

**UNIVERSIDAD DE OVIEDO**

**MASTER UNIVERSITARIO EN BIOTECNOLOGÍA ALIMENTARIA**

**“Evaluación del producto fágico  
LISTEX™ P100 en la eliminación de  
biofilms de *Listeria monocytogenes*”**

**TRABAJO FIN DE MASTER**

**POR**

**Ernesto García Noriega**

**JULIO, 2014**





Master en Biotecnología Alimentaria  
Universidad de Oviedo  
C/Julían Clavería s/n. 33071 Oviedo, España  
Tel. 985106226. Fax 985103434. <http://www.unioviedo.es/MBTA>



**PROFESORES TUTORES:**

Dra. Dña. Pilar García Suárez y Dra. Dña. Ana Rodríguez González

**CERTIFICAN:**

Que D. Ernesto García Noriega ha realizado bajo nuestra dirección el Trabajo Fin de Máster al que corresponde la presente memoria en el contexto de los estudios del Máster Universitario en Biotecnología Alimentaria, 8ª promoción curso 2013-2014.

Oviedo, 10 de Julio de 2014

Dña. Pilar García

Dña. Ana Rodríguez

VºBº

Manuel Réndueles de la Vega

Coordinador del Máster en Biotecnología Alimentaria

# **AGRADECIMIENTOS**

## **AGRADECIMIENTOS**

Me gustaría aprovechar este espacio para mostrar mi más profundo agradecimiento a todas las personas, que de alguna manera, forman parte de este trabajo.

En primer lugar quiero agradecer a las Dras. Pilar García Suárez y Ana Rodríguez González, directoras de este Trabajo Fin de Máster, su dedicación a la hora de mostrarme sus conocimientos y la ayuda que me han proporcionado en la realización de este trabajo a lo largo de todo este tiempo.

A la Dra. Beatriz Martínez Fernández, a Diana y a Roxana, por su colaboración y sus enseñanzas, haciendo extendible este agradecimiento a todo el personal del IPLA, gracias a los cuales este trabajo ha tomado forma.

A todos los profesores que han formado parte de este máster, su dedicación en la labor docente y las enseñanzas aportadas.

A mis amigos, por su compañía a lo largo de este curso, así como de todos los anteriores desde el colegio, en especial a Marina y Sandra por su paciencia.

Finalmente, quiero agradecer a mi familia, en especial a mis padres Misael y Julia, por la comprensión y apoyo que me han mostrado tanto en la realización del trabajo, como del máster, como en el resto de decisiones tomadas a lo largo de mi vida

# ÍNDICE

## ÍNDICE

|   |    |
|---|----|
| RESUMEN .....   | i  |
| ABSTRACT .....  | ii |
| LISTA DE FIGURAS .....  | iv |
| LISTA DE TABLAS .....   | v  |
| 1. INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS.....  | 1  |
| 2. CONSIDERACIONES TEÓRICAS Y EXPERIMENTALES .....  | 5  |
| - 2.1. <i>Listeria monocytogenes</i> . .....  | 5  |
| - 2.2. Importancia de biofilms formados por <i>L. monocytogenes</i> para la industria alimentaria .....   | 8  |
| - 2.3. Incidencia de <i>L. monocytogenes</i> en la industria alimentaria y su repercusión en la salud humana. ....  | 10 |
| - 2.4. Productos implicados en la transmisión de <i>L. monocytogenes</i> : normativa y método de control. ....  | 13 |
| - 2.5. Los bacteriófagos.....   | 16 |
| - 2.6. Nuevos sistemas de conservación y limpieza para la industria alimentaria: los bacteriófagos.....   | 20 |
| - 2.7. Producto fágico (ListexP100).....  | 23 |
| 3. MATERIAL Y MÉTODOS .....   | 25 |
| - 3.1. Cepas bacterianas y condiciones de cultivo. ....   | 25 |
| - 3.2. Determinación de la sensibilidad o resistencia de <i>L. monocytogenes</i> al producto fágico Listex P100 en medio sólido.....                          | 26 |
| - 3.2.1. “Test de la gota o “spot” .....  | 26 |
| - 3.2.2. Cálculo del título de la suspensión fágica Listex P100 y eficiencia de plaqueo para la distintas cepas de <i>L. monocytogenes</i> .....              | 26 |
| - 3.3. Cálculo del número de viables (UFC) de un cultivo en fase exponencial temprana ( $DO_{600} \approx 0,1$ ) y en fase estacionaria (o/n).....            | 27 |
| - 3.4. Determinación de la sensibilidad o resistencia de las distintas cepas de <i>L. monocytogenes</i> al producto fágico Listex P100 en medio líquido. .... | 28 |
| - 3.4.1. Determinación de la MIC del bacteriófago P100. ....  | 28 |

|  |    |
|--|----|
| - 3.4.2. Cálculo de la multiplicidad de infección (MOI).....   | 29 |
| - 3.5. Generación y cuantificación de biofilms de <i>L. monocytogenes</i> . .....  | 29 |
| - 3.5.1. Selección de la concentración celular óptima para la formación de un biofilm en placas de poliestireno.....                             | 29 |
| - 3.5.2. Seguimiento temporal del proceso de formación de biofilms sobre superficie de poliestireno. ....  | 30 |
| - 3.6. Tratamiento de biofilms de <i>L. monocytogenes</i> con Listex P100.....   | 31 |
| - 3.6.1. Determinación de la actuación del producto fágico mediante la técnica de tinción con Cristal Violeta.....                               | 31 |
| - 3.6.2. Determinación de la actuación del producto fágico mediante la técnica del recuento de viables. ....                                     | 31 |
| 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....  | 33 |
| - 4.1. Determinación de la sensibilidad o resistencia de las distintas cepas de <i>L. monocytogenes</i> al producto fágico Listex P100.....      | 33 |
| - 4.2. Cálculo del título de la suspensión fágica Listex P100 y eficiencia de plaqueo para las distintas cepas de <i>L. monocytogenes</i> . .... | 35 |
| - 4.3. Determinación de la concentración inhibitoria mínima (MIC) del producto Listex P100. ....   | 37 |
| - 4.4. Capacidad de formación de biofilms de cepas de <i>L. monocytogenes</i> sobre superficies abióticas .....                                  | 41 |
| - 4.4.1. Selección de las cepas con mayor capacidad de formación de biofilm. ....  | 41 |
| - 4.4.2. Seguimiento temporal del proceso de formación de biofilms sobre una superficie abiótica. ....   | 44 |
| - 4.5. Tratamiento de biofilms de <i>L. monocytogenes</i> con Listex P100.....   | 45 |
| - 4.5.1. Evaluación de la eficacia del producto fágico mediante cuantificación de la biomasa total. ....   | 45 |
| - 4.5.2. Evaluación de la eficacia del producto fágico Listex P100 mediante la técnica del recuento de viables.....                              | 47 |
| 5. CONCLUSIONES.....   | 51 |
| ABREVIATURAS .....   | 52 |
| BIBLIOGRAFÍA .....   | 54 |

**RESUMEN**  
**ABSTRACT**



## RESUMEN

En el presente trabajo se ha estudiado la capacidad infectiva del bacteriófago P100 de *Listeria*, presente en el producto fágico comercial Listex P100, frente a una colección de 11 cepas de *L. monocytogenes* aisladas de productos alimenticios. Asimismo, se ha evaluado al producto fágico Listex P100 como posible método de bio-higienización de superficies contaminadas por biofilms de las citadas cepas.

Los resultados obtenidos muestran la capacidad del bacteriófago P100 para infectar a todas las cepas de *L. monocytogenes* ensayadas, produciendo la inhibición de su multiplicación. Asimismo, se ha demostrado que la sensibilidad a la infección por el fago es variable entre los distintos aislados.

Por otra parte, el tratamiento de los biofilms con Listex P100 a distintas concentraciones da lugar a reducciones notables de la biomasa total del biofilm, así como del número de bacterias viables dentro de los mismos respecto al tratamiento establecido como control. A este respecto, el producto Listex P100 diluido hasta una concentración de  $10^8$  UFP/ml, provocó la eliminación del 90% de la biomasa total en los biofilms producidos por *L. monocytogenes* 52 y *L. monocytogenes* S12, y un descenso de  $3,9 \log_{10}$  UFC/ml en la concentración de viables en los biofilms producidos por *L. monocytogenes* 52, respecto al tratamiento control.

Estos resultados permiten concluir que el uso del producto fágico Listex P100 como estrategia de biocontrol de *L. monocytogenes* en la industria alimentaria puede ser un método efectivo para reducir la contaminación de los alimentos por el patógeno, lo que influiría en la reducción de la incidencia de la listeriosis en la población.

## ABSTRACT

The aim of this study is to study the ability of the *Listeria* bacteriophage P100 present in the commercial product Listex P100, in order to infect a collection composed of 11 *L. monocytogenes* isolates detected in different alimentary products. We have also evaluated Listex P100 as a potential product to bio-sanitize surfaces that have been previously contaminated by *L. monocytogenes* biofilms.

As a result, we have observed that the effect of the bacteriophage P100 on the *L. monocytogenes* stocks results in the inhibition of its multiplication. We could also appreciate that phage infection can vary depending on the different isolates.

On the other hand, treatment of biofilms at different concentrations of Listex P100 resulted in marked reductions of the total biomass, as well as the number of viable inside them compared with the control treatment. In fact, Listex P100 diluted to  $10^8$  PFU/ml resulted in a 90% reduction of biofilm biomass produced by *L. monocytogenes* 52 and *L. monocytogenes*, and a reduction of  $3.9 \log_{10}$  CFU/ml in the viable counts of biofilms produced by *L. monocytogenes* 52.

These results allow to conclude that Listex P100 could be used as a strategy to effectively reduce contaminated food by *L. monocytogenes*, and consequently, the number of people affected by listeriosis.

