



Universidad Nacional de Rafaela

“Tesis presentada como requisito para obtener el grado de Licenciado en Industrias Alimentarias”

“Desarrollo de un método molecular alternativo para la detección de *Listeria monocytogenes*. Aplicación en muestras de queso”

Estudiante: Nadia Moreno

Directora de tesis: Dra. María Evangelina Primo

Lugar realización: Laboratorio de Inmunología y Parasitología -
INTA Rafaela

Año: 2025

AGRADECIMIENTOS

A mi directora, Dra. María Evangelina Primo, gracias Evange, por tu compromiso, paciencia y dedicación. Ha sido un placer contar con tu acompañamiento y tu buena predisposición a lo largo de todo el proceso.

A todos los que formaron parte del proyecto *Listeria*, y al INTA Rafaela por haber facilitado sus instalaciones.

A la directora de la carrera, Bqca. Fabiana Gentinetta, gracias Fabiana, por tus consejos y tu aliento.

A los profesores, de cada uno me llevo grandes aprendizajes.

A mis compañeros, a todos los que me acompañaron tanto en el cursado presencial como en el virtual, gracias. Han sido un gran sostén. ¡Qué alegría haber coincidido en el mismo camino!

A mi querida UNRAf, estoy orgullosa de formar parte de esta casa de estudios, que me dio la posibilidad de acceder a la educación pública, gratuita y de calidad.

A mi familia, siempre tan presente e incondicional, gracias a mis padres por haberme enseñado que sin esfuerzo, dedicación y constancia es imposible alcanzar una meta.

A Fernando, gracias por confiar en mí, incluso cuando yo no lo hacía. Tu amor y apoyo durante todos estos años han sido fundamentales.

Y gracias a mí.

Por animarme a volver a estudiar con más de treinta años.

Por no rendirme.

Por seguir adelante, incluso cuando el camino se hizo más largo de lo imaginado.

Hoy puedo decir, con orgullo, que lo logré: ¡soy Licenciada!

ÍNDICE GENERAL

1. Revisión bibliográfica.....	1
1.1 Características generales y microbiológicas.....	1
1.2 Taxonomía.....	2
1.3 Listeriosis.....	3
1.4 Brotes de listeriosis.....	4
1.5 Incidencia en la industria de alimentos.....	6
1.6 Método de referencia para la detección de <i>L. monocytogenes</i>	6
1.7 Métodos moleculares alternativos para la detección de <i>L. monocytogenes</i>	8
2. Objetivos: generales y específicos.....	10
3. Materiales y métodos.....	10
3.1 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).....	10
3.1.1 PCR específica de género.....	10
3.1.2 PCR anidada específica de especie.....	10
3.2 Controles.....	12
3.2.1 Cepas bacterianas.....	12
3.2.2 Control interno de amplificación.....	12
3.2.3 Control de ADN estándar plasmídico.....	13
3.3 Determinación del límite de detección, repetitividad y reproducibilidad de la PCR anidada.....	13
3.4 Evaluación de la PCR anidada en muestras de queso artificialmente contaminadas.....	14
3.5 Detección de <i>L. monocytogenes</i> en quesos blandos comerciales.....	15
3.5.1 Obtención de las muestras de queso.....	15
3.5.2 Detección de <i>L. monocytogenes</i> según norma ISO 11290-1:2017.....	15
3.5.3 Detección de <i>L. monocytogenes</i> por PCR anidada.....	15

4. Resultados	15
4.1 PCR específica de género <i>Listeria</i> spp.....	15
4.2 PCR anidada específica de especie <i>L. monocytogenes</i>	16
4.3 Controles.....	16
4.3.1 Control interno de amplificación.....	16
4.3.2 Control de ADN plasmídico.....	17
4.4 <i>Performance</i> de la PCR anidada.....	18
4.4.1 Determinación del límite de detección, repetibilidad y reproducibilidad de la PCR anidada.....	19
4.4.2 <i>Performance</i> de la PCR anidada en muestras de quesos.....	21
4.5 Determinación de <i>L. monocytogenes</i> por PCR anidada en muestras de quesos blandos comerciales.....	23
5. Discusión	23
6. Conclusiones	25
7. Bibliografía	26

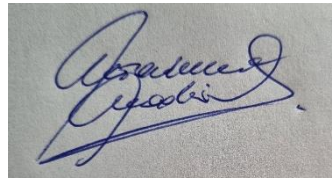
ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Cebadores utilizados en la PCR específica del género <i>Listeria</i>	10
Tabla 2. Cebadores utilizados en la PCR anidada específica de la especie <i>L.</i> <i>monocytogenes</i>	11
Tabla 3. Repetibilidad y reproducibilidad de la PCR anidada para la detección del gen <i>HlyA</i> de <i>L. monocytogenes</i>	21

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Esquema de los principales pasos para la detección de <i>L. monocytogenes</i> por el método microbiológico ISO 11290-1:2017.....	14
Figura 2. Detección de <i>Listeria</i> spp. por PCR.....	15
Figura 3. PCR anidada específica de especie <i>L. monocytogenes</i>	16
Figura 4. Control interno de amplificación.....	17
Figura 5. Control de ADN plasmídico.....	18
Figura 6. <i>Performance</i> de la PCR anidada.....	19
Figura 7. Determinación del límite de detección, repetibilidad y reproducibilidad de la PCR anidada.....	20
Figura 8. <i>Performance</i> de la PCR anidada en muestras de quesos.....	22
Figura 9. Determinación de <i>L. monocytogenes</i> por PCR anidada en muestras de quesos blandos comerciales.....	23

Declaro que el material incluido en esta TFLIA es, a mi mejor saber y entender, original producto de mi propio trabajo y que ha sido presentado en forma parcial en Congresos Nacionales y forma parte del trabajo “Comparison of real-time PCR and nested PCR based on the HlyA gene for the detection of *Listeria monocytogenes*. Application on cheese samples” publicado en la revista Brazilian Journal of Microbiology por María V. Zbrun, Nadia Moreno, Cecilia M. Camussone, Marcelo L. Signorini y María E. Primo.

A photograph of a handwritten signature in blue ink on a light-colored surface. The signature is cursive and appears to read 'Nadia Moreno'.

Nadia Moreno

DNI: 30.616.958

ABREVIATURAS

ADN: Ácido Desoxirribonucleico

ADN_g: ADN genómico

CF: Caldo Fraser

CIA: Control Interno de Amplificación

CSF: Caldo Semi Fraser

dNTPs: desoxinucleótidos trifosfato

ETA_s: Enfermedades Transmitidas por Alimentos

ISO: Organización Internacional de Normalización

L. monocytogenes: *Listeria monocytogenes*

LD: Límite de Detección

OMS: Organización Mundial de la Salud

pb: pares de bases

PCR: Reacción en Cadena de la Polimerasa

ufc: unidades formadoras de colonias

“Desarrollo de un método molecular alternativo para la detección de *Listeria monocytogenes*. Aplicación en muestras de queso”

Resumen

Listeria monocytogenes es capaz de sobrevivir y crecer en condiciones de refrigeración. Los alimentos se pueden contaminar en cualquier eslabón de la cadena productiva. El método microbiológico (ISO 11290-1:2017) de referencia requiere 10 días para identificar la especie. El objetivo de este trabajo fue desarrollar y validar un método molecular para la detección de *L. monocytogenes* en muestras de quesos blandos. Se diseñó una reacción en cadena de la polimerasa (PCR) anidada para la amplificación de una secuencia del gen *HlyA* que codifica para la listeriolisina O, factor de patogenicidad. Un control interno de amplificación (CIA) fue diseñado para evaluar la presencia de inhibidores de la polimerasa y un control de ADN plasmídico, con un fragmento del gen *HlyA*, fue generado para determinar el límite de detección (LD), reproducibilidad y repetibilidad de la PCR anidada. La validación se realizó con muestras obtenidas a distintos tiempos de cultivos contaminados artificialmente con *L. monocytogenes* (0; 3,4; 34 y 340 ufc/25 g) por el método microbiológico de referencia. Finalmente, se analizaron 80 muestras de quesos blandos comerciales. La utilización de 100.000 copias por reacción del CIA no interfiere con la amplificación del ADN molde. El LD de la PCR anidada fue de 30 copias por reacción con 100% de repetibilidad y reproducibilidad. La muestra óptima para la realización de la PCR anidada fue la obtenida luego de 24 h de cultivo en Caldo Fraser. En estas condiciones, la concentración más baja ensayada (3,4 ufc/25 g) fue detectada en las 3 muestras analizadas. Todas las muestras de quesos comerciales fueron negativas para *L. monocytogenes* tanto por PCR anidada como por el método microbiológico convencional. Estos resultados demuestran que la PCR anidada desarrollada es una herramienta robusta, específica y altamente sensible para la detección de *L. monocytogenes* en alimentos, con potencial aplicación en controles de calidad microbiológica en la industria alimentaria.

Palabras clave: PCR anidada, *Listeria monocytogenes*, quesos, gen *HlyA*, microbiología

"Development of an alternative molecular method for the detection of *Listeria monocytogenes*. Application in cheese samples".

Abstract:

Listeria monocytogenes is capable of surviving and growing under refrigerated conditions. Food can become contaminated at any stage of the production chain. The reference microbiological method (ISO 11290-1:2017) requires 10 days to identify the species. The objective of this study was to develop and validate a molecular method for the detection of *L. monocytogenes* in soft cheese samples. A nested PCR (nPCR) was designed for the amplification of a sequence of the *HlyA* gene that encodes listeriolysin O, a pathogenicity factor. An internal amplification control (IAC) was designed to evaluate the presence of polymerase inhibitors, and a plasmid DNA control, with a fragment of the *HlyA* gene, was generated to determine the limit of detection (LD), reproducibility, and repeatability of the nPCR. Validation was performed with samples obtained at different times from artificially contaminated cultures (0, 3.4, 34, and 340 cfu/25 g) and evaluated by the reference microbiological method. Finally, 80 samples of commercial soft cheeses were analyzed. The use of 100,000 copies per reaction of the IAC does not interfere with the amplification of the template DNA. The DL of nPCR was 30 copies per reaction with 100% repeatability and reproducibility. The optimal sample for nPCR was obtained after 24 hours of culture in Fraser broth. Under these conditions, the lowest concentration tested (3.4 cfu/25 g) was detected in the three samples analyzed. All commercial cheese samples were negative for *L. monocytogenes* by both nPCR and the conventional microbiological method. These results demonstrate that the nPCR developed is a robust, specific, and highly sensitive tool for the detection of *L. monocytogenes* in food, with potential application in microbiological quality control in the food industry.

Key words: Nested PCR, *Listeria monocytogenes*, cheeses, *HlyA* gene, microbiology

1. Revisión bibliográfica

La inocuidad alimentaria es un eje fundamental en la salud pública global, ya que el consumo de alimentos contaminados representa una fuente significativa de enfermedades y muertes prevenibles. Según la Organización Mundial de la Salud (OMS), cada año aproximadamente 600 millones de personas en el mundo contraen enfermedades transmitidas por alimentos (ETAs), lo que se traduce en 420.000 muertes, muchas de ellas evitables (FAO/WHO, 2015). Dentro de los peligros microbiológicos de mayor impacto en la industria de alimentos, *Listeria monocytogenes* se destaca como un patógeno crítico, tanto por su alta letalidad como por su capacidad de persistencia en ambientes adversos (Osek et al., 2022).

1.1 Características generales y microbiológicas

Listeria monocytogenes es el agente causante de listeriosis humana y animal, una infección relacionada con el consumo de productos alimenticios contaminados, incluidos productos alimenticios listos para el consumo, leche, lácteos, carnes y alimentos congelados (Ravindhiran et al., 2023). Dicho patógeno encuentra su hábitat en el suelo, la vegetación y los animales (Allerberger & Wagner, 2010). Las bacterias se distribuyen de forma ubicua en la naturaleza y se ha descubierto que están ampliamente presentes en aguas superficiales, suelo, plantas, ensilado, aguas residuales, desechos de mataderos y leche de vaca (Gupta & Adhikari, 2022).

