



# Utilidad del tipado molecular en la caracterización de cepas de *Listeria monocytogenes* aisladas en una industria cárnica

*Se presenta un estudio en el que se recoge información sobre los serotipos y subtipos moleculares de L. monocytogenes aislados en muestras de una industria cárnica para determinar posibles patrones de persistencia.*

**B. Rubio\*, L. Blanco, B. Martínez**

Estación Tecnológica de la Carne.  
Instituto Tecnológico Agrario de Castilla y León.  
C /Filiberto Villalobos, 5  
37770 Guijuelo, Salamanca  
España  
E-mail: rubherbe@itacyl.es

## Introducción

*Listeria monocytogenes* es un microorganismo patógeno ubicuo en el ambiente, resistente a factores ambientales como las bajas temperaturas y los medios salinos, lo que favorece su presencia en bajas concentraciones en muchos alimentos, entre los que se incluyen los productos cárnicos listos para el consumo, como los embutidos y jamones.

*L. monocytogenes* está incluida como microorganismo prioritario en los planes de análisis de peligros y puntos de control críticos (APPCC) llevados a cabo en las industrias alimentarias. Sin embargo, las características de supervivencia y diseminación que caracterizan a esta bacteria dificultan su control en

las plantas de procesado. Este hecho supone un problema para las empresas que se agrava cuando, además, estas destinan parte de su producción a mercados donde los criterios microbiológicos para este microorganismo son más estrictos que el establecido en la Unión Europea (nivel máximo de 100 UFC/g durante la vida útil del producto, Reglamento CE nº 2073/2005); este es el caso de Estados Unidos, cuyo criterio de seguridad alimentaria para este patógeno es ausencia en 25 g. Para estos mercados, *L. monocytogenes* figura de forma prioritaria en las solicitudes de autorización de los establecimientos para exportar a terceros países, en los controles que realizan estos tanto en las auditorías que estos países llevan a cabo a los establecimientos españoles *in situ* como en los controles que realizan en destino.

De forma general, los controles que los operadores alimentarios realizan se reducen a la detección e identificación de *L. monocytogenes* en muestras tomadas tanto en ambiente como en producto. Estas analíticas resultan insuficientes, ya que los resultados positivos únicamente permiten conocer la presencia del microorganismo y no permiten diferenciar las cepas presentes en las diferentes muestras, aspecto necesario por tratarse de una bacteria ampliamente distribuida en el ambiente.

Para *L. monocytogenes* se han descrito hasta 13 serotipos en función de sus antígenos celular (O) y flagelar (H) y se ha observado que determinadas serovariedades están presentes en el 89 - 96 % de los casos de listeriosis humanas, lo que indica que algunas cepas son más aptas que otras para causar enfermedad (Álvarez Gurrea, 2015), de ahí la importancia de su diferenciación. La diferenciación de cepas es un instrumento habitual en los estudios epidemiológicos, siendo el estudio de serotipos el primer nivel de diferenciación. Sin embargo, el serotipado clásico mediante técnicas inmunológicas que establece para *L. monocytogenes* los serotipos 1/2a; 1/2b; 1/2c; 3a; 3b; 3c; 4a; 4b; 4c; 4d; 4e; 4ab y 7, tiene una capacidad de discriminación bastante pequeña y además determinadas cepas no son serotipables. Debido a estas limitaciones, como alternativa se han desarrollado protocolos de PCR multiplex que permiten la identificación de los principales grupos de serotipos de *L. monocytogenes* gracias al empleo de una combinación de múltiples cebadores que amplifican fragmentos de genes específicos de los diferentes linajes y serotipos (Borucki y Call 2003, Doumith y col. 2004

TABLA 1

**Porcentaje de cepas de *L. monocytogenes* que pertenecían a cada uno de los serogrupos determinados en función de la matriz de donde fueron aisladas**

Matriz	1/2a	1/2b	1/2c	4b
Jamón	57,9%	80,0%	---	---
Chorizo	21,0%	---	41,2%	---
Salchichón	5,3%	---	50,0%	---
Otros	15,8%	20,0%	8,8%	100,0%

y 2005) y pueden considerarse como una alternativa al análisis convencional de serotipos.

