o asociados a brotes, siendo la mayoría de los casos listeriosis esporádica. Las personas con una mayor incidencia de padecer listeriosis son las mujeres embarazadas siendo hasta 18 veces más común en este grupo de población que en la población general. La incidencia en los recién nacidos se estima hasta una tasa de 8,6 por 100.000 nacimiento, de hecho aproximadamente el 30% de los casos de listeriosis ocurren en las tres primeras semanas de vida, debido a la transferencia del patógeno de la madre al feto a través de la barrera placentaria (Lamont et al., 2013). En los adultos, la listeriosis no relacionada con el embarazo, aparece generalmente a partir de los 40 años y fuera del periodo fértil es más común en hombres mayores de 65 años (Parrila et al., 2013).

La listeriosis se incluye entre las enfermedades de declaración obligatoria en España a partir del 2015, por ello desde este año se dispone de información de dicha enfermedad declarada por las Comunidades Autónomas, las cuales notifican de forma individual los casos probables y confirmados de listeriosis al Centro Nacional de Epidemiología (CNE) a través de la Red Nacional de Vigilancia Epidemiológica (RENAVE) (CCAES, 2019).

Entre los años 2015-2018 en España, hubo un total de 1369 casos de listeriosis repartidos por toda la península. La Comunidad Autónoma con mayor número de casos de listeriosis en este periodo fue Cataluña (281 casos), seguida de Andalucía (259).

También cabe mencionar los casos de listeriosis en el hogar, entre los años 2015 hasta 2018, se ha observado en España un total de 17 afectados por listeriosis tras el consumo de alimentos en el hogar. En la tabla 3 se reflejan los casos por Comunidad Autónoma y por año.

Tabla 3. Número de casos de listeriosis en España por Comunidades Autónomas

Año	Comunidad Autónoma	Ámbito	Número de casos	Fuente-Mecanismo
2015	Andalucía	Restauración colectiva	3	Ensaladilla Rusa (confirmación microbiológica). Otros alimentos ingeridos: carne mecada, salmorejo, gambas y pulpo
2016	Andalucía	Hogar	2	Queso
	Madrid	Hogar	2	Transmisión vertical
2017	Madrid	Hogar	4	Transmisión vertical
2018	Andalucía	Hogar	2	Transmisión vertical
	Aragón	Hogar	2	Transmisión vertical
	Castilla La Mancha	Hogar	2	Transmisión vertical

Fuente: Ramírez et al., 2019

Prevalencia y control: En la industria alimentaria, para prevenir la contaminación de los alimentos con *L. monocytogenes*, se requiere seguir unas buenas prácticas de fabricación, prácticas de higiene y el control efectivo de la temperatura en toda la cadena de producción alimentaria, incluyendo la distribución y el almacenamiento de alimentos. Resulta crucial controlar la contaminación por *L. monocytogenes*, así como su crecimiento en el producto hasta el final de su vida útil. Además, de establecer por parte de la industria un sistema de autocontrol basado en el APPCC el cual será específico para cada empresa (AESAN, 2010).

El último informe de la EFSA y el ECDC, señala que nuevas tecnologías de tipificación molecular de los aislados de *L. monocytogenes* de la industria aportan información adicional sobre la caracterización de aislamientos de este patógeno, tales como virulencia, persistencia y complejo clonal (CC). La subtipificación mediante estas tecnológicas ayudaría a una mejor caracterización de la diversidad bacteriana en los reservorios de las superficies (Møller Nielsen et al., 2017).

En este sentido, se recomienda que tras el análisis de muestras de superficies de procesado de alimentos, con detección de manera repetitiva de un elevado número de muestras con presencia de *L. monocytogenes*, además de aplicar las medidas

correctoras, se debe utilizar la caracterización genética de los aislados mediante un método molecular, con el objetivo de determinar la trazabilidad de dichas cepas a lo largo de la cadena alimentaria.

A nivel de consumidor, se recomienda que personas pertenecientes a grupos de riesgo: embarazadas, pacientes que reciben tratamiento por cáncer, sida o trasplante de órganos, personas mayores y lactantes, deben tomar precauciones más estrictas como:

- Evitar el consumo de productos lácteos hechos con leche no pasteurizada. Productos como quesos blandos fabricados con leche cruda, fiambres y productos cárnicos listos para comer, y pescados ahumados.
- Cocinar las sobras y los alimentos LPC hasta que estén muy calientes antes de consumirlos
- Respetar rigurosamente las instrucciones sobre los plazos y temperaturas de conservación que figuran en las etiquetas de los productos LPC para asegurarse que las bacterias que puedan contener no se multipliquen hasta alcanzar cifras peligrosamente elevadas. Otra forma eficaz de matar las bacterias es cocinando los productos.

4. OBJETIVOS

El objetivo general de este trabajo es realizar el análisis y discusión de la información epidemiológica asociada a brotes de listeriosis humana producidos por el consumo de alimentos a nivel mundial

Los objetivos parciales son:

- Aportar información epidemiológica de interés en brotes de listeriosis
- Identificar los principales subtipos moleculares de *L. monocytogenes* detectados en la industria alimentaria y su relación con estos brotes
- Conocer las técnicas actuales empleadas para la caracterización molecular e investigación epidemiológica de las cepas implicadas en dichos brotes

5. METODOLOGÍA

La metodología de este Trabajo Fin de Máster se basa en la búsqueda de información científica actualizada en diferentes fuentes de información como: base de datos, organismos y agencias nacionales, europeas e internacionales de seguridad alimentaria.

5.1. Diseño del trabajo

5.1.1. Periodo de la revisión. Periodo transcurrido de Enero de 2020 hasta Octubre de 2020.

5.1.2. Bases de datos consultadas. Se realizaron búsquedas en diferentes bases de datos, como:

- **Artículos científicos:**
 - Web Of Science (WOS)
 - Alcorze
 - Pubmed
 - ScienceDirect
 - Dialnet.
- **Bases de datos de legislación:**
 - EURlex
- **Agencias de Seguridad Alimentaria:**
 - AESAN (Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición)
- **Organismos nacionales, europeos e internacionales:**
 - CCAES (Centro de Coordinación de Alertas y Emergencias Sanitarias)
 - EFSA (European Food Safety Authority)
 - OMS (Organización Mundial de la Salud)
 - RASFF (Food and Feed Safety Alerts)

5.1.3. Palabras claves. Las palabras utilizadas para la búsqueda de los diversos papers en los que se ha basado este Trabajo Fin de Máster han sido los siguientes términos, relacionados todos con *L. monocytogenes*: *Listeria*, Genotypic characterization of isolates from *L. monocytogenes*, Phenotypic characterization of isolates from *L. monocytogenes*, Molecular subtypes,

Ready to eat (RTE), Food processing plants, Biofilm, Listeriosis, types of listeriosis, epidemiology, prevalence and control, y outbreak.

Los resultados obtenidos en las diferentes búsquedas quedan reflejados en la siguiente tabla (Tabla 4).

Tabla 4. Resultados de la búsqueda en diferentes bases de datos

Palabras clave	Resultados obtenidos	Artículos incluidos	Artículos excluidos
“Genotypic characterization of isolates from <i>L. monocytogenes</i>”	104	10	94
“Phenotypic characterization of isolates from <i>L. monocytogenes</i>”	139	9	132
“Molecular subtypes” and “<i>L. monocytogenes</i>”	115	8	109
“Pathogenicity” and “<i>L. monocytogenes</i>”	95	7	88
“<i>L. monocytogenes</i>” and “ready to eat (RTE)”	4275	4	4272
“food processing plants” and “<i>L. monocytogenes</i>”	673	4	670
“<i>L. monocytogenes</i>” and “biofilms formation”	1.291	2	1290
“Listeriosis”, “types of listeriosis”, “epidemiology”	1071	4	1067
“Listeriosis” and “prevalence and control”	319	4	315
“Outbreaks” and “listeriosis”	2377	13	2364

5.2. Criterios de inclusión y exclusión

Además de los artículos incluidos, se han revisado muchos que han sido excluidos aplicando los criterios que se muestran en la Tabla 5.

Tabla 5. Criterios de inclusión y exclusión

CRITERIOS DE INCLUSIÓN	CRITERIOS DE EXCLUSIÓN
Artículos que relacionan <i>Listeria monocytogenes</i>	Artículos que no relacionan <i>Listeria monocytogenes</i>
Artículos que relacionan <i>L. monocytogenes</i> y “food processing plants”	Artículos que no relacionan <i>L. monocytogenes</i> y “food processing plants”
Artículos que relacionan <i>L. monocytogenes</i> y “biofilms formation”	Artículos que no relacionan <i>L. monocytogenes</i> y “biofilms”
Artículos que relacionan <i>L. monocytogenes</i> y “molecular subtyping”	Artículos que no relacionan <i>L. monocytogenes</i> y “molecular subtyping”
Artículos que relacionan <i>L. monocytogenes</i> y listeriosis	Artículos que no relacionan <i>L. monocytogenes</i> y listeriosis
Artículos que relacionan <i>L. monocytogenes</i> y “brotes de listeriosis”	Artículos que no relacionan <i>L. monocytogenes</i> y “brotes de listeriosis”
Artículos desde el 1 de enero de 2010 hasta el 31 de Octubre de 2020	Artículos publicados hace más de 10 años
Artículos con texto completo gratuito disponible	Artículos sin texto completo gratuito disponible

En la figura 3 se muestra un diagrama con el total de artículos y los artículos incluidos y excluidos en este Trabajo Fin de Máster.



Figura 3. Diagrama de los criterios de inclusión y exclusión

5.3. Extracción de los datos

Con esta búsqueda hemos encontrado un total de 10.459 publicaciones de los que se han seleccionado 65 de ellas aplicando los criterios de inclusión y exclusión. (Tabla 5). Los *papers* seleccionados se separan en: caracterización de *L. monocytogenes*, epidemiología, prevención y control de la listeriosis, *L. monocytogenes* en la industria alimentaria, serotipos más comunes de *L. monocytogenes* en la industria alimentaria, tipificación de cepas de *L. monocytogenes* y brotes a nivel mundial, europeo y nacional de listeriosis.

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1. Subtipos moleculares

6.1.1. Serotipos

La estructura poblacional de *Listeria monocytogenes* ha sido clasificada mediante técnicas de tipificación en 4 linajes evolutivos y 13 serotipos (Figura 2). Inicialmente, sólo se conocían tres linajes filogenéticos hasta que se descubrió el linaje IV el cual posee algunas diferencias en términos de filogenia comparada con el resto (Wai et al., 2019).