Listeria monocytogenes es una bacteria gram-positiva, intracelular facultativa, psicrótrofa y formadora de biofilms, lo que le permite crecer en refrigeración y adherirse a superficies industriales, complicando su erradicación (Ribeiro et al., 2023). Este bacilo de tamaño pequeño, no esporulado, es especialmente problemático debido a su capacidad para sobrevivir y crecer en condiciones extremas. La tolerancia a altas concentraciones salinas (14%), pHs ácidos (4.7-9.2) y la capacidad de multiplicarse a temperaturas muy bajas (0-45°C), convierten a *L. monocytogenes* en un serio peligro para la seguridad alimentaria y por lo tanto para la salud pública (Food Safety Authority of Ireland (FSAI), 2005; Jordan & McAuliffe, 2018).

1.2 Taxonomía

Desde el punto de vista taxonómico, la especie *L. monocytogenes* pertenece al dominio Bacteria, filo *Firmicutes*, clase *Bacilli*, orden *Bacillales*, familia *Listeriaceae*, y género *Listeria*. De las más de 20 especies descritas, solo algunas son patógenas; *L. monocytogenes* es la principal implicada en listeriosis humana (Liu D, 2006). Estudios epidemiológicos revelan que de los 13 serotipos identificados (1/2a, 1/2b, 1/2c, 3a, 3b, 3c, 4a, 4ab, 4b, 4c, 4d, 4e y 7) de *L. monocytogenes* basados en la combinación de antígenos somáticos (O) y flagelares (H), tres serotipos 1/2a, 1/2b y 4b representan el 90% de los casos de listeriosis humana (Gupta & Adhikari, 2022).

✓ **Serotipo 1/2a**

Es uno de los más frecuentemente aislados en alimentos listos para el consumo, así como en ambientes de procesamiento alimentario. Está asociado comúnmente a casos esporádicos de listeriosis, particularmente en personas inmunocomprometidas (Ferreira et al., 2014; Kathariou, 2002). Su capacidad de persistencia en ambientes industriales lo convierte en un desafío para la higiene y el control microbiológico en plantas procesadoras (Sauders & Wiedmann, 2007).

✓ **Serotipo 1/2b**

Se encuentra tanto en productos alimenticios como en el ambiente, y aunque representa una proporción menor de los aislamientos clínicos comparado con 1/2a y 4b, ha estado involucrado en brotes ocasionales. Su capacidad para adaptarse a diversos nichos ecológicos lo convierte en un serotipo relevante desde el punto de vista sanitario (Orsi et al., 2011; Ward et al., 2004).

✓ **Serotipo 4b**

Es reconocido como el más virulento y está fuertemente implicado en la mayoría de los brotes epidémicos de listeriosis de gran magnitud. Su capacidad para invadir tejidos y provocar infecciones graves, especialmente en grupos vulnerables, lo convierte en una amenaza significativa para la salud pública (Orsi et al., 2011).

El conocimiento de estos serotipos no solo permite comprender mejor la epidemiología de la listeriosis, sino que también es clave para el diseño de estrategias de vigilancia y control microbiológico a lo largo de la cadena alimentaria (Hurley et al., 2019).

La patogenicidad de *L. monocytogenes* se encuentra estrechamente relacionada con su arsenal de factores de virulencia, como la proteína internalina (*inlA/B*), que facilita la invasión de células epiteliales; la listeriolisina O (*hlyA*), esencial para la lisis de la vacuola fagocítica; la actina nucleadora (*actA*), que le permite moverse intracelularmente; y el regulador maestro *prfA*, que coordina la expresión de genes de virulencia (Radoshevich & Cossart, 2018).

1.3 Listeriosis

Los grupos vulnerables de la población que pueden contraer listeriosis son las mujeres embarazadas (por el riesgo de aborto espontáneo, muerte fetal o parto prematuro), recién nacidos, adultos mayores y los pacientes inmunodeprimidos por tratamientos quimioterápicos o corticoides. La listeriosis se presenta con un cuadro invasivo con infección sistémica, septicemia y encefalitis. Los síntomas aparecen luego de un período de incubación que puede variar desde algunos días hasta tres meses. El diagnóstico a tiempo permite el tratamiento con antibióticos como ampicilina y aminoglucósidos que son sumamente efectivos. En aquellos individuos que no forman parte de los grupos de riesgo, la infección con altas dosis de *L. monocytogenes* puede causar cuadros de gastroenteritis febriles leves similares a una gripe. Estos síntomas también se pueden presentar en las mujeres embarazadas. Se ha establecido que en los individuos que no pertenecen al grupo de riesgo, el consumo de un alimento que contenga menos de 100 ufc/g no ocasiona síntomas (Alonso, 2018).

Listeria monocytogenes es un microorganismo intracelular facultativo que entra al hospedador de forma primaria a través del intestino. El ciclo comienza con la adhesión a la superficie de la célula eucariota y la subsecuente penetración de la bacteria dentro de la célula hospedadora mediante fagocitosis. Una vez fagocitada, la bacteria es capaz de escapar del ambiente hostil del fagosoma gracias a la secreción de listeriolisina O (factor de patogenicidad de *L. monocytogenes*), una hemolisina activa a bajo pH codificada por el gen *HlyA*. La listeriolisina reconoce el colesterol de la membrana, forma poros y favorece la lisis de la membrana del fagolisosoma, lo que provoca la migración de *L. monocytogenes* al citosol de la célula hospedadora (López et al., 2006).

1.4 Brotes de listeriosis

Varios productos alimenticios se relacionaron con brotes de listeriosis, entre ellos ensaladas envasadas, fiambres y productos de cerdo listos para el consumo, pescado ahumado refrigerado, aves crudas o poco cocidas, huevos duros, quesos, leche, helados, salsas, verduras de hoja verde preenvasadas, brotes y frutas y verduras crudas o procesadas. Los alimentos listos para consumir, son la fuente común de listeriosis, ya que estos alimentos generalmente se consumen sin procesamiento adicional por parte del consumidor (Gupta & Adhikari, 2022)

Los brotes de listeriosis han sido ampliamente documentados a nivel internacional y, en muchos casos, han estado relacionados con el consumo de productos lácteos, especialmente quesos blandos (Palacios et al., 2022).

Uno de los brotes más relevantes ocurrió en Estados Unidos en 1985, y fue uno de los primeros en relacionar de manera concluyente a *L. monocytogenes* con un alimento contaminado. Este brote afectó a 142 personas, provocando 48 muertes, incluidas 20 pérdidas fetales o neonatales. La fuente del brote fue un queso fresco estilo mexicano elaborado con leche pasteurizada, el cual se contaminó posteriormente al proceso térmico debido a deficientes prácticas higiénicas en la planta procesadora. El serotipo implicado fue 4b, una de las variantes más virulentas de la especie. Este evento marcó un punto de inflexión en la vigilancia microbiológica de productos lácteos en Estados Unidos y reforzó la percepción de *L. monocytogenes* como un patógeno emergente de transmisión alimentaria (Linnan et al., 1988).

Uno de los brotes más emblemáticos de *L. monocytogenes* en América Latina ocurrió en Chile entre los años 2008 y 2009, y estuvo directamente relacionado con el consumo de quesos blandos tipo Brie y Camembert. Durante este período, se notificaron más de 160 casos en distintas regiones del país, con un aumento significativo respecto a la media anual histórica, que rondaba los 20 casos por año (Alcayaga & Hott, 2008). Los grupos más afectados fueron las mujeres embarazadas (40%), los adultos mayores (23%), los neonatos (14%) y personas inmunocomprometidas (15%), lo que refleja el impacto de esta bacteria en poblaciones vulnerables (Alcayaga & Hott, 2008; Ministerio de Salud de Chile, 2009). La mortalidad asociada alcanzó un 20% en algunos tramos del brote, con al menos 16 muertes confirmadas en el periodo completo (Woodruff A, 2009). La primera fase del brote se originó en 2008 por el consumo de quesos blandos contaminados de la marca *Chevrita*, en los que se

aisló la cepa epidémica 009. La mayoría de los casos se concentraron en comunas del sector oriente de Santiago de Chile, asociadas a un mayor poder adquisitivo, lo cual coincide con el consumo más frecuente de productos gourmet como los quesos tipo Brie y Camembert (Alcayaga & Hott, 2008). En 2009, el brote resurgió por una cepa distinta (cepa 001), esta vez asociada al consumo de embutidos laminados, con una segunda oleada de casos y fallecimientos. Este rebrote reafirmó la capacidad de *L. monocytogenes* para sobrevivir y proliferar en una variedad de matrices alimentarias listas para el consumo (Montero et al., 2015). Como consecuencia, el Ministerio de Salud de Chile actualizó los criterios microbiológicos para alimentos listos para consumo, adoptando el enfoque de “*Listeria* cero” en productos de alto riesgo como quesos blandos, embutidos y alimentos infantiles, siguiendo estándares internacionales de inocuidad alimentaria (Ministerio de Salud de Chile, 2009). Este brote representa un caso paradigmático en la región, ya que evidencia cómo *L. monocytogenes* puede causar una crisis sanitaria a gran escala a través del consumo de alimentos aparentemente inocuos, y destaca la importancia de una vigilancia microbiológica rigurosa en toda la cadena alimentaria especialmente en productos como los quesos de pasta blanda, cuyo pH y contenido de humedad favorecen el crecimiento del patógeno (Ministerio de Salud de Chile, 2009).

Más recientemente, entre 2017 y 2018, tuvo lugar en Sudáfrica el brote de listeriosis más grande registrado a nivel mundial, con un total de 1.060 casos confirmados y 216 muertes. Las investigaciones identificaron como alimento vehiculizante a la "polony", un embutido cocido listo para el consumo, muy popular en ese país. La cepa responsable pertenecía nuevamente al serotipo 4b, dentro del complejo clonal CC6, caracterizado por su alta virulencia. Este brote, además de tener un fuerte impacto sanitario y social, generó la retirada masiva de productos del mercado, sanciones a la empresa involucrada (Enterprise Foods) y reformas regulatorias sobre alimentos listos para consumir en Sudáfrica (Smith et al., 2019; Thomas et al., 2020)

Estos brotes históricos no solo ilustran el grave riesgo que representa *L. monocytogenes* cuando contamina alimentos mínimamente procesados o listos para el consumo, sino que también refuerzan la importancia de los programas de control microbiológico y trazabilidad a lo largo de toda la cadena alimentaria.

1.5 Incidencia en la industria de alimentos

La industria alimentaria se ve gravemente perjudicada cuando este patógeno ingresa a la planta elaboradora de alimentos a través de la vestimenta, el calzado y las manos de los operarios, como también con los utensilios, el equipamiento y los materiales utilizados. Otro inconveniente, no menor, que se da en la industria es la capacidad de esta bacteria para formar biofilm, estructuras multicelulares que le permiten adherirse a superficies inertes como acero inoxidable, plásticos o caucho, muy comunes en las líneas de procesamiento de alimentos. Los biofilms actúan como una barrera protectora frente a desinfectantes y facilitan la persistencia crónica del patógeno en ambientes industriales (Carpentier & Cerf, 2011) lo que le permite sobrevivir a los procesos de limpieza y desinfección de las superficies de trabajo y equipos, contaminando los alimentos que allí se procesan. La pasteurización (71,7°C durante 15 segundos) es el tratamiento térmico más efectivo para eliminar esta bacteria, obteniéndose una reducción en su concentración de 3 a 4 ciclos de logaritmo (Schöbitz et al., 2009).

En el caso de productos lácteos como quesos blandos la reglamentación vigente obliga a los productores a pasteurizar la leche con la que se van a elaborar, sin embargo, la principal fuente de contaminación la constituyen las etapas posteriores a este proceso. Si no se respetan las buenas prácticas de manufactura, durante la comercialización del producto y no se cumplen con las condiciones de higiene adecuadas durante la manipulación se puede dar una fácil y rápida contaminación de los quesos, fundamentalmente si en los comercios se realiza el fraccionamiento de los mismos (Pinto & Reali, 1996).

Los quesos blandos presentan condiciones fisicoquímicas favorables para el crecimiento de *L. monocytogenes*: actividad de agua elevada, pH moderado, largo tiempo de almacenamiento y, en algunos casos, ausencia de tratamiento térmico final. Estudios han demostrado que incluso quesos pasteurizados pueden ser recontaminados durante las etapas de maduración o envasado, lo que pone en evidencia la necesidad de aplicar métodos sensibles y rápidos de vigilancia (Lazzaro et al., 2021).