Adicionalmente, la aplicación de métodos moleculares al estudio de los subtipos de esta especie ha mejorado notablemente la caracterización de *L. monocytogenes* permitiendo diferenciar clones además de cepas. Entre estos métodos la técnica de análisis de múltiples regiones de número variable de repeticiones en tándem, que se designa como MLVA (*Multiple-locus variable-number tandem repeat analysis*) es una técnica novedosa, sencilla y flexible que permite el tipado de alta resolución de bacterias y que aporta información significativa sobre relaciones genéticas y su evolución bacteriana. La utilización de esta técnica para el estudio de los subtipos puede además ayudar a detectar rutas de transmisión a través de las cuales este patógeno llega a los productos finales en las plantas de procesado, lo que la convierte en una herramienta muy valiosa para prevenir brotes epidémicos mediante el control de las contaminaciones producidas durante la producción y distribución de alimentos.

Teniendo en cuenta lo anteriormente expuesto, el objetivo del presente estudio fue recabar la máxima información posible de la frecuencia y distribución de los serotipos y subtipos moleculares de *L. monocytogenes* aislados de muestras positivas provenientes de diferentes productos elaborados por una empresa cárnica, analizadas entre los años 2012 y el 2019 y determinar posibles patrones de persistencia.

## Material y métodos

### Material biológico

Para la realización del presente estudio se han utilizado 59 cepas de *L. monocytogenes* procedentes de muestras de diferentes productos cárnicos, principalmente, que habían sido enviadas al laboratorio

de microbiología de la Estación Tecnológica de la Carne (ETC) por una empresa, desde el año 2012 hasta el 2019, para llevar a cabo el análisis de detección de *L. monocytogenes* y que resultaron positivas en dicha determinación. Tras la confirmación del resultado positivo, el laboratorio aisló las cepas y tras realizarles diferentes pruebas bioquímicas y comprobar su pureza, las conservó en crioviales, en congelación, hasta su uso. Cuando fue necesario, los cultivos puros fueron recuperados en agar BHI (Brain Heart Infusion agar, Scharlau, Barcelona, España) mediante incubación durante 24 horas a 37°C.

---

La utilización de la técnica MLVA permite detectar rutas de transmisión a través de las cuales *L. monocytogenes* llega a los productos finales en las plantas de procesado

---

### Extracción de ADN

Para llevar a cabo la extracción de ADN de las cepas, se inoculó en caldo BHI (Brain Heart Infusion, broth, Scharlau) una colonia procedente de un cultivo fresco crecido en agar BHI, por cepa. El inóculo se mantuvo durante 18-24 h en un baño a 37 °C en agitación y, transcurrido este tiempo, se obtuvo un pellet bacteriano mediante centrifugación de 1,5 ml de inóculo durante 2 minutos a 12.000-16.000 × g y eliminación del medio de cultivo. La extracción de ADN se realizó utilizando el kit GenElute™ Bacterial Genomic DNA y siguiendo el protocolo proporcionado por el fabricante para bacterias Gram positivas. Una vez extraído el ADN, se determinó la calidad, la integridad y la concentración del mismo, tras lo cual se conservó en congelación hasta su uso.

### Identificación del grupo de serotipo mediante PCR multiplex

El serotipado molecular de los 59 aislados de *L. monocytogenes* se llevó a cabo mediante una reacción de PCR multiplex que separa los principales serotipos de *L. monocytogenes* (1/2a, 1/2b, 1/2c y 4b) en cuatro grupos de serotipos. Para llevar a cabo la reacción de PCR se utilizaron los 5 pares de pri-

mers y el protocolo propuesto por Doumith y col. (2004).