Dentro de estos Linajes, las cepas se clasifican en serotipos separándose según los antígenos somático (O) y flagelar (H), incluyendo 13 serotipos: 1/2a, 1/2b, 1/2c, 3a, 3b, 3c, 4a, 4ab, 4b, 4c, 4d, 4e y 7 (Wai et al., 2019). Estas cepas difieren entre sí por su potencial epidémico y su capacidad para causar enfermedades (Martín et al., 2014). La mayoría de los aislados de este patógeno pertenecen al linaje I (incluye los serotipos 1/2b, 3b, 4b, 4d y 4e) y al linaje II (incluye los serotipos 1/2a, 3a, 1/2c y 3c). Las cepas pertenecientes al linaje III (serotipos 4a, 4c y algunas cepas atípicas de serotipo 4b) y al linaje IV son cepas poco frecuentes y se aíslan en animales con síntomas clínicos (Ortiz, 2016).

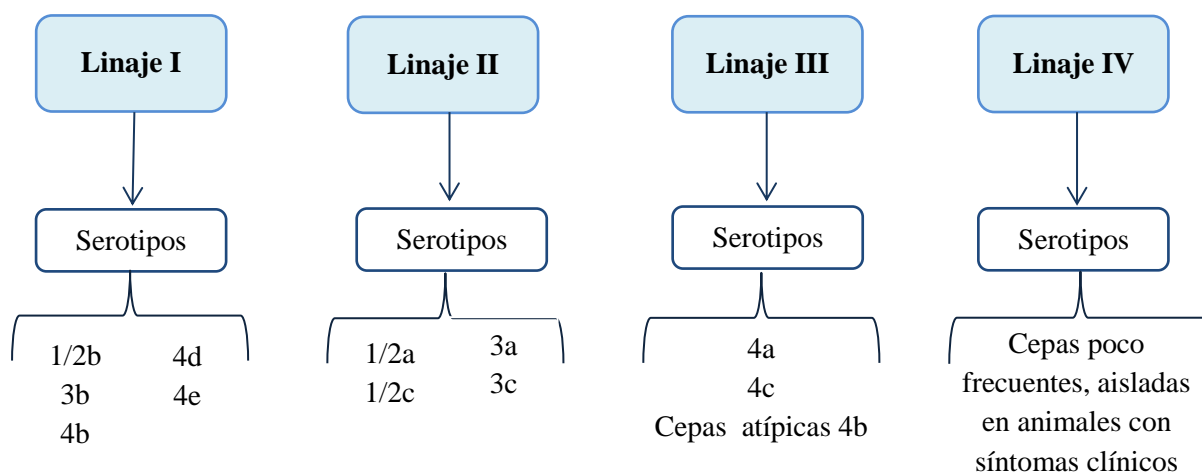


Figura 2: Esquema de los diferentes Linajes evolutivos y serotipos de *L. monocytogenes*

Las cepas aisladas con más frecuencia en los alimentos e industrias alimentarias pertenecen al Linaje I y II, mayoritariamente al linaje II (Ortiz, 2016), siendo los serotipos aislados con más frecuencia el 1/2a y 1/2b (Muñoz et al., 2011). Como

consecuencia, estos serotipos son los que han sido involucrados en más casos y brotes de listeriosis humana (aproximadamente 98% de los casos). En cuanto al serotipo 4b tiene más probabilidad de asociarse con brotes que con casos esporádicos (Martín et al., 2014).

6.1.2. Pulsotipos

Para evaluar la diversidad dentro de dichos grupos clonales se utiliza la técnica de Electroforesis en Gel de Campo Pulsado (PFGE), con la cual se ha demostrado que *L. monocytogenes* es una especie genéticamente heterogénea (Cantinelli et al., 2013).

La técnica PFGE da un patrón de bandas tras la restricción con las enzimas *AscI* y *Apal* el cual se conoce como pulsotipo (Figura 5). Gracias a estos pulsotipos es posible realizar un análisis de comparación de forma rápida y sencilla del conjunto de aislados (Ortiz, 2016).

6.1.3. Secuencias tipo (STs)

Las secuencias tipo (ST) se obtienen tras el análisis de Secuenciación de Múltiples Genes (MLST). Actualmente este método se ha desarrollado para una gran cantidad de bacterias, y las STs se recopilan en diversas bases de datos.

En nuestro patógeno de estudio, tras diversas investigaciones se ha concluido que las ST más comunes de *L. monocytogenes* a nivel mundial son 7: ST-1, ST-3, ST-5, ST-6, ST-8, ST-121 y ST-9. Las cepas de *L. monocytogenes* caracterizadas pertenecientes a estas STs son las responsables de la mayoría de los casos de listeriosis a nivel mundial (Wang et al., 2012).

6.1.4. Secuencias tipo de virulencia (VTs)

Las secuencias tipo de virulencia (VTs) se obtienen mediante el análisis por medio de la técnica de Secuenciación de Múltiples Genes de Virulencia (MVLST). Con la aplicación de esta técnica, en un estudio de Yunyi et al (2019) se determinaron un total de dieciocho VTs en aislados de *L. monocytogenes*: VT-45, VT-181, VT-183, VT-126, VT-59, VT-80, VT-94, VT-115, VT-11, VT-182, VT-8, VT-180, VT-124, VT-110, VT-63, VT-20, VT-21 y VT-14. Siendo cuatro VTs descritas por primera vez fueron: VT-180, VT-181, VT-182 y VT-183 (Yunyi et al., 2019).

6.2. Información epidemiológica de brotes de listeriosis

L. monocytogenes fue reconocida por primera vez como un patógeno humano en la década de 1920, pero no fue hasta la década de 1980 cuando se reconoció el primer brote de listeriosis transmitido por los alimentos, esta diferencia de años entre el descubrimiento del patógeno y su ruta de transmisión refleja la dificultad para el estudio epidemiológico de brotes de listeriosis.

En esta parte del trabajo, vamos a centrarnos en los brotes de listeriosis a nivel mundial, europeo y nacional poniendo en contexto la caracterización molecular de la cepa o cepas responsables de dicho brote. También vamos a hacer referencia a datos epidemiológicos de los diferentes brotes, identificando los patrones de distribución geográfica de la enfermedad, periodos durante los cuales se enfermaron las personas, los alimentos implicados en el brote, personas que hayan consumido alimentos en el mismo restaurante, comprado alimentos en la misma tienda o asistido a un mismo evento.

En los **Estados Unidos**, anualmente se informan alrededor de 800 casos confirmados de listeriosis, y por lo general, se identifican de 3 a 4 brotes por año. Los principales alimentos asociados a estos brotes suelen ser quesos blandos elaborados con leche no pasteurizada así como, productos cárnicos como fiambres y salchichas. A pesar de que otros alimentos como el pescado o los productos agrícolas no se relacionan a menudo con brotes, estos han causado brotes de listeriosis en los años 2009 y 2010 respectivamente (CDC, 2012).

Por otra parte, en **Europa** entre los años 2012 hasta 2017 se reportaron alrededor de 2555 casos de listeriosis anualmente al Sistema Europeo de Vigilancia (TESSy) distribuidos por 30 países de la Unión Europea (UE). De los casos reportados, Alemania representaba el 26%, Francia el 17% y España el 10%. El 54% de las infecciones graves por *L. monocytogenes* fueron más comunes en hombres y en personas mayores de 65 años (CCAES, 2019). El serotipo de *L. monocytogenes* 4b fue el más común, representando aproximadamente 400 notificaciones anuales en 13 países de la UE. La mayoría de los casos fueron de origen doméstico, afectando más a mujeres y personas mayores.

2011, la instalación sustituyó el método de lavado por uno sin recirculación y con agua municipal a la que no se le aplicaba cloro suplementario, y para limpiar y secar mecánicamente los melones utilizaban fieltro. Para implementar este cambio, se instaló equipos de lavado y secado utilizados anteriormente en operaciones de envasado de productos agrícolas crudos. Las recomendaciones de la FDA de preparación del melón (lavado y corte) consisten en frotar con un cepillo limpio especial para frutas y verduras durante el lavado y el secado del producto con un paño limpio para reducir el número de patógenos (McCollum et al., 2013).

En un estudio de Laksanalamai et al (2012) se analizaron un total de 35 aislados de *L. monocytogenes* obtenidos del melón, del entorno de procesado y de aislamientos clínicos. Tras el análisis y tipificación molecular de estas muestras se reveló que las cepas causantes del brote pertenecían a dos serotipos diferentes: 1/2a y 1/2b, las cuales se agrupaban en cuatro patrones (pulsotipos) diferentes PFGE. Los resultados confirmaron que este brote fue el primer brote de listeriosis notificado causado por cepas y serotipos diferentes de *L. monocytogenes*, en un solo producto (Laksanalamai et al., 2012).

Este brote confirma la viabilidad de los productos crudos como vehículo de transmisión de *L. monocytogenes*, así como, la importancia de las buenas prácticas agrícolas para minimizar la contaminación de los productos con diferentes patógenos (McCollum et al., 2013).

Brote 2. En julio de 2012 se detectó un brote **multiestatal de listeriosis en los Estados Unidos y el Distrito de Columbia** asociado con un queso suave y salado elaborado con leche de oveja pasteurizada de la marca “*Marte Brand Frescolina Ricotta Salata*” e importado de Italia. Se identificó *L. monocytogenes* mediante subtipificación molecular en muestras de diferentes cortes de quesos y envasadoras de queso. La subtipificación molecular se realizó mediante PFGE.

Se inició una investigación del brote en la cual se notificaron un total de 22 casos de listeriosis en pacientes de 13 estados de los Estados Unidos y el Distrito de Columbia. En la Tabla 6 se muestra el número de casos de listeriosis por Estados.

Tabla 6: Número de personas infectadas en los diferentes estados.

Estado	Número de casos	Estado	Número de casos
Washington	1	Pennsylvania	2
California	3	Ohio	1
Colorado	1	Virginia	2
Nuevo México	1	Nueva Jersey	3
Nebraska	1	Washington, D.C	3
Minnesota	1	Massachusetts	1
Nueva York	1	Distrito de Colombia	1

Fuente: CDC, 2012

Veinte pacientes fueron hospitalizados, de los cuales 3 (14%) murieron después de la infección. Nueve casos (41%) se describieron en mujeres embarazadas, aislándose *L. monocytogenes* en sangre materna o en el tejido placentario, y se informó de una pérdida fetal y de la muerte de un recién nacido. De los 13 pacientes, la mayoría mujeres, con listeriosis no asociada al embarazo, las edades oscilaron entre 30 y 87 años.