1.6 Método de referencia para la detección de *L. monocytogenes*

En la actualidad, el método de referencia internacionalmente aceptado para la detección de *L. monocytogenes* en alimentos y muestras ambientales es el descrito por la norma ISO 11290-1:2017, titulada “*Microbiology of the food chain — Horizontal method for the detection and enumeration of Listeria monocytogenes and of Listeria spp. — Part 1:*

Detection method". Esta metodología, desarrollada por la Organización Internacional de Normalización (ISO), la cual fue revisada y confirmada en 2024, establece un procedimiento estandarizado de tipo cualitativo que permite la detección de *L. monocytogenes* en 25 g o 25 mL de muestra, siendo aplicable a una amplia gama de productos alimenticios, incluyendo aquellos de alta complejidad como los quesos blandos.

El procedimiento se basa en un sistema secuencial de enriquecimiento selectivo, aislamiento en medios sólidos y confirmación bioquímica y/o serológica. En una primera etapa, la muestra es homogeneizada y cultivada en un medio de enriquecimiento primario en Caldo Semi Fraser (CSF), que contiene agentes selectivos como antibióticos en la mitad de su concentración, durante 25 ± 1 horas a $30 \pm 1^\circ\text{C}$. Posteriormente, una alícuota de este caldo es transferida a Caldo Fraser (CF), que contiene la concentración total de antibióticos, para el enriquecimiento secundario, incubado durante 24 ± 2 horas a $37 \pm 1^\circ\text{C}$. Este paso favorece el crecimiento específico de *Listeria* spp., mientras inhibe la flora competidora. Tras el enriquecimiento, el cultivo es sembrado en medios sólidos selectivos, siendo el más comúnmente empleado el agar Oxford. Las placas se incuban por 48 horas a 37°C , permitiendo la diferenciación presuntiva de colonias típicas. Las colonias sospechosas se aíslan y se someten a pruebas confirmatorias como catalasa positiva, movilidad a 25°C , hemólisis en agar sangre y, en algunos casos, identificación mediante pruebas bioquímicas o moleculares específicas. Se necesitan 2 días más para la confirmación de cualquier aislamiento sospechoso positivo (ISO, 2017).

El tiempo total requerido para la detección y confirmación completa de *L. monocytogenes* mediante el método microbiológico es de aproximadamente 7 días, lo que representa una limitación significativa en matrices como quesos frescos o blandos de corta vida útil. No obstante, este protocolo continúa siendo el patrón de referencia para la validación de métodos alternativos, especialmente en estudios de control oficial o evaluación comparativa.

Respecto a la sensibilidad analítica, se ha reportado que este método puede detectar niveles tan bajos como 1–10 ufc en 25 g de muestra, especialmente tras el enriquecimiento secundario. La especificidad y sensibilidad globales del método han sido evaluadas en estudios multilaboratorio, mostrando sensibilidad entre el 91% y 100%, y especificidad entre el 97% y 100%, dependiendo de la matriz alimentaria y de la concentración de la contaminación. Estas métricas han sido confirmadas en validaciones realizadas conforme a

la norma ISO 16140, que establece criterios para métodos alternativos en microbiología alimentaria (Gnanou Besse et al., 2019).

Sin embargo, cabe destacar que el método presenta ciertas limitaciones inherentes, como la posibilidad de inhibición por flora competitiva como *L. innocua*, que puede enmascarar a *L. monocytogenes*, así como el tiempo prolongado hasta la obtención de un resultado definitivo que no permite la toma de decisiones rápidas en la industria de alimentos, causando incrementos en el costo del producto final por concepto de cuarentena antes de su liberación.

1.7 Métodos moleculares alternativos para la detección de *L. monocytogenes*

Como alternativa al método microbiológico, se han desarrollado métodos que permiten obtener resultados en menor tiempo, basados en diferentes tecnologías, incluidas técnicas inmunológicas y moleculares. Los métodos inmunológicos se basan en la reacción antígeno-anticuerpo, que utilizan anticuerpos específicos para *L. monocytogenes*. Los métodos moleculares, en sus diversas variantes, se basan en el principio de complementariedad de bases del ADN y en la participación de la enzima polimerasa que permite la extensión del fragmento a amplificar, agregando nucleótidos en secuencias complementarias al ADN molde por medio de un proceso cíclico (Palomino-Camargo & González-Muñoz, 2014). Existen, además, métodos que combinan técnicas inmunológicas con técnicas moleculares (Rajkovic & Moulalij, 2012). Las principales ventajas de las técnicas moleculares son la rapidez en la obtención de un resultado y la confirmación de la especie de *L. monocytogenes* ya que se pueden detectar genes de virulencia específicos. Además, la alta sensibilidad de estas técnicas permite detectar patógenos alimentarios que se encuentran generalmente en muy bajas concentraciones (menos de 100 ufc/g), que pueden estar estresados o en estado de viables no cultivables y que no pueden recuperarse satisfactoriamente de muestras muy contaminadas con otros microorganismos interferentes. Las principales desventajas incluyen la reducción de la sensibilidad por la detección directa (ya que no se produce la multiplicación del patógeno), la incapacidad para diferenciar células vivas y muertas, y la no obtención de un aislado bacteriano para su posterior caracterización (Giraldo Aristizábal et al., 2021)

Factores como la sensibilidad, especificidad y costo son determinantes al momento de la elección de una técnica molecular. Dentro de las técnicas moleculares, la PCR anidada

o *nested* PCR (nPCR) posee particular valor en matrices complejas como quesos blandos, que pueden contener inhibidores de la polimerasa reduciendo significativamente la eficiencia de amplificación. La PCR anidada se basa en dos reacciones de amplificación secuenciales, cada una de las cuales utiliza un par diferente de cebadores. El producto de la primera reacción de amplificación se utiliza como plantilla para la segunda PCR, que se ceba con oligonucleótidos que se colocan internamente al primer par de cebadores. El uso de dos pares de oligonucleótidos permite realizar un mayor número de ciclos, aumentando así la sensibilidad de la PCR. La especificidad mejorada de la reacción se deriva de la unión de dos conjuntos separados de cebadores al mismo molde objetivo (Green & Sambrook, 2019). La segunda ronda de amplificación resulta en un aumento en la sensibilidad de detección de varios órdenes de magnitud con respecto a la sensibilidad lograda con una sola ronda de amplificación. Este aumento de sensibilidad se acompaña con un aumento de especificidad, ya que es poco probable que cualquier producto inespecífico amplificado en la PCR primaria contenga secuencias complementarias a los cebadores utilizado en la PCR secundaria (Levin, 2003).

Los genes más utilizados para la detección de *L. monocytogenes* por técnicas moleculares son aquellos asociados a factores de virulencia, tales como el gen *plcB* codificante de la fosfolipasa C, el gen *HlyA* que codifica para la listeriolisina O, el gen *prfA* que codifica para una proteína reguladora de la transcripción, el gen *iap* que codifica para una proteína asociada a la invasión y el gen *mpl* que codifica para una metalloproteasa (Cooray et al., 1994).

El tiempo de detección de *L. monocytogenes* puede reducirse varios días sin disminuir la sensibilidad en la detección si se combina el método microbiológico para la amplificación del patógeno con el método molecular para la detección específica. Así, la PCR se puede utilizar para detectar el patógeno luego de los cultivos de enriquecimiento, mientras que al mismo tiempo se siembran en agar para obtener un resultado válido por el método de referencia (Dalmaso et al., 2014).

Dado que los alimentos son muestras complejas que pueden contener inhibidores de la polimerasa, se recomienda el uso de un control interno que se amplifique en todas las reacciones de PCR y permita identificar en las muestras la presencia de inhibidores de la polimerasa (Murphy et al., 2007).

2. Objetivos

El objetivo general es desarrollar un método molecular complementario, basado en la detección de ADN, al método microbiológico de referencia, para la detección de *L. monocytogenes* en muestras de quesos blandos.

Objetivos específicos

* Desarrollar y validar una PCR anidada para la detección de *L. monocytogenes* en quesos blandos.

* Evaluar la presencia de *L. monocytogenes* en muestras de quesos blandos comerciales mediante PCR anidada.

* Comparar los resultados obtenidos por el método microbiológico de referencia con los obtenidos con la PCR anidada.

3. Materiales y métodos

3.1 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

3.1.1 PCR específica de género

Se puso a punto una PCR para la detección de *Listeria* spp. que amplifica una región complementaria al ADN ribosomal, de 938 pares de bases (pb) conservada en todas las especies de *Listeria*. Para ello, se mandaron a sintetizar los cebadores *forward* U1_Lys y *reverse* LII_Lys (Tabla 1) y se siguió el protocolo descrito por Border et al., (1990).

Tabla 1. Cebadores utilizados en la PCR específica del género *Listeria*.

Identificación	Secuencia (5´-3´)	ADN amplificado	Producto (pb)
U1_Lys	CAGCMGCCGCGGTAATWC	ADN ribosomal	938
LII_Lys	CTCCATAAAGGTGACCCT		

3.1.2 PCR anidada específica de especie

Se diseñó y puso a punto una PCR anidada para la amplificación de una secuencia complementaria del gen *HlyA*. Para ello se diseñaron y enviaron a sintetizar dos cebadores externos (*HlyA_Fext* y *HlyA_Rext*) que se utilizaron para el primer ciclo de amplificación y

dos cebadores internos (HlyA_Fint y HlyA_Rint) que se usaron en el segundo ciclo de amplificación (Tabla 2).

Tabla 2. Cebadores utilizados en la PCR anidada específica de la especie *Listeria monocytogenes*.

Identificación	Secuencia (5´- 3´)	ADN amplificado	Producto (pb)
HlyA_Fext	CCTGCATATATCTCAAGTGTG	Gen <i>HlyA</i>	545
HlyA_Rext	GGCAAATAGATGGACGATGTG		
HlyA_Fint	CCGCAAAAGATGAAGTTCA	Gen <i>HlyA</i>	255
HlyA_Rint	CCCAAGAGATGTTGAATTGAG		

Las condiciones de las dos rondas de PCR que dieron los mejores resultados de sensibilidad fueron establecidas evaluando combinaciones de distintas temperaturas de unión de los cebadores en el primer y segundo ciclo de amplificación. La primera ronda de amplificación (PCR1) fue realizada en un volumen final de reacción de 50 µL y la segunda ronda (PCR2) en un volumen final de reacción de 25 µL. La mezcla de amplificación de la PCR1 contenía 10 µL de ADN muestra como molde, 0,3 µM de cada cebador externo, solución tampón de reacción DreamTaq 1X, que contenía Cl₂Mg 2 mM, desoxinucleótidos trifosfato (dNTPs) 2 mM de cada uno y 0,6 U de ADN polimerasa DreamTaq™. El protocolo de amplificación consistió de: precalentamiento a 95°C durante 5 min; 20 ciclos de 95°C durante 30 s, 55°C durante 30 s y 72°C durante 35 s; con una extensión final a 72°C durante 5 min. La PCR2 utilizó 2 µL del producto de amplificación de la PCR1 como molde de ADN, 0,3 µM de cada cebador interno, solución tampón de reacción DreamTaq 1X que contenía Cl₂Mg 2 mM, dNTPs 0,2 mM de cada uno y 1 U de ADN polimerasa DreamTaq™. El protocolo de amplificación fue: precalentamiento a 95°C durante 5 min; 35 ciclos de 95°C durante 30 s, 55°C durante 30 s y 72°C durante 20 s; con una extensión final a 72°C durante 5 min. Se analizaron 10 µL de los productos de reacción mediante electroforesis en geles de agarosa al 2% teñidos con bromuro de etidio al 0,015%. Los controles y las muestras positivas dan un producto de amplificación de 255 pb.

3.2 Controles

3.2.1 Cepas bacterianas

Se utilizó como control negativo el ADN genómico (ADNg) extraído de *L. innocua*, mientras que para el control positivo se usó una cepa de referencia de *L. monocytogenes* (ATCC 19115) y un aislamiento clínico de *L. monocytogenes* obtenido en la provincia de Santa Fe de un paciente con meningitis. Las cepas de *Listeria* se mantuvieron en cultivo en medio agar triptosa.

