

Estudios de investigación para la *detección* y  
*control* de ***Listeria monocytogenes*** en la  
**Industria Alimentaria**

***M<sup>a</sup> Carmen Rota García***

Profesora Titular

Área de Nutrición y Bromatología.

Facultad de Veterinaria. Universidad de Zaragoza

[crota@unizar.es](mailto:crota@unizar.es)

---

***Jornada Listeria y Biofim***

**Zaragoza, 28 de Abril 2022**

## Grupo de Investigación

### “Análisis y Evaluación de la Seguridad Alimentaria”

- ❖ **Financiación:** Gobierno de Aragón y Fondo Social Europeo
- ❖ **Coordinación:** Agustín Ariño Moneva

Facultad de Veterinaria (Área Nutrición y Bromatología)  
Universidad de Zaragoza



Línea de investigación:

*Evaluación y control de riesgos biológicos vehiculados por los alimentos*



### Proyectos de investigación

1989-  
1990

- ❖ *Contribución al estudio de la presencia de Listeria monocytogenes en alimentos de origen animal.* DGA

1994-  
1995

- ❖ *Estudio del comportamiento de Listeria monocytogenes a bajas temperaturas (4° y 10°C) y evaluación del efecto de la congelación (7 días a -18°C) y posterior almacenamiento a bajas temperaturas en excipiente artificial y sustrato alimenticio.* Universidad de Zaragoza.

2010-  
2013

- ❖ Productos cárnicos para el siglo XXI: seguros, nutritivos y saludables. Subproyecto *Incidencia, prevalencia y detección de L. monocytogenes por técnicas rápidas en la industria cárnica y productos cárnicos LPC.* Proyecto Consolider- Carnisenusa CSD2007-016. Programa Consolider-Ingenio 2010, MINECO.

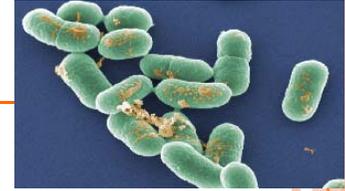
2013-  
2015

- ❖ Evaluación y control del riesgo de *Toxoplasma gondii* en jamón y *desarrollo de métodos rápidos para el análisis de Listeria monocytogenes.* Proyecto INNPACTO ipt-2012-0189-060000. MINECO.

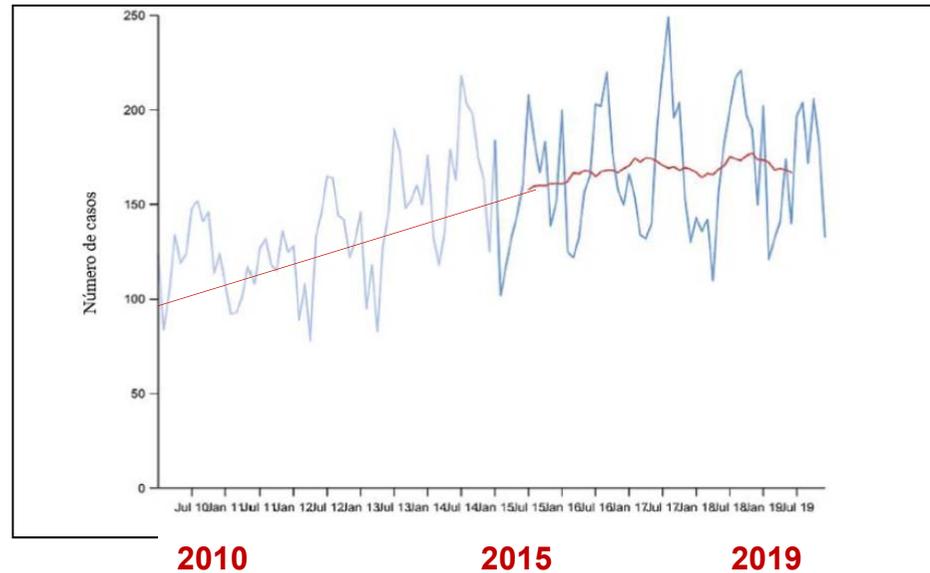
2021-  
2023

- ❖ *Diseño de estrategias aplicadas a la industria cárnica para el control de Listeria monocytogenes durante el proceso de elaboración de productos con carne de cerdo y derivados.* Proyecto IDI-20210675 / IDI-20210676. CDTI

# *Listeria monocytogenes*



**Listeriosis humana: enfermedad infecciosa grave**



**EFSA / ECDC (2020):**

**2621 casos** confirmados en **2019**

**20 brotes: 748 casos**

**España (3 brotes)**

- **225 casos**
- **131 hospitalizaciones**
- **3 fallecimientos**

**EFSA / ECDC (2021):**

**1876 casos** confirmados en **2020**

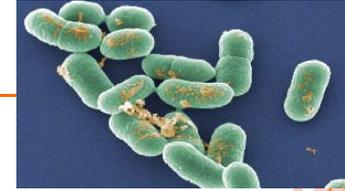
**9 brotes: 120 casos**

**83 hospitalizaciones**

**17 fallecimientos**



# Listeria monocytogenes



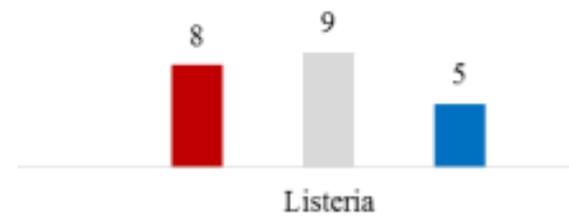
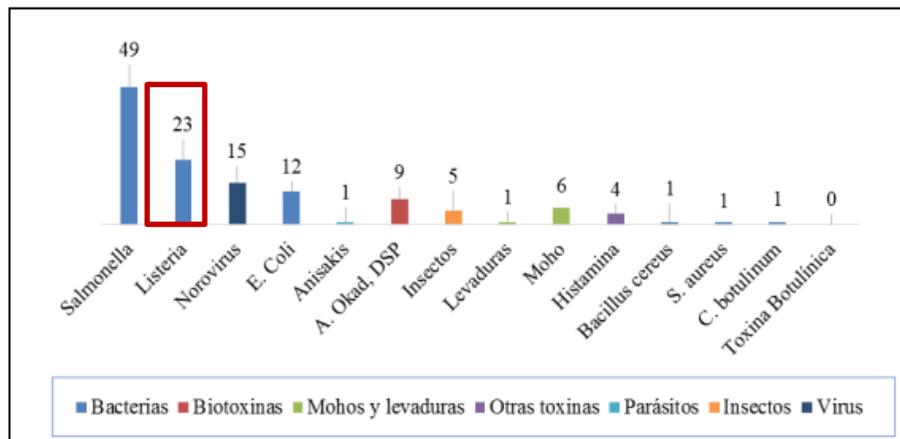
## RASFF (2020): Food and Feed Safety Alerts

### 129 notificaciones *Listeria monocytogenes*

- **32:** pescado y productos de la pesca
- **31:** carne y productos cárnicos
- **25:** leche y productos lácteos
- **21:** carne de pollo y derivados

