



**TESIS DOCTORAL**

**EFECTOS DE TRATAMIENTOS NO TÉRMICOS Y DE  
BIOCONSERVACIÓN EN JAMÓN CURADO  
LONCHEADO SOBRE LA EXPRESIÓN GÉNICA DE  
*Listeria monocytogenes***

**Alberto Alía Muñoz**

**Programa de Doctorado en Ciencia de los Alimentos**

Conformidad de los Directores:

Director:

Codirector:

Codirector:

Fdo. Juan José Córdoba Ramos Fdo. María J. Andrade Gracia Fdo. Alicia Rodríguez Jiménez





**INSTITUTO UNIVERSITARIO DE INVESTIGACIÓN DE LA CARNE Y PRODUCTOS CÁRNICOS**

**FACULTAD DE VETERINARIA**

**HIGIENE Y SEGURIDAD ALIMENTARIA**

Avda. de Las Ciencias, s/n  
CP-10003-Cáceres (España)  
Teléfono: + 34 927 257125  
Fax: + 34 927 257110  
<http://veterinaria.unex.es>

JUAN JOSÉ CÓRDOBA RAMOS, CATEDRÁTICO DE UNIVERSIDAD DEL ÁREA DE NUTRICIÓN Y BROMATOLOGÍA DEL DEPARTAMENTO DE PRODUCCIÓN ANIMAL Y CIENCIA DE LOS ALIMENTOS DE LA UNIVERSIDAD DE EXTREMADURA,

INFORMA:

Que el trabajo presentado por D. Alberto Alía Muñoz titulado “Efectos de tratamientos no térmicos y de bioconservación en jamón curado loncheado sobre la expresión génica de *Listeria monocytogenes*”, ha sido realizado bajo mi dirección en el departamento de Producción Animal y Ciencia de los Alimentos de esta Universidad. Hallándose concluido y reuniendo a mi entender las condiciones necesarias, autorizo su presentación ante el tribunal que ha de juzgarla.

Y para que así conste firmo el presente informe en Cáceres, a 04 de octubre de 2019.

Fdo: Juan José Córdoba Ramos





**INSTITUTO UNIVERSITARIO DE INVESTIGACIÓN DE LA CARNE Y PRODUCTOS CÁRNICOS**

**FACULTAD DE VETERINARIA**

**HIGIENE Y SEGURIDAD ALIMENTARIA**

Avda. de Las Ciencias, s/n  
CP-10003-Cáceres (España)  
Teléfono: + 34 927 257125  
Fax: + 34 927 257110  
<http://veterinaria.unex.es>

MARÍA JESÚS ANDRADE GRACIA, PROFESORA CONTRATADO DOCTOR DEL ÁREA DE NUTRICIÓN Y BROMATOLOGÍA DEL DEPARTAMENTO DE PRODUCCIÓN ANIMAL Y CIENCIA DE LOS ALIMENTOS DE LA UNIVERSIDAD DE EXTREMADURA,

INFORMA:

Que el trabajo presentado por D. Alberto Alía Muñoz titulado “Efectos de tratamientos no térmicos y de bioconservación en jamón curado loncheado sobre la expresión génica de *Listeria monocytogenes*”, ha sido realizado bajo mi dirección en el departamento de Producción Animal y Ciencia de los Alimentos de esta Universidad. Hallándose concluido y reuniendo a mi entender las condiciones necesarias, autorizo su presentación ante el tribunal que ha de juzgarla.

Y para que así conste firmo el presente informe en Cáceres, a 04 de octubre de 2019.

Fdo: María Jesús Andrade Gracia





**INSTITUTO UNIVERSITARIO DE INVESTIGACIÓN DE LA CARNE Y PRODUCTOS CÁRNICOS**

**FACULTAD DE VETERINARIA**

**HIGIENE Y SEGURIDAD ALIMENTARIA**

Avda. de Las Ciencias, s/n  
CP-10003-Cáceres (España)  
Teléfono: + 34 927 257125  
Fax: + 34 927 257110  
<http://veterinaria.unex.es>

ALICIA RODRÍGUEZ JIMÉNEZ, PROFESORA AYUDANTE DOCTOR DEL ÁREA DE NUTRICIÓN Y BROMATOLOGÍA DEL DEPARTAMENTO DE PRODUCCIÓN ANIMAL Y CIENCIA DE LOS ALIMENTOS DE LA UNIVERSIDAD DE EXTREMADURA,

INFORMA:

Que el trabajo presentado por D. Alberto Alía Muñoz titulado “Efectos de tratamientos no térmicos y de bioconservación en jamón curado loncheado sobre la expresión génica de *Listeria monocytogenes*”, ha sido realizado bajo mi dirección en el departamento de Producción Animal y Ciencia de los Alimentos de esta Universidad. Hallándose concluido y reuniendo a mi entender las condiciones necesarias, autorizo su presentación ante el tribunal que ha de juzgarla.

Y para que así conste firmo el presente informe en Cáceres, a 04 de octubre de 2019.

Fdo: Alicia Rodríguez Jiménez





## Agradecimientos

*Es de bien nacidos ser agradecidos...* y por esta misma razón, resulta necesario dedicar unas páginas de este trabajo para dar las gracias a todas las personas, que directa o indirectamente, han participado en la realización de esta Tesis Doctoral.

Agradezco a las entidades que han contribuido a la realización de esta Tesis Doctoral, a la Junta de Extremadura-dependiente de la Consejería de Economía e Infraestructura-, Fondo Social Europeo. “Una manera de hacer Europa” por la ayuda predoctoral concedida (PD16023). Del mismo modo agradecer al Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria (INIA) dependiente del Ministerio de Ciencia, Innovación y Universidades, a través de los proyectos RTA-2013-00070-C03-03 y RTA2017-00027-C03-03. A la Junta de Extremadura y al FEDER a través del proyecto IB16149 y las ayudas a Grupo GR15108 y GR18056 por la financiación parcial de actividades de esta Tesis Doctoral.

Gracias a mis directores, los Dres. Juan José Córdoba, María Jesús Andrade y Alicia Rodríguez, por la dedicación, entrega, esfuerzo y confianza depositada en mí para la realización de este trabajo. Sin ellos este trabajo no habría sido posible. Al Dr. Miguel Ángel Asensio, coordinador del Grupo de Investigación de Higiene y Seguridad Alimentaria por su disponibilidad constante para cualquier cosa que he necesitado. Al resto de integrantes del Grupo, las Dras. Mar Rodríguez y Elena Bermúdez por sus consejos y ayuda desinteresada. Al Dr. Félix Núñez, que a pesar de ser rival futbolístico, siempre ha sido de gran ayuda cuando lo he necesitado.

Gracias también a todos los integrantes del Grupo de Tecnología Alimentaria por la ayuda ofrecida en estos años y al Servicio de Innovación de Productos de Origen Animal (SIPA), al Dr. Antonio Silva y a su equipo por su apoyo en los servicios prestados. Gracias a Fernando Lobo por su infinita paciencia.

Gracias a Aida, Ángela y a la Dra. Margarita Medina del Grupo de Seguridad Microbiológica de Alimentos de INIA (Madrid), por abrirme las puertas de su laboratorio y hacerme sentir uno más durante la breve, pero intensa estancia realizada con ellos. Su aportación ha sido fundamental en esta Tesis Doctoral.

Gracias a Raul y a la Dra. Concepción Cabezas del Departamento de Nutrición, Bromatología y Tecnología de los Alimentos de la Facultad de Veterinaria, de la Universidad Complutense, con los que tuve la suerte de compartir unas semanas de trabajo en Cáceres.

Gracias a todos mis compañeros del Grupo de Higiene y Seguridad Alimentaria y Tecnología de los Alimentos, en especial a Patricia, Irene, Lourdes, Mariela, Eva, Elia, Juanjo, Alberto, Juan Carlos y Belén. Con algunos de ellos no solo hemos compartido la

jornada de trabajo, sino parte de nuestras vivencias diarias, nuestro día a día. Vuestra amistad también ha contribuido en mayor o menor medida en este trabajo. Siempre habéis sido un gran apoyo. Gracias a mi amigo y compañero Josué, a quien tanto admiro y tanto tengo que agradecer, que prefiero hacerlo cara a cara, con una cervecita y disfrutando de la *Champions*. No me olvido de mis antiguas compis, Belén, cuya intensas y prometedoras conversaciones sobre el futuro aun siguen resonando por estos pasillos; y Mariví, muy buena amiga y mejor persona, con quien comparto el gusto por la navegación y el diseño de eventos con un estilo único (banda sonora incluida).

Gracias a Alfredo, por prestarme su ayuda desinteresada y necesaria cuando lo he necesitado, a Librada por estar siempre ahí, tanto para echar una mano como para dar un consejo, y al profesor Luis Gómez por su amistad y esas largas conversaciones entre amigos.

Gracias a mi familia. En especial a mis padres y mi hermana, quienes han conseguido tallar poco a poco, año tras año, parte de lo que soy y que son un ejemplo para mí. Ellos me han enseñado que, en esta vida, las cosas se consiguen con trabajo y esfuerzo, y que todo esfuerzo tiene su recompensa. Lo mejor de todo, es que siempre han confiado en mi decisión, siempre he tenido la última palabra y me han apoyado en aquello que he elegido. Espero que estéis orgullosos de mí. Yo seguiré haciendo lo que me habéis enseñado, trabajar y esforzarme para conseguir mis propias metas.

Y a mi mujer, mi mejor regalo y la parte más importante de esta Tesis. Es todo aquello que no se investiga, que no se discute, que no se explica...todo eso que se necesita para ser feliz. Es la capacidad de mejorar un día malo (*¡¡junto con Tiber!!*), de entender tantas horas de trabajo y de confiar siempre en mí. Gracias por entenderme, por escucharme, por estar siempre a mi lado, y por ser el mejor apoyo en los buenos y malos momentos. Gracias incluso por hacer caso a mis charlas sobre *Listeria* y listeriosis, criticando las noticias de la famosa crisis de este verano, aun viendo lo pesado que me ponía (*jejeje*). Tu apoyo siempre es la mejor recompensa. Espero saber compensar todo lo que me das.

A todos, humildemente, gracias.

A mis padres,  
a mi hermana,  
a Fátima.



“Nos detuvimos en buscar monstruos  
debajo de la cama cuando nos dimos cuenta  
de que estaban dentro de nosotros” (Charles Darwin)



# ÍNDICE

---





<b>I. INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>1</b>
I.1. PELIGROS MICROBIOLÓGICOS EN ALIMENTOS MADURADOS LISTOS PARA EL CONSUMO.....	3
I.1.1. Peligros microbiológicos en jamón curado .....	3
I.1.2. Listeriosis .....	7
I.2. <i>Listeria monocytogenes</i> : CARACTERÍSTICAS GENERALES.....	9
I.2.1. Serotipos de <i>L. monocytogenes</i> : clasificación, distribución y relevancia.....	13
I.2.2. Condiciones ecológicas y persistencia .....	15
I.2.3. Criterios de seguridad alimentaria.....	19
I.3. MÉTODOS PARA LA DETECCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE <i>L. monocytogenes</i> .....	19
I.4. TRATAMIENTOS NO TÉRMICOS COMO MÉTODO DE CONTROL DE <i>L. monocytogenes</i> EN JAMÓN CURADO LONCHEADO.....	27
I.5. EVALUACIÓN DE LA VIABILIDAD DE <i>L. monocytogenes</i> EN JAMÓN CURADO TRAS LA APLICACIÓN DE TRATAMIENTOS NO TÉRMICOS .....	35
I.5.1. Genes implicados en la virulencia y respuesta al estrés de <i>L. monocytogenes</i> .	35
I.5.2. Evaluación de la expresión génica de <i>L. monocytogenes</i> mediante RT-qPCR .	39
I.5.2.1. Cuantificación absoluta.....	40
I.5.2.2. Cuantificación relativa .....	41
<b>II. OBJETIVOS .....</b>	<b>45</b>
<b>III. MATERIAL Y MÉTODOS .....</b>	<b>49</b>
III.1. MATERIAL .....	51
III.1.1. REACTIVOS QUÍMICOS .....	51
III.1.2. EQUIPOS.....	52
III.1.3. MEDIOS DE CULTIVO .....	57
III.1.3.1. Medios de cultivo de uso general.....	57
III.1.3.2. Medios de cultivo elaborados con carne y derivados cárnicos liofilizados.....	58
III.1.3.2.1. Proceso de liofilización .....	58
III.1.3.2.2. Elaboración y composición .....	58
III.1.4. TAMPONES.....	59
III.1.5. PROGRAMAS INFORMÁTICOS.....	60
III.1.6. MATERIAL BIOLÓGICO .....	60
III.2. MÉTODOS.....	63

III.2.1. DISEÑO EXPERIMENTAL .....	63
III.2.2. TOMA DE MUESTRAS PARA EL AISLAMIENTO DE <i>L. monocytogenes</i> .....	65
III.2.3. OPTIMIZACIÓN DE MÉTODOS MOLECULARES .....	67
III.2.3.1. Caracterización serotípica de <i>L. monocytogenes</i> mediante métodos de qPCR .....	67
III.2.3.1.1. Optimización del proceso de extracción de ADN .....	67
III.2.3.1.2. Diseño de cebadores y sondas .....	68
III.2.3.1.3. Optimización de las condiciones de la reacción.....	70
III.2.3.1.4. Sensibilidad del método de qPCR múltiple diseñado. Curvas estándar. ....	72
III.2.3.1.5. Especificidad de la reacción de qPCR múltiple mediante comparación con un método de PCR múltiple convencional .....	73
III.2.3.2. Métodos moleculares para el análisis de la expresión de genes de virulencia y de respuesta al estrés de <i>L. monocytogenes</i> en jamón curado loncheado. ....	74
III.2.3.2.1. Extracción de ARN de medios de cultivo y lonchas de jamón .....	74
III.2.3.2.2. Síntesis del ADNc .....	75
III.2.3.2.3. Evaluación de la sensibilidad de las reacciones de qPCR. Curvas estándar.....	75
III.2.3.2.4. Genes de virulencia y de respuesta al estrés de <i>L. monocytogenes</i> ...	75
III.2.3.2.5. Expresión absoluta: optimización de los métodos de RT-qPCR mediante la utilización de la tecnología TaqMan® .....	76
III.2.3.2.6. Expresión relativa: optimización de los métodos de RT-qPCR basados en la metodología SYBR™ Green .....	79
III.2.4. CARACTERIZACIÓN DE <i>L. monocytogenes</i> .....	80
III.2.4.1. Preparación de los bloques de agarosa.....	80
III.2.4.2. Lisis y lavado celular de los bloques de agarosa.....	81
III.2.4.3. Digestión de los bloques de agarosa con enzimas de restricción .....	81
III.2.4.4. Preparación del gel y condiciones de la electroforesis.....	82
III.2.4.5. Tinción del gel y análisis de perfiles .....	83
III.2.5. TRATAMIENTOS NO TÉRMICOS COMO MÉTODO DE CONTROL DE <i>L. monocytogenes</i> EN JAMÓN CURADO LONCHEADO.....	84
III.2.5.1. Preparación inicial de los inóculos y recuento de los microorganismos..	84

III. 2.5.2. Evaluación del efecto de la $a_w$ , NaCl y temperatura sobre el crecimiento y expresión génica de <i>L. monocytogenes</i> .....	85
III.2.5.2.1. Ensayos <i>in vitro</i> .....	85
III.2.5.2.2. Estudios de expresión génica absoluta de <i>L. monocytogenes</i> en medios de cultivo con distintos valores de $a_w$ , concentración de NaCl y temperatura ....	86
III. 2.5.3. Evaluación del efecto de la $a_w$ y la alta presión hidrostática (HPP) sobre la expresión génica de <i>L. monocytogenes</i> en lonchas de jamón curado.....	86
III.2.5.4. Evaluación del efecto de electrones acelerados la expresión génica de <i>L. monocytogenes</i> en lonchas de jamón curado .....	87
III.2.5.5. Evaluación de la actividad anti- <i>L. monocytogenes</i> de <i>D. hansenii</i> .....	88
III.2.5.5.1. Ensayos <i>in vitro</i> .....	88
III.2.5.5.2. Ensayos en lonchas de jamón curado .....	89
III.2.5.5.3. Estudios de expresión génica relativa de <i>L. monocytogenes</i> en lonchas de jamón curado sometida a tratamientos de biocontrol con <i>D. hansenii</i> .....	90
III. 2.5.5.4. Análisis sensorial de las lonchas de jamón curado inoculadas con <i>D. hansenii</i> .....	90
III.3. TRATAMIENTO ESTADÍSTICO.....	91
<b>IV. RESULTADOS.....</b>	<b>93</b>
IV. 1. DEVELOPMENT OF A MULTIPLEX REAL-TIME PCR TO DIFFERENTIATE THE FOUR MAJOR <i>Listeria monocytogenes</i> SEROTYPES IN ISOLATES FROM MEAT PROCESSING PLANTS .....	95
IV. 2. PREVALENCE AND CHARACTERIZATION OF <i>Listeria monocytogenes</i> IN DEBONING AND SLICING AREAS OF SPANISH DRY-CURED HAM PROCESSING.....	113
IV. 3. MOLECULAR MECHANISMS OF <i>Listeria</i> A STRESS RESPONSE.....	128
IV. 4. COMBINED EFFECT OF TEMPERATURE, WATER ACTIVITY AND SALT CONCENTRATION ON THE GROWTH AND GENE EXPRESSION OF <i>Listeria monocytogenes</i> IN A DRY-CURED HAM MODEL SYSTEM.....	149
IV. 5. EVALUATION OF THE EFFICACY OF <i>Debaryomyces hansenii</i> AS PROTECTIVE CULTURE FOR CONTROLLING <i>Listeria monocytogenes</i> IN SLICED DRY-CURED HAM. ....	159
<b>V. DISCUSIÓN .....</b>	<b>177</b>

V.1. CARACTERIZACIÓN DE LA CONTAMINACIÓN POR <i>L. monocytogenes</i> EN INDUSTRIAS LONCHEADORAS DE JAMÓN CURADO Y EN PRODUCTO LONCHEADO MEDIANTE MÉTODOS MOLECULARES .....	179
V.1.1. Desarrollo de un método de qPCR múltiple para la caracterización de <i>L. monocytogenes</i> .....	180
V.1.2. Evaluación de la prevalencia y de fuentes de contaminación de <i>L. monocytogenes</i> en zona de deshuesado y loncheado en industrias de jamón curado.....	183
V.2. EFECTO DE LAS CONDICIONES DEL PROCESADO DE JAMÓN CURADO Y DE LOS TRATAMIENTOS NO TÉRMICOS EN EL CRECIMIENTO Y EXPRESIÓN GÉNICA DE <i>L. monocytogenes</i> .....	188
V.2.1. Efecto de la $a_w$ , NaCl y temperatura de procesado sobre el crecimiento y expresión génica de <i>L. monocytogenes</i> .....	190
V.2.2. Efecto de la $a_w$ y tratamiento con altas presiones (HPP) sobre la expresión génica de <i>L. monocytogenes</i> .....	194
V.2.3. Efecto del tratamiento con electrones acelerados sobre la expresión génica de <i>L. monocytogenes</i> .....	196
V.2.4. Efecto de <i>D. hansenii</i> sobre el crecimiento y expresión génica de <i>L. monocytogenes</i> en lonchas de jamón curado. Efecto de los tratamientos de biocontrol sobre las características sensoriales del producto. ....	197
<b>VI. CONCLUSIONES</b> .....	<b>203</b>
<b>VII. BIBLIOGRAFÍA</b> .....	<b>207</b>
<b>VIII. RESUMEN</b> .....	<b>265</b>
<b>IX. ANEXOS</b> .....	<b>273</b>

# I. INTRODUCCIÓN

---



## I.1. PELIGROS MICROBIOLÓGICOS EN ALIMENTOS MADURADOS LISTOS PARA EL CONSUMO

En los últimos años, los hábitos de consumo han ido cambiando hacia una mayor utilización de productos alimenticios sin cocinado posterior o alimentos listos para el consumo (RTE, del inglés *ready to eat*; Jamali y Thong 2014). El Reglamento (CE) n° 2073/2005 los define como aquellos alimentos destinados por el productor o el fabricante al consumo humano directo sin necesidad de cocinado u otro tipo de transformación eficaz para eliminar o reducir a un nivel aceptable los microorganismos peligrosos. Por norma general, este tipo de productos van a ser consumidos crudos o mínimamente procesados, de tal manera que en caso de existir una contaminación posterior al tratamiento antimicrobiano y previo al envasado y bajo condiciones de almacenamiento que permitan el desarrollo del microorganismo patógeno, puede producirse un incremento del mismo hasta niveles significativos, lo cual aumenta a su vez el riesgo de infección (Buchanan y col., 2017).

Dentro del grupo de los alimentos RTE se encuentran los derivados cárnicos curado-madurados, entre los que están los embutidos curado-madurados (salchichón, chorizo y lomo madurado) y el jamón curado, siendo este último el más relevante de este grupo de productos cárnicos madurados.

### I.1.1. Peligros microbiológicos en jamón curado

Según la Norma de Calidad reguladora de los Derivados Cárnicos (Real Decreto 474/2014), el jamón curado es un producto elaborado con la extremidad posterior del cerdo que se ha sometido, con carácter general, a un proceso de salazón, acompañado eventualmente de adición de especias, condimentos y aditivos, lavado, reposo o postsalado, maduración y secado durante el tiempo suficiente para conferirle las características organolépticas propias y que constituye uno de los productos típicos de la gastronomía española. Durante el proceso de elaboración del jamón curado tienen lugar una serie de reacciones químicas y bioquímicas complejas reguladas principalmente por la humedad, temperatura, penetración de NaCl y tiempo de curado que van a ser las

responsables del color, textura, aroma y sabor característico del producto final (Figura I.1; Martín y col., 2006; Martín y col., 1998; Rodríguez y col., 1994).

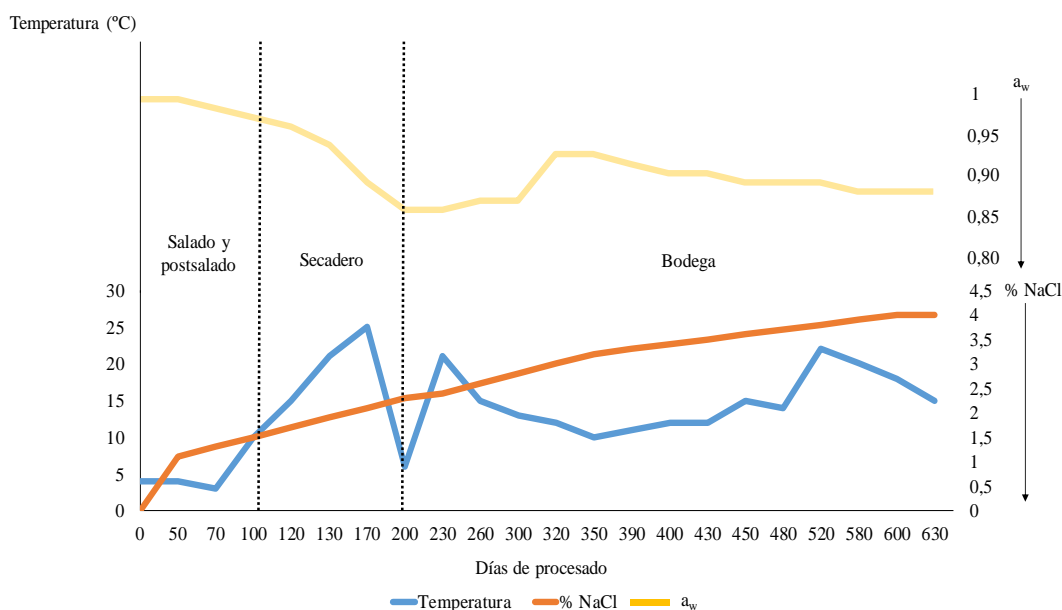


Figura I.1. Evolución de la temperatura, concentración de (%) NaCl y actividad de agua ( $a_w$ ) durante el procesado de elaboración del jamón curado. Adaptado de Martín y col. (1998) y Rodríguez y col. (1994).

También durante el proceso de elaboración de jamón curado, y especialmente de jamón curado de cerdo Ibérico por su mayor tiempo de maduración, tiene lugar el desarrollo de una población microbiana que depende de factores extrínsecos, directamente relacionados con el ambiente en el que se suceden las fases de elaboración del producto (temperatura, humedad relativa, velocidad del aire y sales de curado), factores inherentes o intrínsecos al jamón (actividad de agua [ $a_w$ ], pH, potencial redox, nutrientes y factores antimicrobianos naturales) y factores implícitos derivados de las relaciones de dependencia que se establecen entre los distintos grupos microbianos, con efectos sinérgicos o antagonistas (Arnau y col., 2001). La población microbiana que se desarrolla en jamón durante el proceso de elaboración puede estar formada por microorganismos saprófitos, alterantes y patógenos. La microbiota saprófita se compone principalmente de organismos mesófilos y halotolerantes tales como cocos gram-positivos catalasa-positivos (CGC+), bacterias ácido-lácticas (BAL), mohos y levaduras (Figura I.2). La mayoría de los CGC+ son aislados durante las etapas iniciales de elaboración y pertenecen al género *Staphylococcus*, siendo mayoritaria la especie *Staphylococcus xylosus* (Rodríguez et al., 1994). También se ha descrito la presencia de BAL, fundamentalmente de los géneros *Lactobacillus* y *Pediococcus* aunque en menor



medida que los CGC+ y limitada sobre todo a los primeras fases (salado, postsalado) del proceso de elaboración (Molina y col., 1989). A medida que avanza la maduración esta población bacteriana desciende, a la vez que se incrementa la presencia de levaduras, destacando los géneros *Debaryomyces* y *Candida*, y de forma menos frecuente *Cryptococcus*, *Rhodotorula* y *Rhodospirium* (Andrade y col., 2009; Asefa y col., 2009; Núñez y col., 1996b; Simoncini y col., 2007). Finalmente, ya en fases de secado y maduración en bodega, los mohos de los géneros *Aspergillus*, *Eurotium* y *Penicillium* van a ir ganando protagonismo, alcanzando recuentos similares a las levaduras (Iacumin y col., 2009; Núñez y col., 1996).

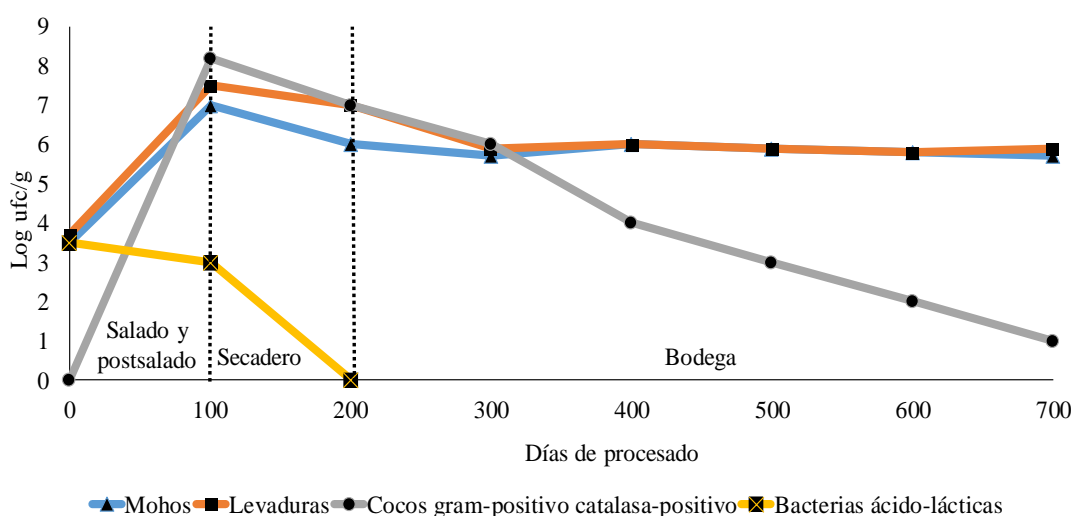


Figura I.2. Evolución de la población microbiana superficial durante el proceso de elaboración del jamón curado de cerdo Ibérico. Adaptado de Núñez (1995) y Rodríguez (1995).

Entre los microorganismos que pueden desarrollarse durante la elaboración del jamón curado también se ha descrito la presencia de alterantes que tienen efectos perjudiciales en el producto, tales como *Serratia liquefaciens*, *Proteus vulgaris* y *Enterobacter agglomerans* causantes de la putrefacción profunda o *cala* en jamón curado (Arnau y col., 2001; García y col., 2000). Además, se han descrito alteraciones o defectos microbianos como la formación de manchas negras sobre la superficie del producto en las fases de secado y maduración en bodega, debidas al desarrollo de ciertas especies de bacterias durante las fases de postsalado como *Carnimonas nigrificans* o *Pseudomonas fluorescens* (Andrade y col. 2012; Garriga y col. 1998), o bien asociadas al crecimiento de mohos del género *Cladosporium* (Alía y col. 2016). En cuanto a la posible presencia de microorganismos patógenos, los cambios que tienen lugar a lo largo del proceso de

elaboración del jamón curado condicionan su desarrollo. De esta manera, durante las primeras fases (almacenamiento en refrigeración de los perniles, salado y postsalado), las condiciones de  $a_w$  (alrededor de 0,98) y pH (alrededor de 6) del pernil permiten el desarrollo de microorganismos patógenos que puedan llegar por contaminación a partir del propio producto, equipos, utensilios y manipuladores tales como *Escherichia coli* O157:H7 (de Alba et al., 2013; Graumann y Holley, 2007), *Listeria monocytogenes* (Bover-Cid y col., 2015, 2011), *Salmonella* spp. (Bover-Cid y col., 2017), *Clostridium botulinum* y *Clostridium perfringens* (Arboix y col. 2001) y *Staphylococcus aureus* enterotoxigénico (Marin y col., 1992). Entre estos patógenos, *L. monocytogenes* es el más preocupante en la industria del jamón curado, principalmente por ser un microorganismo muy ubicuo, psicrótrofo y responsable de listeriosis. Aunque existe el peligro de desarrollo de *L. monocytogenes* en los perniles en las primeras fases del procesado de jamón curado, el progresivo descenso de la  $a_w$  del producto hasta niveles inferiores a 0,90 (Toldrá, 2006) y el contenido en NaCl (alrededor del 4%) permiten controlar el crecimiento de dicho microorganismo patógeno (Reynolds y col., 2001). Este hecho justifica que la incidencia de *L. monocytogenes* en derivados cárnicos curado-madurados como el jamón sea relativamente baja (Seman y col., 2002). No obstante, también hay que considerar que una de las formas más habituales de comercialización y consumo de jamón curado es como producto loncheado y envasado. Durante las operaciones de loncheado y las previas de deshuesado y prensado puede haber contaminación por *L. monocytogenes* (Bover-Cid y col., 2015, 2011; Hereu y col., 2012; Hoz y col., 2008; Possas y col., 2017), dada la capacidad de este microorganismo patógeno de persistir en equipos y utensilios durante largos periodos de tiempo (Autio y col., 2003; Kurpas y col., 2018; Martín y col., 2014; Miettinen y col., 2001; Rivoal y col., 2013). Por otro lado, el almacenamiento en determinadas condiciones de refrigeración del jamón curado loncheado durante periodos prolongados no evita el desarrollo *L. monocytogenes* (Bover-Cid y col., 2019). De hecho, Ng y col. (1997) han encontrado *L. monocytogenes* en lonchas de jamón curado envasadas a vacío procedentes de distintas industrias. Este peligro en productos cárnicos loncheados envasados al vacío se ha relacionado con valores de  $a_w$  en lonchas igual o superiores a 0,92 en aproximadamente el 60% de las muestras analizadas (Hereu y col., 2012; Stollewerk y col., 2014). Por consiguiente, es necesario considerar el peligro de *L. monocytogenes* en productos RTE como jamón curado loncheado, fundamentalmente debido a la contaminación por esta bacteria patógena durante el deshuesado, prensado y loncheado a partir de superficies de equipos y utensilios.

### I.1.2. Listeriosis

La gravedad del peligro de *L. monocytogenes* radica en su capacidad de provocar listeriosis en los consumidores. Se han descritos múltiples casos de esta enfermedad debido al consumo de carne y productos cárnicos, entre los que destaca derivados cárnicos curado-madurados RTE (Buchanan y col. 2017; EFSA y ECDC 2018, Bover-cid y Garriga, 2014; Lakicevic y Nastasijevic, 2017). La listeriosis es una de las enfermedades zoonóticas transmitida por alimentos con mayor tasa de mortalidad (EFSA y ECDC, 2018; Kurpas y col., 2018). Aunque es una enfermedad relativamente rara, el último informe emitido por la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA) presentó unos datos en relación a la enfermedad con un ratio de notificación de 0,48 casos por cada 100.000 habitantes, de los cuales, el 98,6% necesitó hospitalización con una mortalidad del 13,6%, siendo este el mayor registrado de las zoonosis en estudio en la Unión Europea para el año 2017 (EFSA y ECDC, 2018).

La listeriosis es una enfermedad que afecta principalmente a mujeres embarazadas, neonatos, ancianos, inmunodeprimidos y pacientes con condiciones subyacentes como alcoholismo, cirrosis, etc. A pesar de la ubicuidad y elevada prevalencia en alimentos, la incidencia de esta enfermedad en la población general es relativamente baja, aunque probablemente sea infravalorada debido a la existencia de cuadros subclínicos (Buchanan y col., 2017; McLauchlin y col., 2004). Aun así, el incremento o mejora de los sistemas de vigilancia suele dar lugar a un incremento del número de casos detectados. La incidencia anual de listeriosis en los países desarrollados es de aproximadamente 0,35-5 casos por cada 1.000.000 de habitantes (Chen y col., 2003; Ferreira y col., 2014). Así, los últimos informes publicados por la EFSA han demostrado una tendencia creciente de casos de listeriosis en la Unión Europea sin una causa claramente conocida (Auvolat y Besse, 2016), habiéndose incrementado desde el año 2008 hasta el 2017 (Tabla I.1).

La enfermedad producida por *L. monocytogenes* puede presentarse bajo dos cuadros clínicos: listeriosis gastrointestinal no invasiva afectando a individuos inmunocompetentes o listeriosis invasiva, afectando a individuos inmunocomprometidos (EURL-Lm, 2019).

## INTRODUCCIÓN

Tabla I.1. Casos confirmados de listeriosis humana y mortalidad (%) en la Unión Europea desde el año 2008 al 2017.

Informes anuales EFSA	Listeriosis humana	
	Casos confirmados	Mortalidad (%)
2008	1381	20,5
2009	1645	16,6
2010	1601	17,0
2011	1476	12,7
2012	1642	17,8
2013	1763	15,6
2014	2161	15,0
2015	2206	17,7
2016	2536	16,2
2017	2480	13,8

Adaptado de EFSA y ECDC (2018, 2017, 2015a, 2015b, 2014, 2013, 2012, 2011, 2010).

La forma invasiva es la forma predominante de la enfermedad y, a pesar de la baja incidencia en la población en general (Buchanan y col., 2017), la gravedad de la sintomatología unido a las elevadas tasas de hospitalización (superiores al 98%) (EFSA y ECDC, 2018) y mortalidad (en torno al 20-30%) (Auvolat y Besse, 2016; EFSA y ECDC, 2018; Rodríguez-Lázaro y col., 2004; Vázquez-Boland y col., 2001; Warriner y Namvar, 2009), la convierten en uno de los procesos patológicos transmitidos por alimentos de mayor importancia (Bover-Cid y Garriga, 2014; EFSA y ECDC, 2018). Sin embargo, la forma invasiva se encuentra muy limitada a determinados grupos de riesgo, y en concreto a personas mayores de 65 años, mujeres embarazadas, niños o individuos inmunodeprimidos (terapias inmunosupresoras, diálisis, enfermedades hepáticas, sanguíneas o cardiovasculares, alcoholismo, SIDA, cáncer o diabetes mellitus, entre otras muchas causas) (EFSA y ECDC, 2018; Farber y Peterkin, 1991; McLauchlin y col., 2004). Generalmente, se considera que la dosis infectiva mínima para la forma más grave que afecta a la población de riesgo puede estar entre 100 a 1000 unidades formadoras de colonias (ufc) (Jemmi y Stephan, 2006; Warriner y Namvar, 2009) y el periodo de incubación es excepcionalmente largo, transcurriendo normalmente entre 1-3 semanas hasta la aparición de los síntomas, aunque puede prolongarse hasta un mes (CDC, 2016). La sintomatología típica en adultos es la infección del sistema nervioso central (55-60% de los casos), generalmente en forma de meningoencefalitis, aunque también aparecen casos de meningitis, romboencefalitis e incluso abscesos cerebrales (Aguado-García y col., 2005; Vázquez-Boland y col., 2001; Warriner y Namvar, 2009), además de las

infecciones sistemáticas con procesos de bacteriemia y septicemia (20-30% de los casos) (Aguado-García y col., 2005; EURL Lm, 2019; Vázquez-Boland y col., 2001; Warriner y Namvar, 2009). En mujeres embarazadas, la infección suele cursar de manera asintomática y con un cuadro febril (Vázquez-Boland y col., 2001); sin embargo, en el caso de atravesar la placenta, puede darse un cuadro de listeriosis perinatal que puede ocurrir en cualquier momento de la gestación (McLauchlin y col., 2004), afectando al feto y provocando abortos, nacidos muertos o infección generalizada, o bien dar lugar a un cuadro de sepsis o meningitis en el neonato (listeriosis neonatal) (Allerberger y Wagner, 2010).

Por otro lado, la listeriosis no invasiva, también conocida como gastroenteritis febril (FAO/OMS, 2004), es poco frecuente (EURL-Lm, 2019; Food Safety Authority of Ireland, 2005), y no está limitada a grupos de riesgo, sino que afecta típicamente a personas sanas (FAO/OMS, 2004; Food Safety Authority of Ireland, 2005; Rantsiou y col., 2008; Warriner y Namvar, 2009). La forma de presentación está estrechamente relacionada con la ingestión de altas dosis del microorganismo (más de  $10^8$  ufc) y el periodo de incubación suele ser relativamente corto, oscilando entre 1 y 7 días (FAO/OMS, 2004; Warriner y Namvar, 2009). La sintomatología se relaciona con un proceso de gastroenteritis febril de carácter generalmente autolimitante (Food Safety Authority of Ireland, 2005; Warriner y Namvar, 2009). Además, este tipo de listeriosis se ha detectado sobre todo en el contexto de brotes epidémicos (EURL Lm, 2019; FAO/OMS, 2004; Food Safety Authority of Ireland, 2005). La preocupante repercusión sanitaria de esta enfermedad requiere conocer con detalle las características de *L. monocytogenes* como paso previo a poder establecer medidas de control en productos RTE como jamón curado loncheado.

## I.2. *Listeria monocytogenes*: CARACTERÍSTICAS GENERALES

*L. monocytogenes* es una especie del género *Listeria* perteneciente a la familia *Listeriaceae* y compuesta por dieciocho especies (Abay y col., 2019; Miceli y Settanni, 2019; Orsi y Wiedmann, 2016), organizadas en dos grupos o clados en base a su relación filogenética. El primer clado está compuesto por las especies *Listeria sensu stricto*,

consistente en 6 especies que incluyen *L. monocytogenes*, *L. innocua*, *L. welshimeri*, *L. ivanovii*, *L. seeligeri* y *L. marthii* aisladas comúnmente del tracto gastrointestinal y alimentos de origen animal (Olaimat y col., 2018). El segundo clado está compuesto por las especies *Listeria sensu lato*, consistente en 12 especies incluyendo *L. grayi*, *L. fleischmannii*, *L. floridensis*, *L. aquatica*, *L. newyorkensis*, *L. cornellensis*, *L. rocourtiae*, *L. weihenstephanensis*, *L. grandensis*, *L. riparia* y *L. booriae* y *L. costaricensis*, aisladas del medio ambiente o de matrices alimentarias siendo incapaces de colonizar o infectar a mamíferos (Olaimat y col., 2018; Orsi y Wiedmann, 2016; Figura I.3).

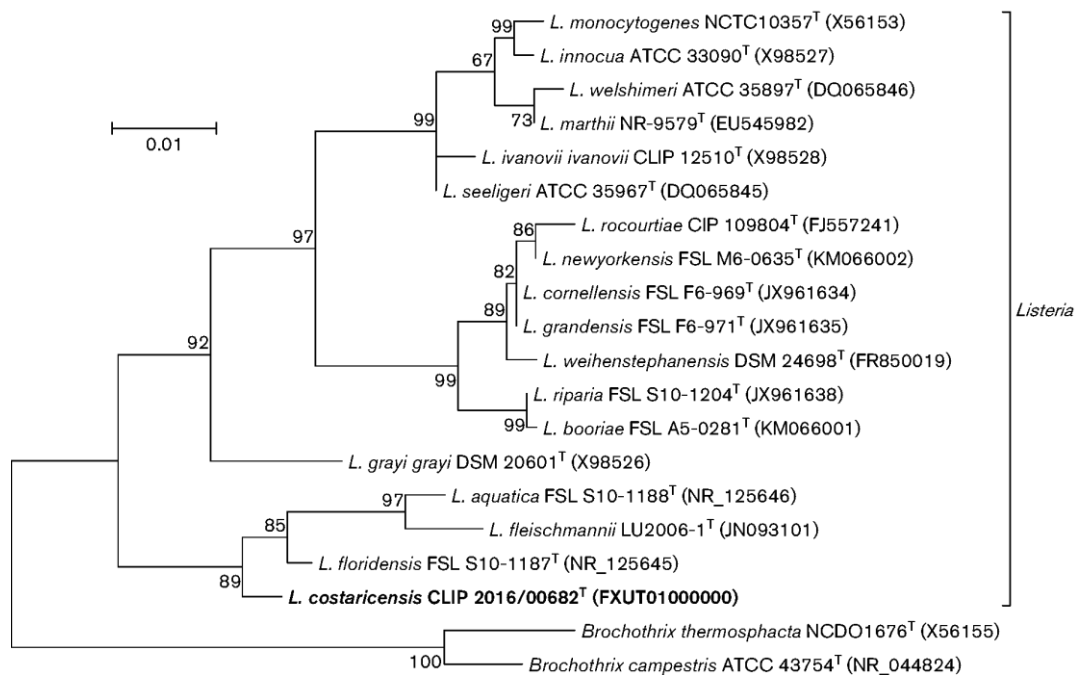


Figura I.3. Relaciones filogenéticas del género *Listeria* basadas en el análisis del gen 16S del ARN ribosómico (ARNr). La estimación de la distancia se basó en el método descrito por Kimura (1980). Se incluyen en la figura dos cepas de *Brochothrix* seleccionadas como grupo externo al género *Listeria*. Entre paréntesis aparecen los números de acceso en GenBank, EMBL o DDBJ. Adaptado de Núñez-Montero y col. (2018).

De las dieciocho especies de *Listeria*, *L. monocytogenes* es la de mayor interés, pues es responsable, casi de forma exclusiva de la listeriosis en el ser humano. *L. ivanovii* es patógena principalmente para los animales de las especies ovina y caprina (Liu 2006a), habiéndose dado algún caso de listeriosis humana por *L. ivanovii* en Francia (Guillet y col., 2010). En el caso de *L. seeligeri* y *L. innocua*, también se han registrado algunos casos aislados de listeriosis en humanos, a pesar de ser consideradas especies inocuas (Cocolin y col., 2002; Dussurget, 2008; Food Safety Authority of Ireland, 2005; Gasanov y col., 2005; McLauchlin y col., 2004; Orsi y Wiedmann, 2016; Vázquez-Boland y col.,

2001). Para la clasificación de las distintas especies de *Listeria* como especies patógenas se utilizan las características bioquímicas que aparecen en la Tabla I.2 y que han sido ampliamente estudiadas previamente por Graves y col. (2010), Leclercq y col. (2010), Orsi y Wiedmann (2016), Seeliger y Jones (1986) y Núñez-Montero y col. (2018) sobre las distintas especies de *Listeria*.

*L. monocytogenes* es un bacilo Gram-positivo de pequeño tamaño (0,4-0,5  $\mu\text{m}$ ), no esporulado, anaerobio facultativo (crece mejor en condiciones de aerobiosis que de anaerobiosis; Lado y Yousef, 2007; Sutherlands y col., 2003), no formador de esporas, sin cápsula y móviles a temperaturas comprendidas entre 20 y 25 °C (EURL Lm, 2019; Kreft y Vázquez-Boland, 2001; Schmid y col., 2005) gracias a la producción de flagelina, la cual se reduce drásticamente a temperaturas de 37 °C (Farber y Peterkin, 1991; Vázquez-Boland y col., 2001). Se puede presentar formando cadenas cortas, así como en forma de V, Y o empalizadas. La caracterización serotípica ha sido el primer método utilizado para clasificar los aislados de *L. monocytogenes* en distintos subtipos (Paterson, 1940).

## INTRODUCCIÓN

Tabla I.2. Características bioquímicas de las distintas especies de *Listeria*. Adaptado de Núñez-Montero y col. (2018).

Características	L1	L2	L3	L4	L5	L6	L7	L8	L9	L10	L11	L12	L13	L14	L15	L16	L17	L18
<b>Movilidad</b>	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>Reducción de nitrato</b>	+	-	-	-	-	-	-	V	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+
<b>Reducción de nitrito</b>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>Reacción Voges-Proskauer</b>	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	V	-	-	-
<b>Catalasa</b>	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<b>Hemólisis</b>	-	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>D-Arilmidasa</b>	-	-	+	+	V	V	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b><math>\alpha</math>-Manosidasa</b>	-	+	+	-	-	+	+	V	+	-	-	+	-	-	+	-	-	+
<b>Esculina</b>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<b>Fosfolipasa C fostatidilinositol específico (PI-PLC)</b>	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>Producción de ácido a partir de:</b>																		
<b>D-Arabitól</b>	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-	V	+	-	-	-	+
<b>D-Galactosa</b>	+	V	-	-	V	-	-	+	+	-	-	+	-	-	-	-	+	+
<b>D-Glucosa</b>	+	v!	v!	+	v!	+	v!	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<b>Glicerol</b>	+	V	+	+	+	+	-	V	+	+	V	V	-	+	V	-	+	+
<b>L-Fucosa</b>	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>Lactosa</b>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	v!	(+)	+	-	+	-	+	+	+
<b>Maltosa</b>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+
<b>L-Ramnosa</b>	+	+	V	-	-	V	-	-	+	+	-	+	-	+	+	+	V	+
<b>D- Ribosa</b>	+	-	-	-	+	-	-	+	+	-	+	V	+	+	+	-	+	V
<b>Sacarosa</b>	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	V	-	-	-	-
<b>Metil <math>\alpha</math>-D-glucosido</b>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+
<b>Metil <math>\alpha</math>-D-manosa</b>	+	-	-	ND	-	ND	+	-	-	-	-	-	-	V	-	-	-	-
<b>Potasio 5-cetogluconato</b>	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>D-Xilosa</b>	+	-	-	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<b>L-Arabinosa</b>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	V	+	-	-	+	+	+	+
<b>Glucosa-1-fosfato</b>	-	-	-	-	V	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>Inositol</b>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	V	-	V	V	-	-
<b>Inulina</b>	-	v!	v!	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>D-Lixosa</b>	-	V	V	-	-	V	-	V	-	-	-	-	-	-	V	+	-	-
<b>D-Manitol</b>	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	V	-	V	-	-	+	+
<b>Melezitosa</b>	-	V	V	V	V	V	-	-	-	-	-	-	-	V	-	-	-	-
<b>Melobiosa</b>	-	v!	V	-	-	-	V	-	+	-	-	V	-	V	-	-	-	+
<b>L-Sorbosa</b>	-	v!	v!	-	v!	-	v!	v!	-	-	-	-	-	V	-	-	-	-
<b>D-Tagatosa</b>	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
<b>N-Acetilglucosamina</b>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<b>Amigdalina</b>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<b>Arbutina</b>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<b>Celobiosa</b>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<b>D-Fructosa</b>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<b>D-Manosa</b>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<b>Salicina</b>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<b>D-Adonitol</b>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>Arabinosa</b>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>Glucógeno</b>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>Metil-<math>\beta</math>-D-xilopiranosido</b>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>Rafinosa</b>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>Potasio 2-cetogluconato</b>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>Turanosa</b>	-	-	V	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	V	-	-	-	-

+: positivo; (+): débilmente positivo; -: negativo; V: variable entre réplicas y/o entre cepas; v!: variable entre estudios (posiblemente debido a diferencias en los tiempos de incubación y la temperatura); ND: no detectado. L1: *Listeria costaricensis* CLIP 2016/00682T; L2: *L. monocytogenes* 10403S; L3: *L. innocua* FSL S4-378; L4: *L. seeligeri*; L5: *L. ivanovii* ATCC BAA-678; L6: *L. welshimeri*; L7: *L. marthii* FSL S4-120T; L8: *L. grayi* cepas ATCC 19120T y ATCC 25401T; L9: *L. rocourtiae* CIP 109804T; L10: *L. weihenstephanensis*; L11: *L. cornellensis* cepas TTU A1-0210T y FSL F6-0970; L12: *L. riparia* FSL S10-1204T y FSL S10-1219; L13: *L. grandensis* TTU A1-0212T; L14: *L. fleischmannii* cepas DSM 24998T, ATCC BAA-2414T, FSL F6-1019, FSL S10-1186, FSL S10-1203 y FSL S10-1220; L15: *L. aquatica* cepas FSL S10-1188 T y FSL S10-1181; L16: *L. floridensis* FSL S10-1187 T; L17: *L. newyorkensis* cepas FSL M6-0635T y A5-0209; L18: *L. booriae* cepas FSL A5-0279T y FSL A5-0281.



I.2.1. Serotipos de *L. monocytogenes*: clasificación, distribución y relevancia.

Actualmente se conocen 15 serotipos de *L. monocytogenes* (1/2a, 1/2b, 1/2c, 3a, 3b, 3c, 4a, 4b, 4c, 4d, 4e, 5, 6a, 6b y 7) establecidos mediante el análisis de los antígenos somático (O) y flagelar (H) (Tabla I.3; Chen y col., 2017; Kérouanton y col., 2010).

Tabla I.3. Clasificación serológica de *Listeria monocytogenes* en función de la composición de los antígenos somático (O) y flagelar (H). Adaptado de Chen y col. (2017).

Serotipo	Antígenos O	Antígenos H
1/2a	I, II	A, B
1/2b	I, II	A, B, C
1/2c	I, II	B, D
3a	II, IV	A, B
3b	II, IV	A, B, C
3c	II, IV	B, D
4a	(V), VII, IX	A, B, C
4b	V, VI	A, B, C
4c	V, VII,	A, B, C
4d	(V), VI, VIII	A, B, C
4e	V, VI, (VIII), (IX)	A, B, C
7	XII, XIII	A, B, C
5	(V), VI, (VIII), X	A, B, C
6a	V, (VI), (VII), (IX), XV	A, B, C
6b	(V), (VI), (VII), IX, X, XI	A, B, C

( ): el antígeno correspondiente no siempre está presente.

Posterior a dicha clasificación serotípica, se han desarrollado un gran número de estudios filogenéticos y de subdivisión que han mostrado que *L. monocytogenes* forma una población estructurada compuesta de cuatro linajes divergentes, designados como I, II, III y IV (Orsi y col., 2011). Las cepas del linaje I (serotipos 1/2b y 4b) y el linaje II (serotipos 1/2a y 1/c) son aislados de forma frecuente de alimentos o de pacientes con listeriosis (Ward y col., 2010) y representan el 95% de los aislados de alimentos contaminados y casos clínicos de listeriosis (Doumith y col., 2004; Kathariou, 2002; Swaminathan y Gerner-Smidt, 2007). Los linajes III y IV no se presentan en la mayoría de estudios ya que el aislamiento de cepas pertenecientes a estos linajes es raro y lleva a confusión (Orsi y col., 2011). Las cepas del linaje I están relacionadas principalmente con aislamientos de casos de listeriosis humana, fundamentalmente el serotipo 4b,

responsable de la mayoría de los casos de listeriosis humana (Virginia y col., 2009), mientras que las cepas del linaje II se han aislado prioritariamente en alimentos y muestras ambientales (Gray y col., 2004; Jeffers y col., 2001; Norton y col., 2001). Además, el serotipo 1/2a es el más frecuentemente aislado en alimentos y medio ambiente (Kocot y Olszewska, 2017; Pan y col., 2009; Zhang y col., 2007) e implicado en casos más esporádicos de listeriosis (Khan y col., 2016). El linaje III solamente representa el 1% de los casos de listeriosis humana y está más relacionado con aislados de origen animal poco adaptado a los entornos de procesamiento de alimentos (De Jesús y Whiting, 2016; Ward y col., 2010; Wiedmann y col., 1997), mientras que de las cepas del linaje IV no se conocen con claridad sus atributos ecológicos y de virulencia ya que es un linaje raro y solo se ha descrito en un número muy reducido de muestras (Liu y col., 2006b; Orsi y col., 2007; Roberts y col., 2006; Ward y col., 2008).

En base al contenido genético común que comparten los serotipos agrupados en cada linaje, se ha propuesto una clasificación posterior en 5 grupos filogenéticos o serogrupos (Doumith y col., 2004). Los serogrupos se pueden definir como complejos evolutivos tipificados por un serotipo predominante que incluye serotipos muy raros en su frecuencia con variantes evolutivas menores respecto al serotipo predominante (Doumith y col., 2004; Ducey y col., 2007; Ward y col., 2008). Estos serotipos raros pueden haber evolucionado recientemente a partir de los serotipos principales (Ward y col., 2010) siendo la mayoría de ellos indistinguibles a nivel de serotipo por los métodos moleculares desarrollados hasta el momento (Borucki y Call, 2003a; Doumith y col., 2004; Ducey y col., 2007; Vitullo y col., 2013; Ward y col., 2008). Así, según los estudios llevados a cabo por Doumith y col. (2004) el linaje I se subdivide en el serogrupo I.1. (serotipos 1/a y 3a) y serogrupo I.2. (serotipos 1/2c y 3c), el linaje II se subdivide en el serogrupo II.1. (serotipos 4b, 4d y 4e) y serogrupo II.2. (serotipos 1/2b, 3b y 7) y el linaje III forma el serogrupo III que agrupa los serotipos 4a y 4c. De tal manera, que, dentro de los 15 serotipos, además existen 4 serogrupos principales que agrupan a los linajes I, II y III.

La definición de linajes por Orsi y col. (2011), ha facilitado el estudio de la ecología y epidemiología de los aislados que pertenecen a distintos serotipos de *L. monocytogenes*. No todos los subtipos de *L. monocytogenes* contribuyen de la misma manera a la enfermedad humana, habiéndose identificado diferencias sustanciales en la ecología y virulencia en función del serotipo y linaje (Roche y col., 2012). Algunos estudios han

demostrado además la resistencia de ciertos serotipos de *L. monocytogenes* que pueden sobrevivir y persistir durante largos periodos de tiempo en las plantas de procesado (Lundén y col., 2003; Martín y col., 2014) lo cual representa un riesgo importante para los consumidores. Por todo ello, la clasificación de *L. monocytogenes* en serotipos adquiere una gran importancia.

### I.2.2. Condiciones ecológicas y persistencia

*L. monocytogenes* es un microorganismo presente de forma común en el intestino de animales homeotermos (Ferreira y col., 2014). Se estima que entre el 2 y el 10% de la población humana es portadora asintomática del microorganismo en su tracto intestinal (Buchanan y col., 2017; Farber y Peterkin, 1991; Food Safety Authority of Ireland, 2005; Warriner y Namvar, 2009), siendo además frecuentemente aislada de rumiantes y aves (Farber y Peterkin, 1991). Sin embargo, más allá de su importancia como microorganismo intestinal, las características ecológicas de *L. monocytogenes* le confieren una gran resistencia fuera de sus hospedadores en una gran diversidad de hábitats tales como suelo, agua, heces (animales y humanas), ensilados y materias primas utilizadas para la elaboración de alimentos. Todas estas fuentes de infección explicarían su presencia en granjas, plantas de procesado de alimentos, establecimientos de restauración y venta al por menor (Farber y Peterkin, 1991; Ferreira y col., 2014; Food Safety Authority of Ireland, 2005; Vázquez-Boland y col., 2001), siendo su entorno idóneo los sustratos fríos y húmedos, especialmente en superficies de difícil limpieza y desinfección. Aunque son los alimentos el principal vehículo de transmisión de *L. monocytogenes* (Buchanan y col., 2017; Food Safety Authority of Ireland, 2005; Kocot y Olszewska, 2017), todos los ambientes citados anteriormente forman parte de la epidemiología de la listeriosis y constituyen la principal fuente de contaminación de *L. monocytogenes* en las plantas de procesado y establecimientos relacionados con los alimentos, en los cuales, las características propias del microorganismo determinan que su control constituya un verdadero reto (Buchanan y col., 2017; Ferreira y col., 2014).

El crecimiento y supervivencia de *L. monocytogenes* en los alimentos está influenciado tanto por factores intrínsecos del producto, como la  $a_w$  y el pH, como por factores extrínsecos (la temperatura, la humedad relativa y la presencia de oxígeno). Además, la

## INTRODUCCIÓN

aplicación de tratamientos (térmicos y no térmicos) a materias primas y productos condicionan la supervivencia y el crecimiento de esta bacteria patógena (Tabla I.4).

Tabla I.4. Características ecológicas en relación con el crecimiento y supervivencia de *Listeria monocytogenes*. Adaptado de EURL Lm (2019).

Parámetro	Condiciones de crecimiento			Supervivencia (sin crecimiento)
	Mínimas	Máximas	Óptimas	
Temperatura (°C)	entre -2 y -4	aproximadamente 45	entre 30 y 37	-18
pH (HCl como acidulante)	entre 4,2 y 4,3	entre 9,4 y 9,5	7	entre 3,3 y 4,2
Actividad de agua ( $a_w$ ; NaCl como modificador de la $a_w$ )	entre 0,90 y 0,93	> 0,99	0,99	< 0,90
Concentración de sal (% en fase acuosa)	< 0,5	entre 12 y 16	0,7	>20
Atmósfera	Anaerobio facultativo (puede crecer en presencia o ausencia de oxígeno, como por ejemplo en un envase a vacío o con atmósfera modificada)			
<b>Inactivación térmica</b>				
$D_{65\text{ °C}}$ (min) <sup>a</sup>	de 0,2 a 2			
Z (°C) <sup>b</sup>	7,5 °C (de 4 a 11)			
<b>Inactivación por altas presiones</b>				
400 MPa durante 10 min a 20 °C	Reducción de 2 log en tampón fosfato (pH 7)			
400 MPa durante 10 min a 20 °C	Reducción de 8 log en tampón citrato (pH 5,6)			
de 400 a 500 MPa durante 5-10 min a 20 °C	Reducción de 3 a 5 log en productos cárnicos			
350 MPa durante 5-10 min a 20 °C	Reducción de 3 a 5 log en productos ácidos (zumos de fruta, mermeladas, etc.)			

<sup>a</sup>Tiempo (en min) a 65 °C necesario para producir una reducción decimal el crecimiento del microorganismo patógeno;

<sup>b</sup> aumento de temperatura necesario para reducir D a 1/10 de su valor, o en un ciclo logarítmico cuando se representa D frente a la temperatura.

La mayoría de las condiciones de crecimiento y supervivencia de *L. monocytogenes* mostradas en la Tabla I.4 han sido determinadas principalmente mediante investigaciones realizadas en medios de cultivo, lo cual proporciona un ambiente más favorable para el crecimiento y supervivencia del microorganismo patógeno con respecto al ambiente propio de los alimentos (Food Safety Authority of Ireland, 2005), debido, principalmente, a las complejas interacciones que tienen lugar entre factores físico-químicos del propio alimento y del medio ambiente, así como a la competición con el resto de la población microbiana (Buchanan y col., 2017). Así, cuando se han estudiado estos efectos sobre matrices alimentarias se han encontrado algunas diferencias en cuanto a los resultados

obtenidos en medios de cultivo. Respecto a la tolerancia de *L. monocytogenes* a NaCl, este microorganismo halotolerante ha llegado a soportar concentraciones de hasta el 23,8% en salmueras utilizadas en la elaboración de embutidos cárnicos o quesos (Bover-Cid y Garriga, 2014; Lado y Yousef, 2007; Larson y col., 2010; Miller, 1992). En cuanto al efecto de la  $a_w$ , se ha demostrado que *L. monocytogenes* puede sobrevivir a valores de  $a_w$  de 0,81 durante largos periodos de tiempo en embutidos curado-madurados, especialmente en temperaturas de refrigeración (Bover-Cid y Garriga, 2014; Johnson y col., 1988; Lado y Yousef, 2007).

Respecto a la temperatura, y a diferencia de otros microorganismos patógenos no esporulados, *L. monocytogenes* es una bacteria psicotrofa capaz de sobrevivir durante largos periodos bajo condiciones de temperatura desfavorables, o incluso resistir la congelación sin una reducción aparente o simplemente una ligera reducción durante la conservación en congelación (entre -18 y 20 °C) (Ben Slama y col., 2013; Bover-Cid y Garriga, 2014; Flessa y col., 2005; Harrison y col., 2016). Aun así, es importante destacar que el crecimiento se reduce significativamente a bajas temperaturas, con tiempos de regeneración situados entre 62 y 131 h, dependiendo de la cepa y las condiciones experimentales (Augustin y Carlier, 2000; Bover-Cid y Garriga, 2014; Tienungoon y col., 2000). En matrices con un alto contenido en nutrientes y pH neutro, *L. monocytogenes* es capaz de crecer y sobrevivir a valores comprendidos entre -0,5 y 9,3 °C (Bover-Cid y Garriga, 2014; Buchanan y col., 2017; Tienungoon y col., 2000).

Un aspecto muy importante que hay que considerar es que no todas las cepas de *L. monocytogenes* se adaptan igual a los distintos alimentos y ambientes y no todas tienen la misma persistencia en las plantas de procesado. Por norma general, suelen ser cepas diferentes y el ambiente de cada planta suele ser colonizado por un número limitado de cepas específicas (Fugget y col., 2007; Gudmundsdóttir y col., 2005; Vergheze y col., 2011), aunque algunos autores han señalado la presencia de cepas idénticas en diferentes plantas de procesado, lo que indica la existencia de clones dispersos geográficamente (Chasseignaux y col., 2001; Peccio y col., 2003; Thévenot y col., 2006). Algunos autores afirman que existen ciertos subtipos de cepas persistentes con características específicas que les permiten una mayor capacidad de resistencia en el medio (Fox y col., 2011; Vergheze y col., 2011). Sin embargo, otros trabajos no han encontrado evidencias de dichas características (Holch y col., 2013; Stasiewicz y col., 2015) indicando que la

persistencia podría ser un proceso aleatorio y cualquier cepa de *L. monocytogenes* podría llegar a ser persistente si se dan las condiciones oportunas para su desarrollo (Ferreira y col., 2014). Por otro lado, la presencia de determinadas oquedades en los equipos y utensilios de las líneas de procesado dificulta las operaciones de limpieza y desinfección, pudiendo actuar incluso el agua utilizada en dichas operaciones como un vehículo de la contaminación, alcanzando zonas de difícil acceso donde se acumulan restos de materia orgánica con un alto contenido en humedad. Estos recovecos constituyen la formación de nichos o reservorios en los que la bacteria crece en condiciones de humedad y nutrientes adecuadas (Cerf, 2011). A todo esto, se suma la capacidad de *L. monocytogenes* para formar biopelículas o agregados de múltiples células microbianas que permanecen fijadas a la superficie, cubiertas por una matriz polimérica extracelular y cuya formación se da especialmente en las zonas de difícil acceso (Buchanan y col., 2017; Ferreira y col., 2014; Food Safety Authority of Ireland, 2005; Khan y col., 2016; Kocot y Olszewska, 2017; Lundén y col., 2003; Martín y col., 2014). La formación de estas biopelículas le aportan una mayor protección gracias al conjunto de materiales poliméricos extracelulares que rodean al conjunto celular, una mayor disponibilidad de nutrientes y eliminación de metabolitos tóxicos, debido a las interacciones que se producen entre las distintas células y el desarrollo de nuevas características debido a los procesos de transmisión horizontal de genes entre ellas (Buchanan y col., 2017; Ferreira y col., 2014; Kocot y Olszewska, 2017). Todas estas características o métodos de supervivencia podrían explicar las causas por las que determinadas cepas o serotipos de *L. monocytogenes* pueden ser aisladas durante meses o incluso años en algunas plantas de procesado de alimentos.

La investigación de cepas de *L. monocytogenes* en superficies de equipos y utensilios mediante muestreo es esencial para evaluar y controlar la contaminación por esta bacteria patógena (Ripolles-Avila y col., 2019) en equipos y manipuladores en zonas de deshuesado, prensado y loncheado, en las que puede haber cepas persistentes. Además, la detección y caracterización de las cepas contaminantes en jamón loncheado permiten, junto con la información obtenida de la propia investigación de equipos, utensilios y manipuladores, detectar las posibles fuentes de contaminación de *L. monocytogenes* en las plantas de deshuesado y loncheado de jamón curado (Berzins y col., 2010; Keto-Timonen y col., 2007; Lundén y col., 2003, 2002; Martín y col., 2014).

### I.2.3. Criterios de seguridad alimentaria

En la investigación de contaminación por *L. monocytogenes* hay que tener en cuenta los criterios de seguridad alimentaria establecidos para este patógeno por las autoridades sanitarias en productos RTE, ante la tendencia creciente en los casos de listeriosis en la Unión Europea. Así, la Unión Europea establece a través del Reglamento (CE) n° 2073/2005, los criterios de seguridad alimentaria respecto a *L. monocytogenes* de los productos RTE, en función de tres categorías de alimentos (Tabla I.5).

Tabla I.5. Criterios de seguridad alimentaria para *Listeria monocytogenes* aplicados según la categoría de alimento listo para el consumo (RTE). Adaptado de Reglamento (CE) 2073/2005.

<b>1ª Categoría</b>	
<b>Alimentos RTE destinados a lactantes/ usos médicos especiales</b>	Ausencia en 25 g
<b>2ª Categoría</b>	
<b>Alimentos RTE en los que <i>L. monocytogenes</i> puede multiplicarse</b>	Ausencia en 25 g antes de que el alimento deje de estar bajo el control inmediato del explotador de la empresa productora
	Límite de 100 ufc/g en toda la fase de comercialización
<b>3ª Categoría</b>	
<b>Resto de alimentos RTE</b>	Límite de 100 ufc/g en toda la fase de comercialización

### I.3. MÉTODOS PARA LA DETECCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE *L. monocytogenes*

Las estrictas medidas establecidas por las autoridades sanitarias que definen los límites de tolerancia de *L. monocytogenes* en alimentos, así como la obligatoriedad de aplicar sistemas de APPCC en las industrias alimentarias plantea la necesidad de disponer de métodos que detecten la contaminación por *L. monocytogenes* a lo largo de toda la cadena alimentaria. En este sentido, la búsqueda de métodos sensibles y rápidos para la detección e identificación de *L. monocytogenes* ha sido siempre uno de los objetivos principales de las autoridades sanitarias. En la Figura I.4 se relacionan de forma resumida los principales métodos de detección, aislamiento, identificación y caracterización de *Listeria* y *L. monocytogenes* en alimentos y muestras ambientales.

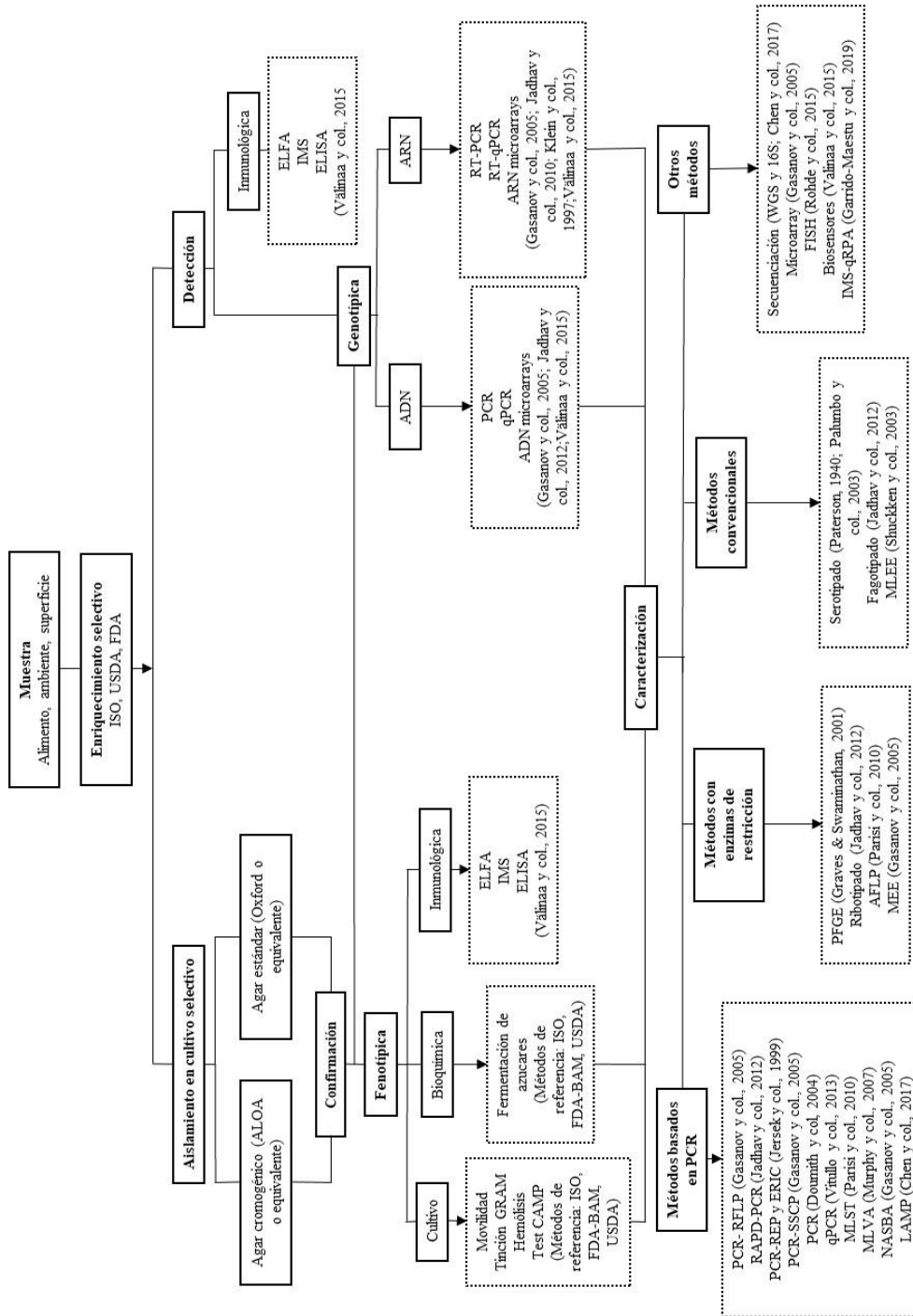


Figura I.4. Resumen de los principales métodos de aislamiento, identificación y caracterización para *Listeria monocytogenes* en alimentos y muestras ambientales. Adaptado de Chen y col., (2017); Gasanov y col.,(2005); Jadhav y col., (2012).



De forma general, el aislamiento y enumeración de microorganismos patógenos presentes en los alimentos se realizan utilizando técnicas microbiológicas convencionales basadas en métodos de cultivo estándar (Chen y col., 2017). A nivel internacional, tanto en la Unión Europea como en Estados Unidos todavía se utilizan los métodos de referencia basados en ensayos sobre medios de cultivo (Välimaa y col., 2015). En este sentido, podemos destacar el método descrito en el Manual Analítico Bacteriológico (BAM del inglés *Bacteriological Analytical Manual*) para la detección y Recuento de *L. monocytogenes* (Hitchins y col., 2017), desarrollado por la Administración Americana de Alimentos y Medicamentos o FDA (del inglés *Food and Drug Administration*), el Método descrito en la Guía de Laboratorio de Microbiología (MLG del inglés *Microbiology Laboratory Guidebook*) 8.11, para el aislamiento e identificación de *L. monocytogenes* de carnes rojas, aves de corral, pescados, productos del huevo y muestras ambientales (USDA, 2019) y el método ISO-11290 de la Organización Internacional de Estandarización para la detección y el recuento de *Listeria* spp. y *L. monocytogenes*. La mayoría de estos métodos requieren procesos de enriquecimiento en medios de cultivo diseñados para favorecer el crecimiento de *L. monocytogenes* y ralentizar el crecimiento de organismos competidores (Alessandria y col., 2010) tales como el caldo de enriquecimiento de *Listeria* tamponado (BLEB), el caldo Fraser, el caldo de enriquecimiento selectivo para *Listeria* modificado (UVM) y el medio bacteriológico y analítico utilizado en el procedimiento del BAM (Law y col., 2015a). Tras el enriquecimiento, se emplean medios específicos para el aislamiento de *Listeria* spp. como son el PALCAM y Oxford para la detección de esta bacteria patógena (Chen y col., 2017). Aparte de estos dos medios selectivos de referencia, se han desarrollado gran cantidad de medios selectivos alternativos que permiten el aislamiento de *L. monocytogenes* como el Agar Oxford Modificado (MOX; Lee y McClain, 1986), Agar LPM (Nadon y col., 2001), Agar cromogénico R&F (Jadhav y col., 2012; Saleh-Lakha y col., 2013), RAPID' L.mono (Oravcová y col., 2008), Agar Ottaviani y Agosti (ALOA) (Aznar y Alarcón, 2003; Yang y col., 2017) y CHROMagar<sup>TM</sup> *Listeria* (Aznar y Alarcón, 2003; Besse y col., 2010). En general, este tipo de métodos son sensibles y de bajo costo pero requieren mucho tiempo, pudiendo ser necesario hasta 5 o 6 días para tener un resultado disponible (Gasnov y col., 2005). Otra importante desventaja es la posible presencia de componentes que puedan inhibir el crecimiento del microorganismo patógeno durante el proceso de enriquecimiento o la presencia de otros microorganismos presentes de forma natural en

los alimentos que no van a ser inhibidos por los componentes selectivos que se utilizan en estos medios, lo cual puede dar lugar a falsos negativos (Chen y col., 2017).

La rapidez y urgencia que precisa la detección de *L. monocytogenes* no se satisface con la aplicación de los métodos tradicionales previamente mencionados, de tal manera que se hace necesario el desarrollo de nuevos métodos, a pesar de que los resultados de estos deban ser reconfirmados por los métodos de cultivo oficiales o de referencia (Conficoni y col., 2016; Valderrama y col., 2016). Los avances tecnológicos han permitido el desarrollo de métodos de detección mucho más rápidos y sensibles para el análisis de microorganismos dando lugar a nuevas metodologías basadas principalmente en técnicas inmunológicas y moleculares (Figura I.2; Chen y col., 2017; Gasanov y col., 2005; Välimaa y col., 2015). Algunos de los principales métodos utilizados en la detección y cuantificación de *L. monocytogenes* en alimentos son el inmunoensayo de flujo lateral, el ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA), el ensayo fluorescente ligado a enzimas (ELFA) y la separación inmunomagnética (IMS) (Välimaa y col., 2015). Una de las principales ventajas de los métodos inmunológicos es que pueden incluir múltiples determinaciones, reduciendo costes de análisis, reactivos y los derivados para la detección de múltiples microorganismos patógenos transmitido por alimentos (Chen y col., 2017). Sin embargo, presentan algunas desventajas como la sensibilidad, situada en un rango muy similar al de los métodos de referencia ( $10^5$  y  $10^6$  ufc/mL; Chen y col., 2017; Jadhav y col., 2012), la posibilidad de reacciones cruzadas con cepas estrechamente relacionadas, el alto coste de utilizar anticuerpos específicos y las variaciones en los niveles de expresión de los antígenos H y O de superficie (Chen y col., 2017; Jadhav y col., 2012). Por otro lado, los métodos moleculares basados en la utilización de ácidos nucleicos han supuesto una ventaja en cuanto a la detección de microorganismos patógenos como *L. monocytogenes* en alimentos, utilizando secuencias de ADN o ARN como objetivo específico en la detección del microorganismo patógeno (Välimaa y col., 2015).

Las técnicas basadas en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) han ido adquiriendo gran protagonismo en los últimos años siendo uno de los métodos de primera elección para la detección y cuantificación de *L. monocytogenes* en alimentos (Cocolin y col., 2011; Postollec y col., 2011; Sheng y col., 2018; Välimaa y col., 2015). Estas técnicas han dado lugar a protocolos automatizados, más rápidos, reproducibles, menos

expuestos a la interferencia alimentaria y con mayor sensibilidad que los métodos de referencia y los métodos inmunológicos, aumentando la probabilidad de detectar microorganismos patógenos (Jasson y col., 2010; Valderrama y col., 2016; Välimaa y col., 2015; Yeni y col., 2014). En este sentido, existen multitud de métodos de PCR que permiten la detección de *L. monocytogenes* directamente a partir de alimentos (Burbano y col., 2019; Cocolin y col., 2011; El-Sayed y col., 2019; Liu, 2006; Liu y col., 2019; Rantsiou y col., 2008; Rodríguez-Lázaro y col., 2004; Wei y col., 2019a; 2019b; Zhan y col., 2019). Las técnicas de PCR en tiempo real o cuantitativa (qPCR) se han presentado como una alternativa con ventajas considerables respecto a la PCR convencional, que hace que se aplique cada vez más en la detección y cuantificación de microorganismos contaminantes en alimentos (Fratamico y Bayles, 2005), dando lugar al desarrollo de múltiples protocolos de qPCR sensibles para la detección y cuantificación conjunta de microorganismos patógenos, incluido *L. monocytogenes* (Bhagwat, 2003; Carloni y col., 2018; Parichehr y col., 2019; Wei y col., 2019a) o bien diseñados de forma específica para *L. monocytogenes* (Cady y col., 2005; Pan y Breidt, 2007; Reyes y col., 2017; Rodríguez-Lázaro y col., 2004; Traunšek y col., 2011; Wei y col., 2019b; Yang y col., 2007). Esta técnica proporciona resultados cualitativos (presencia o ausencia de la secuencia diana) y cuantitativos (cuantificación de la cantidad de microorganismos viables presentes) de forma más rápida, sensible, específica y con menos predisposición a la contaminación cruzada que los métodos de PCR convencional basados en análisis post-PCR mediante electroforesis en gel de agarosa (Bustin 2000; Postollec y col. 2011; Rodríguez y col. 2012b; Vitullo y col. 2013). Sin embargo, el uso de las técnicas de qPCR tiene algunas limitaciones, que cada vez van siendo menores, tales como los costes de la técnica, la necesidad de personal técnico con formación especializada al respecto y la complejidad de aplicarlo en la industria (Doumith y col., 2004; Kérouanton y col., 2010).

El aislamiento, detección y cuantificación de *L. monocytogenes* no ha sido la única preocupación en la industria alimentaria, sino que también se han desarrollado métodos enfocados en la caracterización del microorganismo patógeno, dando lugar a un amplio abanico de métodos de tipificación (Figura I.4; Jadhav y col., 2012; Liu, 2006). La caracterización de *L. monocytogenes* permite el estudio epidemiológico de las cepas aisladas pudiéndose detectar las rutas de transmisión o contaminación del microorganismo patógeno en las plantas de procesado. Así, se puede detectar la existencia de cepas resistentes o persistentes, lo que facilita la aplicación de estrategias eficaces para

prevenir la contaminación (Chen y Knabel, 2008). Algunos de los métodos utilizados tradicionalmente para la caracterización de *L. monocytogenes* incluyen las técnicas de aglutinación (Palumbo y col., 2003; Schönberg y col., 1996), aunque constituyen una metodología limitada por los costes de la misma, además del tiempo necesario y formación especializada (Kérouanton y col., 2010). Por otro lado, la utilización de las técnicas de análisis de ADN ha permitido el desarrollo de métodos moleculares que no están influenciados por las condiciones ambientales y que además permiten una interpretación objetiva de los resultados. La aplicación de métodos moleculares para la caracterización de *L. monocytogenes* en plantas de procesado de jamón curado loncheado, hacen posible el estudio epidemiológico de las posibles vías de contaminación, permiten la adopción en tiempo razonable de medidas preventivas y/o correctoras según proceda, para minimizar la presencia de cepas persistentes que pueden ser foco de contaminación en las plantas de procesado.