# **LISTA DE FIGURAS Y TABLAS**

## LISTA DE FIGURAS

|  |    |
|--|----|
| <i>Figura 1-</i> Imagen de microscopio electrónico de biopelículas maduras de <i>L. monocytogenes</i> .....  | 5  |
| <i>Figura 2-</i> Esquema de la estructura del bacteriófago T4.....   | 17 |
| <i>Figura 3-</i> Morfotipos y características de las diferentes familias de fagos.....   | 17 |
| <i>Figura 4-</i> Biomasa total de biofilm de $\pm 24$ horas, expresada como DO <sub>595</sub> , desarrollados por las distintas cepas de <i>L. monocytogenes</i> de origen lácteo, a partir de distintos inóculos ( $10^8$ , $10^7$ y $10^6$ UFC/ml).....    | 42 |
| <i>Figura 5-</i> Biomasa total de biofilms de $\pm 24$ horas, expresada como DO <sub>595</sub> , desarrollados por distintas cepas de <i>L. monocytogenes</i> de origen cárnico, a partir de distintos inóculos ( $10^8$ , $10^7$ y $10^6$ UFC/ml).....      | 42 |
| <i>Figura 6-</i> Biomasa total de biofilms de $\pm 48$ horas, expresada como DO <sub>595</sub> desarrollados por distintas cepas de <i>L. monocytogenes</i> de origen cárnico a partir de distintos inóculos ( $10^8$ , $10^7$ y $10^6$ UFC/ml).....         | 43 |
| <i>Figura 7-</i> Evolución de la formación de biofilm a lo largo del período de incubación.....  | 45 |
| <i>Figura 8-</i> Biomasa media total en biofilm de 48 horas, expresada como DO <sub>595</sub> , tras distintos tratamientos con Listex P100 ( $10^6$ , $10^7$ , $10^8$ y $10^9$ UFP/ml). El control de lavado ha sido tratado con tampón SM.....             | 46 |
| <i>Figura 9-</i> Efecto del lavado y eficacia de la solución Fágica Listex P100 ( $10^8$ UFP/ml), tras 4 horas de incubación, en la reducción del número de viables en biofilms de 48 horas de <i>L. monocytogenes</i> 52 y <i>L. monocytogenes</i> S12..... | 49 |

## LISTA DE TABLAS

|   |    |
|---|----|
| <i>Tabla 1-</i> Principales patógenos alimentarios declarados al SIM en el año 2011.....  | 12 |
| <i>Tabla 2-</i> Principales patógenos alimentarios declarados al SIM en el año 2012.....  | 12 |
| <i>Tabla 3-</i> Número de casos de listeriosis en España entre 1990 y 2012.....   | 13 |
| <i>Tabla 4-</i> Cepas bacterianas utilizadas en este trabajo.....   | 25 |
| <i>Tabla 5-</i> Sensibilidad/Resistencia de las cepas bacterianas al producto Listex P100 mediante protocolo del “spot”.....  | 34 |
| <i>Tabla 6-</i> Título de la suspensión fágica sobre las distintas cepas de <i>L. monocytogenes</i> ensayadas.....  | 35 |
| <i>Tabla 7-</i> Eficiencia de plaqueo de la suspensión fágica sobre las distintas cepas de <i>L. monocytogenes</i> ensayadas.....   | 36 |
| <i>Tabla 8-</i> Concentración fágica en cada pocillo de la placa microtiter para la determinación de la MIC. Se ha tomado como concentración inicial del producto el título obtenido sobre la cepa <i>L. monocytogenes</i> 52 ( $10^{11}$ UFP /ml)..... | 38 |
| <i>Tabla 9-</i> Determinación de la MIC del producto fágico Listex P100 para las distintas cepas de <i>L. monocytogenes</i> .....   | 38 |
| <i>Tabla 10-</i> Multiplicidad de infección efectiva para inhibir el crecimiento para las distintas cepas de <i>L. monocytogenes</i> .....  | 40 |
| <i>Tabla 11-</i> Número de viables (UFC/ml) en biofilms de 48 horas, tratados con Listex P100 ( $10^8$ UFP/ml) y con SM durante 4 horas a 32°C.....   | 48 |

# **INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS**

## 1. INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

Los alimentos juegan un papel determinante en la transmisión de las denominadas toxiinfecciones alimentarias, un grupo heterogéneo de enfermedades (alrededor de unas 200 descritas) que tiene su origen en la ingesta de alimentos contaminados por microorganismos (bacterias, virus y hongos), parásitos, productos químicos o toxinas (Zúñiga, 1994). Estas afecciones suponen un importante problema de salud pública, tanto en los países en vías de desarrollo como en los países desarrollados. En este contexto, cabe señalar la listeriosis, una enfermedad transmitida al hombre principalmente por el consumo de alimentos contaminados, cuyo agente etiológico es *Listeria monocytogenes*.

*L. monocytogenes* es una bacteria medioambiental de localización ubicua y que presenta la característica de poder multiplicarse sobre alimentos a temperaturas de refrigeración alcanzando concentraciones elevadas en los mismos. Otra característica importante de *L. monocytogenes* es su capacidad de formar biofilms sobre distintas superficies, teniendo repercusiones significativamente negativas en la industria alimentaria, ya que estos biofilms pueden comportarse como reservorio del microorganismo produciendo contaminación cruzada a los alimentos, que actuarían como vectores para la transmisión de la enfermedad causando brotes epidémicos, además de cuantiosas pérdidas económicas.

Los brotes de esta enfermedad se han relacionado comúnmente con el consumo de quesos elaborados con leche no pasteurizada, y de alimentos de elaboración industrial listos para el consumo, entre los que destacan diversos productos cárnicos (salchichas lengua de cerdo en gelatina, patés y salami).

*L. monocytogenes* es un patógeno oportunista que casi siempre afecta a las personas con una patología base o circunstancia subyacente grave (por ejemplo, personas inmunodeficientes, VIH+), mujeres embarazadas, bebés y ancianos.

Aunque la listeriosis es una enfermedad relativamente poco común, en su forma invasiva resulta de gravedad, con tasas de letalidad altas (20-30%) en comparación a

otros patógenos alimentarios. En 2011 se declararon en la Unión Europea (UE) 1.476 casos de listeriosis en humanos, de los que el 93,6% requirieron hospitalización y 134 fallecieron (tasa de letalidad del 12,7%).

Otra de las circunstancias que hacen particularmente relevante a la listeriosis es la tendencia al alza en su incidencia durante las últimas décadas. Esto responde a distintos factores, entre los que podemos encontrar el cambio en los hábitos alimentarios como consecuencia de la globalización y el desarrollo industrial (Organización Mundial de la Salud, 1988), la mayor proporción de poblaciones de riesgo sobre la población general ( ancianos y personas inmunodeprimidas), sin olvidar el desarrollo de técnicas y métodos más sensibles que permiten un mejor aislamiento e identificación de los patógenos alimentarios, así como mejor vigilancia epidemiológica y un más riguroso registro de casos (Muñoz y Díaz, 1998).

La sociedad actual está interesada en mejorar su calidad de vida, lo que inevitablemente pasa por disminuir el riesgo de padecer enfermedades. Esto tiene su traducción, en el caso de las enfermedades alimentarias, en la búsqueda de alimentos inocuos, entendiendo por alimento inocuo aquel que no ocasiona daño alguno al consumidor.

Las tecnologías tradicionales destinadas a inactivar patógenos bacterianos en alimentos (tratamientos térmicos intensos y uso de conservantes químicos) para garantizar la seguridad de los mismos, no son totalmente eficaces, y no parecen ajustarse con facilidad a las exigencias de los consumidores actuales, que además del valor nutricional y las características organolépticas de los alimentos, demandan alimentos con menor cantidad de aditivos químicos y conservantes, y en muchos casos productos mínimamente procesados, lo que supone en ocasiones un reto para garantizar la inocuidad de los mismos (de la Fuente y Barboza, 2010).

Son precisamente estas circunstancias las que han propiciado la investigación y el desarrollo de nuevas técnicas y métodos que permitan mejorar y garantizar la seguridad alimentaria. Es en este contexto en el que en 2010 la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA) publicó un documento (EFSA Panel on Biological Hazards (BIOHAZ), 2010) en el que se recogen los datos y componentes principales



que debe contener un informe de eficacia de una sustancia o sustancias en relación a demostrar su capacidad de reducir la contaminación microbiana de la superficie de los alimentos. De acuerdo con el citado documento, el uso de una sustancia o sustancias como tratamiento descontaminante será considerado eficaz cuando produzca cualquier reducción de la concentración y/o número del microorganismo patógeno diana que sea estadísticamente significativa en comparación con el tratamiento control (por ejemplo, agua), a fin de que esta reducción tenga un efecto positivo en la reducción de la incidencia de los casos de enfermedad en humanos.

Entre estas nuevas sustancias postuladas para ser utilizadas como método de eliminación de la contaminación biológica destacan los bacteriófagos, competidores naturales de las bacterias, que no alteran las cualidades nutricionales ni organolépticas de los productos alimenticios, ni suponen ningún riesgo para la salud de los consumidores (Carlton y col., 2005). Además, ya existen productos comerciales basados en bacteriófagos, como por ejemplo Listex P100, reconocido como sustancia GRAS (Generally Recognized as Safe) por la Food and Drug Administration (FDA) y el US Department of Agriculture (USDA) en 2007, estando permitido su uso en la industria alimentaria.

El presente estudio tiene como objetivo la evaluación de la eficacia del tratamiento con el producto fágico comercial Listex P100 para la eliminación de biofilms de *L. monocytogenes*, debido a las implicaciones anteriormente descritas del patógeno en la salud humana y a las repercusiones económicas que genera en la industria alimentaria. En última instancia, el fin de este estudio es determinar si el tratamiento con la suspensión fágica de los biofilms de *L. monocytogenes* desarrollados sobre distintas superficies en la industria alimentaria podría utilizarse como un método de control de la contaminación, lo que implicaría una reducción proporcional de los niveles de contaminación de los alimentos por parte del patógeno en el momento de consumir los alimentos, de lo que cabría esperar un efecto reductor en la incidencia de listeriosis (FAO/OMS, 2004).

Con estas premisas, el presente trabajo, titulado “Evaluación del producto fágico Listex P100 en la eliminación de biofilms de *L. monocytogenes*”, consta de los siguientes objetivos:

- 1- Estudiar la capacidad antimicrobiana del producto fágico comercial Listex P100 frente a cepas de *L. monocytogenes* aisladas del ambiente alimentario.
- 2- Determinar la concentración óptima del producto Listex P100 que debe utilizarse para la eliminación de la biomasa total de biofilms formados por *L. monocytogenes* sobre una superficie abiótica.
- 3- Confirmar la efectividad del tratamiento con el producto Listex P100 para la eliminación de células viables presentes en biofilms de *L. monocytogenes* sobre una superficie abiótica.

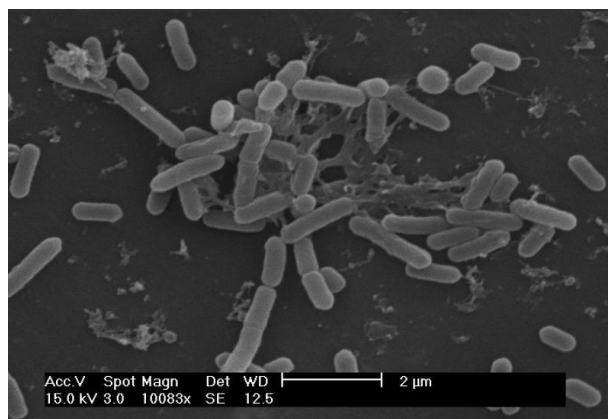
**CONSIDERACIONES  
TEÓRICAS Y  
EXPERIMENTALES**

## 2. CONSIDERACIONES TEÓRICAS Y EXPERIMENTALES

### - 2.1. *Listeria monocytogenes*.

*Listeria* es un género bacteriano dentro del cual se reconocen seis especies (*Listeria monocytogenes*, *L. ivanovii*, *L. innocua*, *L. welshimeri*, *L. seeligeri*, y *L. grayi*), de las cuales solo *L. monocytogenes* se ha descrito como patógena animal y humana (Roccourt y Cossart, 1997).