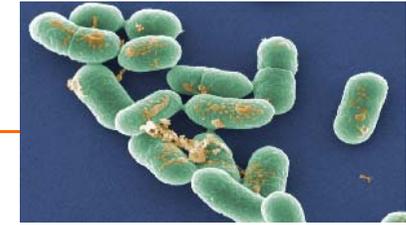
## SCIRI (2020): Sistema Coordinado de Intercambio Rápido de Información

### 128 notificaciones peligros biológicos



■ Carnes y derivados ■ Huevos y ovoproductos ■ Leche y derivados  
■ Moluscos bivalvos ■ Pescados y derivados

# Listeria monocytogenes

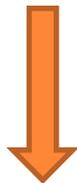


➤ Alimentos "Listos para el Consumo" (LPC)

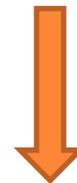
➤ *Listeria monocytogenes*

- Ubicuo
- Psicrótrofo
- Biofilm

➤ Problema importante industrias alimentarias



**Alimentos**



**Ambiente**



## Criterios microbiológicos en *alimentos LPC*



Unión Europea: *Reglamento CE nº 2073/2005*

<p><b>Favorece</b> el desarrollo de <i>L. monocytogenes</i></p>	<p>n=5 c=0</p>	<p>≤ 100 ufc/g</p> <p>No detectado/ 25g</p>	<p>EN/ISO 11290-2</p> <p>EN/ISO 11290-1</p>	<p>Productos comercializados durante su vida útil</p> <p>Antes de dejar el control de la empresa alimentaria</p>
<p><b>No favorece</b> el desarrollo de <i>L. monocytogenes</i></p> <p>pH ≤ 4,4 o aw ≤ 0,92 pH ≤ 5,0 y aw ≤ 0,94 Vida útil &lt; 5 días</p>	<p>n=5 c=0</p>	<p>≤ 100 ufc/g</p>	<p>EN/ISO 11290-2</p>	<p>Productos comercializados durante su vida útil</p> <div style="text-align: center;">  </div>



Aceptabilidad de un lote



EEUU: ausencia/ 25g



## Criterios microbiológicos *superficies procesado*



**Unión Europea:** *Reglamento CE nº 2073/2005*

Los explotadores de las empresas alimentarias (**alimentos LPC**):

- Tomar **muestras** de las **zonas** y el **equipo de producción**, como parte de su plan de muestreo
- Detectar la **posible presencia de dicha bacteria**



**EEUU:** no detectado/ superficies





# Objetivos científicos

## Metodologías

- ❖ **Métodos de análisis rápidos** para el control de *Listeria monocytogenes* en la industria alimentaria
- ❖ **Métodos moleculares** basados en la PCR



## Evaluación del riesgo

- ❖ Detección de **reservorios** en líneas de procesado
- ❖ Diseño de estrategias para el control de *L. monocytogenes* en la industria



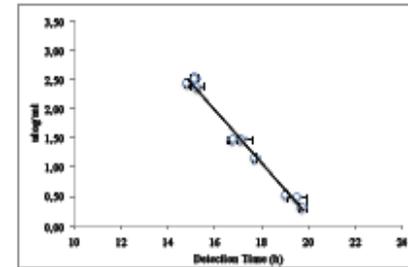


❖ **Métodos de análisis rápidos** para el control de *Listeria monocytogenes* en la industria alimentaria

# Validación de la Impedanciometría

## A. Ensayos cultivo puro de 6 cepas de *Listeria spp*

- **$R^2 > 0,91$**
- **Elevada sensibilidad: 1 ufc**



*C. L. monocytogenes* 64 standard curve.  
 $y = -0,4549x + 9,2645$ .  $R^2=0,99$



Bac-Trac (SY-LAB)

## B. Ensayos en matriz alimentaria: jamón curado

- **Inclusividad-exclusividad** 
- **Especificidad relativa: 100%**
- **Sensibilidad relativa: 100%**
- **Eficacia relativa: 100%**
- **Nivel de detección relativa:  $\leq 1$  ufc/25 g jamón**

Impedanciometría

**VS**

ISO 11290-1

# Impedanciometría

## Ventajas Industria Alimentaria

Análisis simultáneo: **64 muestras**

Resultados negativos: **2 días** (*screening*)

Detección *L. monocytogenes*: **3 días**

Reducción tiempo **hasta 4 días** vs ISO 11290-1



## ❖ **Métodos moleculares** basados en la PCR

# PCR a tiempo real

## Cuantificación de *L. monocytogenes*

- Linealidad:  $R^2=0,9875$
  - Rango lineal: 5 órdenes de magnitud
  - Eficiencia: 100,4 %
  - LOD
  - LOQ
- 30,1 ± 6,2 ufc/g
- Exactitud relativa: 95-105 %