Tras la PCR multiplex y para la visualización de los fragmentos amplificados se utilizó el equipo de electroforesis capilar avanzado QIAxcel (QIAxcel DNA Screening Kit, Qiagen®, Alemania) con el kit de alta resolución (High Resolution Kit QIAGEN), el método OM500 y el marcador de alineamiento QX DNA 15bp-3kb (Qiagen). Además, se incluyó el marcador molecular de tamaño QX DNA 100bp-2.5 kb (Qiagen) para obtener el tamaño de cada producto amplificado. Los tamaños fueron calculados mediante el programa ScreenGel QIaxcel v1.6.0 QIAGEN, y en función de la presencia y del tamaño de los productos amplificados para cada muestra se determinó el grupo de serotipo de cada cepa. Como control se incluyeron las siguientes cepas de referencia de *L. monocytogenes*: S2 (serotipo 1/2a), S4 (serotipo 1/2b) y S12 (serotipo 1/2c) cepas suministradas por el Departamento de Tecnología de los Alimentos del INIA y caracterizadas por Ortiz y col. (2010) y la cepa CECT935 (serotipo 4b) de la Colección Española de Cultivos Tipo.

### Subtipado molecular: Identificación del Número Variable de Repeticiones en Tándem (MLVA)

La técnica MLVA fue realizada utilizando los 8 pares de primers propuestos por Sperry y col. (2008) y siguiendo el protocolo propuesto por Martín y col (2018) en el que se incluyen 3 reacciones de PCR multiplex: 1) PCR1 con los primers para la amplificación de los *loci* Lm-3, Lm-23 and Lm-32; 2) PCR2 con los primers para los *loci* Lm-11, Lm-8 y Lm-15 y 3) PCR3 con los primers para los *loci* Lm-10 y Lm-2.

Para la visualización de los fragmentos amplificados obtenidos en las diferentes PCR multiplex se utilizó el equipo de electroforesis capilar avanzado QIAxcel (QIAxcel DNA Screening Kit, Qiagen®, Alemania) con el kit de alta resolución (High Resolution Kit QIAGEN), el método OM500 y el marcador de alineamiento QX DNA 15-600bp (Qiagen). Además, se incluyó el marcador de tamaño QX DNA 25-500bp (Qiagen) para obtener el tamaño de cada producto de la amplificación. El tamaño de cada producto fue calculado mediante el programa ScreenGel QIaxcel v1.6.0 QIAGEN y para comprobar la reproducibilidad de las reacciones de PCR múltiple de la técnica MLVA se incluyeron en cada ronda de amplificación las cepas de *L. monocytogenes*: S2 (serotipo 1/2a),

S4 (serotipo 1/2b) y S12 (serotipo 1/2c) cepas suministradas por el Departamento de Tecnología de los Alimentos del INIA y caracterizadas por Ortiz y col. (2010) y la cepa CECT935 (serotipo 4b) de la Colección Española de Cultivos Tipo.

El cálculo del número de repeticiones en tándem de cada *locus*, se determinó teniendo en cuenta además del tamaño del amplificado por PCR, el tamaño de las regiones flanqueantes y el tamaño de la secuencia que se repetía. La agrupación de los 8 números obtenidos del cálculo del número de repeticiones en tándem de cada *locus* para cada cepa permitió obtener el patrón MLVA específico de cepa. Finalmente, para establecer existencia de proximidad evolutiva entre las diferentes cepas de *L. monocytogenes* analizadas, la comparación de los patrones MLVA obtenidos se realizó con el software Past4.04, mediante la creación de un dendograma que agrupó los aislados según su similitud.

## Resultados y discusión

En los resultados obtenidos tras la determinación del serogrupo de las cepas de *L. monocytogenes* se observó la presencia de los cuatro serogrupos, siendo el que incluye a la cepa 1/2c el mayoritario (34 cepas), seguido del que incluye las cepas 1/2a (19 cepas) y del que incluye las cepas 1/2b (5 cepas). El minoritario fue el serogrupo que incluye las cepas 4b. Este comportamiento se debe a que la mayoría de las serovariedades y especialmente las 1/2a, 1/2b y 1/2c tienen la capacidad de adherirse a las superficies de equipos, utensilios y suelos de las industrias alimentarias formando biofilms que incrementan su resistencia a las condiciones adversas y a los sistemas de limpieza y desinfección, lo que facilita que puedan llegar a materias primas y a los productos elaborados.