La extracción de ADNg de las cepas control de *L. innocua* y *L. monocytogenes* se realizó hirviendo 1 mL de cultivo a 100°C durante 12 minutos en presencia de PBS-Tween 20 al 0,05% (PBST). Los restos celulares fueron eliminados mediante centrifugación a 12.000 xg y se utilizó 1 µL del sobrenadante en la PCR anidada. Las muestras de ADN se almacenaron a -20°C hasta su uso.

3.2.2 Control interno de amplificación

Para la generación de un control interno de amplificación (CIA) se mandó a sintetizar una secuencia de ADN doble cadena de 85 pb (tgaagttcaatgacccgggttcaaaagcttagacagatggaacggccaatggtgatcactctagaggctacgtcgctcaattcaa) que posee en el extremo 5' 9 pb complementarias al cebador *forward* interno (Hly_Fint) y en el extremo 3' 10 pb complementarias con el cebador *reverse* interno (Hly_Rint) diseñados para la PCR anidada. La amplificación de la secuencia de ADN sintetizada con estos cebadores da un producto de amplificación de 106 pb.

El producto de PCR obtenido usando como molde la secuencia sintetizada y los primers *forward* y *reverse* internos fue purificado por (Promega) y clonado en el vector pGEM-T *Easy* (Promega, EUA) con el que se transformaron células *E. coli Top10F* (Thermo Fisher Scientific) siguiendo las instrucciones del fabricante. Así, se obtuvo el plásmido pGEM-T-CIA, usado en los ensayos como CIA. Una alícuota del cultivo de las bacterias que contenían el plásmido fue conservada a -70°C con el fin de tener una fuente constante de producción de plásmido. El plásmido fue purificado (Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification Systems, Promega) y la concentración de ADN cuantificada por medio de la densidad óptica a 260 nm usando un equipo Nanodrop (Thermo Fisher Scientific Inc, USA). El número de copias del CIA (copias/µL) fue calculado usando la ecuación 1,

$$\text{copias} \frac{\text{número}}{\mu\text{L}} = \frac{6 \times 10^{23} \left(\frac{\text{copias}}{\text{mol}} \right) \times \text{concentración} \left(\frac{\text{g}}{\mu\text{L}} \right)}{\text{longitud DNA (bp)} \times 660 \left(\frac{\text{g}}{\text{mol pb}} \right)} \quad (1) \text{ siendo la longitud del DNA igual}$$

3121 pb.

3.2.3 Control de ADN estándar plasmídico

Un fragmento del gen *HlyA* fue amplificado con los *primers* externos diseñados para la PCR anidada, clonado en el pGEM-T *easy* y su concentración cuantificada como se describe para el CIA en el punto 3.2.2.

Un plásmido conteniendo el producto de amplificación del gen *HlyA* de *L. monocytogenes* con los cebadores externos Hly_Fext y Hly_Rext se generó para su uso como ADN estándar. Para la PCR se utilizó como molde el ADNg de *L. monocytogenes* ATCC19115. El producto de PCR fue purificado y clonado en el vector pGEM-T *easy* con el que se transformaron células *E. coli Top10F*. Luego de la amplificación en bacterias, el plásmido pGEM-T-*HlyA* fue purificado y cuantificado utilizando un equipo Nanodrop. El número de copias de plásmido (copias/ μL) fue calculado usando la ecuación 1, siendo la longitud del DNA igual 3560 pb.

3.3 Determinación del límite de detección, repetitividad y reproducibilidad de la PCR anidada

El límite de detección (LD) se determinó utilizando diluciones seriadas del control de ADN plasmídico en concentración de 0,3 a 300 copias/reacción. Se realizaron 10 repeticiones de cada dilución y el LD se fijó como la menor concentración en la cual las 10 repeticiones dieron resultados positivos. Para evaluar la repetibilidad intraensayo, cada dilución del control de ADN plasmídico (3×10^0 a 3×10^7 copias/ μL) se analizó por triplicado. Para evaluar la reproducibilidad interensayo, cada dilución se analizó en tres experimentos independientes en tres días diferentes. Para la reacción se utilizó un microlitro de control de ADN plasmídico. Se determinó el porcentaje de réplicas positivas (%P) intra e interensayo.

3.4 Evaluación de la PCR anidada en muestras de queso artificialmente contaminadas

La validación de la PCR anidada se realizó con muestras obtenidas a distintos tiempos de los cultivos utilizados para la determinación microbiológica de referencia. Se contaminaron artificialmente por triplicado muestras de 25 g de quesos con 3,4; 34,5; 345 y 3450 ufc de la cepa patrón de *L. monocytogenes* ATCC 19115. Estas muestras contaminadas fueron analizadas siguiendo la norma ISO 11290-1:2017. Brevemente, los 25 g de queso se colocaron en bolsa de stomacher, se le agregaron 225 mL de CSF y se cultivaron durante 24 h a 30°C (enriquecimiento primario). Muestras de queso sin contaminar fueron procesadas en paralelo y usadas como control negativo. Luego de la incubación, se realizó un enriquecimiento secundario por inoculación de 0,1 mL del CSF en 10 mL de CF y se incubó 24 h a 30°C. Finalmente, se sembraron 100 µL de CF en placas de Agar Oxford (Figura 1).

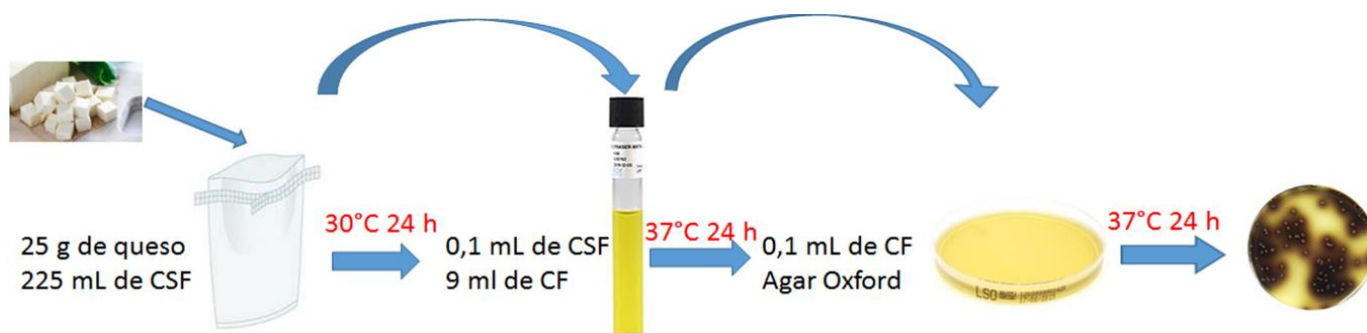


Figura 1. Esquema de los principales pasos para la detección de *L. monocytogenes* por el método microbiológico ISO 11290-1:2017.

Una alícuota de 1 mL del CSF en el momento de la contaminación (M0) y luego de 24 h de incubación (M24), del CF (M48) y de las colonias que crecieron en las placas de Agar Oxford (M72) fueron seleccionadas para el análisis por PCR anidada.

Las muestras fueron centrifugadas y los pellets lavados 2 veces con solución fisiológica. Los pellets resuspendidos en 100 µL de solución fisiológica conteniendo 0,05% de Tween 20 fueron calentados a 100°C durante 12 min para producir la lisis celular. Los restos celulares fueron separados por centrifugación a 12.000 xg durante 20 min. Luego de la centrifugación, 10 µL del sobrenadante fue utilizado como molde para el primer ciclo de amplificación de la PCR anidada.

3.5 Detección de *L. monocytogenes* en quesos blandos comerciales

3.5.1 Obtención de las muestras de queso

Se analizaron un total de 80 muestras de quesos blandos provenientes de establecimientos comerciales localizados en la ciudad de Rafaela adquiridos en supermercados, almacenes, despensas, minimercados, fiambrerías barriales y/o establecimientos elaboradores de quesos. Se trabajó con quesos de pasta blanda, tipo Cuartirolo y Cremoso, de diferentes marcas, fraccionados (listos para la venta) o trozado a pedido del consumidor.

Las muestras recibidas fueron identificadas con una codificación unívoca, y debieron conservarse a temperaturas de refrigeración (entre 2-4°C) en cámara o heladera destinada para tal efecto hasta el momento de su utilización.

3.5.2 Detección de *L. monocytogenes* según norma ISO 11290-1:2017

Las muestras se trabajaron en esterilidad. Se pesaron 25 g de queso en bolsa de stomacher y se procesaron como se indica en el punto 3.4.

3.5.3 Detección de *L. monocytogenes* por PCR anidada

Se analizaron las 80 muestras de quesos por PCR anidada utilizando como muestra la alícuota de cultivo tomada luego de 24 h de incubación en medio CF (ver punto 3.4) y la técnica puesta a punto en el punto 3.5.2.

4. Resultados

4.1 PCR específica de género *Listeria* spp

La PCR específica de género amplifica un fragmento de ADN del tamaño esperado (938 pb) cuando se evalúan las cepas controles de *L. innocua* y *L. monocytogenes* amplificadas en este trabajo (Figura 2).

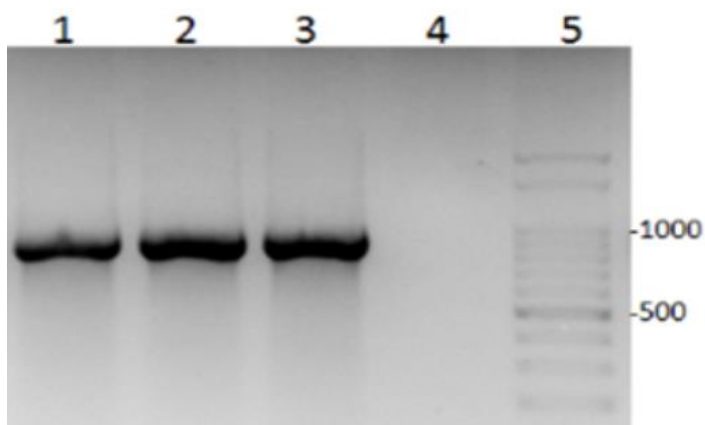


Figura 2. Detección de *Listeria* spp. por PCR. Gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio. Se sembraron los productos de amplificación de: **calle 1:** *L. innocua*, **calle 2:** *L. monocytogenes* ATCC 19115, **calle 3:** aislamiento de *L. monocytogenes*, **calle 4:** agua como control negativo y **calle 5:** marcador de peso molecular de 100-bp DNA (PB-L Productos Bio-Logicos®, Argentina).

4.2 PCR anidada específica de especie *Listeria monocytogenes*

En la PCR específica de especie, mientras que para los controles de *L. monocytogenes* se observa una banda de amplificación de 255 pb, en los controles de *L. innocua* no se observa banda de amplificación (Figura 3).

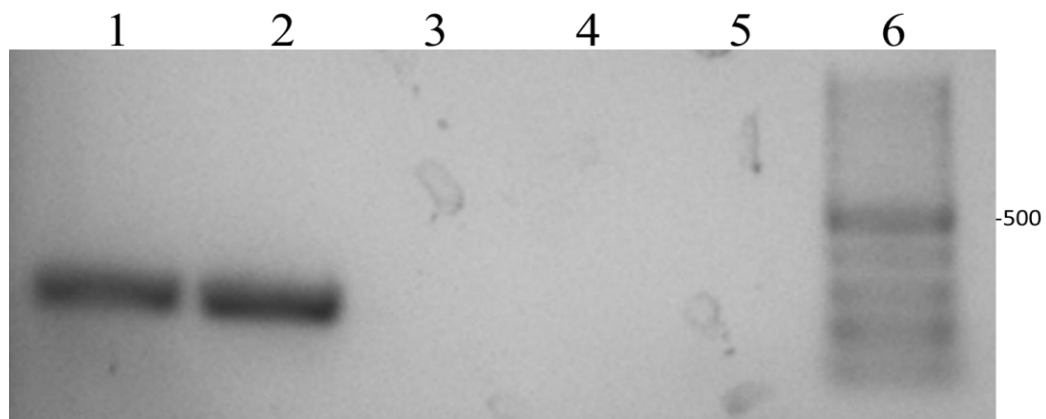


Figura 3. Gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio. Se sembraron los productos de amplificación de: **calles 1 y 2:** los controles de *L. monocytogenes*, **calles 3 y 4:** los controles de *L. innocua*, **calle 5:** agua destilada y **calle 6:** marcador de peso molecular qLadder 100 pb de precisión (PB-L productos Bio-Lógicos®).