Validación

## Perfil genético de RAM

Tetraciclinas: *tet A tetB*

Lincosamidas: *InuA, InuB*

Macrolidos: *mefA, msrA*

$MLS_B$ : *ermA, ermB*

## Resistencia a biocidas

Amonios cuaternarios

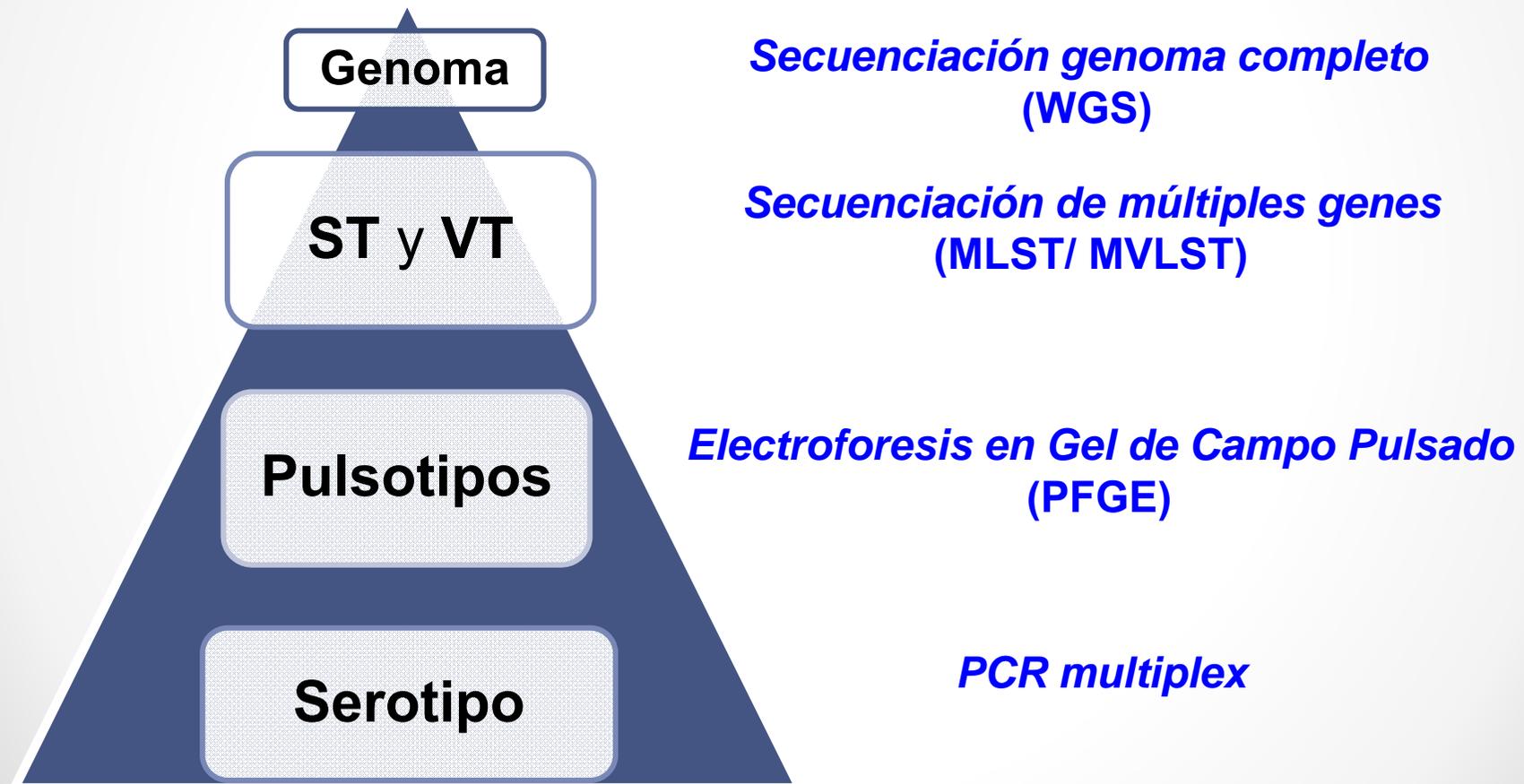
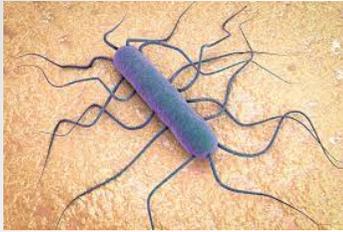
Peróxido de hidrogeno

Acido peracético

Clorados

*National Food Institute Research*  
Technical University of Denmark (DTU)

# Subtipos moleculares



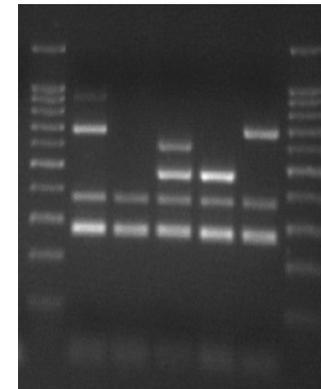
## ❖ Serotipado

Alimentos/plantas procesado

- **13 Serotipos.** Más frecuentes (95%): **1/2 a**, **1/2 b**, **1/2 c**, **4b**
- **PCR multiplex**
  - Grupo IIa: serotipos **1/2a** y 3a
  - Grupo IIb: serotipos **1/2b**, 3b y 7
  - Grupo IIc: serotipos **1/2c** y 3c
  - Grupo IVb: serotipos **4b**, 4d y 4e

Listeriosis humana

### Serotipo 4h



Herramienta



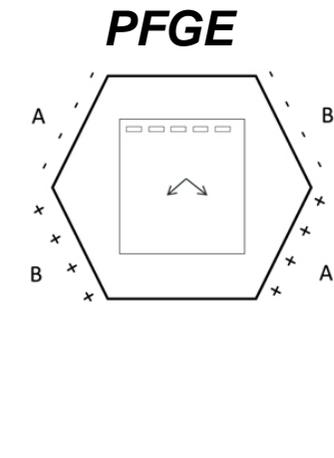
- **Identificar brotes** epidémicos
- **Prevención brotes:** control contaminación durante la producción/distribución de alimentos

# ❖ Electroforesis en Gel de Campo Pulsado (PFGE)

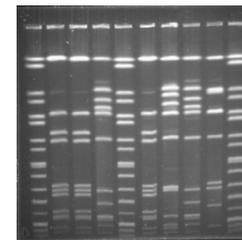
- **Método de referencia (Gold Standard):**
  - Centro de Control y Prevención de Enfermedades (CDC) de EEUU
  - PulseNet International (<http://www.pulsenetinternational.org>)

## Digestión DNA

*endonucleasas de restricción*  
*Ascl, Apal*

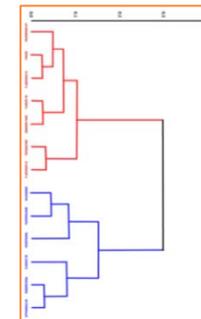


## Análisis bandas



**UPGMA**  
**Índice de similitud Dice**

## Dendrograma



**Pulsotipo = cepa**

Base datos europea (EURL Lm DB)