Uno de los métodos estándar para la caracterización e investigación epidemiológica de *L. monocytogenes* es la electroforesis en campo pulsante (PFGE, del inglés *Pulsed-Field Gel Electrophoresis*) dado su alta capacidad de discriminación entre cepas en las industrias alimentarias (Amajoud y col., 2018; Carvalho y col., 2019; Melero y col., 2019; Rodríguez-López y col., 2019; Sereno y col., 2019; Sosnowski y col., 2019) y la posibilidad de detección de brotes de listeriosis (Doumith y col., 2004; Graves y Swaminathan, 2001; Jensen y col., 2016; Kotzamanidis y col., 2019; Liu, 2006). Durante las dos últimas décadas, la técnica de PFGE ha constituido el método de referencia para la caracterización de *Listeria* spp. (Graves y Swaminathan, 2001; Liu, 2006; Ribot y col., 2019). El fundamento de la técnica consiste en lisar las bacterias y digerir el ADN mediante endonucleasas de restricción con secuencias de reconocimiento poco frecuentes que dan lugar a fragmentos de gran tamaño. Posteriormente, se realiza una electroforesis en gel de agarosa empleando un gradiente de pulsos eléctricos que varían de manera alternativa en distintos ángulos, con lo que se consigue separar los fragmentos de distinto tamaño obtenidos tras la digestión. El patrón de bandas resultante se compara con el obtenido del resto de cepas y en base a las diferencias en el tamaño o peso de los fragmentos se evalúa la relación filogenética. Sin embargo, pueden ocurrir mutaciones, así como la delección o inserción de secuencias que provoquen una variación en el patrón de bandas obtenido, lo que podría dificultar su interpretación (Tenover y col., 1995). A pesar de esto último, la PFGE posee una alta sensibilidad, un elevado nivel de

especialización y poder de discriminación entre cepas y durante los últimos 20 años ha sido el método de referencia para clasificar por subtipos las distintas cepas de *L. monocytogenes* (Graves y Swaminathan, 2001; Liu, 2006). El Centro de Control y Prevención de Enfermedades (CDC de Estados Unidos), creó la red *Pulsenet International* (<http://www.pulsenetinternational.org>) en la que participan laboratorios del sistema sanitario público y agencias alimentarias y en la que se incluyen los protocolos desarrollados para la clasificación en pulsotipos de *L. monocytogenes* (Londero y col., 2019; Martín y col., 2006). En este protocolo estandarizado de PFGE para *L. monocytogenes* del CDC (CDC.gov, 2019) se relacionan las enzimas de restricción usadas (*AscI* y *ApaI*), existiendo estudios que han demostrado el excelente poder de discriminación de esta técnica cuando se usa con los aislados de *L. monocytogenes* procedentes de alimentos, plantas de procesado o pacientes con listeriosis (Amajoud y col., 2018; Carvalho y col., 2019; Fugget y col., 2007; Londero y col., 2019; López y col., 2008, 2007; Rivoal y col., 2013; Sosnowski y col., 2019; Ward y col., 2010; Zhang y col., 2019). Sin embargo, hasta el momento no existen datos sobre la caracterización de cepas de *L. monocytogenes* en zona de deshuesado y loncheado de jamón curado, donde es probable encontrar contaminaciones por esta bacteria patógena. Sería conveniente aplicar esta técnica para la caracterización de la contaminación por *L. monocytogenes* en estas zonas por la posible transcendencia en un producto RTE como el jamón curado loncheado.

El uso de métodos basados en la metodología de PCR ha dado lugar a un amplio número de procedimientos que permiten la caracterización de *L. monocytogenes* (Figura I.4). Algunas de estos procedimientos como la RAPD-PCR han sido ampliamente utilizadas para la caracterización de *L. monocytogenes* (Jadhav y col., 2012; Jamshidi y Zeinali, 2019; Lawrence y col., 1993; Mutlu y Sahin, 2019; Shakuntala y col., 2019). Igualmente, los métodos de PCR convencional y qPCR también han permitido la identificación de los principales grupos de serotipos de *L. monocytogenes* mediante la combinación de múltiples cebadores que amplifican fragmentos de genes de los diferentes serotipos (Tabla I.6).

## INTRODUCCIÓN

Tabla I.6. Resumen de los principales genes utilizados en los métodos de PCR convencional y PCR en tiempo real (qPCR) para la caracterización serotípica de *Listeria monocytogenes*.

Genes	Especificidad (Serogrupos)	Referencias
<b>PCR convencional</b>		
<b>Desconocido (D1)</b>	1/2b, 3b, 4b, 4d, 4e, 4a, 4c	Borucki y Call (2003); De Santis y col. (2007); Zhang y col. (2007)
<b>FORC68_2167</b>	1/2a, 1/2c, 3a, 3c	
<i>flaA</i>	1/2a, 3a	Borucki y Call (2003); De Santis y col. (2007); Kérouanton y col. (2010); Nho y col. (2015); Zhang y col. (2007)
<b>Región <i>gltA-gltB</i></b>	1/2b, 3b	Borucki y Call (2003); De Santis y col. (2007); Lei y col. (2001); Zhang y col. (2007)
<i>hly</i>	4a, 4c	Borucki y Call, 2003; Jinneman and Hill, 2001; Zhang y col., 2007)
<i>lmo0737</i>	1/2a, 1/2c, 3a, 3c	(Doumith y col. (2004); Kérouanton y col. (2010)
	*1/2a	Chen y Knabel (2007)
<i>lmo1118</i>	1/2c, 3c	Doumith y col. (2004); Kérouanton y col. (2010)
<b>ORF2819</b>	1/2b, 3b, 4b, 4d, 4e	Doumith y col. (2004); Kérouanton y col. (2010)
<b>ORF2110</b>	4b, 4d, 4e	Chen y Knabel (2007); Doumith y col. (2004); Kérouanton y col. (2010)
<i>LMOSLCC2372_0308</i>	*1/2c	Nho y col. (2015)
<i>LMLG-0742</i>	*3a	
<i>LMOF2365</i>	1/2b, 4b, 4d, 4e,	
<i>Lmo0525</i>	1/2a, 1/2c, 3a, 3c	Rawool y col. (2016)
<i>LMO4A</i>	4a, 4c	
<i>lmo2234</i>	<i>Listeria monocytogenes</i>	Chen y Knabel (2007)
<i>Lmo1441</i>		Rawool y col. (2016)
<i>prs</i>	<i>Listeria</i> spp.	Doumith y col. (2004); Rawool y col. (2016)
<i>iap</i>		Chen y Knabel (2007)
<b>qPCR</b>		
<i>lmo0737</i>	1/2a, 1/2c, 3a, 3c, 4b atípica <sup>a</sup>	Vitullo y col. (2013)
<i>lmo1118</i>	1/2c, 3c	
<b>ORF2819</b>	1/2b, 3b, 4b, 4d, 4e, 4b atípica <sup>a</sup>	
<b>ORF2110</b>	4b, 4d, 4e, 4b atípica <sup>a</sup>	
<i>plcA</i>	<i>Listeria</i> spp	
<i>prs</i>		

\* Secuencia diseñada que permite la caracterización específica a nivel de serotipo. <sup>a</sup>Serotipo 4b atípico de *L. monocytogenes* debido a un patrón genéticamente diferente al serotipo 4b (Huang y col., 2011).

La mayoría de las técnicas de PCR y qPCR solo permite clasificar las cepas en grupos filogenéticamente similares, donde se incluyen los principales serotipos de *L. monocytogenes* (1/2a, 1/2c, 3a, 3c, 1/2b, 3b, 4b, 4d y 4e), sin distinguir de forma específica dichos serotipos. Concretamente, la técnica de qPCR múltiple desarrollada por Vitullo y col. (2013) permite la caracterización simultánea de los 4 serogrupos que agrupan los 4 serotipos más frecuentemente aislados (1/2a, 1/2b, 1/2c y 4b) de *L.*

*monocytogenes* y que representan el 95% de los aislados procedentes de alimentos y pacientes con listeriosis (Doumith y col., 2004). Sin embargo, hasta el momento no se ha desarrollado ningún protocolo de qPCR para el serotipado simultáneo de los 4 serotipos más frecuentes (1/2a, 1/2b, 1/2c y 4b) de *L. monocytogenes*. Para ello, es necesario la utilización de genes que nos permitan la identificación específica de estos serotipos, tales como el gen *lmo0737* para identificar los serotipos 1/2a y 1/2c (Doumith y col., 2004; Huang y col., 2011), el gen *lmo0308* para la identificación del serotipo 1/2c (Nho y col., 2015), el gen ORFC (locus genómicamente equivalente a la región génica *gltA-gltB*) para la identificación específica del serotipo 1/2b (Lei y col., 2001) y el gen ORF2110 para la identificación del serotipo 4b (Doumith y col., 2004; Müller y col., 2010). La combinación de esta técnica junto con la PFGE podría ser de gran utilidad en la detección y caracterización de las fuentes de contaminación de *L. monocytogenes* en plantas de jamón curado loncheado.

Para asegurar la validez de los resultados de los métodos de PCR o qPCR y evitar resultados falsos negativos y positivos es necesario utilizar controles de amplificación (Tabla I.6) específicos tanto a nivel de género como de especie (Hoorfar y col., 2004, 2003). Los genes del ARN ribosomal (ARNr) han sido ampliamente utilizados en la detección de *L. monocytogenes* ya que poseen zonas codificante altamente conservadas (Janda y Abbott, 2007; Liu, 2006; Rodríguez-López y col., 2019; Somer y Kashi, 2003) de tal manera que también podrían ser utilizados como controles en los métodos de caracterización de *L. monocytogenes*. En este sentido, el ARNr 16S es la macromolécula más ampliamente utilizada en estudios de filogenia y taxonomía bacteriana (Rodicio y Mendoza, 2004) habiendo sido previamente utilizada como control en protocolos de detección de *L. monocytogenes* (Germini y col., 2009; Lee y col., 2014).

#### I.4. TRATAMIENTOS NO TÉRMICOS COMO MÉTODO DE CONTROL DE *L. monocytogenes* EN JAMÓN CURADO LONCHEADO

La extraordinaria capacidad de adaptación y resistencia a los factores ambientales y al procesado de alimentos de *L. monocytogenes*, hacen que la aplicación efectiva de los métodos de limpieza y desinfección, junto con la implementación de determinadas

medidas de control durante el procesado sean las únicas medidas viable para el control de *L. monocytogenes* en alimentos RTE como el jamón curado (Buchanan y col., 2017; Kurpas y col., 2018). Sin embargo, a pesar de la susceptibilidad de *L. monocytogenes* a la mayoría de los desinfectantes de uso común (Davidson y Harrison, 2002), diversos estudios han demostrado la capacidad de sobrevivir tras la aplicación de los métodos de limpieza y desinfección comúnmente utilizados en las industrias alimentarias (Fagerlund y col., 2017; Ferreira y col., 2014; Martínez-Suárez y col., 2016; Møretrø y col., 2019; Møretrø y Langsrud, 2004). Por esta razón, la reducción de contaminación por *L. monocytogenes* de productos como el jamón curado loncheado no puede basarse sólo en la aplicación de tratamientos eficaces de limpieza y desinfección o en la utilización de medidas preventivas de higiene durante el procesado, sino que debe incluir además la aplicación de determinadas estrategias de control que permitan minimizar la presencia y desarrollo de *L. monocytogenes*, cumpliendo además con la preferencia actual hacia los alimentos mínimamente procesados (Garriga y col., 2004). Entre las estrategias a utilizar se pone de manifiesto aplicar alternativas basadas en la teoría de obstáculos de Leistner, entendiendo la inactivación microbiana como una serie de barreras de obstáculos que las células bacterianas deben superar para poder ser viables tras el procesado del alimento (Leistner, 1978; Sadeghi-Mehr y col., 2016). En jamón curado estos obstáculos van a ser las propias características intrínsecas ( $a_w$ , pH, concentración de NaCl) y extrínsecas (temperatura y condiciones de secado, maduración y envasado) del producto, que contribuyen al control de los microorganismos patógenos (Sadeghi-Mehr y col., 2016).

El jamón curado es un producto cuyas condiciones ( $a_w$  y concentración de NaCl) son suficientes para inhibir el crecimiento de *L. monocytogenes*. Sin embargo, los valores de  $a_w$  durante las fases de salado y postsalado, así como el de las lonchas envasadas a vacío puede llegar a ser superior a 0,92 (Hereu y col., 2012; Rodríguez y col., 1994). En estas condiciones unidas a las de un posible almacenamiento incorrecto del producto en comercios minoristas bajo temperaturas de abuso (Buchanan y col., 2017; Stollewerk y col., 2014), sumado a la posibilidad de contaminación del producto RTE durante deshuesado y loncheado y o al, podría favorecer el crecimiento del microorganismo patógeno, que puede haber llegado por contaminación durante deshuesado, prensado o loncheado. Es necesario pues, controlar el crecimiento de *L. monocytogenes* durante las fases de procesado y distribución. Por otro lado, desde las Autoridades Competentes en materia de sanidad y alimentación, se han desarrollado iniciativas dirigidas a disminuir el



elevado consumo de sal en Europa. Para ello, el Ministerio de Sanidad, Servicios Sociales e Igualdad ha presentado el “Plan de Reducción del Consumo de Sal” (2008) y el “Plan de colaboración para la mejora de la composición de los alimentos y bebidas y otras medidas” (este último en vigor), cuyos principales objetivos son la reducción de sal en los alimentos, afectando a los derivados cárnicos curado-madurados, tales como el jamón curado. Por esta razón, se están llevando a cabo acciones desde industrias del sector cárnico para la reducción de sal en jamones, lo cual afectaría, no solo a la composición en NaCl, sino también a la  $a_w$  del producto. La reducción de sal en este tipo de productos podría incrementar la frecuencia de aparición de los peligros microbiológicos lo cual conlleva la necesidad de ajustar otros factores estabilizadores, como la sustitución parcial o total por otras sales, utilización de agentes antimicrobianos o modificación de las condiciones de procesado y almacenamiento, alargando la fase de post-salado a baja temperatura hasta alcanzar una reducción de la  $a_w$  del jamón por debajo del límite de crecimiento de *L. monocytogenes* (AESAN, 2010). Partiendo entonces de las singularidades que tiene el jamón curado y de la premisa de aplicar obstáculos que impidan el crecimiento de los microorganismos patógenos, el desarrollo de las denominadas tecnologías emergentes adquiere mayor protagonismo en el ámbito de este producto para eliminar *L. monocytogenes* (Aymerich y col., 2008; Bover-Cid y col., 2011; Garriga y col., 2004; Hereu y col., 2012; Hoz y col., 2008; Hugas y Monfort, 2002; Jofré y col., 2009; Seman y col., 2002). En este sentido, el desarrollo y aplicación de tratamientos no térmicos como las altas presiones hidrostáticas (HPP del inglés *High Pressure Processing*) o las irradiaciones ionizantes con electrones acelerados (E-beam) han demostrado ser efectivas al ser aplicadas de una forma viable a nivel industrial para inactivar o matar las bacterias patógenas presentes en los alimentos o las materias primas (Bover-Cid y col., 2011; Bover-Cid y Garriga, 2014; Cho y Ha, 2019; Hereu y col., 2012; Hoz y col., 2008; Jeong y Kang, 2017; Jofré y col., 2009; Lung y col., 2015; Pérez-Baltar y col., 2019; Skowron y col., 2018; Velasco y col., 2015).

La aplicación de tratamientos HPP permite inactivar microorganismos a temperatura ambiente, con un efecto mínimo sobre la temperatura, sabor, color, textura y características nutricionales del producto final (Bover-Cid y col., 2015; Garriga y Aymerich, 2009; Rastogi y col., 2007). Además, esta metodología está recomendada y aceptada por organizaciones e instituciones de seguridad alimentaria de todo el mundo para la inactivación de *L. monocytogenes* en diferentes alimentos (Bover-Cid y col.,

2015). La aplicación de altas presiones produce un daño en las membranas celulares (Bowman y col., 2008), además de tener efectos sobre otras partes vitales de la célula bacteriana, afectando principalmente a las proteínas y ácidos nucleicos (Gross y Jaenicke, 1994; Kawarai y col., 2004; Mackey y col., 1995; Mañas y Mackey, 2004). Sin embargo, también se han encontrado limitaciones a la hora de implementar los tratamientos HPP para el control de *L. monocytogenes*, como la adquisición de resistencias a los mismos (Gayán y col., 2017; Mackey y col., 1995), pudiendo afectar la presencia de determinados ingredientes o las propias condiciones ecológicas del producto a dicha resistencia. Así, se ha demostrado un incremento de la resistencia ante la presencia de NaCl, altas concentraciones de grasa o valores bajos de  $a_w$  (Erkmen y Dogan, 2004; Hayman y col., 2008; Hereu y col., 2012; Koseki y Yamamoto, 2006; Morales y col., 2006). Por lo que respecta a los tratamientos de alimentos con E-beam, han sido referenciados como eficaces en la reducción de microorganismos patógenos, alargando la vida útil de los alimentos y reduciendo los riesgos de la contaminación posterior al procesado de productos RTE (Ibrahim, 2013). Este tipo de tratamientos tiene su efecto principalmente a nivel molecular, dañando las moléculas de ADN de los microorganismos patógenos por lo que las células vivas no van a poder reproducirse. Sin embargo, a pesar de haberse convertido en una de las técnicas más exitosas para el control de los microorganismos patógenos, se han descritos algunos efectos perjudiciales sobre los alimentos que pueden limitar su utilización (Ibrahim, 2013). Algunos estudios sobre productos cárnicos han indicado la relación entre la intensidad de la radiación con electrones acelerados y los efectos negativos en las propiedades sensoriales, tales como el aroma, color y flavor (Ahn y col., 2000; Lee y Ahn, 2005), de tal manera que hace necesario ajustar cuidadosamente las dosis de irradiación para lograr un nivel adecuado de seguridad microbiana sin afectar a las propiedades sensoriales del producto (Cabeza y col., 2007). Además, la irradiación con electrones acelerados sobre *L. monocytogenes* no es la forma de irradiación más efectiva, por eso sería interesante la combinación de varias tecnologías, como la irradiación a bajas dosis y la utilización de agentes antimicrobianos o métodos de biocontrol (Ibrahim, 2013). Otro tipo de tratamientos no térmicos y eficaces para el control de *L. monocytogenes* son la aplicación de pulsos de luz sobre la superficie del producto y material de envasado en contacto con alimentos (Ganan y col., 2013; Hierro y col., 2011; Mahendran y col., 2019; Ozer y Demirci, 2006; Rajkovic y col., 2017, 2010b) o los tratamientos con pulsos eléctricos utilizados principalmente en alimentos líquidos como lácteos, derivados y zumos (Mosqueda-Melgar y col., 2008, 2007; Reina

y col., 1998; Upadhyay y col., 2019). La aplicación de pulsos eléctricos también ha sido utilizada con interés tecnológico sobre el proceso de salado del jamón curado, sin embargo, son necesarios más estudios sobre la aplicación y los efectos de esta metodología en una matriz cárnica como el jamón curado (McDonnell y col., 2014).

Además de la aplicación de tratamientos no térmicos para la eliminación de *L. monocytogenes*, diversos estudios han puesto de manifiesto la efectividad de diferentes compuestos en el control de *L. monocytogenes* en distintos tipos de alimentos o sobre superficies en contacto con alimentos como son las sales de ácidos orgánicos tales como lactato potásico, sódico o diacetato sódico (Bover-Cid y col., 2019; Chen y col., 2019; Eraclio y col., 2018; Kwon y col., 2019; Stasiewicz y col., 2011; Tompkin, 2002) y aceites esenciales y derivados de vegetales (Jayasena y Jo, 2013; Pérez-Baltar y col., 2019; Salamci y col., 2007; Silva y col., 2019; Upadhyay y col., 2013; Vasilijević y col., 2019). Algunos de estos compuestos como el trans-cinamaldehído, el carvacrol y el timol, reconocidos en la categoría “GRAS” (del inglés *Generally Recognised As Safety*) de la FDA, han demostrado un efecto inhibitorio frente a *L. monocytogenes* en productos cárnicos (Upadhyay y col., 2013) e incluso en jamón curado (Pérez-Baltar y col., 2019). Sin embargo, su aplicación en jamón curado puede suponer una modificación de algunas características sensoriales específicas de este producto como son el sabor y el aroma, lo que limita enormemente sus posibilidades de uso.

Finalmente, la aplicación de estrategias de biocontrol representan otra de las principales alternativas como parte de la teoría de obstáculos. Esta metodología constituye una de las principales herramientas para el control de los microorganismos patógenos y alterates, mejorando la seguridad alimentaria de los productos (Goerges y col., 2006), permitiendo además satisfacer la demanda actual de alimentos mínimamente procesados, naturales y con óptimas características sensoriales (Aymerich y col., 2008; Hereu y col., 2012), al mismo tiempo que prolongan su vida útil e incrementan la letalidad de otras técnicas, como las altas presiones, sobre los microorganismos patógenos (Aymerich y col., 2008; Hugas y Monfort, 2002). La metodología se basa en aprovechar el efecto antimicrobiano de determinados microorganismos presentes en la población microbiana autóctona, o añadir intencionadamente microorganismos o compuestos producidos por estos con capacidad antimicrobiana (Aymerich y col., 2008; Lucke, 2000; Työppönen y col., 2003). La utilización de microorganismos o sus compuestos derivados

como cultivos protectores constituye uno de los principales mecanismos de biocontrol frente a *L. monocytogenes* (Tabla I.7). La utilización de BAL ha sido ampliamente desarrollada por tratarse de un grupo de microorganismos tradicionalmente implicados en los procesos de fermentación de alimentos tales como productos lácteos, productos de panadería o en vegetales (Coelho y col., 2014; Goerges y col., 2011; Quijada y col., 2018). El mecanismo de acción de las BAL derivado fundamentalmente de la competición por nutrientes o de la producción de compuestos antimicrobianos han hecho que dicha estrategia constituya uno de los métodos de biocontrol más extendidos para mejorar la seguridad de los alimentos sin alterar sus características sensoriales (Aymerich y col., 2008; Goerges y col., 2006).

Sin embargo, las BAL no se encuentran durante todo el proceso de elaboración del jamón curado, ni en el producto acabado, dado que habitualmente se inhiben tras la reducción de  $a_w$  de producto que tiene lugar al final de post-salado/inicio de secado-maduración (Molina y col., 1989). Esto hace que no sea una estrategia adecuada para el control de *L. monocytogenes* en jamón curado. Por otro lado, las levaduras sí constituyen uno de los grupos microbianos predominantes durante el procesado hasta las fases finales de elaboración del jamón curado (Andrade y col., 2009; Núñez y col., 1996b), alcanzando niveles importantes (superiores en muchas ocasiones a  $\log 6$  ufc/g), dependiendo del proceso de elaboración y del tipo de producto (Simoncini y col., 2007). *Debaryomyces hansenii* es la especie de levadura predominante en jamón curado (Andrade y col., 2009; Núñez y col., 1996b), y su utilidad como agente de biocontrol frente a mohos toxigénicos ha sido demostrada en derivados cárnicos curado-madurados (Andrade y col., 2014; Iacumin y col., 2017; Núñez y col., 2015; Peromingo y col., 2019, 2018; Simoncini y col., 2014; Toledano y col., 2019). Además, *D. hansenii* es considerada como un “microorganismo seguro” por el grupo de expertos sobre Seguridad Biológica de la EFSA (EFSA BIOHAZ Panel y col., 2017), se ha demostrado su efecto probiótico en estudios *in vitro* (Ochangco y col., 2016) y sus efectos beneficiosos sobre las características sensoriales de los derivados cárnicos curado-madurados han sido igualmente demostrados (Andrade y col., 2010; Cano-García y col., 2013; Corral y col., 2014, 2015; Martín y col., 2006).

## INTRODUCCIÓN

Tabla I.7. Tratamientos de biocontrol mediante la utilización de bacterias ácido lácticas (BAL), bacteriocinas y bacteriófagos para el control de *Listeria monocytogenes* en distintos tipos de alimentos.

Metodo de biocontrol	Alimento sometido al tratamiento	Reducción (log ufc)	Referencias
<b>BAL</b>			
<i>Lactobacillus plantarum</i> productor de bacteriocinas	Salami Italiano	< 1/g	Campanini y col. (1993)
	Salchichón de cerdo	No disponible	Zanette y col. (2015)
<i>Pediococcus acidilactici</i> productor de pediocina	Salchichón de pollo	2,6/g	Baccus-Taylor y col. (1993)
	Salchichón y Salchicha tipo Frankfurt	2	Nieto-Lozano y col. (2010)
<i>Enterococcus faecium</i> productor de pediocina	Leche y quesos fermentados	No disponible	Leroy y col. (2003)
<i>P. pentosaceus</i>	Salchicha fermentada tradicional portuguesa	No disponible	Albano y col. (2007)
<i>L. sakei</i> productor de sacacina	Jamón cocido loncheado envasado al vacío	<2/g	Gao y col. (2015)
<i>Lactococcus lactis</i>	Queso Italiano Gorgonzola	< 1/g	Morandi y col. (2019)
<i>L. rhamnosus</i>	Puré de Patata	< 1/g	Muñoz y col. (2019)
<i>E. hirae</i> y <i>P. pentosaceus</i>	Medio de cultivo	No disponible	Cavicchioli y col. (2001)
<b>Bacteriocinas</b>			
Nisina producida por <i>L. lactis</i>	Jamón curado loncheado	< 4	Hereu y col. (2012)
	Jamón cocido loncheado	< 2	Figueiredo y Almeida (2017)
Enterocinas A y B producidas por <i>E. faecium</i>	Jamón cocido loncheado	<2/g	Marcos y col. (2008)
	Jamón curado loncheado	> 2,5	Pérez-Baltar y col. (2019)
Pentocina 31-1 producida por <i>L. pentosus</i>	Jamón tradicional chino	No disponible	Zhou y col. (2008)
Plantaricina producida por <i>L. plantarum</i>	Medio de cultivo	No disponible	Müller y col. (2009)
ST22Ch, ST153Ch y ST154Ch producidas por <i>L. sakei</i>	Medio de cultivo	No disponible	Todorov y col. (2013)
Enterocinas NKR-5-3A, B, C, D, Z producidas por <i>E. faecium</i>	Medio de cultivo	No disponible	Ishibashi y col. (2012)
Sacacina P y X producida por <i>L. curvatus</i>	Salami Italiano	<2	Souza y col. (2015)
Bacteriocina Dur 152A y L50B producidas por <i>E. durans</i>	Jamón cocido loncheado	>5/g	Du y col. (2017)
Sacacina C2 producida por <i>L. sakei</i>	Jamón cocido loncheado envasado al vacío	< 4/g	Gao y col. (2015)
Bacteriocina DY4-2 producida por <i>L. plantarum</i>	Filetes de rodaballo	No disponible	Lv y col. (2018)
<b>Bacteriófagos</b>			
Bacteriofago A511	Chocolate, leche, queso mozzarella, perritos calientes, pavo loncheado, salmón ahumado, marisco, repollo de col y hojas de lechuga	> 5	Guenther y col. (2009)
	Queso curado y semicurado	> 3	Guenther y Loessner (2011)
ListShield™	Jamón curado loncheado	3,5	Gutiérrez y col. (2017)
	Lechuga, queso, salmón ahumado, comidas preparadas para aviones (carne de ternera, patatas, brócoli y salsa de tomate)	>2	Perera y col. (2015)
Bacteriofago P100 (comercializado como Listex™ P100)	Jamón cocido loncheado	>2/g	Figueiredo y Almeida (2017)
	Chocolate, leche, queso mozzarella, perritos calientes, pavo loncheado, salmón ahumado, marisco, repollo de col y hojas de lechuga	> 5	Guenther y col. (2009)
	Jamón curado loncheado	> 5	Gutiérrez y col. (2017)
	Jamón curado italiano	>2/cm <sup>2</sup>	Iacumin y col. (2016)
	Pavo cocido loncheado	No disponible	Eraclio y col. (2018)

El principal mecanismo de acción de las levaduras antagonistas parece ser la competición por los nutrientes y el espacio (Andrade y col., 2014; Simoncini y col., 2014; Virgili y col., 2012; Zhao y col., 2008). Otros estudios han atribuido su efecto bioprotector a la producción de compuestos volátiles con actividad antifúngica (Masoud y col., 2005; Núñez y col., 2015) o la producción de proteínas *killer* (Magliani y col., 1997; Marquina y col., 2002), aunque el efecto de estas últimas se limita prácticamente frente a levaduras y la información existente sobre su efecto frente a otro tipo de microorganismos es bastante limitada (Liu y col., 2015; Magliani y col., 1997; Mannazzu y col., 2019; Marquina y col., 2002). Su eficacia como agente protector se ve acentuada por la tolerancia para crecer en altas concentraciones de sal y valores bajos de  $a_w$ , lo cual hace que su aplicación como cultivo protector en este tipo de productos sea muy interesante (Breuer y Harms, 2006; Gori y col., 2012; Masoud y Jakobsen, 2005).

Por otro lado, algunos estudios han demostrado el efecto inhibidor de *D. hansenii* frente a microorganismos patógenos tales como *Staphylococcus aureus* y *Clostridium tyrobutyricum* (Faticenti y col., 1983; Meisel y col., 1989). De igual modo, existen estudios que demuestran el efecto inhibidor de *D. hansenii* frente a *L. monocytogenes* en quesos y productos lácteos (Goerges y col., 2011, 2006; Zhao y col., 2004). Aunque no se ha evaluado su utilidad en jamón curado, estos estudios abren la puerta a su posible uso como cultivo protector en jamón curado loncheado.

A pesar de todo lo anterior, la utilización de cultivos protectores en jamón curado no es una estrategia muy utilizada (Sánchez-Molinero y Arnau, 2008). A la hora de implementar una estrategia de biocontrol, es necesario tener en cuenta el efecto de ésta sobre las características del producto acabado. En este sentido, algunos autores sugieren que dicha utilización podría tener efectos positivos sobre las características sensoriales del producto (Andrade y col., 2010; Boadas y col., 2000; Martín y col., 2000; Núñez y col., 1998), mientras que otros trabajos destacan el efecto negativo de dicha utilización, perjudicando las características sensoriales del producto final (Sánchez-Molinero y Arnau, 2008). Por ello, resulta de gran importancia llevar a cabo análisis sensoriales para evaluar de forma particular cualquier tratamiento sobre un producto determinado. Satisfacer las necesidades del consumidor es prioritario, de tal manera que la aceptación de los consumidores de un producto alimenticio es el aspecto más importante a la hora de desencadenar compras posteriores (Resano y col., 2010).

## I.5. EVALUACIÓN DE LA VIABILIDAD DE *L. monocytogenes* EN JAMÓN CURADO TRAS LA APLICACIÓN DE TRATAMIENTOS NO TÉRMICOS

Las condiciones propias alcanzadas en jamón curado durante el procesado (presencia de NaCl, reducción de  $a_w$ ), así como la utilización de tratamientos no térmicos, como los tratamientos de biocontrol, HPP o E-beam, pueden ser efectivos en el control del peligro de contaminación y desarrollo de *L. monocytogenes*. Sin embargo, resulta necesario evaluar la eficacia y el efecto de la aplicación de dichos tratamientos sobre *L. monocytogenes*. La utilización de dichos tratamientos puede tener un mayor o menor efecto sobre el control del microorganismo patógeno, pero es muy difícil que tenga capacidad para acabar con toda la carga microbiana de *L. monocytogenes*. En este sentido, la efectividad de dichos métodos puede evaluarse mediante el recuento de *L. monocytogenes* en medios de cultivo selectivos para cuantificar la tasa de reducción tras dichos tratamientos. Sin embargo, se ha puesto de manifiesto la posibilidad de que la exposición de este microorganismo a condiciones estresantes subletales, como podría ser la exposición a cualquiera de estos tratamientos, favorece su adaptación y respuesta dando lugar a cambios en la expresión génica de *L. monocytogenes* (Garner y col., 2006a). Es por esto, por lo que sería de gran utilidad para complementar la evaluación de la eficacia de las condiciones propias del jamón curado y de los tratamientos no térmicos, el análisis de la expresión de genes implicados en la virulencia y respuesta al estrés de las cepas de *L. monocytogenes* que resisten los tratamientos, mediante la utilización de métodos moleculares.

### I.5.1. Genes implicados en la virulencia y respuesta al estrés de *L. monocytogenes*

El parasitismo o colonización intracelular de *L. monocytogenes* comprende varias etapas tales como adhesión e invasión de la célula hospedadora, escape de la vacuola, multiplicación intracelular y proliferación extracelular (Figura I.5). (Vera y col., 2013) en cada una de las cuales están involucrados múltiples factores de virulencia (Tabla I.8). La entrada de la bacteria en la célula del hospedador (Figura I.5, etapa 1) está mediada por las interacciones de internalinas InlA e InlB, además de por la participación de otras proteínas como ActA, Ami, Auto y P60. La bacteria penetra en su interior induciendo su

propia fagocitosis y queda englobada en un fagosoma primario. Tras esto, la bacteria escapa de la vacuola por la acción de la hemolisina LLO (listeriolisina O), las fosfolipasas PlcA y PlcB y la metaloproteasa Mpl (Figura I.5, etapa 2). Posteriormente, la bacteria se multiplica en el citosol con ayuda de varios factores, como la internalina InlC, el sistema de captación de azúcar Hpt, la N-desacetilasa de peptidoglicano PgdA y la O-acetiltransferasa de pared OatA, que favorecen el crecimiento intracelular y la evasión del sistema inmune (Figura I.5, etapa 3). Dentro del citoplasma, la proteína superficial ActA induce la formación de filamentos llamados colas de cometa de actina (Figura I.5, etapa 4). La interacción de InlC con la proteína de unión a la actina TubA, junto con los filamentos o colas de actina, permiten la propagación de la bacteria de célula a célula rodeándose a su paso de una vacuola de doble membrana (Figura I.5, etapa 5). Durante el ciclo intracelular, LLO, PlcA y PlcB permiten la ruptura consecutiva de la vacuola de doble membranas que ha rodeado a la bacteria desde su fagocitosis en el paso de célula a célula (Figura I.5, etapa 6).

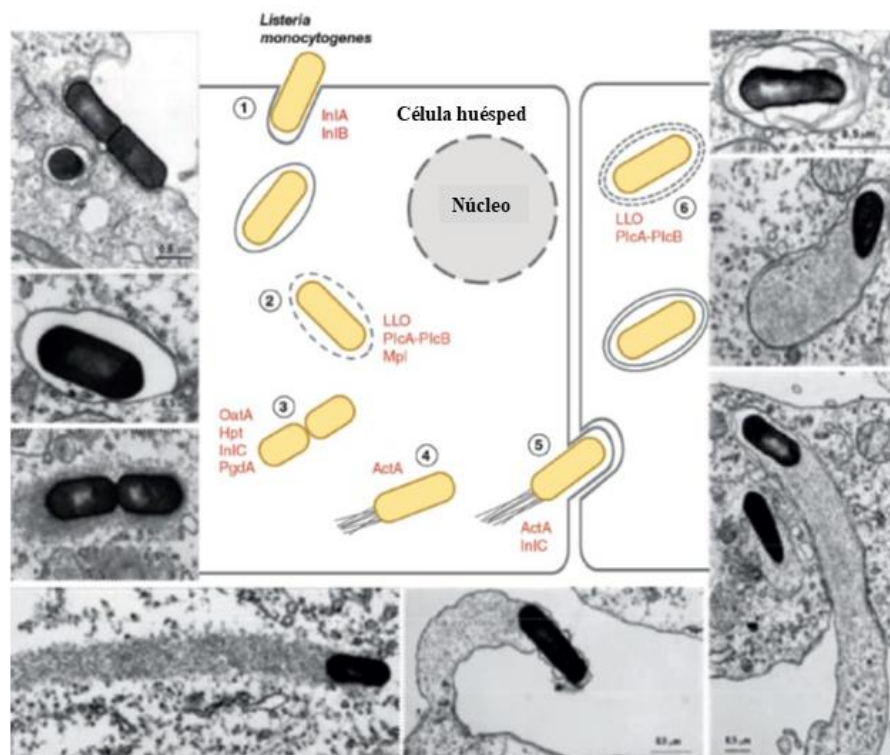


Figura I.5. Esquema del ciclo intracelular de *Listeria monocytogenes*. (1) Entrada de *L. monocytogenes* en el interior del huésped mediante la interacción de las internalinas InlA e InlB con sus receptores específicos. (2) Escape de la bacteria de la vacuola fagocítica a través de la acción de la hemolisina LLO, las fosfolipasas PlcA y PlcB y la metaloproteasa Mpl. (3) Multiplicación y evasión del sistema inmune de *L. monocytogenes* en el citosol de la célula huésped gracias al sistema de absorción de azúcar Hpt, la internalina InlC, y los peptidoglucanos N-desacetilasa PgdA y OatA. (4) Formación de filamentos llamados colas de cometa de actina inducido por la proteína superficial ActA. (5) Los filamentos de actina y la interacción de la internalina InlC con la proteína de unión a la actina TubA, permiten la propagación de la bacteria célula a célula, rodeándose de una vacuola de doble membrana a su paso de una célula a otra. (6) Las proteínas LLO, PlcA y PlcB van a permitir la ruptura consecutiva de la vacuola de doble membrana que ha rodeado a la bacteria desde su fagocitosis en el paso anterior. Adaptado de Rolhion y Cossart (2017).



Para llevar a cabo la colonización efectiva del huésped, *L. monocytogenes* debe regular de forma coordinada la expresión de todos los genes de virulencia que participan (Tabla I.8; *plcA*, *hly*, *mpl*, *actA*, *plcB*, *inlA*, *inlC* y *hpt*) los cuales son regulados principalmente por la proteína reguladora PrfA (de las Heras y col., 2011; Guldemann y col., 2017; Scotti y col., 2007). El gen *prfA* está presente en todas las cepas de *L. monocytogenes*. La proteína PrfA, de 27 KiloDaltons (KDa), regula directamente la transcripción de los principales factores de virulencia, incluidas las proteínas de superficie InlA e InlB, la proteína InlC, la listeriolisina O, las fosfolipasas PlcA y PlcB, las proteínas Mpl y ActA y la proteína transportadora de hexosa fosfato (Rolhion y Cossart, 2017). Además de las proteínas internalinas Inl, reguladas por la proteína PrfA, se han descrito alrededor de 27 InL en *L. monocytogenes* entre las que se puede destacar algunas proteínas con actividad de autolisina como Auto, Ami y P60 (López y col., 2006; Pilgrim y col., 2003) y que resultan también fundamentales para que *L. monocytogenes* atraviese e invada la barrera intestinal.

Tabla I.8. Principales factores de virulencia de *Listeria monocytogenes* involucrados en su ciclo intracelular. Adaptado de Vera y col. (2013).

Localización cromosoma	Gen	Producto del gen	Función	Referencia
LIPI-1	<i>hly</i>	Listeriolisina O (LLO)	Lisis del fagosoma	Camejo y col. (2011); Gedde y col. (2000); Vázquez-Boland y col. (2001)
	<i>plcA</i>	Fosfatidilinositol fosfolipasa C (PI- PLC)	Lisis del fagosoma	Camejo y col. (2011); Liu y col. (2007a); Roche y col. (2005)
	<i>plcB</i>	Fosfatidilcolina fosfolipasa C (PC- PLC)	Lisis del fagosoma	Camejo y col. (2011); Liu y col. (2007a); Roche y col. (2005)
	<i>mpl</i>	Precursor de metaloproteasa dependiente de zinc (Mpl)	Procesa al precursor PC-PLC a su forma madura	Camejo y col. (2011); Vázquez-Boland y col. (2001)
	<i>prfA</i>	Factor regulador positivo A (PrfA)	Requerida para la expresión de los factores de virulencia de <i>L. monocytogenes</i>	Camejo y col. (2011); Kuhn y Goebel (2007); Vázquez-Boland y col. (2001)
	<i>actA</i>	Proteína inductora de ensamblaje actina	Participa en la movilidad intra-intercelular	Camejo y col. (2011); Kuhn y Goebel (2007); Vázquez-Boland y col. (2001); Yoshikawa et al. (2009)
Exterior LIPI-1	<i>hpt</i>	Proteína transportadora de hexosa fosfato	Requerido para el crecimiento intracelular	Camejo y col. (2011); Vázquez-Boland y col. (2001)
	<i>inlA</i>	Internalina A (InlA)	Participa en la invasión celular	Bonazzi y col. (2009); Camejo y col. (2011); Jonquières y col. (1999); Shen y col. (2000); Vázquez-Boland y col. (2001)
	<i>inlB</i>	Internalina B (InlB)	Molécula señalizadora y participa en la invasión celular	Bonazzi y col. (2009); Camejo y col. (2011); Jonquières y col. (1999); Shen y col. (2000); Vázquez-Boland y col. (2001)
	<i>inlC</i>	Internalina C (InlC)	Participa en la propagación celular	Bonazzi y col. (2009); Vázquez-Boland y col. (2001)
	<i>inlJ</i>	Internalina J (InlJ)	Participa en la adhesión celular	Camejo y col. (2011); Sabet y col. (2005)

También se conoce la existencia de otros reguladores que afectan a la virulencia, pudiendo actuar como activadores o represores de los genes (de las Heras y col., 2011; Dussurget, 2008). Así, el regulador de estrés, el factor  $\sigma^B$ , codificado por el gen *sigB*, juega un papel muy importante tanto en la supervivencia de *L. monocytogenes* al ser expuesta a un estrés ambiental, como en la regulación de la transcripción de genes reguladores como el *prfA* o de virulencia como *bsh*, *inlA* e *inlB* (Chaturongakul y Boor, 2006; Guldemann y col., 2017; Kazmierczak y col., 2003; Nadon y col., 2002; Oliver y col., 2010; Vera y col., 2013). Existen otros reguladores como el VirR, involucrado en la transcripción de 17 genes de virulencia (Oliver y col., 2010); el regulador AgrA, relacionado con la formación de biopelículas (Garmyn y col., 2012) y los reguladores MogR, DegU y GmaR relacionados con la movilidad de *L. monocytogenes* (Camejo y col., 2011).

Diversos estudios han demostrado como la expresión génica de *L. monocytogenes* puede estar influenciada por los factores propios del alimento, tales como el pH, la  $a_w$ , la temperatura o incluso la disponibilidad de nutrientes (Hadjilouka y col., 2016; Kazmierczak y col., 2003; Liu y col., 2014b; Makariti y col., 2015; Mataragas y col., 2015; Midelet-Bourdin y col., 2006; Olesen y col., 2010; Schrama y col., 2013). Por otro lado, algunos estudios han demostrado cambios en su expresión génica tras la exposición a extractos antimicrobianos naturales derivados de plantas (Hadjilouka y col., 2017; Pieta y col., 2017; Upadhyay y col., 2012) o sometidos el efecto de la aplicación de tratamientos de HPP (Bowman y col., 2008). De acuerdo a esto, las condiciones propias del producto y las que se encuentran durante la fase de conservación (el almacenamiento en refrigeración del producto loncheado, la presencia de NaCl y los valores de  $a_w$ ) así como la utilización de cultivos protectores podría afectar a la expresión génica con la consiguiente alteración en la viabilidad y virulencia de *L. monocytogenes* (Garner y col., 2006; Kang y col., 2019; Lin y col., 2010; Olesen y col., 2010; 2009; Upadhyay y col., 2012). Para evaluar el efecto de dichas condiciones o tratamientos sobre *L. monocytogenes* es necesaria la aplicación de métodos que permitan el estudio de la expresión génica de genes de virulencia y de respuesta al estrés de *L. monocytogenes* sometida a la influencia de dichas condiciones o tratamientos, lo cual sería de gran utilidad para evaluar el comportamiento de este microorganismo patógeno desde el punto de vista de la seguridad alimentaria, permitiendo evaluar el efecto de las estrategias de

control o de las condiciones propias del jamón curado loncheado sobre la viabilidad del microorganismo patógeno.

### I.5.2. Evaluación de la expresión génica de *L. monocytogenes* mediante RT-qPCR

El análisis de la expresión génica se basa en conocer cómo la información de un gen se está utilizando en la síntesis de un producto génica funcional, lo cual resulta fundamental para la diferenciación celular, la morfogénesis y la adaptación de cualquier organismo vivo a su entorno (Mazza y Mazzette, 2014). Mediante dicho análisis podemos evaluar que genes están involucrados en la adaptación de *L. monocytogenes* a un entorno concreto o cual está siendo la respuesta de dicho microorganismo ante un estímulo determinado, como podría ser la aplicación de un tratamiento o la presencia de un determinado compuesto. El análisis cuantitativo de la expresión génica nos va a permitir evaluar la cantidad de la secuencia de un gen concreto presente ante una situación o condición determinada. Para ello, el análisis de la expresión génica a nivel de ARN mensajero (ARNm) es uno de los componentes clave en la genómica funcional (Mazza y Mazzette, 2014). La utilización de las técnicas de PCR convencional basadas en el ADN no permiten distinguir entre células viables y no viables de los microorganismos (Gasánov y col., 2005; Klein y Juneja, 1997; Wolffs y col., 2005). Esto resulta en un aspecto fundamental para evaluar el comportamiento real de un microorganismo patógeno, pues la detección del ADN de células muertas implica la obtención de falsos positivos (Gasánov y col., 2005; Wolffs y col., 2005), lo que se traduce en una sobreestimación del riesgo (Auvolat y Besse, 2016). Para resolver este problema, la técnica de transcripción inversa (RT) acoplada a una PCR convencional (RT-PCR) o a una PCR en tiempo real (RT-qPCR) permite la detección exclusiva de células microbianas viables mediante la amplificación del ARNm, cuya viabilidad en las células muertas es inferior a la del ADN (Ye y col., 2012), degradándose rápidamente por acción de ARNasas y de factores ambientales como el calor (Gasánov y col., 2005), lo que va a permitir su utilización como marcador de la viabilidad celular (Ye y col., 2012). Aunque existen estudios que han evaluado el efecto de la expresión génica mediante RT-PCR (Bowman y col., 2008) la mayoría de los métodos desarrollados lo han hecho utilizando la metodología RT-qPCR. La utilización de esta metodología permite una detección rápida, altamente sensible, específica y precisa, permitiendo la cuantificación de

pequeños cambios en la expresión génica sin necesidad de un procesamiento posterior (Bernáldez y col., 2017; Bustin, 2000; Ferradás y col., 2016; Lozano-Ojalvo y col., 2013; Radonić y col., 2004; VanGuilder y col., 2008). Esta técnica se compone de tres etapas: primero se sintetiza el ADN complementario (ADNc) a partir del ARN extraído de la muestra mediante la acción de la enzima transcriptasa inversa (Valasek y Repa, 2005); posteriormente se amplifica el ADNc mediante la reacción de qPCR y finalmente se van a analizar los datos obtenidos en la qPCR (Nolan y col., 2006). Esto permite, monitorizar a partir del ADNc, cambios en la expresión de los genes implicados en la virulencia y respuesta al estrés de *L. monocytogenes*.

Sin embargo, la aplicación de estas técnicas sobre muestras biológicas puede alterar considerablemente la sensibilidad y especificidad de las pruebas, debido principalmente a la posible presencia de determinados compuestos que actúan como inhibidores (Al-Soud y Radstrom 2000; Auvolat y Besse 2016; Bustin y Nolan 2004; Rådström y col. 2004; Rodríguez-Lázaro y col., 2005), entre los que destaca la influencia de los inhibidores de la matriz alimentaria, tales como lípidos (Wilson, 1997), glucógeno (Rådström y col., 2004; Wilson, 1997), o calcio (Bustin y Nolan, 2004; Rådström y col., 2004; Wilson, 1997).

Los estudios de expresión génica pueden realizarse de acuerdo a dos modalidades: cuantificación absoluta y cuantificación relativa.

### *1.5.2.1. Cuantificación absoluta*

En la cuantificación absoluta se determina el número de copias del gen diana correspondiente transcrito a ADNc mediante la extrapolación de su valor de Ct obtenido en la reacción qPCR en la curva estándar previamente generada a partir de diluciones conocidas de las copias de ese gen (Livak y Schmittgen, 2001; Rodríguez y col., 2015). Estas curvas son altamente reproducibles y permiten generar datos específicos y muy sensibles, de tal manera que deben ser validadas con exactitud, pues la cuantificación de la expresión génica en la RT-qPCR depende de la precisión de los estándares empleados (Pfaffl, 2001). De este modo, siguiendo los criterios establecidos por Rodríguez y col. (2015), la pendiente de la curva estándar debe tener unos valores entre -3,1 y -3,6, que

corresponde con unas eficiencias que oscilan entre el 80 % y el 110 %. El valor del coeficiente de correlación ( $R^2$ ) debe ser  $\geq 0,98$ .

Diversos estudios han utilizado esta metodología para evaluar el comportamiento de *L. monocytogenes* ante determinadas situaciones de estrés provocada por la presencia de NaCl y su efecto o comportamiento en el citosol de células humanas del epitelio intestinal (Kazmierczak y col., 2006; Sue y col., 2004). Otros estudios han utilizado esta misma metodología para evaluar el efecto que tiene la expresión de genes implicados en la movilidad con la virulencia de *L. monocytogenes* (Shen y Higgins, 2006) o el efecto de la utilización de amonios cuaternarios sobre la expresión génica de *L. monocytogenes* (Mazza y col., 2015).

#### 1.5.2.2. Cuantificación relativa

Los estudios de cuantificación génica relativa pretenden evaluar la magnitud de determinados cambios fisiológicos (temperatura,  $a_w$ , pH, acidez,) en los niveles de expresión de un gen en estudio o “gen diana” de una determinada muestra en comparación con otra. Para ello, hace falta la utilización de uno o más genes de referencia o “controles endógenos” (Pfaffl, 2001) los cuales serán necesarios para normalizar la expresión de los genes diana. Por otro lado, también es necesaria la presencia de un “calibrador” que es la muestra sin ser sometida a ninguna variación fisiológica, empleada como muestra control. Los dos procedimientos más habituales para el análisis de la expresión génica relativa son los métodos  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  y  $2^{-\Delta Ct}$  en función de los valores de eficiencia obtenidos previamente en el cálculo de las curvas estándar (Livak y Schmittgen, 2001). El primero de los métodos asume que ambos genes (diana y endógeno) tienen unas eficiencias óptimas e idénticas entre sí, mientras que el segundo no asume dichos parámetros. Por tanto, la adecuada selección de un gen de referencia es crítica y su expresión debe ser constante en todas las cepas analizadas o en respuesta a las condiciones ambientales ensayadas (Livak y Schmittgen, 2001), haciendo necesario un proceso de normalización que garantice la validez de los resultados (Livak y Schmittgen, 2001). El proceso de normalización evita el error derivado del experimento, como puede ser la variabilidad derivada de las diferencias existentes en la cantidad de muestra añadida, cantidad y calidad del ARN extraído o la eficiencia en la síntesis del ADNc, entre otras (Ferradás y col., 2016). Es precisamente el proceso de normalización lo que ha supuesto el desarrollo

de estrategias muy diversas (Ferradás y col., 2016; Huggett y col., 2005), debido a ser una de las principales limitaciones de la RT-qPCR (Bernáldez y col., 2017; Huggett y col., 2005), entre las que se incluyen la utilización de un tamaño o volumen de muestra similar o la normalización de la cantidad total de ARN. Esto último es de gran importancia, puesto que la cantidad y calidad del ARN extraído son aspectos esenciales a tener en cuenta antes de llevar a cabo las reacciones de RT, dado que pueden influir decisivamente en la cuantificación final de la expresión génica (Huggett et al., 2005). Sin embargo, la utilización de genes de referencia o estructurales, actuando como controles endógenos, constituye el método de elección (Ferradás y col., 2016; Huggett y col., 2005; Pfaffl, 2004), debido principalmente a que al ser también amplificados mediante RT-qPCR, proporcionan un control completo de todas las fases de la reacción que influyen en la cuantificación final (Huggett y col., 2005). Por este motivo, determinadas unidades del ARNr, como la subunidad 16S y la región espaciadora intergénica (IGS), son utilizadas frecuentemente como controles endógenos (Graham y col., 1996, 1997; Rantsiou y col., 2012b, 2008; Wang y col., 2010), gracias a su alto grado de conservación (Sallen y col., 1996) y expresión constante (Pfaffl, 2004). No obstante, numerosos estudios han demostrado que a pesar de que la transcripción de los genes estructurales debería ser constante e independiente de las condiciones experimentales (VanGuilder y col., 2008), estos pueden influir sobre los niveles de transcripción de algunos genes de referencia comúnmente utilizados, y que incluso la estabilidad de su expresión podría ser diferente entre organismos (Ferradás y col., 2016), lo que conllevaría la obtención de resultados erróneos (Dheda y col., 2004). Teniendo en cuenta que los genes de referencia son empleados frecuentemente en estudios de expresión génica mediante RT-qPCR sin una validación previa (Bernáldez y col., 2017), se ha puesto de manifiesto la necesidad de comprobar antes de cualquier ensayo que la expresión del gen estructural utilizado para normalizar es constante bajo las condiciones ensayadas, confirmando así su validez como control endógeno (Dheda y col., 2004; Ferradás y col., 2016; Hoorfar y col., 2004; Huggett y col., 2005; Rip y Gouws, 2009; Rodríguez-Lázaro y col., 2005).

La utilización de esta metodología ha sido ampliamente utilizada en el análisis de la expresión génica de *L. monocytogenes*. Así, en la mayoría de los estudios desarrollados se han seleccionado como genes diana los principales factores de virulencia de *L. monocytogenes*, tales como *plcA*, *hly*, *iap* y el gen regulador de la respuesta al estrés *sigB*. Algunos de los trabajos desarrollados se han utilizado para evaluar la expresión génica

ante la presencia de determinados compuestos vegetales (Hadjilouka y col., 2017; Kang y col., 2019; Pieta y col., 2017; Upadhyay y col., 2012) o la respuesta génica de *L. monocytogenes* ante situaciones provocadas por el tipo de matriz alimentaria, la temperatura, el pH, la presencia de NaCl o la  $a_w$  (Bae y col., 2012; Hadjilouka y col., 2016; Makariti y col., 2015; Olesen y col., 2010;2009; Rantsiou y col., 2012b). Igualmente, la aplicación de esta metodología ha permitido evaluar el efecto que tiene la aplicación de ciertos tratamientos no térmicos como HPP sobre la expresión génica de *L. monocytogenes* (Bowman y col., 2008).





## II. OBJETIVOS

---



## II.1. OBJETIVOS

Este trabajo titulado “Efectos de tratamientos no térmicos y de bioconservación en jamón curado loncheado sobre la expresión génica de *Listeria monocytogenes*” está integrado dentro de un estudio más amplio que se está realizando en el Grupo de Investigación de Higiene y Seguridad Alimentaria perteneciente al Instituto Universitario de Investigación de la Carne y Productos Cárnicos (IProCar) de la Universidad de Extremadura y que está financiado a través de los proyectos INIA RTA-2013-00070-C03-03 y RTA2017-00027-C03-03 e IB16149 (Junta de Extremadura-Consejería de Economía e Infraestructuras, Fondo Europeo de Desarrollo Regional- “Una manera de hacer Europa”). En el proyecto INIA participan además el Grupo de Seguridad Microbiológica de Alimentos del Departamento de Tecnología de Alimentos del INIA y el Grupo de Investigación de Tecnología de Alimentos de la Facultad de Veterinaria de la Universidad Complutense. Este Proyecto está dentro de la Red de Excelencia Consolider de Innovación de Productos Cárnicos Seguros y Saludables (INPROCARSA).

Los objetivos de esta Tesis Doctoral son los siguientes:

1. Caracterización de la contaminación por *L. monocytogenes* en jamones, equipos e instalaciones mediante caracterización de las cepas aisladas en industrias utilizando métodos moleculares.
2. Desarrollo de métodos de qPCR para la detección y caracterización serotípica de *L. monocytogenes*.
3. Optimización de métodos de RT-qPCR capaces de cuantificar la expresión de genes de virulencia y de respuesta al estrés de *L. monocytogenes* en relación con las condiciones propias del jamón curado, en cuanto a composición ( $a_w$  y concentración de NaCl) y modo de conservación (temperatura).
4. Determinara el efecto de los tratamientos no térmicos de HPP y E-Beam sobre la expresión génica de *L. monocytogenes* en jamón curado loncheado.
5. Determinar el efecto de *D. hansenii* utilizada como estrategia de biocontrol frente al crecimiento y expresión génica de *L. monocytogenes* en jamón curado loncheado.
6. Evaluar el efecto de los tratamientos de biocontrol con *D. hansenii* sobre las propiedades sensoriales del jamón curado loncheado.



## III. MATERIAL Y MÉTODOS

---



### III.1. MATERIAL

#### III.1.1. REACTIVOS QUÍMICOS

La parte experimental de esta Tesis Doctoral fue desarrollada utilizando reactivos químicos suministrados por las casas comerciales SCHARLAB, S.L., PANREAC QUÍMICA S.L.U., THERMO FISHER SCIENTIFIC, LABKEM, CHROMagar™, LONZA, Laboratorios CONDA, ALFA AESAR y ACROS ORGANICS™.

El etanol absoluto 99,9% (v/v) utilizado perteneció a la casa comercial SCHARLAB, S.L. mientras que el isopropanol 99,9% (v/v) fue de la casa comercial ACROS ORGANICS™.

Para modificar la  $a_w$  de los medios de cultivo se utilizó glicerol 99,5% (v/v) de la casa comercial FISHER SCIENTIFIC™.

Para el desarrollo de las técnicas moleculares, los cebadores y sondas empleados fueron provistos por la casa comercial METABION INTERNATIONAL AG. Para la extracción de ADN y ARN se utilizó el kit comercial MasterPure™ Complete DNA and RNA Purification Kit de la casa comercial EPICENTRE®.

Los reactivos empleados para el desarrollo de las reacciones de qPCR (SYBR® Premix Ex Taq™ II y Premix Ex Taq™ Probe qPCR) y de transcripción inversa (kit Prime Script™ RT Reagent, Perfect Real Time) fueron de la casa comercial TAKARA BIO INC.

Los reactivos SYBR™ Safe DNA Gel Stain y SYBR™ Gold Nucleic Acid Gel Stain (10.000X), empleados para la tinción de los geles de agarosa, fueron de la marca INVITROGEN. El reactivo marcador de ácidos nucleicos Blue/Orange Loading Dye 6X, empleado en los geles de agarosa, fue suministrado por la casa comercial PROMEGA. El marcador de peso molecular 100 bp PlusBlue DNA Ladder™ fue de la casa comercial INTRON BIOTECHNOLOGY.

El reactivo dodecilsulfato sódico (SDS), empleado en los protocolos de PFGE, fue de la casa comercial INVITROGEN. En esta misma técnica se empleó agarosa SeaKem® Gold de la casa comercial LONZA.

Las enzimas de restricción utilizadas en los protocolos de PFGE fueron *SgsI*, *ApaI* y *XbaI* pertenecientes a la casa comercial THERMO FISHER SCIENTIFIC. Cada enzima de restricción necesitó un tampón específico para su funcionamiento siguiendo las indicaciones del fabricante. Para ello, para las enzimas *SgsI* y *XbaI* se utilizó el tampón *Tango 10X* y para la enzima *ApaI* se utilizó el tampón *B 10X*, ambos de THERMO FISHER SCIENTIFIC.

En los protocolos de PFGE también se utilizó Albumina Sérica Bovina o BSA (del inglés, *Bovine Serum Albumin*) de la casa comercial SIGMA-ALDRICH.

### III.1.2. EQUIPOS

El agua destilada y el agua ultrapura utilizadas para elaborar los medios de cultivo y resuspender los reactivos, así como los cebadores y sondas utilizados en este trabajo fueron obtenidos mediante el sistema de purificación de agua Elix Technology Inside Milli-Q® Integral 5 Water System de EMD MILLIPORE.

Las pesadas rutinarias se realizaron en una balanza electrónica COBOS mod. CB COMPLET con precisión de 10 mg. Para las pesadas de precisión se utilizó una balanza analítica de SARTORIOUS mod. LA310S con una precisión de 0,1 mg.

Los distintos medios de cultivo fueron preparados en agitadores magnéticos con placa calefactora JP SELECTA mod. AGIMATIC-N.

La carne de cerdo y el jamón curado fueron loncheados en una loncheadora comercial OMS mod. TGI 300. La liofilización de la carne de cerdo y el jamón curado previamente loncheados se llevó a cabo en un liofilizador LABCONCO mod. Freezone-6. El picado posterior de la carne de cerdo y jamón curado liofilizados se realizó en una picadora JATA electro de 700 W.



## MATERIAL Y MÉTODOS

---

El almacenamiento de la carne y el jamón liofilizados, así como de muestras y reactivos se hizo a -20 °C en congeladores de las marcas LYNX y LIEBHERR MEDline.

Para la esterilización de los medios de cultivo, reactivos, tampones y material de laboratorio empleado, se utilizó un autoclave P-SELECTA® mod. Presoclave III 80.

Los baños termorregulados utilizados para atemperar los medios de cultivo o llevar a cabo el desarrollo de aquellos protocolos laborales que requerían condiciones de temperatura controlada fueron un baño P-SELECTA mod. PRESCIDIG y un baño con agitación de vaivén P-SELECTA mod. UNITRONIC OR.

Las placas de Petri utilizadas para los medios de cultivo fueron de 90 mm y de 55 mm de diámetro de la casa comercial FISHER SCIENTIFIC.

Los medios de cultivo, una vez elaborados y depositados en placas de Petri, se conservaron a 5 °C en una cámara refrigerada por un equipo de frío RivaCold mod. RC325-45ED.

Para medir el volumen de glicerol utilizado se usó una jeringa Albus® de 60 mL.

Las mediciones de la  $a_w$  se realizaron con un medidor LabMASTER- $a_w$  de NOVASINA AG.

Las medidas de pH se realizaron en un pHmetro CRISON mod. BASIC 20.

Todas las manipulaciones que requerían condiciones de esterilidad fueron realizadas en una campana de flujo laminar TELSTAR mod. BIO-II-A con lámpara UV SILVANA 46320 (1X15 W) con tubo PHILIPS ultra-violet de 15 W.

El material de laboratorio que se utilizó en los ensayos moleculares tales como espátulas de aluminio, cucharas tipo espátula o puntas de bisturí fueron de la marca SCHARLAB, S.L.

## MATERIAL Y MÉTODOS

---

El recuento de levaduras se llevó a cabo en una cámara de recuento de Thoma BRAND™ de FISHER SCIENTIFIC, utilizando un microscopio NIKON mod. SE.

Las pipetas automáticas de 0,5-10 µL, 2-20 µL, 10-100 µL, 100-1000 µL y 1000-5000 µL utilizadas para llevar a cabo los ensayos con microorganismos, así como el desarrollo de las técnicas moleculares pertenecían a la casa comercial THERMO FISHER SCIENTIFIC mod. FINNPIPETTE. Para el manejo de los microorganismos se utilizaron puntas de pipeta sin filtro de DASLAB®, mientras que para las técnicas moleculares se utilizaron puntas con filtro FISHERBRAND® SURE ONE de FISHER SCIENTIFIC.

Para la elaboración y el manejo de soluciones tampón se utilizó un controlador de pipeta semiautomático mod. SWIFTPET PRO de HTL LAB SOLUTIONS de pipetas graduadas de 2, 5 y 10 mL.

Para la conservación y manipulación de los microorganismos, así como el material genético se utilizaron microtubos tipo Eppendorf de tapa con cierre seguro de distintos volúmenes (0,2, 0,5, 1,5 y 2 mL) de las marcas comerciales DASLAB®, AXYGEN SCIENTIFIC y DELTALAB.

Los microorganismos que fueron incubados a 37 °C lo hicieron en una estufa P-SELECTA mod. 207 con temperatura regulable. Para la incubación de microorganismos a las temperaturas de 7 °C y 15 °C se utilizaron estufas refrigeradas VELP SCIENTIFICA mod. FOC 225 de SCHARLAB, S.L.

Para la homogeneización de los microtubos tipo Eppendorf se utilizaron agitatuos HEIDOLPH mod. REAX TOP.

Para la crioconservación de las muestras se empleó un congelador ECONOFREEZER de THERMO SCIENTIFIC mod. 900 series (-82 °C).

El almacenamiento de las muestras de ARN extraído se hizo en un congelador ULT FREEZER DW-86L628 de HAIER BIOMEDICAL (-82 °C). Por otra parte, las muestras de ADN extraídas, así como la mayor parte de los reactivos químicos empleados en las

técnicas moleculares fueron almacenadas a temperatura de -20 °C en congeladores No Frost de SVAN mod. SCV1863FFDX.

En el control microbiano de superficies de equipos y utensilios en la zona de deshuesado, prensado y loncheado se utilizaron toallitas estériles humedecidas embaladas individualmente en una bolsa de fácil apertura de la casa comercial AES CHEMUNEX. Una vez utilizadas, cada toallita se guardó en bolsas estériles de la marca BAGPAGE sin filtro.

Para la homogeneización y posterior detección o recuento microbiano de las toallitas, los medios elaborados con carne de cerdo liofilizada o con jamón curado y las lonchas de jamón curado inoculadas se usaron bolsas Stomacher con filtro de la marca BAGPAGE con filtro y un homogeneizador STOMACHER mod. STOMACHER R400 CIRCULATOR.

Para los procedimientos de centrifugación se empleó una microcentrífuga refrigerada mod. CENTRIFUGE 5430R de EPPENDORF.

La incubación de las muestras a temperaturas de 65 °C se llevó a cabo en un termobloque mod. DRY BATH FB15101 de FISHER SCIENTIFIC.

Durante todo el proceso de extracción del material genético se utilizó hielo para mantener las condiciones óptimas de las muestras y reactivos químicos utilizados, que se elaboró con una máquina de hielo triturado mod. IMS-85 Automatic Flake Ice Maker de LABREEZ.

La cantidad y calidad del ADN y ARN extraídos fueron determinadas mediante un espectrofotómetro THERMO SCIENTIFIC NANODROP mod. 2000C de THERMO FISHER SCIENTIFIC, conectado a un ordenador portátil DELL mod. LATITUDE D505.

Para llevar a cabo las mezclas de reacción para su análisis mediante las técnicas moleculares de PCR se utilizó una campana TELSTAR mod. Mini-V/PCR.

Las reacciones de PCR convencional y de retrotranscripción se llevaron a cabo en un termociclador mod. MASTERCYCLER® EP GRADIENT de EPPENDORF.

La fusión de los geles de agarosa se realizó en un microondas mod. SMW-3 de SCHNEIDER.

Las electroforesis de los ácidos nucleicos se llevaron a cabo en una cubeta horizontal mod. Sub-Cell® GT, alimentada por una fuente mod. PowerPac™ Basic ambos de BIO-RAD LABORATORIES, INC.

Las reacciones de qPCR se realizaron con el sistema de qPCR Viiia™ 7 de APPLIED BIOSYSTEMS, conectado a un ordenador DELL mod. OPTIPLEX XE. Además, se utilizaron placas de reacción de 96 pocillos (0,1 mL) MicroAmp™ Fast Optical con películas adhesivas MicroAmp™ de APPLIED BIOSYSTEMS™.

Para la digestión enzimática de muestras en los análisis de PFGE se utilizó un agitador térmico mod. TS-100 de BIOSAN.

Para ajustar la concentración de los cultivos bacterianos mediante la medida de la turbidez se utilizó un biofotómetro mod. 6131 de EPPENDORF.

La técnica de PFGE se llevó a cabo en el equipo mod. CHEF Mapper® XA Pulsed Field Electrophoresis System de BIO-RAD LABORATORIES, INC. Para la elaboración y procesamiento de los moldes se utilizó un molde mod. 50-Well Plug y un filtro mod. Plug Cap ambos de la casa comercial BIO-RAD LABORATORIES, INC. Tras la electroforesis, los geles se tiñeron con bromuro de etidio (10 mg/mL) o SYBR™ Gold Nucleic Acid Gel Stain (10.000X) y las imágenes fueron obtenidas con un equipo Gel Doc 2000 Image Documentation System de BIO-RAD LABORATORIES, INC. y el equipo de la casa comercial LABNET mod. ENDURO™ GDS GEL DOCUMENTATION SYSTEM.

### III.1.3. MEDIOS DE CULTIVO

Los componentes de los medios de cultivo utilizados en este trabajo pertenecieron a las casas comerciales Laboratorios CONDA, LABKEM, PANREAC QUÍMICA S.L.U. y CHROMAgar™ Listeria.

#### III.1.3.1. Medios de cultivo de uso general

Para el crecimiento de *L. monocytogenes* y *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar *Braenderup* (ATCC® BAA-664™) se utilizó el medio infusión cerebro-corazón o medio BHI por sus siglas en inglés *Brain Heart Infusion* (Tabla III.1).

La evaluación del crecimiento de levaduras se realizó en el medio extracto de levadura y sacarosa o medio YES por sus siglas en inglés *Yeast Extract Sucrose* (Tabla III.2).

Tabla III.1. Composición del medio infusión cerebro-corazón (BHI).

Componentes	Cantidad	
	Medio líquido	Medio sólido
BHI (g)	37	37
Agar bacteriológico (g)	-	15
Agua destilada (mL)	1000	1000

Tabla III.2. Composición del medio extracto de levadura y sacarosa (YES).

Componentes	Cantidad	
	Medio líquido	Medio sólido
Extracto de levadura (g)	20	20
Sacarosa (g)	125	125
Agar bacteriológico (g)	-	20
Agua destilada (mL)	1000	1000

Los cultivos microbianos fueron diluidos en el medio líquido de agua de peptona al 1% (p/v).

El pre-enriquecimiento y enriquecimiento de *L. monocytogenes* se hizo en los medios comerciales UVM-I LISTERIA SELECTIVE (caldo UVM) y LISTERIA FRASER

BROTH BASE (caldo Fraser), respectivamente. Para la confirmación y recuento de *L. monocytogenes* se utilizó el medio comercial cromogénico CHROMAgar™ Listeria.

### III.1.3.2. Medios de cultivo elaborados con carne y derivados cárnicos liofilizados

#### III.1.3.2.1. Proceso de liofilización

El proceso de liofilización se realizó con lonchas de lomo fresco y jamón curado con un grosor aproximado de 1 cm y 0,5 mm, respectivamente. Estas lonchas se colocaron sobre una malla plástica de polietileno de alta densidad y se congelaron a -82 °C durante al menos 2 h antes de introducirlas en el liofilizador. Tras su liofilización, las muestras se trituraron y envasaron a vacío conservándose a -20 °C hasta su uso.

#### III.1.3.2.2. Elaboración y composición

Los medios de cultivo que simularon las condiciones del jamón curado a lo largo de su proceso de elaboración se prepararon con carne de cerdo liofilizada, modificando la  $a_w$  del medio mediante la adición de NaCl y/o de glicerol de acuerdo a las cantidades que se detallan en la Tabla III.3.

Tabla III.3. Composición de los medios elaborados con carne de cerdo liofilizada, agrupados en 4 lotes según si su actividad de agua ( $a_w$ ) fue modificada con NaCl, con glicerol o con una mezcla de ambos sustratos.

Componentes	Control	NaCl			Glicerol			NaCl + Glicerol	
	$a_w$ 0,98	$a_w$ 0,96	$a_w$ 0,94	$a_w$ 0,92	$a_w$ 0,96	$a_w$ 0,94	$a_w$ 0,92	$a_w$ 0,94	$a_w$ 0,92
Carne de cerdo liofilizada (g)	30	30	30	30	30	30	30	30	30
Agar bacteriológico (g)	20	20	20	20	20	20	20	20	20
Glicerol (mL)	-	-	-	-	110	160	230	70	150
NaCl (g)	-	40	90	120	-	-	-	40	40
Agua destilada (mL)	1000	1000	1000	1000	890	840	770	930	850

Por otro lado, para evaluar la actividad anti-*L. monocytogenes* de levaduras se utilizó un medio de cultivo elaborado con jamón curado según el procedimiento previamente descrito por Rodríguez y col. (2014) y cuya  $a_w$  fue modificada mediante la adición de

glicerol según se indica en la Tabla III.4. Además, el pH del medio de cultivo fue ajustado a 6 para simular los valores de pH típicos durante el proceso de secado y maduración del jamón curado. Para confirmar los valores de  $a_w$  y pH del medio elaborado, estos fueron medidos al inicio y al final de cada experimento.

Tabla III.4. Composición del medio de cultivo elaborado con jamón curado liofilizado con diferentes actividades de agua ( $a_w$ ) mediante la adición de glicerol.

Componentes	$a_w$ 0,95	$a_w$ 0,93
Jamón curado liofilizado (g)	30	30
Agar bacteriológico (g)	20	20
Glicerol (mL)	120	180
Agua destilada (mL)	880	820

Todos los medios de cultivo elaborados se esterilizaron a 121 °C (103 KPa) durante 16 min. Posteriormente, fueron atemperados hasta alcanzar una temperatura de 45-50 °C en un baño de agua termostatzado, se agitaron y se repartieron en placas de Petri de 90 mm de diámetro (medio BHI, YES y medio cromogénico CHROMAgar™ Listeria) o en placas de Petri de 55 mm de diámetro (medios de cultivo elaborados con carne de cerdo o con jamón curado). Una vez solidificados, todos los medios de cultivo se conservaron en refrigeración hasta su utilización.

### III.1.4. TAMPONES

A continuación, se muestra la composición de los tampones utilizados durante el desarrollo experimental de esta Tesis Doctoral.

#### **Tampón TE (pH 8):**

- 10 mM TRIS
- 1 mM EDTA

#### **Tampón TBE 5X (pH 8,4):**

- 0,45 M TRIS
- 0,45 M ácido bórico
- 10 mM EDTA

**Tampón de Lisis Celular o *Cell Lysis buffer* (CLB) (pH 8,0):**

- 50 mM TRIS
- 50 mM EDTA
- 1% sarcosina
- 0,1 mg/mL de proteinasa K

**TAE 50X (pH: 8,0):**

- 242 g/L TRIS Base
- 57,1 mL ácido acético glacial
- 100 mL EDTA 0,5 M

**III.1.5. PROGRAMAS INFORMÁTICOS**

La relación de programas informáticos utilizados para el desarrollo experimental de esta Tesis Doctoral se detalla en la Tabla III.5.

Tabla III.5. Programas informáticos utilizados en el desarrollo de esta Tesis Doctoral.

Nombre	Casa comercial	Finalidad
Primer3web versión 4.1.0	ELIXIR	Diseño de cebadores y sondas
ViiA™ 7 versión 1.2.4	FISHER SCIENTIFIC	Manejo, desarrollo y obtención de los resultados obtenidos a partir de las reacciones de qPCR
NanoDrop™ 2000/2000C versión 1.4.2	THERMO FISHER SCIENTIFIC	Medida de la cantidad y calidad de ácidos nucleicos
QLIQS 1D PRO versión 1.2.044	TOTALLAB	Análisis de imágenes de los geles
Bionumerics	APPLIED MATHS	Análisis de pulstipos y elaboración de dendogramas
Microsoft Excel 2016	MICROSOFT	Análisis de datos, elaboración de tablas y obtención de gráficos
Microsoft PowerPoint 2016	MICROSOFT	Elaboración y adaptación de figuras
SPSS Statistic versión 22	IBM	Tratamiento estadístico de los resultados

**III.1.6. MATERIAL BIOLÓGICO**

Las cepas de referencia de *L. monocytogenes* utilizadas en este trabajo fueron las cepas S2 (serotipo 1/2a), S4-2 (serotipo 1/2b), S12-1 (serotipo 1/2c) y S7-2 (serotipo 4b), aisladas de industrias cárnicas y cedidas por el Instituto Nacional de Investigaciones y Tecnología Agraria y Alimentaria (INIA). También se utilizaron como cepas de referencia *L. innocua* Seeliger 1983 (CECT 910), *L. innocua* Seeliger 1983 (CECT 5376), *L. ivanovii* subsp. *ivanovii* (CECT 5368), *L. ivanovii* subsp. *londoniensis*, *L. grayi* (CECT



931T) y *L. welshimeri* (CECT 5380) pertenecientes a la Colección Española de Cultivos Tipo.

Por otra parte, se realizó el aislamiento de cepas de *L. monocytogenes* en la zona de deshuesado, prensado y loncheado de 6 industrias que elaboran jamón curado de cerdo Ibérico deshuesado y loncheado situadas en las Comunidades Autónomas de Castilla y León, Extremadura y Andalucía (ver apartado III.2.2). Se obtuvieron un total de 66 cepas que fueron caracterizadas tal y como se describe en el apartado III.2.4.

En la optimización del método de qPCR múltiple para la identificación de los serotipos más habituales de *L. monocytogenes* en la industria cárnica se utilizaron 41 cepas de esta especie. La mayoría de ellas pertenecían a los aislamientos de las 6 industrias de jamón curado (29) y otras pertenecían a la colección de cultivos del Grupo de Investigación de Higiene y Seguridad Alimentaria de la Universidad de Extremadura (12), aisladas de industrias elaboradoras de derivados cárnicos curado-madurados como salchichón y chorizo.

En cuanto a las levaduras utilizadas para evaluar su actividad anti-*L. monocytogenes*, éstas habían sido previamente aisladas en jamón curado de cerdo Ibérico a diferentes tiempos de procesado (Andrade y col., 2009) y pertenecen a la colección de cultivos del Grupo de Investigación de Higiene y Seguridad Alimentaria de la Universidad de Extremadura (Tabla III.6).

Tabla III.6. Cepas de *Debaryomyces hansenii* aisladas de jamón curado de cerdo Ibérico pertenecientes a la colección de cultivos del Grupo de Investigación de Higiene y Seguridad Alimentaria de la Universidad de Extremadura, utilizadas en esta Tesis Doctoral.

Identificación	Etapas de aislamiento	Identificación	Etapas de aislamiento
6P	Post-salado	152P	Secadero y bodega
7P	Post-salado	156P	Secadero y bodega
11P	Post-salado	159P	Secadero y bodega
45P	Post-salado	163P	Secadero y bodega
58P	Post-salado	176H	Secadero y bodega
63P	Post-salado	184H	Secadero y bodega
69P	Post-salado	196H	Secadero y bodega
71P	Post-salado	212H	Secadero y bodega
74P	Secadero y bodega	213H	Secadero y bodega
78P	Secadero y bodega	217H	Secadero y bodega
122P	Secadero y bodega	221H	Secadero y bodega
125P	Secadero y bodega	223H	Secadero y bodega
130P	Secadero y bodega	229H	Secadero y bodega
133P	Secadero y bodega	253H	Secadero y bodega
151P	Secadero y bodega	258H	Secadero y bodega

## MATERIAL Y MÉTODOS

---

La cepa utilizada como control en los procedimientos de PFGE fue *S. enterica* subsp. *enterica* serovar Braenderup (ATCC® BAA-664™).

## III.2. MÉTODOS

### III.2.1. DISEÑO EXPERIMENTAL

En la realización del presente trabajo se planteó el diseño experimental que se muestra en la Figura III.1. En primer lugar, se llevó a cabo el aislamiento y detección de *L. monocytogenes* procedente de industrias loncheadoras de jamón curado. Posteriormente, se caracterizaron los aislados de *L. monocytogenes* mediante métodos moleculares. Finalmente, se llevaron a cabo los tratamientos no térmicos utilizados como métodos de control de *L. monocytogenes* en jamón curado loncheado, y se evaluó el efecto de tales tratamientos sobre la viabilidad del microorganismo mediante la evaluación de la expresión génica de genes de virulencia y de respuesta al estrés del microorganismo patógeno.

## 1. DETECCIÓN

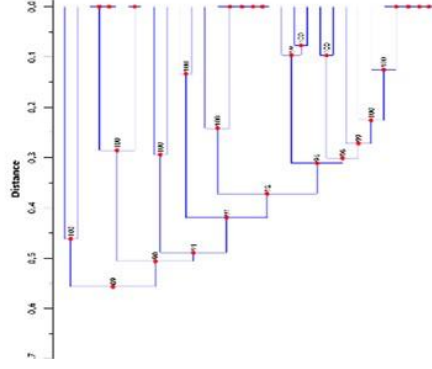
- 1.1. Toma de muestras para el aislamiento y detección de *Listeria monocytogenes* mediante el protocolo USDA (2019)**
- Muestreo en 6 industrias; 30 puntos de muestreo en cada una; Muestreo durante el trabajo y en limpio; 2 muestreos en cada industria (otoño-invierno/primavera-verano)
  - Detección en agar cromogénico CHROMAgar™ *Listeria*



## 2. CARACTERIZACIÓN

### 2.1 Caracterización de los aislados de *L. monocytogenes* mediante métodos moleculares

- Desarrollo de un método de qPCR múltiple para el serotipado de *L. monocytogenes*
  - Gen estructural: región 16S del ARN ribosómico (ARNr)
- Genes diana:
  - lmo0737*: serotipo 1/2a y 1/2c
  - lmo0308*: serotipo 1/2c
  - ORF: serotipo 1/2b
  - ORF2110: serotipo 4b
- Tipificación mediante electroforesis en campo pulsante (PFGE)



## 3. TRATAMIENTOS NO TÉRMICOS COMO MÉTODOS DE CONTROL

### 3.1. Evaluación del efecto de la $a_w$ , NaCl, temperatura, tratamientos con altas presiones hidrostáticas y de electrones acelerados sobre el crecimiento y expresión génica de *L. monocytogenes*

- Estudios de expresión génica absoluta de *L. monocytogenes* mediante metodología TaqMan®
  - Control interno de amplificación: espaciador intergénico IGS de *L. monocytogenes*
  - Genes diana: genes de virulencia *plcA*, *hly* e *iap* y el gen de respuesta al estrés *sigB* de *L. monocytogenes*

### 3.4. Evaluación de la actividad anti-*L. monocytogenes* de *D. hansenii* y su efecto sobre la expresión génica

- Análisis de la expresión génica relativa de *L. monocytogenes* mediante metodología SYBR™ Green
  - Control endógeno: región 16S del ARNr de *L. monocytogenes*
  - Genes diana: genes de virulencia *plcA*, *hly* e *iap* de *L. monocytogenes*



Figura III.1. Diseño experimental del trabajo desarrollado en esta Tesis Doctoral

### III.2.2. TOMA DE MUESTRAS PARA EL AISLAMIENTO DE *L. monocytogenes*

El muestreo para la detección de *L. monocytogenes* se llevó a cabo en la zona de deshuesado, prensado y loncheado de 6 industrias de deshuesado y loncheado de jamón curado de cerdo Ibérico loncheado situadas en diferentes comunidades autónomas: 4 industrias en Extremadura (A, C, D y E), una industria en Castilla y León (B) y una industria en Andalucía (F). En cada industria se muestrearon 30 superficies de trabajo según aparece en la Tabla III.7. El muestreo se diseñó de forma genérica para todas las industrias según la distribución que suelen tener las salas de deshuesado y loncheado de jamón curado. A pesar de este diseño inicial, el muestreo se adaptó a las instalaciones de cada una de las industrias evaluadas.