4.3 Controles

4.3.1 Control interno de amplificación

La amplificación de la secuencia de ADN sintetizada con los cebadores Hly_Fint y Hly_Rint dio un producto de amplificación de 106 pb (Figura 4A) que fue clonado en el vector pGEM-T *easy* para construir el vector pGEM-T-CIA (Figura 4B).

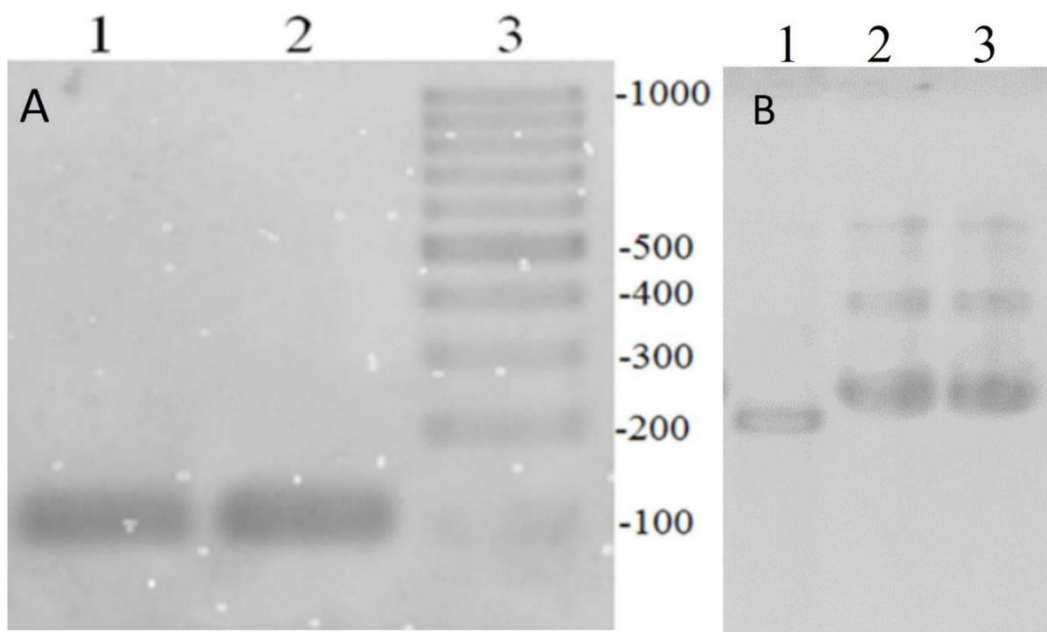


Figura 4. A) Gel de agarosa al 2% teñido con bromuro de etidio. Se sembraron los productos de PCR de: **calles 1 y 2:** control interno de amplificación, **calle 3:** marcador de peso molecular qLadder 100 pb de precisión (PB-L productos Bio-Lógicos®). B) Gel de agarosa al 0,7% teñido con bromuro de etidio. **Calle 1:** vector pGEM-T *easy*, **calles 2 y 3:** clon 1 y 2 del vector pGEM-T-CIA.

La concentración del plásmido pGEM-T-CIA clon 1 purificado fue 391,9 ng/μL, que equivale a $1,14 \cdot 10^{11}$ copias/μL.

4.3.2 Control de ADN plasmídico

La amplificación de la secuencia de ADN genómico con los cebadores Hly_Fext y Hly_Rext dio un producto de amplificación de 545 pb (Figura 5A) que fue clonado en el vector pGEM-T *easy* para construir el vector pGEM-T-HlyA (Figura 5B).

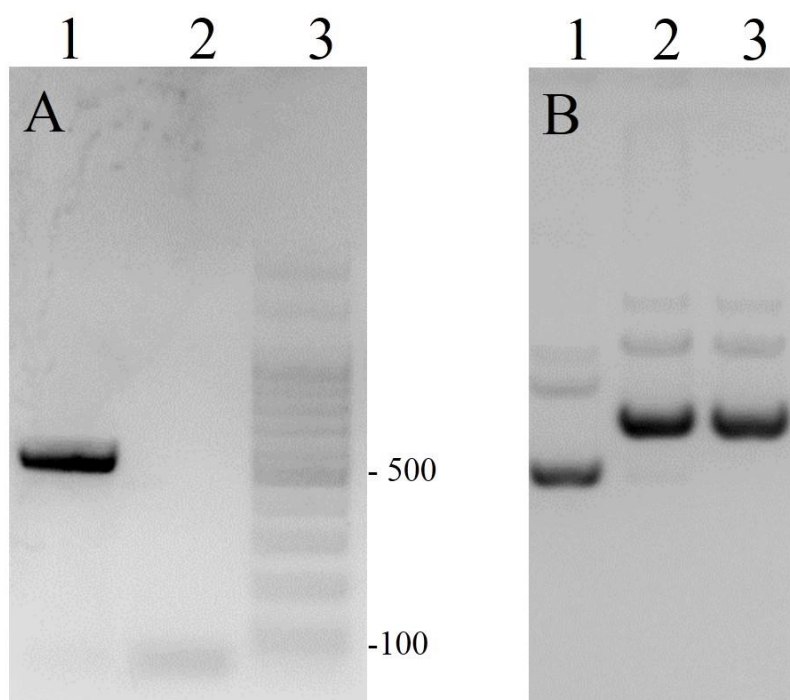


Figura 5. A) Gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio. Se sembraron **calle 1:** los productos de amplificación con los *primers* Hly_Fext y Hly_Rext de *L. monocytogenes* ATCC 19115, **calle 2:** H₂O, **calle 3:** marcador de peso molecular qLadder 100 pb de precisión (PB-L productos Bio-Lógicos®). B) Gel de agarosa al 0,7% teñido con bromuro de etidio. **Calle 1:** vector pGEM-T *easy*, **calles 2-3:** clon 1 y 2 del vector pGEM-T-*HlyA*.

La concentración del plásmido pGEM-T-*HlyA* clon 1 purificado fue 324 ng/μL, que equivale a $1,18 \times 10^{10}$ copias/μL.

4.4 Performance de la PCR anidada

Se evaluó el uso de diferentes concentraciones de copias del pGEM-T-*CIA*/reacción durante el desarrollo de la PCR anidada. El uso de 100.000 copias no interfirió con la amplificación de control de ADN plasmídico (pGEM-T-*HlyA*) en las concentraciones ensayadas (3×10^0 a 3×10^7) (Figura 6). De las 100.000 copias de pGEM-T-*CIA* añadidas, sólo 4.000 pasan a la PCR2, donde se encuentran los cebadores específicos para el *CIA*. En esta condición, se detectaron 3 copias de ADN plasmídico, lo que indica que la competencia entre el *CIA* y el ADN molde por los *primers* no es problemática para la detección. La banda amplificada de 106 pb del *CIA* se observó en todos los controles negativos, en el control sin molde y en todas las muestras en las que no hubo amplificación del gen *HlyA*.

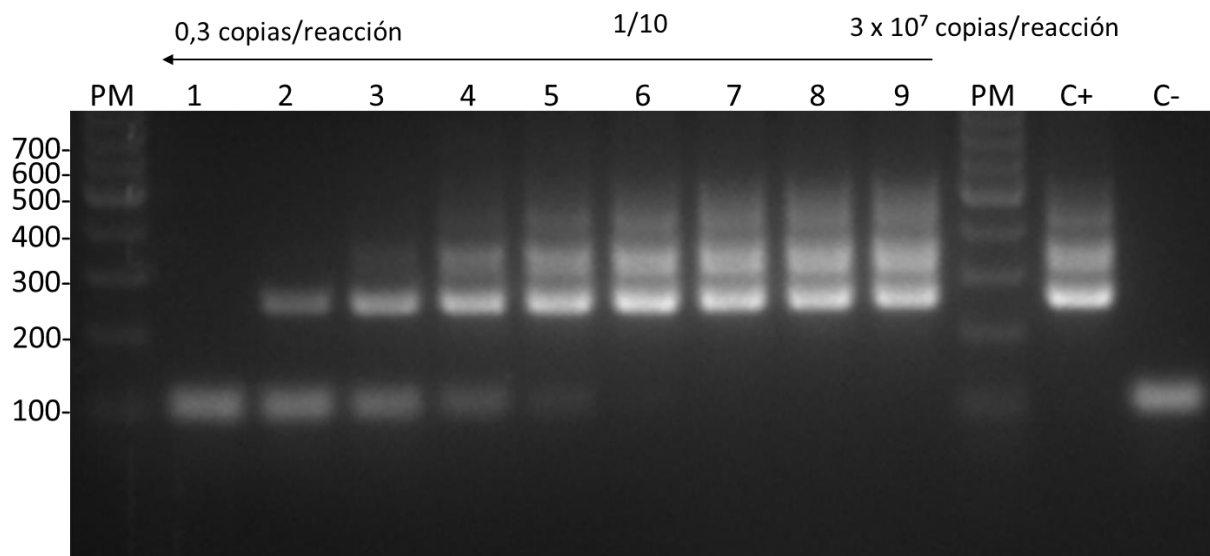


Figura 6. Gel de agarosa al 2% teñido con bromuro de etidio. **Calles 1-9:** diluciones seriadas 1/10 del ADN estándar (pGEM-T-*HlyA*), **calle PM:** marcador de peso molecular qLadder 100 pb de precisión (PB-L productos Bio-Lógicos®), **calle C+:** muestra de ADNg de *L. monocytogenes*, **calle C-:** muestra de ADNg de *L. innocua*.

4.4.1 Determinación del límite de detección, repetibilidad y reproducibilidad de la PCR anidada.

En todas las muestras sin ADN (muestras H₂O) se amplificó sólo la banda correspondiente a la amplificación del CIA (~ 100 pb). El 50%, 100% y 100% de las reacciones con 3, 30 y 300 copias de pGEM-T-*HlyA* dieron la banda de amplificación de 255 pb, correspondiente a la amplificación del gen *HlyA* de *L. monocytogenes* (Figura 7). Basados en estos resultados, el LD se estableció en 30 copias/reacción que fue la menor concentración en la cual las diez réplicas dieron resultados positivos.