El mismo patrón PFGE, serotipo 1/2a, se aisló en 18 casos clínicos y 5 muestras de queso. Esta misma cepa se relacionó con muestras de marisco congelado en 2003.

Se identificó un punto común en los pacientes ya que habían consumido queso de la misma marca. Seis pacientes informaron haber consumido Ricotta salata, otro informó haber consumido queso probablemente cortado con equipos también utilizados durante el proceso de producción de la misma Ricotta salata, y nueve más informaron haber consumido quesos contaminados comercializados por la marca “*Marte Brand Frescolina Ricotta Salata*” (Heiman et al., 2012). Mediante la información aportada por el trabajo de Filipello et al (2017) sabemos que este brote fue causado por *L. monocytogenes* serotipo 1/2a (secuencia tipo de virulencia, VT-80).

Brote 3. En **Sudáfrica**, a mediados de junio de 2017 el Instituto Nacional de Enfermedades Transmisibles (NICD) fue notificado de un aumento inusual de casos de listeriosis en Gauteng una provincia del Sur de África. El pico de este brote se sitúa en noviembre de 2017 con un total de 41 casos de listeriosis reportados en una sola semana. Este brote, llegó a afectar a un total de 1060 individuos, de los cuales se registraron 216 muertes (esto se ajusta a la tasa de letalidad de listeriosis que puede

alcanzar hasta el 30%). La edad media de las personas afectadas fue de 19 años, aunque el grupo más afectado fue el de los neonatos. En cuanto al sexo, la mayoría fueron mujeres.

Respecto a la fuente de contaminación, se ha sugerido que se trataba de la “Polony” un producto cárnico procesado LPC similar a la mortadela. Las investigaciones apuntaron a las instalaciones de producción de carne procesada en Sudáfrica, llamada *Enterprise Foods* como responsable de la fabricación de estos productos alimenticios. De estas instalaciones se aislaron muestras de *L. monocytogenes* con secuencia tipo ST-6 de diversas superficies de contacto con los alimentos incluyendo distintas áreas de producción. Además, esta cepa también se encontró en varios alimentos fabricados en dichas instalaciones. Como consecuencia, se retiraron del mercado los productos alimenticios afectados y se cerraron las instalaciones de producción *Enterprise Foods*.

El análisis de los aislados se llevó a cabo mediante la aplicación de diferentes métodos. Con el método MLST se determinó que el 91% de los aislamientos clínicos tenían secuencia tipo 6 (ST-6), la cual se detectó en muestras ambientales como en productos cárnicos LPC de la planta de producción de carne sudafricana, *Enterprise Foods*. El análisis MLST de genoma central (cgMLST) mostró que todos los aislamientos, tanto clínicos como no clínicos, no tenían más de 4 diferencias alélicas entre sí, lo que sugiere una alta relación epidemiológica. La base de datos de secuencias del genoma de aislados bacterianos para *L. monocytogenes* (BIGSdb-*lm*) asignó a estos aislados ST-6 un número de perfil cgMLST 4148 (CT4148), un perfil exclusivo de los aislamientos sudafricanos y que no habían sido identificados en ningún otro país del mundo. Y el análisis mediante PCR múltiple (mPCR) mostró que los aislados de ST-6 pertenecían al serotipo 4b (Smith et al., 2019).

Con los datos generados durante dicho brote, la listeriosis se incluyó a la lista sudafricana de enfermedades de declaración obligatoria, fortaleciendo los sistemas de vigilancia en la cadena alimentaria sudafricana para prevenir y facilitar la detección temprana de casos esporádicos y brotes de infecciones causadas por este patógeno alimentario (Tchatchouang et al., 2020).

6.2.2. Brotes de listeriosis a nivel europeo

Brote 4. En varios países de **Europa** se reportaron un total de 32 casos de listeriosis entre los años 2016 y 2018. En junio de 2018, la EFSA y el Centro Europeo de Prevención y Control de Enfermedades (ECDC) informaron de que, probablemente, el maíz congelado había sido el origen de un brote por *L. monocytogenes* que había afectado a cinco países de Europa: Austria, Dinamarca, Finlandia, Suecia y Reino Unido.

Tras el análisis de Secuenciación del Genoma Completo (WGS), se mostró una fuerte relación entre los aislados humanos y ambientales. Esto sugiere un fuerte potencial de alimentos contaminados relacionados con el maíz congelado que persistía a lo largo de la cadena alimentaria en la industria desde 2016. En la evaluación realizada por la EFSA y ECDC en 2018 se confirmó un brote originado por *L. monocytogenes* serotipo 4b y ST-6 relacionado con maíz congelado y probablemente con otros vegetales congelados producidos durante las temporadas de 2016, 2017 y 2018. La trazabilidad de las muestras analizadas permitió identificar el origen del brote en una planta de producción de Hungría. La cepa causante dicho brote también se detectó en Austria en muestras de vegetales congelados con origen en Hungría.

Hasta mediados de junio de 2018 se habían reportado 47 casos y 9 fallecimientos debidos a la infección por *L. monocytogenes*. En la siguiente tabla (Tabla 7) se indican los casos confirmados y las muertes en cada uno de los países afectados por dicho brote (EFSA y ECDC, 2018).

Tabla 7. Casos confirmados y muertes en los diferentes países afectados por dicho brote

País	Número de casos	Número de muertes
Austria	2	1
Dinamarca	4	1
Finlandia	23	2
Suecia	7	3
Reino Unido	11	2
TOTAL	47	9

Fuente: EFSA y ECEC, 2018

El estudio epidemiológico demostró que, la cepa de *L. monocytogenes* 4b, ST-6 desencadenante del brote coincidió con la cepa identificada en maíz congelado y en otros vegetales congelados producidos por la planta investigada en Hungría (2016-

2018). Por ello, el estudio llevado a cabo por la EFSA y ECDC, sugiere que puede tratarse de una cepa persistente en el ambiente de la planta de procesado, lo que indicaría que sobrevive a los procedimientos habituales de limpieza y desinfección. Por ello, el uso de las mismas líneas de producción para diferentes vegetales, representa un riesgo de contaminación cruzada a otros productos. La presencia de cepas persistentes de este patógeno es un factor de riesgo, que se agrava cuando las cepas son altamente virulentas (EFSA y ECEC, 2018).

L. monocytogenes ST-6 es un clon hipervirulento asociado a listeriosis invasiva, que afectan especialmente a mujeres embarazadas, personas mayores e individuos con el sistema inmunológico comprometido. Este genotipo emergente ST-6 se ha identificado como el principal factor que conduce a un pronóstico desfavorable en los casos de listeriosis (Koopmans et al., 2013).

Brote 5. En **Dinamarca** se produjo un brote de listeriosis en agosto de 2017 asociado al salmón ahumado. El Statens Serum Institut (SSI) identificó mediante el análisis MLST la misma cepa de listeria en 6 personas diferentes, de las cuales 1 de ellas murió. Esta cepa pertenecía a la secuencia tipo 8 (ST-8).

La edad media de las personas afectadas fue de 80 años siendo la mayoría mujeres. Todos los pacientes tenían en común el hecho de tener una enfermedad subyacente y no tenían antecedentes de viajes.

El estudio epidemiológico mostró que la fuente de contaminación fue el consumo de salmón ahumado en frío y fileteado producido por una empresa situada en Polonia, aunque este producto únicamente se comercializó en Dinamarca. Se analizó una muestra de los lotes sospechosos antes del final de la vida útil y se cuantificó 240 UFC de *L. monocytogenes*/g.

Como consecuencia, el Grupo Danés de Gestión de Brotes (DVFA) obligó la retirada de dicho producto debido al incumplimiento del criterio microbiológico, < 100 UFC/g a lo largo de su vida útil.

Dicho brote fue notificado internacionalmente a través de diferentes plataformas de comunicación como el Sistema Europeo de Información de Inteligencia sobre Epidemias para Enfermedades Transmitidas por los Alimentos y el Agua (EPIS-FWD).

El Centro Nacional de Referencia de Francia (NRC) para *Listeria*, comparó las secuencias de los aislados clínicos daneses y observó que un aislado humano de un residente francés pertenecía al mismo grupo (L2-SL8-ST8-CT771) que los aislados daneses, perteneciente a una mujer de 80 años la cual fue diagnosticada en junio de 2016. En este caso, no se dispuso de información sobre el consumo de alimento y la posibilidad de haber viajado a Dinamarca, ya que dicho paciente había fallecido en el momento de la investigación.

Tras este hallazgo se analizaron muestras de salmón ahumado refrigerado producido por la misma empresa y, se obtuvieron recuentos de hasta 460 UFC/g. Tras el análisis mediante cgMLST se mostró que pertenecía al mismo tipo que el del brote danés. Como consecuencia, dicho producto se retiró del mercado a pesar de que no se habían descrito casos de listeriosis asociados a su consumo.

Cabe destacar que el producto de salmón contaminado en Dinamarca y Francia no pertenecía al mismo lote de fabricación, por lo que la contaminación de ambos sugiere una posible contaminación cruzada, a partir del ambiente de procesado de la empresa (Schjørring et al., 2017).

6.2.3. Brotes de listeriosis a nivel nacional

Brote 6. En 2019, en España se describió un brote de listeriosis situado en Andalucía y que afectó a 5 Comunidades Autónomas diferentes. El 16 de agosto de 2019, las autoridades sanitarias de esta Comunidad Autónoma notificaron un brote de infección alimentaria por *L. monocytogenes* al Centro de Coordinación de Alertas y Emergencias Sanitarias (CCAES) del Ministerio de Sanidad, Consumo y Bienestar Social (MSCBS). Este brote estaba asociado al consumo de un producto LPC de carne de cerdo asada y refrigerada fabricado en España por la empresa *Magrudis S.L.*, situada en el municipio de Sevilla, y vendido con el nombre comercial de “*La Mechá*”.