Tabla III.7. Descripción de las 30 zonas que sirvieron de guía para el muestreo en las distintas industrias, localizadas en las distintas fases de obtención del producto loncheado, tales como el deshuesado inicial, prensado y loncheado en salas blancas, así como en la fase final.

Zona de muestreo	Localización
Mesa de deshuesar y prensa (superficie)	Zona de deshuesado
Prensa para deshuesar (herramienta)	Zona de deshuesado
Armario de útiles y guantes	Zona de deshuesado
Sierra de corte de las pezuñas	Zona de deshuesado
Contenedor de producto deshuesado	Zona de deshuesado
Armario esterilizador de cuchillos	Zona de deshuesado
Prensadora de la zona de masajeado	Zona de deshuesado
Superficies de acero inoxidable (mesas)	Zona de deshuesado
Suelo de la sala de deshuesado	Zona de deshuesado
Mandil y guantes del deshuesador	Zona de deshuesado
Envasadora a vacío	Zona de deshuesado
Contenedor con jamones al vacío	Zona de deshuesado
Desagüe de la sala de deshuesado/pelado (con agua)	Zona de deshuesado
Molde para prensado	Zona de prensado
Superficies de la zona de prensado	Zona de prensado
Envasadora a vacío	Zona de prensado
Superficies de acero inoxidable (mesas)	Zona de loncheado o sala blanca
Sierra del loncheado (corte del producto deshuesado)	Zona de loncheado o sala blanca
Superficie de la línea de loncheado	Zona de loncheado o sala blanca
Cuchilla loncheadora de la línea de trabajo	Zona de loncheado o sala blanca
Salida del producto de la cuchilla loncheadora	Zona de loncheado o sala blanca
Cinta del producto loncheado	Zona de loncheado o sala blanca
Cuchillos (loncheado manual)	Zona de loncheado o sala blanca
Paletas para colocar el producto loncheado	Zona de loncheado o sala blanca
Suelo de la sala de loncheado	Zona de loncheado o sala blanca
Paquete del producto loncheado	Zona de loncheado o sala blanca
Envasadora del producto loncheado	Zona de loncheado o sala blanca
Desagües de la sala de loncheado	Zona de loncheado o sala blanca
Manos del manipulador con guantes (guantes)	Zona de loncheado o sala blanca
Grifos y lavabos	Zona de loncheado o sala blanca

La toma de muestras se realizó por duplicado, ya que se realizó un primer muestreo tras la aplicación de los protocolos de limpieza y desinfección y un segundo muestreo durante la realización de las operaciones de deshuesado, prensado y loncheado. Además, un primer muestreo se hizo durante los meses de otoño/invierno, repitiéndose un segundo muestreo durante los meses de primavera/verano, con la intención de evaluar la persistencia a lo largo del tiempo o la estacionalidad de *L. monocytogenes*. Así, en cada industria se tomaron un total de 120 muestras.

El procedimiento de muestreo de las superficies de las industrias fue desarrollado a partir del protocolo descrito por la USDA (2019) para el aislamiento y detección de *L. monocytogenes* en muestras ambientales y productos cárnicos (USDA, 2019). Para el muestreo de las superficies se utilizó una toallita humedecida estéril que se arrastró por la superficie a muestrear utilizando guantes estériles con la finalidad de evitar la contaminación de la muestra. El uso de este material permite acceder a zonas o recovecos difícilmente accesibles con otros utensilios de muestreo, además de poder muestrear un área o superficie de gran tamaño. Una vez que se aplicó la toallita en la zona de interés, ésta se introdujo en una bolsa estéril, se identificó y se cerró. A continuación, las muestras fueron almacenadas a temperatura ambiente utilizando neveras portátiles de poliestireno expandido hasta ser procesadas. Una vez en el laboratorio, se llevó a cabo un enriquecimiento primario de la muestra, homogeneizando la toallita durante 2 min en el equipo Stomacher con 225 mL de caldo UVM e incubándose a 30 °C durante 24 h. Tras este primer periodo de incubación, se procedió a un enriquecimiento secundario, transfiriéndose 100 µL del enriquecimiento primario en caldo UVM a 10 mL de caldo Fraser, el cual se incubó a 37 °C durante 24 h. Tras su incubación, el caldo Fraser se examinó para detectar las muestras sospechosas para *L. monocytogenes*. Así, cuando se observó oscurecimiento de este medio de cultivo, se sembraron 100 µL de éste en una placa de agar cromogénico CHROMAgar™ Listeria que se incubó a 37 °C durante 24 h. En caso de no observarse oscurecimiento en el medio a las 24 h de incubación, el medio Fraser se incubó otras 24 h hasta un tiempo total de incubación de 48 h. Si transcurrido este tiempo el medio Fraser no se oscureció, el resultado del análisis se consideró ausencia de *L. monocytogenes*.

Además del muestreo de las superficies de trabajo, también se llevó a cabo la detección de *L. monocytogenes* en jamón curado loncheado. Para ello, el procedimiento que se

siguió para el procesado de estas muestras fue similar al utilizado con las toallitas. Así, se homogeneizaron 25 g de muestra de producto con 225 mL de caldo UVM y se continuó el proceso tal y como se describe anteriormente.

Las colonias azules y rodeadas de un halo blanquecino/opaco debido a la actividad fosfolipasa, fueron confirmadas presuntivamente como *L. monocytogenes* en el medio cromogénico CHROMAgar™ Listeria y aisladas hasta obtener un cultivo puro bacteriano a través de pases sucesivos en el mismo agar cromogénico. Posteriormente, se tomó una colonia y se cultivó en caldo BHI a 37 °C durante 24 h para finalmente tomar 1 mL del cultivo líquido y conservarlo en una solución de glicerol al 10% (v/v) a -82 °C.

### III.2.3. OPTIMIZACIÓN DE MÉTODOS MOLECULARES

#### III.2.3.1. Caracterización serotípica de *L. monocytogenes* mediante métodos de qPCR

En esta Tesis Doctoral se desarrolló un método de qPCR múltiple para el serotipado simultáneo y específico de los 4 serotipos de *L. monocytogenes* más frecuentemente aislados en la industria cárnica (Doumith y col., 2004), utilizando para ello la metodología TaqMan®.

##### III.2.3.1.1. Optimización del proceso de extracción de ADN

Para la optimización del proceso de extracción de ADN se utilizaron en primer lugar las cepas de referencia cedidas por INIA. Para ello, estos aislados de *L. monocytogenes* previamente congelados a -82 °C fueron revitalizados mediante 2 pases sucesivos en caldo BHI a 37 °C durante 24 h. Para la extracción del ADN genómico, se tomó 1 mL del cultivo así obtenido que se centrifugó a 10.000 rpm durante 10 min en condiciones de refrigeración (4 °C). A continuación, se eliminó el sobrenadante y el sedimento obtenido se procesó mediante el kit comercial de extracción MasterPure™ Complete DNA and RNA Purification Kit. El ADN obtenido fue diluido en 35 µL de tampón TE y mantenido a -20 °C hasta su uso.

La concentración y pureza del ADN extraído fueron determinadas espectrofotométricamente. La relación de absorbancia a 260 nm y 280 nm ( $A_{260}/A_{280}$ ) se usó para evaluar la pureza de ADN. Se considera que en un ADN de buena calidad la relación  $A_{260}/A_{280}$  tiene un valor de entre 1,8-2,0 (Sambrook y col., 1989).

### III.2.3.1.2. Diseño de cebadores y sondas

Previamente a la optimización del método de qPCR múltiple se diseñaron 4 parejas de cebadores y 4 sondas utilizándose los requisitos para el diseño de cebadores y sondas de qPCR publicados por Rodríguez y col. (2015) (Tabla III.8). Los cebadores y sondas fueron diseñados utilizando el software Primer3web (Untergasser y col., 2012) a partir de secuencias conocidas de los genes *lmo0737* para identificar los serotipos 1/2a y 1/2c, el gen *lmo0308* para identificar el serotipo 1/2c, el gen ORFC (un locus genómicamente equivalente a la región *gltA-gltB* del serotipo 4b para identificar el serotipo 1/2b y el gen ORF2110 para identificar el serotipo 4b (Tabla III.9).

Tabla III.8. Requisitos mínimos para el diseño de los cebadores y sondas utilizados en los ensayos de PCR en tiempo real (qPCR). Adaptado de Rodríguez y col. (2015).

Parámetros	Cebadores	Sondas
Contenido de G-C (%)	30-80 %	30-80 %
Tm (teórica)	50-60 °C (siempre > 55 °C)	68-70 °C (5-10 °C mayor que la Tm de los cebadores)
Longitud de la secuencia	Mínimo 15 pb (15-30 pb)	Máximo 30 pb
Longitud del producto de qPCR	Entre 50-150 pb. Mejor cuanto más pequeños sean	
Regla en el extremo 3'	Máximo 2 G o C en las últimas 5 bases	
Serie de nucleótidos idénticos	Máximo 3 (nunca 3 G seguidas)	
Radio G-C		Seleccionar la hebra con mayor número de C que G

Los oligonucleótidos diseñados en este trabajo (Tabla III.9) lo hicieron de acuerdo a los requisitos que aparecen detallados en la Tabla III.8, ajustándose a dichos requisitos de forma específica, lo cual resulta de especial importancia para el éxito de los resultados de la qPCR (Tabla III.10; Raymaekers y col., 2009; Rodríguez y col., 2015).



Tabla III.9. Secuencia de nucleótidos de los cebadores y sondas diseñados para el método de PCR en tiempo real (qPCR) múltiple desarrollado para la identificación de los serotipos 1/2a, 1/2b, 1/2c y 4b de *Listeria monocytogenes*.

Serotipo(s) identificado(s)	Gen	Cebadores y sondas	Secuencia (5'-3')	Posición dentro del gen	Referencia de acceso GenBank
<i>L. monocytogenes</i> 1/2a y 1/2c	<i>lmo0737</i>	q0737-F	TTTCGCTGTTAAATGGGAAG	275	HQ221543.1
		q0737-R	ACCCTGTCTTGATCCTGGAG	418	
		q0737-P	CAATTGATTGATGCAGGCGC	358	
<i>L. monocytogenes</i> 1/2c	<i>lmo0308</i>	qSLCC-F	AGTTGCTCTGATGAACCTTGA	208	FR733648
		qSLCC-R	TGGCATTCTTAAGGATGTCT	300	
		qSLCC-P	AAGAACCCTAGAAAAGGTTACGATGAAA	239	
<i>L. monocytogenes</i> 1/2b	ORFC	qLei-F	CCTACTGCTTGTGTGGAGAG	688	CP007169.1
		qLei-R	TAGGCTATGTTGACGGAAAA	787	
		qLei-P	AGCATGAACCAAGTTGCTT	706	
<i>L. monocytogenes</i> 4b	ORF2110	q2110-F	TTTAAATGGTACCGGGGACA	438	GQ862961.1
		q2110-R	TTGGACGTGGAGCTCGTAAT	570	
		q2110-P	TGGCGTTTGACAATAATCTTCTG	505	

Tabla III.10. Condiciones específicas de los cebadores y sondas diseñados para el método de PCR en tiempo real (qPCR) múltiple siguiendo las recomendaciones propuestas en la Tabla III.8 para el diseño de oligonucleótidos

Genes	<i>lmo0737</i>			<i>lmo0308</i>			ORFC			ORF2110		
	q0737-F	q0737-R	q0737-P	qSLCC-F	qSLCC-R	qSLCC-P	qLei-F	qLei-R	qLei-P	q2110-F	q2110-R	q2110-P
Cebadores y sondas	45	55	50	40	35	33,33	55	40	45	45	50	40
Contenido de G-C (%)	60,07	60,11	64,83	53,38	54,90	60,98	56,02	55,99	59,88	60,05	60,66	65,26
Tm (teórica)	20	20	20	20	20	27	20	20	20	20	20	20
Longitud de la secuencia												
Tamaño esperado del producto de qPCR	145			95			101			133		

## MATERIAL Y MÉTODOS

Por otro lado, las 4 sondas de hidrólisis TaqMan<sup>®</sup> desarrolladas en este estudio fueron marcadas con un fluoróforo específico para cada pareja de cebadores con una longitud de onda de emisión y de excitación específica para cada una de las sondas (Tabla III.11; Marras 2006), para así identificar en una misma reacción las amplificaciones asociadas a cada uno de los genes.

Tabla III.11. Sondas de hidrólisis TaqMan<sup>®</sup> y espectros de emisión y excitación de cada uno de los fluoróforos con los que se han marcado las sondas diseñadas para el método desarrollado de PCR en tiempo real.

Nombre	Fluoróforos					
	Donador	Longitud de onda (nm)		Aceptor	Longitud de onda (nm)	
		Excitación	Emisión		Excitación	Emisión
q0737-P	HEX	535	555	BHQ-1	480	580
qSLCC-P	Cy5	648	668	BHQ-2	559	670
qLei-P	Cy3	550	564	BHQ-2	559	670
q2110-P	FAM	495	520	TAMRA	556	588

Además, se llevó a cabo el diseño de cebadores para la amplificación de la subunidad 16S del ARNr mediante metodología SYBR<sup>™</sup> Green para ser utilizado como control endógeno (Tabla III.12). Dicho diseño se realizó a partir de una secuencia conocida utilizándose los requisitos propuestos por Rodríguez y col. (2015) (Tabla III.8).

Tabla III.12. Secuencia de nucleótidos de los cebadores diseñados a partir del gen 16S del ARN ribosómico para su amplificación mediante PCR en tiempo real (qPCR).

Cebadores	Secuencia (5'-3')	Tamaño esperado del producto de qPCR (pb)	Posición dentro del gen	Referencia de acceso GenBank
16S-F	ACGAACGGAGGAAGAGCTTG	82	67	M58822.1
16S-R	CCCCAATTACAGGCAGGTT		129	

Finalmente, para comprobar la especificidad de las sondas y cebadores diseñados, se compararon sus secuencias con las secuencias de nucleótidos de la base de datos GenBank del Centro Nacional de Información Biotecnológica (NCBI) utilizando la herramienta BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

### III.2.3.1.3. Optimización de las condiciones de la reacción

Para la optimización de las condiciones de reacción del método de qPCR se utilizaron las cuatro cepas de referencia S2, S4-2, S12-1 y S7-2. Cada una de las reacciones de

## MATERIAL Y MÉTODOS

amplificación se realizó por triplicado para todas las cepas analizadas, en un volumen final de 12,5  $\mu\text{L}$  y en placas MicroAmp de 96 pocillos cubiertas con una lámina óptica adhesiva. Además, en todas las reacciones se incluyeron tres muestras control con agua destilada estéril en lugar de ADN. Para optimizar las condiciones de la reacción de qPCR múltiple, se comenzó optimizando las condiciones de reacción para la amplificación individual de cada uno de los genes utilizando un rango de concentraciones de cebadores y sondas que osciló entre 50 y 300 nM y unas condiciones de temperatura de hibridación y tiempos comprendidos entre 55 y 60  $^{\circ}\text{C}$  y desde 30 s a 1 min, respectivamente. Una vez optimizadas las condiciones de reacción individuales, se fueron incluyendo cada una de las parejas de cebadores y sondas a la reacción mediante pruebas sucesivas y ajustando las concentraciones de cebadores y sondas, así como las condiciones y tiempos de reacción hasta optimizar la reacción con las 4 parejas de cebadores y las 4 sondas para la amplificación simultánea de los 4 genes en estudio.

La mezcla de reacción optimizada contenía 7  $\mu\text{L}$  de Premix Ex Taq<sup>TM</sup>, 0,125  $\mu\text{L}$  de 50X ROX<sup>TM</sup> Reference Dye, 2,5  $\mu\text{L}$  de ADN (10 ng/ $\mu\text{L}$ ) y la concentración optimizada para cada uno de las parejas de cebadores y sondas (Tabla III.13).

Tabla III.13. Condiciones optimizadas de los cebadores y sondas utilizados para la identificación mediante PCR en tiempo real múltiple de los serotipos 1/2a, 1/2b, 1/2c y 4b de *Listeria monocytogenes*.

Gen	Cebadores y sondas	Concentraciones (nM)	Condiciones de amplificación
<i>lmo0737</i>	q0737-F	75	1 ciclo de 95 $^{\circ}\text{C}$ , 10 min ----- 40 ciclos de 95 $^{\circ}\text{C}$ , 15 s; 56,5 $^{\circ}\text{C}$ , 20 s; 58 $^{\circ}\text{C}$ , 20 s y 60 $^{\circ}\text{C}$ , 20 s
	q0737-R	75	
	q0737-P	75	
<i>lmo0308</i>	qSLCC-F	150	
	qSLCC-R	150	
	qSLCC-P	100	
ORFC	qLei-F	150	
	qLei-R	150	
	qLei-P	150	
ORF2110	q2110-F	100	
	q2110-R	100	
	q2110-P	100	

En todas las reacciones, los valores del ciclo de cuantificación o  $C_q$  (del inglés “*quantification cycle*”) fueron detectados automáticamente por el equipo. Los valores de  $C_q$  representan el ciclo de la PCR en el que se detecta el primer incremento de fluorescencia, sobre un umbral definido.

Para la amplificación del gen 16S, la mezcla de reacción optimizada referida a un volumen final de 12,5 µL contenía 6,25 µL de SYBR® Green, 0,125 µL de 50x ROX™, 2,5 µL de ADN (10 ng/µL) y la concentración optimizada de la pareja de cebadores (Tabla III.14). Las condiciones de amplificación de la reacción de qPCR se obtuvieron probando diferentes rangos de temperatura de hibridación y tiempos comprendidos entre 55 y 60 °C y desde 30 s a 1 min, respectivamente. Las condiciones finales de reacción se muestran en la Tabla III.14.

Tabla III.14. Concentración de los cebadores utilizados para el gen 16S del ARN ribosómico mediante PCR en tiempo real utilizando la metodología SYBR® Green.

Gen	Cebadores	Concentraciones (nM)	Condiciones de amplificación
16S	16S-F	300	1 ciclo de 95 °C, 10 min
	16S-R	300	40 ciclos de 95 °C, 15 s y 60 °C, 1 min

Finalmente, se llevó a cabo el análisis de la curva de disociación del producto de PCR mediante el calentamiento del producto en temperaturas comprendidas en un rango de 72 a 95 °C, durante la cual se obtuvieron medidas de fluorescencia de manera continua, calculándose de forma automática la temperatura de fusión o  $T_m$  (del inglés *Melting temperature*). Posteriormente, se llevó a cabo la comparación del valor de  $T_m$  obtenido con el valor de  $T_m$  esperado para la secuencia amplificada y así determinar la especificidad de los cebadores diseñados.

#### III.2.3.1.4. Sensibilidad del método de qPCR múltiple diseñado. Curvas estándar.

A partir del ADN genómico extraído de las muestras de referencia se elaboraron curvas estándar con el objetivo de evaluar la sensibilidad y eficiencia de los métodos de qPCR desarrollados, tanto en el caso del método múltiple para la identificación de los serotipos de *L. monocytogenes* como para el gen 16S del ARNr.

Para ello se utilizaron 10 diluciones seriadas de ADN de cada una de las cepas de referencia usando desde una concentración de 500 hasta 0,005 ng/µL, aplicando las condiciones de reacción para la amplificación de cada una de las parejas de cebadores en estudio detalladas en el apartado III. 2.3.1.3. Una vez obtenidos los valores de  $C_q$ , estos fueron relacionados con el  $\log_{10}$  de las distintas concentraciones de ADN genómico

utilizadas, construyéndose así las curvas estándar correspondientes (Rodríguez y col., 2015).

Para el ensayo de sensibilidad y eficiencia de los resultados obtenidos mediante qPCR se utilizaron tres réplicas de cada dilución del ADN. El límite de detección fue definido como la menor concentración de ADN capaz de ser detectada en la reacción. Los criterios considerados para determinar la eficiencia de la reacción fueron el coeficiente de correlación ( $R^2$ ) de las curvas estándar y la eficiencia de la reacción, calculada mediante la fórmula  $E = 10^{-1/S} - 1$ , siendo “S” la pendiente de la curva estándar (Rodríguez y col., 2015).

### III.2.3.1.5. Especificidad de la reacción de qPCR múltiple mediante comparación con un método de PCR múltiple convencional

Para evaluar la especificidad del método de qPCR múltiple desarrollado, las 41 cepas de *L. monocytogenes* (sección III.1.6) fueron analizadas mediante la metodología de PCR convencional descrita por Doumith y col. (2004). Esta técnica permite la agrupación de los serotipos 1/2a, 1/2b, 1/2c y 4b de *L. monocytogenes* dentro de 4 grupos filogenéticos distintos. Esta metodología ha sido ampliamente utilizada como PCR de referencia para el serotipado de *L. monocytogenes* (Martín y col., 2014; Rodríguez-López y col., 2019; Shimojima y col., 2016; Su y col., 2016; Zhang y col., 2019).

Tras realizar la PCR convencional (Doumith y col., 2004), los productos de PCR fueron separados mediante electroforesis en geles horizontales de agarosa al 2% (p/v) en una solución de tampón TAE 1X preparada a partir del tampón TAE 50X. La tinción de los geles se realizó con 0,5% del reactivo SYBR<sup>TM</sup> Safe DNA Gel Stain. Las muestras se mezclaron con el tampón de carga Blue/Orange Loading Dye 6X, antes de ser depositadas en los pocillos del gel. La electroforesis se realizó en gel de agarosa en solución de tampón TAE 1X a un voltaje constante de 80 V durante 1 h. Transcurrido este tiempo, los geles se visualizaron utilizando el marcador de peso molecular para determinar el tamaño del producto de PCR.

Finalmente, los resultados obtenidos mediante ambos métodos (métodos de PCR convencional y de qPCR múltiples) fueron comparados.

### *III.2.3.2. Métodos moleculares para el análisis de la expresión de genes de virulencia y de respuesta al estrés de L. monocytogenes en jamón curado loncheado.*

Como parte de la optimización de métodos moleculares que se realizó en esta Tesis Doctoral, se desarrollaron dos métodos de cuantificación de la expresión génica, que a su vez utilizaron distintos fluoróforos para detectar la amplificación de las sondas de hidrólisis TaqMan® en el caso de la cuantificación absoluta y SYBR™ Green en el caso de la cuantificación relativa.

#### III.2.3.2.1. Extracción de ARN de medios de cultivo y lonchas de jamón

Para la extracción de ARN se utilizó 1 mL de una muestra homogeneizada almacenada a -82 °C procedente de cada tratamiento (apartado III.2.1, Figura III.1), el cual se centrifugó a 10.000 rpm durante 10 min en condiciones de refrigeración (4 °C), se eliminó el sobrenadante y el sedimento obtenido se empleó para la extracción de todo el material genético empleando el kit comercial de extracción MasterPure™ Complete DNA and RNA Purification Kit. Posteriormente, se ejecutó una segunda fase o tratamiento con ADNasa, para eliminar el contenido de ADN genómico de la muestra. Para ello, se utilizó una solución que contenía la enzima ADNasa (1 U/μL) proporcionada por el kit comercial.

En la extracción de ARN procedente del análisis sobre lonchas de jamón curado, fue necesario incluir una etapa inicial adicional al protocolo de extracción para eliminar la materia grasa del producto. Para ello, se añadieron 200 μL de cloroformo sobre el homogeneizado de las lonchas de jamón curado, previo al tratamiento enzimático. A continuación, la muestra se centrifugó, separando la grasa del resto del contenido celular. Esta grasa fue eliminada junto con el cloroformo y se continuó la extracción siguiendo las instrucciones del kit de extracción.

Finalmente, el ARN obtenido fue diluido en 35 μL de tampón TE y mantenido a -82 °C hasta su utilización. La cantidad y calidad del ARN obtenido fueron determinadas espectrofotométricamente. La calidad del ARN aislado se determinó mediante la relación

de absorbancia  $A_{260}/A_{280}$ , que al igual que en el caso del ADN, se considera que un ARN es de buena calidad cuando dicha relación tiene un valor en torno a 2,0 (Sambrook y col., 1989).

### III.2.3.2.2. Síntesis del ADNc

Antes de realizar el proceso de RT del ARN total extraído para la obtención del ADNc, fue necesario normalizar la concentración de las muestras de ARN a una concentración de 100 ng/ $\mu$ L. La síntesis del ADNc se llevó a cabo utilizando el kit comercial PrimeScrip™ RT Reagent. La mezcla de la reacción estaba compuesta por 5  $\mu$ L de ARN, 2  $\mu$ L de los cebadores aleatorios Random 6 mers (100  $\mu$ M), 0,5  $\mu$ L de OligoDT (50  $\mu$ M), 0,5  $\mu$ L de la enzima transcriptasa inversa PrimerScript RT Enzyme Mix I y agua ultrapura estéril para llevar el volumen de la reacción final a 10  $\mu$ L.

Las condiciones de amplificación de la RT consistieron en un ciclo de 15 min a 37 °C para la transcripción inversa, un ciclo de 5 s a 85 °C para la inactivación de la enzima y una etapa final de enfriamiento a 4 °C. El ADNc obtenido se conservó a -20 °C hasta su uso. En todas las reacciones de RT se incluyó un control negativo que contenía todos los componentes de la mezcla de reacción, excepto el material genético.

Finalmente, previo a la utilización del ADNc para los ensayos de expresión génica, éste se diluyó 1:10 para ser utilizado en las reacciones de qPCR.

### III.2.3.2.3. Evaluación de la sensibilidad de las reacciones de qPCR. Curvas estándar.

Para evaluar la sensibilidad de los métodos de qPCR desarrollados para la cuantificación de la expresión génica absoluta y relativa se siguió el mismo procedimiento descrito en el apartado III.2.3.1.4. Para ello, se prepararon diluciones decimales del ADN de cada una de las cepas de referencia para cada uno de los genes objeto de estudio.

### III.2.3.2.4. Genes de virulencia y de respuesta al estrés de *L. monocytogenes*

Para llevar a cabo la cuantificación de la expresión génica absoluta y relativa de genes de virulencia y de respuesta al estrés de *L. monocytogenes*, se utilizaron las metodologías

## MATERIAL Y MÉTODOS

TaqMan® y SYBR Green™ respectivamente, utilizando los cebadores y sondas que se detallan en la Tabla III.15.

Tabla III.15. Secuencia de nucleótidos de los cebadores y sondas utilizados para los métodos de PCR en tiempo real de transcripción inversa (RT-qPCR) para el análisis de la expresión de los genes de virulencia y de respuesta al estrés de *Listeria monocytogenes*. También se incluye la secuencia de nucleótidos del espaciador intergénico empleada como control interno de amplificación en los protocolos de RT-qPCR mediante la metodología TaqMan®.

Genes	Cebadores y sondas	Secuencia (5'-3')	Tamaño del producto de qPCR (pb)	Referencia
<i>plcA</i>	plcA_f	CTAGAAGCAGGAATACGGTACA	115	Rantsiou y col. (2012b)
	plcA_r	ATTGAGTAATCGTTTCTAAT		
	<i>plcA</i> probe	[HEX]-AATTTATTTAAATGCATCACTTTCAGGT-[TAMRA]		
<i>hly</i>	hlyQFa	CATGGCACCACCAGCATC T	64	Rodríguez-Lázaro y col. (2004)
	hlyQRa	ATCCGCGTGTTCCTTTTCGA		
	<i>hly</i> probe	[HEX]-CGC CTG CAA GTC CTA AGA CGC CA-[TAMRA]		
<i>iap</i>	iapQFa	AAT CTG TTA GCG CAA CTT GGT TAA	78	Rodríguez-Lázaro y col. (2004)
	iapQRa	CAC CTT TGA TGG ACG TAA TAA TAC TGT T		
	<i>iap</i> probe	[HEX]-CAACACCAGCGCCACTACGGACG-[TAMRA]		
<i>sigB</i>	sigB_f	CCAAGAAAATGGCGATCAAGAC	166	Rantsiou y col. (2012b)
	sigB_r	CGTTGCATCATATCTTCTAATAGCT		
	<i>sigB</i> probe	[HEX]-TGTTTCATTACAAAACCTAGTAGAGTCCAT-[TAMRA]		
IGS	IGS1	GGCCTATAGCTCAGCTGGTTA	135	Rantsiou y col. (2012b)
	IGS2	GCTGAGCTAAGGCCCGTAAA		
	IGS probe	[FAM]-ATAAGAAATACAAATAATCATACCCTTTTAC-[TAMRA]		

En el caso de los estudios de expresión génica absoluta mediante metodología TaqMan®, el espaciador intergénico IGS (región conservada entre la subunidad 16S y 23S del ARNr fue utilizado como IAC (del inglés *Internal Amplification Control*) (Tabla III.15).

En el caso de los estudios de expresión génica relativa mediante metodología SYBR Green™, el gen 16S del ARNr se utilizó como control endógeno (apartado III.2.3.1.3).

### III.2.3.2.5. Expresión absoluta: optimización de los métodos de RT-qPCR mediante la utilización de la tecnología TaqMan®

En el desarrollo y optimización de los métodos de qPCR mediante metodología TaqMan® para la cuantificación absoluta de la expresión de los genes de virulencia y de respuesta al estrés de *L. monocytogenes*, inicialmente se optimizaron las condiciones de los cebadores y posteriormente de las sondas de hibridación para cada una de las parejas de cebadores (Tabla III.16). Los componentes de la mezcla de reacción empleada para la



## MATERIAL Y MÉTODOS

amplificación de cada uno de los genes de virulencia y de respuesta al estrés, así como para el espaciador intergénico IGS aparecen detallados en la Tabla III.16.

Tabla III.16. Concentración de los cebadores y sondas, así como el volumen de los componentes de la reacción utilizados para el análisis de la expresión génica absoluta de *Listeria monocytogenes* utilizando la metodología TaqMan®.

Gen	Concentración de los cebadores y sondas (nM)		Volumen (µL/muestra)							
	Cebador	Sonda	Agua	TaqMan®	ROX	MgCl <sub>2</sub>	Cebador Directo	Cebador Reverso	Sonda	<sup>a</sup> ADNc
<i>plcA</i>	300	200	2,875	7	0,125	-	0,375	0,375	0,250	2,5
<i>hly</i>	450	100	1,75	7	0,125	0,75	0,5625	0,5625	0,125	2,5
<i>iap</i>	300	300	2,875	7	0,125	-	0,375	0,375	0,375	2,5
<i>sigB</i>	300	300	2,875	7	0,125	-	0,375	0,375	0,375	2,5
<b>IGS</b>	300	100	-	7	0,125	2	0,375	0,375	0,125	2,5

<sup>a</sup>ADN complementario

La optimización de las reacciones de qPCR se realizó utilizando una concentración de 10 ng/µL de ADN genómico de las 4 cepas de referencia de *L. monocytogenes*. Las reacciones de amplificación fueron realizadas por triplicado en un volumen final de 12,5 µL. Los valores de C<sub>q</sub> fueron calculados automáticamente por el equipo de qPCR.

Las condiciones de reacción aplicadas para la amplificación de los genes de virulencia y de respuesta al estrés, así como las del gen estructural IGS aparecen detalladas en la Tabla III.17.

Tabla III.17. Condiciones de reacción para la amplificación de los genes de virulencia y respuesta al estrés de *Listeria monocytogenes* utilizando la metodología TaqMan®. Se incluyen además las condiciones del control interno de amplificación IGS.

Genes	Etapas	
	Etapa 1 (1 ciclo)	Etapa 2 (40 ciclos)
<i>plcA</i>		60 °C, 1 min
<i>hly</i>		55 °C, 1 min
<i>iap</i>	95 °C, 10 min	95 °C, 15 s 60 °C, 1 min
<i>sigB</i>		60°C, 1 min
<b>IGS</b>		55 °C, 1 min

### III.2.3.2.5.1. Elaboración de las curvas estándar para el cálculo de la expresión génica absoluta

En el estudio de la expresión génica absoluta se determinó el número de copias de los genes objeto de estudio mediante la comparación de los valores de  $C_q$  con una curva estándar. En primer lugar se obtuvieron las curvas estándar de las copias de cada uno de los genes en estudio siguiendo el procedimiento descrito previamente por Mayer y col. (2003). Para ello, a partir del ADN genómico y utilizando las condiciones previamente optimizadas se llevó a cabo una reacción de qPCR, donde los productos de la reacción fueron medidos espectrofotométricamente. Estos fragmentos se consideraron como la disolución patrón. Posteriormente, el número de copias fue calculado siguiendo la fórmula descrita por Hyeon y col. (2010):

$$\text{Número de copias} = \frac{W_{qPCR}}{\left(660 \frac{g}{mol}\right)} \times (L_{qPCR}) \times (6,023 \times 10^{23})$$

donde  $W_{qPCR}$  es el peso del fragmento de qPCR (g/ $\mu$ L), 660 g/mol es el peso molecular de un par de bases (ADN de doble cadena),  $L_{qPCR}$  es el número de pares de bases (pb) del fragmento de PCR y  $6,023 \times 10^{23}$  es el número de Avogadro.

A partir de la disolución patrón, se prepararon diluciones decimales seriadas, usando una alícuota de cada una de las diluciones como patrón de diferentes números de copias en las reacciones de qPCR. De esta manera, las curvas estándar se construyeron relacionando el número de copias de los diferentes genes con el valor de  $C_q$  obtenida para cada uno de esos patrones analizados. Para llevar a cabo la amplificación mediante qPCR, cada dilución de las copias de gen fue ensayada por triplicado. Los criterios considerados para determinar la fiabilidad de los resultados fueron los mismos que los establecidos para el método de qPCR múltiple desarrollado anteriormente (apartado III.2.3.1.4).

Una vez construidas las curvas estándar, el número total de copias del gen de interés se calculó extrapolando los valores de  $C_q$  de las muestras analizadas con los valores obtenidos en las curvas estándar.

III.2.3.2.6. Expresión relativa: optimización de los métodos de RT-qPCR basados en la metodología SYBR™ Green

En el desarrollo y optimización de los métodos de qPCR basados en la metodología SYBR™ Green para la cuantificación relativa de la expresión de los genes de virulencia *plcA*, *hly* e *iap* se utilizaron las condiciones descritas previamente en la metodología TaqMan® (apartado III.2.3.2.4). Las secuencias y las condiciones optimizadas de reacción del gen 16S del ARNr utilizado como control endógeno aparecen detalladas en el apartado III.2.3.1.3.

Las reacciones de amplificación fueron realizadas por triplicado en un volumen final de 12,5 µL (Tabla III.18).

Tabla III.18. Concentración de los cebadores y volumen de los componentes de la reacción para el análisis de la expresión génica relativa de *Listeria monocytogenes* utilizando la metodología SYBR™ Green.

Genes	Concentración de los cebadores (nM)	Volumen (µL/muestra)						
		Agua	SYBR™ Green	ROX	MgCl2	Cebador Directo	Cebador Reverso	ADNc
<i>plcA</i>	300	2,875	6,25	0,125	-	0,375	0,375	2,5
<i>hly</i>	450	1,75	6,25	0,125	0,75	0,5625	0,5625	2,5
<i>iap</i>	300	2,875	6,25	0,125	-	0,375	0,375	2,5

La curva de disociación de los productos de qPCR amplificados se generó tal y como se describe en el apartado III.2.3.1.3.

En el caso de la expresión génica relativa se evaluó la expresión de los genes objeto de estudio en relación a un calibrador o muestra control y un gen endógeno o estructural que mantiene una expresión génica constante. Los genes diana fueron los genes de virulencia *plcA*, *hly* e *iap* de *L. monocytogenes*. El control endógeno fue el gen 16S del ARNr.

El análisis de los resultados obtenidos mediante RT-qPCR se llevó a cabo mediante el método del  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  o método de cuantificación relativa de los niveles de expresión de los genes diana (*plcA*, *hly*, e *iap*) respecto al gen constitutivo o control endógeno 16S (Livak y Schmittgen, 2001). Este gen se utiliza para normalizar las diferencias existentes entre la concentración de ARNm de las distintas muestras analizadas mediante RT-qPCR. La utilización de este método para el análisis de la expresión génica relativa conllevó el

aseguramiento de los dos requisitos establecidos por el mismo. En primer lugar, se demostró que la diferencia entre las curvas estándar de los genes diana y del control endógeno era inferior a 10 % en todos los casos. Para ello, las curvas estándar de los genes diana y del control endógeno se construyeron tal y como se describe en el apartado III.2.3.1.4. En segundo lugar, se evidenció que las condiciones experimentales no afectaban a la expresión génica del control endógeno seleccionado.

### III.2.4. CARACTERIZACIÓN DE *L. monocytogenes*

La caracterización de los aislados de *L. monocytogenes* obtenidos en los muestreos de las industrias cárnicas se llevó a cabo mediante el método de qPCR múltiple desarrollado en esta Tesis Doctoral (apartado III.2.3.1), y mediante PFGE.

Para esta última técnica los aislados se procesaron siguiendo el protocolo descrito por el Centro de Control y Prevención de Enfermedades o CDC (del inglés *Center for Disease Control and Prevention*): “*Standard Operating Procedure for Pulsenet PFGE of Listeria monocytogenes*”.

#### III.2.4.1. Preparación de los bloques de agarosa

Para la extracción del ADN genómico y obtención de los bloques de agarosa se empleó un cultivo de cada una de las cepas en agar BHI incubado durante toda la noche. De este cultivo se arrastró parte del crecimiento con una torunda estéril y se resuspendió en tampón TE. Para verificar el proceso de PFGE se utilizó como control estándar la cepa *S. enterica* subsp. *enterica* serovar *Braenderup* (ATCC® BAA-664™). Posteriormente, se ajustó la concentración a 1 densidad óptica mediante espectrofotometría a 600 nm de longitud de onda. A continuación, se transfirieron 200 µL de dicha solución a un tubo estéril y fueron incubados con 10 µL de lisozima (20 mg/mL) durante 20 min a 55 °C. Después de dicha incubación, se añadieron 20 µL de proteinasa K (20 mg/mL).

Tras el proceso inicial de lisis con lisozima, se prepararon los bloques de agarosa con 200 µL de agarosa SeaKem® Gold al 1% (p/v) y 0,5% de SDS en tampón TE (previamente calentado en el microondas y estabilizado en una estufa a 50 °C). La agarosa se mezcló con la solución de 200 µL tratada con lisozima y proteinasa K, transfiriéndose

posteriormente este volumen al interior de un molde para formar 4 bloques de agarosa de cada una de las cepas.

#### III.2.4.2. Lisis y lavado celular de los bloques de agarosa

Transcurrido el tiempo necesario para que solidificaran los bloques de agarosa, se retiró el adhesivo de la parte interior del molde y los moldes para una misma cepa se introdujeron en 5 mL de tampón CLB. Los tubos con los bloques de agarosa se incubaron en un baño de agua a 55 °C durante 2 h con agitación constante a 175 rpm.

Tras el proceso de lisis celular de los bloques de agarosa, se eliminó el tampón CLB filtrando los bloques a través de un filtro específico y se llevaron a cabo dos procesos de lavado con agua destilada y 4 lavados con tampón TE. Finalmente, los moldes de agarosa se depositaron en 1 mL de tampón TE y se conservaron a 4 °C hasta su utilización.

#### III.2.4.3. Digestión de los bloques de agarosa con enzimas de restricción

Para llevar a cabo la digestión con las enzimas de restricción se utilizó una porción de aproximadamente 1/3 del molde de agarosa. Para la digestión se utiliza una enzima de restricción primaria *SgsI* y una enzima de restricción secundaria *ApaI*, las cuales llevan a cabo cortes en la secuencia del ADN de *L. monocytogenes* de forma específica (Tabla III. 19). El uso de enzimas secundarias está recomendado en las situaciones en las que los patrones de PFGE obtenidas con la enzima primaria son indistinguibles. Para la digestión de la cepa o control estándar se utilizó la enzima de restricción *XbaI* (Tabla III.19).

Tabla III.19. Secuencia de reconocimiento de las enzimas de restricción utilizadas.

Enzima	Secuencia de reconocimiento y corte
<i>SgsI (AscI)</i>	5'...GG <b>X</b> <u>CGCGCC</u> ...3' 3'... <u>CCGCGC</u> <b>X</b> GG...5'
<i>ApaI</i>	5'... <u>GGGCC</u> <b>X</b> C...3' 3'... C <b>X</b> <u>CCGGG</u> ...5'
<i>XbaI</i>	5'...T <b>X</b> <u>CTAGA</u> ...3' 3'... <u>AGATC</u> <b>X</b> T...5'

Para el proceso de restricción enzimática se llevaron a cabo dos pasos:

a) Etapa de pre-digestión o equilibrado

Se recomienda este paso para equilibrar los moldes en la solución tampón en la cual se va a llevar a cabo el proceso de digestión (Tabla III.20). Los moldes se incubaron durante 15-20 min a temperatura ambiente en esta solución de equilibrado.

b) Etapa de digestión

Tras retirar la solución de equilibrado, los moldes se sumergieron en una solución con la enzima de restricción que lleva a cabo el proceso de digestión (Tabla III.20). La temperatura de incubación fue de 37 °C en todos los casos debido a que ésta es la temperatura óptima de funcionamiento de las enzimas de restricción, incubándose los moldes durante 24 h en agitación continua.

Tabla III.20. Volumen de los componentes utilizados en las soluciones de equilibrado y en el proceso de digestión para cada una de las enzimas de restricción utilizadas.

Reactivo	Solución de equilibrado	Solución de digestión		
		<i>SgsI</i>	<i>ApaI</i>	<i>XbaI</i>
		µL/molde		
Agua destilada estéril	180	176,5	176,5	176,5
Tampón de restricción 10X <sup>a</sup>	20	20	20	20
BSA <sup>b</sup> (20 mg/mL)	-	1	1	1
<i>SgsI</i> (10 U/µL)	-	2,5	-	-
<i>ApaI</i> (10 U/µL)	-	-	2,5	-
<i>XbaI</i> (10 U/µL)	-	-	-	2,5
<b>Volumen total</b>	<b>200</b>	<b>200</b>	<b>200</b>	<b>200</b>

<sup>a</sup>Enzima de restricción tiene un tampón de restricción específico para un funcionamiento al 100% según las indicaciones del fabricante. Para las enzimas *SgsI* y *XbaI* se usó el tampón Tango 10X y para la enzima *ApaI* el tampón B 10X.

<sup>b</sup>Albúmina sérica bovina o BSA (del inglés Bovine Serum Albumin).

III.2.4.4. *Preparación del gel y condiciones de la electroforesis*

Para llevar a cabo la electroforesis se preparó un gel de 100 mL de agarosa SeaKem<sup>®</sup> Gold al 1% en una solución de tampón TBE 0,5X, preparada a partir del tampón TBE 5X. Para ello, la agarosa fue derretida en un microondas y posteriormente atemperada en un baño a 55 °C durante 20 min aproximadamente. Como control del peso molecular se utilizó el control estándar *S. enterica* subsp. *enterica* serovar *Braenderup* (ATCC<sup>®</sup> BAA-664<sup>TM</sup>).

Previamente a la electroforesis, los moldes se retiraron de la solución con la enzima de restricción y se introdujeron en 200  $\mu$ L de tampón TBE 0,5X, incubándose a temperatura ambiente durante 10 min para posteriormente depositarse en cada uno de los 15 pocillos del gel. Se colocó un control en cada extremo del gel y uno más en el pocillo central (pocillo 8). Se añadieron los 100 mL de agarosa en el molde y se dejó solidificar a temperatura ambiente cubriendo el gel con una superficie limpia para evitar la aparición de polvo o impurezas sobre la superficie del mismo.

Una vez solidificado se introdujo en la cubeta de electroforesis inmerso en aproximadamente 2.300 mL de tampón TBE 0,5X que se mantuvieron circulando a 70 recirculaciones/min y a una temperatura de 14 °C. Para llevar a cabo la electroforesis se utilizó el equipo CHEF Mapper<sup>®</sup> XA Pulsed Field Electrophoresis System. El tiempo total de la electroforesis fue de 19 h con pulsos cada 4-40 s. El voltaje empleado fue de 6 V/cm, los ángulos de 120° y el factor rampa lineal.

### *III.2.4.5. Tinción del gel y análisis de perfiles*

Una vez finalizada la electroforesis, el gel se depositó en un recipiente con 360 mL de agua destilada y 40  $\mu$ L de SYBR<sup>™</sup> Gold Nucleic Acid Gel Stain (10.000X) durante 20 min. Finalmente, el gel se visualizó y fue fotografiado en un transiluminador.

Los análisis de los perfiles de restricción fueron evaluados mediante el programa informático BioNumerics. Los dendogramas se obtuvieron utilizando el algoritmo UPGMA (del inglés *Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Averages*) (Priest y Austin, 1995), empleando el Coeficiente de Dice con una tolerancia respecto a la posición de la banda del 1,5%. Dos pulsotipos se consideraron diferentes si el coeficiente de similitud fue inferior al 80% y se consideraron como subtipos aquellos pulsotipos con un coeficiente de similitud de 80-95% (González-Dominguez y col., 2015).

### III.2.5. TRATAMIENTOS NO TÉRMICOS COMO MÉTODO DE CONTROL DE *L. monocytogenes* EN JAMÓN CURADO LONCHEADO

#### III.2.5.1. Preparación inicial de los inóculos y recuento de los microorganismos

Las cepas de *L. monocytogenes* utilizadas para los tratamientos no térmicos fueron las cepas de referencia S2, S4-2, S12 y S7-2. Para preparar las cepas de trabajo, éstas fueron revitalizadas mediante 2 pases sucesivos de 24 h en caldo BHI a 37 °C. Para llevar a cabo los experimentos, se ajustó la concentración del cultivo inicial mediante diluciones decimales en agua de peptona al 1% a 3 log ufc/mL, según se especifica en cada uno de los experimentos realizados y que se detallan en el apartado correspondiente.

Para llevar a cabo los estudios de biocontrol se utilizaron las 30 cepas de levaduras seleccionadas (apartado III.1.6, Tabla III.6). Cada una de las cepas de levaduras utilizada fue incubada en caldo YES en agitación constante a 25 °C durante 48 h. Finalizado el tiempo de incubación, la suspensión de levaduras fue cuantificada utilizando una cámara de Thoma y ajustada su concentración mediante diluciones decimales en agua de peptona al 1%, a la concentración definida en cada uno de los experimentos realizados.

Finalmente, para llevar a cabo el recuento de los microorganismos, se utilizó agar cromogénico CHROMagar™ Listeria para el recuento de *L. monocytogenes*, y agar YES para el recuento de levaduras en los ensayos de biocontrol. Para ello, al final del periodo de incubación de cada experimento, el medio elaborado con jamón curado o las lonchas de jamón curado fueron homogeneizadas con 30 mL de agua de peptona al 1%. Posteriormente, se hicieron diluciones seriadas en el mismo diluyente para determinar el crecimiento de *L. monocytogenes* o de las levaduras, inoculando para ello, 100 µL de las mismas en el medio específico para el recuento de cada microorganismo. El medio cromogénico CHROMagar™ Listeria fue incubado a 37 °C durante 24 h mientras que el medio YES fue incubado a 25 °C durante 48 h.

La ratio de crecimiento de *L. monocytogenes* en presencia de las levaduras, expresada como log ufc, se calculó como la diferencia del crecimiento del lote problema (sometido al tratamiento) respecto al lote control (sin ser sometido al tratamiento).



### III. 2.5.2. Evaluación del efecto de la $a_w$ , NaCl y temperatura sobre el crecimiento y expresión génica de *L. monocytogenes*

Para evaluar el efecto de la  $a_w$  se modificó un medio elaborado con carne de cerdo liofilizada con diferentes concentraciones de un sustrato iónico (NaCl; apartado III.1.3.2). Al mismo tiempo se comparó dicho efecto bajo las mismas condiciones con el producido por un sustrato no iónico (glicerol). De esta manera, se pretendió simular las condiciones de  $a_w$  que se dan a lo largo de las fases de obtención del jamón curado, desde las etapas de secado y maduración en bodega hasta las fases finales del producto en comercialización después de ser loncheado.

#### III.2.5.2.1. Ensayos *in vitro*

Para evaluar el efecto de la  $a_w$  y la utilización de diferentes concentraciones de NaCl a 2 temperaturas distintas (temperatura de abuso a 15 °C y temperatura de refrigeración a 7 °C), las 4 cepas de referencia de *L. monocytogenes* fueron incubadas por separado en un medio elaborado con carne de cerdo liofilizada. Para ello, los medios de cultivo que se utilizaron en este experimento fueron elaborados siguiendo las condiciones que se describen en el apartado III.1.3.1 y modificados para obtener diferentes condiciones de  $a_w$  y de concentración de NaCl, tal y como se muestra en dicho apartado. La  $a_w$  del medio fue medida al inicio y al final del periodo de incubación.

Cada uno de los medios se inoculó con 50  $\mu$ L de cada una de las cepas de *L. monocytogenes* por separado a la concentración de 3 log ufc/mL. Todos los experimentos se hicieron por triplicado. Las muestras fueron incubadas a 7 °C y 15 °C durante 10 días. Al final del periodo de incubación, los recuentos de *L. monocytogenes*, así como la evaluación del efecto de las distintas condiciones utilizadas fueron realizadas tal y como se describe en el apartado III.2.5.1.

Al inicio y al final de cada experimento se tomó 1 mL del homogeneizado en agua de peptona al 1% y se almacenó a -82 °C para la extracción de ARN y posterior evaluación de la expresión génica.

III.2.5.2.2. Estudios de expresión génica absoluta de *L. monocytogenes* en medios de cultivo con distintos valores de  $a_w$ , concentración de NaCl y temperatura

A partir de las muestras conservadas a -82 °C procedentes de los ensayos sobre el medio elaborado con carne de cerdo y las lonchas de jamón curado bajo distintas condiciones de  $a_w$ , concentración de NaCl y temperatura, se llevó a cabo la cuantificación absoluta de la expresión de los genes de virulencia *plcA*, *hly* e *iap*, y el gen de respuesta al estrés *sigB* de *L. monocytogenes* siguiendo los protocolos desarrollados en el apartado III.2.3.2.

III. 2.5.3. Evaluación del efecto de la  $a_w$  y la alta presión hidrostática (HPP) sobre la expresión génica de *L. monocytogenes* en lonchas de jamón curado

El tratamiento de HPP fue realizado por el Grupo de Investigación en Seguridad Microbiológica de Alimentos del Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria. Para ello, se utilizaron lonchas de jamón curado de 20 g con valores de  $a_w$  de 0,92, la cual fue modificada con una solución de cloruro de litio saturada hasta alcanzar valores de  $a_w$  de 0,88 y 0,84. Posteriormente, las lonchas fueron inoculadas con las cepas S4-2 y S12-1 de *L. monocytogenes* en una concentración de 6 log ufc/g. Finalmente, se envasaron a vacío y se conservaron a 4 °C hasta ser sometidas a los tratamientos de HPP.

Cada una de las cepas de *L. monocytogenes* en cada uno de los lotes de  $a_w$  (0,92, 0,88 y 0,84) fue sometida a dos tratamientos de HPP a una temperatura aproximada de 11 °C, tal y como se detalla en la Tabla III.21. El experimento se realizó por duplicado. Se utilizó un lote control sin ser sometido a las altas presiones hidrostáticas.

Tabla III.21. Lotes de las lonchas de jamón curado inoculadas con las cepas S4-2 y S12-1 de *Listeria monocytogenes* a distinta actividad de agua ( $a_w$ ) sometidas a los tratamientos de altas presiones hidrostáticas.

$a_w$	0,92		0,88		0,84	
Cepa de <i>L. monocytogenes</i>	S4-2	S12-1	S4-2	S12-1	S4-2	S12-1
Intensidad del tratamiento (MPa)	450	600	450	600	450	600
Tiempo (min)	10	5	10	5	10	5

Las muestras una vez sometidas a los tratamientos con altas presiones hidrostáticas se mantuvieron a 4 °C durante 30 días. Al inicio y al final del periodo de incubación, se tomó

una muestra de 1 mL del homogeneizado en agua de peptona al 1% y se almacenó a -82 °C para la extracción de ARN y posterior evaluación de la expresión génica.

La cuantificación absoluta de la expresión de los genes de virulencia *plcA*, *hly* e *iap*, y el gen de respuesta al estrés *sigB* de *L. monocytogenes* se realizó siguiendo el protocolo desarrollado en el apartado III.2.3.2.

### *III.2.5.4. Evaluación del efecto de electrones acelerados la expresión génica de L. monocytogenes en lonchas de jamón curado*

Para llevar a cabo este experimento se utilizaron lonchas de jamón curado deshuesado sometidas a tratamientos con electrones acelerados bajo el estudio realizado por el Grupo de Investigación “Tecnología de Alimentos de Origen Animal” (TECNOLALIMA) del Departamento de Nutrición, Bromatología y Tecnología de los Alimentos de la Facultad de Veterinaria de la Universidad Complutense de Madrid. Para ello, se utilizaron lonchas de jamón curado inoculadas mediante inmersión en una solución que contenía la cepa S4-2 de *L. monocytogenes* a una concentración entre 8,5 y 9 log ufc/mL. Tras la inoculación, las muestras se envasaron a vacío.

Las lonchas de jamón curado inoculadas con la cepa S4-2 de *L. monocytogenes* fueron irradiadas con dosis de 1, 2, y 3 kGy. Posteriormente, fueron incubadas 30 días bajo temperaturas de abuso y refrigeración (15 °C y 7 °C, respectivamente). El experimento se realizó por triplicado.

Para llevar a cabo el análisis la expresión génica de *L. monocytogenes*, se tomaron muestras los días 1 (inmediatamente tras ser sometida a los tratamientos con electrones acelerados), 7, 15 y 30. En cada análisis, se utilizó un lote control sin ser sometido a los tratamientos con electrones acelerados. Para el análisis de la expresión génica se tomó de cada tratamiento 1 mL del homogeneizado en agua de peptona al 1% y se almacenó a -82 °C hasta la extracción del ARN y posterior evaluación de la cuantificación de la expresión absoluta de los genes de virulencia *plcA*, *hly* e *iap*, y el gen de respuesta al estrés *sigB* de *L. monocytogenes* siguiendo el protocolo desarrollado en el apartado III.2.3.2.

### III.2.5.5. Evaluación de la actividad anti-*L. monocytogenes* de *D. hansenii*

En los estudios de biocontrol se evaluó la capacidad de las levaduras utilizadas para reducir o inhibir el crecimiento de *L. monocytogenes* en jamón curado simulando las condiciones de las lonchas del producto final, utilizando inicialmente un medio elaborado con jamón curado y una cepa del serotipo 4b de *L. monocytogenes*. Posteriormente se seleccionaron aquellos aislados de levaduras con mayor capacidad de reducir el crecimiento de *L. monocytogenes* para evaluar su capacidad antagonista sobre lonchas de jamón curado.

#### III.2.5.5.1. Ensayos *in vitro*

Inicialmente, se llevó a cabo un primer análisis *in vitro* utilizando un medio de cultivo elaborado con jamón curado y seleccionando 30 aislados de la especie *D. hansenii* (apartado III.1.6, Tabla III.6). Cada una de las levaduras seleccionadas se co-inoculó con el serotipo 4b de *L. monocytogenes* en el medio elaborado con jamón curado con dos  $a_w$  (0,95 y 0,93). Para ello, sobre la superficie del medio se inocularon 50  $\mu$ L de una solución que contenía 6 log ufc/mL y 3 log ufc/mL de *D. hansenii* y *L. monocytogenes*, respectivamente, preparados tal y como se describe en el apartado III.2.5.1. Los inóculos se extendieron por toda la placa mediante un asa Drigalski.

A partir de los resultados obtenidos, se seleccionaron los 4 aislados de *D. hansenii* que mostraron los mejores resultados sobre la inhibición del crecimiento de *L. monocytogenes* en ambas  $a_w$  ensayadas. Estos 4 aislados fueron co-inoculados con las 4 cepas de referencia de *L. monocytogenes* a la misma concentración (3 log ufc/mL). En ambos ensayos, se utilizó un lote control inoculado únicamente con *L. monocytogenes* para evaluar el crecimiento del microorganismo sobre el medio elaborado con jamón curado, sin la presencia de levaduras. Cada experimento se realizó por triplicado.

En ambos experimentos, las placas inoculadas se incubaron a temperatura de refrigeración (7 °C) durante 10 días. Finalizado el periodo de incubación, se llevaron a cabo los recuentos tal y como se describe en el apartado III.2.5.1.

### III.2.5.5.2. Ensayos en lonchas de jamón curado

En este experimento se utilizaron lonchas de jamón curado adquiridas en un establecimiento comercial, con una  $a_w$  de 0,90 y que fueron cortadas con un tamaño aproximado de 16 cm<sup>2</sup>. Para reducir la contaminación microbiana de las lonchas, éstas se sumergieron en etanol al 70% (v/v) durante 1 min y se esterilizaron con luz UV durante 30 min. Para modificar la  $a_w$  de las lonchas de jamón, se sumergieron éstas en agua ultra-pura estéril durante 1,5 min y 2,5 min para alcanzar las  $a_w$  de 0,93 y 0,95, respectivamente. Finalmente, las lonchas se depositaron en recipientes de plástico estériles que contenían una solución de glicerol al 12 o al 18% (v/v) para mantener una humedad relativa constante del 95 o 93%, respectivamente (Figura III.2).



Figura III.2. Fotografía de las lonchas de jamón curado sobre la superficie de los recipientes estériles antes de ser inoculadas.

A partir de los resultados obtenidos con las 4 cepas de *D. hansenii* seleccionadas, se seleccionó la cepa de levadura que mostró mejores resultados sobre la inhibición del crecimiento de *L. monocytogenes*. Para ello, se prepararon las suspensiones de las 4 cepas de referencia de *L. monocytogenes* y la cepa de *D. hansenii* elegida en una concentración de 3 log ufc/mL para ambos tipos de microorganismos, tal y como se describe en el apartado III.2.5.1. Se inocularon 100 µL sobre la superficie de las lonchas que fueron extendidos con la ayuda de un asa Drigalsky. Se utilizó un lote control inoculado únicamente con *L. monocytogenes* y un lote no inoculado para medir la  $a_w$  de las lonchas al inicio y al final del experimento. El experimento se realizó por triplicado.

Todas las muestras fueron incubadas a 7 °C durante 10 días. Al final del periodo de incubación, los recuentos de ambos microorganismos se evaluaron tal y como se describe en el apartado III.2.5.1. Además, al inicio y al final de cada experimento, se tomó una muestra de 1 mL del homogeneizado de las lonchas de jamón curado de cada uno de los lotes en agua de peptona al 1% que se almacenó a -82 °C para la extracción de ARN y posterior evaluación de la expresión génica.

### III.2.5.5.3. Estudios de expresión génica relativa de *L. monocytogenes* en lonchas de jamón curado sometida a tratamientos de biocontrol con *D. hansenii*

A partir de las muestras conservadas a -82 °C procedentes de los tratamientos de biocontrol sobre lonchas de jamón curado, se llevaron a cabo los estudios de expresión relativa de los genes de virulencia *plcA*, *hly* e *iap* de *L. monocytogenes*, siguiendo el protocolo desarrollado en el apartado III.2.3.2.

Para el cálculo de la expresión génica relativa se consideraron las muestras control o en ausencia del agente de biocontrol (inoculadas solo con *L. monocytogenes*) como control o calibrador. El gen 16S se utilizó como control endógeno.

### III. 2.5.5.4. Análisis sensorial de las lonchas de jamón curado inoculadas con *D. hansenii*

En el ensayo de biocontrol también se evaluó la aceptabilidad de las lonchas inoculadas con *D. hansenii*. Para ello, se evaluó el efecto de *D. hansenii* sobre las características sensoriales de apariencia y olor de las lonchas de jamón curado.

Inicialmente, las lonchas de jamón curado comercial fueron modificadas tal y como se describe en el apartado III.2.5.5.2. Posteriormente, se inocularon sobre la superficie de las lonchas 100 µL de una suspensión de *D. hansenii* con una concentración de 3 log ufc/mL, que fueron extendidos con la ayuda de un asa Drigalsky. Las lonchas fueron incubadas a 7 °C durante 10 días. Se utilizó un lote control sin inocular.

Las lonchas de jamón inoculadas y no inoculadas fueron evaluadas por un panel de catadores no entrenados formado por estudiantes y personal del Instituto de Investigación de la Carne y Productos Cárnicos de la Universidad de Extremadura. Cada miembro del

panel participó en dos pruebas hedónicas con 4 muestras cada una. Cada una de las muestras fue codificada con 3 dígitos asignados de forma aleatoria.

Para determinar la aceptabilidad de las lonchas, las lonchas inoculadas y no inoculadas fueron evaluadas visualmente y puntuadas siguiendo una escala hedónica de 5 puntos: *no me gusta nada, no me gusta, ni me gusta ni me disgusta, me gusta moderadamente, me gusta mucho* (Martínez y col., 2002). Para evaluar la diferencia de olor entre las lonchas inoculadas y no inoculadas, se indicó al panel de catadores que identificaran la intensidad u olor a levadura (asociada con la presencia de levaduras durante el proceso de fermentación; Sánchez-Molinero y Arnau 2008). Para ello, al igual que para el análisis visual de las lonchas, se utilizó una escala hedónica de 6 puntos, siendo 1 el valor más alto de intensidad u olor a levadura y 6 el nivel de intensidad más bajo.

Los resultados de ambos experimentos fueron expresados como el porcentaje de panelistas que seleccionaron cada punto en las escalas hedónicas (apariencia y olor).

### III.3. TRATAMIENTO ESTADÍSTICO

En primer lugar, se determinó si los datos obtenidos en este trabajo seguían una distribución normal mediante la prueba de Shapiro-Wilk. Para aquellos datos que siguieron una distribución normal, se aplicó el Test ANOVA para determinar diferencias significativas entre las medias y el test Tukey como prueba Post hoc. En el caso de la distribución no normal de los datos analizados, se utilizó la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis para determinar diferencias significativas entre las medias. Posteriormente, se aplicó el test U de Man-Whitney como pruebas Post hoc para determinar que medias diferían. Para establecer las correlaciones entre dos variables independientes en el análisis sensorial de las muestras se determinaron los coeficientes de correlación de Spearman (datos no normales). El nivel de significancia se estableció en  $P \leq 0.05$ .





## IV. RESULTADOS

---



IV. 1. DEVELOPMENT OF A MULTIPLEX REAL-TIME PCR  
TO DIFFERENTIATE THE FOUR MAJOR *Listeria*  
*monocytogenes* SEROTYPES IN ISOLATES FROM MEAT  
PROCESSING PLANTS

**Abstract**

*Listeria monocytogenes* is an important foodborne pathogen, causative agent of listeriosis. The epidemiology and persistence of this bacterium in meat processing plants may be related to its serotype, so it is of utmost importance to carry out a correct differentiation of *L. monocytogenes* serotypes. The objective of this study was to develop a unique quadruplex real-time quantitative PCR (qPCR) method able to differentiate the four most predominant and worrying *L. monocytogenes* serotypes (1/2a, 1/2b, 1/2c and 4b) in isolates from meat processing plants and ready-to-eat (RTE) dry-cured meat products. The design of specific primers and probes was based on the *lmo0737*, *lmo0308*, ORFC (locus genomically equivalent to *gltA-gltB*) and ORF2110 genes. A qPCR based on a fragment of the 16S rRNA gene was used to ensure the amplification of *Listeria* spp. genomic DNA. The standard curves showed efficiency values ranging between 92.3 % and 105.8 % and,  $R^2$  values  $> 0.98$ . The specificity of the method was also confirmed by the comparison of the results with those obtained by a previously reported conventional multiplex PCR. In addition, none of the strains which were not ascribed to *L. monocytogenes* amplified any of the target genes related to the four major serotypes of this pathogenic species. The qPCR, therefore, provides a sensitive, specific and rapid tool for identifying the *L. monocytogenes* serotypes 1/2a, 1/2b, 1/2c and 4b. This method could be very useful for identifying sources of *L. monocytogenes* contamination in the meat industry or for epidemiological monitoring of persistent strains throughout the processing of RTE meat products.

## 1. INTRODUCTION

Consumers' food-related lifestyle is changing towards ready-to-eat (RTE) foods consumption (Jamali and Thong, 2014). RTE foods, such as dry-cured meat products, can be contaminated with pathogenic microorganisms that may enter the food processing environment from raw meats and other ingredients or post-processing handling due to inadequate equipment hygienic conditions (Buchanan et al., 2017). One of the most important and worrying foodborne pathogens contaminating RTE dry-cured meat products is *Listeria monocytogenes* (EFSA and ECDC, 2018). This bacterium is responsible for a serious systematic infection named listeriosis that causes meningitis, encephalitis and septicaemia, primarily in the elderly or immunocompromised patients (Vitullo et al., 2013; Volpe Sperry et al., 2008).

*L. monocytogenes* serotypes differ in their epidemic potential and ability to cause disease. Even some strains of *L. monocytogenes* can survive and persist in meat processing plants for extended periods (Lundén et al., 2003; Martín et al., 2014), which pose an increasing risk to the consumers. Due to the fact that the epidemiology and persistence of this bacterium in RTE food chains may be related to its serotype, it is important the characterisation of *L. monocytogenes* isolates. Serotyping of this bacterium is mainly based on the variation in the somatic (O) and flagellar (H) antigens allowing identification of 13 different serotypes (Kérouanton et al., 2010; Sheng et al., 2018). At least 95 % of isolates from contaminated foods and clinical cases are of serotypes 1/2a, 1/2b, 1/2c and 4b (Doumith et al., 2004). The serotypes 4b, 1/2b and 1/2c are described as pathogenic (Wagner and Allerberger, 2003), being the 4b responsible for the majority of human listeriosis cases (Virginia et al., 2009); whilst the 1/2a is the most prevalent in foods (Zhang et al., 2007).

Because of the relevance of *L. monocytogenes* grouping for epidemiological analyses, several discriminatory subtyping methods have been proposed. Routine analysis for differentiating *L. monocytogenes* serotypes by traditional agglutination methods is time-consuming, and limited by cost and the need of good technical practice and expertise (Kérouanton et al., 2010). So far, among the molecular subtyping methods, pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) is the most known sensitive strain discrimination grouping-based method and it is considered as a “gold standard” for subtyping *Listeria* spp. (Graves

and Swaminathan, 2001; Liu, 2006) and detecting listeriosis outbreaks (Doumith et al., 2004). Other techniques such as Repetitive Extragenic Palindromic PCR (REP-PCR), BOX repetitive element PCR (BOX-PCR) and Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) have been also used for such purpose (Liu, 2006). In the last years, several multiplex PCR systems for the rapid differentiation of *L. monocytogenes* serotypes have been already optimised (Borucki and Call, 2003; Chen and Knabel, 2007; De Santis et al., 2007; Doumith et al., 2004; Nho et al., 2015; Vitullo et al., 2013; Zhang et al., 2007). Concretely, the gel-based multiplex-PCR developed by Doumith et al. (2004) provides a rapid and sensitive method to separate the four major *L. monocytogenes* serotypes from foods and patients (1/2a, 1/2b, 1/2c and 4b) into distinct groups. The use of real-time quantitative (qPCR) instead of using conventional PCR may have some limitations including costs, the presence of trained technicians and *in situ* industrial application (Doumith et al., 2004; Kerouanton et al., 2010); however, it is generally more rapid, of higher specificity and sensitivity and less prone to cross-contamination than conventional PCR method with gel-based detection (Vitullo et al., 2013). Vitullo et al. (2013) designed two triplex TaqMan-based qPCR assays for correctly classifying into the four most frequently *L. monocytogenes* serogroups related to contaminated foods and clinical cases. To our knowledge a unique quadruplex qPCR assay able to differentiate between the serotypes 1/2a, 1/2b, 1/2c and 4b of *L. monocytogenes* has not been developed yet. This tool would be of great usefulness for distinguishing the most important *L. monocytogenes* serotypes in terms of listeriosis-related risk and prevalence in foods. In addition, the use of a multiplex qPCR method for monitoring the main four serotypes of *L. monocytogenes* in a single reaction is the best option to simplify the detection by numerous qPCR procedures, reducing time and costs of the analysis. This method could be of great utility for the rapid detection of sources of *L. monocytogenes* contamination (raw materials, handler, equipment and utensils) in the meat industry.

The objective of this study was to develop a sensitive and specific quadruplex qPCR method for differentiating the main serotypes of *L. monocytogenes* (1/2a, 1/2b, 1/2c and 4b) isolated from meat processing plants. Moreover, the sensitivity and specificity of the developed method were evaluated.

## 2. MATERIALS AND METHODS

### 2.1. Bacterial isolates

Fifty-one strains of *Listeria* spp. were utilised in the study (Table 1). Forty-one isolates were recovered from 5 meat processing plants after sampling food contact surfaces (tables, slicing machines, etc.), dry-cured meat products (mainly dry-cured sausages), handler's hands, gloves and apron, and sinks. In addition, four reference *L. monocytogenes* isolates belonged to the most frequently serotypes encountered in the meat industry supplied by the Spanish Institute of Agronomic Research (INIA, Madrid, Spain) were used for optimising the qPCR method. Furthermore, six strains belonging to *Listeria innocua* (CECT 910 and CECT 5376), *Listeria gravi* CECT 931T, *Listeria ivanovii* subsp. *ivanovii* CECT 5368, *L. ivanovii* subsp. *londoniensis* CECT 5375 and *Listeria welshimeri* CECT 5380 were obtained from the Spanish Type Culture Collection (CECT, Valencia, Spain) and used for specificity assays as negative controls. All bacterial isolates used in this study are held in the Culture Collection of Food Hygiene and Safety at the University of Extremadura (Cáceres, Spain). The isolates were maintained by regular subculturing in Brain Heart Infusion (BHI) broth (Conda, Spain) at 37 °C for 24 h and then stored in 10 % (v/v) glycerol (Fisher Scientific, USA) solutions at -80 °C until required.

### 2.2. Sampling, bacterial isolation and genomic DNA extraction from *L. monocytogenes*

Briefly, the surfaces were sampled with sterile swabs (AES CHEMUNEX, France), which were placed in sterile Stomacher bag with filter. Next, four consecutive steps were conducted to isolate and detect this microorganism: 1) First enrichment: the swabs were mixed with 225 mL of *Listeria* Enrichment Broth Base (UVM) broth (Conda) and incubated for 24 h at 30 °C; 2) Second enrichment: one hundred µL of the UVM enrichment were transferred to a tube containing 10 mL of Fraser Broth (Conda) before vortexing and incubating at 37 °C for 48 h; 3) Bacterium isolation: one hundred µL were plated out on the selective solid media CHROMAgar™ *Listeria* (CHROMAgar, France) and incubated at 37 °C during 24 h; 4) Bacterium identification: only blue/ green colonies surrounded by a characteristic opaque halo on CHROMAgar™ *Listeria* were suspicious to be *L. monocytogenes*. Finally, these colonies were isolated in BHI broth and stored at -80 °C in 10 % (v/v) glycerol.

Table 1. *Listeria monocytogenes* isolates from food contact surfaces (FC) and ready-to-eat dry-cured meat products (M) in processing plants serotyped by the multiplex real-time quantitative PCR (qPCR) method optimised in this study and the conventional multiplex PCR optimised by Doumith et al. (2004).

ID. SAMPLE	Multiplex qPCR Genes					Identification of serotypes			Conventional PCR Genes					Identification of serotypes			Origin of the isolates					
	<i>lmo0737</i>	<i>lmo0308</i>	ORFC	ORF2110	<i>16S rRNA</i>	<i>lmo0737</i>	<i>lmo1118</i>	ORF2819	ORF2110	<i>prs</i>	<i>lmo0737</i>	<i>lmo1118</i>	ORF2819	ORF2110	<i>prs</i>	<i>lmo0737</i>		<i>lmo1118</i>	ORF2819	ORF2110	<i>prs</i>	
M1 <sup>1</sup>	+	+	/	-	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-	+	1/2c	Dry-cured sausage
M2 <sup>1</sup>	+	+	/	-	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-	+	1/2c	Handler's hand
M3 <sup>1</sup>	-	-	+	-	+	+	-	-	-	+	-	+	-	-	+	-	+	-	-	+	1/2b	Dry-cured sausage
M4 <sup>1</sup>	+	+	/	-	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-	+	1/2c	Dry-cured sausage
M5 <sup>1</sup>	+	+	/	-	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-	+	1/2c	Dry-cured sausage
M6 <sup>1</sup>	+	+	/	-	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-	+	1/2c	Dry-cured sausage
M7 <sup>1</sup>	+	+	/	-	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-	+	1/2c	Dry-cured sausage
M8 <sup>1</sup>	+	+	/	-	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-	+	1/2c	Dry-cured sausage
FC8 <sup>1</sup>	+	-	/	-	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-	+	1/2a	Tool box handle
FC11 <sup>1</sup>	+	+	/	-	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-	+	1/2c	Handler's hand
FC12 <sup>1</sup>	-	-	+	-	+	+	-	-	-	+	-	+	-	-	+	-	+	-	-	+	1/2b	Sink
FC1 <sup>2</sup>	+	+	/	-	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-	+	1/2c	Tables and surfaces
FC3 <sup>2</sup>	+	-	/	-	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	1/2a	Tables and surfaces
FC5 <sup>2</sup>	+	-	/	-	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	1/2a	Tables and surfaces
FC6 <sup>2</sup>	+	-	/	-	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	1/2a	Tables and surfaces
FC9 <sup>2</sup>	+	-	/	-	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	1/2a	Tables and surfaces
FC2 <sup>3</sup>	+	-	/	-	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	1/2a	Tables and surfaces
FC7 <sup>3</sup>	-	-	+	-	+	+	-	-	-	+	-	+	-	-	+	-	-	-	-	+	1/2b	Dry-cured sausage
FC8 <sup>3</sup>	-	-	+	-	+	+	-	-	-	+	-	+	-	-	+	-	-	-	-	+	1/2b	Handler's gloves
FC9 <sup>3</sup>	+	-	/	-	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	1/2a	Slicing knife
FC10 <sup>3</sup>	+	-	/	-	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	1/2a	Deboning room's drain
FC11 <sup>3</sup>	+	-	/	-	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	1/2a	Deboning room's drain
FC12 <sup>3</sup>	+	-	/	-	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	1/2a	Tables and surfaces
FC13 <sup>3</sup>	+	-	/	-	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	1/2a	Slicing knife
FC14 <sup>3</sup>	+	-	/	-	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	1/2a	Slicing room's table
FC15 <sup>3</sup>	+	-	/	-	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	1/2a	Slicing room's drain
FC16 <sup>3</sup>	+	+	/	-	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	+	1/2c	Handler's apron
FC17 <sup>3</sup>	+	+	/	-	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	+	1/2c	Tables and surfaces
FC18 <sup>3</sup>	+	+	/	-	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	+	1/2c	Slicing machine
FC81 <sup>3</sup>	-	-	+	-	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	1/2b	Tables and surfaces
																						Deboning room's drain



RESULTADOS

FC82 <sup>3</sup>	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	+	-	+	+	+	Slicing room's drain
FC23 <sup>4</sup>	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	+	-	+	+	+	Packaging machine
FC24 <sup>4</sup>	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	+	-	+	+	+	Slicing rooms's pallet
FC26 <sup>4</sup>	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	+	-	+	+	+	Slicing machine
FC27 <sup>4</sup>	+	-	/	-	+	-	-	-	-	-	+	-	+	+	+	Deboning machine
FC31 <sup>4</sup>	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	+	-	+	+	+	Sliced room's pallet
FC32 <sup>4</sup>	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	+	-	+	+	+	Slicing machine
FC33 <sup>4</sup>	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	+	-	+	+	+	Sink
FC54 <sup>4</sup>	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	+	-	+	+	+	Sliced room's pallet
FC55 <sup>4</sup>	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	+	-	+	+	+	Tables and surfaces
FC35 <sup>5</sup>	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	+	+	+	Deboning room's container
<i>L. monocytogenes</i> S2 (1/2a)*	+	-	/	-	+	-	-	-	-	-	+	-	+	+	+	INIA
<i>L. monocytogenes</i> S4-2 (1/2b)*	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	+	-	+	+	+	INIA
<i>L. monocytogenes</i> S12-1 (1/2c)*	+	+	-	-	+	-	-	-	-	+	+	-	+	+	+	INIA
<i>L. monocytogenes</i> S7-2 (4b)*	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	+	+	+	INIA
<i>L. innocua</i> CECT 910*	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	+	+	+	CECT
<i>L. innocua</i> CECT 5376*	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	+	+	+	CECT
<i>L. grayi</i> CECT 931T*	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	+	+	+	CECT
<i>L. ivanovii</i> subsp. <i>ivanovii</i> CECT 5368*	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	+	+	+	CECT
<i>L. ivanovii</i> subsp. <i>londoniensis</i> CECT 5375*	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	+	+	+	CECT
<i>L. welshimeri</i> CECT 5380*	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	+	+	+	CECT

Prior to DNA extraction, *L. monocytogenes* isolates were grown twice in BHI broth and incubated at 37 °C for 24 h each. Genomic DNA was extracted after centrifuging (10.000 rpm, 10 min, 4 °C) 1 mL aliquot of the obtained culture and removing the resultant supernatant according to the instructions of the commercial DNA extraction MasterPure™ DNA Purification Kit (Epicentre, USA). The DNA obtained was eluted in 35 µL of TE Buffer (10 mM Tris-HCl [pH 7.5], 1 mM EDTA; Epicentre) and kept at -20 °C until required. The DNA concentration (ng/µL) and purity (A<sub>260</sub>/A<sub>280</sub> ratio) were determined using a 1.5 µL aliquot on a NanoDrop spectrophotometer (Thermo Scientific, USA).

### 2.3. Multiplex real-time PCR assay

A multiplex qPCR assay targeting the *lmo0737*, *lmo0308*, ORFC (locus genomically equivalent to *gltA-gltB*) and ORF2110 genes to differentiate the four major serotypes (1/2a, 1/2b, 1/2c and 4b) of *L. monocytogenes* has been developed. The marker gene *lmo0737* allows the identification of the serogroups I (serotype 1/2a) and II (serotype 1/2c). The *lmo0308* gene has been previously used to distinguish specifically the serotype 1/2c (Nho et al., 2015). The novel locus genomically equivalent to the *gltA-gltB* gene of the serotype 4b (ORFC) was used to amplify the serotype 1/2b of *L. monocytogenes* (GenBank accession number: AF033016.1; Lei et al., 2001) while the ORF2110 gene is amplified from the serogroup IV (serotypes 4b, 4d and 4e).