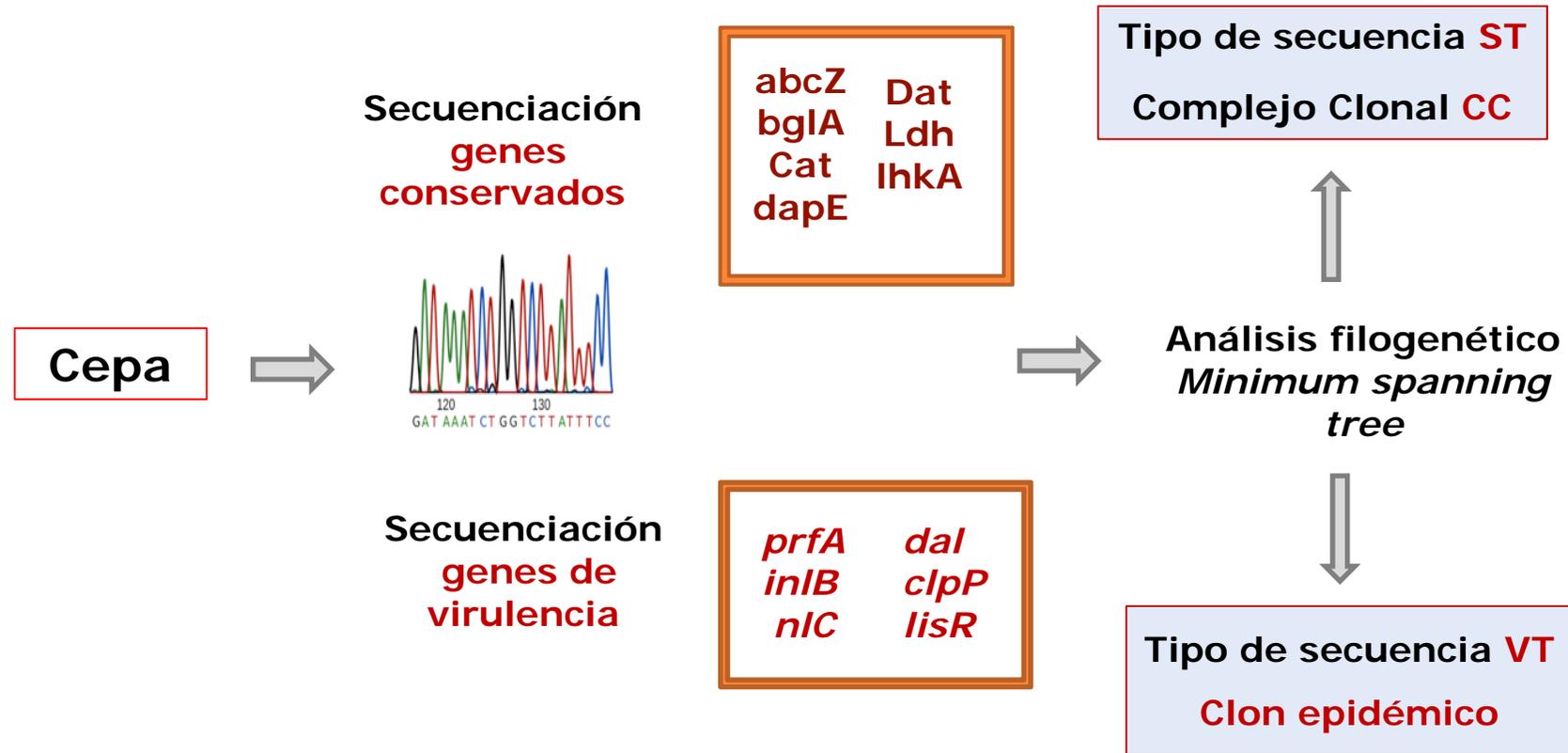


**Vigilancia epidemiológica**

## Industria alimentaria

- Detección de **reservorios**
- **Diversidad** genética

## ❖ Secuencias de múltiples genes y genes de virulencia (MLST / MVLST)



**Base de datos**  
Instituto Pasteur



**Conocer su implicación en brotes epidémicos**  
**Comparar con otras industrias /alimentos**

❖ Detección de **reservorios** en líneas de procesado



❖ Detección de **reservorios** de *L. monocytogenes* en la industria alimentaria



**Cepas esporádicas:** introducción en la planta / destruidas por los procesos de L+D

**Cepas persistentes:** identificadas repetidamente en los análisis de superficies, durante meses e incluso durante años



**Contaminación alimentos (LPC)**



## ❖ Detección de **reservorios** de *L. monocytogenes* en la industria alimentaria

### Selección de muestras (en función el RIESGO)

#### ➤ Alimentos

- Materias primas
- Producto elaborado

#### ➤ Ambientales

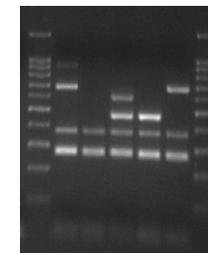
- Superficies de contacto / no contacto

### Análisis microbiológico

- Detección de *Listeria spp* y *L.monocytogenes*
- Aislados

### Caracterización molecular

- Subtipos moleculares



❖ Detección de **reservorios** de *L. monocytogenes* en la industria alimentaria

**Patrones de persistencia** de *L. monocytogenes* en la industria  
**Identificar los reservorios** en plantas de procesado



**Estrategias de control  
eficaces**

**¡ Eliminación de la contaminación !**



## Ejemplo

### Detección de **reservorios** de *L. monocytogenes*

*Proceso de loncheado y envasado de **jamón curado***



# Muestras

- Jamón curado loncheado **n=190** (5 muestras/lote)
- Superficies contacto **n=284**



Detectado /25 g  
**3,3%**

Detección *Listeria* spp.: **36%**  
Detección *L. monocytogenes*: **9,2%**



	Zona Deshuesado 13 zonas <b>n= 150</b>	Zona Loncheado 9 zonas <b>n= 134</b>
<b>Presencia <i>L. monocytogenes</i></b>	<b>22 (12%)*</b>	<b>4 (3,7%)</b>
	Limpias	Sucias
<b>Presencia <i>L. monocytogenes</i></b>	<b>16 (10,7%)<sup>a</sup></b> <b>Deshuesado (&gt;%) *</b>	<b>10 (7,5%)</b>

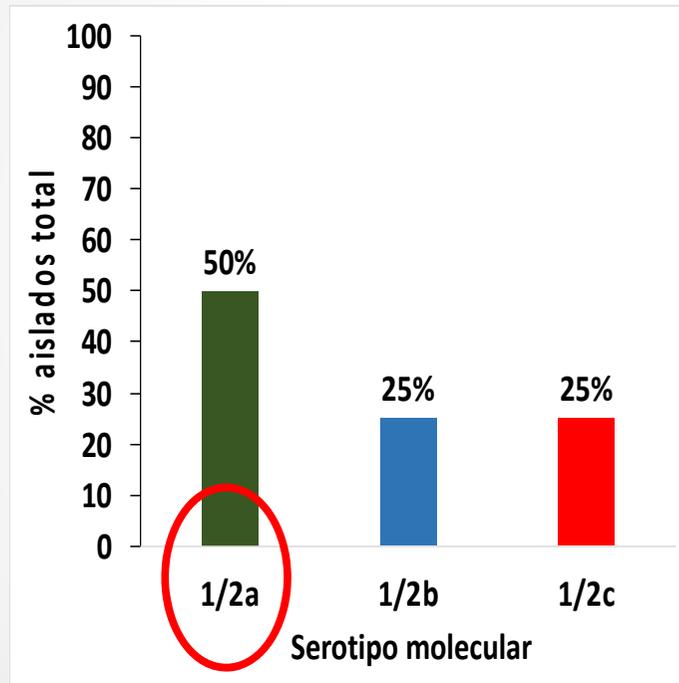
\* Diferencia significativas ( $p \leq 0,05$ )

<sup>a</sup> No diferencia significativas ( $p \geq 0,05$ )