Teniendo en cuenta la matriz de procedencia de las cepas, como se muestra en la **tabla 1**, todos los



## EVITA LA CONDENSACIÓN. ARMARIOS PROTECTORES DE EQUIPOS INFORMÁTICOS.

Insensible a la humedad y totalmente impermeable.  
Resistente a impactos, vibraciones y rayos UVA.

LÍNEAS COMPLETAS PARA MATADEROS, SALAS DE DESPIECE Y TRIPERÍAS



**MG** MECÁNICAS  
GARROTXA

Diseño  
Fabricación  
Flexibilidad  
Adaptación,  
Servicio post-venta  
Stock permanente de piezas claves



TABLA 2

**Número de cepas por serogrupo y matriz de donde fueron aisladas en función del año en que se analizó la muestra**

Matriz	Serotipo	2012	2013	2015	2016	2017	2018	2019
Jamón	1/2a	---	2	---	---	---	5	4
	1/2b	---	---	---	---	1	1	2
Chorizo	1/2a	2	---	1	---	---	1	---
	1/2c	---	---	3	---	8	---	3
Salchichón	1/2a	---	---	1	---	---	---	---
	1/2c	2	---	2	4	2	5	2
Otros	1/2a	---	2	1	---	---	---	---
	1/2b	---	---	1	---	---	---	---
	1/2c	---	---	1	2	---	---	---
	4b	---	1	---	---	---	---	---

serogrupos estuvieron presentes en el grupo denominado otros, el cual incluye productos como fuet, morcilla, lomito e incluso tripas naturales utilizadas en la elaboración de embutidos. También puede observarse cómo el serogrupo 4b únicamente fue encontrado en estas matrices, en concreto, en una cepa aislada de una tripa natural. En cuanto al resto de serogrupos, el serogrupo 1/2a fue localizado en cepas que habían sido aisladas de todos los tipos de productos analizados, aunque de forma mayoritaria en

jamón. También, el serogrupo 1/2b fue aislado en jamón en un 80% y en ningún caso se encontró este serogrupo en muestras de embutidos. Al contrario, el serogrupo 1/2c se encontró en cepas aisladas de embutidos, principalmente y no se encontró en ninguna muestra de jamón.

De acuerdo a la evolución a lo largo del tiempo del número de cepas pertenecientes a cada serogrupo en función del tipo de matriz de donde fueron aisladas (**tabla 2**), se observa que, en jamón, el serogrupo 1/2a, además

de estar presente en los dos últimos años de análisis también se había aislado en muestras de años anteriores. Sin embargo, el serogrupo 1/2b se aisló por primera vez en 2017, y en 2018 y 2019 continuó apareciendo en las muestras de jamón. En chorizo y salchichón, el serogrupo 1/2a se aisló en muestras de forma aleatoria en el tiempo, mientras que el serogrupo 1/2c aparece de forma casi continua, sobre todo en salchichón, donde prácticamente se ha encontrado a lo largo de los 7 años de estudio. Dentro del grupo de otros productos, aunque se aislaron todos los serogrupos de diferentes muestras, no se pudo apreciar ninguna tendencia a lo largo del tiempo, posiblemente debido a que el número de muestras analizadas pertenecientes a este grupo fue menor que el número de muestras analizadas de los otros productos cárnicos.

Para poder establecer relaciones, entre las diferentes cepas aisladas a lo largo del tiempo, tanto para un mismo producto como entre productos, se llevó a cabo el subtipado de las cepas mediante la determinación MLVA y los 18 perfiles obtenidos son los que se muestran en la **tabla 3**.