*L. monocytogenes* es un bacilo Gram-positivo de unos a 0.5  $\mu\text{m}$  de diámetro y de 1 a 2  $\mu\text{m}$  de longitud (Fig.1), posee una forma alargada con extremos redondeados. Esta bacteria puede encontrarse tanto en forma aislada como en formando cadenas cortas en forma de V, de Y o en empalizadas (Roccourt, 1999).



**Figura 1-** Imagen de microscopio electrónico de biopelículas maduras de *L. monocytogenes*.  
Fuente: Instituto de Investigaciones Marinas de Vigo (iim.csic.es/).

*L. monocytogenes* es frecuentemente considerada como una bacteria no capsulada, pero análisis inmunocitológicos y estudios de inmunomicroscopía electrónica han revelado la presencia de una capa externa mucopolisacáridica (Gray y Killinger, 1966).

En cuanto a los parámetros ambientales necesarios para el desarrollo de *L. monocytogenes* cabe destacar su capacidad de crecer a una temperatura mínima de  $-0,4^{\circ}\text{C}$ , óptima de  $37^{\circ}\text{C}$  y máxima de  $45^{\circ}\text{C}$ , por lo cual puede ser clasificada como una

bacteria psicotrofa. El pH mínimo de desarrollo es 4,3, el óptimo 7,0 y el máximo 9,0. Además, *L. monocytogenes* es capaz de crecer en presencia de altas concentraciones de sal (hasta 10% NaCl). Esta bacteria posee un metabolismo aerobio-anaerobio facultativo y resulta característico para su identificación en el laboratorio su crecimiento en agar sangre produciendo una  $\beta$ -hemólisis (hemólisis incompleta). Es además catalasa positiva y oxidasa negativa.

*L. monocytogenes* posee una movilidad característica por volteretas, mejor demostrada en cultivos incubados a "temperatura ambiente"(unos 25°C). En cultivos incubados a 37°C la bacteria presenta pocos flagelos, en caso de tenerlos, por lo que será observable a lo sumo una lenta motilidad (Gray y Killinger, 1966).

En la clasificación inferior a especie de *L. monocytogenes* se distinguen 13 serovariedades en función de sus antígenos celular (O) y flagelar (H). Los casos de listeriosis en humanos son causados principalmente por sólo tres serotipos (4b, 1/2a y 1/2b). La mayoría de los brotes de listeriosis en humanos y un gran porcentaje de los casos esporádicos han sido ocasionados por la serovariedad 4b. En contraste, en los alimentos se aísla con más frecuencia a las cepas del serogrupo 1/2 (Pini y Gilbert, 1988; Schoenberg y col., 1989; Kerr y col., 1995).

*L. monocytogenes* puede ser aislada en el medioambiente, tanto en el suelo como en agua fresca, aguas residuales, vegetación, materia en descomposición y como parte de la flora fecal de una gran variedad de animales. A partir de su reservorio en el medioambiente, el microorganismo puede infectar un amplio abanico de animales como son roedores, conejos, ovejas y rumiantes, a través de la ingestión de vegetales o aguas contaminadas, en los que ocasiona cuadros de sépsis, romboencefalitis, prematuridad y abortos.

Para el ser humano el riesgo de infección radica principalmente en el consumo de alimentos contaminados, en los cuales la bacteria puede haber crecido en la superficie formando biofilms o biopelículas. Cabe destacar a este respecto, dada su ubicuidad en el ambiente, la gran variedad de alimentos susceptibles a la contaminación. El riesgo de contraer la enfermedad también está determinado por la concentración del patógeno en el alimento contaminado, definido mediante un mecanismo de dosis-respuesta. Actualmente se considera que la dosis infectiva necesaria para causar cuadro

clínico es de al menos  $10^2$  células viables para los grupos de riesgo y de  $10^4$  en la población sana (López y col., 2006).

*L. monocytogenes* es un patógeno oportunista, ya que la enfermedad afecta a sectores específicos de población especialmente susceptibles como son personas con una enfermedad o circunstancia subyacente grave, inmunodeprimidos, personas VIH (+), enfermos crónicos (con patologías que producen inmunodeficiencia), mujeres embarazadas, fetos y recién nacidos, y a personas mayores (Cherubin y col., 1991).

La listeriosis puede presentar dos tipos de cuadros clínicos diferentes:

- 1) *Listeriosis gastrointestinal, no invasiva*: Es el cuadro clínico que presentan los individuos inmunocompetentes.
- 2) *Listeriosis invasiva*: Se presenta en los grupos vulnerables (individuos inmunocomprometidos, embarazadas, neonatos y fetos, enfermos crónicos y ancianos).

La infección durante el embarazo es 18 veces más frecuente que en la población no gestante (Lamont y col, 2011). La enfermedad cursa en la gestante con síntomas pseudogripales, entre los que destacan la fiebre, dolor de garganta, dolores musculares, malestar general, dolor en el hipogastrio, dorsalgia y diarrea. En el curso de la misma puede producirse bacteriemia y por lo tanto, la transmisión trasplacentaria del microorganismo al feto, lo que da lugar a la infección intrauterina del mismo. La infección intrauterina del feto puede inducir el trabajo de parto y el nacimiento de un feto infectado o mortinato

Los adultos también pueden ser infectados por *L. monocytogenes*, aunque estos pacientes generalmente presentan patologías base que producen inmunodepresión (ej.: linfoma, trasplante de órganos, VIH, diabetes...). En estos casos se produce sépsis aguda, meningitis subaguda, meningoencefalitis o romboencefalitis. Los principales síntomas descritos en estos casos son fiebre, cefaleas, rigidez del cuello (tortícolis) (Koneman, 2008).

## - 2.2. Importancia de biofilms formados por *L. monocytogenes* para la industria alimentaria

En los últimos tiempos, se ha puesto de manifiesto que las bacterias no se encuentran en el medioambiente exclusivamente de forma libre, comportándose como seres unicelulares, sino que en muchas ocasiones se encuentran formando parte de comunidades microbianas en lo que habitualmente se conoce como biofilms o biopelículas.

Los biofilms se definen como comunidades complejas de microorganismos que crecen embebidos en una matriz orgánica polimérica que ellos mismos producen y adherida a una superficie viva o inerte y que pueden presentar una única especie microbiana o una amplia variedad de especies diferentes (Carpentier y Cerf, 1993) (Costerton, 1995). Estos dos estados que pueden adoptar las bacterias (forma planctónica o en comunidad) pueden diferenciarse fenotípicamente, con respecto a la tasa de crecimiento y a la transcripción de genes (Donlan y Costerton, 2002).

La formación de biofilms se identifica como una estrategia adaptativa de los microorganismos, ya que el crecimiento en biofilm les ofrece importantes ventajas:

- 1) La matriz orgánica polimérica ofrece protección a los microorganismos ya que crea un microambiente en el que las condiciones ambientales son más estables.
- 2) Permite la supervivencia en nichos favorables, sin ser arrastrados de allí por el flujo de líquido.
- 3) Facilita el aprovechamiento del agua, reduciendo la posibilidad de deshidratación.
- 4) La matriz orgánica polimérica confiere resistencia frente a la acción de agentes adversos como son biocidas, anticuerpos y macrófagos.
- 5) Incrementa la disponibilidad de nutrientes para su crecimiento.
- 6) Se propicia por la cercanía las relaciones de comensalismo o cooperación entre organismos con aptitudes fisiológicas diferentes.
- 7) Posibilita la transferencia de material genético (ADN), la proximidad favorece la transferencia horizontal de genes.

Para la formación de biofilms bacterianos solamente son requeridos la presencia de un entorno hidratado y una mínima cantidad de nutrientes, ya que estos pueden desarrollarse sobre todo tipo de superficies (hidrófobas o hidrófilas, bióticas o abióticas) (Kraigsle y col., 2002).

En la industria alimentaria, tanto durante la producción como en el procesado, empaquetado o la distribución, son muchos los momentos en los que se cumplen de forma no intencionada los requerimientos de los diferentes microorganismos para la formación de biofilms sobre diferentes superficies, equipos y materiales.

La presencia de estos biofilms en la industria tiene distintas repercusiones:

- 1) Desde un punto de vista meramente industrial puede plantear diversos problemas tecnológicos, como la alteración de propiedades de superficies, afectando a la fricción o a la capacidad de transferencia de calor. También puede conducir a la obturación de tuberías, orificios, filtros, válvulas y demás sistemas de conducción. Por otra parte, puede alterar el proceso productivo mediante el ensuciamiento de dispositivos instalados para medida y muestreo o incluso facilitar procesos de corrosión en distintos equipos.
- 2) Desde un punto de vista económico y de calidad del producto, debido a que, en muchos casos se producen contaminaciones del producto, que conducen a una pérdida en la calidad y una disminución en el periodo de vida útil del alimento.
- 3) Además de aspectos citados cabe señalar, desde un punto de vista sanitario, que la contaminación del producto acabado puede dar lugar a la transmisión potencial de enfermedades, comportándose estos biofilms de la industria como reservorios y los alimentos en vectores para la transmisión de las mismas (Serra, 2003).

Como anteriormente ha sido señalado *L. monocytogenes* es un microorganismo psicrófilo, con capacidad de proliferación en entornos fríos y húmedos, condiciones ideales para la formación de biofilms monoespecie o en asociación con otros microorganismos (Chmielewsky y Frank, 2003). De hecho, este microorganismo posee una gran facilidad para adherirse a superficies tanto vivas como inertes. Para la adhesión, utiliza flagelos, pilis y proteínas de membrana. En esta capacidad de formación de biofilms ha sido detectada asimismo una gran variabilidad entre distintas



cepas (Borucki y col., 2003). A este respecto, cabe destacar varios estudios que ponen de manifiesto la capacidad de formación de biofilms de este microorganismo sobre distintos materiales frecuentes en la industria alimentaria tales como el acero inoxidable, plástico, y policarbonato, entre otros (Nelson, 1990). Además, se ha demostrado la mayor capacidad de producir contaminación sobre productos alimenticios de las cepas con mayor capacidad de producción de biofilms en estos materiales. Este hecho constata la importancia crucial de los biofilms a la hora para provocar contaminación cruzada (Keskinen y col., 2008). A modo de ejemplo, cabe señalar la descripción del aislamiento de *L. monocytogenes* a partir los estantes de madera en la sala de maduración de un queso implicado en un brote de listeriosis (Noterman., 1994). En la industria láctea, además, se ha demostrado la contribución positiva de residuos lácteos a la formación de biofilms, ya que aportan nutrientes que facilitan su supervivencia (Lee Wong, 1998).