Desde la última semana de julio de ese mismo año, se detectaron pequeños brotes intrafamiliares de listeriosis asociados al consumo de carne mechada. Tras la investigación realizada por los servicios de Control Oficial de la Junta de Andalucía, se descubrieron otros alimentos producidos en la misma fábrica donde se aisló *L. monocytogenes*. La WGS de aislados de *L. monocytogenes* reveló que las cepas clínicas y alimentarias compartían la misma secuencia. Así mismo, las investigaciones de

trazabilidad revelaron que los productos afectados solo se habían distribuido en España, mayoritariamente en Andalucía. A través de la Red Internacional de Autoridades en materia de Inocuidad de los alimentos (INFOSAN), se confirmó que ninguno de los productos incluidos en la actualización se había distribuido fuera de España. Esta información fue transmitida a través del Sistema RASFF de la Comisión Europea.

Las autoridades españolas notificaron el brote a la OMS a través de la Red INFOSAN. Días después, las autoridades españolas emitieron una alerta en relación con la inocuidad de los alimentos donde se aconsejaba a los consumidores evitar todo producto vendido con ese nombre comercial. Además, parte de esta carne de cerdo asada y refrigerada era comercializada como producto de marca blanca por otra empresa.

Desde julio hasta septiembre de 2019 se notificaron 222 casos confirmados vinculados al brote en cinco comunidades autónomas diferentes: Andalucía (214), Aragón (4), Extremadura (2), Castilla y León (1) y Madrid (1). La mayoría de los afectados fueron mujeres, 38 de las cuales embarazadas, y personas mayores de 65 años. Se notificaron 3 muertes y 6 abortos espontáneos como consecuencia de la infección. El 23 de agosto, Francia notificó a través del Sistema de Alerta Precoz y Respuesta (SARP) de la Comisión Europea, el caso de un ciudadano extranjero que había viajado a Andalucía y había consumido el producto en cuestión. Solo se han registrado 3 casos de listeriosis con una fecha de consumo posterior al 17 de agosto, pero en los 3 casos el producto se había adquirido antes de notificarse la alerta alimentaria (CCAES, 2019).

La tipificación molecular de las cepas muestra una estrecha relación genética entre 158 de los 172 aislados, siendo la cepa implicada identificada *L. monocytogenes* serotipo 4b y ST-388 (CC388).

En la Tabla 8 se muestra un resumen de la tipificación de los subtipos moleculares pertenecientes a las cepas causantes de los brotes descritos anteriormente. Para completar dicha tabla se ha buscado información en la base de datos de Listeria del Instituto de Pasteur (<http://www.pasteur.fr/mlst>), en la que se incluye información del perfil MLST en la cual se puede buscar información acerca de multitud de cepas de *L. monocytogenes*, implicadas o no en brotes. Actualmente, la base de datos cuenta con 4036 entradas, de las cuales únicamente 33 están asociadas a casos confirmados y 2344 secuencias tipo (STs) diferentes.

Tabla 8: Tabla resumen de la tipificación de los brotes a nivel mundial, europeo y nacional

	Brote	Año	Serotipo (Linaje)	MLST	cgMLST	CC	Alimento	Referencia
NIVEL MUNDIAL	Brote 1. Brote multiestatal de los EEUU. De los 147 afectados se registraron un total de 33 muertes.	2011	1/2a (L-II) 1/2b (L-I)				Melón	Laksanalamai1 et al., 2012 McCollum et al., 2013
	Brote 2. Brote multiestatal de los EEUU y el Distrito de Columbia. Este brote afectó a 22 personas de las cuales 3 murieron.	2012	1/2a (L-II)				Ricotta salata	Heiman et al., 2012 Filipello et al., 2017
	Brote 3. Brote de Sudáfrica. El cual afectó a 1060 individuos de los cuales se registraron 216 muertes.	2017 - 2018	4b (L-I)	ST-6	CT-4148	CC6	Productos cárnicos LPC, producidos por la empresa <i>Enterprise Foods</i> .	Smith et al., 2019
NIVEL EUROPEO	Brote 4. Brote que afectó a Austria, Dinamarca, Finlandia, Suecia y Reino Unido. Con un total de 32 casos.	2016 - 2018	4b (L-I)	ST-6		CC6	Maíz congelado	EFSA y ECEC, 2018
	Brote 5. Brote en Dinamarca y Francia. Afectó a 6 personas de las cuales se registró una muerte.	2017	1/2c (L-II)	ST-8	CT-771	CC8	Salmón ahumado/curado o refrigerado	Schjørring et al., 2017
NIVEL NACIONAL	Brote 6. Brote en España que afectó a 222 individuos y se registraron un total de 3 muertes y 6 abortos espontáneos.	2019	4b (L-I)	ST-388	CT-8466	CC38 8	Productos LPC de carne de cerdo asada y refrigerada	CCAES, 2019

6.3. Revisión de los principales subtipos moleculares de *L. monocytogenes* aislados de la industria alimentaria y su relación epidemiológica con brotes

Como se ha señalado a lo largo de esta revisión, una misma cepa de *L. monocytogenes* puede estar presente en productos procedentes de diferentes industrias. A continuación, vamos a describir los principales subtipos moleculares de este patógeno que han sido aislados en diversas industrias alimentarias y la relación de estos subtipos con los brotes que hemos descrito en el punto 6.2. Para ello se va a aportar la información de industrias alimentarias dedicadas a la elaboración de diferentes alimentos: productos vegetales, productos lácteos, productos cárnicos y productos de la pesca.

6.3.1. Industria de productos vegetales

Diversos estudios centrados en la caracterización de aislados de *L. monocytogenes* en muestras de productos vegetales, han mostrado que el serotipo más observado es el **4b** (Anderson et al., 2012 y Soni et al., 2014). En el estudio de Soni et al (2014) las muestras fueron obtenidas de diferentes vegetales como berenjena, coliflor, tomate y pimiento, así como del ambiente (suelo) de estos cultivos. Mientras que las muestras recogidas en el estudio de Anderson et al (2012) se centraron en vegetales LPC obtenidos del mercado de San Pablo, Portugal. En este estudio se analizaron un total de 512 muestras, y como conclusión de la investigación se muestra que las hortalizas frescas pueden ser vehículo de *L. monocytogenes* de diferente serotipo, ya que a pesar de que la mayoría de las cepas eran serotipo 4b también se observaron en menor medida cepas 1/2b. Por otro lado, en un estudio realizado por Ballesteros et al. (2012) en el cual se analizan un total de 91 cepas aisladas de productos vegetales congelados durante un periodo de 3 meses, observaron que la mayoría de estas cepas pertenecían al serotipo 1/2a.

Al relacionar esta información con la obtenida de los brotes, podemos ver que el serotipo causante del **brote 4** (consumo de maíz congelado), pertenecía al serotipo 4b, pudiendo ser común en la industria de vegetales (Anderson et al., 2012 y Soni et al., 2014). El serotipo 1/2a, también es común en estos productos como se ha observado en los aislamientos de *L. monocytogenes* del estudio de Ballesteros et al (2012), por lo que también podemos relacionar el serotipo de las cepas aisladas del **brote 1** (consumo de melón) con este estudio.

6.3.2. Industria de productos lácteos

En varios estudios, (Kevenk et al., 2016 y Abdellaoui et al., 2020), centrados en el aislamiento de *L. monocytogenes* de productos de la industria láctica se detectó el **serotipo 4b** como serotipo más frecuente. En el estudio de Kevenk et al (2016) se analizaron diferentes productos lácteos de la industria de Samsun, Turquía en el periodo de noviembre de 2011 hasta abril de 2012. Se analizaron 100 muestras de leche cruda y 110 de diferentes productos lácteos (queso blanco, kashar, helado, mantequilla, cokelek y kuymak. La tipificación se realizó mediante mPCR y aunque el serotipo predominante fue el 4b, también se aislaron cepas pertenecientes a los serotipos 1/2a, 1/2b y 1/2c. Del total de muestras de leche cruda, 20 pertenecían al serotipo 4b y 5 pertenecían al serotipo 1/2b. Por su parte, para las muestras del resto de productos lácteos el serotipo predominante fue el 1/2b (15 aislados), 6 aislados se tipificaron como 1/2a y otros 6 como 1/2c. En el estudio de Abdellaoui et al (2020) las muestras pertenecían a diferentes tipos de quesos de vaca, obtenidas en diferentes etapas del proceso de producción de una industria de Argel. Del total de muestras analizadas (385), se aisló *L. monocytogenes* en 20 muestras. Tras la tipificación mediante mPCR se observó de nuevo que el serotipo más común fue 4b, seguido de 1/2b, y únicamente dos aislados fueron serotipo 1/2a. Las muestras más contaminadas se obtuvieron del área de procesado de quesos duros seguida del área de quesos prensados y por último en el área de producción de quesos blandos.

Relacionando la información de los brotes estudiados, podemos observar que el **brote 2**, causado por el consumo de Ricotta salata, fue producido por cepas del serotipo 1/2a. A pesar de que el estudio realizado por Abdellaoui et al (2020) muestra como serotipo predominante el 4b, también se observan aislados del serotipo 1/2a. Que el serotipo predominante no coincida con el serotipo causante del brote 2, puede deberse a que la leche con la que se elaboran estos quesos no es la misma, ya que el Ricotta salata se elabora con leche de oveja y en el estudio de Abdellaoui et al (2020) analizan muestras de queso elaborado con leche de vaca.

Como hemos visto, aunque los aislados *L. monocytogenes* procedentes de productos lácteos pueden pertenecer a diferentes serotipos, el más frecuente es el serotipo 4b, si bien se ha observado los estudios Kevenk et al (2016) y Abdellaoui et al (2020) los serotipos 1/2a, 1/2b y 1/2c. Por lo que la presencia de cualquier serotipos en la industria

es de gran preocupación para la salud pública, ya que todos ellos han estado implicados en casos y brotes de listeriosis humana (Abdellaoui et al., 2020).

6.3.3. Industria de productos cárnicos

En varios estudios centrados en la caracterización de *L. monocytogenes* en la industria cárnica se observó con mayor frecuencia el **serotipo 1/2a**. En el estudio de Martín et al (2014) se aislaron un total de 106 muestras de diferentes plantas de procesado de carne y productos cárnicos en España, observándose 1/2a como serotipo aislado con mayor frecuencia en las superficies de contacto y en los productos cárnicos. Por su parte, en este estudio se analizaron diferentes muestras del ambiente de industrias cárnicas y productos cárnicos, tras la tipificación se obtuvo mayoritariamente el serotipo 1/2a en los aislados de *L. monocytogenes*. En un último estudio de Matle et al (2019) se analizaron un total de 2017 muestras de diferentes industrias cárnicas en Sudáfrica entre los años 2014-2016, pertenecientes tanto al mercado nacional como al mercado de carne importada. El análisis de ambos tipos de muestras mostró unos recuentos entre 1-4 log UFC/g. Tras el análisis mPCR se detectó que la mayoría de las cepas de estos aislados pertenecían al serotipo 1/2a.