Como puede observarse, para el serogrupo 1/2a se obtuvieron 10 perfiles diferentes, aunque el perfil 14-3-3-4-1-4-NA-15 fue el perfil mayoritario y para el serogrupo 1/2c se obtuvieron 4 perfiles, aunque claramente destacó el perfil 17-3-3-4-6-2-NA-14. Ninguno de los 3 perfiles obtenidos para el serogrupo 1/2b fue predominante y, lógicamente, para el serogrupo 4b únicamente se definió un único perfil. En el estudio realizado por Martín y col (2014) también encontraron que los diferentes serotipos presentan una

TABLA 3

**Perfiles MLVA obtenidos para las cepas analizadas en función del serogrupo**

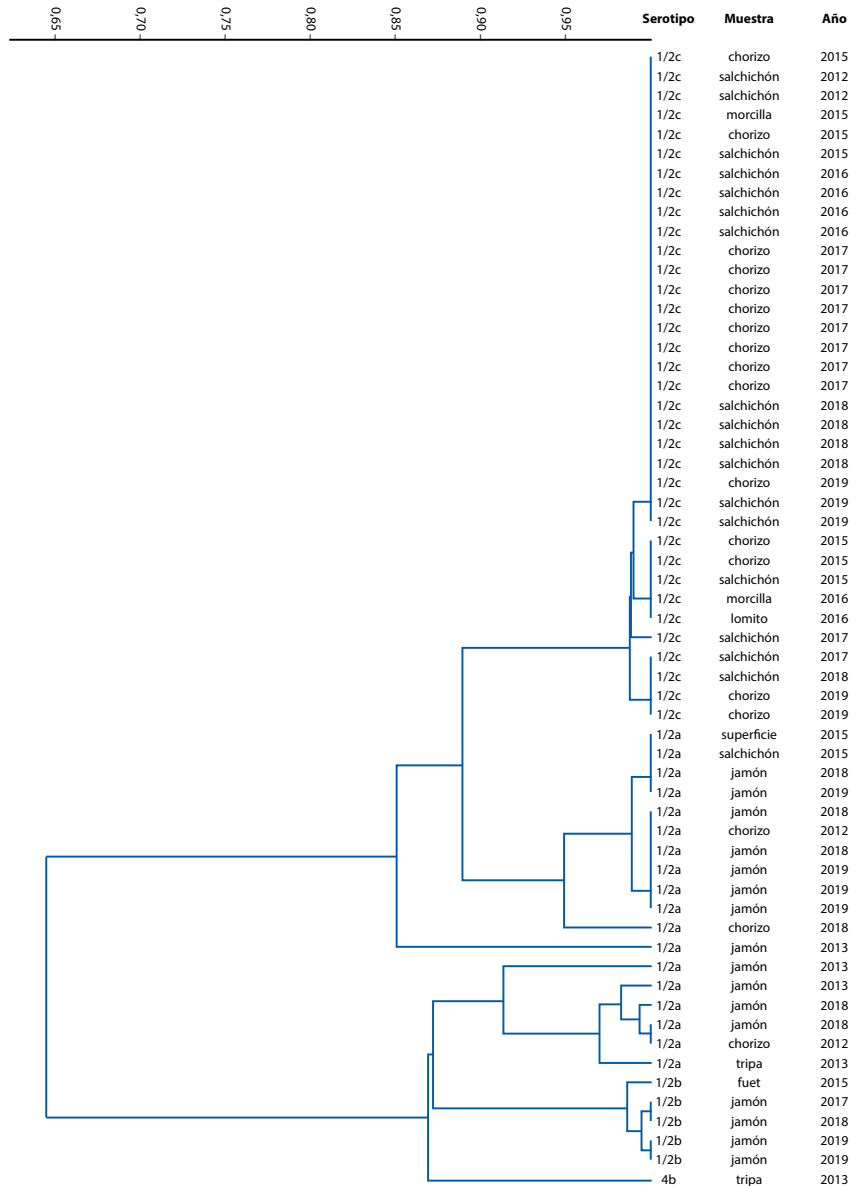
Serogrupo	Nº perfil MLVA	Perfil MLVA	Nº cepas
1/2a	1	14-3-3-4-1-4-NA-15	6
	2	14-3-3-4-2-4-NA-16	4
	3	15-3-3-NA-5-1-32-14	1
	4	15-3-3-4-1-2-NA-14	1
	5	16-3-3-NA-4-2-33-14	2
	6	17-3-3-NA-4-2-33-14	1
	7	17-3-3-NA-5-2-34-14	1
	8	17-3-3-4-6-2-NA-14	1
	9	19-3-3-NA-3-2-39-11	1
	10	19-3-3-NA-3-2-NA-11	1
1/2b	11	14-3-3-5-6-5-35-18	1
	12	14-3-3-5-9-5-35-18	2
	13	14-3-3-5-8-5-35-18	2
1/2c	14	16-3-3-4-6-2-NA-14	4
	15	17-3-3-4-6-2-NA-14	24
	16	17-3-3-4-7-2-NA-14	1
	17	17-3-4-4-6-2-NA-14	5
4b	18	11-3-3-NA-1-3-40-18	1