### **- 2.3. Incidencia de *L. monocytogenes* en la industria alimentaria y su repercusión en la salud humana.**

La listeriosis transmitida por alimentos es una enfermedad relativamente poco común (entre 2 y 7 casos por millón), pero grave. Su tasa de letalidad comparada con las de otros microorganismos patógenos transmitidos por alimentos como *Salmonella*, es alta (20-25%), y es precisamente esta alta tasa de mortalidad una de las causas del interés de su estudio (Schwartz y col., 1989).

En la actualidad, la Organización Mundial de la Salud (OMS), considera la listeriosis como una infección alimentaria transmitida predominantemente de forma mono-zoótica: aunque el suelo y los vegetales en descomposición se consideran su hábitat primario, la transmisión al hombre se produce principalmente a través de animales y superficies de alimentos. A pesar de que tradicionalmente esta enfermedad era considerada dentro de las zoonosis, ya que puede ser transmitida por contacto directo con animales infectados (exposición ocupacional), en áreas urbanas, sin antecedentes de contacto con animales, la mayoría de las infecciones humanas se adquieren por ingestión de alimentos contaminados. Por ello, *L. monocytogenes* se considera como una bacteria medioambiental, de distribución ubicua, que contamina frecuentemente los alimentos, y cuya transmisión al hombre se produce principalmente

mediante el consumo de alimentos que se han contaminado durante su producción o procesamiento (OMS, 1988).

La evidencia de este tipo de transmisión proviene de un primer brote documentado en Nueva Escocia (Canadá), en 1981. Durante el estudio se pudo comprobar la correspondencia entre la cepa de *L. monocytogenes* aislada en la muestra de sangre extraída de un paciente y la presente en la ensalada de col que conservaba en la nevera de su domicilio, lo que constituyó una prueba fehaciente de que la ensalada era la transmisora de la bacteria (Schlech y col., 1983).

Con posterioridad, se han detectado brotes en diversas áreas geográficas con distinto número de individuos implicados y asociados al consumo de distintos alimentos. Algunos de los alimentos implicados en los casos o brotes de listeriosis transmitida por vía de los alimentos han sido los siguientes: queso estilo mexicano (EE.UU., 1985), paté (Reino Unido, 1987-88), queso (Suiza, 1983-87), lengua de cerdo “delicatessen” (Francia, 1992), “rilletes” de cerdo (Francia, 1993), mejillones ahumados (Australia, 1991, Nueva Zelanda, 1992) y salchichas (EE.UU, 1998).

En España, la listeriosis no está incluida en el sistema de enfermedades de declaración obligatoria (sistema EDO), por lo que los datos acerca de su incidencia son los casos comunicados de forma voluntaria por las comunidades autónomas al Sistema de Información Microbiológica (SIM). La falta de vigilancia epidemiológica por parte de las autoridades sanitarias españolas implica una infradeclaración de los casos de esta enfermedad, lo que supone que no se conozca su incidencia real (Parrilla y Vaqué, 2014).

Los datos mostrados en el Boletín epidemiológico semanal, referentes al SIM, indican que los microorganismos causantes de enfermedades de transmisión alimentaria y por agua más frecuentes en España son *Campylobacter*, *Salmonella*, *Yersinia* y *Listeria*.

Con respecto a esta última, en España se declararon de forma oficial en 2011, 91 casos de listeriosis alimentarias causadas por *L. monocytogenes*, de los cuales 49 correspondieron con personas mayores de 60 años (Tabla 2).

**Tabla 1- Principales patógenos alimentarios declarados al SIM en el año 2011. Fuente: Boletín Epidemiológico Semanal. Vol. 20 n° 8. Semanas 18-19 (Del 30/04 al 13/05 de 2012).73-80.**

| Microorganismos causantes de enfermedades de transmisión alimentaria y por agua | Número casos | Sexo   |       |       | Grupo de edad |       |      |        |        |        |        |        |        |       |       |
|---|--------------|--------|-------|-------|---------------|-------|------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|-------|-------|
|   |              | Hombre | Mujer | N.C.* | <1a           | 1-4a  | 5-9a | 10-14a | 15-19a | 20-29a | 30-39a | 40-49a | 50-59a | >/60a | N.C.* |
| <i>Campylobacter coli</i>   | 116          | 68     | 47    | 1     | 10            | 48    | 7    | 8      | 2      | 4      | 3      | 5      | 3      | 21    | 5     |
| <i>Campylobacter fetus</i>  | 5            | 5      |       |       |               |       |      |        |        |        |        | 1      |        | 3     | 1     |
| <i>Campylobacter jejuni</i>   | 4.462        | 2.510  | 1.900 | 52    | 443           | 1.919 | 589  | 204    | 91     | 160    | 150    | 150    | 170    | 451   | 135   |
| <i>Campylobacter lari</i>   | 0            |        |       |       |               |       |      |        |        |        |        |        |        |       |       |
| <i>Campylobacter spp</i>  | 886          | 487    | 392   | 7     | 101           | 355   | 107  | 45     | 14     | 28     | 37     | 22     | 33     | 101   | 43    |
| <i>Escherichia coli</i> O157  | 7            | 2      | 5     |       |               | 1     |      |        |        |        | 1      | 2      |        | 3     |       |
| <i>E. coli</i> verotoxigénica Otros   | 5            | 2      | 3     |       |               | 2     | 1    |        |        |        |        | 1      |        |       | 1     |
| <i>Leptospira spp</i>   | 4            | 2      | 2     |       |               |       |      |        |        |        | 1      |        | 2      |       |       |
| <i>Listeria monocytogenes</i>   | 91           | 47     | 44    |       | 2             | 1     |      |        |        | 8      | 8      | 4      | 14     | 49    | 5     |
| <i>Salmonella</i> Enteritidis   | 992          | 506    | 477   | 9     | 32            | 257   | 155  | 65     | 27     | 66     | 84     | 62     | 49     | 169   | 26    |
| <i>Salmonella</i> Typhimurium   | 1.004        | 534    | 457   | 13    | 40            | 465   | 158  | 52     | 14     | 19     | 34     | 25     | 48     | 118   | 31    |
| <i>Salmonella</i> Grupo B   | 403          | 205    | 198   |       | 24            | 160   | 69   | 15     | 5      | 11     | 15     | 11     | 22     | 64    | 7     |
| <i>Salmonella</i> Grupo D   | 108          | 50     | 58    |       | 5             | 23    | 23   | 4      | 3      | 6      | 5      | 5      | 6      | 24    | 4     |
| <i>Salmonella</i> no tifoidea Otros   | 271          | 131    | 136   | 4     | 74            | 60    | 19   | 11     | 5      | 8      | 18     | 9      | 9      | 41    | 17    |
| <i>Salmonella</i> spp   | 1.008        | 525    | 458   | 25    | 146           | 306   | 122  | 36     | 17     | 33     | 42     | 46     | 58     | 161   | 41    |
| <i>Salmonella</i> Typhi y Paratyphi   | 47           | 22     | 25    |       | 3             | 7     | 8    | 6      | 2      | 3      | 10     | 1      | 1      | 4     | 2     |
| <i>Vibrio parahaemolyticus</i>  | 1            | 1      |       |       |               |       |      |        |        |        |        |        |        | 1     |       |
| <i>Yersinia enterocolitica</i>  | 212          | 111    | 95    | 6     | 29            | 86    | 31   | 16     | 7      | 10     | 9      | 3      | 4      | 14    | 3     |
| <i>Yersinia enterocolitica</i> O:3  | 52           | 23     | 29    |       | 8             | 21    | 8    | 4      | 1      | 4      | 1      | 3      |        | 1     | 1     |
| <i>Cryptosporidium</i>  | 79           | 43     | 35    | 1     | 4             | 50    | 10   | 4      |        |        | 1      | 4      | 1      | 2     | 3     |
| <i>Giardia lamblia</i>  | 530          | 297    | 224   | 9     | 4             | 174   | 132  | 62     | 5      | 31     | 39     | 25     | 18     | 29    | 11    |
| <i>Entamoeba histolytica</i>  | 9            | 8      | 1     |       |               |       |      | 1      | 1      | 1      |        | 4      | 2      |       |       |

Los mismos datos referentes al año 2012 muestran una incidencia mayor, cifrándose en 128 casos, de los cuales 75 se refieren en personas mayores de 60 años (Tabla 2).

**Tabla 2- Principales patógenos alimentarios declarados al SIM en el año 2012. Fuente: Boletín Epidemiológico Semanal. Vol. 22 n° 2. Semanas 5-6 (Del 27/01 al 09/02 de 2014/ 14-21). 14-21.**

