



UNIVERSIDAD DE JAÉN
Centro de Estudios de Postgrado

Trabajo Fin de Máster

**Métodos de
detección de
Listeria spp. en
alimentos**

Alumno/a: Ortega Marjalizo, Rocío

Tutor/a: Rosario Lucas López
Dpto: Ciencias de la Salud

Julio, 2021

ÍNDICE:

RESUMEN.....	6
ABSTRACT	7
1. INTRODUCCIÓN	8
1.1 Enfermedades transmitidas por los alimentos	8
1.1.1 Concepto de infección-intoxicación.....	10
1.2 Aspectos generales de la Seguridad Alimentaria.....	11
1.2.1 Calidad alimentaria en nuestro país	12
1.2.2 La importancia de la seguridad alimentaria	13
1.3 Listeria y Listeriosis	15
1.3.1 Taxonomía de <i>Listeria</i> spp	15
1.3.2 Características generales	16
1.3.2.1 Ecología microbiana	16
1.3.2.2 Temperatura	17
1.3.2.3 Actividad de agua	17
1.3.2.4 Efecto de pH	17
1.3.2.5 Efecto de tratamiento.....	18
1.3.3 Listeriosis	18
1.3.4 Principales alimentos implicados	20

2. OBJETIVOS	23
3. MATERIALES Y MÉTODOS	24
3.1 Búsqueda de literatura.....	24
3.2 Criterio de elegibilidad	24
3.3 Extracción de datos	24
4. RESULTADOS	25
4.1 Carnes.....	25
4.1.1 Prevalencia de <i>Listeria</i> spp. en carnes	25
4.1.2 Métodos de detección de <i>Listeria</i> spp. en carnes.....	28
4.2 Aves de corral.....	31
4.2.1 Prevalencia de <i>Listeria</i> spp. en aves de corral	31
4.2.2 Métodos de detección de <i>Listeria</i> spp. en aves de corral	33
4.3 Alimentos listos para consumir	38
4.3.1 Prevalencia de <i>Listeria</i> spp. en ALC.....	38
4.3.2 Métodos de detección de <i>Listeria</i> spp en ALC	39
4.4 Frutas y vegetales	40
4.4.1 Prevalencia de <i>Listeria</i> spp. en frutas	40
4.4.2 Prevalencia de <i>Listeria</i> spp. en verduras	41
4.4.3 Métodos de detección de <i>Listeria</i> spp. en frutas y verduras	44
4.5 Pescados.....	44

4.5.1 Prevalencia de <i>Listeria</i> spp. en pescado.....	44
4.5.2 Métodos de detección de <i>Listeria</i> spp. en pescado	47
4.6 Huevos	50
4.6.1 Prevalencia de <i>Listeria</i> spp. en huevos	50
4.6.2 Métodos de detección de <i>Listeria</i> spp. en huevos	51
5. DISCUSIÓN.....	53
6. CONCLUSIONES	56
7. BIBLIOGRAFÍA.....	57

RESUMEN

Debido a su capacidad para sobrevivir en condiciones difíciles, las especies de *Listeria* se han aislado en casi todos los tipos de alimentos. Este estudio tuvo como objetivo la recopilación de artículos mediante una búsqueda bibliográfica, con el fin de analizar datos de prevalencia de *Listeria* spp. y *Listeria monocytogenes* en diferentes tipos de alimentos y estudiar los métodos de detección que han sido utilizados para detectar este patógeno en los alimentos. Tras la realización de la búsqueda bibliográfica, dos de los artículos cumplieron todos los criterios de inclusión y a su vez, estos artículos contenían referencias bibliográficas de otros artículos que también han sido seleccionados previamente.

Los alimentos estudiados fueron carnes, aves de corral, alimentos listos para consumir, frutas, verduras, pescados y huevos. Respecto a los resultados, la prevalencia de *Listeria* spp. fue mayor en carnes, aves de corral, frutas y verduras y los métodos que se utilizan con mayor frecuencia para la detección de *Listeria* spp. son los métodos bioquímicos y la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en los alimentos.

Las tasas de prevalencia de *Listeria* spp. y *L. monocytogenes* difieren entre los tipos de alimentos, sin embargo mostraron que existe un riesgo de salud pública y los resultados contribuyen a la vigilancia epidemiológica de la presencia de *Listeria* spp. en alimentos.

Palabras clave: *Listeria* spp., métodos de detección, salud pública.

ABSTRACT

Due to their ability to survive in harsh conditions, *Listeria* species have been isolated from almost all types of food. The objective of this study was to compile articles by means of a bibliographic search, in order to analyze data on the prevalence of *Listeria* spp. and *Listeria monocytogenes* in different types of food and to study the detection methods that have been used to detect this pathogen in food. After conducting the bibliographic search, two of the articles met all the inclusion criteria and, in turn, these articles contained bibliographic references of other articles that have also been previously selected.

The foods studied were meats, poultry, ready-to-eat foods, fruits, vegetables, fish, and eggs. Regarding the results, the prevalence of *Listeria* spp. it was higher in meats, poultry, fruits and vegetables and the most frequently used methods for the detection of *Listeria* spp. are biochemical methods and polymerase chain reaction (PCR) in food.

The prevalence rates of *Listeria* spp. and *L. monocytogenes* differ between food types, however they showed that there is a public health risk and the results contribute to the epidemiological surveillance of the presence of *Listeria* spp. in food.

Keywords: *Listeria* spp., Detection methods, Public health.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Enfermedades transmitidas por alimentos

Las enfermedades transmitidas por alimentos (ETAs) se consideran una importante carga de enfermedad en el mundo. La Organización Mundial de la Salud (OMS) señala que en los países menos desarrollados, las ETAs son la principal causa de enfermedades y muerte, relacionado con una carga socioeconómica significativa. En los países desarrollados, las ETAs son responsables de altos niveles de pérdida de productividad, costos asociados al uso de los servicios de salud y a la implementación de políticas de inocuidad de los alimentos. Un 70% de las gastroenteritis se producen por la ingestión de alimentos contaminados con microorganismos o toxinas. Se han descrito cerca de 250 agentes causantes de ETAs, que incluyen bacterias, virus, hongos, parásitos, priones, toxinas y metales pesados. En la sociedad actual, los cambios en los hábitos alimentarios como el consumo de alimentos envasados, comidas fuera del hogar, consumo de comidas preparadas y comidas rápidas, son factores que contribuyeron al incremento de las ETAs. (González *et al.* 2005; Olea *et al.* 2012).

La OMS estima que, en el mundo, la incidencia anual de gastroenteritis es 1.500 millones de casos y 3 millones de niños menores de cinco años mueren anualmente. La presencia de contaminación alimenticia ya sea mediante, intoxicaciones o infecciones bacterianas, parasitarias o una combinación de las mismas (infecto-intoxicación) son frecuentes y afectan principalmente a grupos sociales de bajos recursos, aquellos que por razones económicas, la mayoría de las veces tienen acceso a alimentos de bajo costo, cuya calidad e inocuidad en muchos casos es por lo menos dudosa. Lo anterior también puede ocurrir en los alimentos preparados para la venta al público o en el ámbito del hogar, debido a las prácticas deficientes utilizadas para prepararlos, manipularlos y consumirlos.

Los propios consumidores pueden originar problemas de contaminación cuando tocan directamente los alimentos con las manos sucias, o al comer en los platos utilizados en el local que proporciona la comida, entre otras diversas formas.

Por otro lado, la falta de conocimientos sobre las buenas prácticas de manufactura, así como la escasa disponibilidad de información técnica complementaria repercute negativamente en la manipulación y preparación de los alimentos, tanto a nivel familiar como comercial. Esta carencia de conocimientos técnicos básicos sobre la inocuidad por parte de quienes preparan alimentos se puede considerar uno de los factores que contribuyen a la contaminación alimentaria, donde de forma indirecta se ven mayormente afectados los grupos más vulnerables a enfermarse, como los niños, los ancianos y las personas inmunodeprimidas.

Es importante conocer la historia de un alimento desde su origen y producción hasta el consumo. La disposición actual es dar seguimiento a las rutas que ha seguido el alimento desde su origen, posibles causas de contaminación durante las fases de manipulación, procesamiento, almacenamiento, transporte, distribución y la exposición de cada alimento hasta que llega finalmente al consumidor. La trazabilidad permite conocer la historia del alimento, su utilización y localización por medio de los códigos de registros, lo que hace posible disponer rápidamente de información sobre el mismo a lo largo de toda la cadena alimentaria. (Kopper *et al.* 2019)

La Organización Mundial de la Salud (OMS) indica que la carga mundial de ETAs son comparables con las principales enfermedades infecciosas: VIH/ SIDA, paludismo y tuberculosis. Las causas más frecuentes de enfermedades transmitidas por alimentos son producidas por agentes de enfermedades diarreicas especialmente norovirus, *Campylobacter spp.*, *Salmonella entéricas*, *Salmonella typhi*, *Taenia solium*, *Staphylococcus aureus*, *Clostridium perfringens*, *Escherichia coli* O157:H7, *Shigella sp.*, *Listeria monocytogenes* y el virus de la hepatitis A son responsables de una alta mortalidad. La carga mundial de ETAs es de 33 millones de años de vida ajustados por discapacidad, y 40% en niños menores de cinco años de edad. Sobre la base de la mortalidad

infantil y de adultos, 14 países tienen diferentes cargas de ETA, con la mayor proporción en las subregiones de África, seguidas de las subregiones en el sudeste de Asia y la subregión del Mediterráneo Oriental.

De forma continua se observa que el grupo de edad más afectado es el de 15 a 44 años, que corresponde a población económicamente activa. Este grupo presenta un alto riesgo de enfermar por una ETA, ya que generalmente consume alimentos fuera del hogar. El segundo grupo más afectado son los niños en edad escolar (5 a 14 años y de 1 a 4 años).

El hecho de que estos grupos etarios ocupen el segundo y tercer lugar en la distribución porcentual puede estar influido porque en esta etapa se inicia el consumo de alimentos fuera del hogar, una vez que los niños ingresan a la escuela. Este hecho puede incrementar la presencia de las ETAs, más aún sino se tienen en cuenta las medidas requeridas en la manipulación y conservación de los alimentos. La incidencia de las ETAs ha aumentado alrededor del mundo, en función de factores como cambios ambientales que conducen a la resistencia antimicrobiana, el aumento de la población, la aparición de grupos poblacionales vulnerables, el rápido incremento del comercio internacional de alimentos, los avances tecnológicos en la producción, el aumento del uso de aditivos, el incremento del consumo de productos manufacturados, el recorrido de largos trayectos para su comercialización, la preferencia de alimentos de rápida preparación y el consumo de éstos en la vía pública (Havelaar *et al.* 2015).

1.1.1 Concepto de infección-intoxicación

Es importante diferenciar las infecciones alimentarias de las intoxicaciones alimentarias:

- Infecciones alimentarias son las ETAs producidas por la ingestión de alimentos o agua contaminados con agentes infecciosos específicos, como bacterias, virus, hongos o parásitos.

- **Intoxicaciones alimentarias:** son las ETAs producidas por ingerir alimentos o agua contaminados con cantidades suficientes de toxinas elaboradas por proliferación bacteriana o con agentes químicos (metales pesados y otros compuestos orgánicos) que se incorporan a ellos de modo accidental, incidental o intencional en cualquier momento desde su producción hasta su consumo.

1.2 Aspectos generales de la Seguridad Alimentaria

El concepto de seguridad alimentaria nace en la década de los 70. Su evolución, hasta la definición actual, ha incorporado diferentes variables económicas y socioculturales. Según la FAO, en una definición establecida en la Cumbre Mundial de la Alimentación (CMA) de Roma en 1996. La seguridad alimentaria se define como el estado en el que todas las personas tienen, en todo momento, acceso físico y económico a suficientes alimentos para satisfacer sus necesidades nutricionales y preferencias alimentarias, a fin de llevar una vida activa y sana. Los pilares básicos de la seguridad alimentaria y nutricional son: disponibilidad física de los alimentos, acceso, utilización biológica, estabilidad.