**25 aislados *L. monocytogenes***

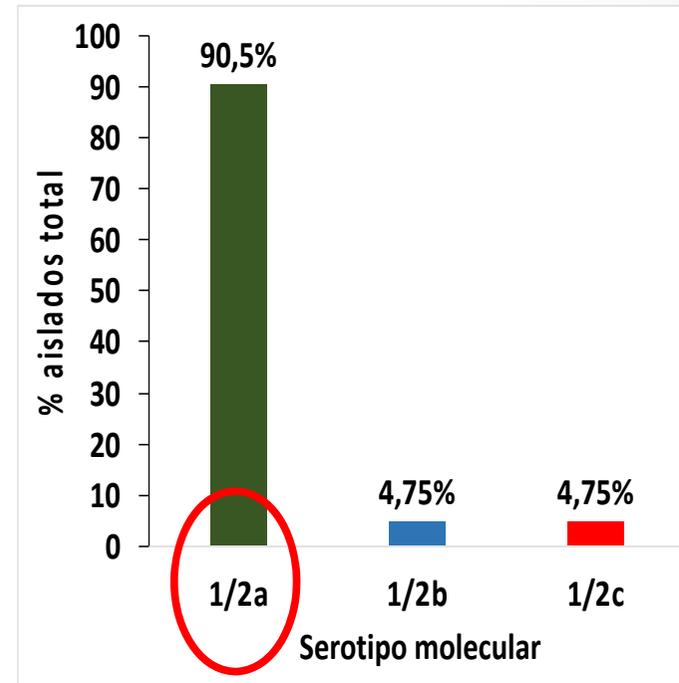
# Serotipos

## Jamón curado



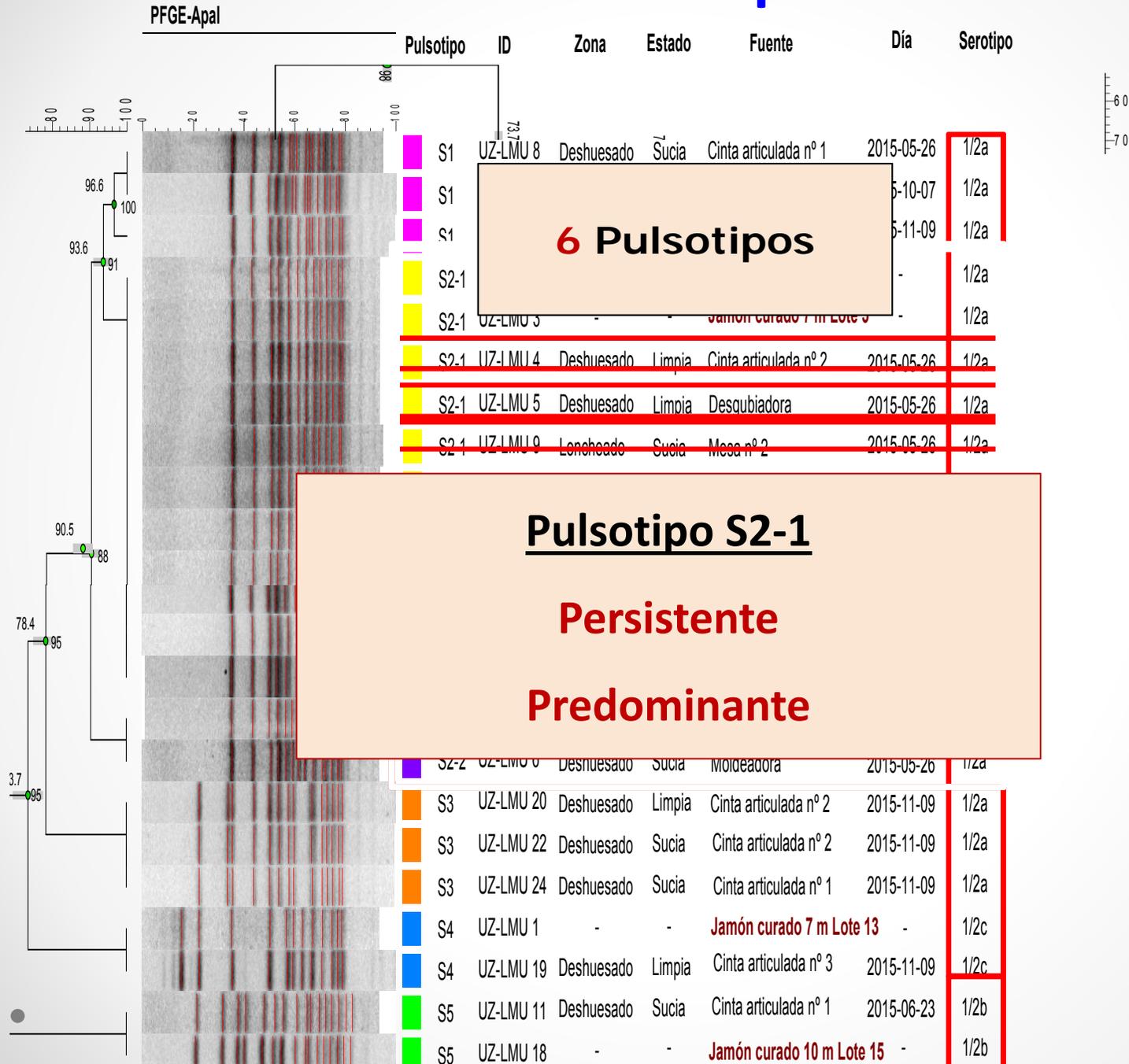
n= 4

## Superficies



n= 21

# Pulsotipos



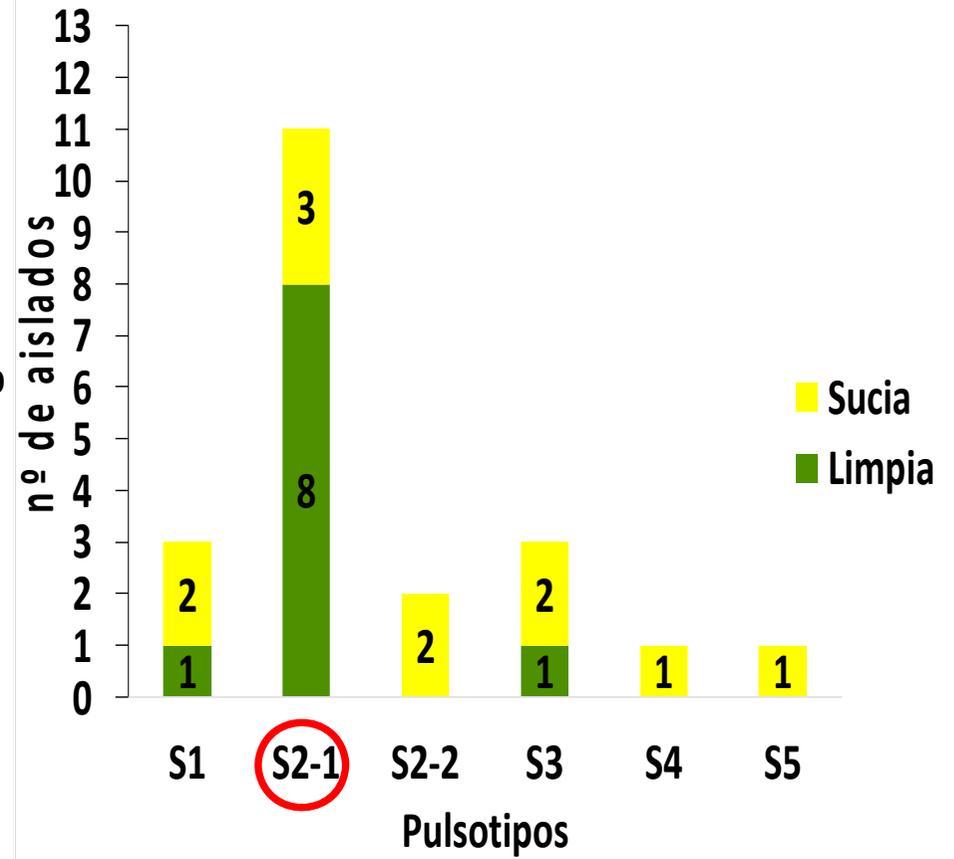
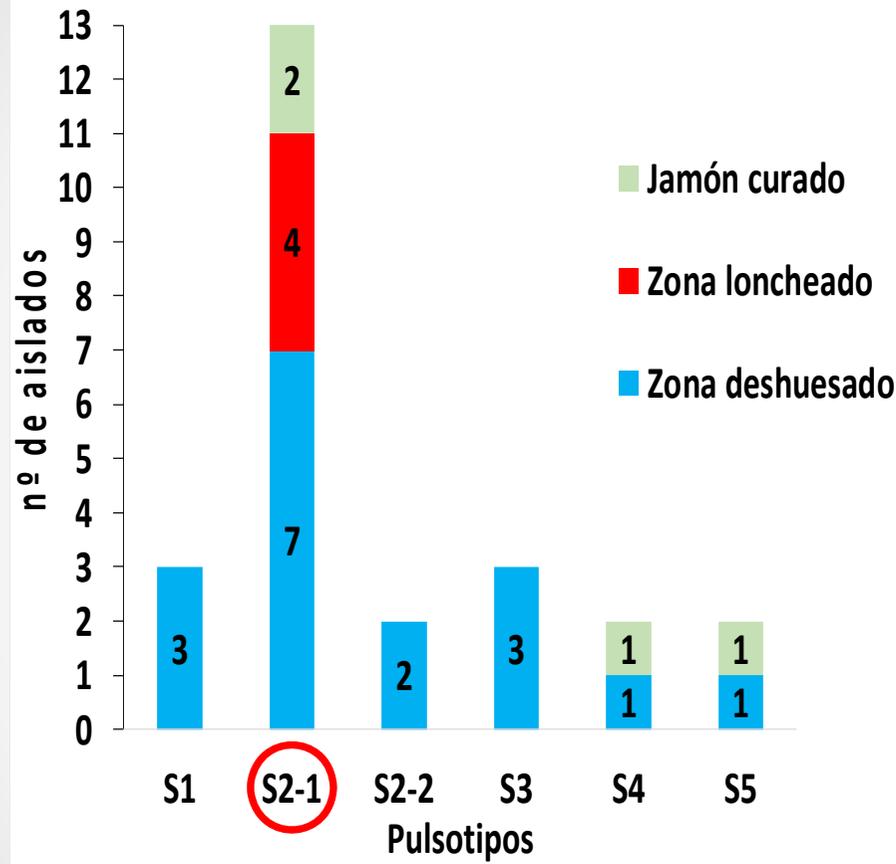
**6 Pulsotipos**