| Microorganismos causantes de enfermedades de transmisión alimentaria y por agua | Número casos | Sexo   |       |       | Grupo de edad |       |      |        |        |        |        |        |        |       |       |
|---|--------------|--------|-------|-------|---------------|-------|------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|-------|-------|
|   |              | Hombre | Mujer | N.C.* | <1a           | 1-4a  | 5-9a | 10-14a | 15-19a | 20-29a | 30-39a | 40-49a | 50-59a | >/60a | N.C.* |
| <i>Campylobacter coli</i>   | 250          | 135    | 114   | 1     | 16            | 100   | 33   | 20     | 5      | 8      | 15     | 9      | 6      | 36    | 2     |
| <i>Campylobacter fetus</i>  | 3            | 2      | 1     | 0     | 0             | 0     | 0    | 0      | 0      | 0      | 0      | 1      | 0      | 2     | 0     |
| <i>Campylobacter jejuni</i>   | 4.913        | 2.840  | 2.016 | 57    | 643           | 2.103 | 652  | 261    | 95     | 186    | 166    | 140    | 155    | 474   | 38    |
| <i>Campylobacter lari</i>   | 1            | 1      | 0     | 0     | 0             | 1     | 0    | 0      | 0      | 0      | 0      | 0      | 0      | 0     | 0     |
| <i>Campylobacter spp</i>  | 955          | 534    | 398   | 23    | 118           | 363   | 136  | 39     | 17     | 37     | 27     | 29     | 31     | 126   | 32    |
| <i>Escherichia coli</i> O157  | 16           | 6      | 9     | 1     | 2             | 7     | 1    | 1      | 0      | 0      | 1      | 2      | 0      | 1     | 1     |
| <i>E. coli</i> verotoxigénica Otros   | 3            | 2      | 1     | 0     | 0             | 1     | 0    | 0      | 0      | 0      | 0      | 2      | 0      | 0     | 0     |
| <i>Leptospira spp</i>   | 0            | 0      | 0     | 0     | 0             | 0     | 0    | 0      | 0      | 0      | 0      | 0      | 0      | 0     | 0     |
| <i>Listeria monocytogenes</i>   | 128          | 76     | 48    | 4     | 9             | 0     | 0    | 0      | 3      | 1      | 11     | 7      | 17     | 75    | 5     |
| <i>Salmonella</i> Enteritidis   | 1.236        | 605    | 608   | 23    | 68            | 318   | 198  | 88     | 30     | 81     | 65     | 86     | 69     | 198   | 35    |
| <i>Salmonella</i> Typhimurium   | 1.354        | 729    | 608   | 17    | 62            | 613   | 249  | 67     | 18     | 26     | 41     | 34     | 53     | 179   | 12    |
| <i>Salmonella</i> Grupo B   | 831          | 414    | 412   | 5     | 26            | 324   | 144  | 47     | 11     | 21     | 33     | 25     | 52     | 141   | 7     |
| <i>Salmonella</i> Grupo D   | 245          | 121    | 123   | 1     | 12            | 56    | 38   | 17     | 2      | 19     | 11     | 18     | 17     | 48    | 7     |
| <i>Salmonella</i> no tifoidea Otros   | 369          | 182    | 184   | 3     | 39            | 83    | 42   | 13     | 9      | 17     | 16     | 10     | 31     | 102   | 7     |
| <i>Salmonella</i> spp   | 794          | 416    | 368   | 10    | 39            | 276   | 107  | 40     | 16     | 27     | 38     | 28     | 44     | 173   | 6     |
| <i>Salmonella</i> Typhi y Paratyphi   | 26           | 12     | 14    | 0     | 0             | 8     | 4    | 1      | 0      | 3      | 6      | 1      | 2      | 1     | 0     |
| <i>Vibrio parahaemolyticus</i>  | 0            | 0      | 0     | 0     | 0             | 0     | 0    | 0      | 0      | 0      | 0      | 0      | 0      | 0     | 0     |
| <i>Yersinia enterocolitica</i>  | 220          | 108    | 103   | 9     | 32            | 87    | 38   | 20     | 5      | 11     | 8      | 2      | 3      | 10    | 4     |
| <i>Yersinia enterocolitica</i> O:3  | 33           | 15     | 18    | 0     | 9             | 12    | 3    | 7      | 0      | 0      | 0      | 0      | 0      | 1     | 1     |
| <i>Cryptosporidium</i>  | 299          | 172    | 117   | 10    | 8             | 196   | 50   | 15     | 5      | 0      | 1      | 1      | 1      | 4     | 18    |
| <i>Giardia lamblia</i>  | 942          | 511    | 397   | 34    | 9             | 323   | 241  | 90     | 12     | 44     | 75     | 46     | 34     | 35    | 33    |
| <i>Entamoeba histolytica</i>  | 4            | 3      | 1     | 0     | 0             | 0     | 0    | 0      | 1      | 0      | 2      | 0      | 1      | 0     | 0     |

Según un reciente estudio de la incidencia de la listeriosis en España para el periodo 2001-2007, la infradeclaración de los datos de la incidencia registrada por el SIM supone que la incidencia real sea 3,5 veces mayor, siendo respectivamente 0,16 y 0,56 (casos por 100.000 habitantes y año). Estos datos nos acercarían a la realidad de nuestro entorno europeo (Parrilla y Vaqué, 2014). Al analizar el número de casos constatados de listeriosis en los últimos años observamos una tendencia al alza en su incidencia (Tabla 3).

**Tabla 3- Número de casos de listeriosis en España entre 1990 y 2012.**

| 6086 - Listeriosis - Number of cases |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |
|--------------------------------------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|
|                                      | 1990 | 1991 | 1992 | 1993 | 1994 | 1995 | 1996 | 1997 | 1998 | 1999 | 2000 | 2001 | 2002 | 2003 | 2004 | 2005 | 2006 | 2007 | 2008 | 2009 | 2010 | 2011 | 2012 |
| SPAIN                                | 18   | 7    | 27   | 24   | 26   | 25   | 21   | 19   | 16   | 32   | 35   | 57   | 49   | 52   | 100  |      | 76   | 79   | 88   | 131  | 120  | 91   | 128  |

Entre las causas atribuibles a esta tendencia al alza de la listeriosis cabe destacar el envejecimiento de la población y el mayor número de pacientes inmunodeprimidos junto con su mayor esperanza de vida.

#### **- 2.4. Productos implicados en la transmisión de *L. monocytogenes*: normativa y método de control.**

A pesar de la gran variedad de alimentos susceptibles a contaminarse con *L. monocytogenes*, en los casos de listeriosis registrados en humanos los alimentos asociados más frecuentemente como vehículo transmisor del patógeno son los alimentos listos para el consumo (LPC) de elaboración industrial con las siguientes características:

- 1) Su composición permite el crecimiento y multiplicación de *L. monocytogenes*.
- 2) Su vida útil en conservación bajo refrigeración es prolongada.
- 3) Son consumidos sin someterse a tratamientos listericidas adicionales, por ejemplo el cocinado (Pinner y col., 1992).

En relación a la capacidad de transmisión de la enfermedad por ingestión de alimentos contaminados adquiere especial relevancia la relación dosis-respuesta. La investigación epidemiológica de los casos demuestra la relación de éstos con consumo de alimentos con niveles elevados del microorganismo, resultado de su multiplicación

sobre la matriz alimentaria previa al consumo (Pinner y col., 1992). De este dato se deriva la distinción entre alimentos que no son propicios a transmitir la enfermedad, debido a su incapacidad a servir de soporte del crecimiento del patógeno, y aquellos que pueden ser fuentes eventuales de listeriosis, centrándose sobre estos últimos el principal esfuerzo preventivo de propagación de esta enfermedad de transmisión alimentaria.

La Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA) ha realizado recientemente un estudio para conocer la presencia de *L. monocytogenes* en determinados alimentos LPC. En este informe se pone de manifiesto la presencia de la bacteria en el 10,3% de las muestras de pescado, el 2,1% de las muestras carne y el 0,5% de las muestras de quesos recogidos en distintas tiendas y supermercados de la Unión Europea (EFSA, 2013).

Con el fin de ofrecer una seguridad al consumidor sobre la inocuidad de los alimentos la Comisión del Código Alimentario (CAC) estableció unos criterios microbiológicos que deben cumplir los alimentos susceptibles de consumo humano para garantizar que patógenos potenciales no estén presentes en concentraciones superiores a aquellas que garantizan su inocuidad, aunque no se garantice su ausencia (EFSA, 2007) y que están recogidos en Reglamento (CE) N° 2073/2005 relativo a los criterios microbiológicos aplicables a los productos alimenticios, que establece el nivel máximo de 100 UFC/g de *L. monocytogenes* durante toda la vida útil del alimento, y ausencia de la bacteria en 25 g del alimento listo para el consumo a la salida de la empresa productora, si dicho alimento puede favorecer el desarrollo de *L. monocytogenes* o está destinado a lactantes o para usos médicos especiales. Los métodos analíticos de referencia para las distintas situaciones se establecen en las normas EN/ISO 11290-1 y EN/ISO 11290-2 (UE., 2005).

A la hora de clasificar los alimentos como susceptibles o no de la proliferación de *L. monocytogenes* deben tenerse en cuenta las características fisicoquímicas del producto: pH,  $a_w$ , concentración de sal, presencia de conservantes; asimismo, es relevante el tipo de envasado, las condiciones de almacenamiento y transformación, las posibilidades de contaminación y la vida útil del producto. En relación a estas características del producto debe tenerse en cuenta la bibliografía científica relativa a los aspectos necesarios para el crecimiento y multiplicación del microorganismo en

cuestión. A modo general, se considera que un alimento que compromete el crecimiento de *L. monocytogenes* si:

- 1- Su pH es igual o menor a 4,4.
- 2- Tiene una  $a_w$  menor o igual a 0,92.
- 3- Su pH es menor o igual a 5,0 con una  $a_w$  menor o igual a 0,94 (AESAN, 2011).

A pesar de la frecuencia de la presencia de *L. monocytogenes* en el estudio mencionado anteriormente, el límite de seguridad alimentaria cifrado en 100 bacterias por gramo sólo fue superado en el 1,7% de las muestras de pescado, el 0,4% de las de carne y el 0,06% de las de queso (EFSA, 2013).

Aunque la proporción de muestras del estudio que incumplen los criterios legales de presencia del patógeno en alimentos no parecen alarmantes, debido a la gravedad de la enfermedad y al hecho de que está muy frecuentemente asociada a alimentos de elaboración industrial (especialmente cuando se producen epidemias), la listeriosis se sitúa entre las enfermedades transmitidas por alimentos de mayor relevancia social y económica. Es esta razón por la que se insiste en la vigilancia de su presencia y niveles en los alimentos (Roberts y Pinner, 1990).

A fin de evitar la enfermedad, la legislación comunitaria establece directivas a las empresas alimentarias, en cuanto al trabajo de sus operadores, el mantenimiento de buenas prácticas de operación, tener programas de autocontrol de higiene, de temperatura, etc. en los distintos puntos a lo largo de la cadena alimentaria (EFSA, 2013).

Otro de los aspectos epidemiológicos de la listeriosis es el ser una enfermedad observada principalmente en los países desarrollados. Al comparar las diferencias entre la incidencia de la enfermedad entre estas áreas geográficas y países en desarrollo, las causas de esta diferente distribución de los casos parecen difusas y no atribuibles a un único factor, entre ellos cabe señalar diferencias geográficas que pueden afectar a las condiciones ambientales, a las diferentes culturas y tecnologías culinarias, las distintas tecnologías de conservación de los alimentos, y también las distintas capacidades de diagnóstico y declaración de casos.

## - 2.5. Los bacteriófagos.

Los bacteriófagos (fagos) son virus que infectan a bacterias. Se comportan como parásitos intracelulares obligados de bacterias, en cuyo interior se multiplican haciendo uso de su maquinaria biosintética.

El descubrimiento de los bacteriófagos se remonta a 1896, momento en el que el bacteriólogo británico Ernest Hankin evidenció la presencia de actividad antimicrobiana frente a *Vibrio cholerae*. A pesar de este primer contacto científico con los bacteriófagos, no sería hasta 1915 de la mano de Frederick Twort el momento en el que se infiriese que la actividad antimicrobiana era debida a la presencia de virus. De forma independiente Félix d'Herelle, científico del instituto Pasteur de París, anunció en 1917 su descubrimiento. Esta es la razón por la que se considera actualmente a Twort y D'Herelle, los codescubridores de los fagos.