- **Disponibilidad física de los alimentos:** La seguridad alimentaria aborda la parte correspondiente a la “oferta” dentro del tema de seguridad alimentaria y es función del nivel de producción de alimentos, los niveles de las existencias y el comercio neto.
- **El acceso económico y físico a los alimentos:** Una oferta adecuada de alimentos a nivel nacional o internacional en sí no garantiza la seguridad alimentaria a nivel de los hogares. La preocupación acerca de una insuficiencia en el acceso a los alimentos ha conducido al diseño de políticas con mayor enfoque en materia de ingresos y gastos, para alcanzar los objetivos de seguridad alimentaria.

- La utilización de los alimentos: La utilización normalmente se entiende como la forma en la que el cuerpo aprovecha los diversos nutrientes presentes en los alimentos. El ingerir energía y nutrientes suficientes es el resultado de buenas prácticas de salud y alimentación, la correcta preparación de los alimentos, la diversidad de la dieta y la buena distribución de los alimentos dentro de los hogares. Si combinamos esos factores con el buen uso biológico de los alimentos consumidos, obtendremos la condición nutricional de los individuos.
- La estabilidad en el tiempo de las tres dimensiones anteriores: Incluso en el caso de que su ingesta de alimentos sea adecuada en la actualidad, se considera que no gozan de completa seguridad alimentaria si no tienen asegurado el debido acceso a los alimentos de manera periódica, porque la falta de tal acceso representa un riesgo para la condición nutricional. Las condiciones climáticas adversas (la sequía, las inundaciones), la inestabilidad política (el descontento social), o los factores económicos (el desempleo, los aumentos de los precios de los alimentos) pueden incidir en la condición de seguridad alimentaria de las personas.

1.2.1 Calidad alimentaria en nuestro país

Cuando hablamos de la calidad de un alimento, se hace referencia a sus características sensoriales (olor, color, sabor, textura) e higiénico sanitarias. Pero hay algo que también garantiza el que verdaderamente sea de calidad: su procedencia u origen. En España existen zonas de reconocido prestigio especializadas en la elaboración de determinados productos y muchas de ellas están identificadas con los conocidos Sellos de Calidad Diferenciada que podemos ver en las etiquetas de alimentos.

Marcas de alimentos con DOP, IGP y ETG, a continuación se desglosa los sellos por orden de exigencia:

- Denominación de Origen Protegida (DOP): es el sello más exigente en cuanto a condiciones, ya que indica que todo alimento que lo lleve ha sido producido, transformado y elaborado en una zona geográfica concreta.
- Indicación Geográfica Protegida (IGP): aunque guarda similitudes con el anterior, lo que lo hace diferente es que NO todas las etapas por las que pasa el alimento han de realizarse en la misma zona. Este sello versa sobre todo en el origen y en que las características del alimento guarden relación con la zona de procedencia del mismo. Tanto la DOP como la IGP se identifican con el nombre de la zona o región geográfica del producto alimentario, bien sea comarca, región o lugar de procedencia.
- Especialidad tradicional garantizada (ETG): de la misma manera que los sellos arriba mencionados, éste también hace referencia a la composición, producción y elaboración, con la diferencia de que en este caso, no está tan ligado con la procedencia sino con un método tradicional de producción.

Estos sellos están amparados por la Unión Europea con el fin de ofrecer garantía al consumidor y servir de promoción por toda Europa, de los productos que lo lleven en su etiqueta.

1.2.2 La importancia de la seguridad alimentaria

La seguridad de los alimentos es un aspecto al que hay que prestar especial atención, por su estrecha relación con la salud. La necesidad de transmitir confianza a los consumidores es cada vez más importante y especialmente hoy día, cuando tanto el entorno como el comercio internacional han adquirido gran relevancia en relación a la movilidad de productos, materias primas y sus componentes.

El marco legal de la Unión Europea, establece reglas claras en cuanto a la importancia de prevenir, eliminar y reducir el nivel de riesgos en la salud humana en toda la cadena alimentaria, incluyendo procesos, productos y actividades relacionados con la manipulación y producción de alimentos, implicando al mismo tiempo operadores privados y autoridades competentes (además de productores, fabricantes, distribuidores, importadores, etc.).

Por su parte, las autoridades europeas confían en la acreditación como una de las estrategias fundamentales, quedando patente en las exigencias establecidas en el Reglamento (CE) nº 882/2004, manteniendo la obligatoriedad de las autoridades en cuanto a la designación de laboratorios acreditados para los controles oficiales, de acuerdo con la norma ISO/IEC 17025. En la actualidad, la práctica totalidad de los laboratorios oficiales de las administraciones que realizan el control oficial en España están acreditados por ENAC.

Por otro lado, en cuanto a la seguridad alimentaria, es necesario tener en cuenta que además del marco de controles oficiales en el que nos movemos, es necesario que exista control en cuanto a la capacidad y fiabilidad de los procesos desarrollados por los operadores.

Los procesos de decisión están basados en gran medida en los resultados analíticos de los laboratorios, además de otras actividades de control e inspección. Estos resultados, no solamente han de ser técnicamente fiables sino que a su vez, también es necesario que se demuestre su fiabilidad en cualquier momento (especialmente en casos de alarma sanitaria) usando medios de prueba de aceptación internacional, motivo por el cual es especialmente recomendable en la industria alimentaria la acreditación de los sistemas internos de control, incluidos los laboratorios interno.

En cuanto a la distribución, esta juega un importante papel en cuanto a la inocuidad de los alimentos, siendo cada vez más importante demostrar mediante ensayos, y otras actividades acreditadas (certificaciones o inspecciones), que sus productos cumplen los requisitos de seguridad.

Es fundamental considerar, la necesidad de seguimiento y aplicación de todos los requisitos en cuanto a la importancia de garantizar el buen estado de los productos, evitando el desarrollo de situaciones complicadas, lo cual pone en peligro la salud de las personas que lo consumen, conllevando para la empresa importantes consecuencias negativas, tanto a nivel económico, como en cuanto a su competitividad en el mercado.

1.3. *Listeria* y listeriosis

La listeriosis es una infección bacteriana que se produce en animales y humanos causada por *Listeria monocytogenes*. Esta bacteria es una de las ocho especies del género *Listeria* (*innocua*, *ivanovii*, *welshimeri*, *seeligeri*, *marthii*, *rocourtiae* y *grayi*) y la única que se considera un patógeno de impacto para el hombre.

1.3.1. Taxonomía de *Listeria* spp

Listeria monocytogenes se describió por primera vez hace más de 60 años, cuando Murray y col. en 1926 aislaron una bacteria corta, gram positiva, de forma bacilar y que producía patologías en conejos y cobayas. Se denominó *Bacterium monocytogenes* porque infectaba a los leucocitos sanguíneos. A finales del siglo XIX ya se describían microorganismos similares a *L. monocytogenes* que causaban infección tanto en animales como en personas. Pirie en 1930 aisló en hígado de gerbos una bacteria similar a la que denominó *Listerella hepatolytica* en nombre del famoso cirujano Joseph Lister (1827-1912). Es importante citar que anteriormente el nombre de “*Listerella*” fue adoptado por un grupo de mohos, productores de mucílago. Fue en 1940, finalmente, cuando se llegó al acuerdo del nombre actual de *L. monocytogenes*.

La clasificación taxonómica de *L. monocytogenes* es: Dominio: Bacteria, Filo: Firmicutes, Clase: Bacilli, Orden: Bacillales, Familia: Listeriaceae, Género: *Listeria*. El género *Listeria* consta de 17 especies: *L. monocytogenes*, *L. ivanovii*, *L. seeligeri*, *L. innocua*, *L. welshimeri*, *L. martii*, *L. rocourtiae*, *L. grayi* y *L. weihenstephanensis* (Halter et al. 2013) , *L. fleischmannii* (Berscht et al. 2013), *L. floridensis*, *L. aquatica*, *L. cornellensis*, *L. riparia*, *L. grandensis* (den Bakker et al. 2014), *L. booriae* y *L. newyorkensis* (Weller et al. 2015). Entre estas especies, *L. grayi* es la especie relacionada más lejanamente (Swaminathan et al. 2007; Jeyaletchumi et al. 2010). Se sabe que *L. ivanovii* y *L. monocytogenes* causan listeriosis, principalmente en rumiantes y humanos, respectivamente (CDC, 2014 a).

1.3.2. Características generales

Según la Sociedad Española de Microbiología Clínica (SEIMC) podemos definir a *L. monocytogenes* como un bacilo corto, gram-positivo, no esporógeno, que se encuentran en pares o como células aisladas de 10 micrometros de longitud.

Su temperatura óptima de crecimiento es de 30-37°C, pero puede crecer a 4°C, ya que es una bacteria psicrotrofa. Crece en aerobiosis y anaerobiosis, por lo que se considera un microorganismo anaerobio facultativo. Es una bacteria móvil a 25°C con una modalidad de “volteo” o “barrilete” mediante flagelos peritricos e inmóviles a 35Cº (Juntilla et al.1988)

1.3.2.1 Ecología microbiana

En cuanto a la ecología microbiana de *L. monocytogenes*, podemos destacar las siguientes características (Figura 1):

1.3.2.2 Temperatura

Puede sobrevivir en condiciones de congelación, resistiendo varias semanas a -18°C en varios sustratos alimenticios, aunque en condiciones ácidas o de laboratorio su supervivencia se acorta.

El rango de temperatura de crecimiento de esta bacteria oscila desde 0 a 50°C, a estas temperaturas con un pH neutro y con unas elevadas concentraciones de nutrientes en el ambiente, *L. monocytogenes* presenta un crecimiento lento con tiempos de generación de 3 a 6 días. En presencia de microorganismos competitivos y a niveles de pH más bajos (carne picada, hígado...) a veces sobrevive sin multiplicarse a temperaturas de 4°C. Su crecimiento mejora conforme aumenta la temperatura.

1.3.2.3 Actividad de agua

Su actividad de agua tiene como límite inferior aproximadamente de 0.90 a 30°C en presencia de glicerol para controlar su actividad, mientras que 4°C y 10°C es de 0.92 y 0.93, utilizando NaCl y sacarosa respectivamente como sustrato. El crecimiento de *L. monocytogenes* con actividad de agua entre 0.924 y 0,921 es muy reducido (Trepatt. 2002).

1.3.2.4 Efecto del pH

El pH mínimo de crecimiento depende de diferentes factores como la temperatura de incubación, la composición general de nutrientes del sustrato de crecimiento y la presencia o cantidad de NaCl y otras sales e inhibidores. *L. monocytogenes* es capaz de resistir un amplio margen de pH, siendo el límite superior de 9.6 y el inferior de 4.6-5.0, con un rango óptimo de pH 6-8.

1.3.2.5 Efecto de tratamiento

El cambio en los componentes de la atmósfera resulta poco eficaz contra *L. monocytogenes*. En condiciones aeróbicas, microaerófilicas y anaeróbicas se han observado tiempos de generación parecidos, sin que existan indicios de que elevadas concentraciones de CO₂ ejerzan un efecto inhibitor. En lo que respecta a tratamientos por calor, la pasteurización comercial de 71° C durante 15 min inactiva la bacteria.

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	Es un anaerobio facultativo que puede crecer en ausencia de oxígeno, por ejemplo, envasado a vacío o atmósfera modificada			

Adaptada de (FSAI, 2003) (UE, 2004, 2008).

Figura 1: Factores que afectan al crecimiento y supervivencia de *Listeria monocytogenes*.

1.3.3 Listeriosis

L. monocytogenes, es un patógeno oportunista ya que puede sobrevivir y multiplicarse fuera de los hospedadores animales. Debido a esta característica junto con su carácter ubicuitario, puede colonizar empresas de elaboración de alimentos. Se considera una bacteria patógena emergente, ya que es a partir de 1980 cuando se empieza a aislar de alimentos como consecuencia de cambios en la producción, procesamiento y distribución de los alimentos. Además, hay que añadir los cambios de hábitos con la alimentación de la población, ya que existe un incremento en el consumo de alimentos listos para el consumo (ALC).

El riesgo de que se presente una listeriosis se incrementa cuando estos alimentos son consumidos por personas encuadradas en un grupo de alto riesgo, entre los que se encuentran mujeres embarazadas, neonatos, personas inmunodeprimidas y personas mayores de 65 años.