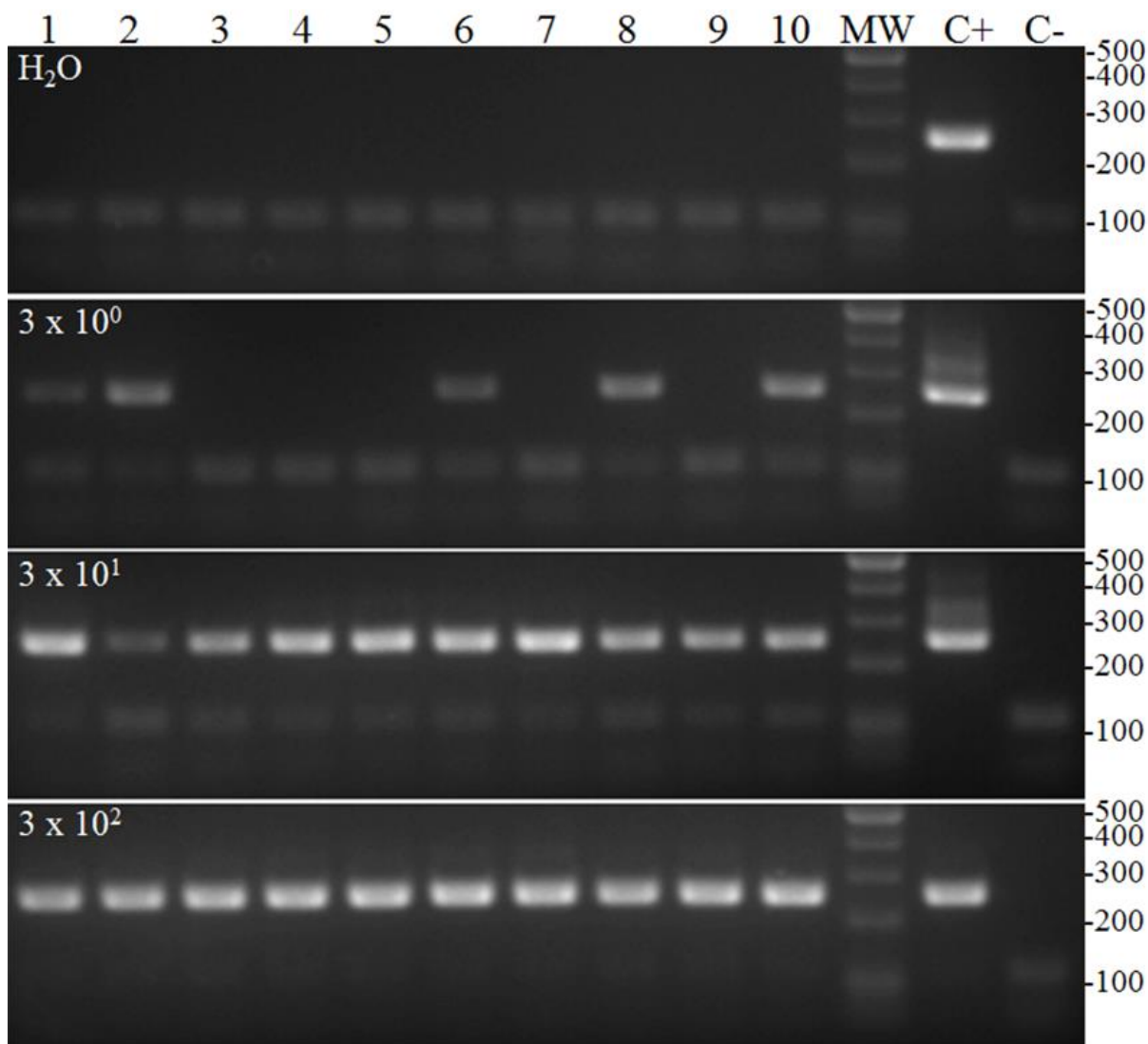


Figura 7. Gel de agarosa al 2% teñido con bromuro de etidio. Se realizaron 10 réplicas utilizando como ADN molde 4 condiciones diferentes detalladas en el extremo superior izquierdo de cada gel. H₂O: se reemplazó el ADN molde por H₂O, 3 x 10⁰: 3 copias de pGEM-T-*HlyA*/reacción, 3 x 10¹: 30 copias de pGEM-T-*HlyA*/reacción y 3 x 10²: 300 copias de pGEM-T-*HlyA*/reacción. C+: muestra de ADNg de *L. monocytogenes*. C-: muestra de ADNg de *L. innocua*.

La repetibilidad y la reproducibilidad del ensayo fueron 100% cuando el número de copias de ADN por reacción fue ≥ 30 copias/ μ L (Tabla 3).

Tabla 3: Repetibilidad y reproducibilidad de la PCR anidada para la detección del gen *HlyA* de *Listeria monocytogenes*.

Concentración (copias/ μ L)	Repetibilidad	Reproducibilidad
	%P	%P
3×10^7	100% (3/3)	100% (9/9)
3×10^6	100% (3/3)	100% (9/9)
3×10^5	100% (3/3)	100% (9/9)
3×10^4	100% (3/3)	100% (9/9)
3×10^3	100% (3/3)	100% (9/9)
3×10^2	100% (3/3)	100% (9/9)
3×10^1	100% (3/3)	100% (9/9)
3×10^0	66% (2/3)	56% (5/9)

%P porcentaje de réplicas positivas

4.4.2 Performance de la PCR anidada en muestras de quesos.

El efecto de la matriz de queso sobre la *performance* de la PCR anidada, fue analizada contaminando artificialmente muestras de queso con distintas concentraciones de *L. monocytogenes* ATCC 19115. Una banda de amplificación de 100 pb, correspondiente a la amplificación del CIA, se observó en todas las muestras de M24, M48 y M72. En las muestras de M0 no se observó la banda de amplificación correspondiente al CIA, lo que pone en evidencia la presencia de inhibidores de la polimerasa en estas muestras. En M24, sólo una de las muestras correspondiente a los quesos contaminados con 3,4 ufc fue negativa. Todas las muestras de M48 y M72 contaminadas fueron fuertemente positivas. En los controles negativos de M24, M48 y M72 sólo hubo amplificación del CIA (Figura 8).

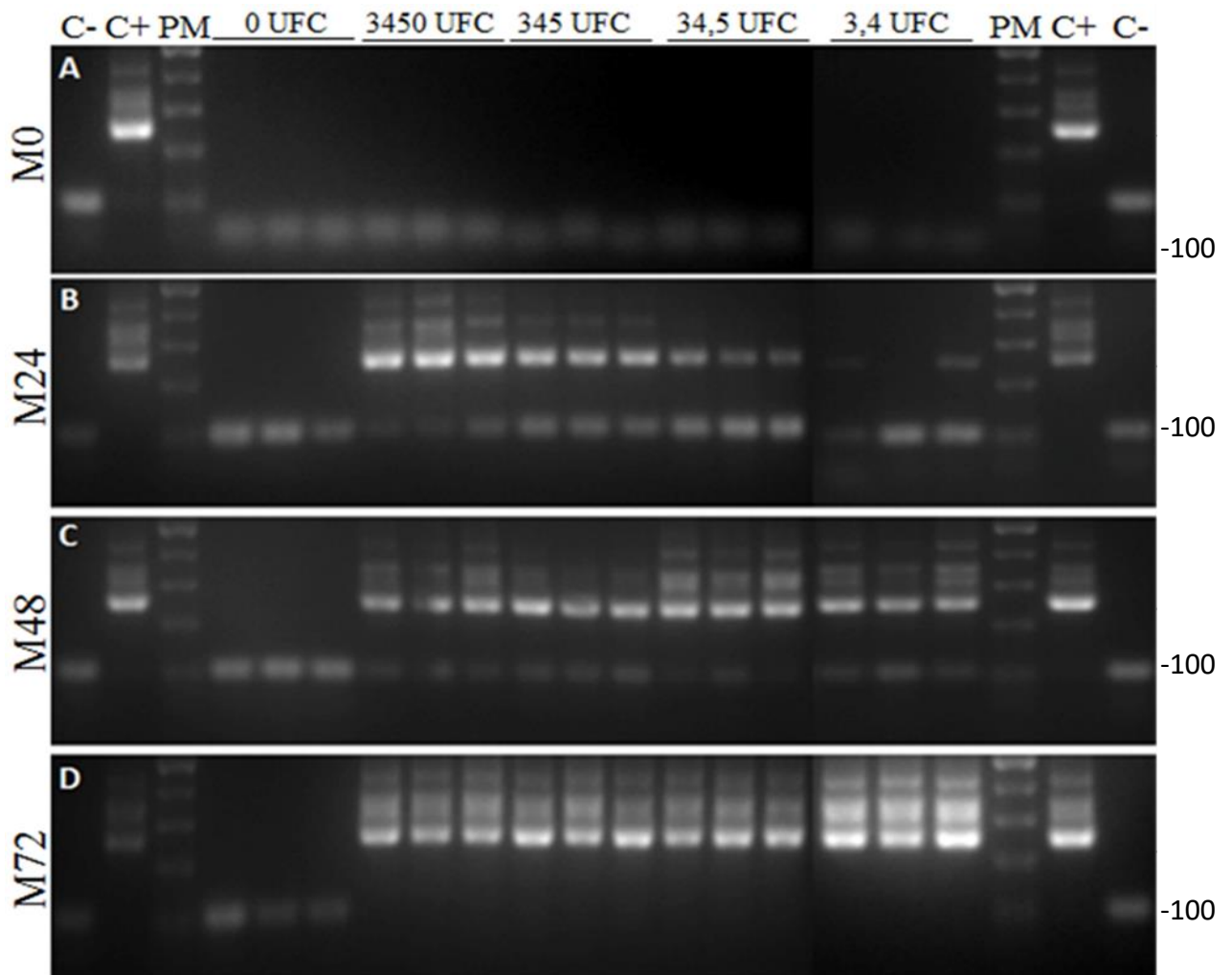


Figura 8. Gel de agarosa al 2% teñido con bromuro de etidio. Productos de amplificación de muestras de quesos sin contaminar (0 ufc) y contaminados artificialmente con 3,4; 34,5; 345 y 3450 ufc fueron tomadas luego de 0 (M0), 24 (M24), 48 (M48) y 72 (M72) horas de cultivo, **calle PM:** marcador de peso molecular qLadder 100 pb de precisión (PB-L productos Bio-Lógicos®), **calle C+:** muestra de ADNg de *L. monocytogenes*, **calle C-:** muestra de ADNg de *L. innocua*.

Este análisis permitió determinar que la muestra óptima para la determinación de *L. monocytogenes* por PCR anidada es la obtenida a las 48 horas de cultivo, tiempo en el cual la PCR anidada fue capaz de detectar la presencia de 3,4 ufc de *L. monocytogenes* en 25 g de queso.

4.5 Determinación de *L. monocytogenes* por PCR anidada en muestras de quesos blandos comerciales.

Los 80 quesos blandos obtenidos de distintos comercios de Rafaela fueron analizados en 5 ensayos distintos. En los ensayos 1 y 5 se analizaron 10 muestras de quesos y en los ensayos 2, 3 y 4 fueron analizadas 20 muestras de quesos. En todas las muestras analizadas se observó sólo la amplificación del CIA, por lo que todas las muestras fueron consideradas negativas para *L. monocytogenes* por el método molecular. Todas las muestras fueron negativas también por el método microbiológico. Los resultados de amplificación del ensayo 1 se muestran en la figura 9.

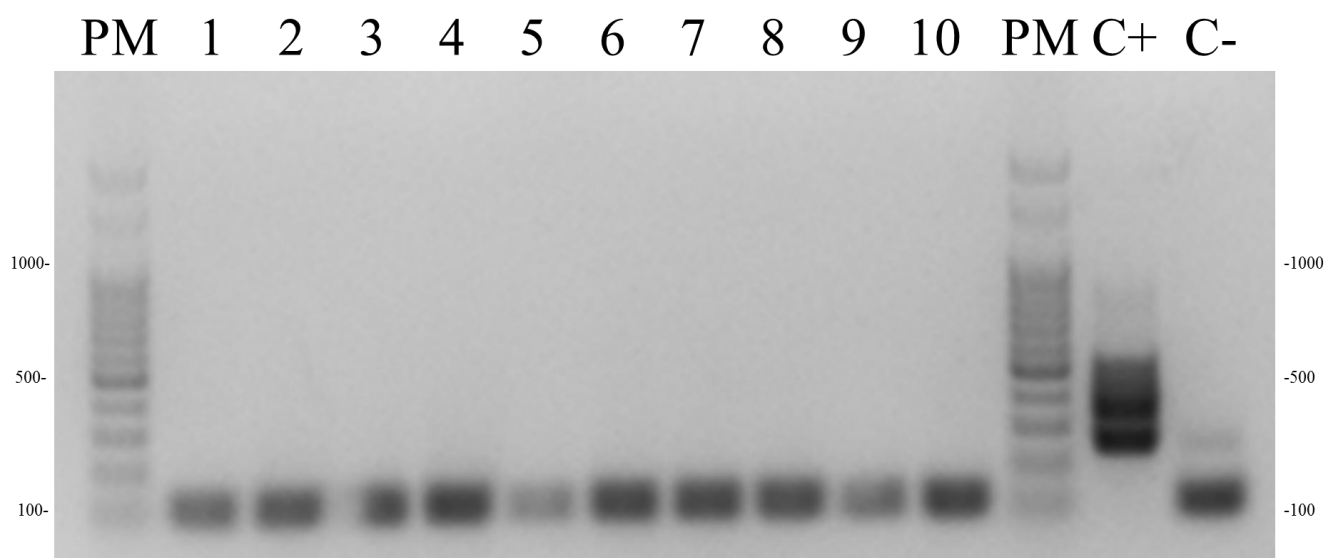


Figura 9. Gel de agarosa al 2% teñido con bromuro de etidio. **Calles 1-10:** muestras de quesos blandos, **calle PM:** marcador de peso molecular qLadder 100 pb de precisión (PB-L productos Bio-Lógicos®), **calle C+:** muestra de DNA de *L. monocytogenes*, **calle C-:** muestra de DNA de *L. innocua*.