Estos virus infectan las células bacterianas con una elevada especificidad de huésped, lo que ha hecho de los bacteriófagos una herramienta útil en el diagnóstico de laboratorio para la identificación de bacterias patógenas (fago-tipificación). Esta fago-tipificación es utilizada frecuentemente en los laboratorios de referencia con propósitos epidemiológicos.

Por otra parte, la capacidad de los fagos para invadir bacterias y alterar su metabolismo causándoles la muerte ha abierto recientemente nuevas líneas de investigación en su posible uso para el tratamiento de infecciones bacterianas y en la profilaxis.

Las partículas fágicas (viriones) están compuestas por un genoma, de DNA o RNA englobado en una envuelta proteica o lipoproteica, denominada cápsida. El conjunto de material genético y cápsida es denominado nucleocápsida (Fig. 2) (Guttman y col., 2005).

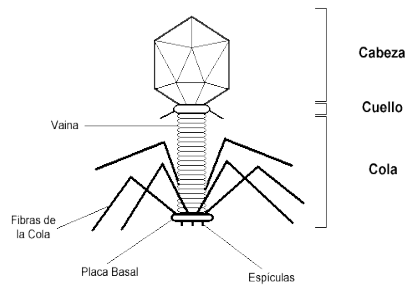


Figura 2- Esquema de la estructura del bacteriófago T4.

Fuente: <http://www.microinmuno.qb.fcen.uba.ar/SeminarioBacteriofagos.htm>

Los bacteriófagos se clasifican según la morfología de la cápsida, el tipo y tamaño de material genético y la presencia o ausencia de envoltura o capa de lípidos.

La clasificación más utilizada en la actualidad fue propuesta por Ackermann según la cual existen 13 familias de fagos que se clasifican de acuerdo a la naturaleza de su genoma y a sus características morfológicas (Fig. 3):

| Morfotipo | Forma              | Ácido nucleico  | Familia                  | Particularidades                                  |
|-----------|--------------------|-----------------|--------------------------|---|
| A1 a A3   | Fagos con cola     | ADN dc, L       | <i>Myoviridae</i>        | Cola contráctil                                   |
| B1 a B3   |                    |                 | <i>Siphoviridae</i>      | Cola larga, no contráctil                         |
| C1 a C3   |                    |                 | <i>Podoviridae</i>       | Cola corta  |
| D1        | Fagos poliédricos  | ADN sc, C       | <i>Microviridae</i>      | Capsómeros sobresalientes                         |
| D3        |                    | ADN dc, C, S    | <i>Corticoviridae</i>    | Cápside compleja, lípidos                         |
| D4        |                    | ADN dc, L       | <i>Tectiviridae</i>      | Vesícula lipídica, pseudocola                     |
| E1        |                    | ARN sc, L       | <i>Leviviridae</i>       |   |
| E2        |                    | ARN dc, L, seg. | <i>Cystoviridae</i>      | Cubierta lipídica                                 |
| F1        | Fagos filamentosos | ADN sc, C       | <i>Inoviridae</i>        | a- filamentos largos                              |
| F2        |                    |                 |                          | b- bastones cortos                                |
| F3        |                    | ADN dc, L       | <i>Lipothirixviridae</i> | Cubierta lipídica                                 |
| F4        |                    | ADN dc, L       | <i>Rudoviridae</i>       | Similar al virus del mosaico del tabaco           |
| G1        | Fagos pleomórficos | ADN dc, C, S    | <i>Plasmaviridae</i>     | Cubierta lipídica, sin cápside                    |
| G2        |                    | ADN dc, C, S    | <i>Fuselloviridae</i>    | Cubierta lipídica, sin cápside, en forma de limón |

Figura 3- Morfotipos y características de las diferentes familias de fagos (Ackerman, 2001).

Los fagos con cola representan el 96% de los estudiados hasta la actualidad, y se encuentran agrupados constituyendo el orden de los Caudovirales. Estos fagos tienen como características un material genético compuesto por DNA de doble cadena, no poseer envuelta lipídica, y presentar simetría cúbica en sus cápsidas y helicoidal en sus colas (Ackermann, 2003). Dentro de este grupo el 25% pertenece a la familia



*Myoviridae* (fagos con cola larga y contráctil), el 61% a la familia *Siphoviridae* (con cola larga no contráctil) y 14% a la familia *Podoviridae* (con cola corta) (Ackermann, 2007).

El ciclo de vida de un fago se inicia con la infección de la bacteria susceptible. Este proceso de infección consta de 4 etapas:

- 1) El primer paso en el proceso de infección es la adsorción del fago a la célula bacteriana. Esta unión es débil y reversible. En el proceso intervienen receptores específicos de la célula bacteriana hospedadora y fibras de la cola del fago o estructuras análogas en aquellos fagos que carezcan de la misma. Los receptores bacterianos tienen distinta naturaleza en las diferentes especies bacterianas, incluyendo proteínas de superficie externa, LPS, pili y lipoproteínas. Esta necesidad de interacción en el proceso de adsorción determina la especificidad del huésped.
- 2) Posteriormente, ha de darse una unión irreversible del fago con la bacteria. En esta unión están implicados componentes de la placa basal. Los fagos que carecen de placa basal tienen otras formas de unirse estrechamente a la célula bacteriana.
- 3) La unión irreversible del fago a la bacteria da como consecuencia la contracción de la vaina, hecho que produce que la cola se vea empujada a penetrar a través de la envoltura bacteriana. Los fagos que no poseen cola cubierta de vaina poseen otros mecanismos para atravesar la envoltura como pueden ser enzimas degradadoras de peptidoglicano.
- 4) Por último, una vez el fago ha logrado atravesar la envoltura bacteriana, se produce la inyección del ácido nucleico que se encuentra en la cabeza del virión pasando a través de la cola hueca. Generalmente el único componente del fago que realmente penetra la célula es el ácido nucleico, a diferencia de los virus animales, en los cuales la mayoría de las partículas virales normalmente se introducen en la célula (Murray y col., 2009)

Relativo a la infección cabe destacar que debido a que los receptores bacterianos tienen distinta naturaleza, a medida que un mismo fago pueda reconocer mayor diversidad de los mismos, más amplio será el rango de huésped del fago, es decir, tendrá capacidad para infectar a un mayor número de cepas, especies y en algunos casos géneros bacterianos (Kutter y Sulakvelidze, 2005).

Tras el proceso infeccioso el bacteriófago debe replicarse, sufrir un ciclo de multiplicación, a fin de asegurar prole que le perpetúe en el tiempo. A efectos de esta replicación se han descrito dos tipos de ciclos:

1) *Ciclo lítico* (fagos líticos o virulentos): el fago solo se puede multiplicar en el interior de la bacteria y el proceso finaliza con la lisis de la bacteria hospedadora inducida por el fago y la liberación su prole.

2) *Ciclo lisogénico* (fagos lisogénicos o atemperados): estos fagos pueden multiplicarse mediante el ciclo lítico o entran en un estado quiescente en la célula, en el que el DNA fágico introducido en la célula bacteriana permanece reprimido y en la mayoría de los casos inserto en el cromosoma bacteriano (profago). Este DNA se replica al mismo tiempo que el cromosoma de la célula que lo alberga y se transmite a sus células hijas, conociéndose ambas como lisógenas. Por tanto no se produce liberación de viriones, y las bacterias lisógenas se mantienen viables (Murray y col., 2009).

El posible uso de los fagos como antimicrobianos parte prácticamente de su descubrimiento, cuando en 1915 d'Herelle, buscando una vacuna para la disentería hemorrágica, observó que a partir de lisados libres de bacterias de la materia fecal de los enfermos las bacterias eran destruidas, produciéndose pequeñas áreas de color más claro en placas de cultivo de medio sólido. La capacidad terapéutica de los fagos en el tratamiento de infecciones fue ensayada en animales en 1919, cuando fue tratada una plaga de disentería de pollo con fagos aislados a partir de sus heces, mostrando resultados exitosos. Tras esto y en el mismo año, en el Hospital de Enfants-Malades (París) se extendió la aplicación de fagos a humanos para el tratamiento de la misma patología, remitiendo los síntomas en los pacientes tras su aplicación (Segundo y col., 2010).

La época de mayor auge de la fagoterapia se centra entre los años 1920 a 1950 cuando diversos laboratorios comerciales (Ely Lilly en Estados Unidos, y en Europa la compañía francesa que daría lugar posteriormente a la firma L'Oréal) comercializaban respectivamente hasta 7 y 5 preparaciones fágicas para su uso en el tratamiento de distintas infecciones en humanos (Sulakvelidze y col., 2001; Hermoso y col., 2007).

En los países de Occidente la aparición y la generalización en el uso de antibióticos a partir de la década del '40 trajo consigo al abandono de la fagoterapia en el tratamiento de las infecciones (Nallelyt y col., 2010), pero se siguió utilizando en Europa del Este (antigua Unión Soviética y Polonia) y la India, donde las investigaciones continuaron. En este campo adquirieron importancia el Instituto Hirsfeld de Polonia y en Georgia el Instituto Eliava, por ejemplo, aunque sus descubrimientos no tuvieron una repercusión trascendente a nivel mundial (Matsuzaki y Rashel, 2005). El resurgir del interés por la fagoterapia en Occidente tiene como causa fundamental la aparición de cepas bacterianas multirresistentes a antibióticos, por lo que se les volvió a considerar como una alternativa interesante en el tratamiento de infecciones tanto en humanos como en animales (Coates y Hu, 2007). Así, su eficacia ha sido ensayada en plantas, acuicultura, aves de corral, animales de abasto, etc. (Ronda y col., 2003).

#### **- 2.6. Nuevos sistemas de conservación y limpieza para la industria alimentaria: los bacteriófagos.**

Los bacteriófagos pueden ser utilizados como método de eliminación de la contaminación microbiológica en la industria de la alimentación a lo largo de toda la cadena alimentaria, es decir, durante el proceso de producción, transformación, empaquetado, distribución, etc. de distintos alimentos tanto de origen animal como vegetal.

Así los bacteriófagos son susceptibles de ser utilizados en:

- 1) La prevención o reducción de la colonización y la infección de animales que sirvan como alimento o materia prima (fagoterapia).
- 2) En la descontaminación de carcasas y otros productos crudos de origen animal o vegetal (biocontrol).
- 3) En la desinfección de equipos, superficies y útiles de producción (biohigienización).
- 4) En la conservación de productos manufacturados perecederos para aumentar su vida útil, como conservantes naturales (bioconservación) (García y col., 2008).

Entre las características que plantean a los bacteriófagos como herramientas en la descontaminación de los alimentos a lo largo de la cadena alimentaria podemos encontrar su capacidad de infección específica a las células bacterianas que presenten receptores para los mismos, y por lo tanto, causar únicamente la muerte de las bacterias seleccionadas (Barrow y Soothil, 1997). Además de esto, los bacteriófagos poseen otras particularidades que les hacen candidatos a su empleo en la desinfección, entre las que destaca su capacidad de automultiplicación. Esto hace referencia a la capacidad que tienen los fagos, mediante la infección de las células bacterianas, de generar su progenie vírica capaz de infectar nuevas células diana.