La listeriosis, se trata de una enfermedad poco común pero grave, de origen alimentario y que es causada por el consumo de alimentos contaminados con *L. monocytogenes*. *L. monocytogenes* es una bacteria que causa zoonosis, ya que infecta a gran variedad de animales como al vacuno, ovino, aves, roedores, peces y crustáceos. El pienso que consumen los animales, en especial al ensilado mal conservado, es una entrada de la bacteria en los animales, aunque al ser una bacteria ubicuitaria, cualquier alimento es susceptible a su presencia. A pesar, de su potencial zoonótico, también es un importante contaminante medioambiental, de relevancia a nivel de salud pública.

L. monocytogenes, al tratarse de una bacteria que es ubicuitaria, se puede encontrar en una amplia variedad de lugares. En el medio ambiente, se puede hallar en el suelo, vegetales, pastos, aguas dulces y marinas, lodos, en explotaciones ganaderas e incluso en hogares, de 1-2 años en suelo.

También se puede encontrar en animales y en el hombre, encontrándose en un 10-30% y de un 3-11% respectivamente, como portadores intestinales. Este porcentaje aumenta entre personal de laboratorio, trabajadores de mataderos y veterinarios clínicos. La tasa de estos “portadores sanos” contrasta con la baja frecuencia con que se detecta la enfermedad: 1 a 3 casos anuales por millón de habitantes (Gómez. 1993).

La principal vía de transmisión de *L. monocytogenes*, es la contaminación cruzada, a partir de superficies, instalaciones, equipos de corte, utensilios y manipuladores; a lo cual hay que sumar la dificultad de eliminar los biofilms y el cruce entre productos frescos y terminados. Otras vías de relevancia son la contaminación en el origen del alimento, mediante la ingestión de alimentos contaminados con *L. monocytogenes* o bien mediante contacto directo poco frecuente o con animales. Por último, otra de las vías de transmisión es la materno-fetal, ya que se ha comprobado que puede transmitirse a través de la placenta.

1.3.4 Principales alimentos implicados

Entre los alimentos más frecuentes contaminados podemos encontrar el queso, la leche cruda y pasteurizada (David *et al.* 1985), carnes frescas de mamíferos, aves y productos cárnicos fermentados y pasteurizados, pescados y mariscos tanto frescos como ahumados, frutas, hortalizas y verduras. Pero a pesar de que son mucho los alimentos que pueden contaminarse con *L. monocytogenes*, los casos están relacionados con alimentos listos para consumo (LPC).

Es importante destacar la presencia de *Listeria spp.* en diferentes superficies alimentarias, como maquinas fileteadoras, tablas de corte y utensilios, así como la posterior contaminación del alimento durante el procesado. a presencia de *L. monocytogenes* en los productos LPC radica en la recontaminación que se produce tras el tratamiento térmico, en la manipulación y durante su procesado, así como durante la posterior conservación en refrigeración, ya que debido a que se trata de un bacteria psicrotrofa, y la refrigeración va a reducir la microbiota competitiva, se crea un ambiente idóneo para la multiplicación de *L. monocytogenes*. Observándose unas tasas de prevalencia de esta de un 3% en canales de cerdo, 12,5 % en jamones crudos y un 2% en jamón curado.

El cambio en los hábitos alimentarios debido a un cambio en la forma de vida, ha conducido a un consumo cada vez mayor de alimentos fuera del hogar, lo que ha hecho que cada vez sea mayor la producción de alimentos

LPC.

Según la FAO/OMS (2004) dentro de alimentos LPC se incluye cualquier alimento (incluidas bebidas) que se consume normalmente en crudo o cualquier alimento manipulado, elaborado, mezclado, cocinado o transformado de otro modo en un tipo de alimento que se consume normalmente sin elaboración adicional.

La AFSSA clasifica este tipo de alimentos según el riesgo debido a la presencia de *L. monocytogenes* (AFSSA. 2005) en tres grupos, exceptuando de esta clasificación los alimentos que sufren un tratamiento térmico o cualquier otro tratamiento tecnológico que asegure la destrucción de *L. monocytogenes*, y así lo reconozca la autoridad competente. De manera que este alimento llegue al consumidor exento de *L. monocytogenes*.

-Categoría 1:

Esta categoría incluye los alimentos que precisan una cocción o cualquier otra transformación antes de ser consumidos, que asegure la eliminación o reducción del microorganismo a un nivel aceptable. Los consumidores deberán conocer perfectamente las 7 condiciones de conservación y preparación de estos alimentos, y toda la información deberá figurar en la etiqueta.

Un ejemplo de este tipo de alimentos LPC son los preparados cárnicos a base de carne picada, que se someten a un tratamiento de plancha o fritura suficiente para reducir en su interior la carga microbiana.

En aquellos casos en que los productos a base de carne picada se vayan a consumir parcial o totalmente crudos, no habrá que considerarlos en esta categoría.

-Categoría 2

Se encuadran en esta categoría los alimentos LPC que en el momento de la

puesta a la venta no contienen *L. monocytogenes* o sus niveles son inferiores al criterio microbiológico reglamentado y además no permiten la multiplicación de la bacteria. También se incluyen los alimentos en los que se puede documentar experimentalmente que *L. monocytogenes* no crece en el producto o se dispone de bibliografía científica que ratifica la imposibilidad de crecimiento de *L. monocytogenes* en el producto.

-Categoría 3:

Dentro de esta última categoría se incluyen los alimentos LPC en los que puede multiplicarse *L. monocytogenes* y donde la seguridad sanitaria y la conformidad a los criterios microbiológicos depende de a su vez de la aplicación de buenas prácticas higiénicas (BPH) y un sistema de análisis de peligros y puntos de control críticos (APPCC) a lo largo de la cadena alimentaria, la fijación correcta del periodo de duración mínima del alimento en función de criterios microbiológicos y de una buena información destinada al consumidor sobre la temperatura de conservación, el periodo de duración mínima y el uso previsto.

2. OBJETIVO DEL ESTUDIO

El objetivo de este trabajo se centra en la recopilación de artículos mediante una búsqueda bibliográfica, con el fin de analizar datos sobre la prevalencia de *Listeria* spp. y *Listeria monocytogenes* en diferentes tipos de alimentos y estudiar los métodos de detección que han sido utilizados para detectar este patógeno en los alimentos.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Búsqueda de literatura

Se realizó una búsqueda bibliográfica para obtener artículos científicos sobre los brotes de *Listeria spp.* en alimentos, así como estudiar los diferentes métodos de detección que se han utilizado para detectar *Listeria spp.* Para contrastar el número de trabajos relacionados con la temática de estudio la búsqueda se ejecutó en tres bases de datos diferentes. Las bases de datos consultadas fueron Science Direct, Scopus y Pubmed, se introdujeron como palabras clave “ *Listeria outbreaks in food* “.

3.2 Criterio de elegibilidad

Se procedió a hacer un filtrado, estableciendo como criterios imprescindibles, que el estudio i) trate de *Listeria spp.* como patógeno principal, ii) trate de brotes causados por patógenos en alimentos iii) que estuviesen enmarcado entre los años 2015-2021. Los títulos y resúmenes de los artículos fueron revisados de forma independiente.

3.3 Extracción de datos.

En la base de datos de Science Direct, el resultado de la búsqueda fue de 9.024 artículos que cumplían alguno de los criterios establecidos, en la base de datos de Scopus, la búsqueda fue de 1.406 artículos y en la base de datos de Pubmed, los resultados de la búsqueda fueron de 1.599 artículos. Destacar que dos de los artículos cumplieron todos los criterios de inclusión mencionados anteriormente y a su vez, estos artículos contenían referencias bibliográficas de otros artículos que también han sido seleccionados previamente.

4. RESULTADOS

Las últimas dos décadas, *L. monocytogenes* se ha asociado con muchas enfermedades transmitidas por los alimentos en los seres humanos, que consumen alimentos contaminados, especialmente alimentos listos para comer, productos lácteos, carnes y aves de corral. A pesar de los avances en preparaciones alimentarias, sistema sanitario y público, este patógeno sigue siendo una de las principales causas de enfermedad transmitida por los alimentos. Los brotes de listeriosis se asocian con una amplia gama de alimentos. Las principales fuentes de brotes de listeriosis se pueden dar en carnes, pescados, vegetales y huevos. Por ello los resultados se dividen en 6 grupos principales de alimentos según la literatura recopilada: carnes, pescados, alimentos listos para consumo, verduras, frutas y huevos.

4.1 Carnes

4.1.1 Prevalencia de *Listeria* spp. en carnes.

Zarei *et al.* en 2013, analizaron muestras de carne de ternera, de búfalo y de cordero con el fin de detectar *L.monocytogenes*. Los resultados en las muestras de ternera fueron los siguientes, se analizaron 70 muestras y se detectaron 2 positivos de *L. monocytogenes* y una prevalencia de 2,8%. Para la carne de búfalo se analizaron 70 muestras y se detectaron dos muestras positivas de *L. monocytogenes*, y una prevalencia de 2.8%. Para la carne de cordero, se analizaron 70 muestras y se detectaron 3 muestras positivas y una prevalencia de 4,3 % de *L. monocytogenes*.

Jalali & Abedi en 2008, analizaron muestras de carne de ternera congelada y ternera fresca. De ternera fresca se analizaron 7 muestras, obteniendo 1 muestra positiva con *Listeria spp.* y con una prevalencia del 14,28% y en relación a *L. monocytogenes* se detectó una muestra positiva con *L. monocytogenes* y una prevalencia de 14,2 % en ternera congelada. En ternera fresca, se analizaron 38 muestras y se detectaron 6 muestras positivas con *Listeria spp.* con una prevalencia del 4,7%, con respecto a *L. monocytogenes* se detectó 1 sola muestra positiva con un

2,6 % de prevalencia.

En ternera picada se analizaron 21 muestras, y se detectó 1 muestra positiva con un 12,12 % de prevalencia de *Listeria spp.*, no se detectó ninguna muestra positiva con *L. monocytogenes*. En las 33 muestras de carne de oveja que se analizaron, se detectaron 4 muestras positivas con *Listeria spp.* y una prevalencia de 7,6%. Por otro lado, en las muestras de hamburguesas, se detectaron 2 muestras positivas con *Listeria spp.* y una prevalencia de *Listeria spp.* en un 18% en estos alimentos, respecto a *L. monocytogenes*, no se detectaron muestras positivas. Finalmente con respecto a las muestras de carne de camello, se han analizado 27 muestras y no se ha detectado muestras positivas para *Listeria spp.* y para *L. monocytogenes*.

Mostagui *et al.* en 2012, analizaron 200 muestras de carne de oveja, en las cuales detectaron 5 muestras positivas con *Listeria spp.* lo que suponía una prevalencia del 5%.

Tipo de comida	Nº de muestras en el ensayo	Nº de muestras positivas de <i>Listeria spp.</i> / Prevalencia de <i>Listeria spp.</i>	Nº de muestras positivas de <i>L.monocytogenes</i> / Prevalencia de <i>L. monocytogenes</i>	Autor / Año
Ternera	70	0/0	2/ 2,8%	Zarei <i>et al.</i> (2013)
Búfalo	70	0/0	2/ 2,8%	
Cordero	70	0/0	2 / 4,3%	

Tipo de comida	Nº de muestras en el ensayo	Nº de muestras positivas de <i>Listeria</i> spp. / Prevalencia de <i>Listeria</i> spp.	Nº de muestras positivas de <i>L.monocytogenes</i> / Prevalencia de <i>L. monocytogenes</i>	Autor / Año
Tenera congelada	7	1/ 14,28%	1 / 14,2%	Jalali & Abedi (2008)
Tenera fresca	38	6/4,7%	1/ 2,6%	
Tenera picada	21	1/12,12%	0/0	
Carne de oveja	33	4/7,6%	0/0	
Hamburguesa	11	2/18%	0/0	
Carne de camello	27	0/0	0/0	Moshtaghi <i>et al.</i> (2012)
Carne de oveja	200	5/2,5%	0/0	

Tabla 1: Resultados de las muestras positivas de *Listeria* spp. y *L. monocytogenes* en muestras de carne y su prevalencia. Elaboración propia.

4.1.2 Métodos de detección de *Listeria* spp. y *L. monocytogenes* en carnes.

Los métodos de detección que se han utilizado para detectar *Listeria* spp y *L. monocytogenes* han sido diversos, como podemos observar en la tabla 2, haciendo referencia a distintos tipos y estado de carne.