#### 2.3.1. Design of primers and probes

The nucleotide sequences of the primers and probes designed from the four target genes (*lmo0737*, *lmo0308*, ORFC and ORF2110) able to amplify the serotypes 1/2a, 1/2b, 1/2c and 4b are listed in Table 2. The four TaqMan® probes developed in this study contained a unique reporter dye with distinct spectra for each target. Thus, the q0737-P, qSLCC-P, qLei-P and q2110-P probes were labelled with HEX (excitation wavelength 535; emission wavelength 555), Cy5 (excitation wavelength 648; emission wavelength 668), Cy3 (excitation wavelength 550; emission wavelength 564) and FAM (excitation wavelength 495; emission wavelength 520), respectively (Table 2). The design of primers and probes was conducted using the Primer3 Software version 0.4.0 (Koressaar and Remm, 2007; Untergasser et al., 2012) according to the general guidelines and

recommendations. Primers and probes specificity was tested by comparing their oligonucleotide sequences with the nucleotide sequence database in GenBank using the BLAST tool from NCBI (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

### 2.3.2. Real-time PCR conditions

The multiplex qPCR assay was conducted in a Viiia7™ Real-Time PCR System (Thermo Fisher Scientific, USA). The qPCR reactions were prepared in MicroAmp Optical 96-Well reaction plates and sealed with optical adhesive covers (Applied Biosystems, USA). The TaqMan® technology was used. To optimise the qPCR protocol, different primer and probe concentrations and thermal conditions were tested. For optimising the concentration of primers and probes, several concentrations ranging from 50 to 300 nM were checked. The optimised reaction mixture consisted of 7 µL of Premix Ex Taq™ (Takara Bio Inc., Japan), 0.125 µL of 50x ROX™ Reference Dye (Takara Bio Inc.), 2.5 µL of template DNA at 10 ng/µL of each isolate and the optimised concentration of each primer and probe (Table 2) in a final volume of 12.5 µL. Three replicates of each DNA were run in the qPCR assays which were at least repeated twice. Non-template controls (NTC) consisting in the reaction mixture with addition of sterile water instead of DNA template were analysed in each PCR run. The optimisation of thermal cycling conditions was conducted by assessing different annealing temperatures and times ranging from 55 to 60 °C and from 30 s to 1 min, respectively. The initial denaturation stage kept constant during optimisation process that consisted in one single step of 10 min at 95 °C. The number of PCR cycles was also unvarying during the performance of the method (40 cycles). Finally, the denaturation step was always 95 °C for 15 s in all the reactions tested. In addition, a SYBR-Green-based qPCR method based on a genus specific fragment of the 16S rRNA gene of *Listeria* spp. was used to ensure the presence of DNA isolated from *Listeria* spp. in order to avoid false positive and negative results in the multiplex qPCR method amplification. The nucleotide sequences, reaction conditions and composition of the mix reaction can be consulted in the Supplementary Material. In all qPCR reactions, the quantification cycle (Cq) was automatically performed by the instrument using default parameters. Cq values represent the PCR cycle in which an increase in fluorescence, over a defined threshold, first occurred for each amplification plot. Cq values higher than 33 were considered qPCR negative results.

Table 2. Sequences of primers and probes designed for the quadruplex real-time quantitative PCR (qPCR) assay optimised in this study.

<i>Listeria monocytogenes</i> serotype	Gene	Protein encoded by the target gene	Primer and probe	Sequence (5'-3')	Amplicon size (nucleotides)	GenBank accession no.	Primer and probe concentration (nM)
<b>1/2a and 1/2c</b>	<i>lmo0737</i>	Unknown, no similarity	q0737-F	TTTCGCCTGGTAAATGGGAAG			75
			q0737-R	ACCGTGTCTTGATCCTGGAG	145	HQ221543.1	75
			q0737-P	[HEX]-CAAATTGATTGATGCAGCGC-[BHQ1]			75
<b>1/2c</b>	<i>lmo0308</i>	Hypothetical protein	qSLCC-F	AGTTGCTCTGATGAACTTGA			150
			qSLCC-R	TGGCATTCTAAGGATGTCT	95	FR733648	150
			qSLCC-P	[Cy5]-AAGAACTAGAAAAAGGTTACGATGAAA-[BHQ2]			100
<b>1/2b</b>	ORFC (locus genomically equivalent to <i>gltA-gltB</i> )	Unknown	qLei-F	CCTACTGCTTGTGTGGAGAG			150
			qLei-R	TAGGCTATGTTGACGGAAAA	100	CP007169.1	150
			qLei-P	[Cy3]-AGCATGAACCACTTCGCTTT-[BHQ2]			150
<b>4b</b>	ORF2110	Putative secreted protein	q2110-F	TTTAAATGGTACCCGGGGACA			100
			q2110-R	TTGGACGTGGAGCTCGTAAT	133	GQ862961.1	100
			q2110-P	[FAM]-TGGGCGTTTGACAAATAATCTTCTG-[TAMRA]			100

#### 2.4. qPCR sensitivity

Ten-fold serial dilutions of DNA ranging from 500 to 0.005 ng from each reference strain of *L. monocytogenes* were used to obtain the standard curves, constructed by plotting the Cq values obtained against a series of increasing and known concentrations of the nucleic acid (Rodríguez et al., 2015). For qPCR amplification, 3 replicates of each DNA dilution were assayed per run. Standard deviations between technical replicates were calculated for each analysed gene. The limits of detection (LOD) as well as the analytical sensitivity of the multiplex qPCR assay were also determined. The LOD was defined as the lowest DNA concentration that can be distinguished from background noise. The analytical sensitivity is the ability of the assay to detect very low DNA concentration of a given substance. Analytical sensitivity is often named as limit of detection. The criteria considered for the reliability of the designed methods were the correlation coefficient ( $R^2$ ) and the amplification efficiency calculated from the formula  $E = 10^{-\frac{1}{S}} - 1$  (S being the slope of the standard curve) (Rodríguez et al., 2015).

#### 2.5. Specificity of qPCR reactions by comparison with a multiplex PCR assay

To evaluate the specificity of the developed multiplex qPCR method, the 4 reference *L. monocytogenes* strains, the 6 reference strains belonging to other *Listeria* species and the 41 isolates recovered from meat processing plants and RTE dry-cured meat products identified as *L. monocytogenes* were also serotyped by a multiplex PCR assay (Doumith et al. 2004). This PCR method contained the *prs* gene as internal amplification control (IAC). After amplification, PCR products were separated by electrophoresis on 2 % (w/v) agarose gels using 1x Tris Acetate EDTA (Scharlab S.L., Spain) at 90 V for 1 h. These gels were previously stained with 3 µL Red Safe Nucleic Acid Staining Solution (iNtRon Biotechnology, Korea). DNA bands were visualised with an UV transilluminator G:Box of Syngene (Synoptics group, UK) and then photographed by means of the camera GeneSnap and analysed by the software equipment GeneTools (Syngene, UK). A DNA molecular size marker of 0.05–1.5 kbp (NZYTech Lda., Portugal) was used to determine the size of the PCR products.

### 3. RESULTS

#### 3.1. Development of the multiplex qPCR method

Table 2 shows the optimal primer and probe concentrations giving the lowest C<sub>q</sub> value at the highest fluorescent signal for a fixed target concentration and, consequently, selected for further analyses. The optimisation of the reaction conditions that can reduce primer-dimer formation and increase the efficiency and specificity of the amplification process was also carried out. The optimal thermal cycling conditions were one single step of 95 °C for 10 min and 40 cycles of 95 °C for 15 s, 56.5 °C for 20 s, 58 °C for 20 s and 60 °C for 20 s. The amplification plots of each serotype with the optimised conditions can be checked in the Figure S1 of the Supplementary Material.

#### 3.2. Sensitivity of the qPCR assay

Standard curves were built for each set of primers and probe designed for the amplification of the four target genes. The standard curves constructed using the C<sub>q</sub> values and the log<sub>10</sub> of the genomic DNA quantity for the optimised method are shown in Figure 1. In general, the standard curves showed linearity across a large part of the range of the DNA quantities used with high correlation coefficients ( $R^2 > 0.98$ ) indicating very low inter-assay variability. The efficiency values obtained from the slopes of the standard curves were 105.7 and 105.8 % to identify the serotypes 1/2a and 1/2c by the amplification of the *lmo0737* gene, respectively (Figure 1). In the case of the *lmo0308*, ORFC and ORF2110 genes, the efficiencies of the standard curves were 103.1, 103.4 and 92.3 % to identify the serotypes 1/2c, 1/2b and 4b, respectively (Figure 1). The LOD and analytical sensitivities of the standard curves were 0.05 ng of DNA for *lmo0308* and *lmo0737* genes; and 0.005 ng of DNA for ORFC and ORF2110 genes.

## RESULTADOS

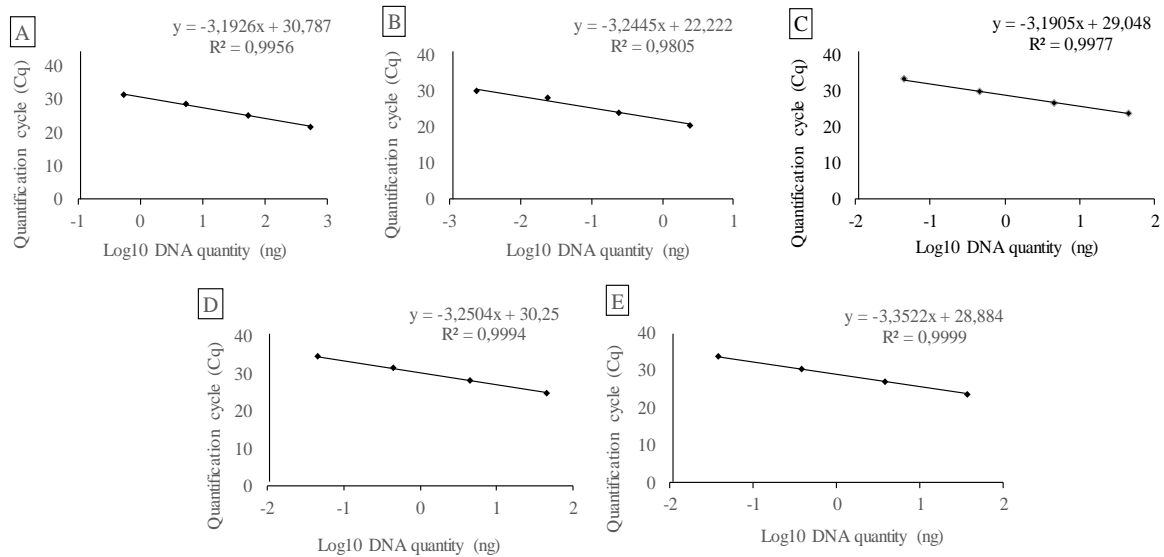


Figure 1. Linear ranges of the standard curves showing the correlation between log<sub>10</sub> DNA quantity (ng) of *Listeria monocytogenes* and the quantification cycle (Cq) values obtained using the multiplex qPCR method for the *lmo0737* gene to identify the serotypes 1/2a (A) and 1/2c (C), the ORFC gene to identify the serotype 1/2b, the *lmo0308* gene to identify the serotype 1/2c (D) and the ORF2110 gene to identify the serotype 4b (E).

### 3.3. Method specificity by comparison with a multiplex PCR assay

The specificity of the developed multiplex qPCR method for correct classifying into the 4 most prevailing *L. monocytogenes* serotypes was tested on genomic DNA obtained from the 10 reference *Listeria* strains and the 41 isolates from the meat industry by the multiplex PCR method. The serotypes of the above strains and isolates obtained by the conventional multiplex PCR method matched with the obtained serotype classification using the developed multiplex qPCR assay (Table 1). Thus, in those isolates tentatively characterised as serotype 1/2a amplified the *lmo0737* gene in both PCR and qPCR methods while those tentatively identified as serotype 1/2b amplified the ORF2819 and ORFC genes by the conventional PCR and qPCR method, respectively. In the case of the isolates assigned to serotype 1/2c, the *lmo0737* and *lmo1118* genes were amplified by using the conventional PCR method, and the *lmo0737* and *lmo0308* genes by the multiplex qPCR optimised in this study. The serotypes 1/2a and 1/2c displayed some non-specific amplification but they did not affect results since Cq values obtained after amplification of the ORFC gene were much lower ( $\geq 8$  cycles) than those obtained for their respective target genes. Only one of the tested isolates amplified the ORF2110 gene by both the conventional PCR and qPCR, which denotes that such isolate belongs to the serotype 4b. It is noteworthy to point out that the most frequently serotypes between the

tested isolates were 1/2a (34.1 %) and 1/2b (34.1 %) followed by the serotypes 1/2c (29.4 %) and 4b (2.4 %).

In addition, all the isolates amplified both the *prs* and 16S rRNA genes specific for the *Listeria* genus by PCR and qPCR, respectively (Table 1). For *L. innocua* CECT 910 and CECT 5376, *L. grayi* CECT 931T, *L. ivanovii* subsp. *ivanovii* CECT 5368, *L. ivanovii* subsp. *londoniensis* CECT 5375 and *L. welshimeri* CECT 5380 the 16S rRNA gene by qPCR and the *prs* gene by PCR were only amplified (Table 1).

#### 4. DISCUSSION

The differences in the virulence and persistence of the *L. monocytogenes* serotypes and the possibility to identify sources of contamination of this pathogen in the industry make necessary the design and optimisation of a rapid, sensitive and specific method able to distinguish the four most important serotypes in only one reaction. Among molecular techniques, qPCR is faster, less prone to cross-contamination and more specific and sensitive than gel-based PCR assays (Amar, 2010; Vitullo et al., 2013). In addition, the utilisation of a multiplex qPCR is preferred to various individual qPCR reactions since it is more rapid and supposes lesser costs of analysis. The use of multiplex primer pairs, targeting the *lmo0737*, *lmo0308*, ORFC and ORF2110 genes, is of great interest for distinguishing *L. monocytogenes* isolates belonged to the four major serotypes in a unique reaction. The effort was mainly relied on generating a positive result for all the four tested serotypes of this pathogenic bacterium using the most efficient combination of primer and probe concentrations and thermal cycler temperature profile. The lowest C<sub>q</sub> values with negligible primers-dimer formation were obtained with concentration of primers and probes lower than those used in the gel-based multiplex conventional PCR reported by Doumith et al. (2004).

Regarding the sensitivity of the developed method, the parameters obtained from the standard curves indicated that it was robust and reproducible. The linearity ( $R^2$ ) and the slopes were within the recommended range reported by Rodríguez et al. (2015). These results are similar to those obtained for other qPCR methods to detect *L. monocytogenes* (Nho et al., 2015; Rodríguez-Lázaro et al., 2004), which indicates that the multiplex qPCR was properly optimised and no errors occurred in this process.



The specificity of the optimised multiplex qPCR assay was tested on the DNA extracted from 41 *L. monocytogenes* isolates from meat processing plants and RTE dry-cured meat products and classified into the four major *L. monocytogenes* serotypes by conventional PCR method (Doumith et al., 2004). Serotype differentiation by using the developed quadruplex qPCR matched with those obtained by the conventional PCR method. All samples amplified the 16S rRNA as well as the *prs* genes by qPCR and PCR methods. This indicates that DNA isolated from *Listeria* spp. was used so no false negative results occurred after running both techniques. In addition, none of the strains belonging to the genus *Listeria* but different from *L. monocytogenes* amplified any of the target genes related to the four major *L. monocytogenes* serotypes. Furthermore, none of primers and probes showed remarkable cross-reactions with those serotypes amplified by the respective other primer and probe sets. The developed multiplex method has proven to be highly specific and able to accurately correctly classify the isolates into the main *L. monocytogenes* serotypes avoiding mistaken characterisation of other *Listeria* spp. isolates. These results are in accordance with those obtained by previous authors (Liu et al., 2007; Nho et al., 2015; Rodríguez-Lázaro et al., 2005; Sheng et al., 2018; Vitullo et al., 2013). Although Vitullo et al. (2013) published two efficient and specific triplex qPCR assays for serogrouping *L. monocytogenes* and differentiating from other *Listeria* spp, the advantage of the method optimised in this study consists in the optimisation of a unique quadruplex qPCR method able to differentiate the four most important *L. monocytogenes* isolates serotypes (1/2a, 1/2b, 1/2c and 4b) with the consequent reduction in time and costs of analysis.

In the present work, the serotypes 1/2a and 1/2b were the most predominant followed by the serotype 1/2c. These results are slightly different to those previously reported that showed the serotypes 1/2c and 1/2a as the most frequently isolated, followed by the serotype 1/2b, in meat processing environments (Chasseignaux et al., 2001; Giovannacci et al., 1999; Thévenot et al., 2006) or in RTE meat products (Martín et al., 2014; Su et al., 2016). However, in other research conducted in RTE products the serotype 1/2b was the most often isolated (Martins and Germano, 2011). It has been reported that the serotype 1/2a may have particular characteristics responsible for being more resistant to the conditions encountered throughout the processing in the meat industry (Iannetti et al., 2016). The serotype 1/2c is rarely implicated in human clinical cases (Gray et al., 2004; Lopez-Valladares et al., 2017; Reis et al., 2011). The serotype 4b was only associated to

one sample, concretely from a container of the deboning room of one of the 5 meat industries analysed. This serotype is well-known to be involved in most listeriosis outbreaks (Kathariou, 2002; Martins and Germano, 2011) and it has been related to several major outbreaks in the USA and Europe (EFSA BIOHAZ Panel et al., 2017; EFSA and ECDC, 2018; Kathariou, 2002; Martín et al., 2014). Furthermore, Martins and Germano (2011) suggested that despite the fact that serotype 4b is not the most frequently isolated from foods, it is more virulent than other serotypes due to its involvement in most of the reported listeriosis cases.

In conclusion, the quadruplex qPCR method developed in this study is able to differentiate and classify the four major and most worrying serotypes of *L. monocytogenes* isolated from meat processing plants in a single reaction. This qPCR could be used as a tool for identifying sources of *L. monocytogenes* contamination in meat industries to effectively implement control and prevention measures. Moreover, this technique could be used for epidemiological monitoring of persistent strains of *L. monocytogenes* throughout processing of RTE meat products.

**Supplementary material**

**Real-time quantitative PCR based on the 16S rRNA gene**

**- Primers**

The sequences of primers based on the 16S rRNA gene are included in Table S1.

**Table S1. Nucleotide sequences of primers for real-time quantitative PCR assays designed on the basis of the 16S rRNA gene.**

Primers	Nucleotide sequence (5'-3')	Position
F-16S	ACGAACGGAGGAAGAGCTTG	67
R-16S	CCCCTACTTACAGGCAGGTT	148

Positions are in accordance with the published sequence of the 16S rRNA gene (GenBank accession no. M58822.1).

**- Real-time PCR mix reaction**

The components and volumes of the real-time quantitative PCR reaction mixture are listed in Table S2.

**Table S2. Components and volumes of the real-time quantitative PCR reaction mixture.**

Component	Volume (µL)
SYBR® Green	6.25
Rox™	0.125
16S-F (300 µM)	0.375
16S-R (300 µM)	0.375
Deionized water	2.875
DNA (10 ng/µL)	2.5

**- Thermal cycling conditions**

The thermal cycling conditions of the real-time quantitative PCR for the amplification of the 16S rRNA gene are included in Table S3.

**Table S3. Conditions of the real-time quantitative PCR for the amplification of the 16S rRNA gene.**

Stage	Number of cycles	Temperature/Time
Initial denaturation	1	95 °C-10 min
Denaturation	40	95 °C-15 sec
Annealing/extension		60 °C-1 min
Melting temperature	After PCR	72-95 °C

**Real-time quantitative PCR amplification plots of the target genes for each *Listeria monocytogenes* serotype**

The amplification plots of the target genes (*lmo0737*, *lmo0308*, ORFC and ORF2110) for each of the four most important serotypes of *L. monocytogenes* (1/2a, 1/2b, 1/2c and 4b) are shown in Figure S1.

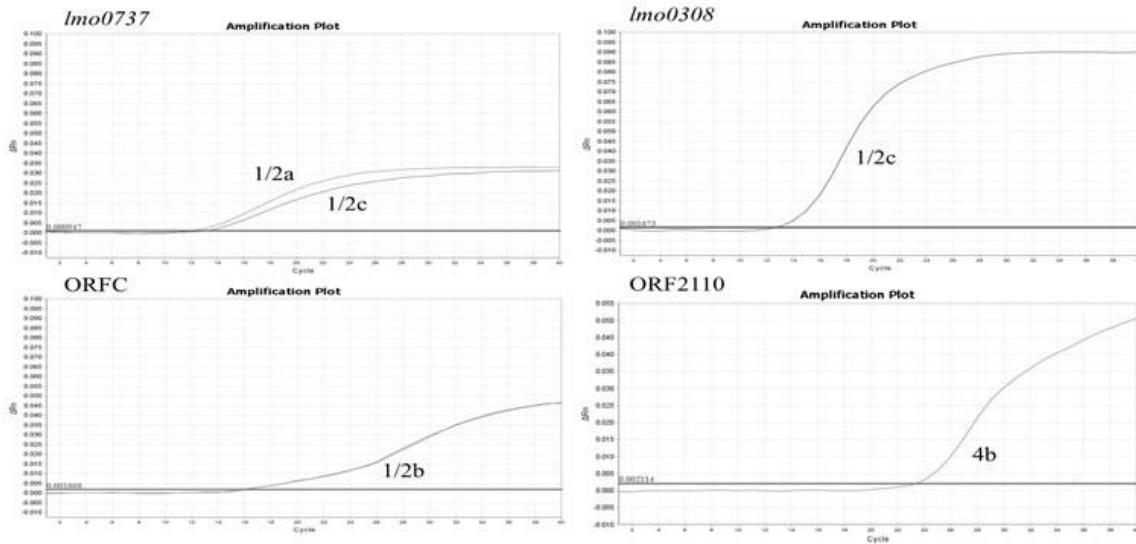


Figure S1. The amplification plots of the target genes (*lmo0737*, *lmo0308*, ORFC and ORF2110) for the serotypes 1/2a, 1/2b, 1/2c and 4b of *Listeria monocytogenes*.

IV. 2. PREVALENCE AND CHARACTERIZATION OF  
*Listeria monocytogenes* IN DEBONING AND SLICING AREAS  
OF SPANISH DRY-CURED HAM PROCESSING

International Journal of Food Microbiology (2019). Enviado para su publicación

**Abstract**

*Listeria monocytogenes*, the causative agent of human listeriosis, can be isolated from a wide variety of environmental sources, including food facilities. This emphasizes the importance of monitoring the possible sources of contamination in deboning and slicing areas of Spanish dry-cured ham processing. Serotyping by PCR-based methods and Pulsed Field Gel Electrophoresis (PFGE) characterization could help to evaluate the diversity of *L. monocytogenes* and identify its sources of contamination. The objective of this study was to evaluate the *L. monocytogenes* diversity throughout the deboning and slicing of Spanish dry-cured ham processing among and within production plants after cleaning and disinfection in two different seasons (autumn/winter and spring/summer). *L. monocytogenes* isolates (n = 66) collected from deboning area (72.7%) and slicing area (22.7%), were serotyped as 1/2b (65.1%), 1/2a (27.3%), 1/2c (6.1%) and 4b (1.5%). The typing of the 66 isolates of *L. monocytogenes* by PFGE using the *ApaI* and *SgsI* enzymes revealed a high diversity with 52 pulsotypes and showed that there were some persistent isolates within each plant. The highest prevalence of *L. monocytogenes* was found in the deboning area, where persistent strains could colonize then compressing and slicing areas. The frequency of isolation of *L. monocytogenes* was higher in spring/summer than in autumn/winter. Although was no detected *L. monocytogenes* in the analysed dry-cured ham, the presence of persistent pulsotypes and cross contaminations in the different industries suppose a hazard of contamination by this pathogen during deboning and slicing of dry-cured ham. Serotyping by PCR or qPCR and PFGE characterization are reliable tools to trace the sources, distribution and routes of *L. monocytogenes* contamination throughout deboning and slicing of dry-cured ham.

## 1. Introduction

*Listeria monocytogenes* is a foodborne pathogen responsible for human listeriosis mainly in vulnerable populations including people with altered immune systems (elderly and pregnant women), immunocompromising conditions (malignancies, diabetes mellitus, alcoholism and liver, renal and autoimmune diseases) or undergoing immunosuppressive therapy (Filipello et al., 2017; Swaminathan and Gerner-Smidt, 2007). Although the incidence of this zoonosis is low compared with other foodborne diseases, has a mortality rate of up to 30% (Morganti et al., 2016). In 2017, 2536 human cases of listeriosis were reported in 28 EU member states, causing the highest number of foodborne diseases-related deaths in compare with other zoonosis in these countries (EFSA and ECDC, 2018).

*L. monocytogenes* can be isolated from a wide variety of environmental sources, including food facilities. In this environment, this bacterium may become resident and then contaminate foods throughout their processing (Morganti et al., 2016). Food safety regulations in many countries have tended to adopt zero tolerance policy for the presence of *L. monocytogenes* in ready-to-eat (RTE) foods because the occurrence of human listeriosis outbreaks and sporadic cases of this disease are predominately associated with the manufacture and commercialization of these products (Koskar et al., 2019; Melero et al., 2019). One of the main RTE foods susceptible to be contaminated with this bacterium is dry-cured ham, a traditional dry-cured meat product that may be sold as whole pieces or in vacuum packaged slices.

Although the hazard associated with the presence of *L. monocytogenes* tends to substantially decrease during the dry-cured ham processing due to a set of hurdles including the temperature of both salting and postsalting stages, the decrease of water activity ( $a_w$ ) throughout the ripening and the presence of salt (Portocarrero et al., 2002; Prencipe et al., 2012), the contamination with this pathogen may represent a serious concern in sliced and vacuum-packaged dry-cured ham during deboning and slicing stages. This emphasizes the importance of monitoring the environment during such steps in order to identify potential contamination sources and transmission routes, particularly regarding to persistent *L. monocytogenes* strains. The source of contamination may originate from external environment and, after breaking the hygienic barriers, causing

contamination of the internal environment and, subsequently, the contamination of the end-product. In addition, the presence of persistent strains in the surfaces of deboning and slicing equipments could result from inefficient cleaning and sanitizing procedures that allow the survival and adaptation of *L. monocytogenes* strains (Thévenot et al., 2006; Véghová et al., 2015). In addition, *L. monocytogenes* has shown to persist in food producing facilities for long periods of time, ranging from a few months to 12 years (Lariviere-Gauthier et al., 2014; Lundén et al., 2003; Martín et al., 2014).

The evaluation of the diversity of *L. monocytogenes* and the identification of its sources of contamination throughout the deboning and slicing of dry-cured ham require highly discriminatory molecular typing methods. Serotypes of this bacterium differ in their epidemic potential and ability to cause disease. At least 95% of isolates from contaminated foods and clinical cases are of serotypes 1/2a, 1/2b, 1/2c and 4b (Doumith et al., 2004). It has been described that the epidemiology and persistence of this bacterium in RTE food chains may be related to its serotype, which highlights the importance of the characterization of this pathogen. Serotyping methods by multiplex conventional PCR or real-time PCR (qPCR) have been reported to differentiate strains of *L. monocytogenes* (Alia et al., 2019; Borucki and Call, 2003; Chen and Knabel, 2007; De Santis et al., 2007; Doumith et al., 2004; Nho et al., 2015; Vitullo et al., 2013; Zhang et al., 2007). In addition, Pulsed Field Gel Electrophoresis (PFGE) is the current “gold standard” method for *L. monocytogenes* subtyping because of its high discrimination power, robustness, reproducibility and typeability (Martín et al., 2014).

The aim of this work was to evaluate the *L. monocytogenes* diversity throughout the deboning and slicing stages of the processing of Spanish dry-cured ham. The distribution and persistence of *L. monocytogenes* among and within production plants after the application of cleaning and sanitation procedures in two different seasons (autumn/winter and spring/summer) were checked to detect the main sources of contamination of dry-cured ham with this foodborne pathogen.



**2. Material and methods**

**2.1 Sampling and bacterial isolation**

This study was carried out over a two-year period (from 2017 to 2018) in 6 deboning and slicing dry-cured ham plants of Spain at different geographical locations: Extremadura (plants A, C, D and E), Castilla y León (plant B) and Andalucía (plant F). Each plant was sampled twice in different seasons, one in spring/summer and the other in autumn/ winter. In addition, each plant was sampled after the application of cleaning and disinfection treatment (before starting the deboning and slicing procedures), and during deboning and slicing. The presence of *L. monocytogenes* was investigated in 30 different food contact surfaces shown in Table 1.

Table 1. Description of the 30 points sampled in the different dry-cured ham processing plants. Some of them were modified depending on the peculiarities of each facility.

Nº	Sampled surface	Stage
1	Tables and surfaces	Deboning
2	Hydraulic deboning gouge	Deboning
3	Manual deboning gouge	Deboning
4	Knives box	Deboning
5	Saw hoof	Deboning
6	Deboning container	Deboning
7	Knife sterilizer	Deboning
8	Massage zone	Deboning
9	Other tables and surfaces	Deboning
10	Deboning floor	Deboning
11	Operator's apron	Deboning
12	Other containers	Deboning
13	Deboning's drain	Deboning
14	Pressing mold	Compressing
15	Tables and surfaces	Compressing
16	Vacuum packing machine	Compressing
17	Tables and surfaces	Slicing
18	Deboning saw	Slicing
19	Slicing knife	Slicing
20	Slicing machine	Slicing
21	Conveyor belt (first product output)	Slicing
22	Conveyor belt (in the middle)	Slicing
23	Knives (handmade slicing)	Slicing
24	Slicing room's pallet	Slicing
25	Slicing floor	Slicing
26	Packages of slices	Slicing
27	Sliced product packer	Slicing
28	Slicing room's drain	Slicing
29	Operator's hands	Slicing
30	Sink	Slicing

The techniques of isolation and detection of *L. monocytogenes* were performed in accordance with the USDA protocol (2019). Briefly described, the surfaces were sampled with sterile swab (AES CHEMUNEX; France) and put in sterile stomacher bags in suitable conditions until their processing in the laboratory. The first enrichment or pre-enrichment was carried out in 225 mL of *Listeria* Enrichment Base (UVM) broth (Conda, Spain) and incubated for 24 h at 30 °C. A second enrichment was performed using 0.1 mL of the pre-enrichment culture into 10 mL of Fraser broth (Conda) which was incubated at 37 °C for 48 h. Bacterial isolation was performed on CHROMAgar™ *Listeria* (CHROMAgar, France) after incubating at 37 °C for up to 24 h. On the other hand, sliced dry-cured ham samples were analysed following the same protocol and conditions previously detailed for the swabs. Finally, characteristic colonies in the chromogenic agar were isolated in Brain Heart Infusion (BHI) broth (Conda) and frozen at -80 °C in 10 % (v/v) glycerol (Fisher Scientific, USA).

## 2.2. DNA extraction

Prior to DNA extraction, *L. monocytogenes* isolates were grown twice in BHI broth and incubated at 37 °C for 24 h each. After centrifuging (10.000 rpm, 10 min, 4 °C) 1 mL aliquot of the previously obtained culture, the resultant supernatant was removed and the genomic DNA was extracted according to the instructions of the commercial DNA extraction MasterPure™ Complete DNA and RNA Purification Kit (Epicentre, USA). The obtained DNA was eluted in 35 µL of TE Buffer (10 mM Tris-HCl [pH 7.5], 1 mM EDTA; Epicentre) and kept at -20 °C until required. The DNA concentration (ng/µL) and purity ( $A_{260}/A_{280}$  ratio) were determined on a NanoDrop spectrophotometer (Thermo Scientific, USA) using a 1.5 µL aliquot.

## 2.3. Serotyping by PCR-based methods

Sixty-six isolates presumptively identified as *L. monocytogenes* were serotyped by multiplex qPCR based on the *lmo0737*, *lmo0308*, ORFC and ORF2110 genes to differentiate the four major serotypes (1/2a, 1/2b, 1/2c and 4b) of *L. monocytogenes* as previously described by Alía et al. (2019). In addition, these isolates were ascribed to different serotypes by a multiplex PCR targeting *lmo0737*, *lmo01118*, ORF2819 and

ORF2110 genes to distinguish the serotypes 1/2a, 1/2b, 1/2c and 4b of *L. monocytogenes* (Doumith et al., 2004).

#### 2.4. PFGE typing of *L. monocytogenes* isolates

The genetic profile of *L. monocytogenes* strains was determined by PFGE by digesting the DNA with the restriction enzymes *Apal* and *SgsI* (Thermo Fisher Scientific, USA) and the subsequent electrophoresis on the Chef Mapper<sup>®</sup> XA Pulsed Field Electrophoresis System (Bio-Rad Laboratories, USA). The protocol described by Pulsenet (Graves and Swaminathan, 2001) was used. Bacterial cells embedded in agarose Seakem<sup>®</sup> Gold (Lonza, Switzerland) (plugs) with lysozyme (Sigma-Aldrich, USA) (20 mg/mL) were lysed in lysis buffer (50 mM Tris:50 mM EDTA, pH 8.0, 1% sarcosine, 0.1 mg/mL proteinase K [Thermo Fisher Scientific]) by incubating for 2 h at 55 °C in a water bath with agitation. The plugs were then washed twice in sterile ultrapure water and four times in TE buffer (10 mM Tris:1mM EDTA, pH 8.0). The digestion of each DNA sample in the plugs was carried out with *SgsI* (10U/μL) and *Apal* (10U/μL) during 24 h at 37 °C. The PFGE was performed in 1% agarose Seakem<sup>®</sup> Gold in TBE buffer (0.45 M TRIS, 0.45 M Boric acid, 10 mM EDTA) in the Chef Mapper<sup>®</sup> XA Pulsed Field Electrophoresis System at 6 V/cm and 14 °C for 19 h with switch times of 4 s to 40 s. Images were obtained with a Gel Doc 2000 Image Documentation System (Bio-Rad Laboratories), after staining with SYBRTM Gold Nucleic Acid Gel Stain (10.000X; Invitrogen, USA) for 15 min. The combined *Apal/SgsI* PFGE pulsotypes were analysed using the BioNumerics software (Applied Maths, Belgium). Bands automatically assigned by the computer were visually checked and corrected manually when necessary. The cluster analysis of combined PFGE pulsotypes was conducted considering maximum optimization of 1.5% and using the unweighted pair group method with average lineage (UPGMA) method. The similarity between the strains was determined based on the Dice's coefficient (Dice, 1945) with maximum position tolerance 1.5%. A cutoff value of 80% was set to determine cluster similarity (Monteiro et al., 2013; Rivoal et al., 2013). Furthermore, the pulsotypes were used to identify strains with unique electrophoretic profiles. The Simpson index (*D*) was determined (Hunter and Gaston, 1988) to assess the genetic diversity of *L. monocytogenes* populations in all the isolates and in each plant (Rivoal et al., 2013).

**3. Results**

**3.1. Prevalence and molecular typing of *L. monocytogenes***

A total of 66 out of 720 (9.16%) isolates presumptively characterized as *L. monocytogenes* were collected from the sampled dry-cured meat processing plants, being all of them from food contact surfaces. The distribution of *L. monocytogenes* according to the dry-cured ham processing plant is shown in Table 2. No *L. monocytogenes* was found in plant F. Among the 66 *L. monocytogenes* positive samples, the highest prevalence was found in the deboning area (72.7%), followed by the slicing area (22.7%), while the lowest one was observed in the compressing area (4.5 %) (Table 3).

Table 2. Distribution of *Listeria monocytogenes* isolates from food contact surfaces in dry-cured ham processing plants serotyped by multiplex PCR methods (Alfía et al., 2019; Doumith et al., 2004).

Plants	Serotypes			
	1/2a	1/2b	1/2c	4b
<b>A</b>	4	-	1	-
<b>B</b>	7	5	3	-
<b>C</b>	1	24	-	1
<b>D</b>	6	11	-	-
<b>E</b>	-	3	-	-
<b>F</b>	-	-	-	-
<b>Total Isolates</b>	18	43	4	1

Both the multiplex PCR and qPCR analysis of the 66 presumptive *L. monocytogenes* isolates showed that the 4 serotypes 1/2a, 1/2b, 1/2b and 4b were isolated (Table 2). Forty-three isolates belonged to the serotype 1/2b (65.1%), being most of them isolated from the processing plant C. In the case of the serotype 1/2a, 18 strains (27.3%) were ascribed to this serotype and sampled from the plants A, B, C and D. On the other hand, the serotypes 1/2c and 4b were only assigned to 4 (6.1%) and 1 (1.5%) isolates, respectively, being the serotype 1/2c the most representative in the industry B while the serotype 4b was only isolated in the facility C.

**3.2. Pulsed-field gel electrophoresis typing and traceability in the various plants**

**3.2. PFGE typing and traceability in the various plants**

The PFGE profile analysis allowed the generation of 25 clusters) and 52 pulsotypes (with different electrophoretic profiles). Twenty-five combined clusters grouped at 40% similarity level were observed (Figure 1). In general, isolates from the same factories

were classified in the same or in close clusters. The Simpson's diversity index to evaluate the diversity of the all isolated strains was  $D=0.87$ . With regard to the diversity in each plant, the diversity indexes were 0.32, 0.78, 0.65, 0.84 and 0.66 for the plants A, B, C, D and E, respectively.

The distribution of the *L. monocytogenes* clusters according to the plant, the season, the time of sampling (in use or cleaned and disinfected) and the origin of the isolates is described in Table 3. In general, results show that most of the isolates were collected during the deboning and slicing operations. Furthermore, the number of *L. monocytogenes* isolates was higher in spring/summer than in autumn/winter sampling. On the other hand, some clusters were persistent within each plant. Thus, most of the isolates from the plant A belonged to cluster 15 and all were serotyped as 1/2a. Furthermore, all the isolates were isolated in the spring/summer sampling and during working in the facility. In the case of the plant B most of the isolates were framed in close clusters (1, 3, 4 and 7 and 15, 16, 19 and 21) being the majority of these isolates, isolated during the same season (autumn/winter). Regarding to the plant C, all the isolates were serotyped as 1/2b, excepting the strain C4, belonging to the serotype 1/2a. Furthermore, most isolates from the plant C were ascribed to cluster 1 and all of them were isolated in the same season. In addition, 10 of the 25 isolates were isolated after the application of the cleaning and disinfection treatments in this facility. In the plant D, 18 isolates were isolated during the processing of sliced dry-cured ham, being most of them isolated in the same period of time (spring/summer) when the facility was being used. Finally, only 3 isolates were isolated from the plant E during autumn/winter during processing. Moreover, cross-contamination between the different sampled locations (deboning, compressing and slicing) was observed. For example, the pulsotype 48 (cluster 21) from the plant B, was isolated in both deboning and compression equipments. Similarly, the pulsotype 16 (cluster 2) from the plant C, was collected in compressing and slicing locations and pulsotype 1 (cluster 1) was isolated from deboning and slicing locations. Finally, the pulsotype 7 (cluster 1) from the plant D, was isolated from deboning and slicing locations.

# RESULTADOS

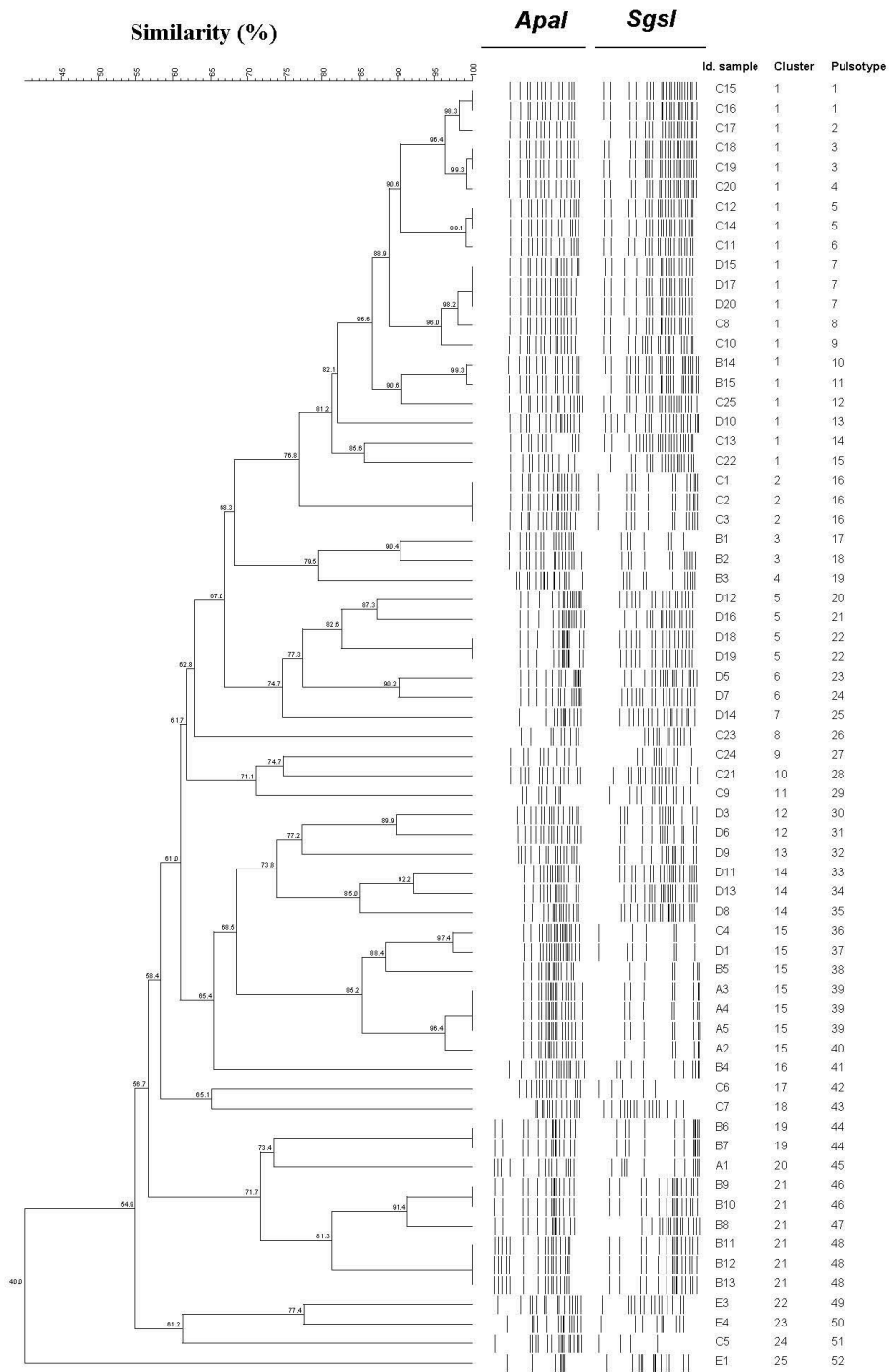


Figure. 1. Unweighted pair group method with arithmetic mean (UPGMA) dendrogram based on Pulsed-Field Gel Electrophoresis (PFGE) profiles of *Listeria monocytogenes* isolated from 5 plants (A, B, C, D and E) of sliced dry-cured ham by using *Apal* and *SgsI* endonuclease enzymes.

## RESULTADOS

Table 3. Distribution of *Listeria monocytogenes* cluster depending on the plant (A, B, C, D or E), the season (SS: spring-summer; AW: autumn-winter), the time of sampling (U: during working; C: after cleaning and disinfection treatment) and the origin of the isolate.

Industry								
Plant	Id. Sample	Season	Sampling	Serotype <sup>a</sup>	Cluster <sup>b</sup>	Pulsotype <sup>b</sup>	Origin of the isolate	
A	A1	SS	U	1/2c	20	45	Deboning tables and surfaces	
	A2		U	1/2a	15	40	Deboning tables and surfaces	
	A3		U	1/2a	15	39	Deboning tables and surfaces	
	A4		U	1/2a	15	39	Deboning tables and surfaces	
	A5		U	1/2a	15	39	Deboning tables and surfaces	
B	B1	AW	U	1/2b	3	17	Slicing room's drain	
	B2		U	1/2b	3	18	Slicing machine	
	B3		U	1/2b	4	19	Sliced product packer	
	B4		C	1/2a	16	41	Deboning room's drine	
	B5		C	1/2a	15	38	Deboning room's drine	
	B6		C	1/2a	19	44	Deboning tables and surfaces	
	B7		U	1/2a	19	44	Deboning tables and surfaces	
	B8		U	1/2a	21	47	Deboning tables and surfaces	
	B9		U	1/2a	21	46	Deboning room's drine	
	B10		U	1/2a	21	46	Operator's apron	
	B11		C	1/2c	21	48	Pressing mold	
	B12		C	1/2c	21	48	Deboning tables and surfaces	
	B13		C	1/2c	21	48	Deboning tables and surfaces	
	B14		SS	U	1/2b	7	10	Deboning room's drine
	B15		SS	U	1/2b	1	11	Deboning room's drine
C	C1	AW	C	1/2b	2	16	Vacuum packing machine	
	C2		U	1/2b	2	16	Slicing room's pallet	
	C3		C	1/2b	2	16	Slicing machine	
	C4		U	1/2a	15	36	Hydraulic deboning gouge	
	C5		U	1/2b	24	51	Slicing room's pallet	
	C6		C	1/2b	17	42	Slicing conveyor belt (first product output)	
	C7		U	1/2b	18	43	Slicing sink	
	C8		U	1/2b	1	8	Slicing room's pallet	
	C9		U	1/2b	11	29	Pressing mold	
	C10		U	1/2b	1	9	Operator's hands	
	C11		U	1/2b	1	6	Slicing tables and surfaces	
	C12		U	1/2b	1	5	Deboning sink	
	C13		U	1/2b	1	14	Compresing tables and surfaces	
	C14		U	1/2b	1	5	Deboning tables and surfaces	
	C15		U	1/2b	1	1	Slicing knife	
	C16		SS	U	1/2b	1	1	Deboning tables and surfaces
	C17			U	1/2b	1	2	Deboning tables and surfaces
	C18			U	1/2b	1	3	Deboning tables and surfaces
	C19			C	1/2b	1	3	Deboning container
	C20			C	1/2b	1	4	Deboning room's drine
	C21			C	1/2b	10	28	Operator's hands
	C22			C	1/2b	1	15	Deboning room's drine
	C23			C	1/2b	8	26	Slicing machine
	C24			C	1/2b	9	27	Deboning room's drine
	C25		C	1/2b	1	12	Slicing knife	
D	D1	AW	U	1/2a	15	37	Deboning room's drine	
	D3		U	4b	12	30	Deboning container	
	D5		U	1/2a	6	23	Hydraulic deboning gouge	
	D6	SS	U	1/2a	12	31	Deboning tables and surfaces	
	D7		U	1/2b	6	24	Deboning tables and surfaces	
	D8		C	1/2a	14	35	Deboning tables and surfaces	
	D9		U	1/2b	13	29	Deboning room's drine	

## RESULTADOS

	D10		U	1/2b	1	13	Deboning tables and surfaces
	D11		U	1/2a	14	33	Manual deboning gouge
	D12		U	1/2B	5	20	Hydraulic deboning gouge
	D13		U	1/2a	14	34	Deboning room's drine
	D14		U	1/2b	7	25	Hydraulic deboning gouge
	D15		U	1/2b	1	7	Hydraulic deboning gouge
	D16		U	1/2b	5	21	Deboning's drain
	D17		U	1/2b	1	7	Operator's apron
	D18		U	1/2b	5	22	Deboning tables and surfaces
	D19		U	1/2b	5	22	Deboning container
	D20		U	1/2b	1	7	Slicing knife
<b>E</b>	E1		U	1/2b	25	52	knives box
	E3	AW	U	1/2b	22	49	Deboning container
	E4		U	1/2b	23	50	Deboning tables and surfaces

<sup>a</sup>serotyping by PCR-based methods. <sup>b</sup>Pulsed Field Gel Electrophoresis typing.

### 4. Discussion

This study demonstrates that the contamination by *L. monocytogenes* of deboning and slicing areas of dry-cured ham processing occurred in greater than 9% of the total of analysed samples. This prevalence is similar to that reported from different food plants like raw meat processing plants (Bolocan et al., 2016; Morales-Partera et al., 2018), cold-smoked processing plants (Dauphin et al., 2001) or dairy processing facilities (Melero et al., 2019). The highest one was found in the deboning area (72.7%), followed by the slicing area (22.7%). Finding values make sense since the deboning procedure requires an invasive mechanical operation to extract the bone by means of a semiautomatic equipment consisting of several pieces as well as the spread of organic debris on the equipment, floor and operators' clothing (Morganti et al., 2016). On the contrary, slicing is a high-precision process with limited spread of organic matter (Morganti et al., 2016). Although most of the isolates were isolated during working, it is necessary to highlight the persistence of some *L. monocytogenes* isolates after cleaning and disinfection procedures. Thus, it is necessary to in-depth control the conditions of cleaning and sanitation procedures in these areas to avoid the presence of persistent strains of *L. monocytogenes*. The persistence of *L. monocytogenes* in food processing environments firstly occurs due to inefficient measures of cleaning and disinfection and the high resistance of the bacterium to different cleaning and disinfection procedures (Aase et al., 2000; Kastbjerg et al., 2010; Mendonça et al., 2012; Moretro and Langsrud, 2004; To et al., 2002). The results in the present work agree with several studies focused on the occurrence and tracing of persistent *L. monocytogenes* isolates in various food production chains in European countries, where sporadic incidence of *L. monocytogenes* with relative



high strains diversity have been elucidated (Bolocan et al., 2016, 2015; Gelbíčov and Karpiskova, 2012; Leong et al., 2015; Martın et al., 2014; Muhterem-Uyar et al., 2015; Veghova et al., 2017).

Regarding the serotype distribution, the predominant serotypes were the 1/2b followed by the 1/2a which are in accordance with some studies where a predominance of the serotype 1/2a followed by the serotype 1/2b in different meat processing plants was reported (Ferreira et al., 2011; Meloni et al., 2012; Thevenot et al., 2006). Furthermore, our results agree with other researchers who reported a low frequency of the serotype 4b of *L. monocytogenes* in food processing plants. This serotype is found in most cases of human listeriosis worldwide (Cartwright et al., 2013; Kathariou, 2002; Lepe et al., 2012; Montero et al., 2015; Paduro et al., 2019), despite the fact that serotypes 1/2a, 1/2b, and 1/2c are the predominant in food isolates (Arslan and Baytur, 2019). However, these results differs from some studies reported in other food processing plants where the serotypes 1/2a and 1/2c were the most frequently found (Martın et al., 2014; Morales-Partera et al., 2018; Thevenot et al., 2005).

A similar cluster distribution from the profile analysis by PFGE with *ApaI* and *SgsI* was described in other food plants (Dauphin et al., 2001; Lunden et al., 2003; Morganti et al., 2016; Rivoal et al., 2013). A high genetic diversity ( $D = 87\%$ ) was found among the *L. monocytogenes* isolates. This degree of diversity is commonly reported in meat processing environments (Chasseignaux et al., 2001; Giovannacci et al., 1999; Lunden et al., 2003; Martın et al., 2014b; Thevenot et al., 2006). In addition, differences in the genetic diversity were observed among plants depending on their size and capacity. Thus, genetic diversity values of 78% and 84% were found in the plants B and D, respectively, which were the large ones. Previous studies highlighted a higher diversity in large facility due to the heterogeneity of the raw material and the highest quantity of raw meat used (Thevenot et al., 2006).

The PFGE profiling was also used to trace the contamination of *L. monocytogenes* along the meat processing chains focusing on the identification of potentially persistent isolates. The dendrogram obtained from PFGE profiling (Figure 1) indicates the spread of certain isolates in each deboning and slicing plants. These results agree with those obtained in previous studies suggesting a wide distribution of the pathogen in the natural

environment of food plants, where some PFGE types may be associated with a single source, whereas other PFGE types may be disseminated widely or even globally (Véghová et al., 2015). In fact, the cluster analysis showed that there were some persistent isolates within each plant. Thus, most of the collected isolates from the same plant belonged to nearby clusters and even they were ascribed to the same serotype (Table 3). These strains were considered persistent since they were repeatedly isolated from several sampling sites in the deboning, compressing and slicing areas despite of regular cleaning and disinfection (Figure 3). For some specific isolated isolates, a cross-contamination between the different locations (deboning, compressing and slicing) was observed. These results confirm the presence of persistent isolates of *L. monocytogenes* mainly in the deboning area. This is a serious concern since the persistent isolates could colonise the other locations, such as compressing and slicing areas. Thus, it has been detected cross-contamination between deboning and compressing or slicing areas in the plant B, C and D. Some *L. monocytogenes* isolates showing a similar PFGE type could be categorised as persistent strains in one plant and non-persistent in another one (Lundén et al., 2003). These authors emphasise the complex nature of contamination and suggest that the analysis of additional samples may imply that some of non-persistent strains could be recovered more frequently, leading to their categorisation as persistent isolates. Furthermore, Lunden et al. (2003) also suggested that the serotype could not show the influence of the persistence of an isolate because all the *L. monocytogenes* serotypes were able to cause persistent contamination in processing plants. Likewise, some isolates isolated during work operations were not repeatedly detected and none of the isolated strains were found in different seasons, as they probably were successfully eliminated from the production environment.

In addition, another factor that could contribute to the persistence of *L. monocytogenes* is the nature of the isolate since some are better adapted to industrial environment or isolated during different seasons. In this work, a higher frequency of isolates of *L. monocytogenes* was obtained in spring/summer than in autumn/winter. These results agree with previous studies where the levels of contamination and outbreaks due to this pathogen were higher in spring and summer than in winter and autumn (EFSA and ECDC, 2018). On the other hand, these results are in contrast with those published by Rivoal et al. (2013) who suggested that the environmental contaminations of the egg breaking

plants was significantly more important in winter, and the risk decreases from spring to autumn.

In conclusion, although no *L. monocytogenes* was detected in any dry-cured ham sample, the presence of persistent pulsotypes and cross contaminations in the different industries tested, even in some of them resistant to cleaning and sanitation, suppose a hazard of contamination by this pathogen during deboning and slicing of dry-cured ham. Thus, it is necessary to control hygienic measures and cleaning and sanitation procedures to minimize this hazard. Furthermore, this study highlights the importance of using molecular typing methods, including serotyping by PCR or qPCR and PFGE characterization to trace the sources, distribution and routes of *L. monocytogenes* contamination throughout deboning and slicing of dry-cured ham.

### IV. 3. MOLECULAR MECHANISMS OF *Listeria* A STRESS RESPONSE

## 1. Introduction

*Listeria monocytogenes* is a Gram-positive facultative intracellular bacterium and the causative agent of a severe foodborne disease - listeriosis, (Chlebicz and Śliżewska, 2018) which is associated with a higher mortality than diseases caused by other foodborne bacteria (Buchanan et al., 2017). As an ubiquitous organism, *L. monocytogenes* commonly present in foods, food processing equipment and premises (Buchanan et al., 2017).

Different preservation and storage methods help reduce and eliminate foodborne microbial contaminations in food products although they do not guarantee the safety and quality of manufactured foods (Rajkovic et al., 2010). To date, the most common preservation methods used in food industry to process safe and high-quality products include heat treatment, refrigeration, acidification, hygienization, desiccation and addition of salts or sugars (Beales, 2004; Kocaman and Sarimehmetoğlu, 2016). Other technologies such as ultrasound under pressure at nonlethal (manosonication, MS) and lethal temperatures (manothermosonication, MTS), pulsed electric field (PEF), high hydrostatic pressure (HPP), and UV-light (UV) may be also applied (Cebrián et al., 2016). While the above methods are effective against most other foodborne pathogens, they show limited value in controlling *L. monocytogenes* due to latter's ability to withstand various treatments, including cold and heat, acidic and alkaline, osmotic and drying, and oxidative stresses. The adaptive response of *L. monocytogenes* to the aforementioned stresses is of significant concern to the food industry since control strategies may not only fail to eliminate *L. monocytogenes*, but also enhance its survival and virulence (Beales, 2004; Melo et al., 2015). In fact, exposure of *L. monocytogenes* to a mild type of stress can enhance its endurance to other stress factors, increase its virulence potential and give rise to more persistent strains. The ability of *L. monocytogenes* to survive and multiply under a wide range of environmental-stress conditions normally encountered in foods is attributable to its inherent resistance mechanisms. A number of transcriptional regulators important for stress response and virulence gene expression has been identified in this microorganism (Kocaman and Sarimehmetoğlu, 2016). This chapter presents an overview of the molecular mechanisms that are used by *L. monocytogenes* to withstand stresses routinely encountered in foods and food environments such as the processing and storage in the industry plants or in the market.

## 2. Genes involved in stress tolerance and virulence of *L. monocytogenes*

*L. monocytogenes*' capability to respond rapidly to adverse or changing environmental conditions is mediated by different associations between various alternative  $\sigma$  factors, which guide RNA polymerase to specific promoters to activate their transcription. Being key components of the complex regulatory networks of *L. monocytogenes*, these  $\sigma$  factors include multiplex transcriptional regulators of stress-response and virulence genes, regulators of genes encoding other regulators, and regulators of small RNAs (Chaturongakul et al., 2008; Zhang et al., 2011). One of these factors is  $\sigma^B$ , encoded by the *sigB* gene, which enables *L. monocytogenes* to multiply and survive under non-host associated environmental stress conditions such as acid, osmotic, oxidative, cold and nutrient limitation or energy stresses (Table 1) (Chaturongakul et al., 2008). The  $\sigma^B$  regulates the expression of some virulence and stress-related genes that are necessary for survival in the host, during either gastrointestinal passage or intracellular survival and growth. Furthermore, the  $\sigma^B$  also contributes to transcription of the *prfA* gene which encodes the global virulence gene regulator PrfA (Chaturongakul et al., 2008).

Table 1. *Listeria monocytogenes*  $\sigma^B$  contribution to stress resistance (adopted from Chaturongakul et al., 2008).

Stress condition	$\sigma^B$ -dependent genes	Phenotypic data supporting $\sigma^B$ contributions
Acid	<i>gadA</i> , <i>gadB</i> and <i>gadC</i>	Survival of the $\Delta sigB$ strain is lower than the wild type when logarithmic-phase cells are exposed to pH 2.5 for 1h
Osmotic	<i>betL</i> , <i>gbuA</i> , <i>bilEAB</i> and <i>opuCABCD</i>	Reduction of ability to use carnitine and betaine as osmoprotectants in the $\Delta sigB$ strain
Oxidative	<i>lmo0669</i> and <i>lmo1433</i>	Survival of the $\Delta sigB$ strain is lower than the wild type when stationary-phase cells are exposed to 13mM CHP for 15 min
Nutrient availability (energy)	<i>opuCA</i> and carbon metabolism genes (e.g. <i>ldh</i> )	Viability of the $\Delta sigB$ strain is impaired when glucose is limited
Cold or freezing	<i>ltrC</i>	The $\sigma^B$ factor is not required during growth of <i>L. monocytogenes</i> in rich media at 4°C or for survival after freeze-thaw cycles; but it contributes to growth in minimal media and in meats at low temperatures
High hydrostatic pressure	n.d.	Survival of the $\Delta sigB$ strain is more limited than the wild type at 350 Mpa after 28 min
Arsenate	<i>lmo2230</i> (encodes a arsenate reductase protein)	n.d.

$\Delta sigB$ : absence of the *sigB* gene. n.d.: no determined.

Other  $\sigma$  factor is  $\sigma^L$ , also known as  $\sigma^{54}$  or RpoN, which is encoded by the *sigL* gene and contributes to *L. monocytogenes* intracellular replication, osmotolerance and susceptibility to the antibacterial peptide mesentericin Y105 (Chaturongakul et al., 2008; Okada et al., 2006; Robichon et al., 1997). Further, the  $\sigma^C$  factor or extracytoplasmic

function  $\sigma$  factor (encodes by the *sigC* gene) seems to be activated upon heat stress (Chaturongakul et al., 2008). Through regulation of small RNA transcription, the  $\sigma$  factors control the expression of binding proteins and chaperones such as *Hfq*, which play an important role in stress response in the presence of salt and ethanol (Christiansen et al., 2004).

It is of note that the stress-related  $\sigma^B$ , encoded by the *sigB* gene, is also linked to *L. monocytogenes* virulence (de las Heras et al., 2011). While  $\sigma^B$  helps modulate *prfA*-dependent expression, its influence during invasive infection is insignificant given its restricted involvement in the gastrointestinal phase before entry (de las Heras et al., 2011; Garner et al., 2006; Ollinger et al., 2009; Toledo-Arana et al., 2009). PrfA is the major regulator of the virulence genes in *L. monocytogenes* (Lebreton and Cossart, 2017). Once inside the host, *L. monocytogenes* enters macrophages, active epithelial cells, hepatocytes, fibroblasts, and cells of the endothelium and nervous tissue, with the help of two listerial surface-associated proteins (internalins InlA and InlB). Other virulence proteins aid its survival by promoting vacuole escape (through activation of pore-forming toxin listeriolysin O or LLO, phospholipases PlcA and PlcB, and protease Mpl), cytosolic replication (sugar phosphate permease Hpt) and actin-based cell-to-cell spreading to adjacent cells (actin-polymerizing protein ActA, InlC) (de las Heras et al., 2011). PrfA regulon is selectively activated during host cell infection where the genes encoding these virulence factors are coordinately expressed under the positive control of PrfA. This protein comes from the cAMP receptor protein (Crp)/fumarate nitrate reductase regulator (Fnr) family of bacterial transcription factors that can bind DNA as dimers on specific sites in gene promoters and activate transcription (de las Heras et al., 2011; Lebreton and Cossart, 2017). PrfA was initially identified for its ability to stimulate the expression of the *hly* gene or the pore-forming toxin listeriolysin O (LLO). The *hly* gene is co-expressed with a PrfA-dependent virulence cluster encompassing the *prfA* gene itself, the *plcA* and *plcB* genes encoding phospholipases, the *mpl* gene encoding a metalloprotease, and ActA, which promotes actin comet tail formation by recruiting the cellular actin nucleator complex Arp2/3 (Hamon et al., 2012; Kocks et al., 1992; Körner et al., 2003; Kreft and Vázquez-Boland, 2001; Leimeister-Wachter et al., 1990; Poyart et al., 1993; Vazquez-Boland et al., 1992). PrfA also activates other genes such as the *inlA* and *inlB* genes encoding the internalin family proteins InlA and InlB, the *inlC* gene encoding a short secreted internalin-like protein important for cell-to-cell spread and the dampening of

inflammatory response, the *bsh* gene encoding a bile-salt hydrolase participating in the intestinal and hepatic phases of infection, and the *uhpT* gene encoding an hexose phosphate transporter (Dussurget et al., 2002; Kreft and Vázquez-Boland, 2001; Pizarro-Cerda and Ku, 2012).

Apart from the *sigB* and *prfA* genes, other transcriptional regulators also contribute to an increase of gene expression during infection favoring virulence of *L. monocytogenes*. The two-component system VirR/S controls the expression of 17 genes, including its own operon, modifies bacterial surface components, and provides resistance to antimicrobial peptides (Kang et al., 2015). The *dlt* gene encodes proteins involved in D-alanylation of lipoteichoic acids and is required for virulence (Abachin et al., 2002); the *lmo1695* gene is required for lysinylation of phospholipids in listerial membranes and confers resistance to cationic antimicrobial peptides (CAMPs) (Thedieck et al., 2006); the *lmo1696* gene encodes a putative glycopeptide antibiotic resistance protein of the VanZ family (Evers et al., 1999); and finally, the ABC transporter AnrAB is involved in resistance to the bacteriocin nisin and several other antibiotics (Collins et al., 2010). Further, the nutrient-responsive regulator CodY, which coordinates the synthesis of branched-chain amino-acids (BCAA), stimulates the expression of virulence genes in response to low availability of BCAA.

Besides the transcriptional regulators, a large variety of RNA-mediated regulatory mechanisms participate in the control of *L. monocytogenes* virulence gene expression (Lebreton and Cossart, 2017). One of them is the 5'-untranslated region (UTR) which controls the expression of several *L. monocytogenes* virulence genes at the post-transcriptional level. Indeed, the 5'-UTR of the *actA*, *hly*, *inlA* and *iap* genes are required for their optimal expression (Lebreton and Cossart, 2017). Furthermore, riboswitches consist in short RNA sequences that make conformational changes upon ligand binding, and adjust the expression of certain operons according to the availability of specific metabolites. Some of these operons are *pdu*, *cob*, and *eut* which have been proposed to confer a metabolic advantage to pathogenic species in competition with the gut flora in the host (Lebreton and Cossart, 2017). Finally, the *Listeria* genome encodes many non-coding RNA (ncRNAs) that share a partial complementarity with targets located elsewhere in the genome and can regulate these targets. To date, >150 putative acting sRNAs, named Rli, have been annotated and are thought to have a regulatory function in



virulence; however, most *Listeria* sRNAs remain uncharacterized functionally (Mraheil et al., 2011; Schultze et al., 2014; Sesto et al., 2014; Toledo-Arana et al., 2009).

### **3. Molecular mechanisms underlying stress tolerance response of *L. monocytogenes* to adverse conditions in foods and food environments**

*L. monocytogenes* is exposed to numerous stress factors such as cold, heat, acid, detergents, dehydration, osmolites and oxidation in foods and food environments throughout the processing and storage. It often confronts more than one type of stress at the same time in food environments. Table 2 summarizes the main mechanisms utilized by *L. monocytogenes* to tolerate adverse conditions and persist in foods.

Table 2. Overview of the main mechanisms of *Listeria monocytogenes* adaptation to tolerate stress.

Type of stress	Mechanism of adaptation	Reference
Cold stress response	Cold shock (Csp), cold acclimation proteins (Caps) and DNA helicases ( <i>Imo0866</i> , <i>Imo1722</i> and <i>Imo1450</i> ) are important for <i>L. monocytogenes</i> growth	(Azizoglu and Kathariou, 2010; Tasara and Stephan, 2006)
	Csps participates in the control of replication, transcription and translation favouring adaptation to cold environment	(Samara and Koutsoumanis, 2009)
	The <i>LisR</i> , <i>Imo1172</i> and <i>Imo1060</i> gene activation permits tolerance of <i>L. monocytogenes</i> to cold stress	(Chan et al., 2008)
	<i>lhkA</i> , <i>yycI</i> and <i>yycF</i> genes are transcriptionally active in response to cold stress	(Chan et al., 2008)
	Increased transcription of the <i>groEL</i> , <i>clpP</i> and <i>clpB</i> genes	(Chan et al., 2008)
	Increased expression of the <i>flp</i> and <i>trxB</i> genes associated with the growth of <i>L. monocytogenes</i> at low temperature	(Chan et al., 2008)
	Increased transcription of the <i>hisJ</i> , <i>trpG</i> , <i>cysS</i> and <i>aroA</i> genes involved in amino acid synthesis as a consequence of cold acclimation process	(Chan et al., 2008)
	Activation of the <i>ltrA</i> , <i>lrrB</i> and <i>lrrC</i> genes are essential for the growth of <i>L. monocytogenes</i> (< 4°C).	(Zheng and Kathariou, 1994)
	<i>flaA</i> encode the <i>L. monocytogenes</i> major flagellin protein FLaA, increasing flagellum production at low temperature	(Liu et al., 2002)
	Heat shock Proteins (Hsps) which contain highly conserved chaperones and ATP-bounded proteases	(Kocaman and Sarimehmetoğlu, 2016)
Hot stress response	The <i>GroES</i> , <i>GroEL</i> and <i>DnaK</i> chaperone proteins help protein aggregation at high temperatures	(Hu et al., 2007a)
	Activation of the <i>CtsR</i> gene which controls the <i>ClpP</i> , <i>ClpE</i> and <i>ClpC</i> genes that remove damaged or misfolded proteins	(Hu et al., 2007b)
	The <i>fri</i> gene encoding a single ferritin gene is strongly overexpressed after heat shock or chemical stress	(Hébraud and Guzzo, 2000; Phan-Thank and Gormon, 1997, 1995)
	The induction of the $\sigma^B$ , <i>prfA</i> , <i>hrcA</i> , and <i>ctsR</i> genes increases the activation of the fatty acid biosynthetic genes	(Bowman et al., 2010)
Acidic stress response	The induction of dehydrogenases ( <i>GuaB</i> , <i>PDuQ</i> and <i>Imo0560</i> ), reductases ( <i>YegI</i> ) and respiratory enzymes is related to adaptation to acid stress consist in accelerating electron transfer through enhanced oxidation-reduction potential.	(Kocaman and Sarimehmetoğlu, 2016; Soni et al., 2011)
	Respiratory enzymes together with the F <sub>o</sub> F <sub>1</sub> ATPase action can contribute to proton efflux events	(Phan-Thanh and Jänsch, 2005; Skandamis et al., 2012)
	The promoting of the <i>atpC</i> and <i>atpD</i> genes encoding H <sup>+</sup> ATPase, which are regulated by the <i>prfA</i> genes, are linked to the onset of the acid tolerance response	(Kocaman and Sarimehmetoğlu, 2016)

	<p>Enzymes encoded by the <i>arcA</i>, <i>arcB</i>, <i>arcC</i>, and <i>arcD</i> genes are involved in the conversion of arginine to ornithine and transfer the ornithine outside the cell in exchange for arginine</p> <p>The glutamate decarboxylase acid resistance system including the <i>gadA</i>, <i>gadB</i> and <i>gadC</i> genes is related to acid stress tolerance</p> <p>The activation of <i>lmo0038</i> gene, and the genes encoding LisRK and HtrA, play an important acid stress adaptation role in <i>L. monocytogenes</i></p> <p>Changes in expression of the stress-related genes (<i>gad2</i> and <i>sigB</i>) of <i>L. monocytogenes</i> are produced in response to acid stress.</p>	<p>(Ryan et al., 2009)</p> <p>(Chen et al., 2009; Cotter et al., 2000, 1999; Sleator and Hill, 2005; Wemekamp-Kamphuis et al., 2004; Wonderling et al., 2004)</p> <p>(Makariti et al., 2015b)</p> <p>(Giotis et al., 2010)</p> <p>(Ells and Truelstrup Hansen, 2011)</p> <p>(Angelidis and Smith, 2003)</p> <p>(Fraser et al., 2000)</p> <p>(Sleator et al., 2001)</p> <p>(Burgess et al., 2016; Sleator et al., 2003)</p> <p>(Chassaing and Auvray, 2007; Utrama et al., 2011)</p> <p>(Michel et al., 2011)</p> <p>(Burall et al., 2015)</p> <p>(Burgess et al., 2016)</p> <p>(Burall et al., 2012; Olesen et al., 2009)</p> <p>(Chaturongakul et al., 2008)</p>
<b>Alkaline stress response</b>	<p>Activation of the stress protective chaperones <i>DnaK</i> and <i>GroEL</i> are stimulated by alkaline stress conditions</p> <p>The <i>treA</i> gene is involved in the trehalose metabolism and is related to osmotic stress resistance</p> <p>The accumulation of glycine betaine, an important osmoprotectant, is mediated by the <i>BetL</i> and <i>Gbu</i> genes</p> <p>The <i>OpuC</i> gene has a direct role in regulating carnitine production, an important osmoprotectant component</p> <p>The biosynthesis of proline is regulated by the <i>ProBA</i> gene and gone up under osmotic stress</p> <p>Activation of the <i>Kdp</i> system, which allows K<sup>+</sup> import, makes easy a rapid response to osmotic stress</p> <p>The <i>lmo2085</i> and <i>lmo1078</i> genes encode proteins which modifying cell wall structure in response to osmotic stress</p> <p>The <i>lmo0501</i> gene is inhibited under osmotic stress conditions</p> <p>Activation of the <i>lscC</i> gene is needed to high salt tolerance adaptation</p> <p>The genes encoding the proteases HtrA and ClpP and the guanosine tetra/penta-phosphate synthetase RelA are essential for osmotic stress adaptation</p> <p>The virulence <i>iap</i> gene plays an important role in salt adaptation</p> <p>The <i>sigB</i> gene, which controls various genes, is also implied in osmotic stress tolerance</p>	<p>(Giotis et al., 2010)</p> <p>(Ells and Truelstrup Hansen, 2011)</p> <p>(Angelidis and Smith, 2003)</p> <p>(Fraser et al., 2000)</p> <p>(Sleator et al., 2001)</p> <p>(Burgess et al., 2016; Sleator et al., 2003)</p> <p>(Chassaing and Auvray, 2007; Utrama et al., 2011)</p> <p>(Michel et al., 2011)</p> <p>(Burall et al., 2015)</p> <p>(Burgess et al., 2016)</p> <p>(Burall et al., 2012; Olesen et al., 2009)</p> <p>(Chaturongakul et al., 2008)</p>
<b>Osmotic stress response</b>		

<b>Desiccation</b>	Microbial biofilm formation and the increase of extrapolymeric substances	(Burgess et al., 2016; Esbelin et al., 2018)
	Accumulation of osmolytes such as betaine, carnitine, proline and trehalose	(Ells and Hansen, 2011; Sleator et al., 2003)
<b>Oxidative stress response</b>	Activation of the <i>sigB</i> and <i>perR</i> genes, which both encoding stress regulator proteins; the <i>sod</i> , <i>kat</i> and <i>fri</i> genes which are involved in oxidation resistance of the microorganism and the <i>recA</i> implied in the DNA repair are some essential genes for the persistence and growth under oxidative stress	(Fiorini et al., 2008; Fisher et al., 2000; Olsen et al., 2005; Van Der Veen and Abec, 2010)
	The <i>kat</i> gene works together with superoxide dismutases encoded by the <i>sod</i> gene to prevent oxidative attack	(Fisher et al., 2000)
	A regulator encoded by the <i>sigB</i> gene regulates the expression of <i>sod</i> , <i>kat</i> , <i>fri</i> and other oxidation resistance genes under oxidative stress conditions	(Dieuleveux et al., 1998; Huang et al., 2018)
	The <i>fri</i> gene is important in protection of <i>L. monocytogenes</i> cells from hydrogen peroxide	(Olsen et al., 2005)
	The <i>perR</i> gene has been reported to be associated with the ability to tolerate oxidative stress	(Brenot et al., 2005)
The <i>recA</i> gene contributes to DNA repair after cell impairment under stress conditions	(Hasset and Cohen, 1989; Huang et al., 2018; Van Der Veen and Abec, 2010)	

### 3.1. Cold and heat stress responses

#### 3.1.1. Cold stress response

*L. monocytogenes* is well known for its capacity to survive and grow at temperatures as low as -0.4°C (Chan et al., 2008). Understanding the molecular mechanisms that help *L. monocytogenes* to endure low temperatures and develop cryotolerance is critical to reduce or prevent its occurrence in refrigerated ready-to-eat (RTE) foods (Chan et al., 2008) (Azizoglu and Kathariou, 2010).

Cold stress resistance in *L. monocytogenes* consists of immediate (shock) response and long-term adaptation. If a decrease in temperatures occurs suddenly, the bacterium will suffer a cold shock stress, which activates appropriate cold shock adaptation molecular response mechanisms for its acclimatization and adaptation at low temperatures (Tasara and Stephan, 2006). Typical molecular cold stress adaptation mechanisms documented in foodborne pathogens including *L. monocytogenes* are: (i) modulation of nucleic acid structures (DNA and RNA) in order to relieve constraints associated with increased stability; (ii) maintenance of structural integrity in cell membranes; (iii) uptake of compatible solutes; (iv) nonspecific stress response mechanisms, and (v) production of various cold stress proteins known as cold shock proteins (Csps) and cold acclimation proteins (Caps) (Tasara and Stephan, 2006). DNA helicases and Csps are important for the growth of *L. monocytogenes* (Kocaman and Sarimehmetoğlu, 2016). Csps are members of small and highly conserved chaperones, which play a role in the control of replication, transcription and translation (Samara and Koutsoumanis, 2009) and could favor the cold adaptation of *L. monocytogenes* (Kocaman and Sarimehmetoğlu, 2016; Schmid et al., 2009).

Furthermore, several other genes (eg, *lhkA*, *ycyJ*, *ycyF*, *lisR*, *lmo1172* and *lmo1060*) are also implicated in *L. monocytogenes* response to cold stress (Chan et al., 2008). Liu et al. (2014a) reported an enhanced expression of the *ycyJ* gene in response to cold stress, which encodes a putative member of the two-component signal transduction system in *L. monocytogenes*. Similarly, the *lhkA* gene, which encodes a histidine kinase sensor, was also induced at low temperatures (Tasara and Stephan, 2006). In addition, the activation of the *psr* gene under cold stress conditions provokes the regulation of its own expression

as well as of penicillin binding protein 5 while its deletion leads to various cell-wall alteration of the bacterium (Tasara and Stephan, 2006). Liu et al. (2014a) also detected increased transcription of the *groEL*, *clpP* and *clpB* genes during cold acclimation of *L. monocytogenes*. Induction of the transcription of both *flp* and *trxB* genes, which encode Flp and thioredoxin reductase, is associated with growth at low temperatures; and a risen transcription of *hisJ*, *trpG*, *cysS* and *aroA* genes, which encode amino acid biosynthetic enzymes, is linked to cold acclimation process. Zheng and Kathariou (1994) noted that the inactivation of three low temperature-requirement genes (*ltrA*, *ltrB* and *ltrC*) seems to be essential for growth at low temperature (4°C) but dispensable for growth at 8°C or higher temperatures.

Additionally, Liu et al. (2002) demonstrated an increase of flagellum production during growth of *L. monocytogenes* at low temperatures. The *flaA* gene encodes major flagellin protein FlaA (Dons et al., 1992), and its expression is higher when *L. monocytogenes* is grown at 25°C and 10°C than at 37°C (Dons et al., 1992). The increased flagellum production in *L. monocytogenes* may be akin to that in other microorganisms in which motility-associated microbial biofilm formation has been described as an adaptation strategy against cold stress environments (Tasara and Stephan, 2006). Moreover, the *lmo0866*, *lmo1722* and *lmo1450* genes encoding helicases identified in *L. monocytogenes* take part in the cold stress response transcriptome (Chan et al., 2007). Finally, Azizoglu and Kathariou (2010) have shown the necessity of the *lmo0866* gene for *L. monocytogenes* to survive and grow at low-temperature conditions.

### 3.1.2. Heat stress response

*L. monocytogenes* is capable of withstanding relatively high heat stress and surviving in some cases during dairy product pasteurization (Kocaman and Sarimehmetoğlu, 2016; Sergelidis and Abraham, 2009). Exposure to heat treatment induces the microorganism to activate cellular mechanisms to maintain homeostasis and repair the effect of heat stress through removal of degraded proteins, renovation of metabolic functions and production of new proteins (Kocaman and Sarimehmetoğlu, 2016). This response is facilitated by the rising production of heat shock proteins (Hsps) which contain highly conserved chaperones and ATP-bounded proteases. Chaperone proteins encoded by the *GroES*, *GroEL* and *DnaK* genes help protein aggregation at high temperature (Hu et al., 2007a).

The gene repressor *CtsR* controls the expression of the *ClpP*, *ClpE* and *ClpC* genes encoding ATP-bounded proteases which remove damaged or misfolded proteins (Hu et al., 2007a). This same authors showed that the activation of the *ClpB* gene makes the precipitated proteins active again. Furthermore, sensitivity to heat stress increases in *L. monocytogenes* cells in the absence of the *fri* gene, which encode a single ferritin protein (Dussurget et al., 2005). *L. monocytogenes* ferritin is a major cold shock protein which is also strongly overexpressed after heat shock or chemical stresses (Hèbraud and Guzzo, 2000; Phan-Thank and Gormon, 1997, 1995). Thus, these chaperone proteins and ATP-bounded proteases work in concert to enhance *L. monocytogenes* resistance to heat stress

## **3.2. Acidic and alkaline stress responses**

### **3.2.1 Acidic stress response**

Acidification is frequently employed in the food industry to control pathogenic microorganisms such as *L. monocytogenes* (Jones et al., 2013). Use of organic acids as food preservatives (Skandamis et al., 2012) and the compounds produced by lactic acid bacteria as protective cultures (Buchanan and Edelson, 1996) create an acidic environment in foods that *L. monocytogenes* has to endure for its survival. In addition, *L. monocytogenes* also needs to withstand inorganic acids present in the gastrointestinal tracts of human hosts during the infection process (Kocaman and Sarimehmetoğlu, 2016; Rychli et al., 2016). Mechanisms of *L. monocytogenes* adaptation to acidic stress include stimulation in activity of DNA repair enzymes, regulators and oxidative stress defenses, improvement in the amino acid catabolism and proton pump, and modifications in the composition of the cell membrane (Soni et al., 2011).

Organic acid has been shown to play a role in the adaptation mechanism of *L. monocytogenes* to acidic stress. Bowman et al. (2010) showed that the use of sodium diacetate at pH 5.0 promotes changes in the expression of a wide range of genes ( $\sigma^B$ , *prfA*, *hrcA*, and *ctsR*) and increases activation of oxidative stress defenses, DNA repair, intermediary metabolism, cell wall modification, and cofactor and fatty acid biosynthetic genes. Other studies in which *L. monocytogenes* faced hydrochloric acid demonstrated that dehydrogenases and reductases, osmolyte transport, protein folding and repair,

general stress resistance, flagella synthesis, and metabolism are all associated with its acid stress responses (Phan-Thanh and Jänsch, 2005; Wemekamp-Kamphuis et al., 2004).

Other adaptation mechanisms used by *L. monocytogenes* to confront acid stress consist in accelerating electron transfer through enhanced oxidation-reduction potential (Kocaman and Sarimehmetoğlu, 2016). The induction of genes involved in dehydrogenases (*GuaB*, *PDuQ* and *lmo0560*), reductases (*YegT*) and respiratory enzymes is related to adaptation to acid stress in this bacterium (Soni et al., 2011). These enzymes together with the  $F_0F_1$  ATPase action contribute to proton efflux events (Phan-Thanh and Jänsch, 2005; Skandamis et al., 2012).