Otro factor a tener en cuenta es su capacidad de producir la denominada “lisis desde afuera” que hace referencia al fenómeno de muerte celular que se produce cuando una determinada bacteria entra en contacto con un fago en una multiplicidad de infección (MOI) elevada. La adsorción de un gran número de fagos a la superficie de la bacteria produce una desestabilización de las envueltas celulares y se produce por lo tanto muerte de la bacteria sin multiplicación fágica.

Los bacteriófagos presentan asimismo la capacidad de eliminación de bacterias multirresistentes a los antimicrobianos clásicos (antibióticos). Estas bacterias multirresistentes a antibióticos han ido tomando relevancia durante las últimas décadas debido a la selección artificial de cepas resistentes producida por los mismos fármacos y la transferencia horizontal de genes implicados en la misma entre distintos microorganismos. La capacidad de lisis de estas bacterias resistentes por parte de los fagos no se ve afectada debido a su distinta forma de actuación.

Por otra parte, hay unos requerimientos específicos que deben cumplir los bacteriófagos para ser seleccionados para su uso en la industria alimentaria. Entre ellas cabe destacar la capacidad de infección del mayor número de cepas posible de la bacteria a eliminar. Asimismo, los bacteriófagos virulentos son los de elección para el tratamiento de infecciones en animales o vegetales, la descontaminación de los alimentos durante su procesado, las superficies que entren en contacto con estos, o la descontaminación de los alimentos ya listos para consumo, ya que la infección de una bacteria por los mismos garantiza la lisis bacteriana completa, no siendo así en el caso de los fagos atemperados (Brüssow, 2005). Además de esto, a la hora de emplear un

fago en la lucha contra una bacteria debe conocerse que este no posee en su material genético ningún gen de virulencia o de resistencia a antibióticos, que pudiesen ser incorporados a las células objeto de infección transfiriéndole las propiedades codificadas en ellos.

En la industria alimentaria las operaciones de limpieza y desinfección son partes esenciales de la producción, y la eficiencia con la que se realizan estas operaciones afecta en gran medida a la calidad del producto final (Bremer y col., 2006).

La desinfección consiste en el uso de productos antimicrobianos para matar microorganismos, por lo general, los desinfectantes no penetran en la matriz del biofilm por lo que tras un procedimiento de limpieza ineficaz, la desinfección por los métodos clásicos puede no destruir todas las células vivas del biofilm (Simões y col., 2006). De ahí, la importancia de utilizar estrategias alternativas como el uso de bacteriófagos. Cuando estos entran en contacto con las biopelículas, y se producen interacciones con las bacterias presentes en ellas, dependiendo de la susceptibilidad de las células del biofilm al fago, es decir, de la disponibilidad de sitios receptores para la infección y de si el fago también posee enzimas degradadores de polisacáridos, la integridad de la biopelícula puede verse rápidamente destruida por la lisis celular y la desestabilización de la matriz (Simões y col., 2010).

Otra de las posibilidades que ofrece el tratamiento con fagos de superficies en contacto con el alimento de las industrias consiste en la capacidad de llevarlo a cabo aún durante la producción, sin interrumpir el proceso de elaboración, lo que podría repercutir positivamente ayudando a reducir costes operacionales (Hagens y Offerhaus, 2009).

A modo de resumen, cabe resaltar que el abanico de aplicación de los bacteriófagos cada vez se dibuja más amplio, debido fundamentalmente a los resultados obtenidos en experimentos realizados recientemente. En este sentido toma especial importancia en su aplicación a la industria alimentaria el hecho de que las Agencia de Protección Ambiental (EPA) y la Administración de Alimentos y Medicamentos (FDA) hayan autorizado el uso de distintas suspensiones fágicas para ser usadas en la

descontaminación ambiental en plantas productoras de alimentos e incluso para su aplicación directa sobre productos de consumo humano.

En la actualidad cobra especial importancia la investigación en la utilización de bacteriófagos específicos contra *L. monocytogenes* para su utilización en alimentos (Guenther y col., 2009).

### - 2.7. Producto fágico (ListexP100)

Listex P100 es una preparación comercial del bacteriófago P100 que infecta a *Listeria*, propuesta para su uso en productos alimenticios sólidos listos para consumo (RTE) con el objetivo de reducir los recuentos de *L. monocytogenes* en los mismos.

En la clasificación taxonómica el fago P100 de *Listeria*, se adscribe al orden de los *Caudovirales*, formando parte de la familia *Myoviridae*, subfamilia *Spounaviridae*, género Twort-like. En cuanto a su rango de huésped el fago P100 de *Listeria* presenta especificidad por una cepa de *L. innocua* y un gran número de cepas de *L. monocytogenes*.

P100 es un bacteriófago purificado, no transductante, y estrictamente virulento (carente de actividad lisogénica). Tiene un rango de huésped inusualmente amplio dentro del género *Listeria*, habiendo contrastado su éxito para lisar el 95% de las especies de *Listeria spp.* analizadas, incluyendo *L. monocytogenes*, serovares 1/2 y 4; serovar 5 de *L. ivanovii* y serovar 6 de *L. innocua* (Carlton y col., 2005).

La caracterización detallada del genoma de P100 ha sido llevada a cabo por Carlton y col. (2005), con una secuencia genética completamente anotada depositada en GenBank bajo el número DQ004855.

El organismo huésped utilizado en la producción del fago es *L. innocua* (Seeliger, 1983), siendo los tipos de cepas y sus números de registro: ATCC 33090, DSM 20649, NCTC 11288, SLCC 3379. Se clasifica en el Nivel de Bioseguridad 1 por la ATCC, ya que no se conoce que cause enfermedad en personas adultas sanas (carece de determinantes de virulencia).

En el proceso de producción de la suspensión fágica podemos distinguir tres etapas:

- 1) *Propagación*: En un cultivo en crecimiento de *L. innocua*, una vez alcanzada una determinada concentración bacteriana, se produce la infección con el bacteriófago P100.
- 2) *Purificación*: Después de un tiempo de incubación, mediante un proceso de microfiltración, los bacteriófagos son separados de los restos celulares de las células huésped y concentrados mediante ultrafiltración de flujo transversal, hasta una concentración fágica final de  $2 \times 10^{11}$  UFP (unidades formadoras de placa) / ml usando agua estéril.
- 3) *Control de calidad*: Se procede a un muestreo de la solución normalizada analizándose en un laboratorio externo para el control de calidad la presencia de especies de *Listeria*, levaduras, mohos y recuento total de aerobios en placa.

En referencia a su aplicación sobre productos alimentarios se propone su uso mediante pulverización tipo spray o inmersión de los productos alimenticios antes del envasado como complemento a las buenas prácticas de higiene (BPH).

# **MATERIAL Y MÉTODOS**



### 3. MATERIAL Y MÉTODOS

#### - 3.1. Cepas bacterianas y condiciones de cultivo.

Las cepas bacterianas utilizadas en este trabajo se detallan en la Tabla 4. Todas ellas se conservaron a -80°C en caldo triptona-soja (TSB) (Scharlab, Barcelona) conteniendo glicerol al 10% de concentración final.

**Tabla 4-** Cepas bacterianas utilizadas en este trabajo.

| Cepa                             | Origen             |
|----------------------------------|--------------------|
| <i>L. monocytogenes</i> 1        | Quesos asturianos  |
| <i>L. monocytogenes</i> 2        | Quesos asturianos  |
| <i>L. monocytogenes</i> 3        | Quesos asturianos  |
| <i>L. monocytogenes</i> 22       | Quesos asturianos  |
| <i>L. monocytogenes</i> 37       | Quesos asturianos  |
| <i>L. monocytogenes</i> 41       | Quesos asturianos  |
| <i>L. monocytogenes</i> 52       | Productos cárnicos |
| <i>L. monocytogenes</i> 54-2     | Productos cárnicos |
| <i>L. monocytogenes</i> 57-2     | Productos cárnicos |
| <i>L. monocytogenes</i> INIA2530 | Productos cárnicos |
| <i>L. monocytogenes</i> S12      | Productos cárnicos |

Para su cultivo en medio líquido utilizamos TSB en condiciones de aerobiosis y a una temperatura de 32°C.

Para la obtención de colonias aisladas las cepas bacterianas se sembraron por estrías sobre TSA (TSB suplementado con 2% p/v agar). Así mismo, para el procedimiento de siembra mediante la doble capa el medio utilizado en la capa superior es TSA (TSB suplementado con 0,7% p/v agar).

Como medio selectivo para *Listeria spp.* se utilizó medio OXFORD (Scharlab), incubando las placas a 32°C durante 48 horas.

### **- 3.2. Determinación de la sensibilidad o resistencia de *L. monocytogenes* al producto fágico Listex P100 en medio sólido.**

#### **- 3.2.1. “Test de la gota o “spot”.**

Para llevar a cabo este ensayo se requieren cultivos o/n de las cepas en las que se quiere determinar su sensibilidad o resistencia al fago.

El método de siembra de estos cultivos será el de la doble capa, para ello se añadirán 200 µl del cultivo o/n de cada cepa a 3 ml de TSA semisólido (0,7% agar) y se vierte sobre una placa de TSA (2% agar). Una vez solidificada la doble capa, se deposita sobre la superficie una gota de 5 µl de la suspensión fágica Listex P100, incubando posteriormente las placas en estufa a 32°C.

El crecimiento esperado tras 24 horas de incubación será un césped en el que se visualizará la aparición de una calva o placa de lisis en el lugar donde se depositó la gota en las cepas sensibles a la infección por el fago.

#### **- 3.2.2. Cálculo del título de la suspensión fágica Listex P100 y eficiencia de plaqueo para la distintas cepas de *L. monocytogenes*.**

Para calcular el título de la suspensión fágica Listex P100 y su eficiencia de plaqueo para las distintas cepas de *L. monocytogenes* se realizaron diluciones decimales seriadas de la suspensión fágica en tampón SM (NaCl 100 mM, MgSO<sub>4</sub> 10 mM, Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> 10 mM, Tris-HCl 20 mM, pH 7,5). A continuación, las diluciones

conteniendo los fagos se ponen en contacto con cultivos o/n de las distintas cepas. Posteriormente, se pipetea a un tubo Eppendorf 100 µl del cultivo o/n de la cepa correspondiente y 100 µl de dilución fágica. Esta mezcla se enriquece con  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$  y  $\text{MgSO}_4$  en una concentración de final 10 mM; estos dos compuestos actuarán favoreciendo la interacción fago-bacteria. La mezcla se incuba a 32°C durante 15 minutos y se siembra sobre una placa de TSA (2% agar) mediante el método de la doble capa (TSA 0,7% agar). Una vez solidificado, se incuba a 32°C durante 24 h y se procede al recuento de placas de lisis.