Diversos autores concluyen que tras el análisis MLST, se observó que las cepas de *L. monocytogenes* aisladas de la industria cárnica, pertenecían mayoritariamente a ST-121 (Martín et al., 2014, Wu et al., 2016 y Martín et al., 2018), a pesar de ello cabe destacar que ST-9 se observó con frecuencia en estos productos (Martín et al., 2014, Wu et al., 2016 y Martín et al., 2018). En el estudio de Knudsen et al (2017) se observó mayoritariamente ST-6 tras el análisis de 233 cepas de *L. monocytogenes* de diferentes industrias danesas.

En relación con los brotes que hemos analizado más profundamente, el **brote 3** producido por el consumo de productos cárnicos LPC fue causado por una cepa de *L. monocytogenes* ST-6, serotipo 4b. A pesar de que ST-121 es el que más frecuente en las muestras de productos cárnicos, también es frecuente encontrar aislados ST-9 y ST-6. Por otra parte, en cuanto al serotipo, aunque el más común en la industria cárnica sea el 1/2a, el principal brote causado por el consumo de productos cárnicos (brote 3) fue causado por una cepa de *L. monocytogenes* serotipo 4b. Esto puede deberse a que las cepas de *L. monocytogenes* aisladas de productos cárnicos varían en serotipo

dependiendo del tipo de producto del que se aíslen, ya que existe una amplia variedad de productos cárnicos con diferentes preparaciones.

6.3.4. Industria de productos de la pesca

En diversos estudios centrados en la caracterización de *L. monocytogenes* en diferentes muestras de productos pesqueros, se obtuvo como serotipo predominante **1/2a** en la mayoría de dichos estudios (Siriken et al., 2013, Acciari et al., 2017 y Dimitrijevic et al., 2011). En el estudio de Siriken et al (2013) se recogieron un total de 150 muestras de diferentes productos pesqueros (anchoas saladas, anchoas crudas y mejillones crudos) recolectados de pequeños productores de Samsun, Turquía. A pesar de la diferente tasa de contaminación entre los productos pesqueros, en todos ellos se detectó *L. monocytogenes*, siendo las anchoas saladas el producto con mayor tasa de contaminación. Por otra parte, en el estudio realizado por Acciari et al (2017), se analizaron un total de 774 muestras de salmón ahumado adquirido del mercado de Italia pero producido en diferentes plantas de 12 países de la Unión Europea. Del total de muestras, se detectó *L. monocytogenes* en 157 y tras la tipificación se detectó como serotipo principal 1/2a. Por último, en el estudio realizado por Dimitrijevic et al (2011) se recolectaron muestras tanto del ambiente de procesado (165 muestras) como de diferentes partes de la trucha ahumada (105 muestras). Tras el análisis se detectaron 10 muestras contaminadas por *L. monocytogenes* procedentes del ambiente (6%), y 14 muestras contaminadas con dicho patógeno procedentes del producto antes del envasado al vacío (13%).

Sin embargo existe variabilidad en la industria en relación a los serotipos de *L. monocytogenes*. En el estudio realizado por Gudmundsdóttir et al (2010) evaluaron la contaminación por *L. monocytogenes* en camarones cocidos pelados y en el entorno de dos plantas de procesamiento de dichos camarones. Se recogieron un total de 82 muestras de producto y 613 muestras del ambiente. Se detectó *L. monocytogenes* sólo en muestras ambientales, pero no en los producto. Del total de 172 aislados de *L. monocytogenes* caracterizados se obtuvo un serotipo predominante diferente en cada una de las fábricas 1/2c y 4b. (Gudmundsdóttir et al., 2010).

El **brote 5** (salmón ahumado) fue causado por el consumo de este producto contaminado, siendo el serotipo causante 1/2c. Como hemos visto, este serotipo, entre otros, es común en los productos de la industria pesquera.

6.4. Técnicas moleculares utilizadas para la caracterización del patógeno implicado en los brotes

Como ya hemos explicado a lo largo de esta revisión, los brotes de listeriosis son causados por diferentes cepas. Por lo que es muy importante tanto la identificación de estas cepas, así como su subtipificación.

Para realizar esta caracterización molecular existen diferentes técnicas que se van a explicar a continuación.

6.4.1. PCR múltiplex (mPCR)

La PCR múltiplex (mPCR) amplifica simultáneamente en una única reacción, diferentes secuencias diana. La especificidad, rendimiento y fiabilidad de esta variante PCR depende de la mezcla de reacción, cebadores utilizados, ciclos de amplificación y DNA polimerasa.

La mPCR ha tenido gran éxito en el diagnóstico de algunos agentes patógenos, así como en el análisis simultáneo de marcadores múltiples incluyendo deleciones, mutaciones, polimorfismos y análisis cuantitativos. Es interesante el desarrollo de protocolos de mPCR en tiempo real (RT-PCR) de forma que se pueda monitorizar la cinética de reacción, conocer la cantidad de DNA molde y detectar la presencia de variaciones genéticas. Por ello, la técnica PCR-multiplex constituye una herramienta eficaz para la detección precoz de varios agentes patógenos. En el estudio epidemiológico de infecciones por *L. monocytogenes*, la mPCR permite identificar los distintos serotipos (Bolívar, et al., 2014).

6.4.2. Electroforesis en Gel de Campo Pulsado (PFGE)

La electroforesis en Gel de Campo Pulsado, PFGE, tiene su origen en 1984 cuando Schwartz y Cantor idearon una técnica para separar moléculas de un tamaño inferior a 10 Mb de DNA. Este método se basa en la capacidad que tiene el DNA para desplazarse a través de un gel de agarosa con la influencia de dos campos eléctricos. Estos campos

eléctricos se denominan pulsos porque no tienen un ángulo uniforme en la intensidad de campo y cambian de manera alterna. Todo esto tiene la finalidad de que las moléculas grandes de DNA sean elongadas a lo largo de la dirección del campo eléctrico con el fin de penetrar a través de los poros del gel de agarosa, por eso cuanto más grandes sean las moléculas de DNA, mayor será el tiempo para encontrar la nueva orientación y la retención en el gel de dicha molécula (Southern et al., 1987).

Así, el fundamento de esta técnica electroforética consiste en la separación de fragmentos de DNA generados tras la digestión del genoma completo mediante unas enzimas específicas, endonucleasas de restricción (*AsaI* y *ApaI*), obteniéndose un patrón de bandas de DNA que es específico para cada cepa. La combinación de estas dos enzimas, en aislados de *L. monocytogenes*, otorga mejores resultados obteniéndose un buen poder discriminativo, el análisis con *ApaI* suele ser más discriminatorio pudiendo diferenciar un mayor número de subtipos (Figura 5). Por ello esta técnica es muy útil para establecer relaciones genéticas entre diferentes aislados. A pesar de que la PFGE tiene diferentes tipos de conformaciones de los electrodos, la única variante utilizada para la tipificación de *L. monocytogenes* es la variante CHEF. Esta técnica se caracteriza por la disposición de los electrodos de forma hexagonal, generando así un ángulo de reorientación del DNA de 120 °C (Cardozo-Bernal et al., 2013). Esta técnica se caracteriza por ser la más apropiada por su alta reproducibilidad, por su gran resolución obtenida (siendo superior en moléculas de hasta 7 Mb), y por permitir estudiar de forma simultánea un mayor número de muestras. Entre sus ventajas destaca su gran poder de separación si se compara con la electroforesis convencional (Birren y Lai, 1993). Además de su alta reproducibilidad y poder de discriminación, permite conocer la persistencia y presencia de cepas de *L. monocytogenes* en la industria de procesamiento de alimentos, detectando así cual es la fuente de contaminación (Brito et al., 2008).

En el año 2000, el Centers for Disease Control and Prevention (CDC) estableció la PFGE como método de referencia para la tipificación de *L. monocytogenes*. Este organismo creó un sistema de tipificación y vigilancia para la detección y seguimiento de brotes producidos por patógenos alimentarios a nivel mundial, denominado PulseNet.

El protocolo estandarizado para la subtipificación de *L. monocytogenes* consigue reducir los tiempos de análisis pasando de 7 días a 30 horas aproximadamente, por lo que esta técnica supone una reducción tanto del tiempo de análisis como de dinero (Graves y Swaminathan, 2001).

Gracias a la utilización de la PFGE, se permite el intercambio rápido de información entre laboratorios facilitando el conocimiento de la “epidemiología global”.

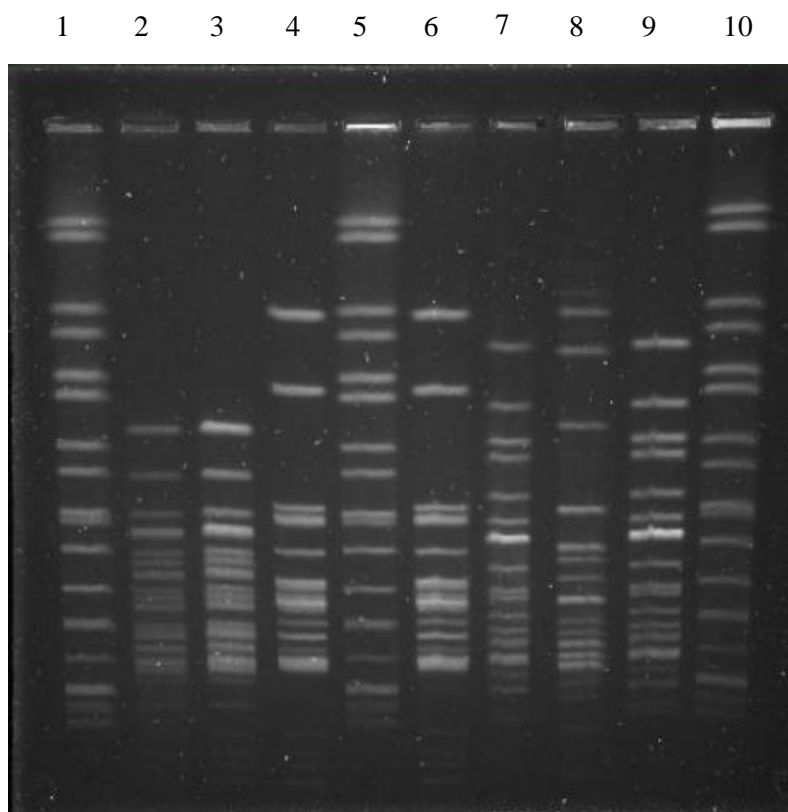


Figura 5: Imagen de un Gel de agarosa con patrones de bandas pertenecientes a *L. monocytogenes* y a *Salmonella* Braenderup (cepa control). Se muestra un Gel de agarosa con las bandas pertenecientes a *L. monocytogenes* (carriles 2, 3, 4, 6, 7, 8 y 9) y la cepa control, *Salmonella* Braenderup H9812, (carriles 1, 5 y 10). El gel de agarosa que se observa en la imagen posee las bandas obtenidas tras la PFGE con *Apal*.