$H^+$  ATPase, encoded by the *atpC* and *atpD* genes which are regulated by the *prfA* gene, is linked to the onset of the acid tolerance response (Kocaman and Sarimehmetoğlu, 2016). The arginine deiminase, involved in the conversion of arginine to ornithine and the transfer of ornithine outside the cell in exchange for arginine because of the action of the enzymes encoded by the *arcA*, *arcB*, *arcC*, and *arcD* genes (Ryan et al., 2009), is also associated with *L. monocytogenes* resistance under acid stress conditions. The glutamate decarboxylase acid resistance system includes the *gadA*, *gadB* and *gadC* genes, *lmo0038* gene (encoding putative peptidylarginase deiminase family proteins, LisRK and HtrA), also play an important part in *L. monocytogenes* acid stress adaptation (Chen et al., 2009; Cotter et al., 2000, 1999; Wemekamp-Kamphuis et al., 2004; Wonderling et al., 2004a).

Recently, Makariti et al. (2015b) have demonstrated changes in the expression of the stress-related genes (*gad2* and *sigB*) in *L. monocytogenes* response to acid stress.

### 3.2.2. Alkaline stress response

Most of detergents and sanitizing agents used in food processing environments may provoke alkaline stress in *L. monocytogenes* (Soni et al., 2011). Mechanisms utilized by *L. monocytogenes* during alkaline stress adaptation include metabolic changes to increase acid generation, and the stimulation of transporters and enzymes and cell surface modifications associated with proton retention (Gardan et al., 2003; Kocaman and Sarimehmetoğlu, 2016). Indeed, 390 gene transcripts related to general stress response, solute transportation, various metabolic systems, and chaperones (eg, *DnaK* and *GroEL*)



are expressed by *L. monocytogenes* in different grades in relation to alkaline stress (Giotis et al., 2010). Nevertheless, there is much to be learnt about the mechanism of *L. monocytogenes* alkaline stress adaptation.

### 3.3. Osmotic and desiccation stress responses

One of the strategies used by food industry to ensure the safety and quality of food products relies on the limitation of the water availability for microorganisms. This typically involves osmotic stress and desiccation (drying or matrix effect). *L. monocytogenes* has evolved a number of complex interplaying and different molecular mechanisms to allow its survival under either desiccation or osmotic stress encountered in food environments.

#### 3.3.1. Osmotic stress response

High levels of sugar and sodium salts increase intracellular solute concentrations and may disrupt many biological functions, and have been long used as food preservatives in food industry. When encountering osmotic stress during a shift to a hyperosmotic solution or due to dehydration, *L. monocytogenes* generate several proteins linked to salt and sugar stress response (Bae et al., 2012b; Ells and Hansen, 2011; Sleator et al., 2003). These proteins are involved in the production of compatible solutes, changes of cell wall and regulatory processes, some of which are general stress proteins, too (Esbelin et al., 2018).

One of the main osmotic stress adaptation strategies is the accumulation of compatible solutes such as trehalose, glycine betaine, carnitine and amino acids (Burgess et al., 2016; Kocaman and Sarimehmetoğlu, 2016; Sleator et al., 2001; Sleator and Hill, 2005). The compatible solute trehalose is important for the *L. monocytogenes* survival under adverse environmental conditions (Burgess et al., 2016; Elbein et al., 2003). The phosphotrehalase gene *treA* (*lmo1254*) is involved in the trehalose metabolism and is relevant to stress resistance (Ells and Hansen, 2011). The accumulation of glycine betaine is mediated by the *BetL* and *Gbu* genes (Angelidis and Smith, 2003), while the *OpuC* gene has a direct role in regulating carnitine production (Fraser et al., 2000). Amino acid proline is an important osmoprotectant (Sleator and Hill, 2002), and its biosynthesis is regulated by the *ProBA* gene and its level increases under osmotic stress (Sleator et al., 2001).

In addition, activation of the Kdp system allows K<sup>+</sup> import, and makes easy for a rapid response in *L. monocytogenes* to osmotic stress (Burgess et al., 2016; Sleator and Hill, 2002). Two genes that encode proteins modifying cell wall structure in response to osmotic stress have been also reported: Imo2085, a putative peptidoglycan bound protein, and Imo1078, a putative UDP-glucose phosphorylase catalysing the formation of UDP-glucose (Chassaing and Auvray, 2007; Utratna et al., 2011). The *lmo0501* gene encoding a regulatory protein has reduced activity under osmotic stress (Michel et al., 2011), and the *lstC* gene is also implicated in high salt tolerance (Burall et al., 2015). Several general stress response proteins are essential for osmotic stress adaptation in *L. monocytogenes*, including serine protease HtrA, the protease ClpP, and the guanosine tetra/penta-phosphate synthetase RelA (Burgess et al., 2016). The virulence gene *iap* also plays a role in salt adaptation (Burall et al., 2012; Olesen et al., 2009). Notably, many of the genes implied in stress tolerance, metabolism, transport, cell envelope, and virulence are controlled by the alternative sigma factor  $\sigma^B$  (Chaturongakul et al., 2008).

### 3.3.2. Desiccation

Desiccation stress is created by food drying process (relative humidity variations) or daily surface cleaning-disinfection procedures in the food industry (Esbelin et al., 2018). Due to its thick peptidoglycans, Gram-positive *L. monocytogenes* is strongly resistant to dryness (Bale et al., 1993). Different cellular mechanisms towards this stress tolerance have been described in *L. monocytogenes*. Firstly, *L. monocytogenes* increases biofilm formation to counter desiccation stress (Burgess et al., 2016; Esbelin et al., 2018). Biofilm formation involves accumulation of extracellular polymeric substances which build up a water-rich gel around bacterial cells (Harmsen et al., 2010; Hingston et al., 2013).

Other adaptation strategy used by *L. monocytogenes* against desiccation consists in the accumulation of osmolytes such as betaine, carnitine, proline and trehalose (Ells and Hansen, 2011; Sleator et al., 2003), which works the same way as osmotic stress response described in section 3.3.2.

Desiccation stress response may also relate to the presence of HSP or DNA damage repair. HSP is able to overcome the loss of water through the building of hydrogen bonds to other molecules (França et al., 2007). The mechanism used to confront heat stress

(detailed in section 3.1.2) may also be employed by *L. monocytogenes* to withstand desiccation. Cells under desiccation may use DNA to stabilize proteins. Therefore, DNA itself could provide a molecular shield against drying stress (García-Fontana et al., 2016).

#### 4. Oxidative stress response

Exposure to oxidative stress associated with atmospheric changes as well as chemical agents (eg, detergents and disinfectants; Kocaman and Sarimehmetoğlu, 2016) results in the production and accumulation of reactive oxygen species (ROS) like superoxide, hydroxyl radicals and hydrogen peroxide in *L. monocytogenes* (Bowman et al., 2010; Burgess et al., 2016). To counter these oxidative agents, *L. monocytogenes* has evolved ROS detoxification systems that include superoxide dismutase (Sod), catalase (Kat) and alkyl hydroperoxidase (AhpCF) (Kocaman and Sarimehmetoğlu, 2016; Lungu et al., 2009). The key genes enabling *L. monocytogenes* persistence and growth under oxidative stress conditions consist of the *sigB* and *perR* genes both encoding stress regulator proteins; the *sod*, *kat* and *fri* genes involved in oxidation resistance; and the *recA* implied in the DNA repair (Bredeche et al., 2001; Fiorini et al., 2008; Fisher et al., 2000; Huang et al., 2018; Rea et al., 2005; Van Der Veen and Abee, 2010). The catalase encoded by the *kat* gene works together with superoxide dismutases (SOD) encoded by the *sod* gene in order to prevent oxidative attack in *L. monocytogenes* (Fisher et al., 2000). A regulator encoded by the *sigB* gene modulates the expression of the *sod*, *kat*, *fri* genes and other oxidation resistance genes in *L. monocytogenes* under oxidative stress environments (Dieuleveux et al., 1998; Huang et al., 2018). The *fri* gene encoding ferritin-like protein is important in the protection of *L. monocytogenes* cell from hydrogen peroxide (Olsen et al., 2005) and the *perR* gene is also linked to the ability to tolerate such stress (Brenot et al., 2005). Finally, the *recA* gene contributes to DNA repair after cell impairment under stress conditions (Hasset and Cohen, 1989; Huang et al., 2018; Van Der Veen and Abee, 2010). Considered to be a secondary stress, as a result of bacterial exposure to acid, heat, high salt concentrations and toxic agents such as antibiotics (Mols and Abee, 2011), oxidative stress has a significant impact in food safety.

## 5. Effect of food processing and treatments on stress tolerance of *L. monocytogenes*

Processing and treatments of raw materials, pre- and elaborated foods to eliminate contamination by and suppress growth of *L. monocytogenes* may create different types of stresses which affect its survival, virulence and tolerance response.

Dairy products (eg, cheeses) and meat products offer a suitable environment for *L. monocytogenes* survival and growth, allowing its persistence in processing plants (Mataragas et al., 2015; Melo et al., 2015; Rantsiou et al., 2012b). The composition, moisture content, pH, content of salt and ripening conditions associated with cheeses and other dairy products may create certain acid, osmotic, drying, oxidative, heat and cold stresses for *L. monocytogenes* (D'amico et al., 2008). Fermentation and ripening of sausages may also activate acidic and osmotic stress responses in *L. monocytogenes* (Mataragas et al., 2015). This bacterium overcomes the inhibitory effect of low pH by developing adaptive mechanisms, involving the F<sub>0</sub>-F<sub>1</sub> ATPase, the glutamate decarboxylase (GAD) system, the arginine deiminase system and sigma factors and regulators (Faleiro et al., 2003). To cope with osmotic, drying and cold stresses, this bacterium synthesizes compatible solutes to balance the intracellular and extracellular environments (Melo et al., 2015; Sleator et al., 2003). To withstand oxidative agents, this bacterium activates protein, membrane and nucleic acid damage repair mechanisms (Lungu et al., 2009; Melo et al., 2015); and to tolerate heat stress, *L. monocytogenes* synthesizes Hsps (see section 3.3) (Van der Veen et al., 2007). In addition, increase in the expression of the stress-related *sigB* gene implies activation of the virulence-related genes in *L. monocytogenes* (Rantsiou et al., 2012b).

Some of the traditional preserving methods (eg, heat treatment, refrigeration, acidification, hygienization, desiccation and adding of salts or sugars) may not only fail to prevent *L. monocytogenes* survival and growth, but also enhance its virulence (Beales, 2004; Melo et al., 2015).

As some of the aforementioned methods do not completely suppress *L. monocytogenes* growth, they cannot be applied in the hygienization of certain foods. Under the circumstances, alternative technologies such as ultrasound under pressure at nonlethal (manosonication, MS) and lethal temperatures (manothermosonication, MTS), pulsed

electric field (PEF), high hydrostatic pressure (HHP), E-Beam treatment and UV-light (UV) may be used (Cebrián et al., 2016). Both MS and MTS may control *L. monocytogenes* growth in juices and other foods depending on pH and medium composition (Baumann et al., 2005; Guzel et al., 2014; Mañas et al., 2000; Pagán et al., 1999; Piyasena et al., 2003); however, the effect of these non-thermal technologies on changes in *L. monocytogenes* virulence and tolerance to stresses requires further studies. PEF has been shown to inhibit the growth of *L. monocytogenes* in fruit juices and milk (Fleischman et al., 2004; Mosqueda-Melgar et al., 2007), possibly by provoking DNA and membrane integrity damages of *L. monocytogenes* cells and generation of toxic compounds (García et al., 2005; Rajkovic et al., 2010a). HHP, also known as pascalization, is a non-thermal pasteurization consisting of treatments above 100 MPa (Daher et al., 2017). This technique has been successfully applied to reduce or control the growth of this pathogen in some fruit and vegetables juices, jams and smoothies (Daher et al., 2017; Erkmén and Dogan, 2004b; Préstamo et al., 1999; Scolari et al., 2015; Shahbaz et al., 2016), cheeses (Evrendilek et al., 2008), cooked chicken (Patterson et al., 2011) and RTE cooked ham (Marcos et al., 2008). Inactivation of *L. monocytogenes* by HHP is a multi-target process (Cebrián et al., 2016; Daher et al., 2017; Mañas and Pagán, 2005), involving membrane damage, increase in solute loss, protein coagulation, key enzyme inactivation, conformational changes in ribosome and alteration of recovery mechanisms (Mañas and Pagán, 2005). HHP may affect cytoplasmic or membrane enzymes, disturb cellular metabolism and induce generation of ROS provoking stress to *L. monocytogenes* bacteria (Cebrián et al., 2016). Although this method is increasingly used, the effect of this treatment on the expression and regulation of stress-related genes in surviving *L. monocytogenes* bacteria has not been studied yet. UV has been traditionally employed for air, surface and water decontamination, but recently this methodology is being successfully applied in the food industry in liquid foods and the surfaces of solid foods contaminated with *L. monocytogenes* (Cebrián et al., 2016; Gayán et al., 2015). Although scarce studies have been performed about the influence of UV on the growth of *L. monocytogenes* in foods, the short-wave UV light region (UV-C) from 200 to 280 nm is the most germicidal and its range of maximum effectiveness (260-265 nm) corresponds to the peak of maximum DNA absorption. Therefore, UV mainly affects integrity of genetic material, although it might alter proteins (Gayán et al., 2014). Recently, Horita et al. (Horita et al., 2018) have proposed a combined strategy consisting of reformulation, active packaging and the use of non-thermal post-packaging

decontamination technology such as HHP, PEF, E-Beam and UV-light to control *L. monocytogenes* in cooked RTE meat products.

## 6. Conclusions and future perspectives

*L. monocytogenes* has evolved a variety of molecular mechanisms to withstand the different types of stresses encountered in food and food environments, including traditional preserving methods (e.g. dehydration or utilization of salts and sugars) and new methods to control the growth of this pathogen in foods (eg, PEF and HHP among others). Understanding the mechanisms of stress tolerance of *L. monocytogenes* may help to develop innovative and efficient strategies to reduce or eliminate its survival and growth in foods and to control the listeriosis risk for consumers.

It is important to note that most advances made so far in understating the *L. monocytogenes* stress responses are derived from broth models and not from actual food substrates. Therefore, further studies using different food substrates that resemble environmental conditions related to the processing of different food items are needed.

The relationship between the stress response and the virulence of *L. monocytogenes* is well-established; however, most of the studies have been focused on the correlation of the  $\sigma^B$  factor with the activity of the virulence genes. Further studies are required to clarify the influence of other stress-related genes on the virulence of this microorganism.

While the transcriptional regulators for stress response and virulence of this bacterium under acidic, osmotic, heat and cold stress have been extensively studied, the mechanisms used by *L. monocytogenes* under alkaline, desiccation and oxidative stress are insufficiently investigated. This calls for additional research efforts to unravel its mechanisms against hygienization, dehydration or presence of oxidative agents in the food industries. In addition, the influence of the new non-thermal technologies on the molecular mechanisms of *L. monocytogenes* stress response should be examined in detail in order to develop optimal control measures.

MS-based proteomic analyses offer a new tool for improving our understanding of *L. monocytogenes* stress responses and virulence related to foods. Use of this technique may

help yield new insights into the mechanisms of its adaptation and survival under adverse conditions, and search for novel ways to block the expression of proteins that regulate its stress adaptation.





IV. 4. COMBINED EFFECT OF TEMPERATURE, WATER  
ACTIVITY AND SALT CONCENTRATION ON THE  
GROWTH AND GENE EXPRESSION OF *Listeria*  
*monocytogenes* IN A DRY-CURED HAM MODEL SYSTEM

**Abstract**

The combined effect of temperature, water activity (aw) and NaCl content, usually found in dry-cured hma, on the growth and expression of the virulence and stress-related genes of *Listeria monocytogenes* was evaluated in a dry-cured ham model system. The highest growth of this pathogen was observed at 15 °C and, at 0.98 and 0.96 aw values. At 0.94 and 0.92 aw values, moderate NaCl levels stimulated the *L. monocytogenes* growth and repressed the expression of the four tested genes. At 7 °C, the expression of the *plcA* gene was favoured while at 15 °C the *hly* and *iap* genes were activated. Preventive actions based on temperature, aw and salt content should be taken to minimise risks associated with growth and gene expression of *L. monocytogenes* in dry-cured ham.

## 1. Introduction

*Listeria monocytogenes* is a facultative anaerobe, Gram-positive and non-spore forming rod-shaped bacterium. It is one of the most important pathogen of concern in the meat industry (Quinto et al., 2016) since it is associated with listeriosis, a serious foodborne disease under EU surveillance (EFSA and ECDC, 2017).

Dry-cured ham is a product with moderate salt content and water activity ( $a_w$ ) values low enough to inhibit *L. monocytogenes*. Nevertheless,  $a_w$  values found during salting or post-salting stages of dry-cured ham processing or in sliced and vacuum-packaged dry-cured ham are often higher than 0.92  $a_w$  (Hereu et al., 2012), which may suppose a hazard associated with *L. monocytogenes* growth. In addition, slicing is a possible cross-contamination source of this pathogen (Buchanan et al., 2017) and in some cases the storage of the product in the market is made under abuse temperatures (Stollewerk et al., 2014). Thus, the growth of *L. monocytogenes* during stages and operations previously mentioned should be controlled. Apart from affecting the *L. monocytogenes* viability, the refrigeration temperatures, the presence of NaCl (related to the decrease of  $a_w$  and nature of the salt itself) and the decrease of  $a_w$  can be stressful factors resulting in a modification of its virulence. The intracellular parasitism of *L. monocytogenes* requires the coordinated expression of various genes encoding different virulence factors such as the *plcA*, *hly* and *iap* genes (Hadjilouka et al., 2016; Hamon, Ribet, Stavru, & Cossart, 2012; Kathariou, Metz, Hof, & Goebel, 1987; Vázquez-Boland et al., 2001; Wuenscher, Kohler, Bubert, Gerike, & Goebel, 1993). On the other hand, it has been reported that the stress-related gene *sigB* plays a role in the expression of some virulence genes such as *hly* and *plcA* (Chaturongakul & Boor, 2006; Kazmierczak, Mithoe, Boor, & Wiedmann, 2003; Nadon, Bowen, Wiedmann, & Boor, 2002).

The aim of this work was to evaluate in a dry-cured ham model system the combined effect of salt content,  $a_w$  reduction and temperature usually found during processing and storage in slices of dry-cured ham on the growth of *L. monocytogenes* and the expression of three virulence genes (*plcA*, *hly* and *iap*), and the stress-related *sigB* gene.

## 2. Materials and methods

The four strains of *L. monocytogenes* used in this work (S2 [serotype 1/2a], S4-2 [serotype 1/2b], S12-1 [serotype 1/2c] and S7-2 [serotype 4b]) were previously isolated from meat industry and supplied by the Spanish Institute of Agronomic Research (INIA). Each *L. monocytogenes* strain was grown twice in BHI broth and incubated at 37 °C for 24 hours each. The concentration of the inoculum was adjusted to 3 Log cfu/mL. To evaluate the effect of ionic (NaCl) and non-ionic (glycerol) water stress and temperatures on the growth and gene expression of *L. monocytogenes*, the four strains were inoculated on a meat-based medium prepared according to Rodríguez et al. (2014). The unmodified medium (basic medium; 0.98  $a_w$ ) was modified with glycerol to obtain 0.96 (11% (v/v) glycerol), 0.94 (16% (v/v) glycerol) and 0.92 (23% (v/v) glycerol)  $a_w$  values batches (0.96G, 0.94G and 0.92G, respectively) or with NaCl to obtain 0.96 (4% (w/v) NaCl), 0.94 (9% (w/v) NaCl) and 0.92 (12% (w/v) NaCl)  $a_w$  values (0.96S, 0.94S and 0.92S, respectively). Furthermore, two mixed batches were prepared by addition of 4% (w/v) NaCl, simulating the usual NaCl concentration of dry-cured ham, and an amount of glycerol required to reach 0.94 (7% (v/v) glycerol; 0.94M) and 0.92 (15% (v/v) glycerol; 0.92M)  $a_w$  values. The pH of the medium was adjusted to 6 for simulating the common value throughout the dry-cured ham ripening (Arnau et al., 1995). Each plate was superficially inoculated with 50  $\mu$ L of each *L. monocytogenes* inoculum. Each one of the four different serotypes was evaluated for the different  $a_w$  treatments. All treatments were incubated at refrigeration (7 °C) and abuse (15 °C) temperatures for 7 days. At 0 and 7 incubation days, counts of each *L. monocytogenes* strain were performed and expressed as log cfu (ISO 11290-2:2017). All experiments were done in triplicate. The  $a_w$  of the meat-based media was measured at the beginning and the end of the incubation period using a Novasina Lab Master  $a_w$  meter (Novasina AG, Switzerland).

At the end of the incubation period, 1 mL aliquot of the filtrate after homogenizing each inoculated dry-cured ham agar plate with 90 mL of 1% (W/v) peptone water in a filter bag was aseptically taken and used for total RNA extraction using the MasterPure™ RNA Purification kit (Epicentre, USA). RNA concentration and purity (A260/280) were then spectrophotometrically measured using the Nanodrop™ (Thermo Fisher Scientific, USA) and normalised to 100 ng/ $\mu$ L. Next, 5  $\mu$ L of normalised RNA was used for

synthesizing cDNA (reverse transcription reaction) to be used as target in real-time PCR (qPCR). qPCR based on the TaqMan<sup>®</sup> methodology was then used to amplify the virulence-associated genes, *plcA*, *hly* and *iap*, and the stress-related gene *sigB* of *L. monocytogenes*. In addition, a RT-qPCR was also performed to amplify the constitutive IGS gene used for normalisation to assure appropriateness of RNA extraction and cDNA synthesis processes. The Mastercycler<sup>®</sup> (Eppendorf, Germany) machine was used to perform the reverse transcription reaction. The ViiA<sup>™</sup> 7 System (Thermo Fisher Scientific, USA) was used for qPCR performance. The reactions were prepared in triplicate in MicroAmp<sup>®</sup> Fast Optical 96-Well Reaction Plate (0.1 mL) (Applied Biosystems, USA). The primer and probe nucleotide sequences, reaction conditions and composition of the mix reactions can be consulted in the Supplementary material.

Statistical analysis was performed using the SPSS v.22.0 software (IBM, USA) setting the statistical significance at  $P \leq 0.05$ .

### 3. Results and discussion

The growth of *L. monocytogenes* was affected by the combined effect of temperature and  $a_w$  (Table 1). Thus, the highest growth was observed at 15 °C and at 0.98 and 0.96  $a_w$ . In addition, at 15 °C at both 0.94 and 0.92  $a_w$  values, the growth of *L. monocytogenes* was stimulated when the  $a_w$  was decreased only with NaCl. This effect could be due to the stressful conditions generated by the presence of this ionic solute at low or moderate levels (Liu et al., 2014b), that provokes the filamentous formation of *L. monocytogenes* favoring a better growth of this pathogen. Thus, the presence of NaCl in sliced and packaged dry-cured ham at  $a_w$  values slightly above 0.92  $a_w$  could favor its growth.

Table 1. Effect of water activity (0.92-0.98) and temperature (7 and 15 °C) on the growth of the four serotypes of *Listeria monocytogenes* in the meat-based media.

Time	Temperature	Serotype	Batches <sup>a</sup>								
			0.98C	0.96G	0.94G	0.92G	0.96S	0.94S	0.92S	0.94M	0.92M
Day 0		1/2a	3.57 ± 0.08 <sup>a,2,3</sup>	3.78 ± 0.12 <sup>a,3</sup>	3.60 ± 0.42 <sup>ab,2,3</sup>	2.17 ± 0.15 <sup>ab,1</sup>	3.76 ± 0.07 <sup>a,3</sup>	3.27 ± 0.05 <sup>a,2,3</sup>	2.88 ± 0.10 <sup>ab,1,2</sup>	2.99 ± 0.04 <sup>a,2,3</sup>	2.83 ± 0.05 <sup>a,1,2</sup>
		1/2b	3.72 ± 0.24 <sup>a,1,2</sup>	3.37 ± 0.05 <sup>a,1,2</sup>	3.41 ± 0.46 <sup>ab,1,2</sup>	2.84 ± 0.00 <sup>ab,c,1</sup>	3.96 ± 0.07 <sup>a,2</sup>	3.20 ± 0.02 <sup>a,1,2</sup>	2.84 ± 0.05 <sup>ab,1</sup>	3.04 ± 0.13 <sup>ab,1,2</sup>	2.84 ± 0.18 <sup>a,1</sup>
		1/2c	3.73 ± 0.10 <sup>a,4</sup>	3.69 ± 0.21 <sup>a,3,4</sup>	3.10 ± 0.09 <sup>a,2,3</sup>	2.03 ± 0.20 <sup>a,1</sup>	3.75 ± 0.02 <sup>a,4</sup>	3.04 ± 0.13 <sup>a,2,3</sup>	3.04 ± 0.17 <sup>b,2,3</sup>	2.88 ± 0.10 <sup>a,2</sup>	2.64 ± 0.15 <sup>a,2</sup>
		4b	3.49 ± 0.16 <sup>a,2,3</sup>	3.76 ± 0.12 <sup>a,3</sup>	3.77 ± 0.04 <sup>ab,3</sup>	2.58 ± 0.30 <sup>ab,c,1</sup>	3.78 ± 0.07 <sup>a,3</sup>	3.35 ± 0.10 <sup>a,2,3</sup>	3.56 ± 0.01 <sup>c,2,3</sup>	3.34 ± 0.13 <sup>b,2,3</sup>	2.93 ± 0.08 <sup>a,1,2</sup>
Day 7	7 °C	1/2a	8.13 ± 0.00 <sup>b,7</sup>	6.55 ± 0.11 <sup>c,5</sup>	3.50 ± 0.07 <sup>ab,3</sup>	2.97 ± 0.26 <sup>ab,c,1,2</sup>	7.55 ± 0.03 <sup>d,6</sup>	3.03 ± 0.04 <sup>a,1,2,3</sup>	2.83 ± 0.05 <sup>ab,1</sup>	4.59 ± 0.03 <sup>c,4</sup>	3.42 ± 0.13 <sup>b,2,3</sup>
		1/2b	8.19 ± 0.00 <sup>b,5</sup>	5.85 ± 0.20 <sup>b,c,4</sup>	3.79 ± 0.10 <sup>ab,2</sup>	2.80 ± 0.15 <sup>ab,c,1</sup>	7.75 ± 0.01 <sup>d,5</sup>	3.36 ± 0.09 <sup>a,2</sup>	2.58 ± 0.10 <sup>a,1</sup>	4.66 ± 0.10 <sup>c,3</sup>	3.77 ± 0.09 <sup>b,2</sup>
		1/2c	7.90 ± 0.00 <sup>b,6</sup>	5.57 ± 0.39 <sup>b,4</sup>	3.37 ± 0.05 <sup>ab,2</sup>	2.48 ± 0.00 <sup>ab,c,1</sup>	6.53 ± 0.10 <sup>b,5</sup>	2.99 ± 0.04 <sup>a,1,2</sup>	2.73 ± 0.13 <sup>ab,1,2</sup>	4.57 ± 0.05 <sup>c,3</sup>	3.37 ± 0.05 <sup>b,2</sup>
		4b	8.08 ± 0.00 <sup>b,5</sup>	6.57 ± 0.32 <sup>c,4</sup>	4.27 ± 0.18 <sup>b,2,3</sup>	3.30 ± 0.49 <sup>b,c,d,1</sup>	6.96 ± 0.05 <sup>c,4</sup>	3.39 ± 0.08 <sup>a,1,2</sup>	3.62 ± 0.03 <sup>c,1,2</sup>	4.83 ± 0.05 <sup>c,2,3</sup>	3.79 ± 0.12 <sup>b,1,2</sup>
Day 7	15 °C	1/2a	9.95 ± 0.03 <sup>d,7</sup>	10.32 ± 0.05 <sup>d,8</sup>	7.30 ± 0.08 <sup>e,4</sup>	4.22 ± 0.08 <sup>d,e,1</sup>	9.91 ± 0.00 <sup>e,7</sup>	8.07 ± 0.12 <sup>e,5</sup>	6.98 ± 0.06 <sup>d,3</sup>	8.84 ± 0.07 <sup>d,e,6</sup>	6.69 ± 0.01 <sup>c,2</sup>
		1/2b	9.46 ± 0.02 <sup>c,5</sup>	9.70 ± 0.10 <sup>d,5</sup>	7.09 ± 0.21 <sup>c,2</sup>	4.34 ± 0.40 <sup>c,d,e,1</sup>	10.06 ± 0.01 <sup>e,5</sup>	7.95 ± 0.09 <sup>c,3</sup>	7.27 ± 0.05 <sup>e,2</sup>	8.71 ± 0.02 <sup>d,4</sup>	6.76 ± 0.02 <sup>c,2</sup>
		1/2c	9.62 ± 0.06 <sup>c,d,5</sup>	9.56 ± 0.09 <sup>d,5</sup>	6.92 ± 0.09 <sup>e,2</sup>	3.44 ± 0.06 <sup>e,1</sup>	9.83 ± 0.04 <sup>e,5</sup>	7.52 ± 0.02 <sup>b,3</sup>	6.69 ± 0.08 <sup>d,2</sup>	8.92 ± 0.03 <sup>d,e,4</sup>	6.79 ± 0.00 <sup>c,2</sup>
		4b	9.57 ± 0.05 <sup>c,d,4,5</sup>	10.33 ± 0.40 <sup>d,6</sup>	6.93 ± 0.07 <sup>c,2</sup>	3.42 ± 0.05 <sup>c,d,e,1</sup>	9.97 ± 0.02 <sup>e,5</sup>	7.82 ± 0.06 <sup>b,c,3</sup>	6.84 ± 0.06 <sup>d,e,2</sup>	9.08 ± 0.00 <sup>e,4</sup>	6.68 ± 0.05 <sup>c,2</sup>

<sup>a</sup> 0.98C: basic medium; 0.96G: 0.98C+11% glycerol; 0.94G: 0.98C+16% glycerol; 0.92G: 0.98C+23% glycerol; 0.96S: 0.98C+4% NaCl; 0.94S: 0.98C+9% NaCl; 0.92S: 0.98C+12% NaCl; 0.94M: 0.98C+7% glycerol+4% NaCl; 0.92M: 0.98C+15% glycerol+4% NaCl. Within a column (for each batch), different superscript letters denote significant differences (P ≤0.05). Within a row (for each serotype), different superscript number denote significant differences (P ≤0.05). The results are presented as mean of counts (Log cfu) ± standard error.

The two virulence genes (*hly* and *iap*) showed higher expression at 15 °C than at 7 °C, while the *plcA* gene was more expressed at 7 °C than at 15 °C (Figure 1). Significant differences between the gene expression profiles of the four *L. monocytogenes* serotypes due to the incubation temperature were also observed. Thus, different virulence patterns of *L. monocytogenes* could be expected based on the processing or storage temperature of the hams.

The presence of NaCl also affected *L. monocytogenes* virulence and stress response depending on the  $a_w$ ; showing some transcriptional level profile differences between serotypes, especially among the serotype 4b and the remaining ones. These results agree with those reported by Schrama et al. (2013) and Olesen et al. (2010) who reported that the virulence of *L. monocytogenes* in presence of salt is strain-dependent. At 15 °C the expression of the *sigB* gene was stimulated at moderate NaCl concentrations and  $a_w$  conditions (0.96S). In previous works, it has been asserted that exposure of this pathogen to 3% NaCl ( $\approx 0.96-0.97 a_w$ ) induces the activity of the alternative sigma factor  $\sigma^B$  (encoded by the *sigB* gene) (Kazmierczak et al., 2003; Olesen et al., 2010). Thus, the expression of non-stress-related genes such as virulence genes could be repressed and then the transcription of stress-related genes such as the *sigB* gene may be activated to facilitate the *L. monocytogenes* survival in stressful environments caused by  $a_w$  conditions (Mataragas et al., 2015). Besides, Liu et al. (2014a) also demonstrated an overexpression of the *sigB* gene in hams with 2.35% of NaCl. In the present work, at the lowest  $a_w$  values achieved only with the addition of NaCl (0.94S and 0.92S batches), a lower expression of both virulence and stress-related *sigB* genes was found. Probably, at these conditions filamentation of *L. monocytogenes* is happening (Liu et al., 2014b), which it might justify its higher growth and its lower gene expression levels. Thus, when  $a_w$  (0.94-0.92) is slightly higher than the limit of growth of *L. monocytogenes* which it could happen in salting, post-salting and storage of sliced and packaged ham, the expression of *L. monocytogenes* might depend on the  $a_w$  and how it has been reached (presence of NaCl). Therefore, when the  $a_w$  of the ham is mainly reduced by drying, as occur in hams with low salt content (2.5-3% NaCl), the growth of *L. monocytogenes* could decrease at  $a_w$  values slightly upper of its limit of growth (0.92), but an overexpression of its virulence genes can be found.

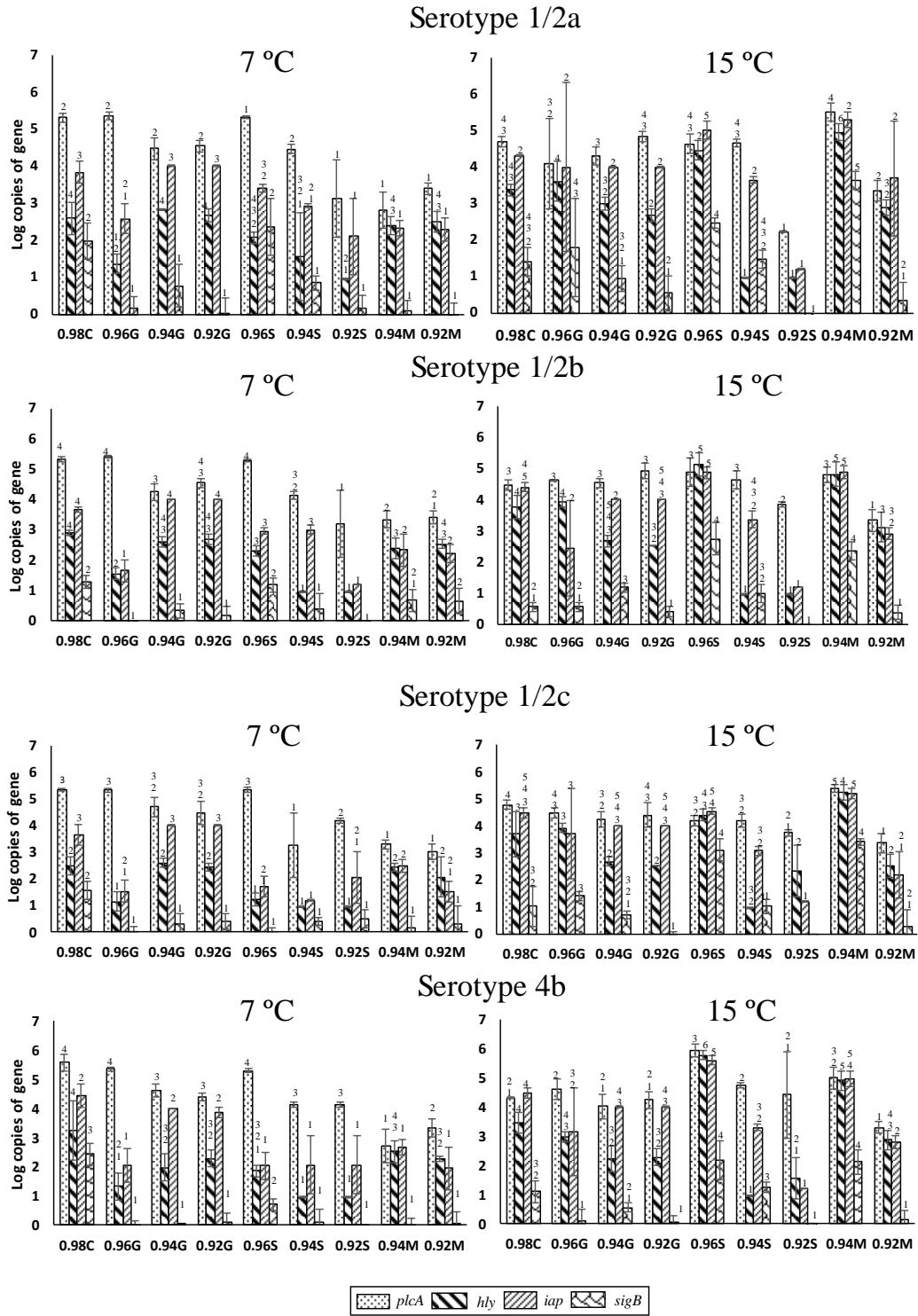


Figure 1. Absolute expression values (Log copies of gene) of the virulence (*plcA*, *hly* and *iap*) and stress-related (*sigB*) genes for the serotypes 1/2a, 1/2b, 1/2c and 4b of *Listeria monocytogenes* on meat-based agar incubated at 7 °C and 15 °C for 7 days. Batches: 0.98C: basic medium; 0.96G: 0.98C+11% glycerol; 0.94G: 0.98C+4% NaCl; 0.92G: 0.98C+23% glycerol; 0.96S: 0.98C+4% NaCl; 0.94S: 0.98C+9% NaCl; 0.92S: 0.98C+12% NaCl; 0.94M: 0.98C+7% glycerol+4% NaCl; 0.92M: 0.98C+15% glycerol+4% NaCl. Within column, different superscript number denotes significant differences for the same gene in each batch ( $P \leq 0.05$ ).

In conclusion, although further studies are needed to evaluate the influence of competing microorganisms coexisting in dry-cured ham on *L. monocytogenes* survival and



gene expression, the presence of moderate levels of NaCl in a meat-based model system at  $a_w$  values above the limit of the growth of *L. monocytogenes* (0.94-0.92  $a_w$ ) stimulates the growth of this pathogen. However, the expression of the virulence and the stress-related *sigB* genes is repressed at these conditions. This information may be useful to design preventive actions based in temperature,  $a_w$  and salt content of hams to minimise risk associated with growth and virulence gene expression of *L. monocytogenes* throughout salting and post-salting stages or during storage of sliced dry-cured ham. The expression of such genes under industry relevant conditions in conjunction with growth analysis is useful information to assess potential risk in dry-cured ham.

**Supplementary material**  
**Real-time PCR reactions**

- **Primers and probe sequences and thermal cycling conditions**

Primer and probe sequences and thermal cycling conditions used for the TaqMan<sup>®</sup> real-time PCR assays are included in Table S1.

Table S1. Nucleotide sequences of primers and probe used for real-time PCR assays designed.

Genes	Primers and probes	Sequences (5'-3')	Amplicon sizes (bp)	Primers and probes concentrations (nM)	Thermal cycling conditions	References
<i>plcA</i>	<i>plcA</i> -F	CTAGAAGCAGGAATACGGT ACA	115	300	95 °C-1 min; 55 °C-1 min	Rantsiou et al., (2012b)
	<i>plcA</i> -R	ATTGAGTAATCGTTTCTAAT [HEX]-		300		
	<i>plcA</i> Probe	AATTTATTTAAATGCATCAC TTTCAGGT-[TAMRA]		200		
<i>hly</i>	<i>hly</i> -Qfa	CATGGCACCACCAGCATCT	64	450	95 °C-1 min; 60 °C-1 min	Rodríguez- Lázaro et al. (2004)
	<i>hly</i> -Qra	ATCCGCGTGTTCCTTTTCGA [HEX]-		450		
	<i>hly</i> probe	CGCCTGCAAGTCCTAAGAC GCCA-[TAMRA]		100		
<i>iap</i>	<i>iap</i> -QFa	AATCTGTTAGCGCAACTGG TTAA	78	300	95 °C-1 min; 60 °C-1 min	Rodríguez- Lázaro et al. (2004)
	<i>iap</i> -QRa	CACCTTTGATGGACGTAATA ATACTGTT [HEX]-		300		
	<i>iap</i> probe	CAACACCAGCGCCACTACG GACG-[TAMRA]		3000		
<i>sigB</i>	<i>sigB</i> -f	CCAAGAAAATGGCGATCAA GAC	166	300	95 °C-1 min; 60 °C-1 min	Rantsiou et al. (2012b)
	<i>sigB</i> -r	CGTTGCATCATATCTTCTAA TAGCT [HEX]-		300		
	<i>sigB</i> probe	TGTTCAATACAAAAACCTAG TAGAGTCCAT-[TAMRA]		300		

The optimized TaqMan<sup>®</sup> protocols were carried out in a final volume of 12.5µL, containing 2.5µL of cDNA templates, 7µL of Premix ExTaq<sup>™</sup> (Takara Bio Inc.), 0.125µL of 50x ROX<sup>™</sup> Reference Dye (Takara Bio Inc.) and different concentrations of the corresponding primers and probes (Table S1).

IV. 5. EVALUATION OF THE EFFICACY OF  
*Debaryomyces hansenii* AS PROTECTIVE CULTURE FOR  
CONTROLLING *Listeria monocytogenes* IN SLICED DRY-  
CURED HAM.

**Abstract**

The anti-*Listeria monocytogenes* activity of 30 *Debaryomyces hansenii* strains was evaluated to be used as protective cultures in sliced dry-cured ham. Some of the yeast strains exhibited inhibitory potential against the *L. monocytogenes* strains S2, S4-2, S12-1 and S7-2 belonging to the serotypes 1/2a, 1/2b, 1/2c and 4b, respectively, when they were co-inoculated in a dry-cured ham-based medium at 0.95 and 0.93 water activity ( $a_w$ ). The antagonistic activity varied with the yeast and bacterium strains and the  $a_w$ . The most active strain (*D. hansenii* 258H) was selected for assessing its activity on slices of dry-cured ham. *D. hansenii* 258H showed a limited action and even a promotion of the *L. monocytogenes* growth in the slices of dry-cured ham. In addition, the upregulation of some key virulence genes of *L. monocytogenes* and the unsuitability appearance on the slices of dry-cured ham inoculated with *D. hansenii* 258H suggest that such yeast is not a good candidate to be used as protective culture against *L. monocytogenes* in sliced dry-cured ham. Such effect should be considered even if *D. hansenii* is not used as a protective culture due to its presence as native microbial population in dry-cured ham.

## 1. Introduction

*Listeria monocytogenes* is a pathogenic bacterium causing listeriosis, a severe disease in humans, and one of the most significant foodborne diseases in industrialised countries (Schlech & Acheson, 2000). The ability of *L. monocytogenes* to survive at a threatening level in food during their cold storage as well as in a wide range of pH (between 4.0 and 9.6), high salt concentration (up to 16%) and low water activity ( $a_w$ ) values (up to 0.90  $a_w$ ) (EURL Lm, 2019) is a serious concern for the meat industry and concretely for the processing of dry-cured ham. During the ripening of this meat product, the growth of *L. monocytogenes* is controlled by the  $a_w$  decrease (usually below 0.90  $a_w$ ) and NaCl content (around 4%). Nonetheless, dry-cured ham may be re-contaminated with this pathogenic bacterium throughout the post-ripening stages of deboning, slicing and packaging, thus being the sliced dry-cured ham a potential vehicle for *L. monocytogenes* (Bover-Cid, Belletti, Aymerich, & Garriga, 2015). It has to be taken into account that the  $a_w$  values found in sliced and vacuum-packaged dry-cured ham are often higher than 0.92  $a_w$  (Hereu, Bover-Cid, Garriga, & Aymerich, 2012). Furthermore, the hygienic strategies followed during deboning, slicing and packaging to avoid the contamination and subsequent growth of *L. monocytogenes* do not guarantee its absence in the final product (Gilbert, Lake, Hudson, & Cressey, 2009). Therefore, due to the fact that sliced dry-cured ham is a ready-to-eat (RTE) product, which is commonly eaten without further cooking (Uma, Muthulakshmi, & Kumar, 2018), *L. monocytogenes* is considered one of the main hazards associated with such product. Accordingly, new approaches should be implemented for controlling *L. monocytogenes* during the storage of sliced dry-cured ham. Biopreservation has been described as a promising approach for controlling *L. monocytogenes* and thus improving food safety. Concretely, *Debaryomyces hansenii*, the most commonly encountered yeast in dry-cured ham (Núñez, Rodríguez, Córdoba, Bermúdez, & Asensio, 1996b), has been proposed as protective culture against toxigenic moulds in such product (Andrade, Thorsen, Rodríguez, Córdoba, & Jespersen, 2014; Peromingo, Núñez, Rodríguez, Alía, & Andrade, 2018; Simoncini, Virgili, Spadola, & Battilani, 2014). Furthermore, *D. hansenii* has been traditionally included in the list of biological agents recommended for Qualified Presumption of Safety (EFSA BIOHAZ Panel et al., 2017) and its beneficial effects on the sensorial characteristics of dry-cured meat products have been demonstrated (Andrade, Córdoba, Casado, Córdoba, & Rodríguez, 2010; Cano-García, Flores, & Belloch, 2013; Martín, Córdoba, Aranda, Córdoba, & Asensio, 2006).

Although the *D. hansenii* effect against bacteria such as *Staphylococcus aureus*, *Clostridium tyrobutyricum*, *Clostridium butyricum* and *L. monocytogenes* has been also reported (Fatichenti, Bergere, Deiana, & Farris, 1983; Goerges, Aigner, Silakowski, & Scherer, 2006; Goerges et al., 2011; Meisel, Gehlen, Fischer, & Hammes, 1989; Zhao, Doyle, & Zhao, 2004), there is no available information about its role as protective culture against *L. monocytogenes* in dry-cured ham.

Additionally, it should be considered that the intracellular parasitism of *L. monocytogenes* requires the coordinated expression of several genes encoding its virulence factors, such as the *plcA*, *hly* and *iap* genes (Rolhion & Cossart, 2017). The transcriptional response of *L. monocytogenes* under a variety of pH,  $a_w$  or temperature conditions (Alía, Rodríguez, Andrade, Gómez, & Córdoba, 2019b; Hadjilouka et al., 2016) or upon exposure to natural antimicrobial extracts derived from plants (Hadjilouka et al., 2017; Pieta et al., 2017; Upadhyay et al., 2012) has been reported. The presence of protective cultures could also result in changes in the *L. monocytogenes* virulence gene expression and, subsequently, in alterations of its viability and virulence (Garner, James, Callahan, Wiedmann, & Boor, 2006; Kang, Burall, Mammel, & Datta, 2019; Lin, Wang, Tsai, & Chou, 2010; Olesen, Thorsen, & Jespersen, 2010; Olesen, Vogensen, & Jespersen, 2009; Upadhyay et al., 2012).

This study aimed to evaluate the *in vitro* anti-*L. monocytogenes* activity of *D. hansenii* to select its active strains as protective cultures. The *D. hansenii* strain with a noteworthy anti-*L. monocytogenes* activity was then chosen to evaluate its effect on the *L. monocytogenes* growth and the expression of some of its virulence genes in commercial slices of dry-cured ham. The impact of *D. hansenii* on the sensorial characteristics of dry-cured ham slices was finally evaluated.

## **2. Materials and Methods**

### **2.1. Culture media**

Yeast Extract Sucrose (YES) broth contained 20 g/L of yeast extract (LabKem, Spain) and 125 g/L of D (+)-Saccharose (LabKem). YES agar was prepared by adding 20 g/L of bacteriological agar (Conda, Spain) to YES broth. Brain Heart Infusion (BHI; Scharlab

S.L., Spain) broth and CHROMagar™ *Listeria* (CHROMagar, France) were prepared according to the manufacturers' instructions. Peptone water contained 10 g/L of bacteriological peptone (Conda).

Dry-cured ham-based medium was prepared according to Rodríguez, Medina, Córdoba, & Magan (2014). The  $a_w$  of the basic medium was modified to 0.95 and 0.93  $a_w$  by adding 12% (v/v) and 18% (v/v) of glycerol (Fisher Scientific, USA), respectively, in order to reach the  $a_w$  conditions that can be found in sliced dry-cured ham. The pH of the medium was adjusted to 6 for simulating that of dry-cured ham. The  $a_w$  and pH of the medium were measured at the beginning and at the end of the experiments using an  $a_w$  meter (Novasina AG, Switzerland) and a pH meter (Crison, Spain), respectively.

## 2.2. Preparation of inocula

Thirty strains of *D. hansenii* isolated from dry-cured ham (Andrade, Rodríguez, Casado, Bermúdez, & Córdoba, 2009b) were screened for their anti-*L. monocytogenes* activity. Four *L. monocytogenes* strains isolated from meat industry supplied by the National Institute for Agricultural and Food Research and Technology (INIA, Spain) were used: S2, S4-2, S12-1 and S7-2. Such *L. monocytogenes* strains had been previously assigned to the serotypes 1/2a, 1/2b, 1/2c and 4b, respectively. For preparing working cultures, *L. monocytogenes* was consecutively grown twice in BHI broth at 37 °C for 24 h each. The concentration of the fresh cultures was adjusted to 3 Log cfu/mL and used as inoculum. Yeasts were inoculated in YES broth and incubated under shaking (200 rpm) for 2 days at 25 °C. The yeast suspensions were then quantified using a Thoma counting chamber (Blaubrand®, Brand, Germany) and diluted to obtain levels of 6 and 3 Log cfu/mL depending on the experiments.

The actual sizes of the *L. monocytogenes* and *D. hansenii* inocula were determined by plating on CHROMagar™ *Listeria* and YES agar, respectively.

### **2.3. Evaluation of the anti-*L. monocytogenes* activity of *D. hansenii***

#### **2.3.1. In vitro assessment in a dry-cured ham-based medium**

The antagonistic activity of the 30 yeast strains was firstly tested against the strain S7-2 of *L. monocytogenes*. Fifty  $\mu\text{L}$  containing 3 Log cfu/mL of *L. monocytogenes* and 6 Log cfu/mL of each yeast were spread over the surface of the dry-cured ham-based medium. The 4 *D. hansenii* strains showing the highest anti-*L. monocytogenes* activity at both  $a_w$  values were selected to evaluate their effect against the remaining strains of *L. monocytogenes*. Since it was wanted to evaluate the anti-*L. monocytogenes* activity of yeasts at the same concentration tested for the bacterium, 50  $\mu\text{L}$  containing 3 Log cfu/mL of *L. monocytogenes* and 3 Log cfu/mL of *D. hansenii* were spread on the dry-cured ham-based medium. A control batch containing only *L. monocytogenes* was also prepared in both *in vitro* assays. All the batches from both experiments were incubated at 7 °C for 10 days. The *L. monocytogenes* and yeast enumeration was then carried out. The assays were conducted in triplicate.

#### **2.3.2. Assessment in slices of dry-cured ham**

Slices of commercial non-sterile dry-cured ham with a cut surface of 16 cm<sup>2</sup> and 0.90  $a_w$  were aseptically prepared. They were treated with 70% (v/v) ethanol (Scharlab S.L.) and UV radiation during 30 min in a laminar flow cabinet (Telstar, Japan). In order to simulate the conditions found in sliced dry-cured ham, the slices were immersed in ultra-pure sterilised water for 2.5 min and 1.5 min to reach 0.95 and 0.93  $a_w$ , respectively. The slices were then separately placed in pre-sterilised receptacles where the relative humidity was kept constant at 95% and 93% after a vapour-liquid equilibrium by 12% (v/v) and 18% (v/v) glycerol solutions, respectively.

The dry-cured ham slices were individually inoculated with 100  $\mu\text{L}$  containing 3 Log cfu/mL of each *L. monocytogenes* strain. *D. hansenii* 258H, the strain showing the most appropriate antagonistic activity against all the tested *L. monocytogenes* strains in the previous assays, was then added to obtain levels of 3 Log cfu/mL. A control batch containing only *L. monocytogenes* was also prepared. The experiment was conducted in triplicate.



All the batches were kept at 7 °C for 10 days. The  $a_w$  of the dry-cured ham slices were measured at the beginning and at the end of the experiment. The *L. monocytogenes* and yeast levels and the changes in the expression of some key virulence genes of *L. monocytogenes* resulting from the exposure to *D. hansenii* were also checked.

#### **2.4. Enumeration of *L. monocytogenes* and antagonistic yeasts**

At the end of the incubation period, samples (dry-cured ham-based medium or slices of dry-cured ham) were homogenised with 30 mL of peptone water. Serial dilutions were then made, and *L. monocytogenes* and *D. hansenii* levels were determined by spreading 0.1 mL of the serial dilutions on CHROMagar™ Listeria and YES agar, respectively. Their incubation was performed for 24-48 h at 37 °C for *L. monocytogenes* and for 72 h at 25 °C for yeasts.

The changes in the *L. monocytogenes* population due to the presence of yeasts were calculated as the difference between the bacterium levels in the co-inoculated batch and its levels in the control batch containing only *L. monocytogenes* at day 10 of incubation and expressed as Log cfu.

#### **2.5. Evaluation of the relative transcription levels of *L. monocytogenes* virulence genes in the presence of *D. hansenii* in slices of dry-cured ham**

One mL collected after homogenising the inoculated slices of dry-cured ham in peptone water (section 2.4) was used for RNA extraction according to the instructions of the MasterPure™ Complete DNA and RNA purification kit (Epicentre, USA). To remove genomic DNA contamination, RNA samples were treated with RNase-Free DNase I (Epicentre). RNA concentration and purity ( $A_{260/280}$ ) were then measured using the Nanodrop™ (Thermo Fisher Scientific, USA). cDNA synthesis was performed using about 500 ng of the total RNA according to the PrimeScript™ RT Reagent Kit (Takara Bio Inc., Japan). Real-time quantitative PCR (qPCR) was set up using previously designed primers for the *plcA*, *hly*, *iap* and 16S genes (Table 1). The ViiA™ 7 system (Applied Biosystems) was used for qPCR performance. The reactions were prepared in MicroAmp® Fast Optical 96-Well Reaction Plates (Applied Biosystems, USA).

Table 1. Real-time quantitative PCR (qPCR) mixes and conditions used for gene expression analysis.

Genes	Primers	Volumes (µL)				Primer concentrations (nM)	qPCR conditions	References
		H <sub>2</sub> O	SYBR® Green <sup>a</sup>	ROX <sup>b</sup>	MgCl <sub>2</sub>			
<b>Target genes</b>								
<i>plcA</i>	plcA_f	2.875	6.25	0.125	-	2.5	300	Rantsiou et al. (2012)
	plcA_r						300	
<i>hly</i>	hlyQF	1.75	6.25	0.125	0.75	2.5	450	Rodríguez-Lázaro et al. (2004)
	hlyQR						450	
<i>iap</i>	iapQF	2.875	6.25	0.125	-	2.5	300	Rodríguez-Lázaro et al. (2004)
	iapQR						300	
<b>Reference genes</b>								
16S	16S-F	2.875	6.25	0.125	-	2.5	300	Alfa et al. (2019a)
	16S-R						300	

<sup>a</sup>SYBR Green Premix Ex Taq™ (Takara Bio Inc); <sup>b</sup>50X ROX™ Reference Dye (Takara Bio Inc.).

Three replicates of RNA from control samples (only *L. monocytogenes*) and template-free negative controls (ultra-pure water instead of cDNA) were also included in the runs. After the final PCR cycle, the specific binding of SYBR<sup>®</sup> Green to the amplicon was tested by analysing the melting curve of the PCR products performed by heating from 60 to 95 °C. The melting temperature ( $T_m$ ) and threshold cycle ( $C_t$ ) were automatically calculated by the instrument. The relative expression of the *hly*, *plcA* and *iap* genes was then quantified using 16S as the reference gene for normalising the quantification of the target mRNA to avoid errors caused by the addition of different amounts of total cDNA to each reaction. The expression ratio was calculated as described by Livak and Schmittgen (2001) after checking that the requirements to use such method were fulfilled.

The calibrator corresponded to the control batch of the dry-cured ham slices containing only *L. monocytogenes* after 10 days of incubation.

## 2.6. Sensorial analysis

Sensorial evaluation of dry-cured ham slices inoculated with 100  $\mu$ L containing 3 Log cfu/mL of *D. hansenii* 258H was performed. The samples were incubated at 7 °C and 0.95 and 0.93  $a_w$  (section 2.3.2) for 10 days. Non-inoculated slices of dry-cured ham incubated at the same conditions of the inoculated ones were used as control.

All the slices of dry-cured ham were evaluated by a panel of untrained panellists selected among students and staff of the Meat and Meat Products Research Institute at the University of Extremadura. Each panellist participated in two hedonic tests with 4 samples each. Samples were coded with its own 3-digit random numbers.

The samples were visually evaluated for acceptability using a 5-point hedonic scale (Martínez, Santa Cruz, Hough, & Vega, 2002). The intensity of yeast odour (associated with fermenting yeasts) (Sánchez-Molinero & Arnau, 2008) was also evaluated by using a 6-point hedonic scale (1 = high, 6 = low). The results were expressed as percentage of panellists who selected each point in the scales.

## 2.7. Statistical analysis

Statistical analyses were performed using the software IBM SPSS Statistics for Windows v. 22.0 (IBM, USA) setting the statistical significance at  $P \leq 0.05$ .

## 3. Results and discussion

### 3.1. Effect of *D. hansenii* strains on the growth of *L. monocytogenes* in a dry-cured ham-based medium

In general, the population of both *D. hansenii* and the *L. monocytogenes* strains increased throughout the incubation time in the dry-cured ham-based medium. After 10 days at 7 °C, *L. monocytogenes*' population was in the range of 5-6 Log cfu at 0.95  $a_w$  and of 3-4 Log cfu at 0.93  $a_w$ , being significantly higher ( $P \leq 0.05$ ) at 0.95  $a_w$  than at 0.93  $a_w$  in all cases. A low inhibitory potential of *D. hansenii* against *L. monocytogenes* S7-2 was observed and varied among yeast strains and  $a_w$  (Table 2). Besides, the highest inhibition was found at 0.93  $a_w$ , which could be due to the fact that the  $a_w$  of the dry-cured ham-based medium was close to the limit of the bacterium growth (Nolan, Chamblin, & Troller, 1992; Vermeulen et al., 2007). At 0.95  $a_w$  8 *D. hansenii* strains (26.6%) showed a reduction of the *L. monocytogenes* population ranging between 0.08 and 0.32 Log cfu (Table 2). Regarding 0.93  $a_w$ , 11 *D. hansenii* strains (36.6%) showed a decrease in the population of *L. monocytogenes* ranging between 0.02 and 0.84 Log cfu (Table 2). Similarly, *D. hansenii* strains from dairy products only caused a limited reduction of the *L. monocytogenes* growth (Goerges et al., 2006, 2011; Hatoum, Labrie, & Fliss, 2013).

Due to their highest antagonistic effect against *L. monocytogenes* at both tested  $a_w$ , the strains 74P, 163P, 213H and 258H of *D. hansenii* were selected for further evaluation in the presence of the strains S2, S4-2 and S12-1 of *L. monocytogenes*. The results showed that the antagonistic activity depended on the yeast strain, the *L. monocytogenes* strain and the  $a_w$  of the medium (Figure 1).

## RESULTADOS

Table 2. Change in the population of the strain S7-2 of *Listeria monocytogenes* in the presence of 30 *Debaryomyces hansenii* strains in relation to the control (value=0) in a dry-cured ham-based medium at 0.95 and 0.93 water activity ( $a_w$ ) after 10 days of incubation at 7 °C. The *D. hansenii* population at the end of the incubation period is also included.

Yeast strains	Change in the population (Log cfu) <sup>a</sup>		Yeast counts (Log cfu)	
	0.95 $a_w$	0.93 $a_w$	0.95 $a_w$	0.93 $a_w$
6P	0.06 ± 0.02 <sup>G,H,I,J</sup>	-0.11 ± 0.02 <sup>I,J</sup>	8.87 ± 0.02	8.29 ± 0.01
7P	0.93 ± 0.06 <sup>A,B</sup>	0.32 ± 0.02 <sup>A,B,C,D</sup>	8.68 ± 0.05	8.28 ± 0.01
11P	0.65 ± 0.09 <sup>C,D,E</sup>	-0.13 ± 0.02 <sup>I,J</sup>	7.32 ± 0.16	7.89 ± 0.03
42P	0.09 ± 0.05 <sup>G,H,I,J</sup>	-0.84 ± 0.03 <sup>L</sup>	8.59 ± 0.02	7.97 ± 0.02
58P	0.05 ± 0.02 <sup>G,H,I</sup>	0.36 ± 0.06 <sup>A,B,C</sup>	8.30 ± 0.01	8.35 ± 0.01
63P	0.89 ± 0.02 <sup>A,B,C</sup>	0.03 ± 0.06 <sup>F,G,H,I</sup>	8.65 ± 0.09	8.30 ± 0.01
69P	0.02 ± 0.06 <sup>G,H,I,J,K</sup>	0.46 ± 0.01 <sup>A,B</sup>	8.69 ± 0.02	8.49 ± 0.02
71P	0.21 ± 0.04 <sup>G,H</sup>	-0.11 ± 0.05 <sup>I,J</sup>	8.32 ± 0.05	7.88 ± 0.04
74P	-0.10 ± 0.04 <sup>I,J,K,L</sup>	-0.28 ± 0.12 <sup>J</sup>	8.26 ± 0.03	7.88 ± 0.04
78P	0.99 ± 0.08 <sup>A,B</sup>	0.13 ± 0.03 <sup>D,E,F,G,H</sup>	8.13 ± 0.01	8.41 ± 0.01
122P	0.59 ± 0.12 <sup>D,E</sup>	0.28 ± 0.00 <sup>B,C,D</sup>	9.36 ± 0.01	8.47 ± 0.01
125P	-0.08 ± 0.05 <sup>H,I,J,K,L</sup>	0.19 ± 0.03 <sup>C,D,E,F,G</sup>	8.55 ± 0.08	8.59 ± 0.01
130P	0.49 ± 0.08 <sup>E,F</sup>	-0.11 ± 0.06 <sup>I,J</sup>	7.25 ± 0.04	7.87 ± 0.02
133P	1.08 ± 0.09 <sup>A</sup>	-0.05 ± 0.05 <sup>H,I</sup>	8.05 ± 0.02	8.12 ± 0.02
151P	1.02 ± 0.07 <sup>A,B</sup>	0.14 ± 0.02 <sup>D,E,F,G,H</sup>	7.28 ± 0.09	8.89 ± 0.02
152P	-0.20 ± 0.01 <sup>J,K,L</sup>	0.03 ± 0.02 <sup>F,G,H,I</sup>	8.79 ± 0.03	9.51 ± 0.01
156P	0.97 ± 0.03 <sup>A,B</sup>	0.13 ± 0.03 <sup>D,E,F,G,H</sup>	7.34 ± 0.03	8.59 ± 0.02
159P	0.77 ± 0.14 <sup>B,C,D</sup>	0.51 ± 0.02 <sup>A</sup>	7.29 ± 0.07	8.41 ± 0.01
163P	-0.18 ± 0.03 <sup>J,K,L</sup>	-0.30 ± 0.02 <sup>J</sup>	8.79 ± 0.02	8.05 ± 0.03
178H	0.49 ± 0.02 <sup>E,F</sup>	0.05 ± 0.05 <sup>E,F,G,H,I</sup>	8.62 ± 0.01	8.09 ± 0.01
184H	0.01 ± 0.03 <sup>G,H,I,J,K</sup>	0.03 ± 0.04 <sup>F,G,H,I</sup>	8.60 ± 0.00	8.60 ± 0.01
196H	-0.32 ± 0.02 <sup>L</sup>	0.04 ± 0.00 <sup>E,F,G,H,I</sup>	8.74 ± 0.02	9.20 ± 0.00
212H	0.24 ± 0.06 <sup>F,G</sup>	0.00 ± 0.00 <sup>G,H,I</sup>	8.63 ± 0.01	7.92 ± 0.02
213H	-0.25 ± 0.02 <sup>K,L</sup>	-0.02 ± 0.05 <sup>G,H,I</sup>	8.22 ± 0.07	7.12 ± 0.04
217H	0.25 ± 0.02 <sup>F,G</sup>	0.35 ± 0.03 <sup>A,B,C</sup>	8.54 ± 0.08	8.11 ± 0.01
221H	0.06 ± 0.06 <sup>G,H,I,J</sup>	0.22 ± 0.02 <sup>C,D,E,F</sup>	8.76 ± 0.02	8.20 ± 0.01
223H	0.09 ± 0.04 <sup>G,H,I,J</sup>	0.22 ± 0.02 <sup>C,D,E,F</sup>	8.77 ± 0.02	8.36 ± 0.01
229H	0.19 ± 0.01 <sup>G,H,I</sup>	-0.11 ± 0.02 <sup>I,J</sup>	8.49 ± 0.08	8.17 ± 0.02
253H	-0.21 ± 0.03 <sup>J,K,L</sup>	0.24 ± 0.03 <sup>C,D,E</sup>	8.49 ± 0.02	8.54 ± 0.08
258H	-0.31 ± 0.05 <sup>L</sup>	-0.56 ± 0.02 <sup>K</sup>	8.72 ± 0.01	8.87 ± 0.02

The assays were conducted in triplicate. The results are presented as mean of population (log cfu) ± standard error. Different superscript letters denote significant differences ( $P \leq 0.05$ ) within a column. <sup>a</sup>Negative value of change in the population indicates a decrease of the *L. monocytogenes* growth due to the *D. hansenii* presence when compared with its growth in the control treatment at the end of the incubation period.

The strongest anti-*L. monocytogenes* activities were displayed against the strain S7-2, while the weakest one was against the strain S2 (Figure 1). Concretely, none of the yeast, except *D. hansenii* 258H at 0.95  $a_w$  was able to reduce the growth of the strain S2, and some of them promoted it ( $P \leq 0.05$ ; Figure 1). Furthermore, *D. hansenii* 258H showed antagonistic activity against the strains S4-2 and S7-2 at both  $a_w$  and the strain S12-1 at

0.93  $a_w$  (Figure 1). Thus, *D. hansenii* 258H was selected for further evaluation in sliced dry-cured ham.

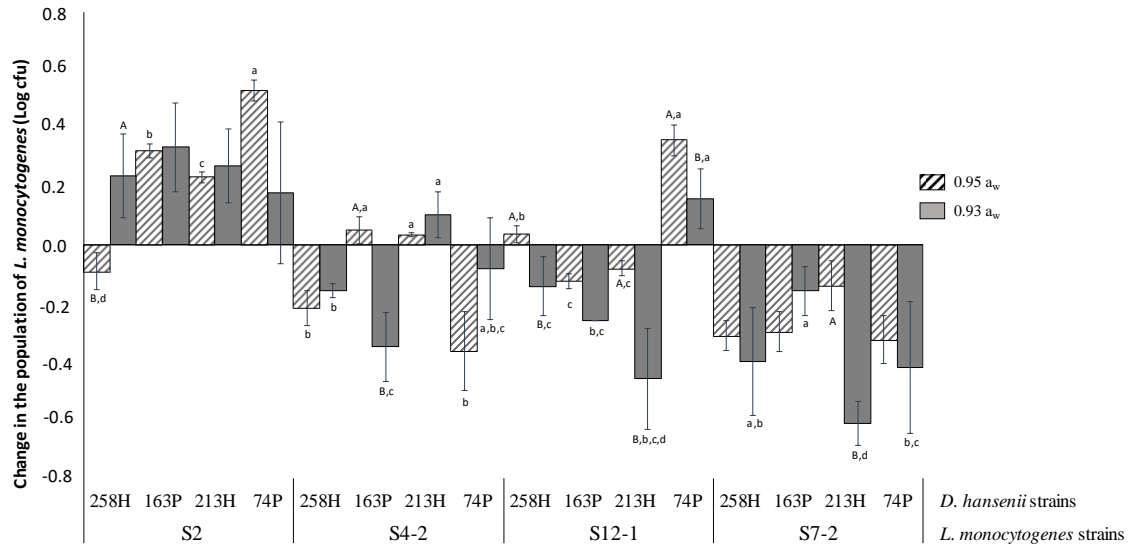


Figure 1. Change in the population of the strains S2, S4-2, S12-1 and S7-2 of *Listeria monocytogenes* in the presence of 4 strains of *Debaryomyces hansenii* (74P, 163P, 213H and 258H) in relation to the control (value=0) in a dry-cured ham-based medium at 0.95 and 0.93 water activity ( $a_w$ ) after 10 days of incubation at 7 °C. The assays were conducted in triplicate. Bars represent the standard deviation of the mean values. Change in the population with different capital letters for the same strain of *L. monocytogenes* and the same yeast strain with different  $a_w$  indicates significant differences ( $P \leq 0.05$ ). Change in the population with different lower case letters for different yeast strains within the same  $a_w$  and strain of *L. monocytogenes* indicates significant differences ( $P \leq 0.05$ ).

### 3.2. Effect of *D. hansenii* 258H on the growth of *L. monocytogenes* in dry-cured ham slices

Generally, the *L. monocytogenes* population in the slices of dry-cured ham was lower than that previously obtained in the dry-cured ham-based medium. Concretely, after 10 days of incubation at 7 °C at 0.95  $a_w$ , the *L. monocytogenes* population was  $5.7 \pm 0.05$ ,  $5.9 \pm 0.01$ ,  $6.1 \pm 0.06$  and  $5.7 \pm 0.01$  Log cfu for the strains S2, S4-2, S12-1 and S7-2, respectively. At 0.93  $a_w$  the *L. monocytogenes* levels were  $2.6 \pm 0.02$ ,  $2.7 \pm 0.04$ ,  $2.7 \pm 0.07$  and  $2.5 \pm 0.06$  Log cfu for the strains S2, S4-2, S12-1 and S7-2, respectively. The final population of *D. hansenii* 258H was  $8.22 \pm 0.02$  Log cfu at 0.95  $a_w$  and of  $9.02 \pm 0.01$  Log cfu at 0.93  $a_w$ . Although an antagonist effect of this yeast strain was observed against the strains S2 and S4-2 of *L. monocytogenes*, a promotion of the growth of the remaining strains was found (Figure 2).

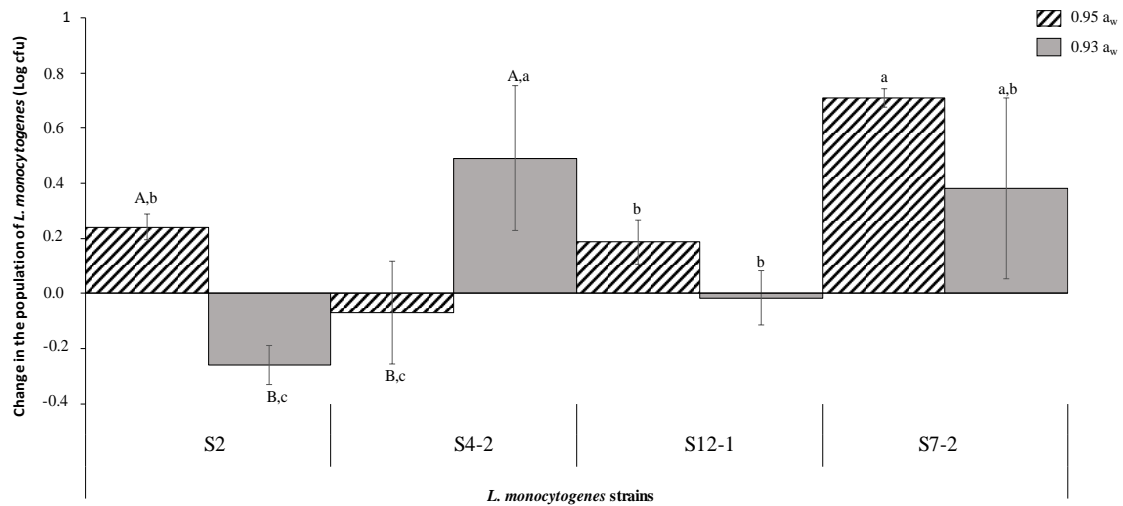


Figure 2. Change in the population of the strains S2, S4-2, S12-1 and S7-2 of *Listeria monocytogenes* in the presence of *Debaryomyces hansenii* 258H in relation to the control (value=0) in dry-cured ham slices at 0.95 and 0.93 water activity ( $a_w$ ) after 10 days of incubation at 7 °C. The assays were conducted in triplicate. Bars represent standard deviation of the mean values. Change in the population with different capital letters in the same strain of *L. monocytogenes* indicates significant differences ( $P \leq 0.05$ ) between both  $a_w$  values. Change in the population with different lower case letters indicates significant differences ( $P \leq 0.05$ ) between the strains of *L. monocytogenes* for the same  $a_w$  value.

Accordingly, a stimulation of the *L. monocytogenes* growth was observed in the previous assay in the dry-cured ham-based medium for most of the non-selected strains of *D. hansenii* (Table 2). The proteolytic activity of *D. hansenii* in dry-cured meat products results in an important myosin and actin hydrolysis and the subsequent peptide and free amino acid generation (Durá, Flores, & Toldrá, 2004; Martín et al., 2006), being this alternative nutrient source derived from the yeast metabolism able to favour the growth of the co-inoculated microorganisms (Mellefont, McMeekin, & Ross, 2008). The hydrolysis of proteins has been also considered a possible reason for the stimulus of the *L. monocytogenes* growth by *Pseudomonas* in milk (Marshall & Schmidt, 1988; Tsigarida, Skandamis, & Nychas, 2000).

### 3.3. Effect of *D. hansenii* on the relative transcription levels of *L. monocytogenes* virulence gene in slices of dry-cured ham

The evaluation of the regulatory and response mechanisms of *L. monocytogenes* is of great importance in order to improve the understanding of its physiology under adverse conditions caused by the presence of interacting microorganisms and thus design effective control strategies (Hadjilouka et al., 2017), since no relationship between growth and such mechanisms is often encountered. This was corroborated in the present study

since weak correlations ( $r$ -values: 0.113, -0.235 and 0.028 for the *hly*, *plcA* and *iap* genes, respectively) were obtained between the *L. monocytogenes* growth and the relative expression of some key virulence genes due to the presence of *D. hansenii*.

In this work, statistical significant differences in the transcription levels due to the co-inoculation with *D. hansenii* were detected, which varied according to the gene, the *L. monocytogenes* strain and the  $a_w$ . The strain S12-1 at 0.95  $a_w$  and the strain S7-2 at 0.93  $a_w$  showed the maximum relative levels of the *hly* gene expression (Figure 3A). The lowest levels of relative expression were obtained for the *plcA* gene (Figure 3B), which was only upregulated in the strains S2 and S4-2 at 0.93  $a_w$  and 0.95  $a_w$ , respectively ( $P \leq 0.05$ ). Regarding the *iap* gene, the highest relative expression levels were found in the strains S4-2 and S12-1 at 0.95  $a_w$  (Figure 3C).

The upregulation of the *hly* and *iap* genes in some strains does not agree with previous studies using anti-*L. monocytogenes* essential oils since they provoked downregulation of the same and other virulence genes (Hadjilouka et al., 2017; Pieta et al., 2017; Upadhyay et al., 2012). Nonetheless, their overexpression was also described by Alía et al. (2019b) when exposing *L. monocytogenes* to osmotic stress. The downregulation of the *plcA* gene observed in most of cases agrees with reported works checking plant-derived extracts (Hadjilouka et al., 2017; Pieta et al., 2017; Upadhyay et al., 2012). Although no particular trend was identified in the studied virulence genes as previously described by Hadjilouka et al. (2016) and Rantsiou, Mataragas, Alessandria, & Cocolin (2012), it seems that the exposure to *D. hansenii* could affect the virulence capacity of *L. monocytogenes*. Previous works have shown the relevance of the virulence gene transcription on the invasive and survival ability of *L. monocytogenes* in humans models or cell lines (Garner et al., 2006; Kang et al., 2019; Lin et al., 2010; Olesen et al., 2009; 2010). These results are of great relevance even if yeasts are not used as protective culture, since *D. hansenii* is present as native microbial population in dry-cured ham.



RESULTADOS

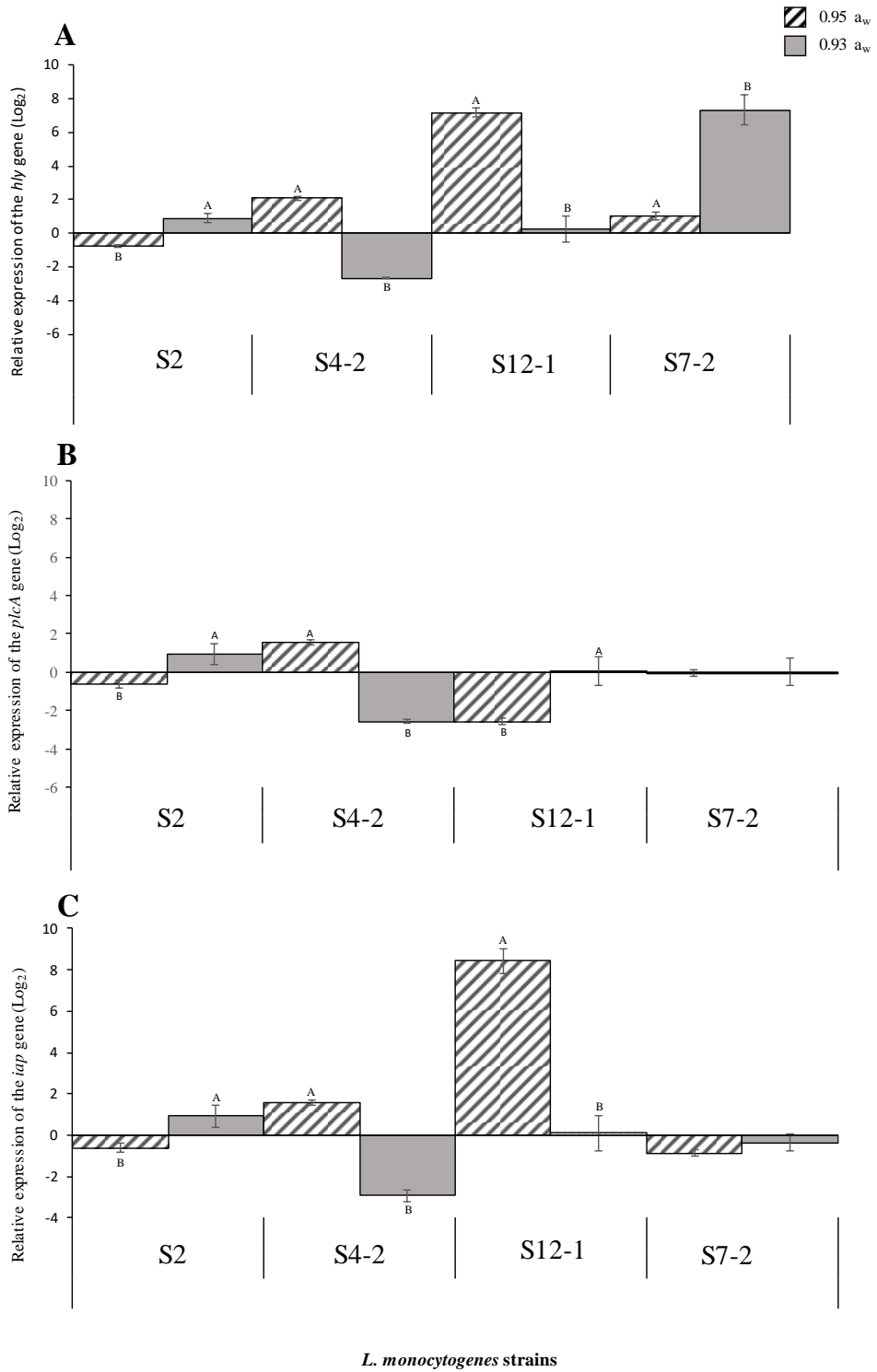


Figura 3. Effect of *Debaryomyces hansenii* 258H on the relative expression of the *hly* (A), *plcA* (B) and *iap* (C) genes of the strains S2, S4-2, S12-1 and S7-2 of *Listeria monocytogenes* in dry-cured ham slices with respect to the calibrator (control batch without yeast, value=0) at 0.95 and 0.93 water activity (a<sub>w</sub>) after incubating 10 days at 7 °C. The assays were conducted in triplicate. Bars represent the standard deviation of the mean values. Mean values of the *hly*, *plcA* and *iap* genes transcription within the same strain of *L. monocytogenes* for different a<sub>w</sub> values with different capital letters indicate significant differences (P ≤ 0.05).

**3.4. Acceptability and odour intensity of slices inoculated with *D. hansenii***

The addition of *D. hansenii* 258H had a significant negative effect on the visual acceptance of the dry-cured ham slices by the panellists ( $P \leq 0.05$ ), since the yeast growth, which was visible in the inoculated slices (Figure 4), was considered unpleasant (Table 3). Nevertheless, no differences were found in the odour of the treated samples with respect to the non-inoculated control samples. This may be because the panellists did not find unpleasant odours between both samples. These results agree with the previously reported positive impact of *D. hansenii* on the volatile compounds profile throughout dry-cured ham ripening (Andrade, Córdoba, Sánchez, Casado, & Rodríguez, 2009a; Martín et al., 2006).