diversidad variable y que el serotipo 1/2a es el que presenta mayor diversidad. El hecho de haber encontrado diferentes cepas que comparten el mismo perfil nos indica la posible presencia de cepas predominantes y/o persistentes. Para poder corroborarlo, en la **figura 1** se muestra el dendograma obtenido al comparar los patrones MLVA obtenidos para las cepas analizadas.

En la figura puede apreciarse dos grandes grupos diferentes. Un grupo mayoritario que incluye todas las cepas del serogrupo 1/2c y parte de las cepas del serogrupo 1/2a y, por otro lado, el resto de cepas 1/2a y las 1/2b y 4b. El grupo mayoritario a su vez se subdivide en 3 agrupaciones. Por un lado, todas las cepas 1/2c que son muy similares están asociadas a productos que implican mayor manipulación durante su elaboración y además se incluye una cepa predominante y persistente ya que aparece durante los 7 años en los que se ha analizado producto. Esto indica que esta cepa está ampliamente distribuida en la empresa en las zonas donde se elaboran los embutidos y que, a día de hoy, los protocolos de limpieza que se han aplicado no han sido lo suficientemente efectivos para acabar con esta cepa. Posiblemente, esta cepa presente una elevada capacidad de formación de biofilms, estrategia adaptativa de los microorganismos que les permite incrementar sus posibilidades de supervivencia otorgándoles resistencia y dificultando su eliminación mediante las tareas de limpieza y desinfección. Además del subgrupo de las cepas 1/2c, los otros dos subgrupos están formados por cepas 1/2a, con una cepa diferente del resto que fue aislada de jamón en el 2013 y con 11 cepas muy semejantes que inicialmente se asociaban a chorizo y salchichón (2012 y 2015) pero que, en la actualidad, debido a algún tipo de contaminación cruzada, ha colonizado las zonas donde se elaboran

FIGURA 1

**Dendograma de los 59 aislados obtenidos de diferentes productos cárnicos a lo largo de 7 años (2012-2019)**



Cada cepa ha sido identificada teniendo en cuenta el serogrupo, la muestra de procedencia y el año en el que se aisló.

y acondicionan las salazones y durante los dos últimos años ha permanecido en dichas zonas, resistiendo a cualquier tipo de tratamiento y contaminando los productos finales. Dentro del otro grupo en el que se encuentran otras cepas del serotipo 1/2a diferentes, puede observarse que mayoritariamente se asocian a jamón, pero de nuevo se encuentra una cepa que se aisló en 2012 en chorizo y que es similar a la aislada de

jamón en 2018. Respecto a la cepa 4b que fue aislada de una tripa natural, puede concluirse que fue una cepa puntual y que fue eliminada a través de algún tratamiento que la empresa aplicó en su momento. Por último, las cepas 1/2b asociadas a jamón presentan una gran similitud entre ellas y de nuevo debe considerarse la presencia de cepas persistentes, ya que aparecen en muestras de 2017, 2018 y 2019, lo que indica que se trata de cepas afincadas en la planta, que podrían haberse adaptado a los tratamientos de limpieza y desinfección, siendo capaces de sobrevivir en el ambiente e incluso multiplicarse allí. A veces, la compleja estructura de las líneas de procesado y/o el mal diseño de la maquinaria impiden con frecuencia que los tratamientos de limpieza y desinfección alcancen algunas zonas contaminadas. Esto provoca la formación de nichos o reservorios en los que la bacteria, protegida contra los desinfectantes y en condiciones de humedad y nutrientes adecuadas, puede sobrevivir y multiplicarse (Ortiz y col, 2016).