Zarei *et al.* en 2013, detectaron *Listeria* spp. y *L. monocytogenes* mediante la técnica de PCR multiplex. Realizaron un procedimiento de muestreo y el enriquecimiento del patógeno se realizó utilizando caldo de enriquecimiento de *Listeria* para *L. monocytogenes*, el caldo de enriquecimiento se incubó durante 20-24 horas a 35°C.

A continuación, se realizó la extracción de ADN y reacción de PCR multiplex. La extracción de ADN se realizó mediante ebullición (Kim JS *et al.* 2007). La muestra de un ml de los caldos de enriquecimiento se centrifugó a 14000 rpm durante 3 minutos. Los sedimentos bacterianos se resuspendieron en 1 ml de solución salina. Después de la centrifugación, los sobrenadantes los reemplazaron con 50 microlitros de agua destilada estéril y se incubaron a 100°C durante 10 minutos para liberar el ADN bacteriano. Después de hervir, los sobrenadantes obtenidos por centrifugación durante 5 minutos a 14000 rpm, se recogieron y almacenaron a -20°C hasta su uso. El ADN extraído del caldo de enriquecimiento de *Listeria* se mezcló y se utilizó en reacciones de PCR multiplex. Las reacciones de PCR se realizaron en un termociclador, en las siguientes condiciones: desnaturalización inicial a 94°C durante 3 minutos, desnaturalización a 94°C durante 45 segundos, hibridación del cebador a 54°C durante 45 segundos y extensión a 72°C durante 60 segundos. El ciclo final incluyó una extensión adicional de 5 minutos a 72°C. Los productos de la PCR se observaron después mediante electroforesis en gel de agarosa al 2% teñidos con bromuro de etidio. La sensibilidad de las reacciones de PCR multiplex se evaluó en muestras de carne de ternera, búfalo y cordero contaminadas artificialmente. Se homogeneizó veinticinco gramos de muestras en 225 ml del caldo de enriquecimiento específico y se agregó 1 ml de diluciones decimales seriadas de *Listeria*. La concentración bacteriana se

determinó mediante cultivo en TSA. Para dicha bacteria y cada producto se probaron tres niveles de contaminación. Se utilizó una muestra no enriquecida como control negativo.

En otro estudio Jalali & Abedi en 2008, detectaron *Listeria* spp. y *L. monocytogenes* en carnes, utilizando el protocolo de aislamiento y enriquecimiento selectivo, recomendado por el Departamento de Agricultura de los Estados Unidos (McClain & Lee, 1988). Se tomaron asépticamente veinticinco gramos de una muestra, se mezclaron durante 2 min en 225 ml de caldo de enriquecimiento de *Listeria* UVM (UVM I) y se incubaron a 37 ° C durante 24 h. Se transfirió un ml de enriquecimiento inicial a 9 ml de UVM II (caldo Fraser) y se incubó a 37 ° C durante 24 h. En segundo lugar, los enriquecimientos se sembraron mediante estrías en agar Oxford y agar Palcam y se incubaron a 37 ° C durante 48 h. Las placas se examinaron en busca de colonias típicas de *Listeria* y se detectaron 3 colonias sospechosas que se aislaron en Trypton Soy Agar suplementado con 0,6% de extracto de levadura (TSAYE) y se incubaron a 37 ° C durante 24 h.

Todos los aislamientos fueron sometidos a pruebas bioquímicas estándar como tinción de Gram, prueba de catalasa, d -mamoside, reducción de nitratos, hidrólisis de esculina y prueba de MR / VP. Para confirmaciones adicionales de *Listeria* spp., se realizaron otras reacciones bioquímicas, actividad β -hemolítica y prueba CAMP de acuerdo con el Manual de Bacteriología Sistemática de Bergey (Seeliger & Jones, 1986). En el protocolo de PCR, las cepas bacterianas se cultivaron en caldo BHI, a 37 ° C durante 18 h y se extrajo el ADN genómico de las cepas bacterianas mediante el método de Fitter *et al.* (1992). La PCR se logró según lo descrito por Fitter *et al.* (1992) y 16 μ l de las mezclas de reacción amplificadas por PCR se sometieron a electroforesis en geles de agarosa. Los productos de PCR se visualizaron mediante tinción con bromuro de etidio y se fotografiaron bajo luz UV.

Moshtagui *et al.* en 2012, utilizaron para detectar *Listeria* spp. , 200 muestras de carne de ovino. Las muestras se cultivaron en medios específicos. Los aislados se sometieron a pruebas bioquímicas estándar. A continuación, los aislados se analizaron mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

Alimento	Método de detección	Autor / Año
Carne de ternera	PCR multiplex	Zarei <i>et al.</i> 2013
Carne de búfalo	PCR multiplex	Zarei <i>et al.</i> 2013
Carne de cordero	PCR multiplex	Zarei <i>et al.</i> 2013
Carne de ternera congelada	Métodos de cultivo, pruebas bioquímicas y PCR	Jalali & Abedi 2008
Carne de ternera fresca	Métodos de cultivo, pruebas bioquímicas y PCR	Jalali & Abedi 2008
Carne de ternera picada	Métodos de cultivo, pruebas bioquímicas y PCR	Jalali & Abedi 2008
Carne de oveja	Métodos de cultivo, pruebas bioquímicas y PCR	Jalali & Abedi 2008
Hamburguesa	Métodos de cultivo, pruebas bioquímicas y PCR	Jalali & Abedi 2008
Carne de camello	Métodos de cultivo, pruebas bioquímicas y PCR	Jalali & Abedi 2008
Carne de oveja	Métodos de cultivo, pruebas bioquímicas, y PCR	Mostagui <i>et al.</i> 2012

Tabla 2: Resultados de los métodos de detección utilizados de *Listeria spp.*, y *L.monocytogenes* en carnes. Elaboración propia

4.2 Aves de corral

4.2.1 Prevalencia de *Listeria* spp. en aves de corral

Los resultados analizados en varios estudios en aves de corral se puede observar en la tabla 2, según el tipo de comida analizada.

En un estudio Sohrabi, Tajbakhsh *et al.* en 2013, analizaron 30 muestras de carne de pollo y detectaron 6 muestras positivas de *Listeria* spp. con una prevalencia del 20% para *Listeria* spp., por el contrario no se detectaron muestras positivas para *L.monocytogenes* en carne de pollo. En la carne de avestruz se analizaron 10 muestras y se detectaron 3 muestras positivas y una prevalencia de 30%, sin embargo no se detectaron muestras positivas con *L. monocytogenes* En la carne de pavo, se analizaron 12 muestras y se detectaron 3 muestras positivas con *Listeria* spp. y una prevalencia de 25% de *Listeria* spp. y no se detectaron muestras positivas con *L. monocytogenes*.

En otro estudio (Fallah *et al.* 2012) se analizaron 54 muestras de carne de pollo, de las cuales 22 fueron positivos para *Listeria* spp. y la prevalencia de *Listeria* spp. de 40,7%. Por otro lado, se detectaron 9 muestras positivas con *L. monocytogenes* y 17,6% de prevalencia para *L. monocytogenes*. Para carne de pavo, se analizaron 40 muestras y se detectaron 10 muestras positivas para *Listeria* spp. y una prevalencia de 25% y con respecto a *L.monocytogenes* se detectaron 5 muestras positivas y una prevalencia de 12,5 %. Del tipo de carne de codorniz, se analizaron 33 muestras y se detectaron 7 muestras positivas con *Listeria* spp. y una prevalencia de 21,2% y en relación con *L. monocytogenes*, se detectaron 3 muestras positivas y una prevalencia de 9,10% de *L. monocytogenes*, también se analizó en dicho estudio la carne de avestruz, se analizó en el ensayo 21 muestras y se detectaron 1 muestra positiva con *Listeria* spp. y una prevalencia de 4,67% y en relación con *L.monocytogenes* no se detectaron muestras positivas en la carne de avestruz.

Siguiendo con el estudio de (Fallah *et al.* 2012), se analizaron 51 muestras de hígado de pollo, se detectaron 29 muestras positivas con *Listeria* spp. y una prevalencia de 59,6%, en cuanto a *L.monocytogenes* se detectaron 11 muestras positivas y una prevalencia de 21,6%.

Panahi *et al.* (2013), analizaron 30 muestras de productos de codorniz al por menor y se detectaron 3 muestras positivas con *Listeria* spp. y un 10% de prevalencia para *Listeria* spp. Por otro lado no se detectaron muestras positivas con *L. monocytogenes*.

En el trabajo realizado por Jalali y Abedi 2008, se analizaron las muestras de aves de corral congeladas y frescas, en las aves de corral congeladas se analizaron 6 muestras y no se detectaron muestras positivas ni de *Listeria* spp. ni de *L. monocytogenes*. Sin embargo en aves de corral frescas, se analizaron 66 muestras y se detectaron tres muestras positivas frente a *Listeria* spp. con una prevalencia de 4,5 %, por otro lado de *L. monocytogenes* no se detectaron muestras positivas para dicho tipo de carne.

Tipo de comida	Nº de muestras en el ensayo	Nº de muestras positivas de <i>Listeria</i> spp./ Prevalencia de <i>Listeria</i> spp.	Nº de muestras positivas de <i>L. monocytogenes</i> / Prevalencia de <i>L. monocytogenes</i>	Autor / Año
Pollo	30	6/ 20%	0/0	Sohrabi, Tajbakhsh <i>et al.</i> (2013)
Avestruz	10	3/ 30%	0/0	
Pavo	12	3/25%	0/0	
Tipo de	Nº de	Nº de	Nº de muestras	Autor /

comida	muestras en el ensayo	muestras positivas de <i>Listeria</i> spp./ Prevalencia de <i>Listeria</i> spp.	positivas de <i>L. monocytogenes</i> / Prevalencia de <i>L. monocytogenes</i>	Año
Pollo	54	22/ 40,7%	9/ 17,6%	Fallah <i>et al.</i> (2013)
Pavo	40	10/ 25%	5/ 12,5%	
Codorniz	33	7/21,2%	3/ 9,10%	
Avestruz	21	1/ 4,67%	0/0	
Hígado de pollo	51	29/56,9%	11/ 21,6%	
Productos de codorniz al por menor	30	3/10%	0/0	Panahi <i>et al.</i> (2013)
Aves de corral congeladas	6	0/ 0	0/0	Jalali & Abedi (2008)
Aves de corral frescas	66	3/ 4,5 %	0/0	

Tabla 3: Resultados de las muestras positivas de *Listeria* spp. y *L. monocytogenes* en muestras de aves de corral y su prevalencia. Elaboración propia

4.2.2 Métodos de detección de *Listeria* spp. en aves de corral.

En el ensayo de (Sohrabi Tajbakshs *et al.* 2013), para la detección de *Listeria* spp. en la carne de ave, se realizó la toma de muestras, de acuerdo con Rahimi *et al.* 2012. Se tomaron asépticamente 25 g de cada muestra, se mezclaron durante 2 min en 225 mL de caldo de enriquecimiento para *Listeria* (UVM I) y se incubó a 37 ° C durante 24 h. Un mL de medio de enriquecimiento se transfirió a 9 mL de UVM II (Caldo Fraser) y se incubó a 37 ° C durante 24 h. En segundo lugar, los enriquecimientos se sembraron en el medio de cultivo Oxford, agar Palcam y se incubaron a 35 ° C durante 48 h. Las placas se examinaron en busca de colonias de *Listeria* (colonias negras) y al menos las posibles colonias positivas, fueron resembradas en agar Trypton Soy suplementado con 0,6% de extracto de levadura (TSAYE) e incubadas a 37 ° C durante 24 h. Todos los aislamientos fueron sometidos a la identificación estándar y pruebas bioquímicas que incluyen Tinción de Gram, prueba de catalasa, motilidad a 25 ° C y 37 ° C, producción de ácido a partir de glucosa, manitol, ramnosa, xilosa, -metil-D-mamosida y reducción de nitratos, hidrólisis de esculina, prueba MR / VP, actividad haemolítica y prueba CAMP.

En el estudio de (Fallah *et al.* 2012), se utilizaron métodos de cultivo, métodos bioquímicos y PCR, también se utilizó la técnica del número más probable (MPN).