**Pulsotipo S2-1**  
**Persistente**  
**Predominante**

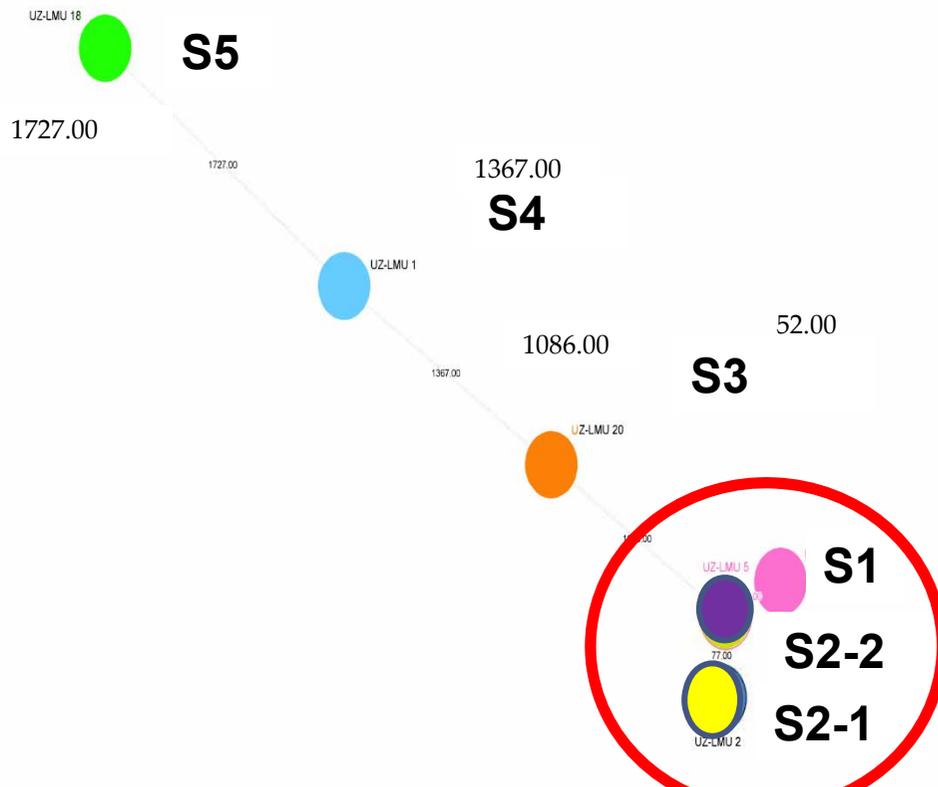
Cluster 1

Cluster 2

# Pulsotipos



6	5	4	4	
Pulsotipo	ST	CC	VT	EC
S1	121	121	VT94	
S2-1	121	121	VT94	
S2-2	1442	121	VT94	
S3	9	9	VT11	
S4	14	14	VT107	
S5	3	3	VT14	ECVIII



**Brote producto lácteo  
EEUU**

*Minimum spanning tree*

# Ejemplo

## Detección de **reservorios** de *L. monocytogenes*

Proceso de **elaboración productos cárnicos LPC**



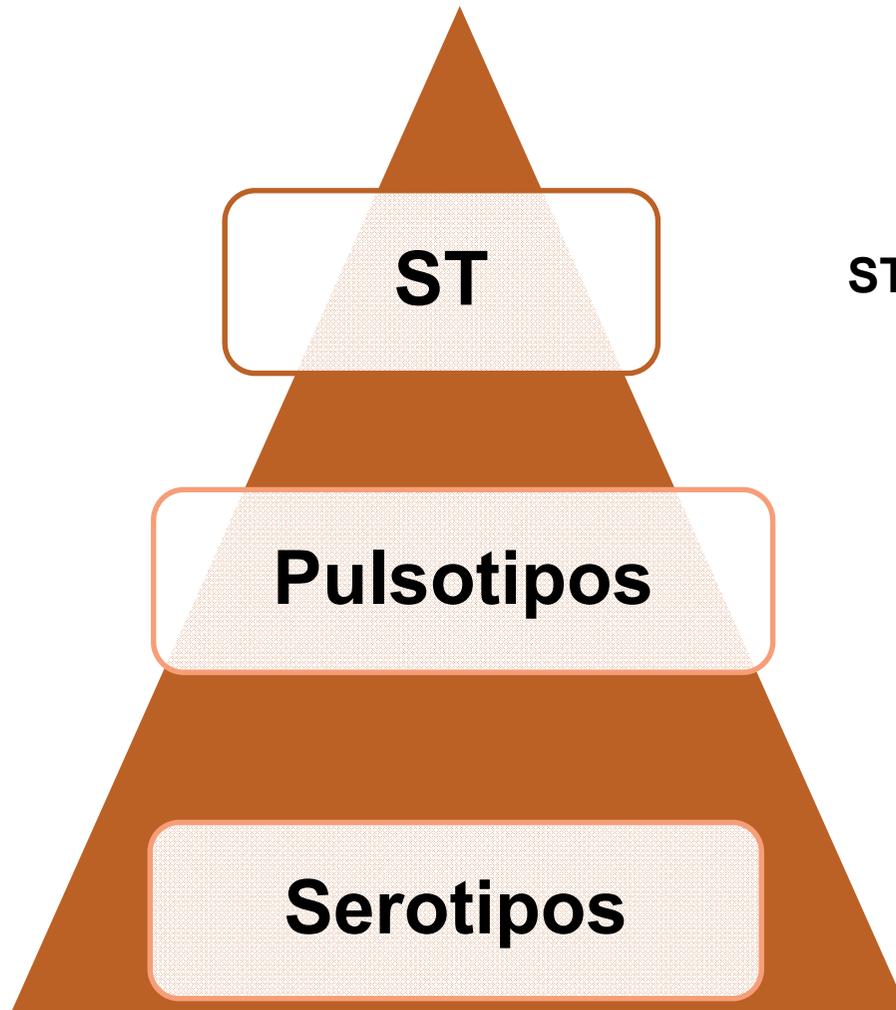
**11** superficies  
**20** productos RTE