## Conclusión

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos en este estudio, se ha demostrado que la caracterización de las cepas de *Listeria monocytogenes* aisladas de muestras positivas de la industria cárnica mediante tipado y subtipado constituye una herramienta de información muy útil a la hora de llevar a cabo actuaciones necesarias para el control de *L. monocytogenes*. El conocimiento de las posibles fuentes de contaminación y de las cepas que colonizan los diferentes ambientes pueden ayudar a tomar decisiones más precisas, tales como seleccionar protocolos de limpieza y desinfección más eficaces frente a determinadas cepas, fortalecer el sistema de verificación de la eficacia de las tareas de limpieza y desinfección de superficies críticas, modificar flujos de trabajo concretos o formar de manera específica a determinados trabajadores para concienciarlos de la importancia de la realización del trabajo de forma adecuada.

## Agradecimientos

Este estudio ha sido realizado dentro del proyecto IBERIC-SENSOTRACING cofinanciado con fondos FEADER (Fondo Europeo Agrícola de Desarrollo Rural).

## Bibliografía

- **Álvarez Gurrea, J.C.** (2015) Evolución de la contaminación de superficies durante los procesos productivos en pymes del sector cárnico. Tesis Doctoral. Departamento de Agricultura y Alimentación, Facultad de Ciencias y Tecnología, *Universidad de la Rioja*.
- **Borucki, M.K. y Call, D.R.** (2003) *Listeria monocytogenes* Serotype Identification by PCR. *Journal of Clinical Microbiology*, 41, 5537-5540.
- **Doumith, M., Buchrieser, C., Glaser, P., Jacquet, C., Martin, P.** (2004) Differentiation of the major *Listeria monocytogenes* serovars by multiplex PCR. *Journal of Clinical Microbiology*, 42(8):3819-22.
- **Doumith M., Jacquet C., Gerner-Smidt P., Graves L.M., Loncarevic S., Mathisen, T, Morvan, A., Salcedo, C., Torpdahl, M., Vázquez, J.A., Martin, P.** (2005) Multicenter validation of a multiplex PCR assay for differentiating the major *Listeria monocytogenes* serovars 1/2a, 1/2b, 1/2c, and 4b: toward an international standard. *Journal of Food Protection*, 68 (12):2648-2650.
- **Martín B., Garriga M., Yangüela J. y Aymerich, T.** (2014). *Listeria monocytogenes* en la industria cárnica. Identificación de la diversidad genética y fuentes de contaminación mediante técnicas moleculares. **eurocarne**, 228 (Julio-agosto): 64-69.
- **Martín, B., Bover-Cid, S., Aymerich, T.** (2018) MLVA subtyping of *Listeria monocytogenes* isolates from meat products and meat processing plants. *Food Research International*, 106: 225-232.
- **Ortiz S., López-Alonso V. y Martínez-Suárez J.V.** (2016). Control de *Listeria monocytogenes* en la industria: el problema de la persistencia ambiental y su relación con la resistencia a desinfectantes. **eurocarne**, 243 (Enero-febrero): 48-56.
- **Ortiz S., López V., Villatoro D., López P., Dávila J.C., Martínez-Suárez J.V.** (2010). A 3-year surveillance of the genetic diversity and persistence of *Listeria monocytogenes* in an Iberian pig slaughterhouse and processing plant. *Foodborne Pathogens and Disease*, 7(10): 1177-1184.
- **Reglamento (CE) n° 2073/2005** de la Comisión, de 15 de noviembre de 2005, relativo a los criterios microbiológicos aplicables a los productos alimenticios. <http://data.europa.eu/eli/reg/2005/2073/oj>.
- **Sperry K.E., Kathariou S., Edwards J.S., Wolf L.A.** (2008) Multiple-locus variable-number tandem-repeat analysis as a tool for subtyping *Listeria monocytogenes* strains. *Journal of Clinical Microbiology*, 46(4): 1435-1450. **e**