Se homogeneizó una cantidad de 25 g de cada muestra con 225 ml de caldo de enriquecimiento de *Listeria* tamponado. Para el análisis mediante la técnica del MPN, por triplicado se prepararon series de tubos con 10, 1, 0,1 y 0,01 ml. Los medios se incubaron a 30 C durante 4 h como paso previo al enriquecimiento. Después, se añadió el suplemento selectivo BLEB y los tubos se incubaron durante otras 44 horas a 30° C. Los cultivos turbios se sembraron en agar PALCAM y se incubó a 35 C durante 48 h. Los posibles positivos se picaron colonias de *Listeria* en agar triptona soja suplementado con extracto de levadura al 0,6% e incubado a 35 C durante 24 h. Los aislamientos fueron sometidos a pruebas bioquímicas para su identificación como *Listeria* spp. y *L. monocytogenes* según el método de Roberts & Greenwood (2003, cap.6).

En el trabajo realizado por (Panahi *et al.* 2013) se utilizaron métodos de cultivo estándar y pruebas bioquímicas, para detectar *Listeria* spp. en los productos de carne de aves de corral, de acuerdo con el método de cultivo estándar (Gnanou *et al.* 2005). Al principio, la carne de ave comprada se dividió en porciones de 25 g que se colocaron en bolsas y se almacenaron a 3 ° C o se congelaron a -18 ° C. El cultivo de enriquecimiento fue realizado de acuerdo con el método de referencia ISO 11290-1 (Anónimo, 1996). Se añadieron asépticamente las muestras (25 g) a 250 ml de caldo de enriquecimiento de *Listeria* (UVM) y se preenriquecieron a 30 ° C durante 20 a 24 h, y luego 0,1 ml de cultivo se transfirió a caldo Fraser a 35 ° C durante 24 a 48 h. Después del enriquecimiento selectivo, las muestras se sembraron en Agar selectivo para *Listeria* (PALCAM) y se incubaron a 35 ° C durante 24 a 48 h. Las placas se examinaron para detectar la presencia de colonias de *Listeria*. De los productos cárnicos de aves de corral analizados, se transfirieron 12 muestras de color marrón verdoso y rodeadas por un halo negro a trypticase Soy Agar suplementado con extracto de levadura al 0,6% (TSAYE) y se incubaron a 30 ° C durante 24 a 48 h. Se realizaron pruebas bioquímicas como la presencia de catalasa, hemolítica, fermentación de xilosa y ramnosa, oxidasa y crecimiento en forma de paraguas en la motilidad en medio sulfuro-indol-motilidad (SIM), (prueba de reducción de azufre, producción de indol, motilidad). La tinción de Gram fue también realizada en las colonias dudosas. Las principales pruebas se observan en la Tabla 4, (Janzten *et al.* 2006).

Species	Hemolysis	Phosphatidylinositol phosphatase	Acid production	
			L-Rhamnose	D-Xylose
<i>L. monocytogenes</i>	+	+	+	-
<i>L. ivanovii</i>	+	+	-	+
<i>L. seeligeri</i>	+	-	-	+
<i>L. innocua</i>	-	-	V	-
<i>L. welshimeri</i>	-	-	V	+
<i>L. grayi</i>	-	-	V	-

Tabla 4: Pruebas bioquímicas, que se han utilizado para detectar *Listeria* spp. (Panahi *et al.* 2013).

Por otro lado Jalali & Abedi en 2008 analizaron muestras de aves de corral para detectar la presencia de *Listeria* spp., utilizando el protocolo de aislamiento y enriquecimiento selectivo, recomendado por el Departamento de Agricultura de los Estados Unidos (McClain & Lee, 1988). Se tomaron asépticamente veinticinco gramos de una muestra, se mezclaron durante 2 min en 225 ml de caldo de enriquecimiento de *Listeria* UVM (University of Vermont Media) (UVM I) y se incubaron a 37 ° C durante 24 h. Se transfirió un ml de enriquecimiento primario a 9 ml de UVM II (caldo Fraser) y se incubó a 37 ° C durante 24 h. En segundo lugar, los enriquecimientos se sembraron en estrías en agar Oxford y agar Palcam y se incubaron a 37 ° C durante 48 h. Las placas se examinaron en busca de colonias típicas de *Listeria* (colonias negras con centro negro hundido) y al menos 3 colonias sospechosas se subcultivaron en Trypton Soy Agar suplementado con 0,6% de extracto de levadura (TSAYE) y se incubaron a 37 ° C durante 24 h. Todos los aislamientos fueron sometidos a pruebas bioquímicas estándar como tinción de Gram, prueba de catalasa, d - mamoside, reducción de nitratos, hidrólisis de esculina y prueba de MR / VP. Para confirmaciones adicionales de *Listeria* spp., Se realizaron otras pruebas bioquímicas, como la actividad β -hemolítica y prueba CAMP de acuerdo con el Manual de Bacteriología Sistemática de Bergey (Seeliger & Jones, 1986). A continuación se realizó la PCR según lo descrito en (Fitter *et al.* 1992) y 16 μ l de las mezclas de la reacción amplificadas por PCR se visualizaron mediante electroforesis en gel de agarosa. Los productos de PCR se revelaron usando bromuro de etidio (1 μ g / mL) y se fotografiaron bajo luz UV.

Alimento	Métodos de detección	Autor / Año
Carne de pollo	Métodos de cultivo estándar y pruebas bioquímicas	Sohrabi Tajbakhsh <i>et al.</i> 2013
Carne de avestruz	Métodos de cultivo estándar y pruebas bioquímicas	Sohrabi Tajbakhsh <i>et al.</i> 2013
Carne de pavo	Métodos de cultivo y pruebas bioquímicas	Sohrabi Tajbakhsh <i>et al.</i> 2013

Alimento	Métodos de detección	Autor / Año
Carne de pollo	Métodos de cultivo y pruebas bioquímicas y PCR	Fallah <i>et al.</i> 2013
Carne de pavo	Métodos de cultivo y pruebas bioquímicas y PCR	Fallah <i>et al.</i> 2013
Carne de codorniz	Métodos de cultivo y pruebas bioquímicas y PCR	Fallah <i>et al.</i> 2013
Carne de avestruz	Métodos de cultivo y pruebas bioquímicas y PCR	Fallah <i>et al.</i> 2013
Hígado de pollo	Métodos de cultivo y pruebas bioquímicas y PCR	Fallah <i>et al.</i> 2013
Productos de codorniz al por menor	Métodos de cultivo estándar y pruebas bioquímicas	Panahi <i>et al.</i> 2013
Carne de aves de corral congeladas	Métodos de cultivo y pruebas bioquímicas y PCR	Jalali & Abedi 2008
Carne de aves de corral frescas	Métodos de cultivo y pruebas bioquímicas y PCR	Jalali & Abedi 2008

Tabla 5: Resultados de los métodos de detección utilizados de *Listeria* spp. y *L. monocytogenes* en aves de corral. Elaboración propia.

4.2 Alimentos listos para consumir

4.3.1 Prevalencia de *Listeria* spp. en alimentos listos para consumir

Los resultados de la contaminación en alimentos listos para consumir por *Listeria* spp. y *L.monocytogenes*, se puede observar en la tabla 3, en la que he recogido los datos de diferentes estudios que han detectado *Listeria* spp. y *L. monocytogenes* en alimentos listos para consumir.

Akya *et al.* en 2013, analizaron 92 muestras de ensalada verde , se detectaron 5 muestras positivas de *Listeria* spp. y 18,2% de prevalencia de *Listeria* spp. y de *L. monocytogenes* no se detectó muestras positivas. Otro tipo de alimentos listos para consumo, es en la ensalada dos se analizaron 11 muestras y se detectaron 2 muestras positivas de *Listeria* spp. y una prevalencia de 18,2% de *Listeria* spp. y no se detectaron muestras positivas de *L. monocytogenes*.

Tipo de comida	Nº de muestras en el ensayo	Nº de muestras positivas para <i>Listeria</i> spp. Prevalencia de <i>Listeria</i> spp.	Nº de muestras positivas de <i>L. monocytogenes</i> Prevalencia de <i>L.monocytogenes</i>	Autor / Año
Ensalada verde	92	5 / 18,2 %	0/0	Akya <i>et al.</i> (2013)
Ensalada dos	11	2/18,2%	0/0	Akya <i>et al.</i> (2013)

Tabla 6: Resultados de las muestras positivas de *Listeria* spp. y *L. monocytogenes* en muestras de alimentos listos para consumir y su prevalencia. Elaboración propia.

4.3.2 Métodos de detección de *Listeria* spp. en alimentos listos para consumir.

Akya *et al.* en 2013, se recogieron muestras (200 g) en bolsas de plástico esterilizadas y llevadas al laboratorio. Una muestra de 25 g de cada uno se pesó en condiciones asépticas y fue homogeneizado y mezclado con 225 mL de medio caldo Fraser. Las muestras sólidas fueron asépticamente mezcladas y homogeneizadas. antes agregando al medio de caldo Fraser. Todo el equipo estaba esterilizado, la mezcla (cultivo) se incubó a 30 ° C durante 24 horas. De la mezcla, 0.1 mL se agregó a 9.9 mL de medio de caldo Fraser y se incubó a 37 ° C durante 24 horas. Para aislar colonias de *Listeria* spp. , los cultivos se sembraron en placas (PALCAM) agar y medios Oxford e incubados a 37 ° C durante 24 a 48 horas.

Las colonias con las características de *Listeria* spp. (colonias de color gris verdoso con un halo negro) fueron seleccionados de cada placa y cultivada en triptona de soja medio de agar enriquecido con levadura al 0,6%. Los cultivos se incubaron a 37 ° C durante 24 a 48 horas. Con el fin de caracterizar la *Listeria* spp., se llevaron a cabo pruebas que incluyen: tinción de Gram, catalasa, oxidasa, motilidad a 25 ° C, sangre de carnero hemólisis, Christie-Atkins-Munch- Petersen (CAMP), rojo de metilo, Voges- Proskauer (MRVP) y carbohidratos.

Alimentos	Métodos de detección	Autor / Año
Ensalada verde	Métodos de cultivo y pruebas bioquímicas	Akya <i>et al.</i> 2013
Ensalada 2	Métodos de cultivo y pruebas bioquímicas	Akya <i>et al.</i> 2013

Tabla 7: Resultados de los métodos de detección utilizados en las muestras de alimentos listos para consumir. Elaboración propia.

4.4 Frutas y verduras

4.4.1 Prevalencia de *Listeria* spp. en frutas Para los resultados de frutas de *Listeria* spp. se han analizado los siguientes alimentos, que se pueden observar en la tabla 8 (Willis *et al.* 2020). En todos los tipos de frutas que se han analizado no se ha detectado *L. monocytogenes*, sin embargo, si se han detectado 1 muestra positiva de otras especies de *Listeria* en cerezas con una prevalencia del 10% de *Listeria* spp

Tipo de alimento	Nº de muestras en el ensayo	Nº de muestras positivas y prevalencia de <i>L.monocytogenes</i> en 25g:	Nº de muestras de otras especies de <i>Listeria</i> detectadas en 25g y prevalencia de otras especies de <i>Listeria</i> :
Manzana	4	0/0	0/0
Moras	24	0/0	0/0
Palta	11	0/0	0/0
Grosellas negras	3	0/0	0/0
Arándanos	32	0/0	0/0
Cerezas	10	0/0	1/10%
Arándanos	4	0/0	0/0
Yaca	3	0/0	0/0
Mango	19	0/0	0/0
Melón	5	0/0	0/0
Papaya	3	0/0	0/0
Piña	6	0/0	0/0
Frambuesas	38	0/0	0/0

Tipo de alimento	Nº de muestras en el ensayo	Nº de muestras positivas y prevalencia de <i>L. monocytogenes</i> en 25g:	Nº de muestras de otras especies de <i>Listeria</i> detectadas en 25g y prevalencia de otras especies de <i>Listeria</i> :
Ruibarbo	3	0/0	0/0
Fresas	19	0/0	0/0

Tabla 8: Resultados de las muestras positivas de *L.monocytogenes* y otras especies de *Listeria*, en muestras de diferentes frutas y su prevalencia. (Willis *et al.* 2020). Elaboración propia.

4.4.2 Prevalencia de *Listeria* spp. en verduras

En cuanto a los resultados de *L.monocytogenes* en verduras (Willis *et al.* 2020), se ha analizado diversos tipos de verduras.