5. Discusión

En el presente trabajo se desarrolló una técnica molecular de alta sensibilidad para la detección de *L. monocytogenes* en muestras complejas. Luego de comparar su desempeño con la técnica de referencia microbiológica ISO 11290-1:2017, la PCR anidada fue utilizada, en paralelo con el método microbiológico, para la detección de *L. monocytogenes* en muestras de quesos obtenidas de comercios locales de Rafaela. La elección del gen *HlyA*

para el desarrollo de la PCR anidada se fundamentó en resultados previos obtenidos por otros autores, en los que la amplificación del gen *HlyA* demostró tener alta especificidad y sensibilidad para la detección de *L. monocytogenes* en varios tipos de alimentos (Garrido-Maestu et al., 2018; Gianfranceschi et al., 2014). En nuestro trabajo, la PCR anidada ha identificado correctamente las muestras contaminadas con *L. monocytogenes* con un LD de 30 copias/reacción.

La incorporación en el desarrollo de la PCR anidada del CIA permitió aumentar la confiabilidad de la técnica respecto a los resultados negativos. La amplificación del CIA en todos los resultados negativos demuestra que cada uno de ellos es un verdadero negativo y no el resultado de la inhibición de la PCR, lo que refuerza el valor del diagnóstico. El CIA contiene las secuencias diana de los cebadores internos del gen *HlyA* de *L. monocytogenes* y se amplificaría competitivamente. De las 100.000 copias de CIA añadidas, sólo 4.000 quedan en la PCR2 donde se encuentran los cebadores específicos. En esta condición, se detectaron 30 copias de ADN plasmídico (pGEM-T-*HlyA*), lo que indica que dicha competencia no es problemática para la detección de bajas concentraciones de *L. monocytogenes* en las muestras.

El estudio se realizó sobre muestras de queso blando porque las características intrínsecas de estos alimentos, que incluyen pH alto, alta actividad de agua y bajo porcentaje de sal, contribuyen al crecimiento de *L. monocytogenes*. Por lo tanto, los quesos frescos de pasta blanda pueden presentar riesgo de listeriosis incluso cuando se producen con leche pasteurizada (Campagnollo et al., 2018). La contaminación posterior a la pasteurización puede ocurrir durante la producción de queso, en el mercado minorista o durante la manipulación por parte del consumidor (Brito et al., 2008; Jackson et al., 2007). Los quesos blandos contaminados han provocado brotes de listeriosis en varios lugares del mundo (Centers for Disease Control and Prevention [CDC], 2015; EFSA & ECDC, 2019; Jackson et al., 2018). Por lo tanto, muchos países aplican una política de tolerancia cero (ausencia en 25 g/mL de alimento) para *L. monocytogenes* en alimentos listos para el consumo como criterio de seguridad (Anon, 2005). Para aumentar la sensibilidad en la detección es necesario realizar un paso de enriquecimiento previo a la detección molecular de *L. monocytogenes* (Gasnov et al., 2005).

En el caso de los quesos contaminados artificialmente, establecimos que la muestra obtenida a las 24 horas de cultivo en CSF fue la mejor para la amplificación del ADN. Así, se realizó un paso previo de enriquecimiento para permitir la multiplicación de bacterias y la dilución y eliminación de posibles inhibidores de la PCR presentes en la muestra (presencia

de sales, sustancias de conservación, etc.). De las muestras procesadas a partir del CSF a las 24 h de incubación, en todas menos una de las muestras contaminadas con 3,5 ufc se amplificó el gen *HlyA* mediante PCR anidada. La falta de amplificación del gen *HlyA* en las muestras procesadas a partir del CSF sin incubación puede explicarse por la presencia de inhibidores de la PCR, ya que tampoco se observó amplificación del CIA. La sensibilidad de la PCR anidada fue 3,5 ufc/25 g, para las muestras de queso.

Se estima que los alimentos listos para el consumo que contienen menos de 10^2 ufc/g plantean poco riesgo, mientras que se ha descubierto que los alimentos relacionados con brotes contienen 10^3 ufc/g (Chen et al., 2003). El límite de detección de 3,5 ufc/25 g detectado en este estudio está por debajo de la dosis infecciosa mínima, que se cree que es $> 10^2$ células viables (Roberts et al., 1996).

Finalmente se utilizó la PCR anidada y el método microbiológico para la detección de *L. monocytogenes* en 80 muestras de queso blando obtenidas de tiendas minoristas locales. El análisis de quesos obtenidos en los mercados minoristas nos permitió evaluar la contaminación de alimentos listos para el consumo, incluyendo la contaminación que puede ocurrir en la planta procesadora o durante el fraccionamiento en el mercado minorista. La única fuente de contaminación adicional, no evaluada aquí, fueron las prácticas de manipulación de alimentos realizadas en la casa por parte de los consumidores (Byrd-Bredbenner et al., 2013). La concordancia entre el método microbiológico y el método molecular fue del 100% debido a que todas las muestras resultaron negativas. Estos resultados concuerdan con reportes previos realizados por otros autores de Sudamérica que indican la ausencia o baja prevalencia ($< 1\%$) de *L. monocytogenes* en muestras de quesos elaborados con leche pasteurizada en Chile (Cordano & Rocourt, 2001), Argentina (Marzocca et al., 2004) y Perú (Gutiérrez Gonzales et al., 2023).

6. Conclusiones

El presente trabajo desarrolló y validó una PCR anidada, basada en el gen *HlyA*, para la detección de *L. monocytogenes* en muestras de quesos blandos. La PCR anidada demostró una alta sensibilidad (30 copias de ADN/reacción y 3,5 ufc/reacción) y especificidad (100%), permitiendo la identificación de *L. monocytogenes* en muestras de queso artificialmente contaminadas, con un límite de detección 30 copias/reacción. En la evaluación de muestras comerciales, todos los quesos analizados fueron negativos tanto por el método molecular como por el método microbiológico, siendo la concordancia entre ambos del 100%. Este método molecular presenta ventajas significativas en términos de

rapidez y precisión frente a los métodos convencionales, lo que lo posiciona como una herramienta complementaria y útil para el control de *L. monocytogenes* en el proceso productivo, de limpieza e higiene en la industria láctea.

7. Bibliografía

- Alcayaga, & Hott. (2008). *Listeria* y listeriosis: un desafío de los nuevos tiempos. *Revista Chile Salud Pública*, 12(3), 188–195. <https://revistasaludpublica.uchile.cl/index.php/RCSP/article/view/2216>
- Allerberger, F., & Wagner, M. (2010). Listeriosis: A resurgent foodborne infection. *Clinical Microbiology and Infection*, 16(1), 16–23. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2009.03109.x>
- Alonso, A. (2018). Métodos de detección y control de *Listeria monocytogenes* en la industria alimentaria. *Universidad de Oviedo*, 1, 1–57
- Anon. (2005). The control and management of *Listeria monocytogenes* contamination of food. *Food Safety Authority of Ireland*.
- Border, P. M., Howard, J. J., Plastow, G. S., & Siggins, K. W. (1990). Polymerase chain reaction for the detection of *Listeria* species and *Listeria monocytogenes*. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, 46, 237–246. <https://doi.org/10.1385/0-89603-297-3:237>
- Brito, J. R., Santos, E. M., Arcuri, E. F., Lange, C. C., Brito, M. A., Souza, G. N., Cerqueira, M. M., Beltran, J. M., Call, J. E., Liu, Y., Porto-Fett, A. C., & Luchansky, J. B. (2008). Retail survey of Brazilian milk and Minas frescal cheese and a contaminated dairy plant to establish prevalence, relatedness, and sources of *Listeria monocytogenes* isolates. *Applied and environmental microbiology*, 74(15), 4954–4961. <https://doi.org/10.1128/AEM.01828-07>
- Byrd-Bredbenner, C., Berning, J., Martin-Biggers, J., & Quick, V. (2013). Food safety in home kitchens: A synthesis of the literature. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 10(9), 4060–4085. <https://doi.org/10.3390/ijerph10094060>
- Campagnollo, F. B., Gonzales-Barron, U., Cadavez, V. A. P., Sant’Ana, A. S., & Schaffner, D. W. (2018). *Quantitative risk assessment of Listeria monocytogenes* in traditional

- Minas cheeses: The cases of artisanal semi-hard and fresh soft cheeses. *Food Control*, 92, 370–379. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2018.05.019>
- Carpentier, B., & Cerf, O. (2011). Review — Persistence of *Listeria monocytogenes* in food industry equipment and premises. *International Journal of Food Microbiology*, 145(1), 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2011.01.005>
- Centers for Disease Control and Prevention. (2015, 23 de octubre). *2015 Outbreak of Listeria Infections Linked to Soft Cheeses Distributed by Karoun Dairies, Inc.*. CDC. Recuperado el [2025, 29 de julio], de https://archive.cdc.gov/www_cdc_gov/listeria/outbreaks/soft-cheeses-09-15/index.html
- Chen, Y., Ross, W. H., Scott, V. N., & Gombas, D. E. (2003). *Listeria monocytogenes*: low levels equal low risk. *Journal of food protection*, 66(4), 570–577. <https://doi.org/10.4315/0362-028x-66.4.570>
- Cooray, K. J., Nishibori, T., Xiong, H., Matsuyama, T., Fujita, M., & Mitsuyama, M. (1994). Detection of multiple virulence-associated genes of *Listeria monocytogenes* by PCR in artificially contaminated milk samples. *Applied and Environmental Microbiology*, 60(8), 3023–3026. <https://doi.org/10.1128/aem.60.8.3023-3026.1994>
- Cordano, A. M., & Rocourt, J. (2001). Occurrence of *Listeria monocytogenes* in food in Chile. *International Journal of Food Microbiology*, 70(1–2), 175–178. [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(01\)00533-5](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(01)00533-5)
- Dalmaso, M., Sorin, A., Hernandez, M., Kapetanakou, A. E., Manios, S. G., Melero, B., Minarovi, J., Muhterem, M., Ioana, A., Rovira, J., Skandamis, P. N., Stessl, B., Wagner, M., Jordan, K., & Rodríguez-Lázaro, D. (2014). Comparison of polymerase chain reaction methods and plating for analysis of enriched cultures of *Listeria monocytogenes* when using the ISO11290-1 method. *Journal of Microbiological Methods 8–14 Contents 98*, 98, 8–14. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2013.12.018>
- EFSA (European Food Safety Authority), & ECDC (European Centre for Disease Prevention and Control). (2019, 12 de diciembre). The European Union One Health 2018 zoonoses report. *EFSA Journal*, 17(12), e05926. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2019.5926>