Fuente: Calleja, 2019

6.4.3. Secuenciación de múltiples genes (MLST)

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 la Secuenciación de Múltiples Genes (MLST) que permite establecer relaciones filogenéticas entre los aislados.

La técnica MLST es un procedimiento para caracterizar aislamientos de especies bacterianas utilizando las secuencias de fragmentos internos de siete genes altamente conservados. Esta técnica se basa en los principios de la electroforesis enzimática multilocus (MLEE), pero difiere de ésta en que asigna alelos en múltiples locus directamente mediante secuenciación de DNA, en lugar de indirectamente a través de la movilidad electroforética de sus productos genéticos (Maiden et al., 1998). La técnica MLEE fue durante muchos años un método estándar en genética de poblaciones eucariotas y sistemáticas, con ella se establecieron marcos genéticos poblacionales básicos para el análisis de la variación en serotipos y otras características fenotípicas (Selander et al., 1986).

La tipificación mediante MSLT adicionalmente subdividió a *L. monocytogenes* en 63 grupos filogenéticos conocidos como Complejos Clonales (CCs), de los cuales algunos son altamente prevalentes, y se han asociado con casos clínicos de listeriosis por todo el mundo (Toledo et al., 2018). La mayoría de los brotes principales fueron causados por un pequeño número de clones epidémicos (ECs): ECI, EC1a y ECII (pertenecientes al serotipo 4b) y ECIII (dentro del serotipo 1/2a) (Martín et al., 2014). Para definir los grupos clonales de *L. monocytogenes* existen dos conjuntos de genes: tipificación mediante MLST y tipificación mediante MVLST (Cantinell et al., 2013).

MLST permite identificar tanto la fuente de contaminación en la industria alimentaria, como para el análisis epidemiológico de casos y brotes.

Actualmente este método se ha desarrollado para una gran cantidad de bacterias, y tanto los alelos como los tipos de secuencia (ST) se están recopilando en bases de datos, lo que permite la distribución de datos a nivel internacional.

El estudio de Salcedo et al, (2003) fue el primer paso para el desarrollo del método MLST relacionado con *L. monocytogenes*. El resultado del método fue comparable con los resultados obtenidos por PFGE, permitiendo la comparación e intercambio de resultados obtenidos en diferentes laboratorios. En este estudio se concluye que la aplicación futura de este método molecular podría ser una herramienta útil para los sistemas de vigilancia de listeriosis permitiendo la identificación y distribución de

análisis de clones de *L. monocytogenes* en el medio ambiente. Además, dicha técnica aporta información acerca del complejo clonal (CC) al que pertenecen los aislados.

Estos métodos actualmente tienen el inconveniente de ser costosos de tiempo y dinero, concretamente en la industria alimentaria, donde se aíslan muchas cepas bacterianas, lo que hace que el método sea poco práctico para este fin. Se han buscado variantes de este método, como es el método MLST de alto rendimiento (Hi-MLST) el cual utiliza un secuenciador de última generación que permite analizar simultáneamente las secuencias de una gran cantidad de fragmentos (Takahashi et al., 2017).

6.4.4. Secuenciación de múltiples genes de virulencia (MVLST)

A partir del MLST, se desarrolló el método MVLST basado en la secuenciación de 6 genes de virulencia: *prfA*, *inlB*, *inlC*, *dal*, *lisR* y *clpP*. Además, dicha técnica aporta información acerca del clon epidémico (EC) de los aislados proporcionando un poder discriminatorio mayor que el método PFGE y MLST (Chen et al., 2007).

6.4.5. Secuenciación del genoma completo (WGS)

La técnica de secuenciación del genoma completo, WGS, se empezó a aplicar a aislados de *L. monocytogenes* en 2013 con la creación de un proyecto en el que participaron el Centro para el Control y Prevención de Enfermedades (CDC), la Administración de Alimentos y Medicamentos de los EE.UU (FDA), así como el Departamento de Agricultura de los EE.UU y el Centro Nacional de Información Biotecnológica y los departamentos de salud estatales y locales.

El fundamento de esta técnica se basa en la ruptura al azar del DNA de interés en fragmentos pequeños, que posteriormente se unen a un soporte (nanoesferas en suspensión o una interfaz sólida). La inmovilización en espacios separados de los fragmentos de DNA molde, permite que se produzcan de manera simultánea miles de reacciones de secuenciación, mediante un proceso de sucesivas incorporaciones de nucleótidos, lavado y escaneado, con el que finalmente se recogen los datos de la secuencia.

En la actualidad, la aplicación de WGS en la vigilancia de la salud pública permite caracterizar los aislados de patógenos alimentarios proporcionando nuevos y amplios conocimientos acerca de la biología y transmisión de los mismos. En el caso de los

brotos, esta información detallada generada por esta técnica permite a los investigadores vincular casos de enfermedad y encontrar fuentes de infección e identificar incluso donde se originó dicho patógeno, ofreciendo datos fiables y eficientes (CDC, 2016).

La utilización de esta técnica para la detección de brotes de listeriosis, permite determinar si una misma cepa ha sido el origen de infección de diferentes personas. La combinación de esta técnica con información sobre la alimentación de los pacientes y los alimentos en los que *Listeria* puede detectarse puede:

- Vincular casos de *Listeria* a una fuente probable
- Identificar fuentes no reconocidas de *Listeria*
- Detener los brotes de *Listeria* mientras aun sean pequeños

Además, esta técnica aporta información sobre la presencia de genes de resistencia a los antibióticos (RAN). Con la utilización del método de WGS, los científicos pueden comprender mejor como estos microorganismos se vuelven resistentes y como se propaga dicha resistencia (CDC, 2016).

Se han utilizado ampliamente diferentes enfoques analíticos basados en WGS para la tipificación de *L. monocytogenes*, incluidos los datos del genoma central o del genoma completo, ya sea a nivel de diferencias alélicas MLST o polimorfismos de un solo nucleótido (SNP). Los enfoque más comúnmente aplicados son MLST de genoma central (cgMLST), MLST de genoma completo (wgMLST) y tipificación de SNP de genoma completo (wgSNP) (Papić et al., 2020).

El enfoque alternativo wgMLST o cgMLST tienen su origen en la técnica MLST pero con una modificación de la tipificación multilocus tradicional, MLST de genoma completo o de genoma central, respectivamente. La variante cgMLST tiene el inconveniente de que sus análisis están restringidos a regiones del genoma presentes en todos los aislados analizados, lo que significa que se descarta información potencialmente útil, una posible solución ante esto sería la utilización del pangenoma como una herramienta adicional para tipificar genomas bacterianos (Papić et al., 2020). Tanto la PFGE como la WGS nos permiten obtener diferentes tipos de huellas genéticas de DNA (CDC, 2016).

7. CONCLUSIONES

En esta revisión bibliográfica se concluye que:

1. La técnica de caracterización molecular de referencia para *L. monocytogenes* es la PFGE, siendo el método con mayor poder discriminatorio, gracias a la actuación conjunta de dos enzimas de restricción, *AscI* y *ApaI*. Si bien, la técnica MLST aporta información adicional sobre la relación taxonómica de los aislados.
2. Los aislados de *L. monocytogenes* procedentes de las industrias de procesamiento de alimentos pertenecen a diversos serotipos (1/2a, 1/2b, 1/2c y 4b). Siendo éstos los principales causantes de brotes y casos de listeriosis en todo el mundo.
3. En la industria de los productos vegetales y de los productos lácteos el serotipo 4b es el más frecuente, observándose en menor medida 1/2b y 1/2a en ambas industrias e incluso el 1/2c en la industria láctea.
4. En la industria cárnica, el serotipo principalmente aislado es el 1/2a, y las secuencias tipo aisladas con más frecuencia son ST-121, ST-6 y ST-9.
5. En la industria de productos de la pesca, el serotipo aislado con mayor frecuencia es el serotipo 1/2a, aunque también son comunes los serotipos 1/2c y 4b.
6. *L. monocytogenes* ha causado numerosos brotes en todo el mundo, siendo el más relevante en los últimos años el producido en Sudáfrica (2017), el cual causó 1060 afectados y 216 muertes. El estudio epidemiológico identificó a varios productos cárnicos LPC como origen del mismo, así como a la cepa de *L. monocytogenes* perteneciente al serotipo 4b y ST-6.