De las 3 muestras de alcachofas analizadas no se detectaron ningún positivo de *L. monocytogenes*, ni de otras especies, en los espárragos se analizaron 4 muestras y no se detectaron positivos. En las 63 muestras de frijoles analizadas, se han detectado *L. monocytogenes* en 5 muestras con una prevalencia de 6,7% en este alimento. Por otro lado, se detectaron 6 muestras de otras especies de *Listeria* spp. y una prevalencia de 9,5%.

En la calabaza amarga, de las 5 muestras analizadas, no se detectó ningún positivo de *Listeria* spp., ni de otras especies. En las 23 muestras de brócoli, se han detectado 4 muestras positivas de *L.monocytogenes* y 17,4% de prevalencia y de otras especies de *Listeria* spp., 2 muestras positivas con una prevalencia de 8,7%, en las 12 muestras de repollo, no se detectaron *L. monocytogenes* en las muestras, sin embargo en otras especies de *Listeria* spp. se han detectado 2 muestras positivas y un 16,7% de prevalencia.

En las 33 muestras de zanahorias, se detectaron una muestra positiva de *Listeria monocytogenes* y una prevalencia de 3%, por otro lado se detectaron 6 muestras positivas de otras especies de *Listeria* spp. con una prevalencia de 18,2%. En las 6 muestras de mandioca analizadas, no se ha detectado *L.monocytogenes*, ni otras especies de *Listeria*. En las 14 muestras de coliflor, no se detectaron *Listeria* spp. y se detectó 1 muestra positiva de otras especies de *Listeria* spp. y una prevalencia de 7,1% de otras especies de *Listeria* spp.

En las 3 muestras de col rizada analizada, se detectó una muestra positiva de otras especies de *Listeria* spp. con una prevalencia de 33,3%. En las 4 muestras de fenogreco analizadas, se detectó 1 muestra positiva de otras especies de *Listeria* spp. y una prevalencia de 50% y no se ha detectado ninguna muestra positiva de *L.monocytogenes*. En las 3 muestras de molokhia (espinacas egipcias), no se detectaron muestras positivas de *Listeria* spp. En las 10 muestras de hongos, se han detectaron 5 muestras positivas de *L. monocytogenes* y una tasa de prevalencia de 50%. Por otro lado, se han detectaron 4 muestras positivas de otras especies de *Listeria* spp. y una prevalencia de 40%.

En las 15 muestras de Okra analizadas, no se detectaron ninguna muestra positiva de *L. monocytogenes* ni de otras especies. En las 5 muestras de cebollas analizadas, no se detectaron muestras positivas de *L. monocytogenes*, ni de otras especies de *Listeria* spp.

En las 110 muestras de chicharos, se detectaron 5 muestras positivas de *L. monocytogenes*, con una prevalencia de 4,5 % y en cuanto las otras especies de *Listeria* spp. se detectaron 9 muestras positivas y una prevalencia de 8,2%. En las 26 muestras de pimientos se detectaron, 8 muestras positivas de *L. monocytogenes* y una prevalencia de 30,8% y en cuanto a otras especies de *Listeria* spp. se detectaron 3 muestras positivas y una prevalencia de 11,5%.

En las 32 muestras de espinacas, se detectaron 3 muestras positivas de *L.a monocytogenes* y un 9,4% de prevalencia de *L. monocytogenes*. En las 22 muestras de coles, se detectaron una muestra positiva de *L.monocytogenes*, y un 4,5% de prevalencia de *L.monocytogenes*, en cuanto a otras especies de *Listeria* spp. no se detectaron muestras positivas. En relación a las 5 muestras de calabaza, se detectó 1 muestra positiva de *L. monocytogenes* con un 20% de prevalencia, por otro lado no se detectaron ninguna muestra de otras especies de *Listeria* spp. en muestras de calabaza.

En las 92 muestras de maíz dulce, se detectaron 21 muestras positivas de *L. monocytogenes* con una prevalencia de 22,8% de *L. monocytogenes*. En las

3 muestras de batata analizadas, no se detectaron ninguna muestra positiva de *L.monocytogenes* ni de otras especies de *Listeria* spp.

Tipo de alimento	Nº de muestras en el ensayo	Nº de muestras positivas y prevalencia de <i>L. monocytogenes</i> en 25g	Nº de muestras de otras especies de <i>Listeria</i> detectadas en 25g y prevalencia de otras especies de <i>Listeria</i>
Alcachofa	3	0/0	0/0
Espárragos	4	0/0	0/0
Frijoles	63	5/ 7,9%	6/9,5%
Calabaza amarga	5	0/0	0/0
Brócoli	23	4/17,4%	2/8,7%
Repollo	12	0	2/16,7%
Zanahorias	33	1/ 3%	6/18,2%
Mandioca	6	0/0	0/0
Coliflor	14	0/0	1/7,1%
Col rizada	3	0/0	1/33,3%
Fenogreco	4	0/0	1/50 %
Molokhia	3	0/0	0/0
Hongos	10	5/50%	4/40%
Okra	15	0/0	0/0
Cebollas	5	0	0
Chícharos	110	5/4,5%	9/8,2%
Pimientos	26	8/30,8%	3/11,5%
Espinacas	32	3/9,4%	5/15,6%
Coles	22	1/4,5%	0/0
Calabaza	5	1/20%	0/0
Maíz dulce	92	21/22,8%	21/22,8%
Batata	3	0/0	0/0

Tabla 9: Resultados de las muestras positivas de *L. monocytogenes* y otras especies de *Listeria*, en muestras de diferentes verduras y su prevalencia (Willis *et al.* 2020).Elaboración propia.

4.4.3 Métodos de detección de *Listeria spp.* en frutas y verduras.

Los métodos de detección de *Listeria spp.* en frutas y verduras, (Willis *et al.* 2020), consistieron en la extracción de ADN y mediante secuenciación se confirmó la presencia de *L. monocytogenes* y otras especies.

Alimento	Métodos de detección	Autor/ Año
Frutas	Extracción de ADN y secuenciación	Willis <i>et al.</i> 2020
Verduras	Extracción de ADN y secuenciación	Willis <i>et al.</i> 2020

Tabla 10: Resultados de los métodos de detección utilizados en las muestras de frutas y verduras. (Willis *et al.* 2020). Elaboración propia.

4.5 Pescados

4.5.1 Prevalencia de *Listeria spp.* en pescados

Akhondzadeh *et al.* en 2006 analizaron diferentes tipos de pescado, en total analizaron 107 muestras de pescado fresco en las cuales no se detectaron muestras positivas de *Listeria spp.*, sin embargo se detectaron 4 muestras positivas de *L.monocytogenes* con una prevalencia de 3,73%. También se analizaron 127 muestras de pescado salado y ahumado en las cuales no se detectaron muestras positivas de *Listeria spp.*, sin embargo de *L. monocytogenes* si se detectaron 46 muestras positivas con una prevalencia de 36,22 % .Jalali & Abedi (2008) analizaron 12 muestras de pescado congelado y no se detectaron muestras positivas de *Listeria spp.* ni de *L. monocytogenes*. En el pescado fresco se analizaron 61 muestras y se detectaron 2 muestras positivas de *Listeria spp.* y una prevalencia de 3,27% .

Se analizaron 12 muestras de camarones en dicho artículo, pero no se detectaron muestra positivas de *Listeria* spp. y de *L. monocytogenes*.

Fallah *et al.* en 2013 analizaron 398 muestras de mariscos crudos y se detectaron 22 muestras positivas de *L. monocytogenes* con una prevalencia de 5,52 % en mariscos crudos de *L. monocytogenes*.

Khamesipour *et al.* en 2013 se analizó 40 muestras de carne de cangrejo de río y no se detectaron resultados positivos para *Listeria* spp. y se detectaron 3 muestras positivas de *L. monocytogenes* con una prevalencia de 7,5% de *L. monocytogenes*.

Momtaz & Yadollahi (2013), analizaron 220 muestras de pescado y se detectaron 23 muestras positivas de *Listeria* spp. y una prevalencia de 10,45 % de *Listeria* spp. en pescado. A continuación se analizaron 40 muestras de camarones y se detectó 1 muestra positiva de *Listeria* spp. y una prevalencia de 2,5 % y de *L. monocytogenes* se detectó 1 muestra positiva de camarones y una prevalencia de 2,5 % de *L. monocytogenes*. También se analizaron 20 muestras de langosta y 20 muestras de camarones y no se detectaron muestras positivas de *Listeria* spp. ni de *L. monocytogenes*.

Tipo de comida:	Nº de muestras en el ensayo:	Nº muestras positivas de <i>Listeria</i> spp. Prevalencia <i>Listeria</i> spp:	Nº muestras positivas de <i>L. monocytogenes</i> Prevalencia <i>L. monocytogenes</i> :	Autor/ Año:
Pescado fresco	107	0/0	4 / 3,73 %	Akhondzadeh Basti <i>et al.</i> (2006)
Pescado			46/ 36,22%	

salado y ahumado	127	0/0		
Tipo de comida:	Nº de muestras en el ensayo:	Nº muestras positivas <i>Listeria</i> spp. Prevalencia <i>Listeria</i> spp:	Nº muestras depositivas de <i>L. monocytogenes</i> / Prevalencia <i>L. monocytogenes</i> :	Autor/ Año:
Pescado congelado	12	0/0	0/0	Jalali & Abedi (2008)
Pescado fresco	61	2/3,27% 1/8,33%	0/0 0/0	
Camarones	12			
Mariscos crudos	398	0/0	22/5,52%	Fallah <i>et al.</i> (2013)
Mariscos LPC	190	0/0	24/12,63%	
Carne de cangrejo de río	40	0/0	3/7,5%	Khamesipour <i>et al.</i> (2013)
Pescado: 220	220	23/ 10,45%	17/ 7,72%	Momtaz & Yadollahi (2013)
Camarones: 40	40	1/ 2,5%	1/ 2,5%	
Langosta: 20	20	0/0	0/0	
Cangrejo: 20	20	0/0	0/0	

Tabla 11: Resultados de las muestras positivas de *Listeria* spp. y *L. monocytogenes* en muestras de pescado y su prevalencia. Elaboración propia.

4.5.2 Métodos de detección de *Listeria spp.* en pescados.

En (Akhondzadeh Basti *et al.* 2006), se utilizó para el aislamiento de *L. monocytogenes* (Dillon *et al.* 1992). la versión canadiense modificada del protocolo de aislamiento de *Listeria* de la FDA de EE. UU. Se homogeneizaron 25 g de muestra en 225 ml de caldo de enriquecimiento de *Listeria* (LEB) que contenía tiocianato de potasio y ácido nalidíxico, utilizando una centrifugadora y se incubó a 30 ° C durante 24 h y 48 h. A continuación, se sembró, en agar selectivo para *Listeria*, que contenía ácido nalidíxico y agar selectivo PALCAM *Listeria* suplementado con suplemento selectivo PALCAM *Listeria*. Las colonias sospechosas se confirmaron mediante tinción de Gram, prueba de motilidad pruebas de catalasa y β -hemólisis y pruebas de fermentación de azúcar para ramnosa, xilosa y manitol (APHA, 1992, Harrigan, 1998).

También se utilizó la técnica del número más probable (NMP) para estimar *L. monocytogenes*. Consiste en la inoculación de cinco réplicas de 10 ml de 10⁻¹ en 20 ml de LEB de doble concentración y la inoculación de cinco réplicas de 1 ml de 10⁻¹, 10⁻² y 10⁻³ en la segunda, tercera y cuarta serie de 10 ml de LEB. Después de la incubación a 30 ° C durante 24 y 48 h, se procedió a la retirada de 20 μ l del caldo de enriquecimiento y se extendieron sobre agar selectivo para *Listeria* que contenía ácido nalidíxico y agar selectivo PALCAM para *Listeria*, que contenía el suplemento selectivo PALCAM *Listeria*. (APHA, 1992, Gohil *et al.* 1995).

Fallah *et al.* en 2013, detectaron y enumeraron *L. monocytogenes* en mariscos, utilizando la técnica del número más probable (MPN), (De Martins, Duvali y Hitchins, 2007; Hitchins y Jinneman, 2011). Se homogeneizó una cantidad de 25 g de cada muestra con 225 ml de caldo de enriquecimiento de *Listeria* tamponado (BLEB). Para análisis MPN, triplicado se prepararon

series de tubos con 10, 1, 0,1 y 0,01 ml. del homogeneizado en un volumen de 10 ml de BLEB; por lo tanto, cada conjunto de tubos contenían 1, 0,1, 0,001 y 0,0001 g de alimento. Los medios se incubaron a 30°C durante 4 h como paso previo al enriquecimiento. Después, se añadió el suplemento selectivo BLEB, y los tubos se incubaron durante otras 44 horas a 30°C.