- FAO/WHO. (2015). WHO estimates of the global burden of foodborne diseases: foodborne disease burden epidemiology reference group 2007-2015. *World Health Organization*. http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/199350/1/9789241565165_eng.pdf
- Ferreira, V., Wiedmann, M., Teixeira, P., & Stasiewicz, M. J. (2014). *Listeria monocytogenes* Persistence in Food-Associated Environments: Epidemiology, Strain Characteristics, and Implications for Public Health. *Journal of Food Protection*, 77(1), 150–170. <https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-13-150>
- Food Safety Authority of Ireland (FSAI) (2005). *The control and management of Listeria monocytogenes contamination of food*. <https://www.fsai.ie>
- Garrido-Maestu, A., Azinheiro, S., Carvalho, J., & Prado, M. (2018). Rapid and sensitive detection of viable *Listeria monocytogenes* in food products by a filtration-based protocol and qPCR. *Food Microbiology*, 73, 254–263. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2018.02.004>
- Gasnov, U., Hughes, D., & Hansbro, P. M. (2005). Methods for the isolation and identification of *Listeria* spp. and *Listeria monocytogenes*: a review. *FEMS microbiology reviews*, 29(5), 851–875. <https://doi.org/10.1016/j.femsre.2004.12.002>
- Gianfranceschi, M. V., Rodriguez-Lazaro, D., Hernandez, M., González-García, P., Comin, D., Gattuso, A., Delibato, E., Sonnessa, M., Pasquali, F., Prencipe, V., Sreter-Lancz, Z., Saiz-Abajo, M. J., Pérez-De-Juan, J., Butrón, J., Kozačinski, L., Tomic, D. H., Zdolec, N., Johannessen, G. S., Jakočiune, D., ... De Medici, D. (2014). European validation of a real-time PCR-based method for detection of *Listeria monocytogenes* in soft cheese. *International Journal of Food Microbiology*, 184, 128–133. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2013.12.021>
- Giraldo Aristizábal, A., Aguilera Becerra, A. M., Urbano Cáceres, E. X., Pedraza Bernal, A. M., & Jaimes Bernal, C. P. (2021). Comparación teórica entre técnicas fenotípicas y genotípicas utilizadas en la identificación de *Listeria monocytogenes*. *Revista Facultad De Ciencias Básicas*, 16(2), 7–19. <https://doi.org/10.18359/rfcb.5012>
- Gnanou Besse, N., Lombard, B., Guillier, L., François, D., Romero, K., Pierru, S., Bouhier, L., & Rollier, P. (2019). Validation of standard method EN ISO 11290 - Part 1 - Detection of *Listeria monocytogenes* in food. *International Journal of Food Microbiology*, 288, 13–21. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2018.03.024>

- Green, M. R., & Sambrook, J. (2019). *Polymerase Chain Reaction*. *Cold Spring Harbor protocols* 436–457. <https://doi.org/10.1101/pdb.top095109>
- Gupta, P., & Adhikari, A. (2022). Novel Approaches to Environmental Monitoring and Control of *Listeria monocytogenes* in Food Production Facilities. *Foods (Basel, Switzerland)*, *11*(12), 1760. <https://doi.org/10.3390/foods11121760>
- Gutiérrez Gonzales, M. L., Córdova Ramos, J. S., & Lozano Zanelly, G. A. (2023). Prevalencia de *Listeria monocytogenes* asociados a factores de riesgo en quesos expendidos en el Valle del Mantaro – Junín. *Cátedra Villarreal Posgrado*, *2*(1), 31–38. <https://doi.org/10.24039/rcvp2023211675>
- Hurley, D., Luque-Sastre, L., Parker, C. T., Huynh, S., Eshwar, A. K., Nguyen, S. V., Andrews, N., Moura, A., Fox, E. M., Jordan, K., Lehner, A., Stephan, R., & Fanning, S. (2019). Whole-Genome Sequencing-Based Characterization of 100 *Listeria monocytogenes* Isolates Collected from Food Processing Environments over a Four-Year Period. *MSphere*, *4*(4). <https://doi.org/10.1128/msphere.00252-19>
- ISO. Organización Internacional de Normalización. *Microbiología Internacional Estándar de la cadena alimentaria — Método horizontal para la detección y enumeración de Listeria*. 2017, (2017).
- Jackson, K. A., Gould, L. H., Hunter, J. C., Kucerova, Z., & Jackson, B. (2018). Listeriosis outbreaks associated with soft cheeses, United States, 1998–2014. *Emerging Infectious Diseases*, *24*(6), 1116–1118. <https://doi.org/10.3201/eid2406.171051>
- Jackson, V., Blair, I. S., McDowell, D. A., Kennedy, J., & Bolton, D. J. (2007). The incidence of significant foodborne pathogens in domestic refrigerators. *Food Control*, *18*(4), 346–351. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2005.10.018>
- Jordan, K., & McAuliffe, O. (2018). *Listeria monocytogenes* in Foods. In *Advances in Food and Nutrition Research*, *86*, 181–213. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/bs.afnr.2018.02.006>.
- Kathariou, S. (2002). *Listeria monocytogenes* Virulence and Pathogenicity, a Food Safety Perspective. *Journal of Food Protection*, *65*(11), 1811–1829. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-65.11.1811>

- Lazzaro, A., Innocenti, G. Pietro, Santinelli, L., Pinacchio, C., De Girolamo, G., Vassalini, P., Fanello, G., Mastroianni, C. M., Ceccarelli, G., & D'ettore, G. (2021). Antiretroviral therapy dampens mucosal CD4+ T lamina propria lymphocytes immune activation in long-term treated people living with HIV-1. *Microorganisms*, 9(8). <https://doi.org/10.3390/microorganisms9081624>
- Levin, R. E. (2003). Application of the polymerase chain reaction for detection of *Listeria monocytogenes* in foods: A review of methodology. *Food Biotechnology*, 17(2), 99–116. <https://doi.org/10.1081/FBT-120023074>
- Linnan, M. J., Mascola, L., Lou, X. D., Goulet, V., May, S., Salminen, C., Hird, D. W., Yonekura, M. L., Hayes, P., & Weaver, R. (1988). Epidemic listeriosis associated with Mexican-style cheese. *The New England journal of medicine*, 319(13), 823–828. <https://doi.org/10.1056/NEJM198809293191303>
- Liu D. (2006). Identification, subtyping and virulence determination of *Listeria monocytogenes*, an important foodborne pathogen. *Journal of Medical Microbiology*, 645–659.
- López, V., Suárez, M., Chico-Calero, I., Navas, J., & Martínez-Suárez, J. V. (2006). *Listeria monocytogenes* en alimentos: ¿son todos los aislamientos igual de virulentos? *Revista Argentina de Microbiología*, 38(4), 224–234.
- Marzocca, M. A., Marucci, P. L., Sica, M. G., & Alvarez, E. E. (2004). Detección de *Listeria monocytogenes* informe breve. *Revista Argentina de Microbiología*, 36, 179–181.
- Ministerio de Salud de Chile. (2009). Ministerio de salud división de políticas públicas saludables y promoción departamento de alimentos y nutrición propuesta de criterios microbiológicos para *Listeria monocytogenes*. https://ainchile.cl/LISTERIA_CHILE.pdf
- Montero, D., Boderó, M., Riveros, G., Lapierre, L., Gaggero, A., Vidal, R. M., & Vidal, M. (2015). Molecular epidemiology and genetic diversity of *Listeria monocytogenes* isolates from a wide variety of ready-to-eat foods and their relationship to clinical strains from listeriosis outbreaks in Chile. *Frontiers in Microbiology*, 6(APR). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00384>

- Murphy, N. M., McLauchlin, J., Ohai, C., & Grant, K. A. (2007). Construction and evaluation of a microbiological positive process internal control for PCR-based examination of food samples for *Listeria monocytogenes* and *Salmonella enterica*. *International Journal of Food Microbiology*, *120*(1–2), 110–119. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2007.06.006>
- Orsi, R. H., Bakker, H. C. den, & Wiedmann, M. (2011). *Listeria monocytogenes* lineages: Genomics, evolution, ecology, and phenotypic characteristics. *International Journal of Medical Microbiology*, *301*(2), 79–96. <https://doi.org/10.1016/J.IJMM.2010.05.002>
- Osek, J., Lachtara, B., & Wieczorek, K. (2022). *Listeria monocytogenes* - How this pathogen survives in food-production environments? *Frontiers in microbiology*, *13*, 866462. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.866462>
- Palacios, A., Otto, M., Flaherty, E., Boyle, M. M., Malec, L., Holloman, K., Low, M., Wellman, A., Newhart, C., Gollarza, L., Weeks, T., Muyombwe, A., Lozinak, K., Kafka, E., O'Halloran, D., Rozza, T., Nicholas, D., Ivory, S., Kreil, K., Huffman, J., ... Conrad, A. (2022). Multistate Outbreak of *Listeria monocytogenes* Infections Linked to Fresh, Soft Hispanic-Style Cheese - United States, 2021. *MMWR. Morbidity and mortality weekly report*, *71*(21), 709–712. <https://doi.org/10.15585/mmwr.mm7121a3>
- Palomino-Camargo, C., & González-Muñoz, Y. (2014). Técnicas moleculares para la detección e identificación de patógenos en alimentos: ventajas y limitaciones. *Rev Peru Med Exp Salud Publica*, *31*(3), 535–546.
- Pinto, B., & Reali, D. (1996). Prevalence of *Listeria monocytogenes* and other listerias in Italian-made soft cheeses. *Zentralblatt fur Hygiene und Umweltmedizin = International journal of hygiene and environmental medicine*, *199*(1), 60–68.
- Radoshevich & Cossart. (2018). *Listeria monocytogenes*: towards a complete picture of its physiology and pathogenesis. *Nature Reviews. Microbiology*, *16*(1), 32–46.
- Rajkovic, A., & Moulalij, B. (2012). Detection of *Clostridium botulinum* neurotoxins A and B in milk by ELISA and immuno-PCR at higher sensitivity than mouse bio-assay. *Food Anal. Methods* *5*, 319–326. <https://doi.org/10.1007/s12161-011-9300-7>
- Ravindhiran, R., Sivarajan, K., Sekar, J. N., Murugesan, R., & Dhandapani, K. (2023). *Listeria monocytogenes* an Emerging Pathogen: a Comprehensive Overview on

- Listeriosis, Virulence Determinants, Detection, and Anti-Listerial Interventions. *Microbial Ecology*, 86(4), 2231–2251. <https://doi.org/10.1007/s00248-023-02269-9>
- Ribeiro, A. C., Almeida, F. A., Medeiros, M. M., Miranda, B. R., Pinto, U. M., & Alves, V. F. (2023). *Listeria monocytogenes*: An Inconvenient Hurdle for the Dairy Industry. *Dairy*, 4(2), 316-344. <https://doi.org/10.3390/dairy4020022>
- Roberts, T. A., Baird-Parker, A. C., & Tompkin, R. B. (1996). Microorganisms in Foods 5. Characteristics of Microbial Pathogens. *Blackie London*, 141–182.
- Sauders, B. D., & Wiedmann, M. (2007). Ecology of *Listeria* Species and *L. monocytogenes* in the Natural Environment. In book: *Listeria, Listeriosis, and Food Safety*, Third Edition. 10.1201/9781420015188.ch2.
- Schöbitz, R., Ciampi, L., & Nahuelquin, Y. (2009). *Listeria monocytogenes* un peligro latente para la industria alimentaria. *Agro Sur*, 37(1), 1–8. <https://doi.org/10.4206/agrosur.2009.v37n1-01>
- Smith, A. M., Tau, N. P., Smouse, S. L., Allam, M., Ismail, A., Ramalwa, N. R., Disenyeng, B., Ngomane, M., & Thomas, J. (2019). Outbreak of *Listeria monocytogenes* in South Africa, 2017-2018: Laboratory Activities and Experiences Associated with Whole-Genome Sequencing Analysis of Isolates. *Foodborne Pathogens and Disease*, 16(7), 524–530. <https://doi.org/10.1089/fpd.2018.2586>
- Thomas, J., Govender, N., McCarthy, K. M., Erasmus, L. K., Doyle, T. J., Allam, M., Ismail, A., Ramalwa, N., Sekwadi, P., Ntshoe, G., Shonhiwa, A., Essel, V., Tau, N., Smouse, S., Ngomane, H. M., Disenyeng, B., Page, N. A., Govender, N. P., Duse, A. G., ... Blumberg, L. H. (2020). Outbreak of Listeriosis in South Africa Associated with Processed Meat. *New England Journal of Medicine*, 382(7), 632–643. <https://doi.org/10.1056/nejmoa1907462>
- Ward, T. J., Gorski, L., Borucki, M. K., Mandrell, R. E., Hutchins, J., & Pupedis, K. (2004). Intraspecific phylogeny and lineage group identification based on the *prfA* virulence gene cluster of *Listeria monocytogenes*. *Journal of Bacteriology*, 186(15), 4994–5002. <https://doi.org/10.1128/JB.186.15.4994-5002.2004>
- Woodruff A. (2009, 31 de agosto). Listeriosis strikes Chile again, claims nine victims. *MercoPress*. <https://en.mercopress.com/2009/08/31/listeriosis-strikes-chile-again-claims-nine-victims>