**31** aislados



## Información de los aislados (n= 31)



### 9 Secuencias tipo

ST1, ST3, ST8, ST9, ST11, ST31, ST87,  
ST121, ST155

### 12 pulsotipos

1/2a: 15 aislados

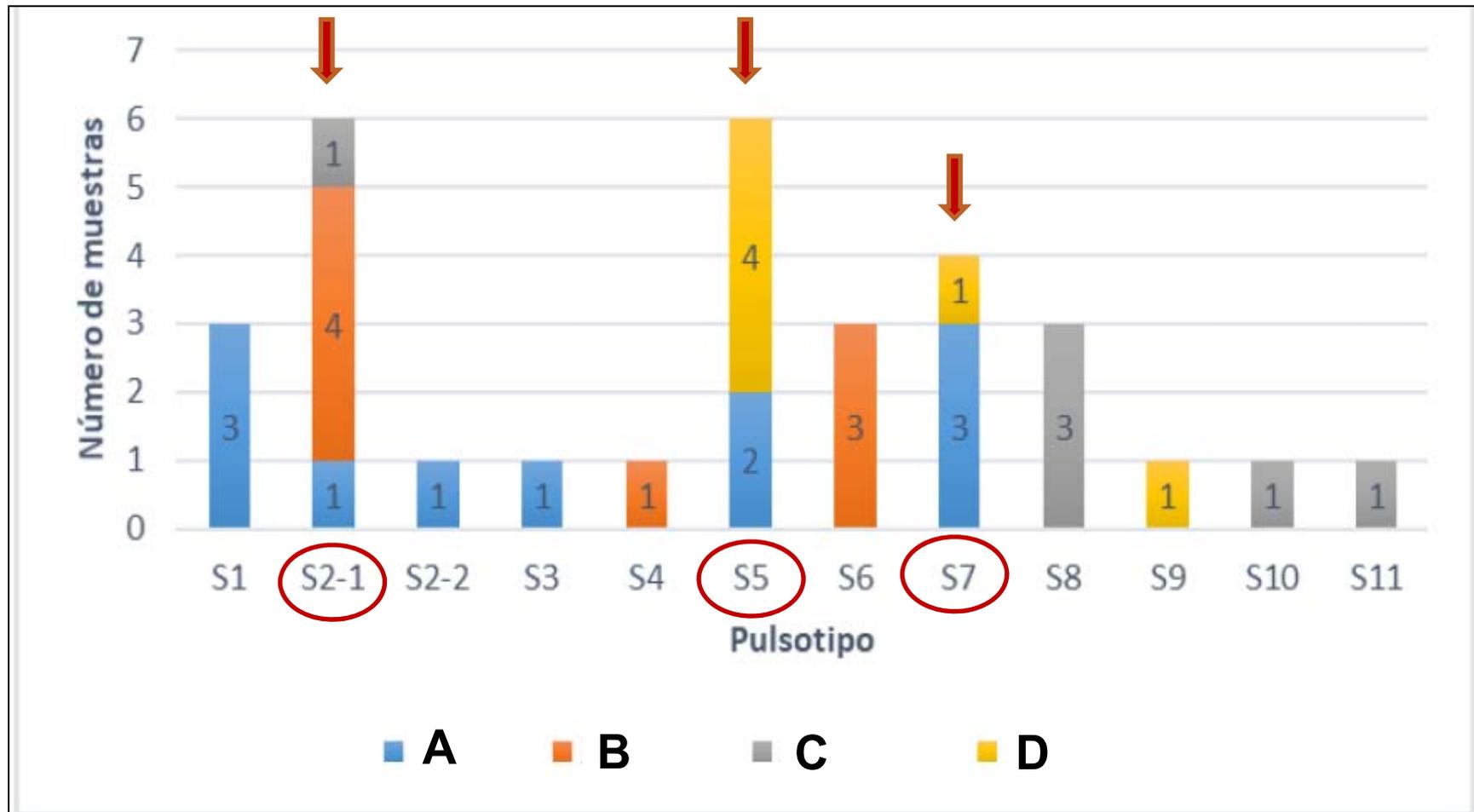
1/2b: 7 aislados

1/2c: 8 aislados

4b: 1 aislado



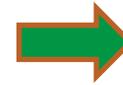
## Distribución pulsotipos por **industrias**



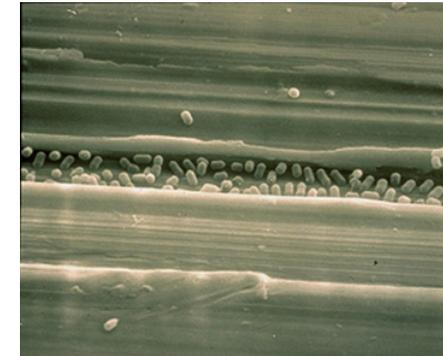
❖ Detección de **reservorios** de *L. monocytogenes*

## Resistencia de *L. monocytogenes* a **biocidas**

- Limpieza insuficiente previa a la desinfección
- Humedad excesiva de las superficies
- Aclarado insuficiente tras la desinfección
- Dosis inadecuada desinfectantes



BIOFILMS



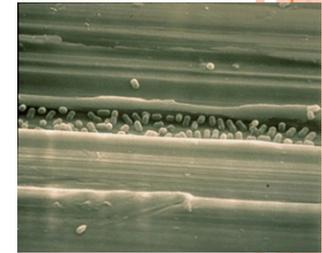
Exposición a **concentraciones subletales** de desinfectantes



Adaptación **fenotípica** a desinfectantes  
Adquisición **genética** de mecanismos de resistencia:  
**biocidas, RAM**