Table 3. Scores for the sensorial analysis of dry-cured ham slices at 0.95 and 0.93 water activity ( $a_w$ ) after no treatment (control) or inoculation with 3 Log cfu/mL of *Debaryomyces hansenii* (treated) after 10 days of incubation at 7 °C.

Characteristics	Points in the hedonic scale	Treated slices		Control slices	
		0.95 $a_w$	0.93 $a_w$	0.95 $a_w$	0.93 $a_w$
Visual appearance	I do not like it at all	80.76*	76.92*	23.07*	15.38*
	I do not like it moderately	7.69*	15.38*	26.92*	30.77*
	Neither like nor dislike	7.70*	7.70*	26.92*	34.61*
	I like it moderately	3.85*	0.00*	19.23*	15.38*
	I like it very much	0.00*	0.00*	3.85	3.85
Yeast odour	1 (High intensity)	7.70	7.70	0.00	3.85
	2	7.70	3.85	3.85	11.54
	3	30.77	15.38	26.92	15.38
	4	23.08	34.62	7.70	7.70
	5	11.54	11.54	38.46	34.62
	6 (Low intensity)	19.23	26.92	23.07	26.92

Values represent the percentage of panellists who selected each point in the scales. \*Denotes significant differences ( $P \leq 0.05$ ) within the same  $a_w$  (0.95 or 0.93  $a_w$ ) and treatment (treated or control).

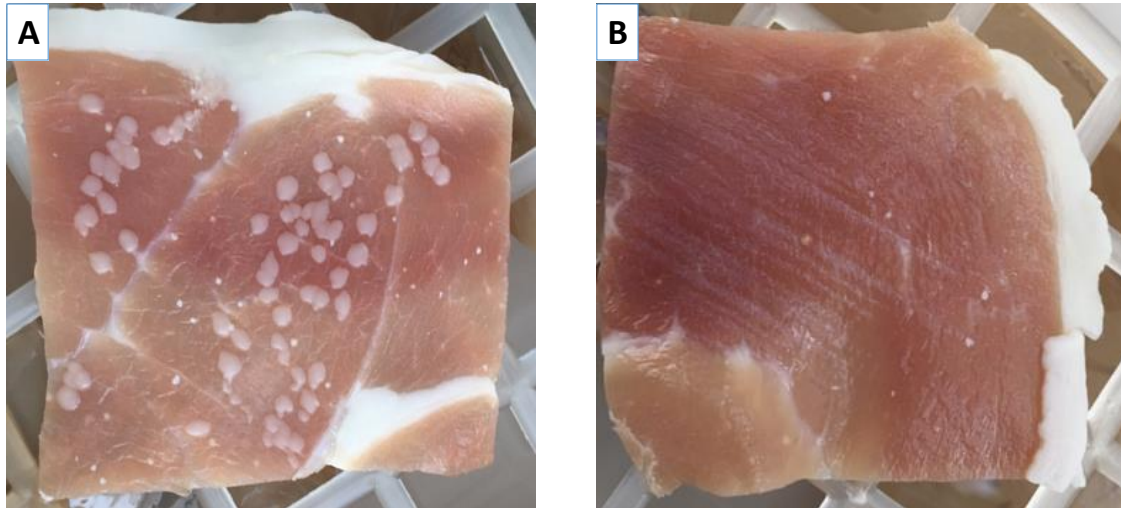


Figure 4. Example of dry-cured ham slices containing *Debaryomyces hansenii* intentionally added after incubating at 7 °C for 10 days (A). Non-inoculated slices of dry-cured ham were also incubated (B).

#### 4. Conclusions

The low degree of the anti-*L. monocytogenes* activity of the tested *D. hansenii* strains together with the stimulation of the bacterium growth by some of them and their effect on upregulating the expression of the *hly* and *iap* virulence genes of *L. monocytogenes* suggest that *D. hansenii* is not a good candidate to be used as a protective culture in sliced dry-cured ham. The effect of *D. hansenii* on the stimulation of the *L. monocytogenes* growth and virulence gene expression should be taken into account even if this yeast is not used as protective cultures due to its presence as native microbial population in dry-cured ham. Additionally, the obtained results highlight the need of performing a complete evaluation of potential protective culture before their application in dry-cured meat products.



## V. DISCUSIÓN

---



## V.1. CARACTERIZACIÓN DE LA CONTAMINACIÓN POR *L. monocytogenes* EN INDUSTRIAS LONCHEADORAS DE JAMÓN CURADO Y EN PRODUCTO LONCHEADO MEDIANTE MÉTODOS MOLECULARES

El cambio en los hábitos de consumo y el consiguiente aumento en la demanda de alimentos RTE han incrementado la comercialización de dichos productos. En el proceso de elaboración de estos productos se añaden nuevas etapas que incrementan de manera notable el riesgo de contaminación (Jamali y Thong, 2014b; Nugen y Baeumner, 2008). A esto se unen las condiciones de envasado y almacenamiento que pudieran permitir el desarrollo de determinados microorganismos patógenos hasta niveles significativos, lo cual también incrementaría el riesgo de enfermedad (Buchanan y col., 2017). En productos RTE como el jamón curado puede haber contaminación y desarrollo de microorganismos patógenos durante su proceso de elaboración (Arnau y col., 2001). Entre ellos, *L. monocytogenes* es el microorganismo patógeno que más preocupa en este tipo de industrias cárnicas, especialmente por la posibilidad de contaminación del producto elaborado durante las fases de deshuesado y loncheado (Bover-Cid y col., 2015; Ng y col., 1997).

Por ello, la detección, cuantificación y caracterización de microorganismos representa uno de los grandes retos a los que se enfrenta la industria alimentaria, de tal manera que la mejora de la seguridad de los alimentos depende en parte de métodos rápidos y sensibles que permitan realizar un seguimiento de los posibles microorganismos patógenos presentes en los alimentos (Palchetti y Mascini, 2008). Los métodos moleculares basados en la metodología de PCR representan una de las principales opciones para llevar a cabo la detección y caracterización de *L. monocytogenes* en industrias de jamón curado loncheado, lo cual permitiría la identificación de cepas resistentes y/o persistentes facilitando el diseño de estrategias para prevenir su contaminación (Chen y Knabel, 2008).

### V.1.1. Desarrollo de un método de qPCR múltiple para la caracterización de *L. monocytogenes*

La utilización de métodos de PCR para la detección y caracterización simultáneas de *L. monocytogenes* es de gran interés ya que permite identificar fuentes de contaminación de este microorganismo patógeno. En este sentido, la caracterización serotípica de *L. monocytogenes* es de gran relevancia, existiendo numerosos métodos de PCR convencional que se han desarrollado para tal fin (Borucki y Call, 2003; De Santis y col., 2007; Doumith y col., 2004; Kérouanton y col., 2010; Rawool y col., 2016; Zhang y col., 2007). Hasta el momento, sólo Vitullo y col. (2013) han desarrollado técnicas basadas en qPCR con el mismo objetivo pero con considerables ventajas respecto a las técnicas de PCR convencional, como la rapidez, la sensibilidad y la especificidad. Sin embargo, tanto los métodos de PCR convencional como los de qPCR desarrollados hasta el momento solo permiten la caracterización de las cepas en grupos filogenéticamente similares, donde se incluyen los serotipos de *L. monocytogenes*, sin capacidad de distinción específica entre los mismos. Así, el método de PCR convencional desarrollado por Doumith y col. (2004) adscribe *L. monocytogenes* a 4 serogrupos o grupos de cepas genéticamente relacionadas: serogrupo I (serotipos 1/2a y 3a), serogrupo II (serotipos 1/2c y 3c), serogrupo III (serotipos 1/2b, 3b y 7) y serogrupo IV (serotipos 4b, 4d y 4e), pero no permite caracterizar de forma específica a nivel de serotipo, no pudiéndose distinguir entre serotipos dentro del mismo serogrupo. Igualmente, Vitullo y col. (2013) desarrollaron dos métodos de qPCR utilizando metodología TaqMan<sup>®</sup> que permiten caracterizar *L. monocytogenes* a nivel de serogrupo sin capacidad de distinguir entre dos serotipos dentro del mismo serogrupo. Sin embargo, aún no se ha desarrollado un método de qPCR múltiple que permita el serotipado específico y simultáneo de los serotipos más frecuentemente aislados en la industria alimentaria (1/2a, 1/2b, 1/2c y 4b) sin análisis posterior, lo que disminuiría tiempos y costes de análisis. Por ello, en esta Tesis Doctoral se ha desarrollado un método de qPCR cuádruple basado en la metodología TaqMan<sup>®</sup> para el serotipado simultáneo de *L. monocytogenes*.

En el desarrollo de este trabajo se ha procedido inicialmente a la selección de las secuencias diana para el diseño de los cebadores y sondas para caracterizar de forma específica los serotipos 1/2a, 1/2b, 1/2c y 4b de *L. monocytogenes* en una única reacción



de qPCR. Así, para el serotipo 1/2a y 1/2c se utilizó el gen *lmo0737*, específico de los serogrupos I y II de *L. monocytogenes* (Doumith y col., 2004; Huang y col., 2011) que codifica una proteína hipotética (Doumith y col., 2004). En el caso del serotipo 1/2c se utilizó el gen *lmo0308*, específico del serogrupo II de *L. monocytogenes* y que permite caracterizar de forma específica cepas de este serotipo (Nho y col., 2015), el cual también codifica para una proteína hipotética. Para el serotipo 1/2b se utilizó el gen ORFC, un locus genómicamente equivalente a la región *gltA-gltB* presente en el serotipo 4b de *L. monocytogenes* (Lei y col., 2001). Finalmente, para el serotipo 4b se utilizó el gen ORF2110, que codifica una serín proteasa y es un gen específico del serogrupo IV de *L. monocytogenes* (Doumith y col., 2004; Müller y col., 2010).

Una vez seleccionadas las secuencias diana, se procedió al diseño de los cebadores y de las sondas basados en las secuencias de los genes seleccionados relacionados con los 4 serotipos de *L. monocytogenes* más frecuentemente aislados de productos cárnicos siguiendo los requisitos propuestos por Rodríguez y col. (2015) y detallados en la Tabla III.9. Todos los cebadores y sondas diseñados en esta Tesis Doctoral cumplieron la mayoría de los requisitos recomendados para poder ser utilizados de forma eficiente en reacciones de qPCR (Tabla III.11.). Sólo en el caso de los cebadores qSLCC-F y qSLCC-R diseñados a partir del gen *lmo0308* el valor de  $T_m$  fue ligeramente inferior a 55°C, mínimo valor de temperatura recomendado. Además, es destacable que los valores de  $T_m$  de las 4 sondas fueran siempre algo menor al recomendado (59,88 - 65,26 °C), aunque sus temperaturas siempre fueron aproximadamente 5 °C mayor que la de los cebadores del gen correspondiente. En el caso de los tamaños de los productos de qPCR amplificadas con cada una de las 4 parejas de cebadores, estos fueron siempre mayores que 90 pb pero menores de 150 pb, el tamaño máximo aconsejado. Otros estudios también han seguido los criterios para el diseño eficiente de cebadores y sondas para su amplificación en métodos de qPCR como (Raymaekers y col. (2009) y Rodríguez-Lazaro y Hernández (2013).

A continuación, se procedió a la optimización de la concentración de los cebadores y de las sondas, así como de las condiciones de amplificación de la qPCR múltiple. Los valores más bajos de  $C_t$  sin formación de dímeros o con una formación insignificante de ellos se obtuvieron con concentraciones de cebadores ligeramente más bajas que las utilizadas en el método de PCR convencional desarrollado por Doumith y col. (2004). En

cuanto a la optimización de las condiciones de la reacción, los mejores resultados se obtuvieron con un incremento de temperaturas en la etapa de hibridación/extensión en tres etapas seguidas de 56,5, 58 y 60 °C en tiempos de reacción de 20 s. Esta estrategia había sido llevada a cabo anteriormente para la optimización de métodos de qPCR múltiple basados en la metodología TaqMan<sup>®</sup> por Rodríguez y col. (2012a; 2012b), pues facilita la hibridación específica de los cebadores a su gen diana a temperaturas ligeramente más bajas de su T<sub>m</sub> óptima inicialmente a pesar de la existencia de otros cebadores y sondas, incrementándose su especificidad al aumentar dicha temperatura poco después.

Tras optimizar dichas condiciones, el método de qPCR múltiple desarrollado presentó una alta sensibilidad. Así, las curvas estándar resultantes de la amplificación de cada uno de los gen diana mostraron una adecuada linealidad ( $R^2 > 0,98$ ) y valores de eficiencia (entre 92,3 y 105,8) dentro de los rangos recomendados por Rodríguez y col. (2015), lo cual es indicativo de la robustez y reproducibilidad del método desarrollado. Los valores de eficiencia y  $R^2$  fueron similares a los obtenidos en otros trabajos de qPCR desarrollados para detectar *L. monocytogenes* (Nho y col., 2015; Rodríguez-Lázaro y col., 2004), lo que es indicativo de que la qPCR múltiple se optimizó de forma correcta y no se produjeron errores durante su desarrollo. También se optimizaron las concentraciones y las condiciones de amplificación de un método de qPCR basado en el gen 16S del ARNr, utilizado como control específico del género *Listeria*. Este método de qPCR fue utilizado para asegurar la amplificación del ADN de *Listeria* spp. y de forma colateral evitar la aparición de resultados falsos positivos y falsos negativos en el método de qPCR múltiple para el serotipado de *L. monocytogenes* diseñado en esta Tesis Doctoral ante la imposibilidad de añadir un control interno de amplificación (IAC) debido a razones metodológicas (Gunson y col., 2006; Law y col., 2015b). Los valores de eficiencia y valor de  $R^2$  de este método de qPCR fueron similares al método de qPCR múltiple optimizado.

Cuando se compararon los resultados obtenidos con el método de qPCR múltiple desarrollado con los obtenidos usando el método de PCR convencional de Doumith y col. (2004), la especificidad quedó demostrada para las 41 cepas de *L. monocytogenes* aisladas de las industrias cárnicas analizadas, obteniendo los mismos resultados en ambos métodos. Además, no se detectó amplificación en ninguna de las cepas de referencia de *Listeria* pertenecientes a otras especies distintas a *L. monocytogenes*, mientras que si se

detectó amplificación del gen 16S, lo que indica que no hay falsos resultados negativos. Ninguno de los cebadores y sondas mostró reacciones cruzadas con aquellos serotipos amplificados por los otros respectivos conjuntos de cebadores y sonda. Además, las muestras analizadas también amplificaron el control 16S en el método de qPCR desarrollado y el IAC en el método de PCR convencional (*prs*) de Doumith y col. (2004), lo cual es indicativo de que no se produjeron falsos resultados positivos (Hoorfar y col., 2004; Rodríguez-Lázaro y col., 2005).

Por todo ello, el método de qPCR múltiple desarrollado en esta Tesis Doctoral es un método rápido y sensible de gran utilidad para la caracterización serotípica de *L. monocytogenes*, de forma que permitiría adoptar de forma rápida medidas preventivas o correctoras para controlar las contaminaciones de esta bacteria patógena detectadas en la industria del jamon curado.

#### V.1.2. Evaluación de la prevalencia y de fuentes de contaminación de *L. monocytogenes* en zona de deshuesado y loncheado en industrias de jamón curado

En esta Tesis Doctoral se utilizó de forma conjunta el método de PCR múltiple desarrollado por Doumith y col. (2004), el método de qPCR múltiple descrito anteriormente y el análisis mediante PFGE para la evaluación de la persistencia y prevalencia de fuentes de contaminación de *L. monocytogenes* en zonas de deshuesado y loncheado de jamón curado en industrias cárnicas.

Concretamente, se muestrearon 6 industrias que deshuesan y lonchean jamón curado, situadas en localizaciones geográficas diferentes dentro del territorio nacional (centro y suroeste de España). En las 6 industrias se realizaron muestreos de superficies de equipos y utensilios de la zona de deshuesado, prensado y loncheado (Figura V.1), tras la aplicación de los procedimientos de limpieza y desinfección y durante las labores de deshuesado, prensado y loncheado. Las tomas de muestras se repitieron en dos épocas distintas del año (otoño/invierno y primavera/verano).

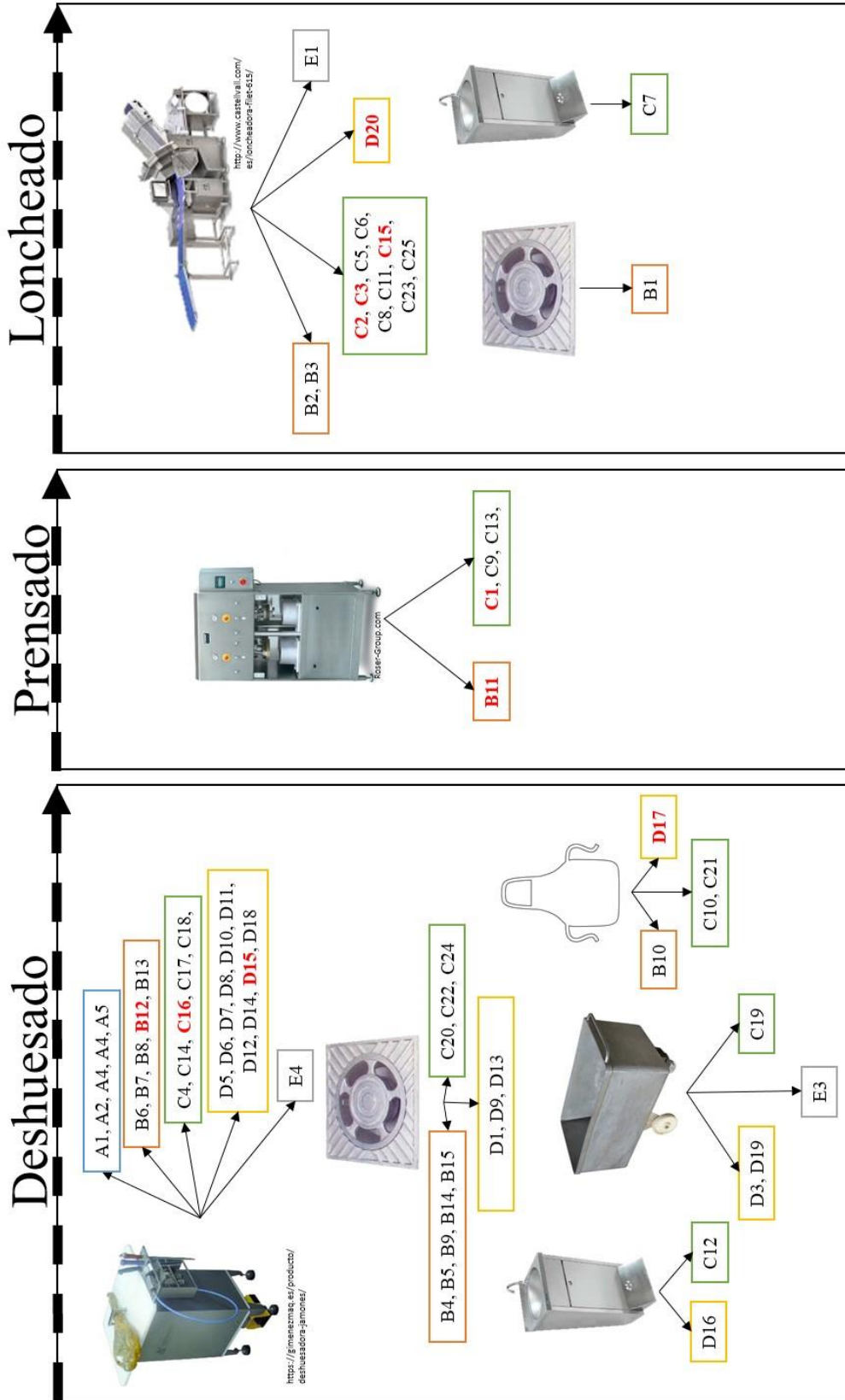


Figura V.1. Distribución de las 66 cepas de *Listeria monocytogenes* aisladas de los muestreos de las superficies de equipos y utensilios de 5 industrias cármicas elaboradoras de jamón curado loncheado (A, B, C, D y E). Las cepas marcadas en rojo pertenecen al mismo serotipo y son genéticamente idénticas según el análisis de electroforesis en campo pulsante.

Como resultados de estos análisis se obtuvieron un total de 720 aislados de los cuales solamente 66 (9%) fueron tentativamente identificados como *L. monocytogenes*, siendo estos valores bastante inferiores a los obtenidos en otras industrias alimentarias (Amajoud y col., 2018; Arslan y Baytur, 2019; Bolocan y col., 2016; Chemaly y col., 2008; Dauphin y col., 2001; Iannetti y col., 2016; Kramarenko y col., 2013; Melero y col., 2019; Morales-Partera y col., 2018; Véghová y col., 2017). Los mayores niveles de prevalencia fueron encontrados en el área de deshuesado (72,7%), seguido de la zona de loncheado (22,7%) (Figura V.1). La mayor prevalencia encontrada en la zona de deshuesado puede deberse a la gran complejidad de este proceso, con procedimientos muy invasivos para poder extraer el hueso, bien de forma manual o utilizando distintos equipos y prensas que sujetan el producto, con la consiguiente propagación y acumulación de desechos orgánicos en el equipo, en el suelo y en la ropa de los operarios (Morganti y col., 2016). Sin embargo, el loncheado suele ser un proceso mucho más sofisticado, realizado con equipos de alta precisión, habitualmente en salas blancas y bajo condiciones más estrictas de higiene de operarios y de limpieza y desinfección de equipos y utensilios (Morganti y col., 2016).

En cuanto a la caracterización serotípica de las cepas aisladas de *L. monocytogenes* mediante los métodos basados en la metodología PCR, hubo un predominio del serotipo 1/2b seguido de los serotipos 1/2a, 1/2c y 4b. Algunos trabajos han destacado la importancia de los serotipos 1/2b y 1/2a (Ferreira y col., 2011; Kramarenko y col., 2013; Meloni y col., 2012; Thévenot y col., 2006). Sin embargo, esta distribución de serotipos podría considerarse algo atípica ya que no coincide con la descrita en estudios previos, en los que generalmente el serotipo 1/2b junto con el 4b suelen ser los menos preponderantes, siendo los serotipos 1/2a y 1/2c los más comúnmente aislados (Martín y col., 2014; Morales-Partera y col., 2018; Thévenot y col., 2005). Además, existe coincidencia con los resultados descritos en estos trabajos en cuanto a la frecuencia más baja del serotipo 4b, el cual está ligado a los casos más relevantes de listeriosis humana en todo el mundo (Cartwright y col., 2013; Kathariou, 2002; Lepe y col., 2012; Montero y col., 2015; Paduro y col., 2019).

El análisis mediante PFGE con las enzimas de restricción *ApaI* y *SgsI* permitió clasificar las cepas de *L. monocytogenes* en un total de 25 clanes y 52 pulsotipos, distribución muy similar a la encontrada para cepas de *L. monocytogenes* en otras

industrias alimentarias (Dauphin y col., 2001; Lundén y col., 2003; Morganti y col., 2016; Rivoal y col., 2013). Del análisis de los resultados encontrados en esta Tesis Doctoral, se obtuvo una diversidad genética superior al 87% entre los aislados de *L. monocytogenes*, la cual es común en las plantas de procesamiento de carne y productos cárnicos (Chasseignaux y col., 2001; Giovannacci y col., 1999; Lundén y col., 2003; Martín y col., 2014). Además, se observaron diferencias en la diversidad genética de las cepas aisladas de cada una de las industrias evaluadas, encontrándose mayores índices de diversidad en las industrias B y D (78% y 84%, respectivamente) que fueron las industrias de mayor tamaño y capacidad de elaboración. Estudios previos han demostrado existen índices de diversidad genética entre cepas superiores en los establecimientos de mayores dimensiones, debido tanto a la mayor cantidad y heterogeneidad de la materia prima procesada (Thévenot y col., 2006), como a la más alta probabilidad de existencia de diferentes fuentes de contaminación (Véghová y col., 2017).

Por otra parte, el análisis de los perfiles de PFGE permitió detectar la presencia de cepas potencialmente persistentes de *L. monocytogenes* aisladas tanto durante el deshuesado como en el prensado y/o loncheado del jamón curado, encontrándose algunas de estas cepas persistentes incluso tras la aplicación de los procedimientos de limpieza y desinfección. Todas estas cepas clasificadas como potencialmente persistentes, pertenecían al mismo serotipo y estaban agrupadas en clanes o pulsotipos muy cercanos. Con algunas cepas específicas se observó contaminación cruzada entre las diferentes fases del procesamiento (deshuesado, prensado y loncheado) (Figura V.1), encontrándose la mayor fuente de contaminación en el deshuesado. La falta de eficacia en los planes de limpieza y desinfección motivado en parte por la alta resistencia de este microorganismo patógeno a dichos tratamientos podría explicar la presencia de estas cepas persistentes (Aase y col., 2000; Kastbjerg y col., 2010; Mendonça y col., 2012; Moretro y Langsrud, 2004; To y col., 2002). Otro factor importante que podría contribuir a dicha persistencia es la alta diversidad de cepas, algunas de las cuales podrían estar altamente adaptadas a determinados entornos de las industrias. Los resultados encontrados en esta Tesis Doctoral coinciden con otros estudios realizados en distintos países europeos sobre la detección de fuentes de contaminación de *L. monocytogenes* en diversas cadenas de producción de alimentos, en los que se ha observado una prevalencia esporádica de esta bacteria patógena con una diversidad relativamente alta (Bolocan y col., 2016, 2015; Gelbíčová y Karpíšková, 2012; Leong y col., 2015; Martín y col., 2014; Muhterem-Uyar

y col., 2015; Véghová y col., 2017). Así en la industria B, la cepa B11 y B12 fueron caracterizadas con el mismo serotipo según los métodos de PCR, siendo además genéticamente idénticas según el análisis con PFGE. Estas dos cepas fueron aisladas en las zonas de deshuesado y prensado, dos ubicaciones correlativas lo cual podría ser indicativo de la posible contaminación cruzada de la misma cepa desde una zona a la otra. En la planta C sucede algo similar con las cepas C1, C2 y C3, pertenecientes al serotipo 1/2b y al pulsotipo 16, aisladas en la sala de prensado y loncheado, y con las cepas C15 y C16 adscritas al serotipo 1/2b y al pulsotipo 1, aisladas de la sala de deshuesado y loncheado. Finalmente, en la planta D, las cepas D15, D17 y D20 (serotipo 1/2b, pulsotipo 1) fueron aisladas en la sala de deshuesado y posteriormente en loncheado. Estos resultados además de confirmar que el deshuesado es un punto importante de contaminación de las industrias loncheadoras de jamón curado por *L. monocytogenes*, muestra la eficacia del análisis de los perfiles de PFGE para detectar fuentes de contaminación por esta bacteria patógena.

Algunas de las cepas aisladas tuvieron un perfil de PFGE único que no se repitió en cualquier otra fase del procesado, ni en los muestreos en diferentes estaciones, lo cual es indicativo de que probablemente esa contaminación haya sido eliminada de forma eficaz mediante los tratamientos de limpieza y desinfección. Sin embargo, la clasificación de cepas persistentes y no persistentes, así como el estudio de la contaminación de las plantas de procesado es un proceso muy complejo, en el que algunos autores afirman que las cepas de *L. monocytogenes* que muestran un perfil de PFGE similar y que se clasifican como cepas persistentes en una industria, podrían clasificarse como no persistentes en otras plantas (Lundén y col., 2003). Además, estos mismos autores señalan que con la realización de muestreos adicionales, algunas de las cepas clasificadas como no persistentes podrían ser aisladas con más frecuencia siendo entonces categorizadas como persistentes.

Por otro lado, los resultados encontrados en esta Tesis Doctoral mostraron una mayor prevalencia de *L. monocytogenes* en los muestreos realizados durante los meses más cálidos (primavera/verano), lo cual coincide con los datos publicados por la EFSA sobre el incremento de brotes de listeriosis durante los meses de primavera/verano (EFSA and ECDC, 2018). Sin embargo, (Rivoal y col., 2013) encontraron una mayor frecuencia de aislamiento de *L. monocytogenes* en los meses de las estaciones más frías

(otoño/invierno) en plantas de almacenamiento de huevos. Probablemente, en este caso la distinta naturaleza del establecimiento alimentario con condiciones de temperatura de procesado distintas a la de jamón curado justifiquen estas diferencias.

Aunque en las muestras de jamón curado loncheado no se detectó *L. monocytogenes*, los hallazgos de contaminación cruzada entre las distintas etapas del proceso de loncheado de dicho producto RTE, así como la posible presencia de cepas persistentes incluso tras la aplicación de los tratamientos de limpieza y desinfección, confirma la existencia de un peligro de contaminación por *L. monocytogenes* del jamón curado en estas fases del procesado. Esto hace necesario extremar las medidas de higiene y adecuar los procesos de limpieza y desinfección para minimizar este peligro. Además, el estudio de tipificación molecular desarrollado en esta Tesis Doctoral resalta la utilidad de los métodos de serotipado de PCR y de PFGE para la detección de fuentes de contaminación de *L. monocytogenes* en plantas de deshuesado y loncheado de jamón curado.

## V.2. EFECTO DE LAS CONDICIONES DEL PROCESADO DE JAMÓN CURADO Y DE LOS TRATAMIENTOS NO TÉRMICOS EN EL CRECIMIENTO Y EXPRESIÓN GÉNICA DE *L. monocytogenes*

*L. monocytogenes* desarrolla una amplia variedad de mecanismos moleculares para resistir las condiciones adversas que se puede encontrar en el medio en el que se desarrolla, como pueden ser los alimentos o incluso frente a los métodos tradicionales de conservación, como la deshidratación, utilización de sales y azúcares, y a nuevos métodos, como la aplicación de métodos de biocontrol y tratamientos HPP o con electrones acelerados. Comprender dichos mecanismos puede ayudar al desarrollo de estrategias innovadoras y eficientes para reducir o eliminar la presencia y el desarrollo de este microorganismo patógeno en alimentos controlando así el riesgo de listeriosis en los consumidores. La relación entre la respuesta al estrés y la virulencia de *L. monocytogenes* ha sido ampliamente estudiada, centrándose principalmente en la regulación del factor  $\sigma^B$  respecto a los genes de virulencia bajo condiciones de diferentes tipos de estrés: osmótico,



acídico o térmico (calor o frío). Sin embargo, la influencia de la aplicación de métodos de control, tales como la utilización de agentes de biocontrol o el empleo de tratamientos no térmicos requieren esfuerzos de investigación adicionales para desentrañar los mecanismos implicados en la respuesta del microorganismo patógeno ante la presencia de estos, dando lugar al desarrollo de medidas de control óptimas ante tales circunstancias.

Estudios previos han demostrado que la relación de *L. monocytogenes* con el entorno alimentario puede tener un gran impacto sobre su expresión génica (Kang y col., 2019; Mahoney y Henriksson, 2003). Así, la expresión de genes de virulencia de este microorganismo patógeno puede verse afectada en gran medida ante determinadas condiciones de  $a_w$  y temperaturas (Hadjilouka y col., 2016; Larsen y Jespersen, 2015; Liu y Ream, 2008; Mujahid y col., 2008; Olesen y col., 2010; Rantsiou y col., 2012b; Rieu y col., 2010; Tang y col., 2015) mejorando su capacidad para sobrevivir a los mecanismos de defensa del huésped (Barmpalia-Davis y col., 2008; Garner y col., 2006b; Kang y col., 2019; Olesen y col., 2009; Peterson y col., 2007; Sue y col., 2004; Wonderling y Bayles, 2004) y su potencial celular (Lin y col., 2010). Además, otros estudios han demostrado el efecto en la expresión génica de *L. monocytogenes* cuando ha sido sometida a la exposición de determinados componentes antimicrobianos de origen vegetal (Hadjilouka y col., 2017; Pieta y col., 2017; Upadhyay y col., 2012). De la misma forma, el estrés provocado por la presencia de NaCl en concentraciones relevantes para la industria alimentaria o la exposición de microorganismo a ambientes ácidos (ácido láctico) ha tenido efectos en la transcripción de genes de virulencia de *L. monocytogenes* incrementándose su capacidad de invasión en líneas celulares Caco-2 del epitelio intestinal humano (Garner y col., 2006a; Olesen y col., 2009). En esta línea, Kang y col. (2019) demostraron que existe una adaptación fenotípica de *L. monocytogenes* en un medio que simulaba las condiciones del fluido gástrico a pH muy ácidos y que podría estar relacionado con el incremento de los niveles de transcripción de genes implicados en la resistencia biliar (Begley y col., 2005; Sleator y col., 2005) lo cual podría servir para resolver las etapas iniciales de la infección, que requieren el paso a través de la barrera gástrica del estómago.

Durante el proceso de elaboración de jamón curado se produce una reducción de la  $a_w$  del producto hasta llegar a valores por debajo de límite de crecimiento de *L.*

*monocytogenes* (Rodríguez y col., 1994), promovida principalmente por la entrada de NaCl en el producto durante el proceso de salado y a la salida de agua del mismo durante el procesado posterior (postsalado, secado y maduración en bodega). Si *L. monocytogenes* contamina el pernil durante alguna de estas fases del procesado, la reducción de la  $a_w$  y la presencia de sal, además de la temperatura de salado y postsalado afectará tanto al posible crecimiento de esta bacteria como a la expresión de sus genes de virulencia y de adaptación al estrés. Así mismo, la aplicación de tratamientos no térmicos en producto acabado (jamón loncheado) con el objetivo de eliminar y/o reducir los niveles de *L. monocytogenes*, también tiene podría tener una repercusión tanto en el crecimiento como en la expresión génica del microorganismo patógeno.

La utilización de técnicas moleculares para el análisis de la expresión de genes relacionados con la virulencia y respuesta al estrés de *L. monocytogenes* en jamón curado puede ser una herramienta útil, no solo en la detección y cuantificación de este microorganismo patógeno, sino también para evaluar el efecto derivado tanto de las condiciones de procesado como de la aplicación de tratamientos no térmicos en su crecimiento y expresión génica.

#### V.2.1. Efecto de la $a_w$ , NaCl y temperatura de procesado sobre el crecimiento y expresión génica de *L. monocytogenes*

En esta Tesis Doctoral se evaluó el efecto de la  $a_w$  (modificada con un sustrato iónico, como es el NaCl, y otro no iónico, como es el glicerol) y la temperatura de procesado y/o almacenamiento sobre el crecimiento y la expresión de genes de virulencia y respuesta al estrés de *L. monocytogenes*. Las condiciones de  $a_w$  y temperatura que se utilizaron son habituales durante las fases de salado y postsalado (Andres y col., 2005; Rodríguez y col., 1994) así como en las lonchas de jamón curado cuando se almacenan bajo condiciones de abuso de temperatura (Stollewerk y col., 2014). Para llevar a cabo dicho ensayo, se utilizó un medio elaborado con carne de cerdo, el cual se modificó con NaCl utilizando concentraciones en torno al 4% que se corresponden con valores de sal comúnmente encontrados en jamón curado (Toldrá, 2006). También se utilizó glicerol para reducir la  $a_w$  sin el efecto del NaCl. Se pretendía con ello evaluar el efecto de la reducción de la  $a_w$  sobre la expresión de *L. monocytogenes* en condiciones habituales en jamón curado en

las que la bajada de la  $a_w$  es debido al efecto de la incorporación de NaCl y de la eliminación de agua durante el secado y compararlo con otras condiciones en las que en la reducción del parámetro  $a_w$  no interviene la sal sino sólo el glicerol, simulando condiciones que podría encontrarse en el procesado de jamón curado cuando se reduce la sal y el descenso de  $a_w$  es motivado prioritariamente por el secado. Además, se evaluaron condiciones en las que sólo se añadió NaCl para modificar la  $a_w$  para comparar el efecto de este sustrato iónico con respecto a los otros dos tratamientos en la expresión de genes de virulencia y relacionados con el estrés.

Los resultados obtenidos muestran un mayor crecimiento de *L. monocytogenes* en los valores más elevados de  $a_w$  y temperatura (Figura V.2). Así, los mayores recuentos se observaron a 15 °C en las  $a_w$  de 0,98 y 0,96. Además, en el medio con  $a_w$  de 0,94 y 0,92 modificado con NaCl e incubado a 15 °C se observó un incremento del crecimiento de *L. monocytogenes* respecto al medio modificado únicamente con glicerol. Por ello, parece que, aunque la  $a_w$  es un factor principal que influye sobre el crecimiento de *L. monocytogenes*, la presencia de NaCl en niveles bajos o moderados podría estar estimulando el crecimiento del microorganismo patógeno, probablemente debido a las condiciones de estrés, principalmente osmótico, provocadas por la presencia de este soluto iónico en niveles bajos o moderados (Liu y col., 2014b). En este mismo sentido, (Magalhaes y col., 2016) observaron un incremento en el desarrollo de esta bacteria patógena a 2,5, 4 y 8% de NaCl. En el presente trabajo, los valores de  $a_w$  utilizados (0,96, 0,94 y 0,92) se lograron con concentraciones de NaCl de 4, 9 y 12%, respectivamente. La adaptación de *L. monocytogenes* a dichas condiciones podría estar relacionada con el proceso de filamentación que ocurre en presencia de dicha sal, lo cual favorecería su crecimiento (Liu y col., 2014b). Durante el proceso de salado y postsalado del jamón curado, la sal penetra y se distribuye por toda la pieza, alcanzándose como consecuencia de ello así como de la pérdida de agua de la pieza, valores de  $a_w$  y NaCl similares a los que se han utilizado y evaluado en la presente Tesis Doctoral (Andres y col., 2005; Rodríguez y col., 1994). Según los resultados obtenidos, en estas condiciones y cuando la temperatura es superior (condiciones de abuso) a la de refrigeración se puede estar favoreciendo el desarrollo de *L. monocytogenes*.

Además, de los resultados obtenidos se puede deducir que la temperatura de incubación provoca diferencias en la expresión de los genes de virulencia y respuesta al

estrés en los distintos serotipos de *L. monocytogenes*. De forma general, hubo una estimulación de la expresión de los genes de virulencia *hly* e *iap* a 15 °C y del gen *plcA* a 7 °C. Estos resultados concuerdan con los obtenidos por (Rantsiou y col., 2012b) que encontraron heterogeneidad en la expresión de los genes *plcA*, *hly*, *iap* y *sigB* de tres cepas de *L. monocytogenes* en diferentes matrices alimentarias a dos temperaturas de almacenamiento diferentes (4 y 12 °C). De esta manera, la temperatura podría dar lugar a diferentes patrones de virulencia del microorganismo patógeno, aspecto muy importante a considerar para desarrollar estrategias eficientes para la reducción e incluso eliminación de este microorganismo patógeno.

En cuanto a la presencia de NaCl y el efecto derivado en la disminución de la  $a_w$  del medio elaborado con carne sobre la expresión génica, se observó una reducción de la expresión génica de forma generalizada, mostrando algunas diferencias a nivel transcripcional entre las distintas cepas, especialmente en la cepa S7-2 (serotipo 4b). Este efecto de la presencia de sal sobre la expresión de genes implicados en la virulencia y en la respuesta al estrés de *L. monocytogenes* concuerda con lo descrito por Schrama y col. (2013) y Olesen y col. (2010), que igualmente obtuvieron diferencias a nivel de cepa.

En este trabajo, la expresión del gen *sigB* se estimuló en condiciones y concentraciones de  $a_w$  y NaCl moderadas (0,96S a 15 °C), lo que concuerda con estudios previos que han demostrado que la exposición de *L. monocytogenes* a una concentración del 3% de NaCl (en torno a 0,96-0,97) induce la activación del factor sigma alternativo  $\sigma^B$  (codificado por el gen *sigB*) (Kazmierczak y col., 2003b; Olesen y col., 2010). Además, el trabajo desarrollado por (Liu y col., 2014b) también demostró un incremento en la expresión del gen *sigB* con un porcentaje de NaCl del 2,35%. De esta manera, la expresión de genes no relacionados con el estrés, como los genes de virulencia, podrían ser reprimida ante determinadas condiciones activándose la expresión genes relacionados con el estrés, como el *sigB*, que podrían facilitar la supervivencia de *L. monocytogenes* en ambientes de  $a_w$  estresantes (Mataragas y col., 2015). En la presente Tesis Doctoral, se observó una inhibición en la expresión de los genes de virulencia y respuesta al estrés en los medios con los valores de  $a_w$  más bajos modificados con NaCl. Probablemente en estas condiciones se está produciendo el proceso de formación de filamentos de *L. monocytogenes* (Liu y col., 2014b), lo cual podría justificar el incremento en el crecimiento del microorganismo patógeno y los valores bajos de expresión génica.

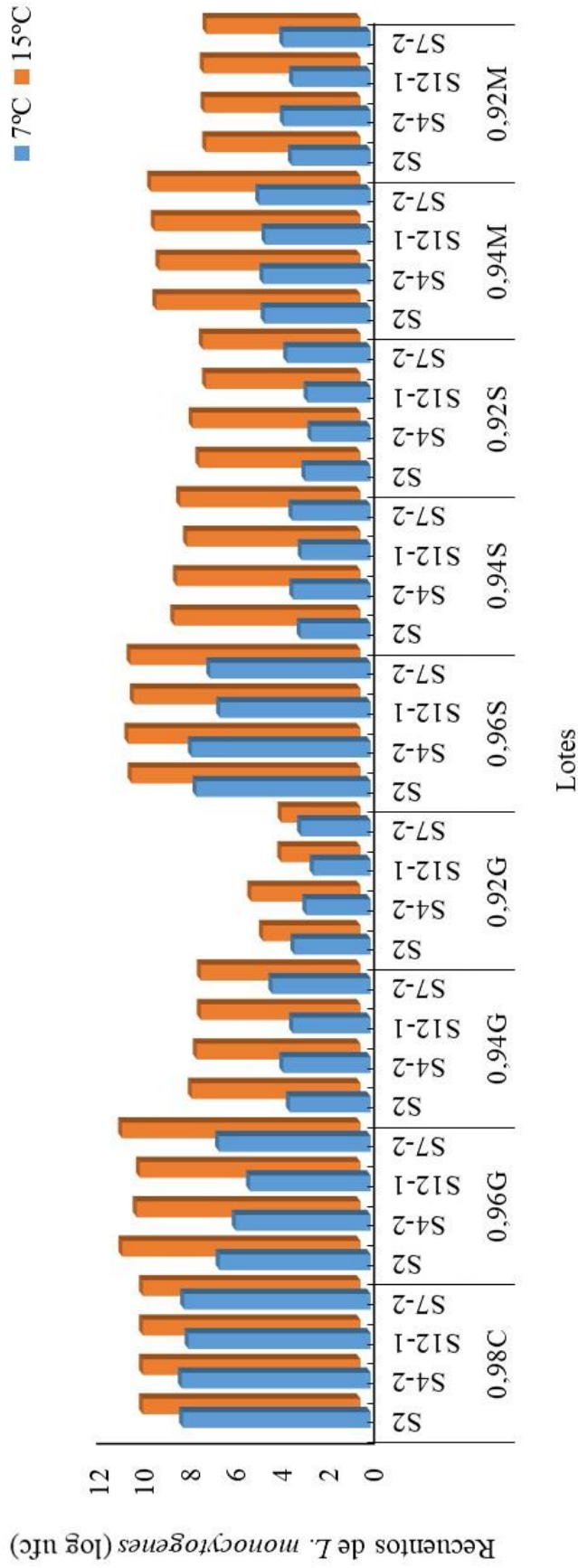


Figura V.2. Efecto de la actividad de agua ( $a_w$ , desde 0,98, 0,96, 0,94 y 0,92) y la temperatura (7 °C y 15 °C) sobre el crecimiento de las 4 cepas de *Listeria monocytogenes* (1/2a, 1/2b, 1/2c y 4b) en cada uno de los lotes elaborado con carne de cerdo (0,98C medio control sin modificar), modificado con glicerol (0,96G: 0,98C+11% glicerol; 0,94G: 0,98C+16% glicerol; 0,92G: 0,98C+23% glicerol), modificado con NaCl (0,96S: 0,98C+4% NaCl; 0,94S: 0,98C+9% NaCl; 0,92S: 0,98C+12% NaCl) o con una mezcla de ambos (0,94M: 0,98C+7% glicerol+4% NaCl; 0,92M: 0,98C+15% glicerol+4% NaCl). Los resultados se presentan como la media de los recuentos (log ufc).

Por lo tanto, la expresión génica de *L. monocytogenes* parece reducirse cuando los valores de  $a_w$  del medio elaborado con carne son ligeramente superiores al límite de crecimiento (en torno a 0,92-0,94) y el descenso de la  $a_w$  se ha producido fundamentalmente con NaCl. Esto podría ocurrir en etapas tales como el salado y postsalado del jamón y almacenamiento de las lonchas del producto final. Sin embargo, cuando la  $a_w$  se reduce principalmente por el proceso de secado, como ocurre en los jamones con bajo contenido en sal (en torno a 2,5-3%), el crecimiento de *L. monocytogenes* podría estar limitado debido al efecto de la  $a_w$ , pero se podría estar produciendo una activación de la expresión de sus genes de virulencia. De esta manera, sería interesante disminuir la  $a_w$  del producto hasta valores por debajo del límite de crecimiento de *L. monocytogenes* lo antes posible, durante las primeras etapas del proceso de elaboración, y mantenerlos en estos valores en el producto loncheado y envasado al vacío, ya que en  $a_w$  ligeramente superiores a 0,92 tanto el crecimiento como la expresión de los genes de virulencia se pueden ver favorecidos en función de la concentración de NaCl de los jamones. La tendencia actual de reducir la cantidad de sal en los perniles genera jamones en los que si la  $a_w$  no ha descendido por debajo del límite de crecimiento de *L. monocytogenes* podría haber un mayor crecimiento y expresión de genes de virulencia de este patógeno, en función del contenido de sal de los jamones.

#### V.2.2. Efecto de la $a_w$ y tratamiento con altas presiones (HPP) sobre la expresión génica de *L. monocytogenes*

Entre los tratamientos no térmicos para el control de *L. monocytogenes* se evaluó el efecto de HPP sobre el crecimiento y expresión génica de esta bacteria patógena en jamón curado loncheado. Este estudio pertenece al proyecto coordinado INIA RTA-2013-00070-C03 y se desarrolla de forma conjunta con el Grupo de Seguridad Microbiológica de Alimentos del Departamento de Tecnología de Alimentos del INIA. En este trabajo se evaluó la influencia de dichos tratamientos aplicados sobre lonchas de jamón curado con una intensidad de 450 MPa durante 10 min y 600 MPa durante 5 min tras 30 días de almacenamiento a temperatura de refrigeración a 4 °C sobre la expresión génica de *L. monocytogenes*.

El análisis de la expresión de los genes de virulencia (*plcA*, *hly* e *iap*) y del gen relacionado con la respuesta al estrés (*sigB*) de *L. monocytogenes* tras ser sometida a los tratamientos HPP mostraron una menor expresión del gen *sigB* con respecto a la de los genes de virulencia. Esto puede ser debido al hecho de que se produzca una represión de las proteínas reguladoras SigB y PrfA, tal y como se ha descrito previamente tras la utilización de tratamientos HPP sobre un medio de cultivo para controlar el desarrollo de *L. monocytogenes* (Bowman y col., 2008). La proteína reguladora PrfA se encarga de la regulación de genes de virulencia como los genes *plcA* y *hly*, lo cual podría explicar la disminución en la expresión de estos genes en las cepas S4-2 y S12-1, principalmente en los dos valores de  $a_w$  más altos (0,92 y 0,88) de las tres que fueron evaluadas. Apoya esta hipótesis el hecho de que el gen *iap*, cuya regulación no depende de dicha proteína (Rolhion y Cossart, 2017), sea el único de los genes de virulencia analizados que mostró un incremento significativo en la expresión génica de la cepa S12-1 respecto al lote control no tratado. El gen *sigB*, es responsable de regulación y respuesta ante situaciones de estrés (Rolhion y Cossart, 2017), siendo necesario para la supervivencia osmótica y de estrés ácido (Kazmierczak y col., 2003b) y junto con el gen *prfA*, son los genes reguladores de la mayoría de los genes de virulencia de *L. monocytogenes* (Bowman y col., 2008; de las Heras y col., 2011; Milohanic y col., 2003). Los análisis obtenidos revelaron diferencias en la expresión tras los tratamientos HPP entre cepas, obteniéndose en la mayoría de los casos valores de expresión mayor en la cepa S4-2 que en la cepa S12-1, lo cual concuerda con los estudios desarrollados por (Bruschi y col., 2017), donde el serotipo 1/2b (cepa S4-2) tiene mayor resistencia a los tratamientos con altas presiones que el serotipo 1/2c (cepa S12-1) y que podría explicar el incremento en la expresión génica observada en este trabajo.

En cuanto al efecto sobre la capacidad de virulencia de las cepas sometidas a los tratamientos HPP, existen estudios previos sobre moluscos bivalvos que han demostrado un efecto prácticamente nulo en la capacidad invasiva de *L. monocytogenes* tras ser sometida a dichos tratamientos (Stollewerk y col., 2017). Sin embargo, estos efectos no han sido evaluados en jamón curado, donde los valores de  $a_w$ , la presencia de NaCl y el contenido en grasa pueden modificar la resistencia de *L. monocytogenes* a los tratamientos con HPP. En el presente trabajo no se observa un incremento importante en la expresión de los genes de virulencia de *L. monocytogenes* tras dichos tratamientos que justifique un incremento en la virulencia de las cepas evaluadas, dado que sólo se produce el aumento

reseñado del gen *iap*. No obstante, es conveniente llevar a cabo nuevos estudios para evaluar la virulencia real de las cepas tratadas.

### V.2.3. Efecto del tratamiento con electrones acelerados sobre la expresión génica de *L. monocytogenes*

Como tratamiento no térmico para el control de *L. monocytogenes* se evaluó también el efecto de tratamientos con electrones acelerados la expresión génica de esta bacteria patógena en jamón curado loncheado. Este estudio está dentro del proyecto coordinado INIA RTA-2013-00070-C03 y se desarrolla de forma conjunta con el grupo de Tecnología Alimentaria de la Facultad de Veterinaria de la Universidad Complutense de Madrid. En este trabajo se evaluó el efecto de tratamientos de electrones acelerados de 1, 2 y 3 kGy sobre la expresión génica de *L. monocytogenes* en jamón curado loncheado almacenado durante 30 días a 7°C y 15°C.

En cuanto al efecto del tratamiento con electrones acelerados sobre la expresión génica de *L. monocytogenes*, no se encontró una relación entre el efecto del tratamiento sobre el crecimiento y los resultados obtenidos en la expresión de los genes de virulencia y respuesta al estrés de *L. monocytogenes*. Los genes de virulencia *plcA* y *hly* fueron los que mostraron una mayor expresión en los diferentes tratamientos a lo largo de los 30 días de almacenamiento y a las dos temperaturas evaluadas. Cuando se comparó la expresión génica del lote control (sin tratar) y los lotes tratados en ambas temperaturas durante los primeros días de almacenamiento (días 1 y 7), no se encontraron diferencias significativas en la mayoría de los casos. Sin embargo, a los 15 días de almacenamiento se observó una disminución significativa respecto al control de la expresión de los genes *plcA* y *hly* a 15 °C. A los 30 días de almacenamiento a 7 °C se observó una disminución significativa de la expresión de los tres genes de virulencia analizados con respecto a la expresión génica del control no tratado. Estos resultados demuestran de forma general una tendencia a la disminución en la expresión de los genes de virulencia en las muestras tratadas durante el tiempo de almacenamiento. Dichos resultados concuerdan con estudios previos que utilizan tratamientos no térmicos como los HPP, donde también se observó una reducción en la expresión de los genes *plcA* y *hly*, probablemente explicado por la represión del gen regulador PrfA (Bowman y col., 2008).



#### V.2.4. Efecto de *D. hansenii* sobre el crecimiento y expresión génica de *L. monocytogenes* en lonchas de jamón curado. Efecto de los tratamientos de biocontrol sobre las características sensoriales del producto.

La utilización de cultivos protectores para inhibir el crecimiento de microorganismos patógenos ha sido objeto de numerosos estudios, constituyendo uno de los principales mecanismos de biocontrol frente a *L. monocytogenes*. En este sentido, la utilización de BAL es uno de los métodos más utilizados para el control de este microorganismo patógeno en derivados cárnicos (Albano y col., 2007; Baccus-Taylor y col., 1993; Campanini y col., 1993; Gao y col., 2015; Leroy y col., 2003; Nieto-Lozano y col., 2010; Zanette y col., 2015). Sin embargo, las características ecológicas propias del jamón curado limitan el crecimiento de esta población microbiana en las etapas iniciales del proceso de elaboración (Molina y col., 1989), descartando la posibilidad de utilizar estos microorganismos como cultivos protectores. En cambio, las levaduras sí permanecen en el jamón curado hasta las etapas finales de su proceso de elaboración (Andrade y col., 2009; Núñez y col., 1996b) haciendo posible la utilización de este grupo microbiano como cultivos protectores. *D. hansenii* forma parte de la población microbiana predominante en la superficie del jamón curado durante el proceso de maduración y está adaptada a este nicho ecológico, de tal manera, que podría colonizar la superficie del producto de manera efectiva y competir potencialmente frente al desarrollo de *L. monocytogenes*. Además, ha sido considerada como un “microorganismo seguro” por el grupo de expertos sobre Seguridad Biológica de la EFSA (EFSA BIOHAZ Panel y col., 2017). En este sentido, tanto por sus propiedades probióticas, no tóxicas y sensoriales, *D. hansenii* parece ser uno de los microorganismos más prometedores para ser utilizados en jamón curado (Peromingo y col., 2018). En cuanto a su capacidad como agente de biocontrol, las levaduras han sido utilizadas como agentes de biocontrol frente al crecimiento de mohos toxigénicos en derivados cárnicos curado-madurados (Andrade y col., 2014; Iacumin y col., 2017; Peromingo y col., 2018; Simoncini y col., 2014). Además, *D. hansenii* ya ha sido utilizada frente a microorganismos patógenos tales como *S. aureus* o *C. tyrobutyricum* (Fatichenti y col., 1983; Meisel y col., 1989) o incluso frente a *L. monocytogenes* en quesos y productos lácteos (Goerges y col., 2011, 2006; Zhao y col., 2004). Sin embargo, no ha sido evaluado su efecto frente a *L. monocytogenes* en jamón curado.

Cuando se evaluó el efecto de 30 cepas de *D. hansenii* en un medio elaborado con jamón curado liofilizado incubado a 7 °C, el nivel de inhibición observada sobre el crecimiento de la cepa S7-2 de *L. monocytogenes* fue bastante bajo. Estos resultados concuerdan con los obtenidos en estudios previos donde se describió un efecto limitado de cepas de *D. hansenii* aisladas de quesos frente al crecimiento de *L. monocytogenes* (Goerges y col., 2011, 2006; Hatoum y col., 2013). De este primer ensayo, se seleccionaron las cepas 74P, 163P, 213H y 258H de *D. hansenii* por ser las que presentaron mayor actividad antimicrobiana. Estas cepas se evaluaron frente al resto de las cepas de referencia de *L. monocytogenes* (S2, S4-2, S12-1 y S7-2), dando lugar a resultados similares que los hallados en el primer ensayo y encontrándose diferencias a nivel de cepa de *L. monocytogenes* frente al efecto de *D. hansenii*. En este sentido, la cepa S2 fue la más resistente al efecto antagonista de las levaduras. Además, la  $a_w$  tuvo un papel influyente en el efecto de *D. hansenii* frente a *L. monocytogenes*. En este sentido, los niveles de inhibición del crecimiento de la bacteria patógena fueron mayores en el medio con la  $a_w$  más baja (0,93), lo cual podría explicarse por el hecho de que estos valores de  $a_w$  se encuentran próximos a los valores mínimos de crecimiento de *L. monocytogenes* (EURL Lm, 2019; Nolan y col., 1992; Vermeulen y col., 2007).

Tras los resultados obtenidos en medio de cultivo elaborado con jamón curado, se evaluó el efecto de *D. hansenii* sobre *L. monocytogenes* en el propio jamón curado. En este caso, se seleccionó únicamente la cepa 258H de *D. hansenii*, la cual mostró una mayor actividad antagonista frente a todos los serotipos de *L. monocytogenes* en alguna de las  $a_w$  ensayadas en el medio elaborado con jamón curado. Cuando se evaluó el efecto de dicha cepa de levadura frente a las 4 cepas de referencia de *L. monocytogenes* en las lonchas de jamón curado, solo las cepas S2 y S4-2 de esta bacteria patógena mostraron una reducción significativa en el crecimiento. Sin embargo, las otras dos cepas de *L. monocytogenes* (S12-1 y S7-2) mostraron un incremento significativo en los recuentos cuando se inocularon con la levadura. Los resultados obtenidos sobre las lonchas de jamón curado fueron similares al efecto de las cepas de *D. hansenii* no seleccionadas en los ensayos sobre el medio elaborado con jamón curado. Se han descrito multitud de efectos antimicrobianos derivados de las levaduras, tales como la producción de compuestos volátiles con actividad antifúngica (Masoud y col., 2005; Núñez y col., 2015) o la producción de proteínas *killer* (Magliani y col., 1997; Marquina y col., 2002) aunque parece ser que su principal mecanismo de acción consiste en la competición por nutrientes

y espacio (Andrade y col. 2014; Simoncini y col. 2014; Virgili y col. 2012; Zhao y col. 2008). Sin embargo, parece ser que la presencia de ambos microorganismos inoculados conjuntamente está favoreciendo el crecimiento de *L. monocytogenes*, dando lugar al efecto contrario al deseado. Un efecto similar ha sido descrito en el trabajo desarrollado por Andrade y col. (2014), donde la presencia de *D. hansenii* co-inoculada con *Penicillium nordicum* en un medio poco favorable para la levadura, ha dado lugar a un mayor crecimiento del moho. Es posible que las células de levadura muertas y lisadas resultantes pudiesen proporcionar nutrientes para el crecimiento del moho (Andrade y col., 2014). En este sentido, a pesar de la tolerancia que presentan las levaduras para crecer en altas concentraciones de sal y valores bajos de  $a_w$  (Breuer y Harms, 2006; Gori y col., 2012; Masoud y Jakobsen, 2005), *L. monocytogenes* podría estar aprovechándose de las células muertas de levadura, favoreciendo su crecimiento. Es muy probable que la actividad proteolítica descrita en *D. hansenii* sobre productos cárnicos curado-madurados, provocando la hidrólisis parcial de proteínas como miosina y actina con la subsiguiente generación de péptidos y aminoácidos libres (Durá y col 2004; Martín y col., 2006a), favorezca el desarrollo de *L. monocytogenes*. Esta fuente alternativa de nutrientes, con el aumento de la disponibilidad de péptidos y aminoácidos libres podría estar favoreciendo el crecimiento de ambos microorganismos co-inoculados (Mellefont y col., 2008). Marshall y Schmidt, (1988) y Tsigarida y col., (2000) demostraron un efecto similar en leche, donde hubo una estimulación en el crecimiento de *L. monocytogenes* debido a la hidrólisis de proteínas lácteas por parte de *Pseudomonas*.

Además de evaluar el efecto sobre el crecimiento de *L. monocytogenes*, se determinó el efecto de la levadura sobre la expresión génica de la bacteria patógena, lo cual puede ser de gran utilidad para comprender la fisiología de este microorganismo en presencia de este posible cultivo protector y por lo tanto, diseñar estrategias de control eficaces frente al mismo (Hadjilouka y col., 2017). Es la primera vez que se evalúa el efecto en la expresión de genes de virulencia de *L. monocytogenes* en presencia de *D. hansenii* utilizado como agente de biocontrol en jamón curado. En este sentido, se evaluó el efecto de *D. hansenii* 258H sobre la expresión relativa de los genes de virulencia *plcA*, *hly* e *iap* de *L. monocytogenes* sobre lonchas de jamón curado (Figura V.3). Inicialmente se estudió la relación entre el crecimiento y la expresión génica de *L. monocytogenes* mediante un análisis de correlación, obteniéndose correlaciones débiles entre el crecimiento y la expresión relativa de los genes de virulencia analizados (valores r: 0,113, -0,235 y 0,028

para los genes *hly*, *plcA* e *iap*, respectivamente), lo cual pone de manifiesto la diferencia de comportamiento de ambos parámetros del microorganismo patógeno.

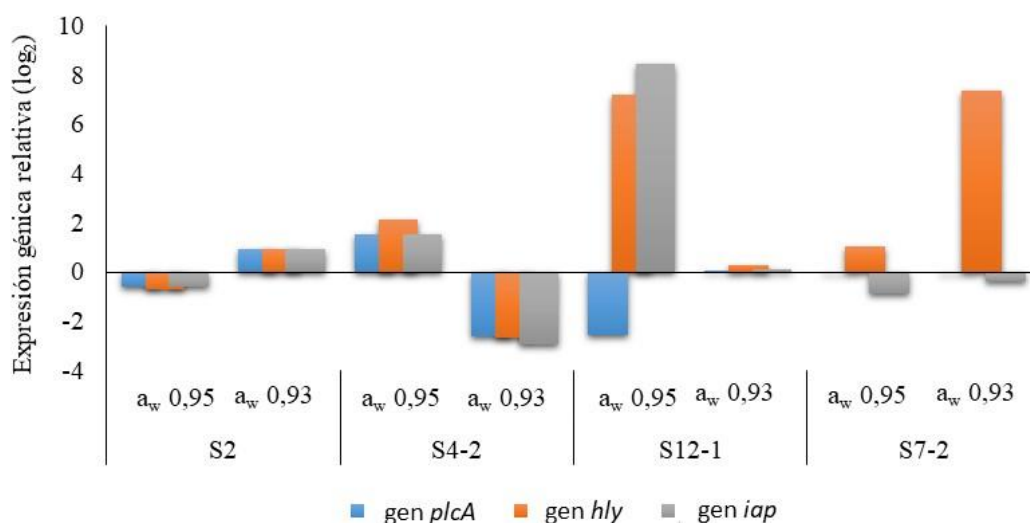


Figura V.3. Efecto de los tratamientos de biocontrol con *Debaryomyces hansenii* 258 H sobre la expresión génica relativa de las cepas S2 (serotipo 1/2a), S4-2 (serotipo 1/2b), S12-1 (serotipo 1/2c) y S7-2 (serotipo 4b) de *Listeria monocytogenes*.

Los resultados obtenidos revelaron diferencias en la expresión génica de *L. monocytogenes* entre los distintos genes de virulencia, las distintas cepas analizadas y las distintas condiciones de  $a_w$  (Figura V.3). De forma generalizada, el incremento en la expresión de los genes *hly* e *iap* de *L. monocytogenes* cuando se inoculó junto con *D. hansenii* coincide con los resultados obtenidos previamente en el ensayo realizado sobre el medio elaborado con jamón curado donde se evaluó el efecto de la  $a_w$ , la temperatura y la concentración de NaCl (apartado V.2.1), donde también se observó un incremento en la expresión de los genes *hly* e *iap* bajo condiciones de estrés osmótico. Sin embargo, estos resultados no concuerdan con estudios previos donde mediante la utilización de un aceite esencial con actividad antagonista frente a *L. monocytogenes* se observó el efecto contrario sobre la expresión génica de estos y de otros genes de virulencia (Hadjilouka y col., 2017; Pieta y col., 2017; Upadhyay y col., 2012).

Antes de proponer la utilización de un cultivo protector es necesario realizar una evaluación sensorial del producto inoculado, aspecto éste que también se evaluó en esta Tesis Doctoral. En la evaluación sensorial de las lonchas inoculadas con *D. hansenii* 258H se consideraron dos características principales a la hora de comprar y consumir un

producto, como son la apariencia visual y el olor del producto. En vista a los resultados obtenidos, la aplicación de *D. hansenii* sobre la superficie de las lonchas de jamón curado tuvo un efecto negativo sobre su apariencia, provocando el rechazo del 90% de los catadores, debido principalmente al crecimiento visible de la levadura sobre la superficie de las lonchas. Para el análisis del olor en las lonchas de jamón curado, se informó a los catadores que tenían que evaluar la intensidad de olor a levadura, definido éste como el olor asociado a procesos fermentativos (Sánchez-Molinero y Arnau, 2008). En dicha evaluación, los catadores no encontraron diferencias entre las lonchas inoculadas y las no inoculadas. Esto indica que los panelistas no encontraron olores desagradables en ninguno de los lotes, lo cual concuerda con los estudios llevados a cabo por Andrade y col. (2009) y Martín y col. (2006a) donde destacan el efecto positivo que tiene *D. hansenii* en el perfil de compuestos volátiles durante el proceso de maduración del jamón curado.

Aunque no se encontraron diferencias en la evaluación del olor, el efecto negativo de la apariencia visual del crecimiento de *D. hansenii* sobre las lonchas de jamón curado, unido a la posible estimulación del crecimiento y al incremento en la expresión de genes de virulencia de *L. monocytogenes*, desaconseja el uso de *D. hansenii* como cultivo protector en jamón curado loncheado. Es necesario tener en cuenta estos posibles efectos negativos de *D. hansenii* dado además que esta levadura forma parte de la población microbiana habitual durante la mayor parte del proceso de elaboración del jamón curado.

La aplicación de los métodos de RT-qPCR para el análisis de la expresión génica de *L. monocytogenes* ha permitido evaluar el efecto de las condiciones propias del jamón curado, así como la aplicación de tratamientos no térmicos y de biocontrol sobre *L. monocytogenes*. Estos análisis resultan necesarios a la luz de los estudios que han demostrado como la expresión génica de este microorganismo patógeno puede verse influenciado por multitud de factores, ya sean propios del alimento (Hadjilouka y col., 2016; Kazmierczak y col., 2003; Liu y col., 2014b; Makariti y col., 2015; Mataragas y col., 2015; Midelet-Bourdin y col., 2006; Olesen y col., 2010; Schrama y col., 2013), derivados de la presencia de determinados compuestos antimicrobianos (Hadjilouka y col., 2017; Pieta y col., 2017; Upadhyay y col., 2012) o bien derivado de la acción de ciertos tratamientos no térmicos (Bowman y col., 2008). En este sentido, los resultados obtenidos tras la evaluación del efecto de las condiciones propias del jamón curado como son la  $a_w$ , la temperatura y la concentración de NaCl afectan de manera significativa al

incremento en la expresión de genes de virulencia de *L. monocytogenes*, principalmente en aquellas condiciones donde la reducción de sal y la  $a_w$  permiten el crecimiento del microorganismo patógeno. Algo similar sucede con la utilización de *D. hansenii* como agente de biocontrol, donde también se produce un incremento en la expresión de los genes de virulencia. De esta manera, aunque no se observa una tendencia particular en la expresión de los genes de virulencia analizados, como sí ocurrió en los estudios llevados a cabo por Hadjilouka y col.(2016) y Rantsiou y col. (2012b), parece que la presencia de *D. hansenii* podría estar incrementando la capacidad virulenta de *L. monocytogenes*. Por otro lado, la tendencia generalizada de los tratamientos no térmicos (HPP y E-beam) es totalmente contraria, dando lugar a la disminución en la expresión de los genes de virulencia en las muestras sometidas a dichos tratamientos durante el tiempo de almacenamiento.

Estos resultados son de gran interés, sobre todo a la hora de utilizar un tratamiento no térmico o de implantar un agente de biocontrol para controlar el crecimiento del microorganismo patógeno y ponen de manifiesto la importancia que tiene la transcripción de genes de virulencia sobre la capacidad invasiva y de supervivencia de *L. monocytogenes* y su posible repercusión en modelos humanos o líneas celulares (Garner y col., 2006a; Kang y col., 2019; Lin y col., 2010; Olesen y col., 2010, 2009). Todo ello sería de gran utilidad para controlar el comportamiento de este microorganismo patógeno desde el punto de vista de la seguridad alimentaria, permitiendo evaluar el efecto de las estrategias de control o de las condiciones propias del jamón curado loncheado sobre la viabilidad del microorganismo patógeno.

## VI. CONCLUSIONES

---





## VI. 1. CONCLUSIONES

1. El método de qPCR múltiple desarrollado en este estudio es capaz de diferenciar y caracterizar de forma sensible, específica y en una sola reacción los 4 serotipos principales y más preocupantes de *L. monocytogenes*.

2. La aplicación de técnicas analíticas adecuadas, tales como el método de qPCR múltiple desarrollado y el análisis de PFGE permite la caracterización de *L. monocytogenes* en zonas de deshuesado, prensado y loncheado de industrias de jamón curado, lo cual hace posible el análisis de las fuentes de contaminación y la detección de cepas persistentes de esta bacteria patógena. Estas herramientas podrían utilizarse para implementar medidas de prevención y control efectivas.

3. La RT-qPCR es una técnica sensible y eficaz capaz de evaluar diferencias en la expresión de los genes relacionados con la virulencia y la respuesta al estrés de *L. monocytogenes* en condiciones relacionadas con la elaboración y conservación del jamón curado. Los resultados obtenidos revelan que la técnica también podría ser de utilidad para evaluar el efecto de tratamientos de control en jamón curado sobre la expresión génica de *L. monocytogenes*.

4. Las condiciones ambientales relacionadas con la  $a_w$ , la presencia de NaCl y la temperatura de almacenamiento del jamón curado afectan significativamente al crecimiento y expresión génica de *L. monocytogenes*.

5. La aplicación de tratamientos no térmicos como las altas presiones provocan un daño subletal que difiere entre cepas y tipo de tratamiento. Además, la presencia de estos factores está ejerciendo un efecto protector contra el tratamiento de HPP e induciendo cambios en la expresión de los genes de virulencia y respuesta al estrés de *L. monocytogenes*.

6. La utilización de *D. hansenii* como cultivo protector en lonchas de jamón curado no inhibe el desarrollo de *L. monocytogenes*, pudiendo incluso favorecer su crecimiento. Además, la utilización de *D. hansenii* favorece la expresión de genes de virulencia de *L.*

*monocytogenes*, lo que limita el uso en este tipo de productos como estrategia de biocontrol.

7. La utilización de herramientas de análisis para la caracterización de *L. monocytogenes* unido a una correcta aplicación de los métodos de limpieza y desinfección puede utilizarse para la prevención y control de *L. monocytogenes* en las plantas de procesado. Estas técnicas pueden combinarse además con la aplicación de tratamientos no térmicos para el control del microorganismo patógeno en jamón curado loncheado, lo cual sería de gran interés para evitar así el peligro asociado a la presencia de *L. monocytogenes* en este tipo de productos RTE.