8. BIBLIOGRAFÍA

- Abdellaoui, L., Bouayad, L., Bensefia, S.A. y Hamdi, T.M. (2020). "Serotyping and antibiotic sensitivity of *Listeria monocytogenes* isolated from cheeses produced in the región of Algiers (Algeria)". *Veterinaria*, 69(1), pp. 43-49. ISSN: 03726827.
- Acciari, V.A., Torresi, M., Iannetti, L., Scattolini, S., Pomilio, F., Decastelli, L., Colmegna, S., Muliari, R., Bossu, T., Proroga, Y., Cosimo, M., Cardamone, C., Cogoni, P., Prencipe, V.A. y Migliorati, G. (2017). "*Listeria monocytogenes* in Smoked salmon and other smoked fish at retail in Italy: Frequency of contamination and strain characterization in products from different manufacturers". *Journal of Food protection*. 80(2), pp. 271-278. DOI: 10.4315/0362-028X.JFP-15-599.
- Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición (AESAN). (2010). Informe del Comité Científico de la Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición (AESAN) en relación a los biofilms y su repercusión en la seguridad alimentaria. Rev.12. Recuperado: https://www.aesan.gob.es/AECOSAN/docs/documentos/seguridad_alimentaria/evaluacion_riesgos/informes_comite/BIOFILMS.pdf
- Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición (AESAN). (2011). Informe del Comité Científico de la Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición (AESAN) en relación a los estudios de vida útil para *Listeria monocytogenes* en determinados productos alimenticios. Rev. 14. Recuperado: <https://seguridadalimentaria.elika.eus/wp-content/uploads/articulos/Archivo747/Rev%20CC%20AESAN%2014%20Listeria.pdf>
- Anderson, S.A., Igarashi, M.C., Landgraf, M., Destro, M.T. y Franco, B.D.G.M. (2012). "Prevalence, populations and pheno-and genotypic characteristics of *Listeria monocytogenes* isolated from ready-to-eat vegetables marketed San Pablo, Basil". *International Journal of Food Microbiology*, 155, pp. 1-9. DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2011.12.036.
- Bolivar Sánchez, Ana María. (2014). "PCR and PCR-multiplex: critical parameters and standarization protocol". *Avances en Biomedicina*, 3(1), pp. 25-33 DOI: 10.2144/97233rr01.
- Brito, J.R.F., Santos, E.M.P., Arcuri, E.F., Lange, C.C., Brito, Maria A. V. P., Souza, G.N., Cerqueira, Mônica M. P. O., Beltran, J.M.S., Call, J.E., Liu, Y., Porto-Fett, A.C.S. y Luchansky, J.B. (2008). "Retail survey of brazilian milk and minas frescal cheese and a contaminated dairy plant to establish prevalence,

relatedness, and sources of *Listeria monocytogenes* isolates". *Applied and Environmental Microbiology*. 74(15):4954. DOI: 10.1128/AEM.01828-07.

Calleja Cruz, Sergio. (2019). "Evaluation of the genetic diversity of *Listeria monocytogenes* in the food industry by Pulsed-Field Gel Electrophoresis". Facultad de veterinaria, Universidad de Zaragoza.

Cantinelli, T., Chenal-Francisque, V., Diancourt, L., Frezal, L., Leclercq, A., Wirth, T., Lecuit, M. y Brisse, S. (2013). "Epidemic Clones" of *Listeria monocytogenes* Are Widespread and Ancient Clonal Groups". *Journal of Clinical Microbiology*, 51(11), pp. 3770-3779 DOI: 10.1128/JCM.01874-13.

Carpentier, B., & Cerf, O. (2011). "Review - Persistence of *Listeria monocytogenes* in food industry equipment and premises". *International Journal of Food Microbiology*, 145(1), pp 1-8 DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2011.01.005

Centers for Disease Control and Prevention (CDC). (2012). *Multi-state outbreak of listeriosis linked to whole cantaloupes from Jensen Farms, Colorado* Up-to-date [Septiembre 2020]. Disponible en: <https://www.cdc.gov/listeria/outbreaks/cheese-09-12/key-resources.html>

Centers for Disease Control and Prevention (CDC). (2012). *Multi-state outbreak of listeriosis linked imported Frescolina Marte Brand ricota salata cheese*. Up-to-date [Octubre 2020]. Disponible en: <https://www.cdc.gov/listeria/outbreaks/cheese-09-12/key-resources.html>

Centers for Disease Control and Prevention (CDC). (2016). *Whole genome sequence*. Up-to-date [Julio 2020]. Disponible en: <https://www.cdc.gov/pulsenet/pathogens/wgs.html>

Centro de Coordinación de Alertas y Emergencias Sanitarias (CCAES). (2019). Informe de fin de seguimiento del brote de listeriosis 27 de septiembre de 2019. Recuperado de: https://www.mscbs.gob.es/profesionales/saludPublica/ccayes/alertasActual/listeriosis/docs/Informe_cierre_Listeriosis_20190927.pdf

Chen, Y., Zhang, W. Knabel, J.S. (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), pp.835-846 DOI: 10.1128/JMC.01575-06.

Decisión de Ejecución (UE) 945/2018 de la Comisión de 22 de junio de 2018 sobre enfermedades transmisibles y problemas sanitarios especiales relacionados que deben estar sujetos a vigilancia epidemiológica, así como las definiciones de casos pertinentes. (2018) Bruselas: Diario Oficial de la Unión Europea.

- Dellafiora, L., Filipello, V., Dall'Asta, C., Finazzi, G., Galaverna, G. y Losio, M.N. (2020). "A Structural Study on the *Listeria monocytogenes* Internalin A-Human E-cadherin Interaction: A Molecular Tool to Investigate the Effects of Missense Mutations". *Toxins*, 12(1), pp. 60 DOI: 10.3390/toxins12010060.
- Den Bakker, H.C., Cummings, C.A., Ferreira, V., Vatta, P., Orsi, R.H., Degoricija, L., Barker, M., Petrauskene, O., Furtado, M.R. y Wiedmann, M. (2010). "Comparative genomics of the bacterial genus *Listeria*: Genome evolution is characterized by limited gene acquisition and limited gene loss". *BMC genomics*, 11(1), pp. 688 DOI: 10.1186/1471-2164-11-688.
- Dimitrijevc, M., Anderson, R.C., Karabasil, N., Pavlicevic, N., Jovanovi, S., Nedeljkovic, T.J., Teodorovic, M. Dojcinovi, S. (2011). "Environmental prevalence and persistence of *Listeria monocytogenes* in cold-smoked trout processing plants". *Acta veterinaria*, 61, pp. 429-442. DOI: 10.2298/AVB1104429D.
- European Food Safety Authority (EFSA), Panel On Biological Hazards (2013). "Scientific Opinion on the evaluation of molecular typing methods for major food-borne microbiological hazards and their use for attribution modelling, outbreak investigation and scanning surveillance: Part 1 (evaluation of methods and applications)". *EFSA Journal*, 11(12), pp. n/a DOI: 10.2903/j.efsa.2013.3502.
- European Food Safety Authority (EFSA). (2018). "*Listeria monocytogenes* contamination of ready-to-eat foods and the risk for human health in the EU". *EFSA Journal*, 16(1), 5134. DOI: 10.2903/j.efsa.2018.5134.
- European Food Safety Authority (EFSA) y European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC). (2018). "Multi-country Outbreak of *Listeria monocytogenes* Linked to Consumption of Salmon Products". *World food regulation review*, 28(5), pp. 9-10. Disponible en: https://www.ecdc.europa.eu/sites/portal/files/documents/2018_ECDC-EFSA_ROA_UI-444_Listeria-final-22-mar-2018.pdf
- European Food Safety Authority (EFSA) y European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC). (2019). "The European Union One Health 2018 Zoonoses Report". *EFSA Journal*, 17(12) pp. 5926 DOI: 10.2903/j.efsa.2019.5926
- Filipello, V., Gallina, S., Amato, E., Losio, M.N., Pontellillo, M., Decastelli, L. y Lomonaco, S. (2017). "Diversity and persistence of *Listeria monocytogenes* within the Gorgonzola PDO production chain and comparison with clinical isolates from the same area". *International Journal of Food Microbiology*, 245, pp. 73-78.

- Graves, L.M. y 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), pp. 55-62. DOI: 10.1016/S0168-1605(00)00501-8.
- Gudmundsdóttir, S., Gudbjörnsdóttir, B., Einarsson, H., Kristinsson, K. y Kristjánsson, M. (2010). "Contamination of cooked peeled shrimp (*Pandalus borealis*) by *Listeria monocytogenes* during processing at two processing plants". *J. Food Prot.*, 69(6), pp.1304-1311. DOI: 10.4315/0362-028x-69.6.1304.
- Heiman, K.E., Garalde, V.B., Gronostaj, M., Jackson, K.A., Beam, S., Joseph, L., Saupe, A., Ricotta, E., Waechter, H., Wellman, A., Adams-Cameron, M., Ray, G., Fields, A., Chen, Y., Datta, A., Burrall, L., Sabol, A., Kucerova, Z., Trees, E., Metz, M., Leblanc, P., Lance, S., Griffin, P.M., Tauxe, R.V. y Silk, B.J. (2012). "Multi-state outbreak of listeriosis caused by imported cheese and evidence of cross-contamination of other cheeses, USA, 2012". *Epidemiol. Infect.*, 144, pp.2698-2708. DOI: 10.1017/S095026881500117X.
- Koopmans, M.M., Brouwer, M.C., Bijlsma, M.W., Bovenerk, S., Keijzer, W., Der Ender, A. y De Beek, D. (2013). "Listeria monocytogenes sequence type 6 and increased rate of unfavorable outcome in meningitis: epidemiologic cohort study". *Clin Infect Dis.*, 57(2), pp. 247-253. DOI: 10.1093/cid/cit250.
- Kevenk, T.O. y Gulel, G.T. (2016). "Prevalence, antimicrobial resistance and serotype distribution of *Listeria monocytogenes* isolated from raw milk and dairy products". *Journal of Food Safety.* 36, pp. 11-18. DOI: 10.1111/jfs.12208.
- Laksanalamai, P., Joseph, L. A., Silk, B. J., Burrall, L. S., Tarr, C.L., Peter Gerner-Smidt, P. y Datta, A. R. (2012). "Genomic Characterization of *Listeria monocytogenes* strains involved in a multistate listeriosis outbreak associated with cantaloupe in US". *Plos ONE*, 7 DOI: 10.1371/journal.pone.0042448.
- Lamont, R.F., Sobel, J., Mazaki-Tovi, S., Kusanovic, J.P., Vaisbuch, E., Kim, S.K., Uldbjerg, N. y Romero, R. (2013). "Listeriosis in Human Pregnancy: a systematic review". *J Perinat Med.*, 39(3), pp. 227-236. DOI: 10.1515/JPM.2011.035.
- Leibniz Institute DSMZ-German Collection of Microorganisms and Cell Cultures, Germany, Prokaryotic Nomenclature Up-to-date [Mayo 2022]. Disponible en: <https://www.dsmz.de/dsmz>
- Martín, B., Perich, A., Gómez, D., Yangüela, J., Rodríguez, A., Garriga, M. y Aymerich, T. (2014). "Diversity and distribution of *Listeria monocytogenes* in meat processing plants" *Food Microbiology*, 44, pp.119-127. DOI: 10.1016/j.fm.2014.05.014.