## Resistencia de *L. monocytogenes* a biocidas



- ❖ Cualquier cepa puede **persistir** en un “nicho”
- ❖ Las **cepas resistentes** pueden contribuir a la **persistencia**
- ❖ La **persistencia** puede favorecer la adquisición de **resistencia**

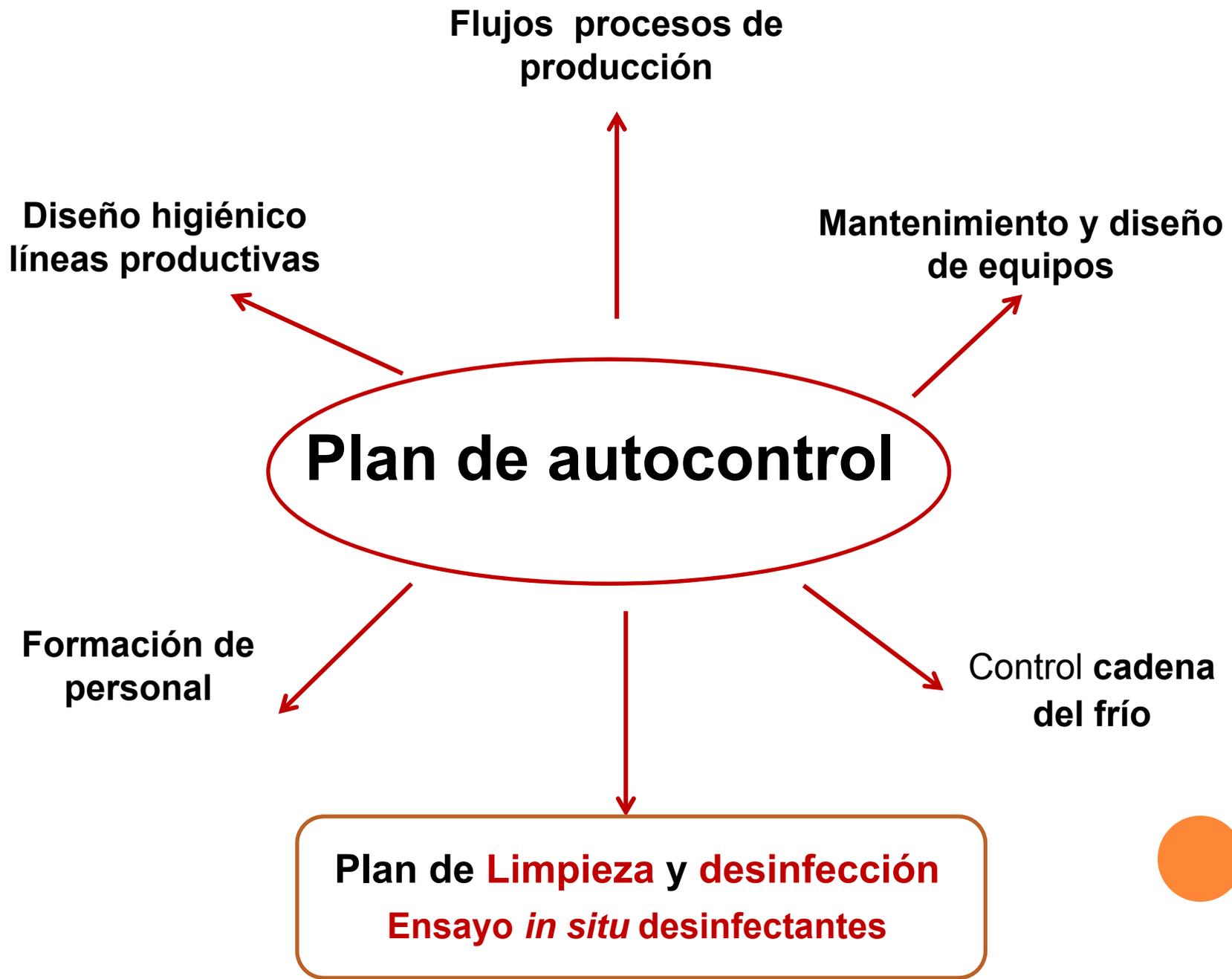
**Necesidad de identificar y controlar la persistencia:**

implicación de la persistencia en brotes



❖ **Diseño de estrategias** para el control de  
*L. monocytogenes* en la industria



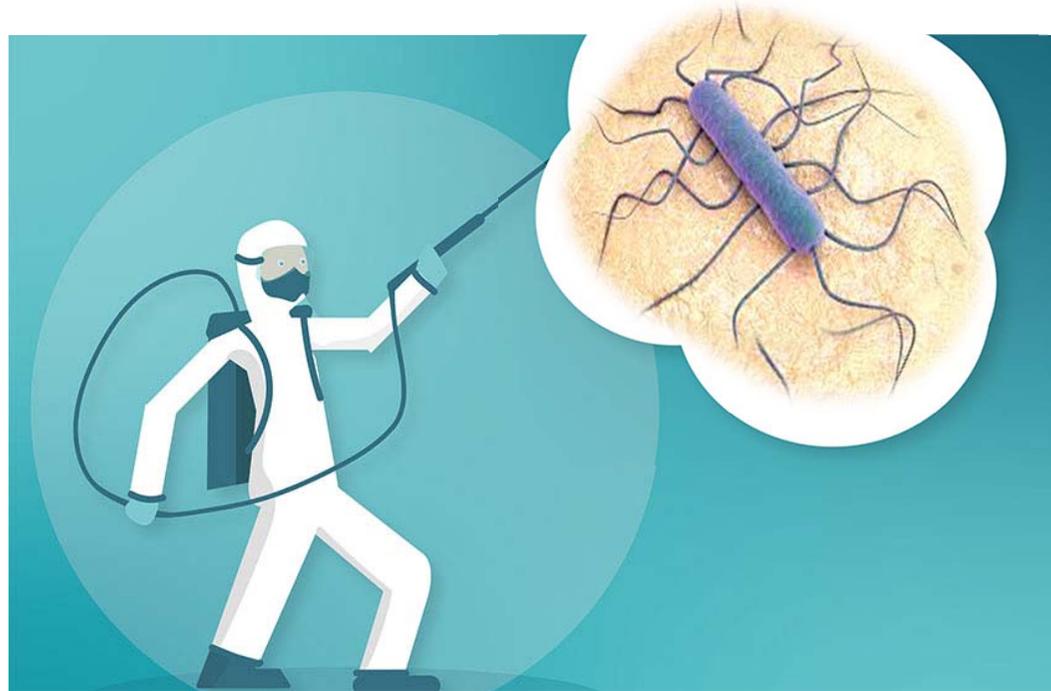


# Conclusiones

- ❖ Generación de **conocimiento científico** para la evaluación del riesgo de listeriosis por consumo de alimentos
- ❖ **Mejora del APPCC** en la industria alimentaria para el control de *Listeria monocytogenes* en el procesado



# Gracias por vuestra atención



***M<sup>a</sup> Carmen Rota García***  
[crota@unizar.es](mailto:crota@unizar.es)



**Universidad**  
Zaragoza



Instituto Universitario de Investigación Mixto  
Agroalimentario de Aragón  
**Universidad Zaragoza**