## VII. BIBLIOGRAFÍA

---



- Aase, B., Sundheim, G., Langsrud, S., Rørvik, L.M., 2000. Occurrence of and a possible mechanism for resistance to a quaternary ammonium compound in *Listeria monocytogenes*. *Int. J. Food Microbiol.* 62, 57–63.
- Abachin, E., Poyart, C., Pellegrini, E., Milohanic, E., Fiedler, F., Berche, P., Trieu-Cuot, P., 2002. Formation of D-alanyl-lipoteichoic acid is required for adhesion and virulence of *Listeria monocytogenes*. *Mol. Microbiol.* 43, 1–14.
- Abay, S., Çakır-Bayram, L., Aydın, F., Müştak, H.K., Diker, K.S., Erol, İ., 2019. Pathogenicity, genotyping and antibacterial susceptibility of the *Listeria* spp. recovered from stray dogs. *Microb. Pathog.* 126, 123–133.
- AESAN, 2010. Informe del Comité Científico de la Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición (AESAN) en relación al efecto de la reducción de la sal en la seguridad microbiológica de los productos cárnicos curados 13, 59–87.
- Aguado-García, J.M., Faggian, F., Jiménez de Anta Losada, M.T., 2005. Infecciones por *Listeria* y *Erysipelothrix*, in: Ausina Ruiz, V., Moreno Guillén, S. (Eds.), *Tratado SEIMC de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*. Medica Panamericana, Buenos Aires-Argentina, pp. 451–456.
- Ahn, D.U., Jo, C., Du, M., Olson, D.G., Nam, K.C., 2000. Quality characteristics of pork patties irradiated and stored in different packaging and storage conditions. *Meat Sci.* 56, 203–209.
- Al-Soud, W.A., Radstrom, P., 2000. Effects of amplification facilitators on diagnostic PCR in the presence of blood, feces, and meat. *J. Clin. Microbiol.* 38, 4463–4470.
- Albano, H., Oliveira, M., Aroso, R., Cubero, N., Hogg, T., Teixeira, P., 2007. Antilisterial activity of lactic acid bacteria isolated from “Alheiras” (traditional Portuguese fermented sausages): In situ assays. *Meat Sci.* 76, 796–800.
- Alessandria, V., Rantsiou, K., Dolci, P., Cocolin, L., 2010. Molecular methods to assess *Listeria monocytogenes* route of contamination in a dairy processing plant. *Int. J. Food Microbiol.* 141, 156–162.
- Alía, A., Andrade, M.J., Rodríguez, A., Reyes-Prieto, M., Bernáldez, V., Córdoba, J.J., 2016. Identification and control of moulds responsible for black spot spoilage in dry-cured ham. *Meat Sci.* 122, 16–24.
- Alía, A., Rodríguez, A., Andrade, M.J., Gómez, F.M., Córdoba, J., 2019. Effect of water activity, NaCl content and temperature on the growth and gene expression of *Listeria monocytogenes* in a dry-cured ham model system. *Meat Sci.* 155, 16–19.
- Allerberger, F., Wagner, M., 2010. Listeriosis: a resurgent foodborne infection. *Clin.*

- Microbiol. Infect. 16, 16–23.
- Amajoud, N., Leclercq, A., Soriano, J.M., Bracq-Dieye, H., El Maadoudi, M., Senhaji, N.S., Kounoun, A., Moura, A., Lecuit, M., Abrini, J., 2018. Prevalence of *Listeria* spp. and characterization of *Listeria monocytogenes* isolated from food products in Tetouan, Morocco. Food Control 84, 436–441.
- Amar, C., 2010. Molecular diagnosis of gastrointestinal pathogens., in: Kesler, H. (Ed.), Molecular diagnostics of Infectious diseases. Gruyter GmbH & Co, Berlin, Germany, pp. 135–154.
- Andrade, M.J., Córdoba, J.J., Casado, E.M., Córdoba, M.G., Rodríguez, M., 2010. Effect of selected strains of *Debaryomyces hansenii* on the volatile compound production of dry fermented sausage “salchichón.” Meat Sci. 85, 256–264.
- Andrade, M.J., Córdoba, J.J., Sánchez, B., Casado, E.M., Rodríguez, M., 2009. Evaluation and selection of yeasts isolated from dry-cured Iberian ham by their volatile compound production. Food Chem. 113, 457–463.
- Andrade, M.J., Rodas, E., Durbán, A., Moya, A., Córdoba, J.J., 2012. Characterization and control of microbial black spot spoilage in dry-cured Iberian ham. Food Control 23, 128–136.
- Andrade, M. J., Rodríguez, M., Casado, E.M., Bermúdez, E., Córdoba, J.J., 2009. Differentiation of yeasts growing on dry-cured Iberian ham by mitochondrial DNA restriction analysis, RAPD-PCR and their volatile compounds production. Food Microbiol. 26, 578–586.
- Andrade, M.J., Thorsen, L., Rodríguez, A., Córdoba, J.J., Jespersen, L., 2014. Inhibition of ochratoxigenic moulds by *Debaryomyces hansenii* strains for biopreservation of dry-cured meat products. Int. J. Food Microbiol. 170, 70–77.
- Andres, A.I., Ventanas, S., Ventanas, J., Cava, R., Ruiz, J., 2005. Physicochemical changes throughout the ripening of dry cured hams with different salt content and processing conditions. Eur. Food Res. Technol. 221, 30–35.
- Angelidis, A.S., Smith, G.M., 2003. Three transporters mediate uptake of glycine betaine and carnitine by *Listeria monocytogenes* in response to hyperosmotic stress. Appl. Environ. Microbiol. 69, 1013–22.
- Arnau, J., Guerrero, L., Casademont, G., Gou, P., 1995. Physical and chemical-changes in different zones of normal and Pse dry-cured ham during processing. Food Chem. 52, 63–69.
- Arnau, J., Guerrero, L., Gou, P., Monfort, J.M., 2001. Tecnología, microbiología y

- principales problemas tecnológicos del jamón curado, in: Martín Bejarano, S. (Ed.), Enciclopedia de La Carne y Los Productos Cárnicos. Madrid, pp. 1177–1204
- Arslan, S., Baytur, S., 2019. Prevalence and antimicrobial resistance of *Listeria* species and subtyping and virulence factors of *Listeria monocytogenes* from retail meat. *J. Food Saf.* 39, 1–10.
- Asefa, D.T., Møretrø, T., Gjerde, R.O., Langsrud, S., Kure, C.F., Sidhu, M.S., Nesbakken, T., Skaar, I., 2009. Yeast diversity and dynamics in the production processes of Norwegian dry-cured meat products. *Int. J. Food Microbiol.* 133, 135–140.
- Augustin, J.C., Carlier, V., 2000. Modelling the growth rate of *Listeria monocytogenes* with a multiplicative type model including interactions between environmental factors. *Int. J. Food Microbiol.* 56, 53–70.
- Autio, T., Keto-Timonen, R., Lundén, J., Björkroth, J., Korkeala, H., 2003. Characterisation of Persistent and Sporadic *Listeria monocytogenes* strains by Pulsed-Field Gel Electrophoresis (PFGE) and Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP). *Syst. Appl. Microbiol.* 26, 539–545.
- Auvolat, A., Besse, N.G., 2016. The challenge of enumerating *Listeria monocytogenes* in food. *Food Microbiol.* 53, 135–149.
- Aymerich, T., Picouet, P.A., Monfort, J.M., 2008. Decontamination technologies for meat products. *Meat Sci.* 78, 114–129.
- Azizoglu, R.O., Kathariou, S., 2010. Inactivation of a cold-induced putative RNA helicase gene of *Listeria monocytogenes* is accompanied by failure to grow at low temperatures but does not affect freeze-thaw tolerance. *J. Food Prot.* 73, 1474–1479.
- Aznar, R., Alarcón, B., 2003. PCR detection of *Listeria monocytogenes*: A study of multiple factors affecting sensitivity. *J. Appl. Microbiol.* 95, 958–966.
- Baccus-Taylor, G., Glass, K.A., Luchansky, J.B., Maurer, A.J., 1993. Fate of *Listeria monocytogenes* and pediococcal starter cultures during the manufacture of chicken summer sausage. *Poult. Sci.* 72, 1772–1778.
- Bae, D., Liu, C., Zhang, T., Jones, M., Peterson, S.N., Wang, C., 2012. Global gene expression of *Listeria monocytogenes* to salt stress. *J. Food Prot.* 75, 906–912.
- Bale, M.J., Bennett, P.M., Beringer, J.E., Hinton, M., 1993. The survival of bacteria exposed to desiccation on surfaces associated with farm buildings. *J. Appl. Bacteriol.* 75, 519–528.
- Barmpalia-Davis, I.M., Geornaras, I., Kendall, P.A., Sofos, J.N., 2008. Survival of

- Listeria monocytogenes* in a simulated dynamic gastrointestinal model during storage of inoculated bologna and salami slices in vacuum packages. *J. Food Prot.* 71, 2014–2023.
- Baumann, A.R., Martin, S.E., Feng, H., 2005. Power ultrasound treatment of *Listeria monocytogenes* in apple cider. *J. Food Prot.* 68, 2333–40.
- Beales, N., 2004. Adaptation of microorganisms to cold temperatures, weak acid preservatives, low pH, and osmotic stress: a review. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* 3, 1–20.
- Begley, M., Sleator, R.D., Gahan, C.G.M., Hill, C., 2005. Gastrointestinal persistence and bile tolerance of *Listeria monocytogenes*. *Infect. Immun.* 73, 894–904.
- Bernáldez, V., Córdoba, J.J., Andrade, M.J., Alía, A., Rodríguez, A., 2017. Selection of reference genes to quantify relative expression of ochratoxin A-related genes by *Penicillium nordicum* in dry-cured ham. *Food Microbiol.* 68, 104–111.
- Berzins, A., Hellstrom, S., Silins, I., Korkeala, H., 2010. Contamination patterns of *Listeria monocytogenes* in cold-smoked pork processing. *J. Food Prot.* 73, 2103–2109.
- Besse, G.N., Barre, L., Buhariwalla, C., Vignaud, M.L., Khamissi, E., Decourseulles, E., Nirsimloo, M., Chelly, M., Kalmokoff, M., 2010. The overgrowth of *Listeria monocytogenes* by other *Listeria* spp. in food samples undergoing enrichment cultivation has a nutritional basis. *Int. J. Food Microbiol.* 136, 345–351.
- Bhagwat, A.A., 2003. Simultaneous detection of *Escherichia coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes* and *Salmonella* strains by real-time PCR. *Int. J. Food Microbiol.* 84, 217–224.
- Boadas, C., Gou, P., Guardia, D., Arnau, J., 2000. Efecto de la dextrosa y de dos sistemas de inoculación de un cultivo iniciador en las propiedades sensoriales del jamón curado, in: Monfort, J.M. (Ed.), II Symposium International Del Jamón Curado. Estrategias Alimentarias, S.L.-Eurocarne, Madrid, pp. 90–91.
- Bolocan, A.S., Nicolau, A.I., Alvarez-Ordóñez, A., Borda, D., Oniciuc, E.A., Stessl, B., Gurgu, L., Wagner, M., Jordan, K., 2016. Dynamics of *Listeria monocytogenes* colonisation in a newly-opened meat processing facility. *Meat Sci.* 113, 26–34.
- Bolocan, A.S., Oniciuc, E.A., Alvarez-Ordóñez, A., Wagner, M., Rychli, K., Jordan, K., Nicolau, A.I., 2015. Putative cross-contamination routes of *Listeria monocytogenes* in a meat processing facility in Romania. *J. Food Prot.* 78, 1664–1674.
- Bonazzi, M., Lecuit, M., Cossart, P., 2009. *Listeria monocytogenes* internalin and E-



- cadherin: From structure to pathogenesis. *Cell. Microbiol.* 11, 693–702.
- Borucki, M.K., Call, D.R., 2003. *Listeria monocytogenes* serotype Identification by PCR. *J. Clin. Microbiol.* 41, 5537–5540.
- Bover-Cid, S., Belletti, N., Aymerich, T., Garriga, M., 2017. Modelling the impact of water activity and fat content of dry-cured ham on the reduction of *Salmonella enterica* by high pressure processing. *Meat Sci.* 123, 120–125. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2016.09.014>
- Bover-Cid, S., Belletti, N., Aymerich, T., Garriga, M., 2015. Modeling the protective effect of  $a_w$  and fat content on the high pressure resistance of *Listeria monocytogenes* in dry-cured ham. *Food Res. Int.* 75, 194–199.
- Bover-Cid, S., Belletti, N., Garriga, M., Aymerich, T., 2011. Model for *Listeria monocytogenes* inactivation on dry-cured ham by high hydrostatic pressure processing. *Food Microbiol.* 28, 804–809.
- Bover-cid, S., Garriga, M., 2014. Condiciones que determinan el crecimiento y la supervivencia de *Listeria monocytogenes* en alimentos listos para el consumo. Monells, España.
- Bover-Cid, S., Serra-Castelló, C., Dalgaard, P., Garriga, M., Jofré, A., 2019. New insights on *Listeria monocytogenes* growth in pressurised cooked ham: A piezo-stimulation effect enhanced by organic acids during storage. *Int. J. Food Microbiol.* 290, 150–158.
- Bowman, J.P., Bittencourt, C.R., Ross, T., 2008. Differential gene expression of *Listeria monocytogenes* during high hydrostatic pressure processing. *Microbiology* 154, 462–475.
- Bowman, J.P., Chang, K.J.L., Pinfold, T., Ross, T., 2010. Transcriptomic and phenotypic responses of *Listeria monocytogenes* strains possessing different growth efficiencies under acidic conditions. *Appl. Environ. Microbiol.* 76, 4836–4850.
- Bredeche, M.F., Ehrlich, S.D., Michel, B., 2001. Viability of rep recA mutants depends on their capacity to cope with spontaneous oxidative damage and on the Dnak chaperone protein. *J. Bacteriol.* 183, 2165–2171.
- Brenot, A., King, K.Y., Caparon, M.G., 2005. The PerR regulon in peroxide resistance and virulence of *Streptococcus pyogenes*. *Mol. Microbiol.* 55, 221–234.
- Breuer, U., Harms, H., 2006. *Debaryomyces hansenii*-an extremophilic yeast with biotechnological potential. *Yeast* 23, 415–37.
- Bruschi, C., Komora, N., Castro, S.M., Saraiva, J., Ferreira, V.B., Teixeira, P., 2017. High

- hydrostatic pressure effects on *Listeria monocytogenes* and *L. innocua*: Evidence for variability in inactivation behaviour and in resistance to pediocin bacHA-6111-2. *Food Microbiol.* 64, 226–231.
- Buchanan, R.L., Edelson, S.G., 1996. Culturing enterohemorrhagic *Escherichia coli* in the presence and absence of glucose as a simple means of evaluating the acid tolerance of stationary-phase cells. *Appl. Environ. Microbiol.* 62, 4009–13.
- Buchanan, Robert L., Gorris, L.G.M., Hayman, M.M., Jackson, T.C., Whiting, R.C., 2017. A review of *Listeria monocytogenes*: an update on outbreaks, virulence, dose-response, ecology, and risk assessments. *Food Control* 75, 1–13.
- Burall, L.S., Laksanalamai, P., Datta, A.R., 2012. *Listeria monocytogenes* mutants with altered growth phenotypes at refrigeration temperature and high salt concentrations. *Appl. Environ. Microbiol.* 78, 1265–1272.
- Burall, L.S., Simpson, A.C., Chou, L., Laksanalamai, P., Datta, A.R., 2015. A novel gene, *lstC*, of *Listeria monocytogenes* is implicated in high salt tolerance. *Food Microbiol.* 48, 72–82.
- Burbano, R.P., Carrascal, A.K., Arango, J.L.P., Bautista, J.L.R., 2019. Assessment of a multiplex detection method for *Salmonella enterica*, *Escherichia coli* O157:H7, and *Listeria monocytogenes* in cow milk. *Univ. Sci.* 24, 277–294.
- Burgess, C.M., Gianotti, A., Gruzdev, N., Holah, J., Knøchel, S., Lehner, A., Margas, E., Esser, S.S., Sela Saldinger, S., Tresse, O., 2016. The response of foodborne pathogens to osmotic and desiccation stresses in the food chain. *Int. J. Food Microbiol.* 221, 37–53.
- Bustin, S.A., 2000. Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. *J. Mol. Endocrinol.* 25, 169–93.
- Bustin, S.A., Nolan, T., 2004. Pitfalls of quantitative real-time reverse-transcription polymerase chain reaction. *J. Biomol. Tech.* 15, 155–166.
- Cady, N.C., Stelick, S., Kunnavakkam, M. V., Batt, C.A., 2005. Real-time PCR detection of *Listeria monocytogenes* using an integrated microfluidics platform. *Sensors Actuators, B Chem.* 107, 332–341.
- Camejo, A., Carvalho, F., Reis, O., Leitão, E., Sousa, S., Cabanes, D., 2011. The arsenal of virulence factors deployed by *Listeria monocytogenes* to promote its cell infection cycle. *Virulence* 2, 379–394.
- Campanini, M., Pedrazzoni, I., Barbuti, S., Baldini, P., 1993. Behaviour of *Listeria monocytogenes* during the maturation of naturally and artificially contaminated

- salami: effect of lactic-acid bacteria starter cultures. *Int. J. Food Microbiol.* 20, 169–175.
- Cano-García, L., Flores, M., Belloch, C., 2013. Molecular characterization and aromatic potential of *Debaryomyces hansenii* strains isolated from naturally fermented sausages. *Food Res. Int.* 52, 42–49.
- Carloni, E., Rotundo, L., Brandi, G., Amagliani, G., 2018. Rapid and simultaneous detection of *Salmonella* spp., *Escherichia coli* O157, and *Listeria monocytogenes* by magnetic capture hybridization and multiplex real-time PCR. *Folia Microbiol. (Praha)*. 63, 735–742.
- Carpentier, B., Cerf, O., 2011. Review - Persistence of *Listeria monocytogenes* in food industry equipment and premises. *Int. J. Food Microbiol.* 145, 1–8.
- Cartwright, E.J., Jackson, K.A., Johnson, S.D., Graves, L.M., Silk, B.J., Mahon, B.E., 2013. Listeriosis outbreaks and associated food vehicles, United States, 1998-2008. *Emerg. Infect. Dis.* 19, 1–9.
- Carvalho, F.T., Vieira, B.S., Vallim, D.C., Carvalho, L.A., Carvalho, R.C.T., Pereira, R.C.L., Figueiredo, E.E.S., 2019. Genetic similarity, antibiotic resistance and disinfectant susceptibility of *Listeria monocytogenes* isolated from chicken meat and chicken-meat processing environment in Mato Grosso, Brazil. *LWT - Food Sci. Technol.* 109, 77–82.
- Cavicchioli, V.Q., Camargo, A.C., Todorov, S.D., Nero, L.A., Maoz, A., Mayr, R., Scherer, S., Martinis, E.C.P., Públio, M.R.P., Santarosa, P.R., Freitas, F.Z., Goerges, S., Koslowsky, M., Velagic, S., Borst, N., Bockelmann, W., Heller, K.J., Scherer, S., 2001. Antilisterial activity of lactic acid bacteria isolated from vacuum-packaged brazilian meat and meat products. *Brazilian J. Microbiol.* 32, 32–37.
- CDC.gog, 2019. Pulsed-field gel electrophoresis (PFGE). URL <https://www.cdc.gov/pulsenet/pathogens/pfge.html>
- Cebrián, G., Mañas, P., Condón, S., 2016. Comparative resistance of bacterial foodborne pathogens to non-thermal technologies for food preservation. *Front. Microbiol.* 7, 734.
- Chan, Y.C., Hu, Y., Chaturongakul, S., Files, D.K., Bowen, M.B., Boor, J.K., Wiedman, M., 2008. Contributions of two-component regulatory systems, alternative  $\sigma$  factors, and negative regulators to *Listeria monocytogenes* cold adaptation and cold growth. *J Food Prot* 71, 420–425.
- Chan, Y.C., Raengpradub, S., Boor, K.J., Wiedmann, M., 2007. Microarray-based

- characterization of the *Listeria monocytogenes* cold regulon in log- and stationary-phase cells. *Appl. Environ. Microbiol.* 73, 6484–6498.
- Chassaing, D., Auvray, F., 2007. The *lmo1078* gene encoding a putative UDP-glucose pyrophosphorylase is involved in growth of *Listeria monocytogenes* at low temperature. *FEMS Microbiol. Lett.* 275, 31–37.
- Chasseignaux, E., Toquin, M.T., Ragimbeau, C., Salvat, G., Colin, P., Ermel, G., 2001. Molecular epidemiology of *Listeria monocytogenes* isolates collected from the environment, raw meat and raw products in two poultry- and pork-processing plants. *J. Appl. Microbiol.* 91, 888–899.
- Chaturongakul, S., Boor, K.J., 2006.  $\sigma^B$  activation under environmental and energy stress conditions in *Listeria monocytogenes*. *Appl. Environ. Microbiol.* 72, 5197–5203.
- Chaturongakul, S., Raengpradub, S., Wiedmann, M., Boor, K.J., 2008. Modulation of stress and virulence in *Listeria monocytogenes*. *Trends Microbiol.* 16, 388–396.
- Chemaly, M., Toquin, M.T., Le Notre, Y., Fravallo, P., 2008. Prevalence of *Listeria monocytogenes* in poultry production. *J. Food Prot.* 71, 1996–2000.
- Chen, J., Jiang, L., Chen, Q., Zhao, H., Luo, X., Chen, X., Fang, W., 2009. *lmo0038* is involved in acid and heat stress responses and specific for *Listeria monocytogenes* lineages I and II, and *Listeria ivanovii*. *Foodborne Pathog. Dis.* 6, 365–376.
- Chen, J., Regan, P., Laksanalamai, P., Healey, S., Hu, Z., 2017. Prevalence and methodologies for detection, characterization and subtyping of *Listeria monocytogenes* and *L. ivanovii* in foods and environmental sources. *Food Sci. Hum. Wellness* 6, 97–120.
- Chen, L., Zhang, H., Liu, Q., Pang, X., Zhao, X., Yang, H., 2019. Sanitising efficacy of lactic acid combined with low-concentration sodium hypochlorite on *Listeria innocua* in organic broccoli sprouts. *Int. J. Food Microbiol.* 295, 41–48.
- Chen, Y., Knabel, S.J., 2008. Strain typing, in: CRC Press (Ed.), *Handbook of Listeria monocytogenes*. Boca Raton, Florida, EEUU, pp. 203–240.
- Chen, Y., Knabel, S.J., 2007. Multiplex PCR for simultaneous detection of bacteria of the genus *Listeria*, *Listeria monocytogenes*, and major serotypes and epidemic clones of *L. monocytogenes*. *Appl. Environ. Microbiol.* 73, 6299–6304.
- Chen, Y., Ross, W.H., Scott, V.N., Gombas, D.E., 2003. *Listeria monocytogenes*: low levels equal low risk. *J. Food Prot.* 66, 570–7.
- Chlebicz, A., Śliżewska, K., 2018. Campylobacteriosis, salmonellosis, yersiniosis, and listeriosis as zoonotic foodborne pathogens: A review. *Int. J. Environ. Res. Public*

- Health 15, 1–28.
- Cho, G.L., Ha, J.W., 2019. Application of X-ray for inactivation of foodborne pathogens in ready-to-eat sliced ham and mechanism of the bactericidal action. *Food Control* 96, 343–350.
- Christiansen, J.K., Larsen, M.H., Ingmer, H., Søgaaard-Andersen, L., Kallipolitis, B.H., C, D.F., 2004. The RNA-binding protein Hfq of *Listeria monocytogenes*: role in stress tolerance and virulence. *J. Bacteriol.* 186, 3355–3362.
- Cocolin, L., Rajkovic, A., Rantsiou, K., Uyttendaele, M., 2011. The challenge of merging food safety diagnostic needs with quantitative PCR platforms. *Trends Food Sci. Technol.* 22, S30–S38.
- Cocolin, L., Rantsiou, K., Iacumin, L., Cantoni, C., Comi, G., 2002. Direct identification in food samples of *Listeria* spp. and *Listeria monocytogenes* by molecular methods. *Appl. Environ. Microbiol.* 68, 6273–6282.
- Coelho, M.C., Silva, C.C.G., Ribeiro, S.C., Dapkevicius, M.L.N.E., Rosa, H.J.D., 2014. Control of *Listeria monocytogenes* in fresh cheese using protective lactic acid bacteria. *Int. J. Food Microbiol.* 191, 53–59.
- Collins, B., Curtis, N., Cotter, P.D., Hill, C., Ross, R.P., 2010. The ABC transporter AnrAB contributes to the innate resistance of *Listeria monocytogenes* to nisin, bacitracin, and various  $\beta$ -lactam antibiotics. *Antimicrob. Agents Chemother.* 54, 4416–4423.
- Cabeza, M., Cambero, I., de la Hoz, L., Ordóñez, J.A., 2007. Optimization of E-beam irradiation treatment to eliminate *Listeria monocytogenes* from ready-to-eat (RTE) cooked ham. *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.* 8, 299–305.
- Conficoni, D., Losasso, C., Cortini, E., Cesare, A. Di, Cibir, V., Giaccone, V., Corno, G., Ricci, A., 2016. Resistance to biocides in *Listeria monocytogenes* collected in meat-processing environments. *Front. Microbiol.* 7, 1–9.
- Corral, S., Salvador, A., Belloch, C., Flores, M., 2015. Improvement the aroma of reduced fat and salt fermented sausages by *Debaromyces hansenii* inoculation. *Food Control* 47, 526–535.
- Corral, S., Salvador, A., Belloch, C., Flores, M., 2014. Effect of fat and salt reduction on the sensory quality of slow fermented sausages inoculated with *Debaryomyces hansenii* yeast. *Food Control* 45, 1–7.
- Cossart, P., Vicente, M.F., Mengaud, J., Baquero, F., Perez-Diaz, J.C., Berche, P., 1989. Listeriolysin O is essential for virulence of *Listeria monocytogenes*: direct evidence

- obtained by gene complementation. *Infect. Immun.* 57, 3629–3636.
- Cotter, P.D., Emerson, N., Gahan, C.G.M., Hill, C., 1999. Identification and disruption of *lisRK*, a genetic locus encoding a two-component signal transduction system involved in stress tolerance and virulence in *Listeria monocytogenes*. *J. Bacteriol.* 181, 6840–6843.
- Cotter, P.D., Gahan, C.G., Hill, C., 2000. Analysis of the role of the *Listeria monocytogenes* F<sub>0</sub>F<sub>1</sub>-AtPase operon in the acid tolerance response. *Int. J. Food Microbiol.* 60, 137–46.
- D'amico, D.J., Druart, M.J., Donnelly, C.W., 2008. 60-day aging requirement does not ensure safety of surface-mold-ripened soft cheeses manufactured from raw or pasteurized milk when *Listeria monocytogenes* is introduced as a postprocessing contaminant. *J. Food Prot.* 71, 1563–1571.
- Daher, D., Gourrierc, S. Le, Pérez-Lamela, C., 2017. Effect of high pressure processing on the microbial inactivation in fruit preparations and other vegetable based beverages. *Agriculture* 7, 72.
- Dauphin, G., Ragimbeau, C., Malle, P., 2001. Use of PFGE typing for tracing contamination with *Listeria monocytogenes* in three cold-smoked salmon processing plants. *Int. J. Food Microbiol.* 64, 51–61.
- Davidson, P.M., Harrison, M.A., 2002. Resistance and adaptation to food antimicrobials, sanitizers, and other process controls. *Food Technol.* 56, 69–78.
- De Alba, M., Bravo, D., Medina, M., 2013. Inactivation of *Escherichia coli* O157: H7 in dry-cured ham by high-pressure treatments combined with biopreservatives. *Food Control* 31, 508–513.
- De Jesús, A.J., Whiting, R.C., 2016. Thermal inactivation, growth, and survival studies of *Listeria monocytogenes* strains belonging to three distinct genotypic lineages. *J. Food Prot.* 66, 1611–1617.
- De las Heras, A., Cain, R.J., Bielecka, M.K., Vazquez-Boland, J.A., 2011. Regulation of *Listeria* virulence: PrfA master and commander. *Curr. Opin. Microbiol.* 14, 118–127.
- De Santis, E.P.L., Pilo, A.L., Cosseddu, A.M., Canu, N.A., Scarano, C., Marongiu, P., 2007. Multiplex PCR for the identification and serotyping of *L. monocytogenes* isolated from sheep cheese-processing plants. *Vet. Res. Commun.* 31, 359–363.
- Dheda, K., Huggett, J.F., Bustin, S.A., Johnson, M.A., Rook, G., Zumla, A., 2004. Validation of housekeeping genes for normalizing RNA expression in real-time

- PCR. *Biotechniques*. 37, 112-119.
- Dice, L.R., 1945. Measures of the amount of ecologic association between species. *Ecology* 26, 297–302.
- Dieuleveux, V., Van Der Pyl, D., Chataud, J., Gueguen, M., 1998. Purification and characterization of anti-*Listeria* compounds produced by *Geotrichum candidum*. *Appl. Environ. Microbiol.* 64, 800–803.
- Dons, L., Rasmussen, O.F., Olsen, J.E., 1992. Cloning and characterization of a gene encoding flagellin of *Listeria monocytogenes*. *Mol. Microbiol.* 6, 2919–2929.
- Doumith, M., Buchrieser, C., Glaser, P., Jacquet, C., Martin, P., 2004. Differentiation of the Major *Listeria monocytogenes* serovars by Multiplex PCR. *J. Clin. Microbiol.* 42, 3819–3822.
- Du, L., Liu, F., Zhao, P., Zhao, T., Doyle, M.P., 2017. Characterization of *Enterococcus durans* 152 bacteriocins and their inhibition of *Listeria monocytogenes* in ham. *Food Microbiol.* 68, 97–103.
- Ducey, F.T., Page, B., Usgaard, T., Borucki, M.K., Pupedis, K., Ward, T.J., 2007. A single-nucleotide-polymorphism-based multilocus genotyping assay for subtyping lineage I isolates of *Listeria monocytogenes*. *Appl. Environ. Microbiol.* 73, 133–147.
- Durá A., Flores, M., Toldrá, F., 2004. Effect of *Debaryomyces* spp. on the proteolysis of dry-fermented sausage. *Meat Sci.* 68, 319–328.
- Dussurget, O., 2008. New insights into determinations of *Listeria monocytogenes* virulence. *Int. Rev. Cell Mol. Biol.* 270, 1–38.
- Dussurget, O., Cabanes, D., Dehoux, P., Lecuit, M., Buchrieser, C., Glaser, P., Cossart, P., 2002. *Listeria monocytogenes* bile salt hydrolase is a PrfA-regulated virulence factor involved in the intestinal and hepatic phases of listeriosis. *Mol. Microbiol.* 45, 1095–1106.
- Dussurget, O., Dumas, E., Archambaud, C., Chafsey, I., Chambon, C., Hébraud, M., Cossart, P., 2005. *Listeria monocytogenes* ferritin protects against multiple stresses and is required for virulence. *FEMS Microbiol. Lett.* 250, 253–261.
- EFSA BIOHAZ Panel (EFSA Panel on Biological hazards), Ricci, A., Allende, A., Bolton, D., Chemaly, M., Davies, R., Girones, R., Herman, L., Koutsoumanis, K., Lindqvist, R., Norrung, B., Robertson, L., Ru, G., Sanaa, M., Simmons, M., Skandamis, P., Snary, E., Speybroek, N., Ter Kuile, B., Threlfall, J., Wahlström, H., Cocconcelli, P., Klein, G. (deceased), Prieto Maradona, M., Querol, A., Peixe, L.,

- Suarez, J., Sundh, I., Vlak, J., Aguilera-Gómez, M., Barizzone, F., Brozzi, R., Correia, S., Heng, L., Istace, F., Lythgo, C., Fernández Escámez, P., 2017. Scientific opinion on the update of the list of QPS-recommended biological agents intentionally added to food or feed as notified to EFSA. *EFSA J.* 15, 1–178.
- EFSA BIOHAZ Panel, Ricci, A., Allende, A., Bolton, D., Chemaly, M., Davies, R., Fernández Escamez, P., Girones, R., Herman, L., Koutsoumanis, K., Norrung, B., Robertson, L., Ru, G., Sanaa, M., Simmons, M., Skandamis, P., Snary, E., Speybroeck, N., Ter Kuile, B., Threlfall, J., Wahlström, H., Takkinen, J., Wagner, M., Arcella, D., Da Silva Felicio, M., Georgiadis, M., Messens, W., Lindqvist, R., 2018. Scientific opinion on the *Listeria monocytogenes* contamination of ready-to-eat foods and the risk for human health in the EU. *EFSA J.* 16, 1–173.
- EFSA, ECDC, 2018a. The European Union Summary report on trends and sources of zoonoses and zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2017. *EFSA J.* 16, 1–262.
- EFSA, ECDC, 2017. The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2016. *EFSA J.* 15, 1–228.
- EFSA, ECDC, 2015a. The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2013. *EFSA J.* 16, 1–165.
- EFSA, ECDC, 2015b. The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2014. *EFSA J.* 13, 1–190.
- EFSA, ECDC, 2014. The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2012. *EFSA J.* 16, 1–312.
- EFSA, ECDC, 2013. The European Union Summary Report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2011. *EFSA J.* 11, 1–250.
- EFSA, ECDC, 2012. The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2010. *EFSA J.* 10, 1–442.
- EFSA, ECDC, 2011. The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2009. *EFSA J.* 9, 1–378.
- EFSA, ECDC, 2010. Trends and Sources of Zoonoses and Zoonotic Agents and Food-borne Outbreaks in the European Union in 2008, *EFSA Journal*.
- El-Sayed, O.M., Moustafa, A.E.H., Abdeen, E., Amin, A.S., 2019. Simultaneous detection of *Brucella*, *Leptospira*, *Mycoplasma* and *Listeria* species by multiplex-PCR. *Alexandria J. Vet. Sci.* 61, 52.
- Elbein, A.D., Pan, Y.T., Pastuszak, I., Carroll, D., 2003. New insights on trehalose: a multifunctional molecule. *Glycobiology* 13, 17–27.



- Ells, T.C., Hansen, L., 2011. Increased thermal and osmotic stress resistance in *Listeria monocytogenes* 568 grown in the presence of trehalose due to inactivation of the phosphotrehalase-encoding gene *treA*. *Appl. Environ. Microbiol.* 77, 6841–6851.
- Eraclio, G., Vegt, B. De, Mierlo, J. Van, Sirdesai, S., Peterson, R., 2018. Synergistic effect of phages and organic acid salts on *Listeria* contaminated ready to eat turkey ham. *Meat Muscle Biol.* 2, 132-132.
- Erkmen, O., Dogan, C., 2004. Effects of ultra high hydrostatic pressure on *Listeria monocytogenes* and natural flora in broth, milk and fruit juices. *Int. J. Food Sci. Technol.* 39, 91–97.
- Esbelin, J., Santos, T., Hébraud, M., 2018. Desiccation: an environmental and food industry stress that bacteria commonly face. *Food Microbiol.* 69, 82–88.
- EURL Lm, 2019. Technical guidance document for conducting shelf-life studies on *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat foods. <https://sites.anses.fr/en/system/files/LIS-Cr-201909D2.pdf>.
- Evers, S., Quintilianijr, R., Courvalin, P., 1969. Genetics of glycopeptide resistance in *Enterococci*. *Microb. Drug Resist.* 2, 219–223.
- Evrendilek, G.A., Koca, N., Harper, J.W., Balasubramaniam, V.M., 2008. High-pressure processing of Turkish white cheese for microbial inactivation. *J. Food Prot.* 71, 102–108.
- Fagerlund, A., Moretro, T., Heir, E., Briandet, R., Langsrud, S., 2017. Cleaning and disinfection of biofilms composed of *Listeria monocytogenes*. *Appl. Environ. Microbiol.* 83, 1–21.
- Faleiro, M.L., Andrew, P.W., Power, D., 2003. Stress response of *Listeria monocytogenes* isolated from cheese and other foods. *Int. J. Food Microbiol.* 84, 207–16.
- FAO/OMS, 2004. Evaluación de riesgos de *Listeria monocytogenes* en alimentos listos para consumo, in: Serie FAO/OMS sobre evaluación de riesgos microbiológicos, N° 4.
- Farber, J.M., Peterkin, P.I., 1991. *Listeria monocytogenes*, a food-borne pathogen. *Microbiol. Rev.* 55, 476–511.
- Faticenti, F., Bergere, J.L., Deiana, P., Farris, G.A., 1983. Antagonistic activity of *Debaryomyces hansenii* towards *Clostridium tyrobutyricum* and *Cl. butyricum*. *J. Dairy Res.* 50, 449–457.
- Ferradás, Y., Rey, L., Martínez, Ó., Rey, M., González, M.V., 2016. Identification and validation of reference genes for accurate normalization of real-time quantitative

- PCR data in kiwifruit. *Plant Physiol. Biochem.* 102, 27–36.
- Ferreira, V., Barbosa, J., Stasiewicz, M., Vongkamjan, K., Switt, A.M., Hogg, T., Gibbs, P., Teixeira, P., Wiedmann, M., 2011. Diverse geno- and phenotypes of persistent *Listeria monocytogenes* isolates from fermented meat sausage production facilities in Portugal. *Appl. Environ. Microbiol.* 77, 2701–2715.
- 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. *J. Food Prot.* 77, 150–170.
- Figueiredo, A.C.L., Almeida, R.C.C., 2017. Antibacterial efficacy of nisin, bacteriophage P100 and sodium lactate against *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat sliced pork ham. *Brazilian J. Microbiol.* 48, 724–729.
- Filipello, V., Gallina, S., Amato, E., Losio, M.N., Pontello, M., Decastelli, L., Lomonaco, S., 2017. Diversity and persistence of *Listeria monocytogenes* within the Gorgonzola PDO production chain and comparison with clinical isolates from the same area. *Int. J. Food Microbiol.* 245, 73–78.
- Fiorini, F., Stefanini, S., Valenti, P., Chiancone, E., De Biase, D., 2008. Transcription of the *Listeria monocytogenes* *fri* gene is growth-phase dependent and is repressed directly by Fur, the ferric uptake regulator. *Gene* 410, 113–121.
- Fisher, C.W., Lee, D., Dodge, B.A., Hamman, K.M., Robbins, J.B., Martin, S.E., 2000. Influence of catalase and superoxide dismutase on ozone inactivation of *Listeria monocytogenes*. *Appl. Environ. Microbiol.* 66, 1405–1409.
- Fleischman, G.J., Ravishankar, S., Balasubramaniam, V.M., 2004. The inactivation of *Listeria monocytogenes* by pulsed electric field (PEF) treatment in a static chamber. *Food Microbiol.* 21, 91–95.
- Flessa, S., Lusk, D.M., Harris, L.J., 2005. Survival of *Listeria monocytogenes* on fresh and frozen strawberries. *Int. J. Food Microbiol.* 101, 255–262.
- Food Safety Authority of Ireland, 2005. The control and management of *Listeria monocytogenes* contamination of food, Food Safety Authority of Ireland. Dublin, Ireland.  
<https://www.lenus.ie/bitstream/handle/10147/44799/6360.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- Fox, E.M., Leonard, N., Jordan, K., 2011. Physiological and transcriptional characterization of persistent and nonpersistent *Listeria monocytogenes* isolates. *Appl. Environ. Microbiol.* 77, 6559–6569.

- França, M.B., Panek, A.D., Eleutherio, E.C.A., 2007. Oxidative stress and its effects during dehydration. *Comp. Biochem. Physiol. A Mol. Integr. Physiol.* 146, 621–631.
- Fraser, K.R., Harvie, D., Coote, P.J., O’Byrne, C.P., 2000. Identification and characterization of an ATP binding cassette L-carnitine transporter in *Listeria monocytogenes*. *Appl. Environ. Microbiol.* 66, 4696–704.
- Fratamico, P.M., Bayles, D.O., 2005. Molecular approaches for detection, identification and analysis of foodborne pathogens., in: Fratamico, P.M., Bhunia, A.K., Smith, J.L. (Eds.), *Foodborne Pathogens: Microbiology and Molecular Biology*. Horizon Scientific Press, Norfolk, Reino Unido, pp. 1–15.
- Fugget, E.B., Schoonmaker-Bopp, D., Dumas, N.B., Corby, J., Wiedmann, M., 2007. Pulsed-Field Gel Electrophoresis (PFGE) analysis of temporally matched *Listeria monocytogenes* isolates from human clinical cases, foods, ruminant farms, and urban and natural environments reveals source-associated as well as widely distributed PFGE types. *J. Clin. Microbiol.* 45, 865–873.
- Ganan, M., Hierro, E., Hospital, X.F., Barroso, E., Fernández, M., 2013. Use of pulsed light to increase the safety of ready-to-eat cured meat products. *Food Control* 32, 512–517.
- Gao, Y., Li, D., Liu, X., 2015. Effects of *Lactobacillus sakei* C2 and sakacin C2 individually or in combination on the growth of *Listeria monocytogenes*, chemical and odor changes of vacuum-packed sliced cooked ham. *Food Control* 47, 27–31.
- García-Fontana, C., Narváez-Reinaldo, J.J., Castillo, F., González-López, J., Luque, I., Manzanera, M., 2016. A new physiological role for the DNA molecule as a protector against drying stress in desiccation-tolerant microorganisms. *Front. Microbiol.* 7, 1–12.
- García, C., Martín, A., Timón, M.L., Córdoba, J.J., 2000. Microbial populations and volatile compounds in the “bone taint” spoilage of dry cured ham. *Lett. Appl. Microbiol.* 30, 61–66.
- García, D., Gómez, N., Mañas, P., Condón, S., Raso, J., Pagán, R., 2005. Occurrence of sublethal injury after pulsed electric fields depending on the micro-organism, the treatment medium pH and the intensity of the treatment investigated. *J. Appl. Microbiol.* 99, 94–104.
- Gardan, R., Cossart, P., Labadie, J., 2003. Identification of *Listeria monocytogenes* genes involved in salt and alkaline-pH tolerance. *Appl. Environ. Microbiol.* 69, 3137–3143.

- Garmyn, D., Augagneur, Y., Gal, L., Vivant, A.L., Piveteau, P., 2012. *Listeria monocytogenes* differential transcriptome analysis reveals temperature-dependent Agr regulation and suggests overlaps with other regulons. PLoS One 7, e43154.
- Garner, R., James, K.E., Callahan, M.C., Wiedmann, M., Boor, K.J., 2006a. Exposure to salt and organic acids increases the ability of *Listeria monocytogenes* to invade Caco-2 cells but decreases its ability to survive gastric stress. Appl. Environ. Microbiol. 72, 5384–5395.
- Garner, M. R., Njaa, B.L., Wiedmann, M., Boor, K.J., 2006b. Sigma B contributes to *Listeria monocytogenes* gastrointestinal infection but not to systemic spread in the guinea pig infection model. Infect. Immun. 74, 876–886.
- Garriga, M., Aymerich, T., 2009. Advanced Decontamination technologies: high hydrostatic pressure on meat products, in: Toldrá, F. (Ed.), Safety of meat and Processed Meat. Springer Science Business Media, New York, pp. 183–208.
- Garriga, M., Ehrmann, M.A., Arnau, J., Hugas, M., Vogel, R.F., 1998. *Carnimonas nigrificans* gen. nov., sp. nov., a bacterial causative agent for black spot formation on cured meat products. Int. J. Syst. Bacteriol. 48, 677–686.
- Garriga, M., Grèbol, N., Aymerich, M.T., Monfort, J.M., Hugas, M., 2004. Microbial inactivation after high-pressure processing at 600 MPa in commercial meat products over its shelf life. Innov. Food Sci. Emerg. Technol. 5, 451–457.
- Gasanov, U., Hughes, D., Hansbro, P.M., 2005a. Methods for the isolation and identification of *Listeria* spp. and *Listeria monocytogenes*: A review. FEMS Microbiol. Rev. 29, 851–875.
- Gayán, E., Condón, S., Álvarez, I., 2014. Biological aspects in food preservation by ultraviolet light: a review. Food Bioprocess Technol. 7, 1–20.
- Gayán, E., Govers, S.K., Aertsen, A., 2017. Impact of high hydrostatic pressure on bacterial proteostasis. Biophys. Chem. 231, 3–9.
- Gayán, E., Serrano, M.J., Pagán, R., Álvarez, I., Condón, S., 2015. Environmental and biological factors influencing the UV-C resistance of *Listeria monocytogenes*. Food Microbiol. 46, 246–253.
- Gedde, M.M., Higgins, D.E., Tilney, L.G., Portnoy, D.A., 2000. Role of listeriolysin O in cell-to-cell spread of *Listeria monocytogenes*. Infect. Immun. 68, 999–1003.
- Gelbíčová, T., Karpíšková, R., 2012. Outdoor environment as a source of *Listeria monocytogenes* in food chain. Czech J. Food Sci. 30, 83–88.
- Germini, A., Masola, A., Carnevali, P., Marchelli, R., 2009. Simultaneous detection of

- Escherichia coli* O175 : H7 , *Salmonella* spp., and *Listeria monocytogenes* by multiplex PCR. Food Control 20, 733–738.
- Gilbert, S., Lake, R., Hudson, A., Cressey, P., 2009. Risk profile: *Listeria monocytogenes* in processed ready-to-eat meats. Institute of Environmental Science and Research Limited. <https://www.mpi.govt.nz/dmsdocument/25847/direct>.
- Giotis, E.S., Muthaiyan, A., Natesan, S., Wilkinson, B.J., Blair, I.S., McDowell, D.A., 2010. Transcriptome analysis of alkali shock and alkali adaptation in *Listeria monocytogenes* 10403S. Foodborne Pathog. Dis. 7, 1147–1157.
- Giovannacci, I, Ragimbeau, C., Queguiner, S., Salvat, G., Vendevre, J., Carlier, V., Ermel, G., 1999. *Listeria monocytogenes* in pork slaughtering and cutting plants use of RAPD , PFGE and PCR – REA for tracing and molecular epidemiology. Int. J. Food Microbiol. 53, 127–140.
- Goerges, S., Aigner, U., Silakowski, B., Scherer, S., 2006. Inhibition of *Listeria monocytogenes* by food-borne yeasts. Appl. Environ. Microbiol. 72, 313–318.
- Goerges, S., Koslowsky, M., Velagic, S., Borst, N., Bockelmann, W., Heller, K.J., Scherer, S., 2011. Anti-listerial potential of food-borne yeasts in red smear cheese. Int. Dairy J. 21, 83–89.
- Gombas, D.E., Chen, Y., Clavero, R.S., Scott, V.N., 2003. Survey of *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat foods. J. Food Prot. 66, 559–569.
- Gori, K., Sørensen, L.M., Petersen, M.A., Jespersen, L., Arneborg, N., 2012. *Debaryomyces hansenii* strains differ in their production of flavor compounds in a cheese-surface model. Microbiologyopen 1, 161–168.
- Graham, T., Golsteyn-thomas, E.J., Gannon, V.P.J., Thomas, J.E., 1996. Genus- and species-specific detection of *Listeria monocytogenes* using polymerase chain reaction assays targeting the 16S/23S intergenic spacer region of the rRNA operon. Can. J. Microbiol. 42, 1155–1162.
- Graham, T.A., Golsteyn-thomas, E.J., Thomas, J.E., Gannon, V.P.J., 1997. Inter- and intraspecies comparison of the 16S-23S rRNA operon intergenic spacer regions of six *Listeria* spp. Int. J. Syst. Bacteriol. 47, 863–869.
- Graumann, G.H., Holley, R.A., 2007. Survival of *Escherichia coli* O157:H7 in needle-tenderized dry cured Westphalian ham. Int. J. Food Microbiol. 118, 173–179.
- Graves, L.M., Helsel, L.O., Steigerwalt, A.G., Morey, R.E., Daneshvar, M.I., Roof, S.E., Orsi, R.H., Fortes, E.D., Milillo, S.R., Den Bakker, H.C., Wiedmann, M., Swaminathan, B., Sauders, B.D., 2010. *Listeria marthii* sp. nov., isolated from the

- natural environment, Finger Lakes National Forest. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 60, 1280–1288.
- Graves, L.M., Swaminathan, B., 2001. PulseNet standardized protocol for subtyping *Listeria monocytogenes* by macrorestriction and pulsed-field gel electrophoresis. *Int. J. Food Microbiol.* 65, 55–62.
- Gray, M.J., Zadoks, R.N., Fortes, E.D., Dogan, B., Cai, S., Chen, Y., Scott, V.N., Gombas, D.E., Boor, K.J., Wiedmann, M., 2004. *Listeria monocytogenes* isolates from foods and humans form distinct but overlapping populations. *Appl. Environmental Microbiol.* 70, 5833–5841.
- Gross, M., Jaenicke, R., 1994. Proteins under pressure. The influence of high hydrostatic pressure on structure, function and assembly of proteins and protein complexes. *Eur. J. Biochem.* 221, 617–630.
- Gudmundsdóttir, S., Gudbjörnsdóttir, B., Lauzon, H.L., Einarsson, H., Kristinsson, K.G., Kristjánsson, M., 2005. Tracing *Listeria monocytogenes* isolates from cold-smoked salmon and its processing environment in Iceland using pulsed-field gel electrophoresis. *Int. J. Food Microbiol.* 101, 41–51.
- Guenther, S., Huwyler, D., Richard, S., Loessner, M.J., 2009. Virulent bacteriophage for efficient biocontrol of *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat foods. *Appl. Environ. Microbiol.* 75, 93–100.
- Guenther, S., Loessner, M.J., 2011. Bacteriophage biocontrol of *Listeria monocytogenes* on soft ripened white mold and red-smear cheeses. *Bacteriophage* 1, 94–100.
- Guillet, C., Join-Lambert, O., Le Monnier, A., Leclercq, A., Mechaï, F., Mamzer-Bruneel, M.F., Bielecka, M.K., Scotti, M., Disson, O., Berche, P., Vazquez-Boland, J., Lortholary, O., Lecuit, M., 2010. Human listeriosis caused by *Listeria ivanovii*. *Emerg. Infect. Dis.* 16, 136–138.
- Guldimann, C., Guariglia-Oropeza, V., Harrand, S., Kent, D., Boor, K.J., Wiedmann, M., 2017. Stochastic and differential activation of  $\sigma$ B and PrfA in *Listeria monocytogenes* at the single cell level under different environmental stress conditions. *Front. Microbiol.* 8, 1–14.
- Gunson, R.N., Collins, T.C., Carman, W.F., 2006. Practical experience of high throughput real time PCR in the routine diagnostic virology setting. *J. Clin. Virol.* 35, 355–367.
- Gutiérrez, D., Rodríguez-Rubio, L., Fernández, L., Martínez, B., Rodríguez, A., García, P., 2017. Applicability of commercial phage-based products against *Listeria*

- monocytogenes* for improvement of food safety in Spanish dry-cured ham and food contact surfaces. *Food Control* 73, 1474–1482.
- Guzel, B.H., Arroyo, C., Condón, S., Pagán, R., Bayindirli, A., Alpas, H., 2014. Inactivation of *Listeria monocytogenes* and *Escherichia coli* by ultrasonic waves under pressure at nonlethal (manosonication) and lethal temperatures (manothermosonication) in acidic fruit juices. *Food Bioprocess Technol.* 7, 1701–1712.
- Hadjilouka, A., Mavrogiannis, G., Mallouchos, A., Paramithiotis, S., Mataragas, M., Drosinos, E.H., 2017. Effect of lemongrass essential oil on *Listeria monocytogenes* gene expression. *LWT - Food Sci. Technol.* 77, 510–516.
- Hadjilouka, A., Molfeta, C., Panagiotopoulou, O., Paramithiotis, S., Mataragas, M., Drosinos, E.H., 2016. Expression of *Listeria monocytogenes* key virulence genes during growth in liquid medium, on rocket and melon at 4, 10 and 30 °C. *Food Microbiol.* 55, 7–15.
- Hamon, M.A., Ribet, D., Stavru, F., Cossart, P., 2012. Listeriolysin O: the swiss army knife of *Listeria*. *Trends Microbiol.* 20, 360–368.
- Harmsen, M., Lappann, M., Knøchel, S., Molin, S., 2010. Role of extracellular DNA during biofilm formation by *Listeria monocytogenes*. *Appl. Environ. Microbiol.* 76, 2271–9.
- Harrison, M.A., Huang, Y., Chao, C., Shineman, T., 2016. Fate of *Listeria monocytogenes* on Packaged, Refrigerated, and Frozen Seafood. *J. Food Prot.* 54, 524–527.
- Hasset, D.J., Cohen, M.S., 1989. Bacterial adaptation to oxidative stress: Implication for pathogenesis and interaction with phagocytic cells. *Faseb J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* 3, 2574–2582.
- Hatoum, R., Labrie, S., Fliss, I., 2013. Identification and partial characterization of antilisterial compounds produced by dairy yeasts. *Probiotics Antimicrob. Proteins* 5, 8–17.
- Hayman, M.M., Kouassi, G.K., Anantheswaran, R.C., Floros, J.D., Knabel, S.J., 2008. Effect of water activity on inactivation of *Listeria monocytogenes* and lactate dehydrogenase during high pressure processing. *Int. J. Food Microbiol.* 124, 21–26.
- Hëbraud, M., Guzzo, J., 2000. The main cold shock protein of *Listeria monocytogenes* belongs to the family of ferritin-like proteins. *FEMS Microbiol. Lett.* 190, 29–34.
- Hereu, A., Bover-cid, S., Garriga, M., Aymerich, T., 2012. High hydrostatic pressure and

- biopreservation of dry-cured ham to meet the food safety objectives for *Listeria monocytogenes*. *Int. J. Food Microbiol.* 154, 107–112.
- Hierro, E., Barroso, E., La Hoz, L. De, Ordóñez, J.A., Manzano, S., Fernández, M., 2011. Efficacy of pulsed light for shelf-life extension and inactivation of *Listeria monocytogenes* on ready-to-eat cooked meat products. *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.* 12, 275–281.
- Hingston, P.A., Stea, E.C., Knøchel, S., Hansen, T., 2013. Role of initial contamination levels, biofilm maturity and presence of salt and fat on desiccation survival of *Listeria monocytogenes* on stainless steel surfaces. *Food Microbiol.* 36, 46–56.
- Hitchins, A.D., Jinneman, K., Chen, Y., 2017. Detection of *Listeria monocytogenes* in foods and environmental samples, and enumeration of *Listeria monocytogenes* in foods, in: FDA (Ed.), *Bacteriological Analytical Manual*.
- Holch, A., Webb, K., Lukjancenko, O., Ussery, D., Rosenthal, B.M., Gram, L., 2013. Genome sequencing identifies two nearly unchanged strains of persistent *Listeria monocytogenes* isolated at two different fish processing plants sampled 6 years apart. *Appl. Environ. Microbiol.* 79, 2944–2951.
- Hoorfar, J., Cook, N., Malorny, B., Wagner, M., De Medici, D., Abdulmawjood, A., Fach, P., 2003. Making internal amplification control mandatory. *Lett. Clin. Microbiol.* 41, 5835.
- Hoorfar, J., Malorny, B., Abdulmawjood, A., Cook, N., Wagner, M., Fach, P., 2004. Practical considerations in design of Internal Amplifications Controls for diagnostic PCR assays. *J. Clin. Microbiol.* 42, 1863–1868.
- Horita, C.N., Baptista, R.C., Caturla, M.Y.R., Lorenzo, J.M., Barba, F.J., Sant'Ana, A.S., 2018. Combining reformulation, active packaging and non-thermal post-packaging decontamination technologies to increase the microbiological quality and safety of cooked ready-to-eat meat products. *Trends Food Sci. Technol.* 72, 45–61.
- Hoz, L., Cambero, M.I., Cabeza, M.C., Herrero, A., Ordóñez, J.A., 2008. Elimination of *Listeria monocytogenes* from vacuum-packed dry-cured ham by E-beam radiation. *J. Food Prot.* 71, 2001–2006.
- Hyeon, J.Y., Park, C., Choi, I.S., Holt, P.S., Seo, K.H., 2010. Development of multiplex real-time PCR with internal amplification control for simultaneous detection of *Salmonella* and *Cronobacter* in powdered infant formula. *Int. J. Food Microbiol.* 144, 177–181.
- Hu, Y., Oliver, H.F., Raengpradub, S., Palmer, M.E., Orsi, R.H., Wiedmann, M., Boor,



- K.J., 2007a. Transcriptomic and phenotypic analyses suggest a network between the transcriptional regulators HrcA and  $\sigma$ B in *Listeria monocytogenes*. Appl. Environ. Microbiol. 73, 7981–7991.
- Hu, Y., Raengpradub, S., Schwab, U., Loss, C., Orsi, R.H., Wiedmann, M., Boor, K.J., 2007b. Phenotypic and transcriptomic analyses demonstrate interactions between the transcriptional regulators QsR and sigma B in *Listeria monocytogenes*. Appl. Environ. Microbiol. 73, 7967–7980.
- Huang, B., Fang, N., Dimovski, K., Wang, X., Hogg, G., Bates, J., 2011. Observation of a new pattern in serogroup-related PCR typing of *Listeria monocytogenes* 4b isolates. J. Clin. Microbiol. 49, 426–429.
- Huang, Y., Morvay, A.A., Shi, X., Suo, Y., Shi, C., Knøchel, S., 2018. Comparison of oxidative stress response and biofilm formation of *Listeria monocytogenes* serotypes 4b and 1/2a. Food Control 85, 416–422.
- Hugas, M., Monfort, J.M., 2002. New mild technologies in meat processing: high pressure as a model technology. Meat Sci. 32, 359–371.
- Huggett, J., Dheda, K., Bustin, S., Zumla, A., 2005. Real-time RT-PCR normalisation; strategies and considerations. Genes Immun. 6, 279–284.
- Hunter, P.R., Gaston, M.A., 1988. Numerical index of the discriminatory ability of typing systems: an application of Simpson's index of diversity. J. Clin. Microbiol. 26, 2465–6.
- Iacumin, L., Chiesa, L., Boscolo, D., Manzano, M., Cantoni, C., Orlic, S., Comi, G., 2009. Moulds and ochratoxin A on surfaces of artisanal and industrial dry sausages. Food Microbiol. 26, 65–70.
- Iacumin, L., Manzano, M., Andyanto, D., Comi, G., 2017. Biocontrol of ochratoxigenic moulds (*Aspergillus ochraceus* and *Penicillium nordicum*) by *Debaryomyces hansenii* and *Saccharomycopsis fibuligera* during speck production. Food Microbiol. 62, 188–195.
- Iacumin, L., Manzano, M., Comi, G., 2016. Phage Inactivation of *Listeria monocytogenes* on San Daniele dry-cured ham and elimination of biofilms from equipment and working environments. Microorganisms 4, 4.
- Iannetti, L., Acciari, V.A., Antoci, S., Addante, N., Bardasi, L., Bilei, S., Calistri, P., Cito, F., Cogoni, P., D'Aurelio, R., Decastelli, L., Iannetti, S., Iannitto, G., Marino, A.M.F., Muliari, R., Neri, D., Perilli, M., Pomilio, F., Prencipe, V.A., Proroga, Y., Santarelli, G.A., Sericola, M., Torresi, M., Migliorati, G., 2016. *Listeria*

- monocytogenes* in ready-to-eat foods in Italy: Prevalence of contamination at retail and characterisation of strains from meat products and cheese. *Food Control* 68, 55–61.
- Ibrahim, H.M., 2013. Prediction of meat and meat products by gamma rays , electron beams and X-ray irradiations-A Review. *Int. J. Agric. Sci.* 3, 521–534.
- Ishibashi, N., Himeno, K., Fujita, K., Masuda, Y., Perez, R.H., Zendo, T., Wilaipun, P., Leelawatcharamas, V., Nakayama, J., Sonomoto, K., 2012. Purification and characterization of multiple bacteriocins and an inducing peptide produced by *Enterococcus faecium* NKR-5-3 from Thai fermented fish. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 76, 947–953.
- Jadhav, S., Bhave, M., Palombo, E.A., 2012. Methods used for the detection and subtyping of *Listeria monocytogenes*. *J. Microbiol. Methods* 88, 327–341.
- Jamali, H., Thong, K.L., 2014. Genotypic characterization and antimicrobial resistance of *Listeria monocytogenes* from ready-to-eat foods. *Food Control* 44, 1–6.
- Jamshidi, A., Zeinali, T., 2019. Significance and Characteristics of *Listeria monocytogenes* in poultry products . *Int. J. Food Sci.* 2019, 1–7. h
- Janda, J.M., Abbott, S.L., 2007. 16S rRNA gene sequencing for bacterial identification in the diagnostic laboratory: Pluses, perils, and pitfalls. *J. Clin. Microbiol.* 45, 2761–2764.
- Jasson, V., Jacxsens, L., Luning, P., Rajkovic, A., Uyttendaele, M., 2010. Alternative microbial methods: An overview and selection criteria. *Food Microbiol.* 27, 710–730.
- Jay, J.M., Loessner, M.J., Golden, D.A., 2005. Listeriosis de origen alimentario, in: Acibia S.A. (Ed.), *Microbiología Moderna de Los Alimentos*. Zaragoza, España.
- Jayasena, D.D., Jo, C., 2013. Essential oils as potential antimicrobial agents in meat and meat products: A review. *Trends Food Sci. Technol.* 34, 96–108.
- Jeffers, G.T., Bruce, J.L., McDonough, P.L., Scarlett, J., Boor, K.J., Wiedmann, M., 2001. Comparative genetic characterization of *Listeria monocytogenes* isolates from human and animal listeriosis cases. *Microbiology* 147, 1095–1104.
- Jemmi, T., Stephan, R., 2006. *Listeria monocytogenes*: food-borne pathogen and hygiene indicator. *Sci. Tech. Rev. Off. Int. des Epizoot.* 25, 571–580.
- Jensen, A.K., Björkman, J.T., Ethelberg, S., Kiil, K., Kemp, M., Nielsen, E.M., 2016. Molecular typing and epidemiology of human listeriosis cases, Denmark, 2002–2012. *Emerg. Infect. Dis.* 22, 625–633.

- Jeong, S.G., Kang, D.H., 2017. Inactivation of *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella Typhimurium*, and *Listeria monocytogenes* in ready-to-bake cookie dough by gamma and electron beam irradiation. *Food Microbiol.* 64, 172–178.
- Jinneman, K.C., Hill, W.E., 2001. *Listeria monocytogenes* lineage group classification by MAMA-PCR of the listeriolysin gene. *Curr. Microbiol.* 43, 129–133.
- Jinneman, K.C., Wekell, M.M., Eklund, M.W., 2007. Incidence and behavior of *Listeria monocytogenes* in fish and seafood, en: CRC Press (Ed.), *Listeria*, listeriosis, and food Safety. CRS Press, Taylor & Francis Group, Boca Raton, Florida. pp. 357-405.
- Jofré, A., Aymerich, T., Grèbol, N., Garriga, M., 2009. Efficiency of high hydrostatic pressure at 600 MPa against food-borne microorganisms by challenge tests on convenience meat products. *LWT - Food Sci. Technol.* 42, 924–928.
- Johnson, J.L., Doyle, M.P., Cassens, R.G., Schoeni, J.L., 1988. Fate of *Listeria monocytogenes* in tissues of experimentally infected cattle and in hard salami. *Appl. Environ. Microbiol.* 54, 497–501.
- Jones, T.H., Vail, K.M., McMullen, L.M., 2013. Filament formation by foodborne bacteria under sublethal stress. *Int. J. Food Microbiol.* 165, 97–110.
- Jonquières, R., Bierne, H., Fiedler, F., Gounon, P., Cossart, P., 1999. Interaction between the protein InlB of *Listeria monocytogenes* and lipoteichoic acid: A novel mechanism of protein association at the surface of Gram-positive bacteria. *Mol. Microbiol.* 34, 902–914.
- Kang, J., Burall, L., Mammel, M.K., Datta, A.R., 2019. Global transcriptomic response of *Listeria monocytogenes* during growth on cantaloupe slices. *Food Microbiol.* 77, 192–201.
- Kang, J., Wiedmann, M., Boor, K.J., Bergholz, T.M., 2015. VirR-mediated resistance of *Listeria monocytogenes* against food antimicrobials and cross-protection induced by exposure to organic acid salts. *Appl. Environ. Microbiol.* 81, 4553–4562.
- Kastbjerg, V.G., Larsen, M.H., Gram, L., Ingmer, H., 2010. Influence of sublethal concentrations of common disinfectants on expression of virulence genes in *Listeria monocytogenes*. *Appl. Environ. Microbiol.* 76, 303–309.
- Kathariou, Sophia, 2002. *Listeria monocytogenes* virulence and pathogenicity, a food safety perspective. *J. Food Prot.* 65, 1811–29.
- Kathariou, S., Metz, P., Hof, H., Goebel, W., 1987. Tn916-induced mutations in the hemolysin determinant affecting virulence of *Listeria monocytogenes*. *J. Bacteriol.* 169, 1291–1297.

- Kawarai, T., Wachi, M., Ogino, H., Furukawa, S., Suzuki, K., Ogihara, H., Yamasaki, M., 2004. SulA-independent filamentation of *Escherichia coli* during growth after release from high hydrostatic pressure treatment. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 64, 255–262.
- Kazmierczak, M.J., Mithoe, S.C., Boor, K.J., Wiedmann, M., 2003. *Listeria monocytogenes*  $\sigma^B$  regulates stress response and virulence functions. *J. Bacteriol.* 185, 5722–34.
- Kazmierczak, M.J., Wiedmann, M., Boor, K.J., 2006. Contributions of *Listeria monocytogenes*  $\sigma^B$  and PrfA to expression of virulence and stress response genes during extra- and intracellular growth. *Microbiology* 152, 1827–1838.
- Kérouanton, A., Marault, M., Petit, L., Grout, J., Dao, T.T., Brisabois, A., 2010. Evaluation of a multiplex PCR assay as an alternative method for *Listeria monocytogenes* serotyping. *J. Microbiol. Methods* 80, 134–137.
- Keto-Timonen, R., Tolvanen, R., Lundén, J., Korkeala, H., 2007. An 8-year surveillance of the diversity and persistence of *Listeria monocytogenes* in a chilled food processing plant analyzed by amplified fragment length polymorphism. *J. Food Prot.* 70, 1866–73.
- Khan, I., Khan, J., Miskeen, S., Tango, C.N., Park, Y.S., Oh, D.H., 2016. Prevalence and control of *Listeria monocytogenes* in the food industry – a review. *Czech J. Food Sci.* 34, 469–487.
- Kimura, M., 1980. A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *J. Mol. Evol.* 16, 111–120.
- Klein, P.G., Juneja, V.K., 1997. Sensitive detection of viable *Listeria monocytogenes* by reverse transcription-PCR. *Appl. Environ. Microbiol.* 63, 4441–4448.
- Kocaman, N., Sarimehmetođlu, B., 2016. Stress responses of *Listeria monocytogenes*. *Ankara  niv Vet Fak Derg* 63, 421–427.
- Kocks, C., Gouin, E., Tabouret, M., Berche, P., Ohayon, H., Cossart, P., 1992. *L. monocytogenes*-induced actin assembly requires the actA gene product, a surface protein. *Cell* 68, 521–531.
- Kocot, A.M., Olszewska, M.A., 2017. Biofilm formation and microscopic analysis of biofilms formed by *Listeria monocytogenes* in a food processing context. *Lwt* 84, 47–57.
- Koressaar, T., Remm, M., 2007. Enhancements and modifications of primer design

- program Primer. *Bioinformatics* 23, 1289–1291.
- Körner, H., Sofia, H.J., Zumft, W.G., 2003. Phylogeny of the bacterial superfamily of Crp-Fnr transcription regulators: exploiting the metabolic spectrum by controlling alternative gene programs. *FEMS Microbiol. Rev.* 27, 559–592.
- Koseki, S., Yamamoto, K., 2006. pH and solute concentration of suspension media affect the outcome of high hydrostatic pressure treatment of *Listeria monocytogenes*. *Int. J. Food Microbiol.* 111, 175–179.
- Koskar, J., Kramarenko, T., Meremae, K., Kunigas, M., Sogel, J., Maesaar, M., Anton, D., Lillenberg, M., Roasto, M., 2019. Prevalence and Numbers of *Listeria monocytogenes* in various ready-to-eat foods over a 5-year period in Estonia. *J. Food Prot.* 82, 597–604.
- Kotzamanidis, C., Papadopoulos, T., Vafeas, G., Tsakos, P., Giantzi, V., Zdragas, A., 2019. Characterization of *Listeria monocytogenes* from encephalitis cases of small ruminants from different geographical regions, in Greece. *J. Appl. Microbiol.* 126, 1373–1382.
- Kramarenko, T., Roasto, M., Meremäe, K., Kuningas, M., Põltsama, P., Elias, T., 2013. *Listeria monocytogenes* prevalence and serotype diversity in various foods. *Food Control* 30, 24–29.
- Kreft, J., Vázquez-Boland, J.A., 2001. Regulation of virulence genes in *Listeria*. *Int. J. Med. Microbiol.* 291, 145–157.
- Kuhn, M., Goebel, W., 2007. Molecular virulence determinants of *Listeria monocytogenes*, en: Rysr, E., Marth, E. (Eds.), *Listeria, listeriosis, and food safety*. CRS Press, Taylor & Francis Group, pp. 111–155.
- Kurpas, M., Wieczorek, K., Osek, J., 2018. Ready-to-eat meat products as a source of *Listeria monocytogenes*. *J. Vet. Res.* 62, 49–55.
- Kwon, S.A., Song, W.J., Kang, D.H., 2019. Combination effect of saturated or superheated steam and lactic acid on the inactivation of *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella Typhimurium* and *Listeria monocytogenes* on cantaloupe surfaces. *Food Microbiol.* 82, 342–348.
- Lado, B.H., Yousef, A.E., 2007. *Listeria, listeriosis and food safety*, 3rd ed. CRS Press, Taylor & Francis Group, Boca Raton, Florida.
- Lakicevic, B., Nastasijevic, I., 2017. *Listeria monocytogenes* in retail establishments: Contamination routes and control strategies. *Food Rev. Int.* 33, 247–269.
- Lariviere-Gauthier, G., Letellier, A., Kerouanton, A., Bekal, S., Quessy, S., Fournaise,

- S., Fravallo, P., 2014. Analysis of *Listeria monocytogenes* strain distribution in a pork slaughter and cutting plant in the province of Quebec. *J. Food Prot.* 77, 2121–2128.
- Larsen, N., Jespersen, L., 2015. Expression of virulence-related genes in *Listeria monocytogenes* grown on Danish hard cheese as affected by NaCl content. *Foodborne Pathog. Dis.* 12, 536–544.
- Larson, A.E., Johnson, E.A., Nelson, J.H., 2010. Survival of *Listeria monocytogenes* in Commercial Cheese Brines. *J. Dairy Sci.* 82, 1860–1868.
- Law, J.W.F., Ab Mutalib, N.S., Chan, K.G., Lee, L.H., 2015a. An insight into the isolation, enumeration, and molecular detection of *Listeria monocytogenes* in food. *Front. Microbiol.* 6, 1–15.
- Law, J.W.F., Mutalib, N.S.A., Chan, K.G., Lee, L.H., 2015b. Rapid methods for the detection of foodborne bacterial pathogens: Principles, applications, advantages and limitations. *Front. Microbiol.* 5, 1–19.
- Lawrence, L.M., Harvey, J., Gilmour, A., 1993. Development of a random amplification of polymorphic DNA typing method for *Listeria monocytogenes*. *Appl. Environ. Microbiol.* 59, 3117–3119.
- Lebreton, A., Cossart, P., 2017. RNA- and protein-mediated control of *Listeria monocytogenes* virulence gene expression. *RNA Biol.* 14, 460–470.
- Leclercq, A., Clermont, D., Bizet, C., Grimont, P.A.D., Le Flèche-Matéos, A., Roche, S.M., Buchrieser, C., Cadet-Daniel, V., Le Monnier, A., Lecuit, M., Allerberger, F., 2010. *Listeria rocourtiae* sp. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 60, 2210–2214.
- Lee, E.J., Ahn, D.U., 2005. Quality characteristics of irradiated turkey breast rolls formulated with plum extract. *Meat Sci.* 71, 300–305.
- Lee, N., Kwon, K.Y., Kyung, S., Chang, H., Chun, H.S., Choi, S.W., 2014. A multiplex PCR assay for simultaneous detection of *Escherichia coli* O157:H7, *Bacillus cereus*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Salmonella* spp., *Listeria monocytogenes*, and *Staphylococcus aureus* in Korean ready-to-eat food. *Foodborne Pathog. Dis.* 11, 574–580.
- Lee, W.H., McClain, D., 1986. Improved *Listeria monocytogenes* selective agar. *Appl. Environ. Microbiol.* 52, 1215–1217.
- Lei, X.H., Fiedler, F., Lan, Z., Kathariou, S., 2001. A novel serotype-specific gene cassette (*gltA-gltB*) is required for expression of teichoic acid-associated surface antigens in *Listeria monocytogenes* of serotype 4b. *J. Bacteriol.* 183, 1133–1139.
- Leimeister-Wachter, M., Haffner, C., Domann, E., Goebel, W., Chakraborty, T., 1990.

- Identification of a gene that positively regulates expression of listeriolysin, the major virulence factor of *Listeria monocytogenes*. Proc. Natl. Acad. Sci. 87, 8336–8340.
- Leistner, L., 1978. Hurdle effect and energy saving, Food Quality and Nutrition. (ed. W.K. Donkey), Applied Science Publishers, London. pp. 553-557.
- Leong, D., Alvarez-Ordóñez, A., Zaouali, S., Jordan, K., 2015. Examination of *Listeria monocytogenes* in seafood processing facilities and smoked Salmon in the Republic of Ireland. J. Food Prot. 78, 2184–2190.
- Lepe, J.A., Torres, M.J., Liró, J., Luque, R., Aznar, J., 2012. Caracterización microbiológica de los aislados de *Listeria monocytogenes* procedentes de casos humanos en Andalucía. Enferm. Infecc. Microbiol. Clin. 30, 602–607.
- Leroy, F., Moreno-Foulquié, M.R., De Vuyst, L., 2003. *Enterococcus faecium* RZS C5 , an interesting bacteriocin producer to be used as a co-culture in food fermentation. Int. J. Food Microbiol. 88, 235–240.
- Lin, C.S., Wang, C., Tsai, H.J., Chou, C.H., 2010. Growth of *Listeria monocytogenes* on a RTE-meat matrix enhances cell invasiveness to mouse J774A.1 macrophages. Int. J. Food Microbiol. 144, 199–201.
- Liu, D., 2006. Identification, subtyping and virulence determination of *Listeria monocytogenes*, an important foodborne pathogen. J. Med. Microbiol. 55, 645–659.
- Liu, D., Lawrence, M.L., Ainsworth, A.J., Austin, F.W., 2007a. Toward an improved laboratory definition of *Listeria monocytogenes* virulence. Int. J. Food Microbiol. 118, 101–115.
- Liu, D., Lawrence, M.L., Austin, F.W., Ainsworth, A.J., 2007b. A multiplex PCR for species- and virulence-specific determination of *Listeria monocytogenes*. J. Microbiol. Methods 71, 133–140.
- Liu, D., Lawrence, M.L., Wiedmann, M., Gorski, L., Mandrell, R.E., Ainsworth, A.J., Austin, F.W., 2006. *Listeria monocytogenes* subgroups IIIA, IIIB, and IIIC delineate genetically distinct populations with varied pathogenic potential. J. Clin. Microbiol. 44, 4229–4233.
- Liu, G.L., Chi, Z., Wang, G.Y., Wang, Z.P., Li, Y., Chi, Z.M., 2015. Yeast killer toxins, molecular mechanisms of their action and their applications. Crit. Rev. Biotechnol. 35, 222–234.
- Liu, S., Graham, J.E., Bigelow, L., Morse, P.D., Wilkinson, B.J., 2002. Identification of *Listeria monocytogenes* genes expressed in response to growth at low temperature. Appl. Environ. Microbiol. 68, 1697–1705.

- Liu, X., Basu, U., Miller, P., McMullen, L.M., 2014a. Stress response and adaptation of *Listeria monocytogenes* 08-5923 exposed to a sublethal dose of Carnocyclin A. *Appl. Environ. Microbiol.* 80, 3835–3841.
- Liu, X., Miller, P., Basu, U., McMullen, L.M., 2014b. Sodium chloride-induced filamentation and alternative gene expression of *fts*, *murZ*, and *gnd* in *Listeria monocytogenes* 08-5923 on vacuum-packaged ham. *FEMS Microbiol. Lett.* 360, 152–156.
- Liu, Y., Cao, Y., Wang, T., Dong, Q., Li, J., Niu, C., 2019. Detection of 12 common food-borne bacterial pathogens by TaqMan real-time PCR using a single set of reaction conditions. *Front. Microbiol.* 10, 1–9.
- Liu, Y., Ream, A., 2008. Gene expression profiling of *Listeria monocytogenes* strain F2365 during growth in ultrahigh-temperature-processed skim milk. *Appl. Environmental Microbiol.* 74, 6859–6866.
- Livak, K.J., Schmittgen, T.D., 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta CT}$  method. *Methods* 25, 402–408.
- Londero, A., Costa, M., Sucari, A., Leotta, G., 2019. Comparison of three molecular subtyping techniques for *Listeria monocytogenes*. *Rev. Argent. Microbiol.* 1–4.
- López-Valladares, G., Tham, W., Parihar, V., Helmersson, S., Andersson, B., Ivarsson, S., Johansson, C., Ringberg, H., Tjernberg, I., Henriques-Normark, B., Tham-Danielsson, M., 2017. Human isolates of *Listeria monocytogenes* in Sweden during half a century (1958 – 2010). *Epidemiol. Infect.* 144, 2251–2260.
- López, V., Ortiz, S., Corujo, A., López, P., Navas, J., Moreno, R., Martínez-Suárez, J.V., 2007. Traceback identificación of an ingredient (pork dewlap) as the possible source of *Listeria monocytogenes* serotype 4b contamination in raw chicken products. *J. Food Prot.* 70, 1513–1517.
- López, V., Ortiz, S., Corujo, A., López, P., Poza, D., Navas, J., Moreno, R., Martínez-Suárez, J. V., 2008. Different contamination patterns of lineage I and II strains of *Listeria monocytogenes* in a Spanish broiler abattoir. *Poult. Sci.* 87, 1874–1882.
- 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?. *Rev. Argent. Microbiol.* 38, 224-234.
- Lozano-Ojalvo, D., Rodríguez, A., Bernáldez, V., Córdoba, J.J., Rodríguez, M., 2013. Influence of temperature and substrate conditions on the *omt-1* gene expression of *Aspergillus parasiticus* in relation to its aflatoxin production. *Int. J. Food Microbiol.*



- 166, 263–269.
- Lucke, F.K., 2000. Utilization of microbes to process and preserve meat. *Meat Sci.* 56, 105–115.
- Lundén, J.M., Autio, T.J., Korkeala, H.J., 2002. Transfer of persistent *Listeria monocytogenes* contamination between food-processing plants associated with a dicing machine. *J. Food Prot.* 65, 1129–1133.
- Lundén, J.M., Autio, T.J., Sjöberg, A.M., Korkeala, H.J., 2003. Persistent and nonpersistent *Listeria monocytogenes* contamination in meat and poultry processing plants. *J. Food Prot.* 66, 2062–2069.
- Lung, H.M., Cheng, Y.C., Chang, Y.H., Huang, H.W., Yang, B.B., Wang, C.Y., 2015. Microbial decontamination of food by electron beam irradiation. *Trends Food Sci. Technol.* 44, 66–78.
- Lungu, B., Ricke, S.C., Johnson, M.G., 2009. Growth, survival, proliferation and pathogenesis of *Listeria monocytogenes* under low oxygen or anaerobic conditions: A review. *Anaerobe* 15, 7–17.
- Lv, X., Ma, H., Sun, M., Lin, Y., Bai, F., Li, J., Zhang, B., 2018. A novel bacteriocin DY4-2 produced by *Lactobacillus plantarum* from cutlassfish and its application as bio-preservative for the control of *Pseudomonas fluorescens* in fresh turbot (*Scophthalmus maximus*) fillets. *Food Control* 89, 22–31.
- Mackey, B.M., Forestiere, K., Isaacs, N., 1995. Factors affecting the resistance of *Listeria monocytogenes* to high hydrostatic pressure. *Food Biotechnol.* 9, 1–11.
- Magalhaes, R., Ferreira, V., Brandao, T.R.S., Casquete-Palencia, R., Almeida, G., Teixeira, P., 2016. Persistent and non-persistent strains of *Listeria monocytogenes* : a focus on growth kinetics under different temperature , salt, and pH conditions and their sensitivity to sanitizers. *Food Microbiol.* 57, 103–108.
- Magliani, W., Conti, S., Gerloni, M., Bertolotti, D., Polonelli, L., 1997. Yeast killer systems. *Clin. Microbiol. Rev.* 10, 369–400.
- Mahendran, R., Ramanan, K.R., Barba, F.J., Lorenzo, J.M., López-Fernández, O., Munekata, P.E.S., Roohinejad, S., Sant’Ana, A.S., Tiwari, B.K., 2019. Recent advances in the application of pulsed light processing for improving food safety and increasing shelf life. *Trends Food Sci. Technol.* 88, 67–79.
- Mahoney, M., Henriksson, A., 2003. The effect of processed meat and meat starter cultures on gastrointestinal colonization and virulence of *Listeria monocytogenes* in mice. *Int. J. Food Microbiol.* 84, 255–261.

- Makariti, I.P., Printezi, A., Kapetanakou, A.E., Zeaki, N., Skandamis, P.N., 2015. Investigating boundaries of survival, growth and expression of genes associated with stress and virulence of *Listeria monocytogenes* in response to acid and osmotic stress. *Food Microbiol.* 45, 231–244.
- Mañas, P., Mackey, B.M., 2004. Morphological and physiological changes induced by high hydrostatic pressure in Exponential- and stationary-phase cells of *Escherichia coli*: Relationship with cell death. *Appl. Environ. Microbiol.* 70, 1545–1554.
- Mañas, P., Pagán, R., 2005. Microbial inactivation by new technologies of food preservation. *J. Appl. Microbiol.* 98, 1387–1399.
- Mañas, P., Pagán, R., Raso, J., 2000. Predicting lethal effect of ultrasonic waves under pressure treatments on *Listeria monocytogenes* ATCC 15313 by power measurements. *J. Food Sci.* 65, 663–667.
- Mannazzu, I., Domizio, P., Carboni, G., Zara, S., Zara, G., Comitini, F., Budroni, M., Ciani, M., 2019. Yeast killer toxins: from ecological significance to application. *Crit. Rev. Biotechnol.* 39, 603–617.
- Marcos, B., Aymerich, T., Monfort, J.M., Garriga, M., 2008. High-pressure processing and antimicrobial biodegradable packaging to control *Listeria monocytogenes* during storage of cooked ham. *Food Microbiol.* 25, 177–182.
- Marin, M.E., De La Rosa, M.D.C., Cornejo, I., 1992. Enterotoxigenicity of *Staphylococcus* strains isolated from Spanish dry-cured hams. *Appl. Environ. Microbiol.* 58, 1067–1069.
- Marquina, D., Santos, A., Peinado, J.M., 2002. Biology of killer yeasts. *Int. Microbiol.* 5, 65–71.
- Marras, S.A.E., 2006. Selection of Fluorophore and Quencher Pairs for Fluorescent Nucleic Acid Hybridization Probes, in: Didenko, V.V. (Ed.), *Methods in Molecular Biology: Fluorescent Energy Transfer Nucleic Acid Probes*. HUMAN, Totowa, New Jersey, pp. 3–16.
- Marshall, D.L., Schmidt, R.H., 1988. Growth of *Listeria monocytogenes* at 10°C in Milk Preincubated with Selected Pseudomonads. *J. Food Prot.* 51, 277–282.
- Martín, A., Córdoba, J.J., Aranda, E., Córdoba, M.G., Asensio, M. A., 2006. Contribution of a selected fungal population to the volatile compounds on dry-cured ham. *Int. J. Food Microbiol.* 110, 8–18.
- Martín, A., Ruíz, J., Núñez, F., Córdoba, J.J., Asensio, M.A., 2000. Contribución de la población microbiana a la seguridad y calidad del jamón curado, in: Monfort, J.M.

- (Ed.), II Symposium International Del Jamón Curado. Estrategias Alimentarias, S.L.-Eurocarne, Madrid, pp. 55–64.
- Martín, B., Perich, A., Diego, G., Yangüela, J., Rodr, A., Garriga, M., Aymerich, T., 2014. Diversity and distribution of *Listeria monocytogenes* in meat processing plants. *Food Microbiol.* 44, 119–127.
- Martín, L., Córdoba, J.J., Antequera, T., Timón, M.L., Ventanas, J., 1998. Effects of salt and temperature on proteolysis during ripening of Iberian ham. *Meat Sci.* 49, 145–153.
- Martín, P., Jacquet, C., Goulet, V., Vaillant, V., De Valk, H., 2006. Pulsed-Field Gel Electrophoresis of *Listeria monocytogenes* strains: the pulsenet Europe feasibility study. *Foodborne Pathog.* 3, 303–308.
- Martínez-Suárez, J. V., Ortiz, S., López-Alonso, V., 2016. Potential impact of the resistance to quaternary ammonium disinfectants on the persistence of *Listeria monocytogenes* in food processing environments. *Front. Microbiol.* 7.
- Martínez, C., Santa Cruz, M.J., Hough, G., Vega, M.J., 2002. Preference mapping of cracker type biscuits. *Food Qual. Prefer.* 13, 535–544.
- Martins, E.A., Leal Germano, P.M., 2011. *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat, sliced, cooked ham and salami products, marketed in the city of Sao Paulo, Brazil: Occurrence, quantification, and serotyping. *Food Control* 22, 297–302.
- Masoud, W., Jakobsen, M., 2005. The combined effects of pH, NaCl and temperature on growth of cheese ripening cultures of *Debaryomyces hansenii* and coryneform bacteria. *Int. Dairy J.* 15, 69–77.
- Masoud, W., Poll, L., Jakobsen, M., 2005. Influence of volatile compounds produced by yeasts predominant during processing of *Coffea arabica* in East Africa on growth and ochratoxin A (OTA) production by *Aspergillus ochraceus*. *Yeast* 22, 1133–1142.
- Mataragas, M., Rovetto, F., Bellio, A., Alessandria, V., Rantsiou, K., Decastelli, L., 2015. Differential gene expression profiling of *Listeria monocytogenes* in Cacciatore and Felino salami to reveal potential stress resistance biomarkers. *Food Microbiol.* 46, 408–417.
- Mayer, Z., Bagnara, A., Farber, P., Geisen, R., 2003. Quantification of the copy number of *nor-1*, a gene of the aflatoxin biosynthetic pathway by real-time PCR, and its correlation to the cfu of *Aspergillus flavus* in foods. *Int. J. Food Microbiol.* 82, 143–151.

- Mazza, R., Mazzette, R., 2014. Absolute and relative gene expression in *Listeria monocytogenes* using real-time PCR, in: Jordan, K., Fox, E., Wagner, M. (Eds.), *Listeria Monocytogenes. Methods in Molecular Biology (Methods and Protocols)*. Humana Press, New York, pp. 15–3.
- Mazza, R., Mazzette, R., McAuliffe, O., Jordan, K., Fox, E.M., 2015. Differential gene expression of three gene targets among persistent and nonpersistent *Listeria monocytogenes* strains in the presence or absence of benzethonium chloride. *J. Food Prot.* 78, 1569–1573.
- McDonnell, C.K., Allen, P., Chardonnerau, F.S., Arimi, J.M., Lyng, J.G., 2014. The use of pulsed electric fields for accelerating the salting of pork. *LWT - Food Sci. Technol.* 59, 1054–1060.
- McLauchlin, J., Mitchell, R.T., Smerdon, W.J., Jewell, K., 2004. *Listeria monocytogenes* and listeriosis: a review of hazard characterisation for use in microbiological risk assessment of foods. *Int. J. Food Microbiol.* 92, 15–33.
- Meisel, C., Gehlen, K.H., Fischer, A., Hammes, W.P., 1989. Inhibition of the growth of *staphylococcus aureus* in dry sausages by *Lactobacillus curvatus*, *micrococcus varians* and *Debaryomyces hansenii*. *Food Biotechnol.* 3, 145–168.
- Melero, B., Stessl, B., Manso, B., Wagner, M., Esteban-Carbonero, Ó.J., Hernández, M., Rovira, J., Rodriguez-Lázaro, D., 2019. *Listeria monocytogenes* colonization in a newly established dairy processing facility. *Int. J. Food Microbiol.* 289, 64–71.
- Mellefont, L.A., McMeekin, T.A., Ross, T., 2008. Effect of relative inoculum concentration on *Listeria monocytogenes* growth in co-culture. *Int. J. Food Microbiol.* 121, 157–168.
- Melo, J., Andrew, P.W., Faleiro, M.L., 2015. *Listeria monocytogenes* in cheese and the dairy environment remains a food safety challenge: The role of stress responses. *Food Res. Int.* 67, 75–90.
- Meloni, D., Piras, F., Mureddu, A., Mazza, R., Nucera, D., Mazzette, R., 2012. Sources of *Listeria monocytogenes* contamination in traditional fermented sausage processing plants in Italy. *Ital. J. Food Sci.* 24, 214–222.
- Mendonça, K.S., Michael, G.B., von Laer, A.E., Menezes, D.B., Cardoso, M.R.I., Da Silva, W.P., 2012. Genetic relatedness among *Listeria monocytogenes* isolated in foods and food production chain in southern Rio Grande do Sul, Brazil. *Food Control* 28, 171–177.
- Miceli, A., Settanni, L., 2019. Influence of agronomic practices and pre-harvest

- conditions on the attachment and development of *Listeria monocytogenes* in vegetables. *Ann. Microbiol.* 69, 185–199.
- Michel, E., Stephan, R., Tasara, T., 2011. The *lmo0501* gene coding for a putative transcription activator protein in *Listeria monocytogenes* promotes growth under cold, osmotic and acid stress conditions. *Food Microbiol.* 28, 1261–1265.
- Midelet-Bourdin, G., Leleu, G., Copin, S., Roche, S.M., Velge, P., Malle, P., 2006. Modification of a virulence-associated phenotype after growth of *Listeria monocytogenes* on food. *J. Appl. Microbiol.* 101, 300–308.
- Miettinen, M.K., Palmu, L., Bjorkroth, K.J., Korkeala, H., 2001. Prevalence of *Listeria monocytogenes* in broilers at the abattoir, processing plant, and retail level. *J. Food Prot.* 64, 994–999.
- Miller, A.J., 1992. Combined water activity and solute effects on growth and survival of *Listeria monocytogenes* Scott A. *J. Food Prot.* 55, 414–418.
- Milohanic, E., Glaser, P., Coppée, J., Frangeul, L., Vega, Y., Vázquez-boland, J.A., Kunst, F., Cossart, P., Buchrieser, C., 2003. Transcriptome analysis of *Listeria monocytogenes* identifies three groups of genes differently regulated by PrfA. *Mol. Microbiol.* 47, 1613–1625.
- Molina, I., Silla, H., Flores, J., Monzo, J.L., 1989. Study of the microbial flora in dry-cured ham. II. Micrococcaceae *Fleischwirtschaft* 69, 1433–1434.
- Mols, M., Abee, T., 2011. Primary and secondary oxidative stress in *Bacillus*. *Environ. Microbiol.* 13, 1387–1394.
- Monteiro, L.R.L. de, Mesquita, A.J. de, André, M.C.D.P.B., Cardoso, J.L., 2013. Molecular characterization of *Listeria monocytogenes* isolated from animal products in a city of Northern Brazil. *Ciência Rural* 43, 1443–1448.
- 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. *Front. Microbiol.* 6, 1–8.
- Morales-Partera, A.M., Cardoso-Toset, F., Luque, I., Astorga, R.J., Maldonado, A., Herrera-León, S., Hernández, M., Gómez-Laguna, J., Tarradas, C., 2018. Prevalence and diversity of *Salmonella* spp., *Campylobacter* spp., and *Listeria monocytogenes* in two free-range pig slaughterhouses. *Food Control* 92, 208–215.
- Morales, P., Calzada, J., Nuñez, M., 2006. Effect of high-pressure treatment on the survival of *Listeria monocytogenes* Scott A in sliced vacuum-packaged Iberian and

- Serrano cured hams. *J. Food Prot.* 69, 2539–2543.
- Morandi, S., Silveti, T., Battelli, G., Brasca, M., 2019. Can lactic acid bacteria be an efficient tool for controlling *Listeria monocytogenes* contamination on cheese surface? The case of Gorgonzola cheese. *Food Control* 96, 499–507.
- Møretro, T., Fanebust, H., Fagerlund, A., Langsrud, S., 2019. Whole room disinfection with hydrogen peroxide mist to control *Listeria monocytogenes* in food industry related environments. *Int. J. Food Microbiol.* 292, 118–125.
- Moretro, T., Langsrud, S., 2004. *Listeria monocytogenes*: biofilm formation and persistence in food-processing environments. *Biofilms* 1, 107–121.
- Morganti, M., Scaltriti, E., Cozzolino, P., Bolzoni, L., Casadei, G., Pierantoni, M., Foni, E., Pongolini, S., 2016. Processing-dependent and clonal contamination patterns of *Listeria monocytogenes* in the cured ham food chain revealed by genetic analysis. *Appl. Environ. Microbiol.* 82, 822–831.
- Mosqueda-Melgar, J., Elez-Martínez, P., Raybaudi-Massilia, R.M., Martín-Belloso, O., 2008. Effects of pulsed electric fields on pathogenic microorganisms of major concern in fluid foods: A Review. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 48, 747–759.
- Mosqueda-Melgar, J., Raybaudi-Massilia, R.M., Martín-Belloso, O., 2007. Influence of treatment time and pulse frequency on *Salmonella Enteritidis*, *Escherichia coli* and *Listeria monocytogenes* populations inoculated in melon and watermelon juices treated by pulsed electric fields. *Int. J. Food Microbiol.* 117, 192–200.
- Mraheil, M.A., Billion, A., Mohamed, W., Mukherjee, K., Kuenne, C., Pischmarov, J., Krawitz, C., Retey, J., Hartsch, T., Chakraborty, T., Hain, T., 2011. The intracellular sRNA transcriptome of *Listeria monocytogenes* during growth in macrophages. *Nucleic Acids Res.* 39, 4235–4248.
- Muhterem-Uyar, M., Dalmaso, M., Bolocan, A.S., Hernandez, M., Kapetanakou, A.E., Kuchta, T., Manios, S.G., Melero, B., Minarovičová, J., Nicolau, A.I., Rovira, J., Skandamis, P.N., Jordan, K., Rodríguez-Lázaro, D., Stessl, B., Wagner, M., 2015. Environmental sampling for *Listeria monocytogenes* control in food processing facilities reveals three contamination scenarios. *Food Control* 51, 94–107.
- Mujahid, S., Pechan, T., Wang, C., 2008. Protein expression by *Listeria monocytogenes* grown on a RTE-meat matrix. *Int. J. Food Microbiol.* 128, 203–211.
- Müller, A.A., Schmid, M.W., Meyer, O., Meussdoerffer, F.G., 2010. *Listeria seeligeri* isolates from food processing environments form two phylogenetic lineages. *Appl. Environ. Microbiol.* 76, 3044–3047.