- Martín, B., Bover-Cid, S. y Aymerich, T. (2018). "MLVA subtyping of *Listeria monocytogenes* isolates from meat products and meat processing plants". *Food Research international*, 106, pp. 225-232. DOI: 10.1016/j.foodres.2017.12.052.
- McCollum, J.T., Cronquist, A.B., Silk, B.J., Jackson, K.A., O'Connor, K.A., Cosgrove, S., Gossack, J.P., Parachini, S.S., Jain, N.S., Ettestad, P., Ibraheem, M., Cantu, V., Joshi, M., DuVernoy, T., Fogg, N.W., Gorny, J.R., Mogen, K.M., Spires, C., Teitell, P., Joseph, L.A., Tarr, C.L., Imanishi, M., Neil, K.P., Tauxe, R.V. y Mahon, B.E. (2013). "Multistate outbreak of listeriosis associated with cantaloupe". *N Engl J Med*, 53 pp. 369-944 DOI: 10.1056/NEJMoa1215837.
- Møller Nielsen E, Bjørkman JT, Kiil K, Grant K, Dallman T, Painset A, Amar C, Roussel S, Guillier L, Felix B, Rotariu O, Perez-Reche F, Forbes K., Strachan N. (2017). "Closing gaps for performing a risk assessment on *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat (RTE) foods: activity 3, the comparison of isolates from different compartments along the food chain, and in humans using whole genome sequencing (WGS) analysis". *EFSA Supporting Publication*, 14(2) DOI: 10.2903/sp.efsa.2017.EN-1151
- Muñoz, A.I, Vargas, M., Otero, L., Diaz, G. y Guzmán, V. (2011). "Presencia de *Listeria monocytogenes* en alimentos listos para el consume, procedenes de plazas de Mercado y delicatessen de supermercados de cadena, Bogota, D.C, 2002-2008". *Biomédica*, 31, pp.428-439 DOI: 10.7705/biomedica.v31i3.394.
- Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO) y Organización Mundial de la Salud (OMS). (2004). Evaluación de riesgos de *Listeria monocytogenes* en alimentos listos para el consumo. Recuperado de: https://www.who.int/foodsafety/publications/micro/mra4_es.pdf
- Ortiz Jareño, María del Sagrario (2016). Diversidad genética y persistencia ambiental de *Listeria Monocytogenes* en dos plantas de procesado de carne de cerdo ibérico: influencia de la resistencia a desinfectantes de amonio cuaternario. Universidad Complutense de Madrid.
- 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), pp. 1177-1184 DOI: 10.1089/fpd.2010.0535.
- Papić, B., Kušar, D., Zdovc, I., Golob, M. y Pate, M. (2020). "Retrospective investigation of listeriosis outbreaks in small ruminants using different analítical approaches for whole genoma sequencing-based typing of *Listeria monocytogenes*". *Infection, Genetics and Evolution*, 77, pp. 1567-1348 DOI: 10.1016/j.meegid.2019.104047.

- Parrilla, F. y Rafart, J.V. (2013). "Estudio de incidencia de la listeriosis en España". *Gac Sanit*, 28, pp. 74-46 DOI: 10.1016/j.garceta.2013.03.004.
- Ramírez P., Nuvials, X. y Díaz, E. (2019) Informe epidemiológico de listeriosis. Casos notificados a la RENAVE en los años 2015-2018. Recuperado de: <https://www.isciii.es/>
- RASFF, European Commission (2018) "The Rapid Alert System for Food and Feed. 2018 Annual Report". *Health and Food Safety*. Up-to-date [Octubre 2020]. Disponible en: https://ec.europa.eu/food/sites/food/files/safety/docs/rasff_annual_report_2018.pdf
- Regan, T., MacSharry, J. y Brint, E. (2014). "Tracing innate immune defences along the path of *Listeria monocytogenes* infection". *Immunology and Cell Biology*, 92, pp. 563-569. DOI: 10.1038/icb.2014.27.
- Reglamento (CE) nº 852/2004 de la Comisión, de 29 de abril de 2004, relativo a la higiene de los productos alimenticios. (2004). Publicado en el Diario Oficial de la Unión Europea, L139 del 30/04/2004.
- 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). Publicado en el *Diario Oficial de la Unión Europea*, L338 del 22/12/2005.
- Reglamento (UE) nº1019/2013 de la Comisión, de 23 de octubre de 2013, que modifica el anexo I del Reglamento (CE) nº 2073/2005 en lo relativo a la histamina en los productos de pesca (2013). Publicado en el *Diario Oficial de la Unión Europea*, L282 del 23/10/2013.
- Reglamento (CE) nº 2073/2005 de la Comisión, de 15 de noviembre de 2005, relativo a los criterios microbiológicos aplicables a los productos alimenticios. Publicado en el Diario Oficial L338 DEL 22/12/2005.
- 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". *Environ Microbiol*, 13(4), pp. 835-50 DOI: 10.1111/j.1462-2920.2010.02378.
- Saceldo, C., Arreaza, L., Alcalá, L., De la Fuente, L. y Vázquez, A. (2003). "Development of a Multilocus Sequence Typing Method for Analysis of *Listeria monocytogenes* Clones". *Jornal of Clinical Microbiology*, 41(2), pp. 757-762 DOI: 10.1128/JCM.41.2.757-762.2003.
- Schjørring, S., Gillesberg, S., Jensen, T., Moura, A., Kjeldgaard, J.S., Müller, L., Thielke, S., Leclercq, A., Maury, M.M., Tourdjman, M., Donguy, M.P., Lecuit,

- M., Ethelberg, S. y Nielsen, E.M. (2017). "Cross-border outbreak of listeriosis caused by cold-smoked salmon, revealed by integrated surveillance and whole genome sequencing (WGS), Denmark and France, 2015 to 2017" *Euro Surveill*, 22, pp. 50 DOI: 10.2807/1560-7917.ES.2017.22.50.17-00762.
- Selander, R.K., Caugant, D.A., Ochman, H., Musser, J.M., Gilmour, M.N. y Whisttam, T.S. (1986). "Methods of multilocus enzyme electrophoresis for bacterial population genetics and systematics". *Applied and environmental microbiology*, 51(5), pp. 873-884 DOI:10.1128/AEM.51.5.873-884.1986.
- Siriken, B., Ayaz, N.D. y Erol, I. (2013). Prevalence and Serotype distribution of *Listeria monocytogenes* in Salted Anchovy, Raw Anchovy and Raw Mussel using IMS-based cultivation technique and PCR. *Journal of Aquatic Food Product Tecnology*, 22(1) pp. 77-82. DOI: 10.1080/10498850.2011.625594.
- Smith, A.M., Tau, N.P., Smouse, S.L., Allam, M., Ismail, A., Ramalwa, N.R., Disenyeng, B., Ngomane, M. y Thomas, J. (2019). "Outbreak of *Listeria Monocytogenes* in South Africa 2017-2018: Laboratory activities and experiences associated with whole-genome sequencing analysis of isolate" *Mary Ann Lieber, Inc*, 16 pp. 524-530 DOI: 10.1089/fpd.2018.2586.
- Soni, D.K., Singh, M., Singh, D.V. Dubey, S.K. (2014). "Virulence and genotypic characterization of *Listeria monocytogenes* isolated from vegetable and soil samples". *BMC microbiology*, 14, pp. 241. DOI: 10.1186/s12866-014-0241-3.
- Southern, E.M., Anand, R., Brown, W.R.A. y Fletcher, D.S. (1987). "A model for the separation of large DNA molecules by crossed field gel electrophoresis". *Nucleic Acids Research*, 15(15), pp. 5925-2943. DOI: 10.1093/nar/15.15.5925.
- Takahashi, H., Iwakawa, A., Ohshima, C., Kyoui, Daisuke, Kumano, S., Kuda, T. y Kimura, B. (2017). "A rapid typing method for *Listeria monocytogenes* based on high-throughput multilocus sequence typing (Hi-MLST)". *International Journal of Food Microbiology*, 243, pp.84-89 DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2016.12.009.
- Tchatchouang, C.D.K., Fri, J., De Santi, M., Brandi, G., Schiavano, G.F., Amagliani, G. y Ateba, C.N. (2020). "Listeriosis outbreak in South Africa: a comparative analysis with previously reported cases worldwide". *Microorganism*, 8. DOI: 10.3390/microorganisms8010135.
- Toledo, V., den Bakker, H.C., Hormazábal, J.C., González-Rocha, G., Bello-Toledo, H., Toro, M. y Moreno-Switt, A.I. (2018). "Genomic Diversity of *Listeria monocytogenes* Isolated from Clinical and Non-Clinical Samples in Chile". *Genes*, 9(8), pp. 396 DOI: 10.3390/genes9080396.

- Wai, G.Y., Tang, J.Y.H., New, C.Y. y R, S. (2019). "A review on *Listeria monocytogenes* in food: prevalence, pathogenicity, survivability and antibiotic resistance". *Food Research*, 4(1), pp. 20-27 DOI: 10.26656/fr.2017.4(1).155.
- Walter Ledermann, D. (2008). "In homage to Lister". *Revista chilena de infectología*, 25(5), 351-356 DOI:10.4067/S0716-101820080005000006.
- Wang, Y., Zhao, A., Zhu, R., Lan, R., Jin, D., Cui, Z., Wang, Y., Li, Z., Wang, Y., Xu, J. y Ye, C. (2012). "Genetic diversity and molecular typing of *Listeria monocytogenes* in China". *BMC Microbiology*, 12(119). DOI: 10.1186/1471-2180-12-119
- Wu, S., Wu, Q., Zhang, J., Chen, M. y Guo, W. (2016). "Analysis of Multilocus Sequence Typing and Virulence Characterization of *Listeria monocytogenes* Isolates from Chinese Retail Ready-to-Eat Food". *Frontiers in microbiology*, 7, pp. 168 DOI: 10.3389/fmicb.2016.00168.
- Yunyi, Z., Shilei, D., Honghu, C., Jiancai, C., Junyan, Z., Zhen, Z., Yong, Y., Ziyang, X., Li, Z. y Lingling, M. (2019). "Prevalence, genotypic characteristics and antibiotic resistance of *Listeria monocytogenes* from retail foods in bulk in Zhejiang province, China". *Frontiers in microbiology*, 10. DOI: 10.3389/fmicb.2019.01710.