Los medios turbios se esparcieron en agar PALCAM y se incubó a 35°C durante 48 h. Los posibles positivos de *Listeria* se sembraron en medio agar triptona soja suplementado con extracto de levadura al 0,6% e incubado a 35 °C durante 24 h. Los aislamientos fueron sometidos a pruebas bioquímicas para su identificación como *Listeria* spp. y *L. monocytogenes* según el método de (Roberts y Greenwood 2003, cap.6). Los aislamientos identificados de *L. monocytogenes* fueron confirmados por PCR (Fallah et al. 2012).

En (Khamesipour et al. 2013) se analizaron las muestras de cangrejos de río, mediante la reacción en cadena de la polimerasa para detectar la presencia de *L. monocytogenes*, se utilizó el protocolo de aislamiento y enriquecimiento selectivo recomendado por el Departamento de Agricultura de los Estados Unidos (McClain y Lee 1988).

Los resultados aislados de *L. monocytogenes* identificados mediante métodos bacteriológicos se analizaron mediante PCR, con las técnicas de PCR (Zhou & Jiao, 2005). Se centrifugó 1 ml de cultivo puro a 13.000 g durante 5 min a temperatura ambiente. El ADN genómico se extrajo de las muestras utilizando un kit de extracción, de acuerdo con el protocolo del fabricante. El ADN total se midió a una densidad óptica de 260 nm según el método descrito por (Sambrook & Russell 2001). El ADN extraído de cada muestra de músculo se mantuvo congelado a -20 °C hasta su uso. Las condiciones del termociclador incluyeron una retención inicial de 2 min a 94 °C, luego paso a la desnaturalización a 95 °C durante 10 s, un calentamiento a 60 °C durante 30 segundos y una extensión de 30 segundos a 72 °C para un total de 40 ciclos. Una retención final a 4 °C siguió a una extensión final a

72 ° C durante 10 min. Las reacciones de amplificación se llevaron a cabo en un termociclador de ADN. Los productos de la PCR se examinaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 1,5%, se tiñeron con una solución al 1% de bromuro de etidio y se observaron con iluminación UV.

En Momtaz & Yadollahi (2013) el aislamiento e identificación de *Listeria*, y *Listeria* spp. de mariscos fue según el protocolo ISO 11290 [19]. Todos los aislamientos fueron sometidos a pruebas bioquímicas estándar que incluyen Tinción de Gram, prueba de catalasa, prueba de motilidad a 25 ° C y 37 ° C, producción de ácido a partir de glucosa, manitol, ramnosa, zilosa, α-metil-D-mamosida y nitrato reducción, hidrólisis de esculina, prueba MR / VP, β-hemolítico actividad y prueba CAMP .

Alimento	Métodos de detección	Autor/ Año
Pescado fresco	Métodos de cultivo, pruebas bioquímicas y MPN	Akhondzadeh Basti <i>et al.</i> 2006
Pescado salado y ahumado	Métodos de cultivo, pruebas bioquímicas y MPN	Akhondzadeh Basti <i>et al.</i> 2006
Pescado fresco	Métodos de cultivo, pruebas bioquímicas y PCR	Jalali & Abedi 2008
Pescado congelado	Métodos de cultivo y pruebas bioquímicas y PCR	Jalali & Abedi 2008
Camarones	Métodos de cultivo y pruebas bioquímicas y PCR	Jalali & Abedi 2008
Mariscos crudos	Técnica numérica más probable, métodos de	Fallah <i>et al.</i> 2013

	cultivo y pruebas bioquímicas y PCR	
Mariscos LPC	Técnica numérica más probable, métodos de cultivo y pruebas bioquímicas y PCR	Fallah <i>et al.</i> 2013
Carne de cangrejo de río	PCR	Khamesipour <i>et al.</i> 2013
Pescado	Pruebas bioquímicas y PCR	Momtaz & Yadollahi 2013
Camarones	Pruebas bioquímicas y PCR	Momtaz & Yadollahi 2013
Langosta	Pruebas bioquímicas y PCR	Momtaz & Yadollahi 2013
Cangrejo	Pruebas bioquímicas y PCR	Momtaz & Yadollahi 2013

Tabla 12: Resultados de los métodos de detección en muestras de pescado de *Listeria* spp. y *L.monocytogenes*.

4.6 Huevos

4.6.1 Prevalencia de *Listeria* spp. en huevos.

Mahdavi *et al.* en (2012) analizaron 525 muestras de huevos y no detectaron muestras positivas de *Listeria* spp.

Tipo de comida	Nº de muestras en el ensayo:	Nº de muestras positivas de <i>Listeria spp</i> / Prevalencia <i>Listeria spp</i>	Nº muestras positivas de <i>L. monocytogenes</i> / Prevalencia <i>L. monocytogenes</i>	Autor/ Año:
Huevo:525	525	0/0	0/0	Mahdavi et al. (2012)

4.6.2 Métodos de detección de *Listeria spp.* en huevos.

Mahdavi *et al.* en 2012 analizaron diferentes muestras de huevos para detectar la presencia de *Listeria spp.* utilizando el protocolo de aislamiento y enriquecimiento selectivo, recomendado por el Departamento de Agricultura de los Estados Unidos (USDA). El contenido de cada huevo se mezcló completamente y luego se agregaron 25 ml del contenido de huevo y 25 ml de University of Vermont Media (UVM) I, respectivamente, y se incubaron a 37 ° C. Posteriormente, 1 mL de los cultivos se transfirieron a 9 mL de UVM II (caldo Fraser) y se incubaron a 37 ° C durante 24-48 h para enriquecimiento selectivo. A continuación, los cultivos se sembraron en estrías sobre agar PALCAM y se suplementaron con el suplemento selectivo PALCAM y se incubaron a 37 ° C durante 24-48 h. Se observaron las placas con el objetivo de observar las colonias típicas de tipo *Listeria*.

Alimento	Métodos de detección	Autor / Año
Huevos	Métodos de cultivo	Mahdavi et al. 2012

Tabla 14: Resultados de los métodos de detección de *Listeria spp.* y *L. monocytogenes* de las muestras de huevos.

5. DISCUSIÓN

En el presente estudio, las tasas de prevalencia de *Listeria* spp. y de *L. monocytogenes* se estudiaron en diferentes alimentos, como carnes, aves de corral, verduras, frutas, pescados y huevos.

La mayor prevalencia fue en aves de corral, productos cárnicos, frutas y verduras y la menor prevalencia fue en huevos. Además la mayor prevalencia de *L. monocytogenes*, fue en los productos listos para consumo y en los productos poco cocidos que pueden ser un riesgo potencial para los consumidores, especialmente en mujeres embarazadas. Las medidas de control de *L. monocytogenes* en las instalaciones alimentarias, los sistemas de análisis de peligros y puntos críticos de control (HACCP), las buenas prácticas de fabricación (GMP), los procedimientos operativos estándar de saneamiento y las buenas prácticas de higiene (BPH) serían medidas efectivas de control frente a esta bacterias (Lambertz *et al.* 2012).

Además, los alimentos listos para consumo, se contaminan durante la producción y la manipulación en la casa, es necesario el control de *L. monocytogenes* en el procesado de los productos (Lambertz *et al.* 2012). Por tanto, se sugiere el control de la contaminación en todos los niveles de la cadena alimentaria. La contaminación puede causar listeriosis en humanos, lo que a vez puede provocar abortos en mujeres embarazadas o muerte neonatal.

En relación a esto Hamidiyan *et al.* en 2017 realizaron el primer metanálisis sobre *Listeria* spp. en Irán y se ha demostrado la incidencia de listeriosis en humanos (Lotfollahi *et al.* 2011), identificó *L. monocytogenes*, en el 9% de mujeres embarazadas en muestras de aborto espontáneo. Por otro lado Bazooyar en 2015, detectó una infección por encefalitis por *L. monocytogenes* en 2 grupos de hombres de 65 y 63 años con diabetes.

L. monocytogenes, es común es en el medio ambiente y en consecuencia los alimentos no procesados, de origen no animal corren el riesgo de contaminarse con esta bacteria. La fruta es un ambiente relativamente hostil

para *Listeria* ya que este producto, tiene generalmente una capa seca y un interior ácido, los datos de este trabajo son consecuentes con menos del 1% de prevalencia de estas bacterias, *L. monocytogenes* y otras especies de *Listeria* encontrados por otros autores (Willis et al. 2020).

Las cadenas alimentarias para frutas y verduras congeladas son extremadamente complejas (Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria 2018 a) y el rastreo de las rutas de contaminación requiere mucho tiempo y trabajo, y puede ser un paso limitante en la gestión de brotes y crisis. La secuenciación genómica completa (WGS) proporciona una gran sensibilidad y especificidad para la caracterización de aislados bacterianos de diferentes partes de la cadena alimentaria y es particularmente útil para identificar cepas específicas de patógenos con un ancestro común. Aunque *L. monocytogenes*, las cepas recuperadas del estudio de (Willis et al. 2020) fueron diversas, los datos presentados aquí identificaron grupos de aislados de alimentos muestreados de forma independiente (a menudo de tipo homogéneo), lo que indica un origen común de contaminación. Además, el carácter internacional de esta contaminación sugiere que, en algunos casos, se ha originado en el punto de elaboración primaria.

En el caso del maíz dulce producido en Hungría y asociado con el brote en varios países, la misma cepa estuvo presente en los alimentos producidos durante al menos 3 años. Se ha demostrado previamente que las cepas de *L. monocytogenes* pueden persistir en entornos de producción de alimentos durante muchos meses o años (Carpentier & Cerf, 2011; Leong et al. 2014). En particular, este organismo puede sobrevivir bien en biopelículas que pueden formarse en las superficies de preparación de alimentos. La formación y persistencia de biopelículas es más probable en equipos complejos que tienen una gran superficie y pueden ser de difícil acceso para su limpieza. Las máquinas descascaradoras utilizadas en la extracción de los granos de maíz dulce de la mazorca son un ejemplo de este tipo de equipo junto con la planta y maquinaria en el punto de congelación.

A medida que las bases de datos internacionales de secuenciación de

genoma completo (WGS), se hacen más grandes, el proceso de mapeo de rutas probables de contaminación para informar las intervenciones dentro de la cadena alimentaria será cada vez más informativo y resaltarán aún más la necesidad de compartir metadatos asociados con las secuencias genéticas.

6. CONCLUSIONES

-Las infecciones humanas por *Listeria* se deben principalmente a la ingestión de alimentos contaminados y pueden provocar una listeriosis grave y potencialmente mortal.

-Se desconoce la situación real de la listeriosis en países como Irán y existe poca información sobre la incidencia de *Listeria* spp. y *L. monocytogenes* en los alimentos estudiados en este trabajo y sus métodos de detección.

-Según los resultados, la aparición de *Listeria* spp., en aves de corral, productos cárnicos, frutas y verduras, pueden representar un riesgo potencial para los consumidores.

-Debemos profundizar y mejorar los métodos de detección de *Listeria* spp. y dicho patógeno debe ser controlado y observado por la Organización Mundial de la Salud u otras organizaciones relacionadas.

7. AGRADECIMIENTOS

En agradecimiento a todos los autores, que me han servido para realizar este Trabajo Fin de Master, por su aporte de datos para realizar dicho análisis. Especialmente a Negar Hamidiyan y Caroline Willis, así como los demás autores citados anteriormente. Reconozco la ayuda prestada por mi tutora.

8. BIBLIOGRAFÍA

AFSSA. (2005). DICTAMEN 9/3/2005 de la Agencia Francesa de Seguridad Alimentaria sobre la revisión del Dictamen 2000-SA-0094 sobre la clasificación de los alimentos con respecto al riesgo que representa *Listeria monocytogenes* y los protocolos de prueba de crecimiento (Referencia nº2003-SA-0362).