- Müller, D.M., Carrasco, M.S., Tonarelli, G.G., Simonetta, A.C., 2009. Characterization and purification of a new bacteriocin with a broad inhibitory spectrum produced by *Lactobacillus plantarum* lp 31 strain isolated from dry-fermented sausage. *J. Appl. Microbiol.* 106, 2031–2040.
- Muñoz, N., Sonar, C.R., Bhunia, K., Tang, J., Barbosa-Cánovas, G. V., Sablani, S.S., 2019. Use of protective culture to control the growth of *Listeria monocytogenes* and *Salmonella typhimurium* in ready-to-eat cook-chill products. *Food Control* 102, 81–86.
- Mutlu, N., Sahin, M., 2019. Isolation and characterisation of *Listeria monocytogenes* bacteriophages from environmental sources in Kars-Turkey. *Pak. Vet. J.* 39, 91–95.
- Nadon, C.A., Bowen, B.M., Wiedmann, M., Boor, K.J., 2002.  $\sigma^B$  contributes to PrfA-mediated virulence in *Listeria monocytogenes*. *Infect. Immun.* 70, 3948–3952.
- Nadon, C.A., Woodward, D., Young, C., Rodgers, F., Wiedmann, M., 2001. Correlations between molecular subtyping and serotyping of *Listeria monocytogenes*. *J. Clin. Microbiol.* 39, 2704–2707.
- Ng, W.F., Langlois, B.E., Moody, W.G., 1997. Fate of selected pathogens in vacuum-packaged dry-Cured (Country-Style) ham slices stored at 2 and 25° C. *J. Food Prot.* 60, 1541–1547.
- Nho, S.W., Abdelhamed, H., Reddy, S., Karsi, A., Lawrence, M.L., 2015. Identification of high-risk *Listeria monocytogenes* serotypes in lineage I (serotype 1/2a, 1/2c, 3a and 3c) using multiplex PCR. *J. Appl. Microbiol.* 119, 845–852.
- Nieto-Lozano, J.C., Reguera-Useros, J.I., Peláez-Martínez, M. del C., Sacristán-Pérez-Minayo, G., Gutiérrez-Fernández, Á.J., la Torre, A.H. de, 2010. The effect of the pediocin PA-1 produced by *Pediococcus acidilactici* against *Listeria monocytogenes* and *Clostridium perfringens* in Spanish dry-fermented sausages and frankfurters. *Food Control* 21, 679–685.
- Nolan, D.A., Chamblin, D.C., Troller, J.A., 1992. Minimal water activity levels for growth and survival of *Listeria monocytogenes* and *Listeria innocua*. *Int. J. Food Microbiol.* 16, 323–335.
- Nolan, R., Hands, R.E., Bustin, S.A., 2006. Quantification of mRNA using real-time RT-qPCR. *Nat. Protoc.* 1, 1559–1582.
- Norton, D.M., Braden, C.R., 2007. Foodborne listeriosis, in: CRC Press (Ed.), *Listeria, Listeriosis, and Food Safety*. CRC Press, Taylor & Francis Group, Boca Raton, Florida.

- Norton, D.M., McCamey, M.A., Gall, K.L., Scarlett, J.M., Boor, K.J., Wiedmann, M., 2001. Molecular studies on the ecology of *Listeria monocytogenes* in the smoked fish processing industry. *Appl. Environ. Microbiol.* 67, 198–205.
- Nugen, S.R., Baeumner, A.J., 2008. Trends and opportunities in food pathogen detection. *Anal. Bioanal. Chem.* 391, 451–454.
- Núñez, F. (1995). Flora antifúngica en jamón ibérico y su importancia tecnológica y sanitaria. *Tesis Doctoral*. Facultad de Veterinaria. Universidad de Extremadura.
- Núñez-Montero, K., Leclercq, A., Moura, A., Vales, G., Peraza, J., Pizarro-Cerdá, J., Lecuit, M., 2018. *Listeria costaricensis* sp. Nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 68, 844–850.
- Núñez, F., Lara, M.S., Peromingo, B., Delgado, J., Sánchez-Montero, L., Andrade, M.J., 2015. Selection and evaluation of *Debaryomyces hansenii* isolates as potential bioprotective agents against toxigenic penicillia in dry-fermented sausages. *Food Microbiol.* 46, 114–120.
- Núñez, F., Rodríguez, M.M., Bermúdez, M.E., Córdoba, J.J., Asensio, M. a, 1996a. Composition and toxigenic potential of the mould population on dry-cured Iberian ham. *Int. J. Food Microbiol.* 32, 185–197.
- Núñez, F., Rodríguez, M.M., Córdoba, J.J., Bermúdez, M.E., Asensio, M.A., 1996b. Yeast population during ripening of dry-cured Iberian ham. *Int. J. Food Microbiol.* 29, 271–280.
- Núñez, F., Rodríguez, M.M., Martín, A., Córdoba, J.J., Bermúdez, E., Asensio, M.A., 1998. Selección de cultivos iniciadores para jamón curado y ventajas de su aplicación, in: Proceeding of the special symposium “El jamón curado: Tecnología y análisis de consumo” (Ed.), 44th International Congress of Meat Science and Technology. Barcelona, pp. 58–68.
- Ochangco, H.S., Gamero, A., Smith, I.M., Christensen, J.E., Jespersen, L., Arneborg, N., 2016. In vitro investigation of *Debaryomyces hansenii* strains for potential probiotic properties. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 32, 141.
- Okada, Y., Okada, N., Makino, S.I., Asakura, H., Yamamoto, S., Igimi, S., 2006. The sigma factor RpoN ( $\sigma_{54}$ ) is involved in osmotolerance in *Listeria monocytogenes*. *FEMS Microbiol. Lett.* 263, 54–60.
- Olaimat, A.N., Al-Holy, M.A., Shahbaz, H.M., Al-Nabulsi, A.A., Abu Ghoush, M.H., Osaili, T.M., Ayyash, M.M., Holley, R.A., 2018. Emergence of antibiotic resistance in *Listeria monocytogenes* isolated from food products: A comprehensive review.



- Compr. Rev. Food Sci. Food Saf. 17, 1277–1292.
- Olesen, I., Thorsen, L., Jespersen, L., 2010. Relative transcription of *Listeria monocytogenes* virulence genes in liver pâtés with varying NaCl content. *Int. J. Food Microbiol.* 141, S60–S68.
- Olesen, I., Vogensen, F., Jespersen, L., 2009. Gene transcription and virulence potential of *Listeria monocytogenes* strains after exposure to acidic and NaCl stress. *Foodborne Pathog. Dis.* 669–680.
- Oliver, H.F., Orsi, R.H., Wiedmann, M., Boor, K.J., 2010. *Listeria monocytogenes*  $\sigma^B$  has a small core regulon and a conserved role in virulence but makes differential contributions to stress tolerance across a diverse collection of strains. *Appl. Environ. Microbiol.* 76, 4216–4232.
- Ollinger, J., Bowen, B., Wiedmann, M., Boor, K.J., Bergholz, T.M., 2009. *Listeria monocytogenes*  $\sigma^B$  modulates PrfA-mediated virulence factor expression. *Infect. Immun.* 77, 2113–2124.
- Olsen, K.N., Larsen, M.H., Gahan, C.G.M., Kallipolitis, B., Wolf, X.A., Rea, R., Hill, C., Ingmer, H., 2005. The Dps-like protein Fri of *Listeria monocytogenes* promotes stress tolerance and intracellular multiplication in macrophage-like cells. *Microbiology* 151, 925–933.
- Oravcová, K., Trnčíková, T., Kuchta, T., Kaclíková, E., 2008. Limitation in the detection of *Listeria monocytogenes* in food in the presence of competing *Listeria innocua*. *J. Appl. Microbiol.* 104, 429–437.
- Orsi, R.H., Bakker, H.C. den, Wiedmann, M., 2011. *Listeria monocytogenes* lineages: Genomics, evolution, ecology, and phenotypic characteristics. *Int. J. Med. Microbiol.* 301, 79–96.
- Orsi, R.H., Ripoll, D.R., Yeung, M., Nightingale, K.K., Wiedmann, M., 2007. Recombination and positive selection contribute to evolution of *Listeria monocytogenes* *inlA*. *Microbiology* 153, 2666–2678.
- Orsi, R.H., Wiedmann, M., 2016. Characteristics and distribution of *Listeria* spp., including *Listeria* species newly described since 2009. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 100, 5273–5287.
- Ozer, N.P., Demirci, A., 2006. Inactivation of *Escherichia coli* O157:H7 and *Listeria monocytogenes* inoculated on raw salmon fillets by pulsed UV-light treatment. *Int. J. Food Sci. Technol.* 41, 354–360.
- Paduro, C., Montero, D.A., Chamorro, N., Carreño, L.J., Vidal, M., Vidal, R., 2019. Ten

- years of molecular epidemiology surveillance of *Listeria monocytogenes* in Chile 2008-2017. *Food Microbiol.* 85, 103280.
- Pagán, R., Mañas, P., Raso, J., Condón, S., 1999. Bacterial resistance to ultrasonic waves under pressure at nonlethal (manosonication) and lethal (manothermosonication) temperatures. *Appl. Environ. Microbiol.* 65, 297–300.
- Palchetti, I., Mascini, M., 2008. Electroanalytical biosensors and their potential for food pathogen and toxin detection. *Anal. Bioanal. Chem.* 391, 455–471.
- Palumbo, J.D., Borucki, M.K., Mandrell, R.E., Gorski, L., 2003. Serotyping of *Listeria monocytogenes* by enzyme-linked immunosorbent assay and identification of mixed-serotype cultures by colony immunoblotting. *J. Clin. Microbiol.* 41, 564–571.
- Pan, Y., Breidt, F., 2007. Enumeration of viable *Listeria monocytogenes* cells by real-time PCR with propidium monoazide and ethidium monoazide in the presence of dead cells. *Appl. Environ. Microbiol.* 73, 8028–8031.
- Pan, Y., Breidt, F., Kathariou, S., 2009. Competition of *Listeria monocytogenes* serotype 1/2a and 4b strains in mixed-culture biofilms. *Appl. Environ. Microbiol.* 75, 5846–5852.
- Parichehr, M., Mohammad, K., Abbas, D., Mehdi, K., 2019. Developing a multiplex real-time PCR with a new pre-enrichment to simultaneously detect four foodborne bacteria in milk. *Future Microbiol.* 14, 885–898.
- Paterson, J.S., 1940. The antigenic structure of organism of the genus *Listerella*. *J. Pathol. Bacteriol.* 51, 427–436.
- Patterson, M.F., Mackle, A., Linton, M., 2011. Effect of high pressure, in combination with antilisterial agents, on the growth of *Listeria monocytogenes* during extended storage of cooked chicken. *Food Microbiol.* 28, 1505–1508.
- Peccio, A., Autio, T., Korkeala, H., Rosmini, R., Trevisani, M., 2003. *Listeria monocytogenes* occurrence and characterization in meat-producing plants. *Lett. Appl. Microbiol.* 37, 234–238.
- Perera, M.N., Abuladze, T., Li, M., Woolston, J., Sulakvelidze, A., 2015. Bacteriophage cocktail significantly reduces or eliminates *Listeria monocytogenes* contamination on lettuce, apples, cheese, smoked salmon and frozen foods. *Food Microbiol.* 52, 42–48.
- Pérez-Baltar, A., Serrano, A., Bravo, D., Montiel, R., Medina, M., 2019. Combined Effect of High pressure processing with enterocins or thymol on the inactivation of *Listeria monocytogenes* and the characteristics of sliced dry-cured Ham. *Food Bioprocess*

- Technol. 12, 288–297.
- Peromingo, B., Andrade, M.J., Delgado, J., Sánchez-Montero, L., Núñez, F., 2019. Biocontrol of aflatoxigenic *Aspergillus parasiticus* by native *Debaryomyces hansenii* in dry-cured meat products. *Food Microbiol.* 82, 269–276.
- Peromingo, B., Núñez, F., Rodríguez, A., Alía, A., Andrade, M.J., 2018. Potential of yeasts isolated from dry-cured ham to control ochratoxin A production in meat models. *Int. J. Food Microbiol.* 268, 73–80.
- Peterson, L.D., Faith, N.G., Czuprynski, C.J., 2007. Resistance of *Listeria monocytogenes* F2365 cells to synthetic gastric fluid is greater following growth on ready-to-eat deli Turkey meat than in brain heart infusion broth. *J. Food Prot.* 70, 2589–2595.
- Pfaffl, M.W., 2004. Quantification strategies in real-time PCR, en: Bustin S.A. International University Line (Ed.), A-Z of Quantitative PCR. California, EE.UU, pp. 87–120.
- Pfaffl, M.W., 2001. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res.* 29, e45.
- Phan-Thanh, L., Jänsch, L., 2005. Elucidation of mechanisms of acid stress in *Listeria monocytogenes* by proteomic analysis. Wiley-Blackwell, pp. 73–88.
- Phan-Thank, L., Gormon, T., 1997. Stress proteins in *Listeria monocytogenes*. *Electrophoresis* 18, 1464–1471.
- Phan-Thank, L., Gormon, T., 1995. Analysis of heat and cold shock proteins in *Listeria* by two-dimensional electrophoresis. *Electrophoresis* 16, 444–450.
- Pieta, L., Escudero, F.L.G., Jacobus, A.P., Cheiran, K.P., Gross, J., Moya, M.L.E., Soares, G.L.G., Margis, R., Frazzon, A.P.G., Frazzon, J., 2017. Comparative transcriptomic analysis of *Listeria monocytogenes* reveals upregulation of stress genes and downregulation of virulence genes in response to essential oil extracted from *Baccharis psiadioides*. *Ann. Microbiol.* 67, 479–490.
- Pilgrim, S., Kolb-Mäurer, A., Gentschev, I., Goebel, W., Kuhn, M., 2003. Deletion of the gene encoding p60 in *Listeria monocytogenes* leads to abnormal cell division and loss of actin-based motility. *Infect. Immun.* 71, 3473–84.
- Piyasena, P., Mohareb, E., McKellar, R.C., 2003. Inactivation of microbes using ultrasound: A review. *Int. J. Food Microbiol.* 87, 207–216.
- Pizarro-cerda, J., Ku, A., 2012. Entry of *Listeria monocytogenes* in mammalian. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* 1–18.

- Portocarrero, S.M., Newman, M., Mikel, B., 2002. Reduction of *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* spp., and *Escherichia coli* O157:H7 during processing of country-cured hams. *J. Food Sci.* 67, 1892–1898.
- Possas, A., Pérez-Rodríguez, F., Valero, A., García-Gimeno, R.M., 2017. Modelling the inactivation of *Listeria monocytogenes* by high hydrostatic pressure processing in foods: A review. *Trends Food Sci. Technol.* 70, 45–55.
- Postollec, F., Falentin, H., Pavan, S., Combrisson, J., Sohier, D., 2011. Recent advances in quantitative PCR (qPCR) applications in food microbiology. *Food Microbiol.* 28, 848–861.
- Poyart, C., Abachin, E., Razafimanantsoa, I., Berche, P., 1993. The zinc metalloprotease of *Listeria monocytogenes* is required for maturation of phosphatidylcholine phospholipase C: Direct evidence obtained by gene complementation. *Infect. Immun.* 61, 1576–1580.
- Prencipe, V.A., Rizzi, V., Acciari, V., Iannetti, L., Giovannini, A., Serraino, A., Calderone, D., Rossi, A., Morelli, D., Marino, L., Migliorati, G., Caporale, V., 2012. *Listeria monocytogenes* prevalence, contamination levels and strains characterization throughout the Parma ham processing chain. *Food Control* 25, 150–158.
- Préstamo, G., Sanz, P.D., Fonberg-Broczek, M., Arroyo, G., 1999. High pressure response of fruit jams contaminated with *Listeria monocytogenes*. *Lett. Appl. Microbiol.* 28, 313–6.
- Priest F., Austin, B., 1995. Numerical taxonomy, in: Priest, F., Austin, B. (Eds), *Modern Bacterial Taxonomy*. Chapman and Hall, London, pp. 14-49.
- Quijada, N.M., De Filippis, F., Sanz, J.J., García-Fernández, M. del C., Rodríguez-Lázaro, D., Ercolini, D., Hernández, M., 2018. Different *Lactobacillus* populations dominate in “Chorizo de León” manufacturing performed in different production plants. *Food Microbiol.* 70, 94–102.
- Quinto, E.J., Marín, J.M., Schaffner, D.W., 2016. Effect of the competitive growth of *Lactobacillus sakei* MN on the growth kinetics of *Listeria monocytogenes* Scott A in model meat gravy. *Food Control* 63, 34–45.
- Radonić, A., Thulke, S., Mackay, I.M., Landt, O., Siegert, W., Nitsche, A., 2004. Guideline to reference gene selection for quantitative real-time PCR. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 313, 856–862.
- Rådström, P., Knutsson, R., Wolffs, P., Lövenklev, M., Löfström, C., 2004. Pre-PCR

- processing: strategies to generate PCR-compatible samples. *Mol. Biotechnol.* 26, 133–146.
- Rajkovic, A., Smigic, N., Devlieghere, F., 2010a. Contemporary strategies in combating microbial contamination in food chain. *Int. J. Food Microbiol.* 141, S29–S42.
- Rajkovic, A., Tomasevic, I., De Meulenaer, B., Devlieghere, F., 2017. The effect of pulsed UV light on *Escherichia coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella Typhimurium*, *Staphylococcus aureus* and staphylococcal enterotoxin A on sliced fermented salami and its chemical quality. *Food Control* 73, 829–837.
- Rajkovic, A., Tomasevic, I., Smigic, N., Uyttendaele, M., Radovanovic, R., Devlieghere, F., 2010b. Pulsed UV light as an intervention strategy against *Listeria monocytogenes* and *Escherichia coli* O157:H7 on the surface of a meat slicing knife. *J. Food Eng.* 100, 446–451.
- Rantsiou, K., Alessandria, V., Urso, R., Dolci, P., Cocolin, L., 2008. Detection, quantification and vitality of *Listeria monocytogenes* in food as determined by quantitative PCR. *Int. J. Food Microbiol.* 121, 99–105.
- Rantsiou, K., Greppi, A., Garosi, M., Acquadro, A., Mataragas, M., Cocolin, L., 2012a. Strain dependent expression of stress response and virulence genes of *Listeria monocytogenes* in meat juices as determined by microarray. *Int. J. Food Microbiol.* 152, 116–122.
- Rantsiou, K., Mataragas, M., Alessandria, V., Cocolin, L., 2012b. Expression of virulence genes of *Listeria monocytogenes* in food. *J. Food Saf.* 32, 161–168.
- Rastogi, N.K., Raghavarao, K.S.M.S., Balasubramaniam, V.M., Niranjana, K., Knorr, D., 2007. Opportunities and challenges in high pressure processing of foods. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 47, 69–112.
- Rawool, D.B., Doijad, S.P., Poharkar, K.V., Negi, M., Kale, S.B., Malik, S.V.S., Kurkure, N.V., Chakraborty, T., Barbuddhe, S.B., 2016. A multiplex PCR for detection of *Listeria monocytogenes* and its lineages. *J. Microbiol. Methods* 130, 144–147.
- Raymaekers, M., Smets, R., Maes, B., Cartuyvels, R., 2009. Checklist for optimization and validation of real-time PCR assays. *J. Clin. Lab. Anal.* 23, 145–151.
- Rea, R., Hill, C., Gahan, C.G.M., 2005. *Listeria monocytogenes* PerR mutants display a small-colony phenotype, increased sensitivity to hydrogen peroxide, and significantly reduced murine virulence. *Appl. Environ. Microbiol.* 71, 8314–8322.
- Real Decreto 474/2014, de 13 de junio, por el que se aprueba la norma de calidad de derivados cárnicos.

- Reglamento (CE) n° 2073/2005 de la Comisión de 15 de noviembre de 2005, relativo a los criterios microbiológicos aplicables a los productos alimenticios. D. Of. la Unión Eur. 1–26.
- Reglamento (CE) N° 852/2004 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 29 de abril de 2004, relativo a la higiene de los productos alimenticios. D. Of. la Unión Eur. L139/1, 1–54.
- Reina, L.D., Jin, Z.T., Zhang, Q.H., Yousef, A.E., 1998. Inactivation of *Listeria monocytogenes* in milk by pulsed electric field. J. Food Prot. 61, 1203–1206.
- Reis, C.M., Barbosa, V.A., Rusak, L.A., Vallim, D.C., Hofer, E., 2011. Antimicrobial susceptibilities of *Listeria monocytogenes* human strains isolated from 1970 to 2008 in Brazil. Rev. Soc. Bras. Med. Trop. 44, 173–176.
- Resano, H., Sanjuán, A.I., Cilla, I., Roncalés, P., Albisu, L.M., 2010. Sensory attributes that drive consumer acceptability of dry-cured ham and convergence with trained sensory data. Meat Sci. 84, 344–351.
- Reyes, C., Linares, L.H., Moredo, F., Lirón, J.P., Brusa, V., Londero, A., Galli, L., Oteiza, J.M., Costa, M., Leotta, G.A., 2017. Development and in-house validation of a real-time polymerase chain reaction for the detection of *Listeria monocytogenes* in meat. Foodborne Pathog. Dis. 15, 55–57.
- Reynolds, A.E., Harrison, M.A., Rose-Morrow, R., Lyon, C.E., 2001. Validation of dry cured ham process for control of pathogens. J. Food Sci. 66, 1373–1379.
- Ribot, E.M., Freeman, M., Hise, K.B., Gerner-Smidt, P., 2019. PulseNet: Entering the age of next-generation sequencing. Foodborne Pathog. Dis. 16, 451–456.
- Rieu, A., Guzzo, J., Piveteau, P., 2010. Sensitivity to acetic acid, ability to colonize abiotic surfaces and virulence potential of *Listeria monocytogenes* EGD-e after incubation on parsley leaves. J. Appl. Microbiol. 108, 560–570.
- Rip, D., Gouws, P.A., 2009. Development of an internal amplification control using multiplex PCR for the detection of *Listeria monocytogenes* in food products. Food Anal. Methods 2, 190–196.
- Ripolles-Avila, C., Hascoët, A.S., Martínez-Suárez, J.V., Capita, R., Rodríguez-Jeréz, J.J., 2019. Evaluation of the microbiological contamination of food processing environments through implementing surface sensors in an iberian pork processing plant: An approach towards the control of *Listeria monocytogenes*. Food Control 99, 40–47.
- Rivoal, K., Fablet, A., Courtillon, C., Bougeard, S., Chemaly, M., Protais, J., 2013.

- Detection of *Listeria* spp. in liquid egg products and in the egg breaking plants environment and tracking of *Listeria monocytogenes* by PFGE. *Int. J. Food Microbiol.* 166, 109–116.
- Roberts, A., Nightingale, K., Jeffers, G., Fortes, E., Marcelino, J., Wiedmann, M., 2006. Genetic and phenotypic characterization of *Listeria monocytogenes* lineage III. *Microbiology* 152, 685–693.
- Robichon, D., Gouin, E., Debarbouille, M., Cossart, P., Cenatiempo, Y., Hechard, Y., 1997. The *rpoN* ( $\sigma^{54}$ ) gene from *Listeria monocytogenes* is involved in resistance to mesentericin Y105, an antibacterial peptide from *Leuconostoc mesenteroides*. *J. Bacteriol.* 179, 7591–7594.
- Roche, S.M., Gracieux, P., Milohanic, E., Albert, I., Virlogeux-Payant, I., Temoin, S., Grepinet, O., Kerouanton, A., Jacquet, C., Cossart, P., Velge, P., 2005. Investigation of specific substitutions in virulence genes characterizing phenotypic groups of low-virulence field strains of *Listeria monocytogenes*. *Appl. Environ. Microbiol.* 71, 6039–6048.
- Roche, S.M., Grépinet, O., Kerouanton, A., Ragon, M., Leclercq, A., Témoïn, S., Schaeffer, B., Skorski, G., Mereghetti, L., Monnier, A. Le, Velge, P., 2012. Polyphasic characterization and genetic relatedness of low-virulence and virulent *Listeria monocytogenes* isolates. *BMC Microbiol.* 12, 1–12.
- Rodicio, M.R., Mendoza, M.C., 2004. Identificación bacteriana mediante secuenciación del ARNr 16S: fundamento, metodología y aplicaciones en microbiología clínica. *Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.* 22, 238–245.
- Rodríguez-Lázaro, D., Hernández, M., 2013. Real-time PCR in food science: Introduction. *Curr. Issues Mol. Biol.* 15, 25–38.
- Rodríguez-Lázaro, D., Hernández, M., Scotti, M., Esteve, T., Vázquez-Boland, J.A., Pla, M., 2004. Quantitative Detection of *Listeria monocytogenes* and *Listeria innocua* by Real-Time PCR: assessment of *hly*, *iap*, and *lin02483* targets and AmpliFluor technology. *Appl. Environ. Microbiol.* 70, 1366–1377.
- Rodríguez-Lázaro, D., Pla, M., Scotti, M., Monzó, J.H., Vázquez-boland, J.A., 2005. A novel Real-Time PCR for *Listeria monocytogenes* that monitors analytical performance via an internal amplification control. *Appl. Environ. Microbiol.* 71, 9008–9012.
- Rodríguez-López, P., Bernárdez, M., Rodríguez-Herrera, J.J., Comesaña, Á.S., Cabo, M.L., 2019. Identification and metagenetic characterisation of *Listeria*

- monocytogenes*-harbouring communities present in food-related industrial environments. *Food Control* 95, 6–17.
- Rodríguez, A., Córdoba, J.J., Werning, M.L., Andrade, M.J., Rodríguez, M., 2012a. Duplex real-time PCR method with internal amplification control for quantification of verrucosidin producing molds in dry-ripened foods. *Int. J. Food Microbiol.* 153, 85–91.
- Rodríguez, A., Medina, Á., Córdoba, J.J., Magan, N., 2014. The influence of salt (NaCl) on ochratoxin A biosynthetic genes, growth and ochratoxin A production by three strains of *Penicillium nordicum* on a dry-cured ham-based medium. *Int. J. Food Microbiol.* 178, 113–119.
- Rodríguez, A., Rodríguez, M., Córdoba, J.J., Andrade, M.J., 2015. Design of primers and probes for quantitative real-time PCR methods, en: Basu, C. (Ed.), *PCR Primer Design. Methods in Molecular Biology*, New York, pp. 31–56.
- Rodríguez, A., Rodríguez, M., Luque, M.I., Martín, A., Córdoba, J.J., 2012b. Real-time PCR assays for detection and quantification of aflatoxin-producing molds in foods. *Food Microbiol.* 31, 89–99.
- Rodríguez, M.M. (1995). Evaluación tecnológica y sanitaria de las micrococáceas en la maduración del jamón de cerdo ibérico. *Tesis Doctoral*. Facultad de Veterinaria. Universidad de E
- Rodríguez, M., Núñez, F., Córdoba, J.J., Sanabria, C., Bermudez, E., Asensio, M.A., 1994. Characterization of *Staphylococcus* spp. and *Micrococcus* spp. isolated from iberian ham throughout the ripening process. *Int. J. Food Microbiol.* 24, 329–335.
- Rolhion, N., Cossart, P., 2017. How the study of *Listeria monocytogenes* has led to new concepts in biology. *Futur. Microbiol. Futur. Med.* 12, 621–638.
- Ryan, S., Begley, M., Gahan, C.G.M., Hill, C., 2009. Molecular characterization of the arginine deiminase system in *Listeria monocytogenes* : regulation and role in acid tolerance. *Environ. Microbiol.* 11, 432–445.
- Rychli, K., Grunert, T., Ciolacu, L., Zaiser, A., Razzazi-Fazeli, E., Schmitz-Esser, S., Ehling-Schulz, M., Wagner, M., 2016. Exoproteome analysis reveals higher abundance of proteins linked to alkaline stress in persistent *Listeria monocytogenes* strains. *Int. J. Food Microbiol.* 218, 17–26.
- Sabet, C., Lecuit, M., Cabanes, D., 2005. LPXTG Protein InlJ, a newly identified internalin involved in *Listeria monocytogenes* virulence. *Infec. Immun.* 73, 6912–6922.



- Sadeghi-Mehr, A., Lautenschlaeger, R., Drusch, S., 2016. Behavior of *Salmonella* spp. and *Listeria monocytogenes* throughout the manufacture and shelf-life of dry-cured formed ham. *Food Control* 64, 22–28.
- Salamci, E., Kordali, S., Kotan, R., Cakir, A., Kaya, Y., 2007. Chemical compositions, antimicrobial and herbicidal effects of essential oils isolated from Turkish *Tanacetum aucheranum* and *Tanacetum chiliophyllum* var. *chiliophyllum*. *Biochem. Syst. Ecol.* 35, 569–581.
- Saleh-Lakha, S., Allen, V.G., Li, J., Pagotto, F., Odumeru, J., Taboada, E., Lombos, M., Tabing, K.C., Blais, B., Ogunremi, D., Downing, G., Lee, S., Gao, A., Nadon, C., Chen, S., 2013. Subtyping of a large collection of historical *Listeria monocytogenes* strains from Ontario, Canada, by an improved multilocus variable-number tandem-repeat analysis (MLVA). *Appl. Environ. Microbiol.* 79, 6472–6480.
- Sallen, B., Rajoharison, A., Desvarenne, S., Quinn, F., Mabilat, C., 1996. Comparative analysis of 16S and 23S rRNA sequences of *Listeria* species. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 46, 669–674.
- Samara, A., Koutsoumanis, K.P., 2009. Effect of treating lettuce surfaces with acidulants on the behaviour of *Listeria monocytogenes* during storage at 5 and 20 °C and subsequent exposure to simulated gastric fluid. *Int. J. Food Microbiol.* 19, 1–7.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T., 1989. *Molecular cloning: a laboratory manual*, 2<sup>o</sup> Edition. ed. Nueva York, Estados Unidos.
- Sánchez-Molinero, F., Arnau, J., 2008. Effect of the inoculation of a starter culture and vacuum packaging during the resting stage on sensory traits of dry-cured ham. *Meat Sci.* 80, 1074–1080.
- Schlech, W.F., Acheson, D., 2000. Foodborne Listeriosis. *Clin. Infect. Dis.* 31, 770–775.
- Schmid, B., Klumpp, J., Raimann, E., Loessner, M.J., Stephan, R., Tasara, T., 2009. Role of cold shock proteins in growth of *Listeria monocytogenes* under cold and osmotic stress conditions. *Appl. Environ. Microbiol.* 2009, 1621–1627.
- Schmid, M.W., Ng, E.Y.W., Lampidis, R., Emmerth, M., Walcher, M., Kreft, J., Goebel, W., Wagner, M., Schleifer, K.H., 2005. Evolutionary history of the genus *Listeria* and its virulence genes. *Syst. Appl. Microbiol.* 28, 1–18.
- Schönberg, A., Bannerman, E., Courtieu, A.L., Kiss, R., McLauchlin, J., Shah, S., Wilhelms, D., 1996. Serotyping of 80 strains from the WHO multicentre international typing study of *Listeria monocytogenes*. *Int. J. Food Microbiol.* 32, 279–287.

- Schrama, D., Helliwell, N., Neto, L., Faleiro, M.L., 2013. Adaptation of *Listeria monocytogenes* in a simulated cheese medium: effects on virulence using the *Galleria mellonella* infection model. *Lett. Appl. Microbiol.* 56, 421–427.
- Schultze, T., Izar, B., Qing, X., Mannala, G.K., Hain, T., 2014. Current status of antisense RNA-mediated gene regulation in *Listeria monocytogenes*. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 4, 1–6.
- Scolari, G., Zacconi, C., Busconi, M., Lambri, M., 2015. Effect of the combined treatments of high hydrostatic pressure and temperature on *Zygosaccharomyces bailii* and *Listeria monocytogenes* in smoothies. *Food Control* 47, 166–174.
- Scotti, M., Monzó, H.J., Lacharme-Lora, L., Lewis, D.A., Vázquez-Boland, J.A., 2007. The PrfA virulence regulon. *Microbes Infect.* 9, 1196–1207.
- Seeliger, H., Jones, D., 1986. Genus *Listeria*, in: Wilkins, W.& (Ed.), *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Baltimore. EEUU.
- Seman, D.L., Borger, A.C., Meyer, J.D., Hall, P.A., Milkowski, A.L., 2002. Modelling the growth of *Listeria monocytogenes* in cured ready-to-eat processed meat products by manipulation of sodium chloride, sodium diacetate, potassium lactate, and product moisture content. *J. Food Prot.* 65, 651–658.
- Sereno, M.J., Viana, C., Pegoraro, K., Lopes da Silva, D., Yamatogi, R.S., Nero, L.A., Bersot, L. dos S., 2019. Distribution, adhesion, virulence and antibiotic resistance of persistent *Listeria monocytogenes* in a pig slaughterhouse in Brazil. *Food Microbiol.* 84, 103234.
- Sergelidis, D., Abraham, A., 2009. Adaptive response of *Listeria monocytogenes* to heat and its impact on food safety. *Food Control* 20, 1–10.
- Sesto, N., Koutero, M., Cossart, P., 2014. Bacterial and cellular RNAs at work during *Listeria* infection. *Future Microbiol.* 9, 1025–1037.
- Shahbaz, H.M., Yoo, S., Seo, B., Ghafoor, K., Kim, J.U., Lee, D.-U., Park, J., 2016. Combination of TiO<sub>2</sub>-UV photocatalysis and high hydrostatic pressure to inactivate bacterial pathogens and yeast in commercial apple juice. *Food Bioprocess Technol.* 9, 182–190.
- Shakuntala, I., Das, S., Ghatak, S., Milton, A.A.P., Sanjukta, R., Puro, K.-U., Pegu, R.K., Duarah, A., Barbuddhe, S.B., Sen, A., 2019. Prevalence, characterization, and genetic diversity of *Listeria monocytogenes* isolated from foods of animal origin in North East India. *Food Biotechnol.* 33, 237–250.
- Shen, A., Higgins, D.E., 2006. The MogR transcriptional repressor regulates

- nonhierarchal expression of flagellar motility genes and virulence in *Listeria monocytogenes*. PLoS Pathog. 2, 282–295.
- Shen, Y., Naujokas, M., Park, M., Ireton, K., 2000. InlB-dependent internalization of *Listeria* is mediated by the Met receptor tyrosine kinase. Cell 103, 501–510.
- Sheng, J., Tao, T., Zhu, X., Bie, X., Lv, F., Zhao, H., Lu, Z., 2018. A multiplex PCR detection method for milk based on novel primers specific for *Listeria monocytogenes* 1/2a serotype. Food Control 86, 183–190.
- Shimajima, Y., Ida, M., Nishino, Y., Ishitsuka, R., Kuroda, S., Hirai, A., Sadamasu, K., Nakama, A., Kai, A., 2016. Multiplex PCR serogrouping of *Listeria monocytogenes* isolated in Japan. J. Vet. Med. Sci. 78, 477–479.
- Silva, C. de S., Figueiredo, H.M. de, Stamford, T.L.M., Silva, L.H.M. da, 2019. Inhibition of *Listeria monocytogenes* by *Melaleuca alternifolia* (tea tree) essential oil in ground beef. Int. J. Food Microbiol. 293, 79–86.
- Simoncini, N., Rotelli, D., Virgili, R., Quintavalla, S., 2007. Dynamics and characterization of yeasts during ripening of typical Italian dry-cured ham. Food Microbiol. 24, 577–84.
- Simoncini, N., Virgili, R., Spadola, G., Battilani, P., 2014. Autochthonous yeasts as potential biocontrol agents in dry-cured meat products. Food Control 46, 160–167.
- Skandamis, P.N., Gounadaki, A.S., Geornaras, I., Sofos, J.N., 2012. Adaptive acid tolerance response of *Listeria monocytogenes* strains under planktonic and immobilized growth conditions. Int. J. Food Microbiol. 159, 160–166.
- Skowron, K., Grudlewska, K., Gryń, G., Skowron, K.J., Świeca, A., Paluszak, Z., Zimek, Z., Rafalski, A., Gospodarek-Komkowska, E., 2018. Effect of electron beam and gamma radiation on drug-susceptible and drug-resistant *Listeria monocytogenes* strains in salmon under different temperature. J. Appl. Microbiol. 125, 828–842.
- Slama, B.R., Miladi, H., Chaieb, K., Bakhrouf, A., 2013. Survival of *Listeria monocytogenes* cells and the effect of extended frozen storage (-20 °C) on the expression of its virulence gene. Appl. Biochem. Biotechnol. 170, 1174–1183.
- Sleator, R.D., Gahan, C.G.M., Hill, C., 2003. A postgenomic appraisal of osmotolerance in *Listeria monocytogenes*. Appl. Environ. Microbiol. 69, 1–9.
- Sleator, R.D., Hill, C., 2005. A novel role for the LisRK two-component regulatory system in listerial osmotolerance. Clin. Microbiol. Infect. 11, 599–601.
- Sleator, R.D., Hill, C., 2002. Bacterial osmoadaptation: the role of osmolytes in bacterial stress and virulence. FEMS Microbiol. Rev. 26, 49–71.

- Sleator, R.D., Wemekamp-Kamphuis, H.H., Gahan, C.G.M., Abee, T., Hill, C., 2005. A PrfA-regulated bile exclusion system (Bile) is a novel virulence factor in *Listeria monocytogenes*. *Mol. Microbiol.* 55, 1183–1195.
- Sleator, R.D., Wouters, J., Gahan, C.G.M., Abee, T., Hill, C., 2001. Analysis of the Role of OpuC, an Osmolyte Transport System, in Salt Tolerance and Virulence Potential of *Listeria monocytogenes*. *Appl. Environ. Microbiol.* 67, 2692–2698.
- Somer, L., Kashi, Y., 2003. A PCR Method based on 16S rRNA sequence for simultaneous detection of the genus *Listeria* and the species *Listeria monocytogenes* in food products. *J. Food Prot.* 66, 1658–1665.
- Soni, K.A., Nannapaneni, R., Tasara, T., 2011. The contribution of transcriptomic and proteomic analysis in elucidating stress adaptation responses of *Listeria monocytogenes*. *Foodborne Pathog. Dis.* 8, 843–852.
- Sosnowski, M., Lachtara, B., Wieczorek, K., Osek, J., 2019. Antimicrobial resistance and genotypic characteristics of *Listeria monocytogenes* isolated from food in Poland. *Int. J. Food Microbiol.* 289, 1–6.
- Souza, M. De, Dimitrov, S., Ivanova, I., Dora, B., Melo, G. De, Chobert, J., Haertl, T., 2015. Improving safety of salami by application of bacteriocins produced by an autochthonous *Lactobacillus curvatus* isolate. *Food Microbiol.* 46, 254–262.
- Stasiewicz, M.J., Oliver, H.F., Wiedmann, M., den Bakker, H.C., 2015. Whole-Genome sequencing allows for improved identification of persistent *Listeria monocytogenes* in food-associated environments. *Appl. Environ. Microbiol.* 81, 6024–6037.
- Stasiewicz, M.J., Wiedmann, M., Bergholz, T.M., 2011. The transcriptional response of *Listeria monocytogenes* during adaptation to growth on lactate and diacetate includes synergistic changes that increase fermentative acetoin production. *Appl. Environ. Microbiol.* 77, 5294–5306.
- Stollewerk, K., Cruz, C.D., Fletcher, G., Garriga, M., Jofré, A., 2017. The effect of mild preservation treatments on the invasiveness of different *Listeria monocytogenes* strains on Greenshell™ mussels. *Food Control* 71, 322–328.
- Stollewerk, Katharina, Jofré, A., Comaposada, J., Arnau, J., Garriga, M., 2014. NaCl-free processing, acidification, smoking and high pressure: effects on growth of *Listeria monocytogenes* and *Salmonella enterica* in QDS processed dry-cured ham. *Food Control* 35, 56–64.
- Su, X., Zhang, J., Shi, W., Yang, X., Li, Y., Pan, H., 2016. Molecular characterization and antimicrobial susceptibility of *Listeria monocytogenes* isolated from foods and

- humans. *Food Control* 70, 96–102.
- Sue, D., Fink, D., Wiedmann, M., Boor, K.J., 2004.  $\sigma^B$ -dependent gene induction and expression in *Listeria monocytogenes* during osmotic and acid stress conditions simulating the intestinal environment. *Microbiol.* 150, 3843–3855.
- Sutherlands, P.S., Miles, D.W., Laboyrie, D.A., 2003. *Listeria monocytogenes*, en: Branch), Waterloo, N.S.W. (Ed.), *Foodborne Microorganisms of Public Health Significance*. Sydney, pp. 381–443.
- Swaminathan, B., Gerner-Smidt, P., 2007. The epidemiology of human listeriosis. *Microbes Infect.* 9, 1236–1243.
- Tang, S., Orsi, R.H., den Bakker, H.C., Wiedmann, M., Boor, K.J., Bergholz, T.M., 2015. Transcriptomic analysis of the adaptation of *Listeria monocytogenes* to growth on vacuum-packed cold smoked salmon. *Appl. Environmental Microbiol.* 81, 6812–6824.
- Tasara, T., Stephan, R., 2006. Cold Stress Tolerance of *Listeria monocytogenes*: a review of molecular adaptive mechanisms and food safety implications. *J. Food Prot.* 69, 1473–1484.
- Tenover, F.C., Arbeit, R.D., Goering, R. V, Mickelsen, P.A., Murray, B.E., Persing, D.H., Swaminathan, B., 1995. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. *J. Clin. Microbiol.* 33, 2233–9.
- Thedieck, K., Hain, T., Mohamed, W., Tindall, B.J., Nimtz, M., Chakraborty, T., Wehland, J., Jansch, L., 2006. The MprF protein is required for lysinylation of phospholipids in listerial membranes and confers resistance to cationic antimicrobial peptides (CAMPs) on *Listeria monocytogenes*. *Mol. Microbiol.* 62, 1325–1339.
- Thévenot, D., Delignette-Muller, M.L., Christieans, S., Leroy, S., Kodjo, A., Vernozy-Rozand, C., 2006. Serological and molecular ecology of *Listeria monocytogenes* isolates collected from 13 French pork meat salting-curing plants and their products. *Int. J. Food Microbiol.* 112, 153–161.
- Thévenot, D., Delignette-Muller, M.L., Christieans, S., Vernozy-Rozand, C., 2005. Prevalence of *Listeria monocytogenes* in 13 dried sausage processing plants and their products. *Int. J. Food Microbiol.* 102, 85–94.
- Tienungoon, S., Ratkowsky, D.A., Meekin, T.A.M.C., Ross, T., 2000. Growth limits of *Listeria monocytogenes* as a function of temperature , pH , NaCl , and lactic acid. *Appl. Environ. Microbiol.* 66, 4979–4987.

- To, M.S., Favrin, S., Romanova, N., Griffiths, M.W., 2002. Postadaptational resistance to benzalkonium chloride and subsequent physicochemical modifications of *Listeria monocytogenes*. *Appl. Environ. Microbiol.* 68, 5258–5264.
- Todorov, S.D., Vaz-Velho, M., de Melo Franco, B.D.G., Holzapfel, W.H., 2013. Partial characterization of bacteriocins produced by three strains of *Lactobacillus sakei*, isolated from salpicão, a fermented meat product from North-West of Portugal. *Food Control* 30, 111–121.
- Toldrá, F., 2006. *Handbook of food science technology and engineering*. CRC Press, Florida.
- Toledano, A.M., Jordano, R., Medina, L.M., López-Mendoza, M.C., 2019. Behavior and effect of combined starter cultures on microbiological and physicochemical characteristics of dry-cured ham. *J. Food Sci. Technol.* 56, 122–131.
- Toledo-Arana, A., Dussurget, O., Nikitas, G., Sesto, N., Guet-Revillet, H., Balestrino, D., Loh, E., Gripenland, J., Tiensuu, T., Vaitkevicius, K., Barthelemy, M., Vergassola, M., Nahori, M.A., Soubigou, G., Régnault, B., Coppée, J.Y., Lecuit, M., Johansson, J., Cossart, P., 2009. The *Listeria* transcriptional landscape from saprophytism to virulence. *Nature* 459, 950–956.
- Tompkin, R.B., 2002. Control of *Listeria monocytogenes* in the Food-Processing Environment. *J. Food Prot.* 65, 709–725.
- Traunšek, U., Toplak, N., Jeršek, B., Lapanje, A., Majstorović, T., Kovač, M., 2011. Novel cost-efficient real-time PCR assays for detection and quantitation of *Listeria monocytogenes*. *J. Microbiol. Methods* 85, 40–46.
- Tsigarida, E., Skandamis, P., Nychas, G.J.E., 2000. Behaviour of *Listeria monocytogenes* and autochthonous flora on meat stored under aerobic, vacuum and modified atmosphere packaging conditions with or without the presence of oregano essential oil at 5°C. *J. Appl. Microbiol.* 89, 901–909.
- Työppönen, S., Petäjä, E., Mattila-Sandholm, T., 2003. Bioprotectives and probiotics for dry sausages. *Int. J. Food Microbiol.* 83, 233–244.
- Uma, C., Muthulakshmi, K., Kumar, S., 2018. Incidence of *Listeria monocytogenes* in Ready To Eat ( RTE ) foods. *Int. J. Res. Anal. Rev.* 5, 341–346.
- Untergasser, A., Cutcutache, I., Koressaar, T., Ye, J., Faircloth, B.C., Remm, M., Rozen, S.G., 2012. Primer3-new capabilities and interfaces. *Nucleic Acids Res.* 40, 1–12.
- Upadhyay, A., Johny, A.K., Amalaradjou, M.A.R., Ananda Baskaran, S., Kim, K.S., Venkitanarayanan, K., 2012. Plant-derived antimicrobials reduce *Listeria*

- monocytogenes* virulence factors in vitro, and down-regulate expression of virulence genes. *Int. J. Food Microbiol.* 157, 88–94.
- Upadhyay, A., Upadhyaya, I., Kollanoor-Johny, A., Ananda Baskaran, S., Mooyottu, S., Karumathil, D., Venkitanarayanan, K., 2013. Inactivation of *Listeria monocytogenes* on frankfurters by plant-derived antimicrobials alone or in combination with hydrogen peroxide. *Int. J. Food Microbiol.* 163, 114–118.
- Upadhyay, N., Kumar, C.T.M., Sharma, H., Borad, S., Singh, A.K., 2019. Pulse electric field processing of milk and milk products, en: Chauhan, O.P. (Ed.), *Non-Thermal Processing of Foods*. CRC Press (Taylor and Francis), Boca Raton, (Florida,USA).
- USDA, 2019. Isolation and identification of *Listeria monocytogenes* from Read Meat, Poultry, Ready-To-Eat Siluriformes (Fish), and Egg Products, and Environmental Samples, in: *Microbiology Laboratory Guidebook*. pp. 1–18.
- Utratna, M., Shaw, I., Starr, E., O’Byrne, C.P., 2011. Rapid, transient, and proportional activation of  $\sigma^B$  in response to osmotic stress in *Listeria monocytogenes*. *Appl. Environ. Microbiol.* 77, 7841–5.
- Valasek, M.A., Repa, J.J., 2005. The power of real-time PCR. *Adv. Physiol. Educ.* 29, 151–159.
- Valderrama, W.B., Dudley, E.G., Doores, S., Cutter, C.N., 2016. Commercially available rapid methods for detection of selected food-borne pathogens. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 56, 1519–1531.
- Välilä, A., Tilsala-Timisjärvi, A., Virtanen, E., 2015. Rapid detection and identification methods for *Listeria monocytogenes* in the food chain: A review. *Food Control* 55, 103–114.
- Van Der Veen, S., Abee, T., 2010. Importance of SigB for *Listeria monocytogenes* static and continuous-flow biofilm formation and disinfectant resistance. *Appl. Environ. Microbiol.* 76, 7854–7860.
- Van der Veen, S., Hain, T., Wouters, J.A., Hossain, H., de Vos, W.M., Abee, T., Chakraborty, T., Wells-Bennik, M.H.J., 2007. The heat-shock response of *Listeria monocytogenes* comprises genes involved in heat shock, cell division, cell wall synthesis, and the SOS response. *Microbiology*.
- VanGuilder, H.D., Vrana, K.E., Freeman, W.M., 2008. Twenty-five years of quantitative PCR for gene expression analysis. *Biotechniques* 44, 619–626.
- Vasilijević, B., Mitić-Ćulafić, D., Djekic, I., Marković, T., Knežević-Vukčević, J., Tomasevic, I., Velebit, B., Nikolić, B., 2019. Antibacterial effect of *Juniperus*

- communis and *Satureja montana* essential oils against *Listeria monocytogenes* in vitro and in wine marinated beef. *Food Control* 100, 247–256.
- Vazquez-Boland, J. a, Kocks, C., Dramsi, S., Ohayon, H., Geoffroy, C., Mengaud, J., Cossart, P., 1992. Nucleotide-sequence of the lecithinase operon of *Listeria monocytogenes* and possible role of lecithinase in cell-to-cell spread. *Infect. Immun.* 60, 219–230.
- Vázquez-Boland, J.A., Kuhn, M., Berche, P., Chakraborty, T., Dominguez-Bernal, G., Goebel, W., González-Zorn, B., Wehland, J., Kreft, J., 2001. *Listeria* pathogenesis and molecular virulence determinants. *Clin. Microbiol. Rev.* 14, 584–640.
- Véghová, A., Kore, J., Jana, Ň.O.V.Á., Ová, M.Č., Drahovská, H., Siekel, P., Kaclíková, E.V.A., 2015. Isolation and characterization of *Listeria monocytogenes* from the environment of three ewe's milk processing factories in Slovakia. *J. Food Nutr. Res.* 54, 252–259.
- Véghová, A., Minarovičová, J., Koreňová, J., Drahovská, H., Kaclíková, E., 2017. Prevalence and tracing of persistent *Listeria monocytogenes* strains in meat processing facility production chain. *J. Food Saf.* 37.
- Velasco, R., Ordóñez, J.A., Cambero, M.I., Cabeza, M.C., 2015. Use of E-beam radiation to eliminate *Listeria monocytogenes* from surface mould cheese. *Int. Microbiol.* 18, 33–40.
- Vera, A., González, G., Domínguez, M., Bello, H., 2013. Principales factores de virulencia de *Listeria monocytogenes* y su regulación. *Rev. Chil. Infectología* 30, 407–416.
- Verghese, B., Lok, M., Wen, J., Alessandria, V., Chen, Y., Kathariou, S., Knabel, S., 2011. comK Prophage junction fragments as markers for *Listeria monocytogenes* genotypes unique to individual meat and poultry processing plants and a model for rapid niche-specific adaptation, biofilm formation, and persistence. *Appl. Environmental Microbiol.* 77, 3279–3292.
- Vermeulen, A., Gysemans, K.P.M., Bernaerts, K., Geeraerd, A.H., Van Impe, J.F., Debevere, J., Devlieghere, F., 2007. Influence of pH, water activity and acetic acid concentration on *Listeria monocytogenes* at 7°C: data collection for the development of a growth/no growth model. *Int. J. Food Microbiol.* 114, 332–341.
- Virginia, M., Claudia, M., Ottavio, D., Gattuso, A., Bella, A., Aureli, P., 2009. Distribution of serotypes and pulsotypes of *Listeria monocytogenes* from human, food and environmental isolates ( Italy 2002 – 2005 ). *Food Microbiol.* 26, 520–526.



- Vitullo, M., Grant, K.A., Sammarco, M.L., Tamburro, M., Ripabelli, G., Amar, C.F.L., 2013. Real-time PCRs assay for serogrouping *Listeria monocytogenes* and differentiation from other *Listeria* spp. *Mol. Cell. Probes* 27, 68–70.
- Volpe 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. *J. Clin. Microbiol.* 46, 1435–1450.
- Wagner, M., Allerberger, F., 2003. Characterization of *Listeria monocytogenes* recovered from 41 cases of sporadic listeriosis in Austria by serotyping and pulsed-field gel electrophoresis. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 35, 227–234.
- Wang, J., Yamada, S., Ohashi, E., 2010. Rapid identification of *Listeria* species and screening for variants by melting curve and high-resolution melting curve analyses of the intergenic spacer region of the rRNA gene. *Can. J. Microbiol.* 56, 676–682.
- Ward, T., Evans, P., Wiedmann, M., Usgaard, T., Roof, S.E., Stroika, S.G., Hise, K., 2010. Molecular and phenotypic characterization of *Listeria monocytogenes* from U.S. Department of Agriculture Food Safety and Inspection Service Surveillance of ready-to-eat foods and processing facilities. *J. Food Prot.* 73, 861–869.
- Ward, T.J., Ducey, T.F., Usgaard, T., Dunn, K.A., Bielawski, J.P., 2008. Multilocus genotyping assays for single nucleotide polymorphism-based subtyping of *Listeria monocytogenes* isolates. *Appl. Environ. Microbiol.* 74, 7629–7642.
- Warriner, K., Namvar, A., 2009. What is the hysteria with *Listeria*? *Trends Food Sci. Technol.* 20, 245–254.
- Wei, S., Daliri, E.B.M., Chelliah, R., Park, B.J., Lim, J.S., Baek, M.A., Nam, Y.S., Seo, K.H., Jin, Y.G., Oh, D.H., 2019a. Development of a multiplex real-time PCR for simultaneous detection of *Bacillus cereus*, *Listeria monocytogenes*, and *Staphylococcus aureus* in food samples. *J. Food Saf.* 39, 1–7.
- Wei, S., Park, B.J., Kim, S.H., Seo, K.H., Jin, Y.G., Oh, D.H., 2019b. Detection of *Listeria monocytogenes* using Dynabeads® anti-Listeria combined with real-time PCR in soybean sprouts. *LWT - Food Sci. Technol.* 99, 533–539.
- Wemekamp-Kamphuis, H.H., Wouters, J.A., De Leeuw, P.P.L.A., Hain, T., Chakraborty, T., Abee, T., 2004. Identification of sigma factor  $\sigma^B$ -controlled genes and their impact on acid stress, high hydrostatic pressure, and freeze survival in *Listeria monocytogenes* EGD-e. *Appl. Environ. Microbiol.* 70, 3457–3466.
- Wiedmann, M., Bruce, J.L., Keating, C., Johnson, A.E., McDonough, P.L., Batt, C.A., 1997. Ribotypes and virulence gene polymorphisms suggest three distinct *Listeria*

- monocytogenes* lineages with differences in pathogenic potential. *Infect. Immun.* 65, 2707–2716.
- Wilson, I.A.N.G., 1997. Inhibition and facilitation of nucleic acid amplification. *Appl. Environmental Microbiol.* 63, 3741–3751.
- Wolffs, P., Norling, B., Rådström, P., 2005. Risk assessment of false-positive quantitative real-time PCR results in food, due to detection of DNA originating from dead cells. *J. Microbiol. Methods* 60, 315–323.
- Wonderling, L.D., Bayles, D.O., 2004. Survival of *Listeria monocytogenes* strain H7762 and resistance to simulated gastric fluid following exposure to frankfurter exudate. *J. Food Prot.* 67, 1170–1176.
- Wonderling, L.D., Wilkinson, B.J., Bayles, D.O., 2004. The *htrA* gene of *Listeria monocytogenes* 10403S is essential for optimal growth under stress conditions. *Appl. Environ. Microbiol.* 70, 1935–43.
- Wuenschel, M.D., Kohler, S., Bubert, A., Gerike, U., Goebel, W., 1993. The *iap* gene of *Listeria monocytogenes* is essential for cell viability, and its gene product, P60, has bacteriolytic activity. *J. Bacteriol.* 175, 3491–3501.
- Yang, H., Qu, L., Wimbrow, A.N., Jiang, X., Sun, Y., 2007. Rapid detection of *Listeria monocytogenes* by nanoparticle-based immunomagnetic separation and real-time PCR. *Int. J. Food Microbiol.* 118, 132–138.
- Yang, X., Zhou, X., Zhu, M., Xing, D., 2017. Sensitive detection of *Listeria monocytogenes* based on highly efficient enrichment with vancomycin-conjugated brush-like magnetic nano-platforms. *Biosens. Bioelectron.* 91, 238–245.
- Ye, K., Zhang, Q., Jiang, Y., Xu, X., Cao, J., Zhou, G., 2012. Rapid detection of viable *Listeria monocytogenes* in chilled pork by real-time reverse-transcriptase PCR. *Food Control* 25, 117–124.
- Yeni, F., Acar, S., Polat, Ö.G., Soyer, Y., Alpas, H., 2014. Rapid and standardized methods for detection of foodborne pathogens and mycotoxins on fresh produce. *Food Control* 40, 359–367.
- Yoshikawa, Y., Ogawa, M., Hain, T., Yoshida, M., Fukumatsu, M., Kim, M., Mimuro, H., Nakagawa, I., Yanagawa, T., Ishii, T., Kakizuka, A., Sztul, E., Chakraborty, T., Sasakawa, C., 2009. *Listeria monocytogenes* ActA-mediated escape from autophagic recognition. *Nat. Cell Biol.* 11, 1233.
- Zanette, C.M., Dalla Santa, O.R., Bersot, L.S., 2015. Effect of *Lactobacillus plantarum* starter cultures on the behavior of *Listeria monocytogenes* during sausage

- maturation. *Int. Food Res. J.* 22, 844–848.
- Zhan, Z., Liu, J., Yan, L., Aguilar, Z.P., Xu, H., 2019. Sensitive fluorescent detection of *Listeria monocytogenes* by combining a universal asymmetric polymerase chain reaction with rolling circle amplification. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 169, 181–187.
- Zhang, Q., Feng, Y., Deng, L., Feng, F., Wang, L., Zhou, Q., Luo, Q., 2011. SigB plays a major role in *Listeria monocytogenes* tolerance to bile stress. *Int. J. Food Microbiol.* 145, 238–243.
- Zhang, X., Niu, Y., Liu, Y., Lu, Z., Wang, D., Cui, X., Chen, Q., Ma, X., 2019. Isolation and characterization of clinical *Listeria monocytogenes* in Beijing, China, 2014–2016. *Front. Microbiol.* 10, 1–11.
- Zhang, Y., Yeh, E., Hall, G., Cripe, J., Bhagwat, A.A., Meng, J., 2007. Characterization of *Listeria monocytogenes* isolated from retail foods. *Int. J. Food Microbiol.* 113, 47–53.
- Zhao, T., Doyle, M.P., Zhao, P., 2004a. Control of *Listeria monocytogenes* in a biofilm by competitive-exclusion microorganisms. *Appl. Environmental Microbiol.* 70, 3996–4003.
- Zhao, T., Doyle, M.P., Zhao, P., 2004b. Control of *Listeria monocytogenes* in a Biofilm by Competitive-Exclusion Microorganisms 70, 3996–4003.
- Zhao, Y., Tu, K., Shao, X., Jing, W., Su, Z., 2008. Effects of the yeast *Pichia guilliermondii* against *Rhizopus nigricans* on tomato fruit. *Postharvest Biol. Technol.* 49, 113–120.
- Zheng, W., Kathariou, S., 1994. Transposon-induced mutants of *Listeria monocytogenes* incapable of growth at low temperature (4°C). *FEMS Microbiol. Lett.* 121, 287–292.
- Zhou, K., Zhou, W., Li, P., Liu, G., Zhang, J., Dai, Y., 2008. Mode of action of pentocin 31-1: An antilisteria bacteriocin produced by *Lactobacillus pentosus* from Chinese traditional ham. *Food Control* 19, 817–822.



## VIII. RESUMEN

---



## VIII.1. RESUMEN

Los cambios en el estilo de vida de la población han incrementado el consumo de productos listos para el consumo (RTE, del inglés *Ready to Eat*), de tal manera que, en caso de existir una contaminación por un microorganismo patógeno en las etapas finales del proceso de elaboración de este tipo de productos, el riesgo de infección va a ser mayor. *Listeria monocytogenes* constituye uno de los microorganismos patógenos más preocupantes en la industria cárnica. A pesar de su baja incidencia, las elevadas tasas de mortalidad y hospitalización de la listeriosis, en combinación con la ubicuidad y características ecológicas de este microorganismo patógeno sitúan a *L. monocytogenes* como uno de los microorganismos de mayor relevancia. Por todo ello, el control de dicho microorganismo patógeno es un objetivo prioritario a nivel mundial por parte de las autoridades sanitarias.

Dentro del grupo de los alimentos RTE se encuentran los derivados cárnicos curado-madurados como el jamón curado loncheado. Las condiciones ecológicas alcanzadas durante el proceso de elaboración condicionan el desarrollo de una población microbiana muy diversa, entre la que se podría encontrar microorganismos patógenos tales como *L. monocytogenes*. Dichas condiciones ecológicas resultan suficientes para el control de este microorganismo patógeno durante el procesado de jamón curado. Sin embargo, los procedimientos aplicados para la obtención del jamón curado loncheado, así como las condiciones almacenamiento en refrigeración o almacenamiento en condiciones de abuso pueden incrementar el riesgo de contaminación y desarrollo de *L. monocytogenes*. Es necesario desarrollar estrategias para la prevención y el control de esta bacteria patógena en jamón curado loncheado.

Los objetivos de esta Tesis Doctoral consistieron en: a) caracterizar la contaminación por *L. monocytogenes* en jamones enteros, equipos e instalaciones mediante muestreos en industrias y caracterización de las cepas aisladas mediante métodos moleculares; b) desarrollar un método de qPCR para la detección y caracterización serotípica de *L. monocytogenes*; c) optimizar un método de RT-qPCR capaz de analizar la expresión de genes de virulencia y respuesta al estrés de *L. monocytogenes* en relación con las condiciones propias de la matriz en la que se desarrolla como es el jamón curado; d)

determinar el efecto de tratamiento no térmicos de altas presiones e irradiación con electrones acelerados sobre la expresión de dichos genes de virulencia y respuesta al estrés de *L. monocytogenes*; e) determinar el efecto de tratamientos de biocontrol con *Debaryomyces hansenii* frente al crecimiento y expresión génica de *L. monocytogenes* en jamón curado loncheado y, f) evaluar el efecto de los tratamientos de biocontrol sobre las propiedades sensoriales del jamón curado loncheado.

Junto al muestreo de *L. monocytogenes* en industrias loncheadoras de jamón curado, se desarrolló un método de qPCR múltiple capaz de diferenciar los cuatro serotipos de *L. monocytogenes* más preocupantes y predominantes (1/2a, 1/2b, 1/2c y 4b) aislados de alimentos y relacionados con casos de listeriosis. Para ello, se diseñaron 4 parejas de sondas y cebadores basados en los genes *lmo0737*, *lmo0306*, ORFC (locus genómicamente equivalente a *gltA-gltB*) y ORF2110. En dicho método se utilizó el gen 16S del ARNr como control de amplificación a nivel de género. La eficiencia y sensibilidad del método fueron evaluadas, así como la especificidad del mismo mediante la comparación de los resultados obtenidos con otro método previamente desarrollado. De tal manera, que el método de qPCR desarrollado constituye una herramienta sensible, específica y rápida para la identificación de los serotipos más frecuentes (1/2a, 1/2b, 1/2c y 4b) de *L. monocytogenes*.

En el análisis realizado en las zonas de deshuesado, prensado y loncheado de jamón curado realizado de forma conjunta mediante PCR múltiple, el método de qPCR desarrollado en este trabajo y el estudio de los pulstipos por PFGE se caracterizaron 66 cepas de *L. monocytogenes*. Estos resultados demostraron la existencia de cepas persistentes en las distintas plantas muestreadas o incluso la presencia de cepas idénticas en distintas fases del proceso de loncheado, lo cual resultó de especial relevancia para determinar el origen de la contaminación, así como evaluar la efectividad de los procedimientos de limpieza y desinfección. Igualmente, los resultados obtenidos revelaron el efecto de la estacionalidad sobre el microorganismo patógeno, existiendo cepas mejor adaptadas a las estaciones cálidas. El análisis de las cepas de *L. monocytogenes* mediante qPCR múltiple y PFGE constituye una herramienta adecuada y sensible para la detección y caracterización de fuentes de contaminación por *L. monocytogenes* en las plantas de procesamiento de jamón curado loncheado o para el monitoreo epidemiológico de cepas persistentes durante el procesamiento de productos



carnicos RTE, lo cual podría utilizarse para implementar medidas de control y prevención adecuadas.

Una de las estrategias utilizadas en esta Tesis Doctoral para evaluar el comportamiento de *L. monocytogenes* en el jamón curado loncheado consistió en evaluar el desarrollo y la expresión de genes de virulencia (*plcA*, *hly* e *iap*) y de respuesta al estrés (*sigB*) ante el efecto de diferentes  $a_w$  (0,95 y 0,93), concentración de NaCl y temperaturas (7 y 15 °C) que se dan a lo largo del proceso de elaboración del jamón curado y que pueden darse en el producto loncheado envasado bajo condiciones de refrigeración o abuso. Para ello se optimizó un método de RT-qPCR previamente desarrollado y que fue validado para ser utilizado en el análisis de la expresión génica absoluta y relativa de una matriz elaborada con jamón curado. Los controles endógenos utilizados fueron el espaciador intergénico IGS y el gen 16S del ARNr. Estos métodos permitieron el estudio de los cambios en la expresión de los genes de virulencia y de respuesta al estrés de forma adecuada y sensible, lo cual puede ser de gran utilidad para evaluar el efecto de los tratamientos de control en jamón curado sobre la expresión génica de *L. monocytogenes*. En general, las condiciones óptimas de crecimiento se observaron a 15 °C a valores de  $a_w$  de 0,98 y 0,96. A valores de  $a_w$  de 0,94 y 0,92, la presencia de NaCl estimuló el crecimiento de *L. monocytogenes*, reprimiendo la expresión de los genes de virulencia analizados. En cuanto a la temperatura y la expresión génica, esta última se vio afectada de distinta manera en las distintas temperaturas analizadas. Por todo ello, se demostró como las condiciones ambientales relacionadas con la  $a_w$ , la presencia de NaCl y la temperatura de almacenamiento del jamón curado afectaron significativamente al crecimiento y expresión génica de *L. monocytogenes*.

Posterior al estudio de la influencia de las condiciones ambientales sobre el crecimiento y la expresión génica de *L. monocytogenes*, se evaluó el efecto de la utilización de tratamientos no térmicos como métodos de control del microorganismo patógeno. Para ello, se utilizaron lonchas de jamón inoculadas con *L. monocytogenes* sometidas a dos tratamientos distintos. Por un lado, se aplicaron tratamientos con altas presiones hidrostáticas (HPP del inglés *High Pressure Processing*) a una intensidad de 450 y 600 MPa durante 10 y 5 min, respectivamente. En relación con el efecto de este tratamiento sobre la expresión génica, los resultados obtenidos también revelaron que las aplicaciones de dichos tratamientos disminuyeron la expresión de genes de virulencia

(*plcA* y *hly*) responsables de la capacidad infectiva de *L. monocytogenes*. Otro de los tratamientos utilizados fue la utilización de electrones acelerados sobre lonchas inoculadas con *L. monocytogenes*. Para ello, y al igual que en el tratamiento anterior, las lonchas fueron sometidas a diferentes intensidades de irradiación (1, 2, y 3 kGy) para posteriormente evaluar el efecto de dicha exposición sobre la expresión génica de *L. monocytogenes*, dando lugar a un efecto similar al encontrado con los tratamientos HPP, provocando una disminución en la expresión de los genes de virulencia de *L. monocytogenes*.

Finalmente, se evaluó la utilización de *D. hansenii* como agentes de biocontrol. En primer lugar, se evaluaron y seleccionaron levaduras de esta especie según su capacidad para inhibir o controlar el crecimiento de *L. monocytogenes*, utilizando para ello un medio de cultivo elaborado con jamón curado. De esta primera selección, se seleccionó solamente la cepa 258H de *D. hansenii* por su capacidad para reducir el crecimiento de *L. monocytogenes* en el medio de cultivo y se probó dicho efecto sobre lonchas de jamón curado, en dos  $a_w$  (0,95 y 0,93) y bajo condiciones de refrigeración (7 °C). En el caso de las lonchas de jamón curado, el efecto de la levadura fue contrario al esperado, ya que la presencia de esta favoreció el crecimiento de *L. monocytogenes*, lo cual podría deberse a la producción de determinados compuestos derivados de la actividad proteolítica y lipolítica de la levadura que a su vez esté favoreciendo la utilización de estos por parte de *L. monocytogenes*. A continuación, se evaluó la expresión de los genes de virulencia (*plcA*, *hly* e *iap*) de *L. monocytogenes*, comprobando que la presencia de *D. hansenii* provoca el aumento en la expresión de los genes *hly* e *iap* de *L. monocytogenes*. La evaluación sensorial de las lonchas de jamón curado tratadas con *D. hansenii* como agente de biocontrol reveló un efecto negativo debido a la aparición de crecimiento visible de la levadura sobre la superficie de las lonchas lo que provocó el rechazo generalizado de los catadores. Este hecho unido al efecto negativo de *D. hansenii* sobre el crecimiento y expresión génica de *L. monocytogenes*, nos hace descartar la utilización de cultivos protectores de levaduras como método de control de *L. monocytogenes* en jamón curado loncheado.

La preocupante presencia y contaminación de *L. monocytogenes* en los alimentos RTE, y de forma especial en la industria del jamón curado loncheado, justifican el desarrollo y aplicación de técnicas que permitan el seguimiento y caracterización de la contaminación,

de tal manera que se pueden implementar las medidas para la prevención y control de *L. monocytogenes*. De igual forma, se hace necesaria la aplicación de tratamientos no térmicos que permitan el control y erradicación del microorganismo patógeno, con el mínimo efecto sobre el jamón curado. En este sentido, también resulta de utilidad los protocolos de RT-qPCR para evaluar el efecto de dichos tratamientos sobre el comportamiento génico de *L. monocytogenes*.



## IX. ANEXOS

---



---

---

## ANEXO 1. PUBLICACIONES DERIVADAS DE LA TESIS DOCTORAL

### ARTÍCULOS INTERNACIONALES

1. AUTORES: **Alía, A.**, Rodríguez, A., Andrade, M.J., Gómez, F.M., Córdoba, J.J.

TÍTULO: Combined effect of temperature, water activity and salt content on the growth and gene expression of *Listeria monocytogenes* in a dry-cured ham model system.

REF. REVISTA/LIBRO: Meat Science 155, 16-19. (2019).

Área JCR o Índice de impacto: Food Science and Technology. Tercio en el que está incluido: 1°.

2. AUTORES: **Alía, A.**, Andrade, M.J., Córdoba, J.J., Martín, I., Rodríguez, A.

TÍTULO: Development of a multiplex real-time PCR to differentiate the four major *Listeria monocytogenes* serotypes in isolates from meat processing plants.

REF. REVISTA/LIBRO: Food Microbiology-En revisión.

Área JCR o Índice de impacto: Food Science and Technology. Tercio en el que está incluido: 1°.

3. AUTORES: **Alía, A.**, Andrade, M.J., Rodríguez, A., Pérez-Baltar, A., Córdoba, J.J.

TÍTULO: Prevalence and characterization of *Listeria monocytogenes* in deboning and slicing areas of Spanish dry-cured ham processing.

REF. REVISTA/LIBRO: International Journal of Food Microbiology-En preparación.

Área JCR o Índice de impacto: Food Science and Technology. Tercio en el que está incluido: 1°.

4. AUTORES: **Alía, A.**, Córdoba, J.J., Rodríguez, A., García, C., Andrade, M.J.

TÍTULO: Evaluation of the efficacy of *Debaryomyces hansenii* as protective culture for controlling *Listeria monocytogenes* in sliced dry-cured ham.

REF. REVISTA/ LIBRO: LWT-Food Science and Technology-En revision.

Área JCR o Índice de impacto: Food Science and Technology. Tercio en el que está incluido: 1°.

### **CAPÍTULOS DE LIBRO INTERNACIONALES**

1. AUTORES: **Alía, A.**, Rodríguez, A., Andrade, M.J., Córdoba, J.J.

TÍTULO: Molecular mechanisms of *Listeria monocytogenes* stress response.

REF. REVISTA/ LIBRO: Molecular Food Microbiology. Editado por: Dongyou Liu.

### **CAPÍTULOS DE LIBRO NACIONALES**

1. AUTORES: Asensio, M.A., Andrade, M.J., Bermúdez, E., Núñez, F., Rodríguez, M., Rodríguez, A., Delgado, J., Bernáldez, V., Sánchez-Montero, L., Peromingo, B., **Alía, A.**, Padilla, P., Álvarez, M., Martín, I., Lobo, F., Jiménez, I., Córdoba, J.J.

TÍTULO: Biocontrol de *Listeria monocytogenes* y mohos productores de micotoxinas en derivados cárnicos curado-madurados.

REF. REVISTA/LIBRO: Productos carnicos seguros, nutritivos y saludables. Editado por: Núñez, M., Jiménez-Colmenero, F., Córdoba, J.J.



## ANEXO 2. COMUNICACIONES A CONGRESOS DERIVADOS DE LA TESIS DOCTORAL

### CONGRESOS INTERNACIONALES

1. AUTORES: **Alía, A.**, Rodríguez, A., Córdoba, J.J., Bermúdez, E., Padilla, P., Andrade, M.J.

TÍTULO: Development of real-time PCR assays for serotyping *Listeria monocytogenes* in meat processing plants

TIPO DE PARTICIPACIÓN: Póster

CONGRESO: 7th Congress of European Microbiologists (FEMS)

LUGAR DE CELEBRACIÓN: Valencia, España                      FECHA: 09/07/2017

2. AUTORES: Martín, I., **Alía, A.**, Lozano-Ojalvo, D., Delgado, J., Andrade, M.J., Bermúdez, E., Córdoba, J.J.

TÍTULO: Biocontrol de *Listeria monocytogenes* en jamón curado loncheado mediante la utilización de hidrolizados proteicos

TIPO DE PARTICIPACIÓN: Póster

CONGRESO: IX Congreso Mundial del Jamón

LUGAR DE CELEBRACIÓN: Toledo                                      FECHA: 07/06/2017

3. AUTORES: **Alía, A.**, Andrade, M.J., Sánchez-Montero, L., Bermúdez, E., Asensio, M.A., Córdoba, J.J.

TÍTULO: Selection of yeast for biocontrol of *Listeria monocytogenes* in RTE dry-cured ham

TIPO DE PARTICIPACIÓN: Póster

CONGRESO: 25<sup>th</sup> International ICFMH Conference-FoodMicro 2016

LUGAR DE CELEBRACIÓN: Dublín, Irlanda                              FECHA: 19/07/2016

## CONGRESOS NACIONALES

1. AUTORES: Ruchel Dos Santos, L., **Alía, A.**, Martín, I., Córdoba, J.J.

TÍTULO: Evaluación de actividad antimicrobiana de aceites esenciales y extractos vegetales para su utilización en derivados cárnicos curado-madurados en el control de *Listeria monocytogenes*

TIPO DE PARTICIPACIÓN: Póster

CONGRESO: X Foro Anvepi

LUGAR DE CELEBRACIÓN: Badajoz, España                      FECHA: 15/03/2018

2. AUTORES: **Alía, A.**, Núñez, F., Rodríguez, M., Bermúdez, E., Córdoba, J.J.

TÍTULO: Actividad de levaduras aisladas de jamón curado frente a *Listeria monocytogenes*

TIPO DE PARTICIPACIÓN: Comunicación oral

CONGRESO: IX Congreso CyTA CESIA

LUGAR DE CELEBRACIÓN: Madrid, España                      FECHA: 16/05/2017

3. AUTORES: **Alía, A.**, Rodríguez, A., Andrade, M.J., Gómez, F.M., Córdoba, J.J.

TÍTULO: Análisis de la expresión de genes de virulencia y de respuesta al estrés de *Listeria monocytogenes* en jamón curado listo para el consumo

TIPO DE PARTICIPACIÓN: Comunicación oral

CONGRESO: V Jornadas Doctorales del Grupo 9 de Universidades

LUGAR DE CELEBRACIÓN: Cáceres, España                      FECHA: 01/12/2016

4. AUTORES: **Alía, A.**, Rodríguez, A., Andrade, M.J., Bermúdez, E., Gómez, F.M., Córdoba, J.J.

TÍTULO: Evaluación de la supervivencia de *Listeria monocytogenes* en jamón curado mediante el análisis de la expresión génica

TIPO DE PARTICIPACIÓN: Comunicación oral

CONGRESO: XX Congreso Nacional de Microbiología de los Alimentos (SEM)

LUGAR DE CELEBRACIÓN: León, España                      FECHA: 14/09/2016

5. AUTORES: **Alía, A.**, Rodríguez, A., Andrade, M.J., Córdoba, J.J.

TÍTULO: Desarrollo de métodos de RT-qPCR para evaluar el efecto de tratamientos de control en jamón curado sobre genes de virulencia y de resistencia al estrés de *Listeria monocytogenes*

TIPO DE PARTICIPACIÓN: Comunicación oral

CONGRESO: IV Jornadas Doctorales del Grupo 9 de Universidades

LUGAR DE CELEBRACIÓN: Pamplona, España      FECHA: 09/03/2016