Akhondzadeh Basti .A , Misaghi, A , Salehi TZ, Kamkar, A. (2006), Patógenos bacterianos en pescado iraní fresco, ahumado y salado. Control de alimentos , 17 (3), pp.:183 – 188.

Akya, A , Najafi, F , Moradi. J, Mohebi.Z, Adabagher , S. (2013) Prevalencia de la contaminación de los alimentos con *Listeria* spp. en Kermanshah, República Islámica del Irán. Revista de salud del Mediterráneo oriental 19 (5), pp 474 – 477.

APHA (1992). Compendio de métodos para el examen microbiológico, (3rd ed.), American Public Health Association, Washington pp. 105-119, 325-367, 371-415, 451-469 & 637-658.

Carpentier. B, Cerf. O. (2011). Revisión: persistencia de *Listeria monocytogenes* en equipos e instalaciones de la industria alimentaria. International Journal of Food Microbiology, 145, pp. 1 - 8.

Comisión Europea (2005). Reglamento (CE) nº 2073/2005 de 15 de noviembre de 2005 relativo a los criterios microbiológicos aplicables a los productos alimenticios. Diario Oficial de la Unión europea L 338/1-26 de 22.12.2005.

Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades [CDC] (2014a). Vigilancia nacional de enfermedades entéricas: Iniciativa *Listeria*.

David, W., Fleming, M. D., Stephen, L., Cochi, M.D., Kristine, L., MacDonald, M. D., Jack Brondum, D. V.M., M. S., Peggy, S., Hayes, B. S., Brian, D., Pliskaytis.....

Reingold, M. D. (1985). Leche pasteurizada como vehículo de infección en un brote de listeriosis. The New England Journal of Medicine, 312, 404-407.

De Martins, E. C. P., Duvali, R. E., & Hitchins, A. D. (2007) La detección por PCR en tiempo real de genes de ARNr 16S acelera la enumeración del número más probable de *L. monocytogenes* transmitida por los alimentos. Revista de protección alimentaria., 70, 1650e1655.

Den Bakker, H. C., Warchocki, S. Wright, E. M.,..... (2014). *Listeria floridensis* sp. nov., *Listeria aquatic* sp. nov., *Listeria cornellensis* sp. nov. *Listeria riparia* sp. nov. and *Listeria grandensis* sp. nov., from agricultural and natural environments. International Journal Systematic Evolutional Microbiologic. 64(6), 1882-1889.

Fallah, SS Saei-Dehkordi , M. Rahnama , H. Tahmasby , M. Mahzounieh, (2012) Patrones de prevalencia y resistencia a los antimicrobianos de especies de *Listeria* aisladas de productos avícolas comercializados en Irán. Control de alimentos, 28 (2), págs. 327 - 332.

Fallah AA, SS Saei-Dehkordi , M. Mahzounieh, (2013) . Perfiles de presencia y resistencia a los antibióticos de *L. monocytogenes* aislada de productos del mar y entornos de mercado y procesamiento en Irán. Control de alimentos, 34 (2), págs. 630 - 636.

FAO/OMS, (2004). Serie de evaluación de riesgos microbiológicos 4. Evaluación de riesgos de *Listeria monocytogenes* en alimentos listos para el consumo. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación.

Fitter, Ajustador .S, Heuzenroeder M., Thomas C. J. (1992) Un método combinado de PCR y enriquecimiento selectivo para la detección rápida de *Listeria monocytogenes*. Revista de Bacteriología Aplicada, 73, págs. 53 - 59.

Gnanou BN, Audinet N, Kerouanton A, Colin P, Kalmokoff M, (2005).

Evolution of *Listeria* populations in food samples undergoing enrichment culturing. *Int. J. Food Microbiol.* 104(2):123-134.

Gohil, M.A. Ahmed, R. Davies, R.K. Robinson, (1995). La enumeración directa de *Listeria monocytogenes* en un alimento con una microflora de fondo baja. *Food Control*, 6 (6) pp. 365-369.

González, F.T. y Rojas, H.R. (2005). "Enfermedades transmitidas por alimentos y por prevención y diagnóstico", *Salud Pública de México*, 47 (5): 388-391.

Hamidiyan N., Amin Salehi-Abargouei, Zeynab Rezaei, Roohollah Dehghani-Tafti, Fateme Akrami-Mohajeri, , (2018) La prevalencia de *Listeria spp.* contaminación de los alimentos en Irán: una revisión sistemática y un metanálisis. *Food Research International*, Volume 107, Pages 437-450.

Hitchins, A. D., & Jinneman, K. (2011). FDA-BAM online: Detección y enumeración de *L. monocytogenes*.

Janzten MM, Navas J, Corujo A, Moreno R, López V, Martínez-Suárez JV (2006). Review- specific detection of *L. monocytogenes* in foods using commercial methods: from chromogenic media to real time PCR. *Span. J. Agric. Res.* 4(3):235- 247.

Khamesipour, A. Khodadoustan Shahraki , M. Moumeni , R. Khadivi Boroujeni , M. Yadegari. Prevalencia de *L. monocytogenes* en el cangrejo de río (*Astacus leptodactylus*) por reacción en cadena de la polimerasa en Irán. *Revista Internacional de Biociencias* , 3 (10) (2013) , págs. 160 – 169.

Kim JS, Lee GG, Park JS, Jung YH, Kwak HS, Kim SB, (2007). Un nuevo ensayo de PCR multiplex para la detección rápida y simultánea de cinco bacterias patógenas: *Escherichia coli* O157: H7, *Salmonella*, *Staphylococcus aureus*, *L. monocytogenes* y *Vibrio parahaemolyticus*. *Journal of Food Protection*. 70 (7): 1656-62.

ST Lambertz , C. Nilsson , A. Brådenmark , S. Sylvén , A. Johansson , L.-M. Jansson, M. Lindblad, (2012). Prevalencia y nivel de *L. monocytogenes* en alimentos listos para el consumo en Suecia 2010. Revista Internacional de Microbiología de Alimentos, 160 (1), págs. 24 – 31.

Leong .D, Álvarez-Ordóñez .A, Jordan, K. (2014). Seguimiento de la presencia y persistencia de *L. monocytogenes* en alimentos y entornos de procesamiento de alimentos en la República de Irlanda. Frontiers in Microbiology, 5, pág. 436.

Lotfollahi .L, J. Nowrouzi, G. Irajian , F. Masjedian , B. Kazemi , L. Eslamian , M. Ramez. (2011). Perfiles de prevalencia y resistencia a los antimicrobianos de *L. monocytogenes* en abortos espontáneos en humanos. African Journal of Microbiología Investigación, 5 (14), 1990-1993.

M. Mahdavi , M. Jalali , HG Safaei , E. Shamloo. (2012). Calidad microbiana y prevalencia de *Salmonella* y *Listeria* en huevos. Revista Internacional de Ingeniería de Salud Ambiental, 1 (6), págs. 16 – 20.

McClain, D., Lee, W.H., (1988). Desarrollo del método USDA-FSIS para el aislamiento de *L. monocytogenes* de carnes y aves crudas. Journal of Association of Official Analytical Chemists 71, 660-664.

H. Momtaz, S. Yadollahi. Caracterización molecular de *L. monocytogenes* aislada de muestras de mariscos frescos en Irán. (2013). Diagnostic Pathology , 8 (149), pp. 1 - 6 .

Havelaar, A.H., Kirk, M.D., Torgerson, P.R., Gibb, H.J., Hald, T. et al. (2015) , Estimaciones mundiales de la Organización Mundial de la Salud y comparaciones

regionales de la carga de enfermedades transmitidas por los alimentos en 2010, *plos Med*, 12 (12): 1-23.

M. Jalali , D. Abedi, (2008) . Prevalencia de especies de *Listeria* en productos alimenticios en Isfahan, Irán. *Revista Internacional de Microbiología de Alimentos* , 122 (3), págs. 336 – 340.

Jeyaletchumi, P., Tunung, R., Margaret, S. P., Son, P., Farinazleen, M. G., and Cheah, Y. K. (2010). Detection of *L. monocytogenes* in foods. *Int Food Res J*. 17(1), 1-11.

Kopper, G., Calderón, G., Schneider, S., Domínguez, W. y Gutiérrez, G. (2009). Enfermedades transmitidas por alimentos y su impacto socioeconómico. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación, Roma.

Liu, D. (2006). Identificación, subtipificación y determinación de virulencia de *L. monocytogenes*, un patógeno importante transmitido por los alimentos. *Journal of Medical Microbiology*, 55, 645-659.

McClain D., Lee W.H. (1988), Desarrollo del método USDA-FSIS para el aislamiento de *L. monocytogenes* de carnes y aves crudas. *Revista de la Asociación de Químicos Analíticos Oficiales* , 71, págs. 660 – 664

Moshtaghi H. , H. Tahmasby , A. Gholamhosseini , H. Riyahi , Y. Khosravi. (2012). Evaluación molecular y bioquímica de la contaminación de canales de ovino por *L. monocytogenes* en Shahrekord. *Revista de investigación de Jentashapir*, 3 (3), págs. 391 – 398.

Olea, A., Díaz, J., Fuentes, R., Vaquero, A. y García M. (2012), Vigilancia de brotes de enfermedades transmitidas por alimentos en Chile, *Rev Chilena Infectol.*, 29 (5): 504-510.

M. Panahi , R. Sohrabi , M. Salajegheh, (2013), Prevalencia de especies de *Listeria* en productos de codorniz al por menor de Isfahan, Irán. *Revista de Medicin*

Veterinaria y Sanidad Animal , 5 (1) , págs. 16 - 19.

Reglamento (CE) nº 882/2004 del Parlamento Europeo y del Consejo de 29 de abril de 2004, sobre los controles oficiales efectuados para garantizar la verificación del cumplimiento de la legislación en materia de piensos y alimentos y la normativa sobre salud animal y bienestar de los animales.

D. Roberts , M. Greenwood. (2003) , Microbiología alimentaria práctica, (3.a ed.) , Blackwell Publishing Ltd , Oxford

Sambrook J, Russell DW. (2001) . Molecular cloning: A laboratory manual. 3rd edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, 58- 152 p.

Seeliger H.PR , Jones D. (1986). Listeria .PHA Sneath , NS Maine , ME Sharpe , JG Holt (Eds.) , Bergey de Bacteriología Manual de Systematic , Williams & Wilkins , Baltimore, Maryland, pp. 1 235 - 1.245 mil.

R. Sohrabi , F. Tajbakhsh , E. Tajbakhsh , M. Momeni. (2013). Prevalencia de Listeria spp en carne de pollo, pavo y avestruz de Isfahan, Irán. Global Veterinaria , 11 (1) , págs. 80 - 83.

Trepas, M. (2002). Incidencia y comportamiento de *Salmonella* y *Listeria* en pechugas de pavo curadas. Tesis Doctoral: 12-52, Universidad Autónoma de Barcelona.

Caroline Willis, Jim McLauchlin, Heather Aird, Corinne Amard, Clare Barker....Lorraine Sadler-Reeves (2020). Ocurrencia de *Listeria* y *Escherichia coli* en frutas y hortalizas congeladas recogidas en establecimientos minoristas y de restauración en Inglaterra 2018-2019. International Journal of Food Microbiology. Volume 334, 108849

. Weller, D., Andrus, A., Wiedmann, M., and den Bakker, H. C. (2015). *Listeria booriae* sp. nov. and *Listeria newyorkensis* sp. nov., from food processing environments in the USA. Int J Syst Evol Microbiol. 65(1), 286-292.

M. Zarei, N. Basiri , A. Jamnejad , MH Eskandari. (2013). Prevalencia de *Escherichia coli* O157: H7, *L. monocytogenes* y *Salmonella spp.* en carne de vacuno, búfalo y cordero mediante PCR multiplex. Jundishapur Journal of Microbiology , 6 (8), pp. 1 – 5.

Zhou X, Jiao X. (2005) Polymerase chain reaction detection of *L. monocytogenes* using oligonucleotide primers targeting act A gene. Food Control 16, 125 – 130.

Rahimi, E, H. Momtaz, A Sharifazadeh, A. Behzadian, M. Asthari, S. Zandi Esfahami, M. Riahi and Momeni, (2012). Prevalence and antimicrobial resistance of *Listeria* species from traditional dairy products in Chaharmahal & Bakhtiary Iran. Bulgarian Journal of Veterinary Medicine. 15 (2): 115-122.