El título de la suspensión fágica sobre las distintas cepas se calcula mediante la siguiente fórmula:

$$\text{UFP/ml} = n \cdot 1/C \cdot 1/V$$

Dónde n es el número de placas de lisis que aparecen aisladas, C es la dilución de la suspensión fágica que se sembró y V es el volumen de la dilución de la suspensión fágica que se añade en la placa.

La eficiencia de plaqueo (EOP) se define como la capacidad de un fago para infectar a una cepa con respecto a la que muestra sobre una cepa control. Se calcula mediante la fórmula:

$$\text{EOP}_{\text{cepa}} = \text{Título fágico (UFP/ml)}_{\text{cepa en estudio}} / \text{Título fágico (UFP/ml)}_{\text{cepa control}}$$

### - 3.3. Cálculo del número de viables (UFC) de un cultivo en fase exponencial temprana ( $\text{DO}_{600} \approx 0,1$ ) y en fase estacionaria (o/n).

Para la preparación de un cultivo o/n, se inocularon 2 ml de TSB con una colonia aislada previamente en un medio sólido, y se incubaron posteriormente en estufa a 32°C durante 24 horas. Tras la incubación, este cultivo fue utilizado para obtener un cultivo en fase exponencial, mezclando 10 ml de TSB con 200 µl del cultivo o/n, incubándolo a 37°C en agitación durante aproximadamente 45 min, hasta obtener una  $\text{DO}_{600}$  de 0,1.

Para calcular las respectivas UFC de ambos cultivos se prepararon diluciones seriadas decimales en Tampón Ringer, sembrando 100 µl de las diluciones  $10^{-2}$ ,  $10^{-4}$ ,

$10^{-6}$  y  $10^{-8}$  en placas de TSA mediante el método de siembra en superficie, utilizando para ello un asa de Digralsky. Las placas se incubaron a  $32^{\circ}\text{C}$  y al día siguiente, se procedió al recuento de las colonias, preferentemente en placas que contenían entre 30 y 300.

La concentración inicial de viables de cada cultivo se calcula mediante la fórmula:

$$\text{UFC/ml} = n \times 1/C \times 1/V$$

Dónde n es el número de colonias que aparecen aisladas, C es la dilución del cultivo que se sembró y V es el volumen de cultivo que se añade en la placa.

**- 3.4. Determinación de la sensibilidad o resistencia de las distintas cepas de *L. monocytogenes* al producto fágico Listex P100 en medio líquido.**

**- 3.4.1. Determinación de la MIC del bacteriófago P100.**

El experimento se inició con la obtención de un cultivo en fase exponencial de cada cepa. Para ello se inocularon 10 ml de TSB con 200  $\mu\text{l}$  del cultivo o/n de la cepa correspondiente y se incubaron a  $37^{\circ}\text{C}$  y en agitación hasta obtener una  $\text{DO}_{600} \approx 0,1$  ( $6,4 \times 10^7$  UFC/ml).

Con la suspensión fágica Listex P100 se preparó una dilución 1:10, mezclando 100  $\mu\text{l}$  de la misma con 900  $\mu\text{l}$  de TSB. Seguidamente, en una placa microtiter se hicieron diluciones seriadas del producto fágico con el objeto de obtener concentraciones decrecientes del mismo. Estas diluciones se obtuvieron pipeteando en el primer pocillo 110  $\mu\text{l}$  de la dilución 1:10, de la que se transfieren 10  $\mu\text{l}$  al segundo pocillo, habiendo pipeteado previamente en él 100  $\mu\text{l}$  de TSB. Esta operación se repite hasta el décimo pocillo, obteniendo así 9 diluciones decrecientes del fago P100. Posteriormente, se añadieron 100  $\mu\text{l}$  del cultivo con una  $\text{DO}_{600} \approx 0,1$  a cada pocillo, del 1 al 10. Los pocillos 11 y 12 se utilizaron respectivamente como control negativo y positivo. Para ello, en el primero se añadieron 200  $\mu\text{l}$  de TSB y en el segundo 200  $\mu\text{l}$  del cultivo con una  $\text{DO}_{600} \approx 0,1$ . Este procedimiento se realiza por duplicado para cada cepa objeto de estudio.

### - 3.4.2. Cálculo de la multiplicidad de infección (MOI).

La determinación de la multiplicidad de infección (MOI, “multiplicity of infection”) se efectúa dividiendo el número de fagos (UFP) entre el número de bacterias (UFC), en un determinado volumen de mezcla de infección. La MOI determina el porcentaje de la población microbiana que es infectada por el fago al inicio de la mezcla de infección (Chávez-Peña y col., 2010)

### - 3.5. Generación y cuantificación de biofilms de *L. monocytogenes*.

#### - 3.5.1. Selección de la concentración celular óptima para la formación de un biofilm en placas de poliestireno.

Para calcular la concentración celular óptima que ha de tener el inóculo para la formación de un biofilm en placa microtiter, se partió de los cultivos puros o/n de cada cepa. En estos cultivos la concentración celular se sitúa en el rango de  $10^9$  UFC/ml, siendo necesario preparar diluciones seriadas cuya concentración fue  $10^8$  UFC/ml y  $10^7$  UFC/ml, que se utilizaron para contrastar el distinto grado de capacidad de formación de biofilm.

El procedimiento consistió primeramente en generar el biofilm para cada concentración de inóculo y cepa, que se realizará por triplicado, y posteriormente se cuantificó dicho biofilm. Las cepas se distribuyeron en filas y las concentraciones de inóculo en columnas. En cada pocillo se pipetearon consecutivamente 180  $\mu$ l de TSB + 0,25% glucosa, 20  $\mu$ l del cultivo o/n en las 3 primeras columnas, 20  $\mu$ l de la dilución 1:10 en las 3 siguientes, y 20  $\mu$ l de la dilución 1:100 en el siguiente grupo de 3 columnas. Establecemos así mismo unos pocillos “control” donde únicamente pipeteamos 200  $\mu$ l de TSB + 0,25% glucosa. La placa se incubó a 32°C durante 24 horas.

Como medida estimada de la formación del biofilm se utilizó la tinción con Cristal Violeta. Para ello, tras la incubación, se retiró el cultivo de los pocillos, permaneciendo el biofilm adherido a las paredes de los mismos. A continuación, se realizó el lavado del biofilm, a fin de eliminar el material biológico no adherido a las paredes del pocillo, para lo cual se añadieron 250  $\mu$ l de PBS (NaCl 37 mM, KCl 2.7

mM pH 7,3, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 10 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 2 mM) a cada pocillo y se retiró a continuación. Tras el procedimiento de lavado se dejó secar el biofilm a temperatura ambiente durante 10 minutos.

Para teñir el biofilm se añadieron a cada pocillo 250 µl de Cristal Violeta 0,1% (p/v), dejando la placa en reposo durante 15 minutos, tras los cuales se lavó el exceso con agua.

Por último, se destiñó cada pocillo mediante la adición de 200 µl de ácido acético 33% (v/v) y se mide la absorbancia a una DO<sub>595nm</sub> como medida indirecta de la formación de biofilm.

### **- 3.5.2. Seguimiento temporal del proceso de formación de biofilms sobre superficie de poliestireno.**

En la realización de este estudio el medio de cultivo fue el anteriormente seleccionado (TSB + 0,25% glucosa), el biofilm se desarrolló sobre la superficie interna de los pocillos de la placa de microtiter, tras incubación a 32°C y en condiciones aerobias.

Para llevar a cabo este estudio se sembró una placa de microtiter para cada tiempo de toma de datos, realizando un triplicado de cada cepa. De esta manera, en cada placa se sembraron 6 pocillos (3 de cada cepa), a los que se les añadió 180 µl del caldo de cultivo y 20 µl del cultivo en la concentración bacteriana establecida en experimentos previos. Como blanco, se utilizaron pocillos con el medio de cultivo sin inocular (TSB + 0,25% glucosa), que posteriormente fueron teñidos con Cristal Violeta siguiendo el mismo procedimiento que con las muestras, las cuales fueron incubadas previamente durante 6, 16, 24 y 48 h.

### **- 3.6. Tratamiento de biofilms de *L. monocytogenes* con Listex P100.**

#### **- 3.6.1. Determinación de la actuación del producto fágico mediante la técnica de tinción con Cristal Violeta.**

En primer lugar, se generaron los biofilms en las placas de poliestireno utilizando las condiciones óptimas descritas en el apartado anterior, y posteriormente se aplicaron los distintos tratamientos. Para la generación de biofilms, se incubaron las placas durante 48 horas y posteriormente, se extrajo con la micropipeta el medio de cultivo, permaneciendo los biofilms adheridos a la superficie interior del pocillo.

Los tratamientos se realizaron por triplicado. Como tratamiento control se añadieron 225 µl de SM, a fin de cuantificar la influencia del “lavado” del biofilm por el método mecánico de arrastre. En el resto de casos se añadieron 225µl de las distintas concentraciones de la suspensión fágica diluida en SM. En este experimento se utilizaron 4 diluciones seriadas de la solución fágica Listex P100 ( $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$  y  $10^{-5}$ ), conteniendo  $10^9$ ,  $10^8$ ,  $10^7$  y  $10^6$  UFP/ml, respectivamente.

Tras un periodo de incubación de 4 horas a 32°C, se procedió a la retirada del medio de tratamiento y posterior tinción de los restos del biofilm con Cristal Violeta, siguiendo el procedimiento anteriormente descrito y midiendo su DO a 595 nm.

El análisis estadístico de los resultados obtenidos se realizó mediante el programa estadístico PASW statistics (SPSS.18). La  $DO_{595}$  del biofilm de 48 h producido por las cepas *L. monocytogenes* 52 y S12 (biofilms control y tratados) fue sometida a un análisis de varianza (ANOVA unifactorial) en el se utilizó como factor el *tipo de tratamiento* con 6 categorías (control, tratado con SM, y con  $10^6$ ,  $10^7$ ,  $10^8$  y  $10^9$  UFP/ml de Listex P100). Para la comparación de medias se utilizó el test LSD (Diferencia Significativa Mínima) de Fisher ( $P < 0,05$ ).

#### **-3.6.2. Determinación de la actuación del producto fágico mediante la técnica del recuento de viables.**

Para la realización de este experimento se partió de biofilms generados sobre la misma superficie, en idéntico medio de cultivo y condiciones que en el anterior apartado (placa de microtiter de poliestireno, TSB + 0,25% glucosa y 48 h de incubación a 32°C

en aerobiosis). Tras la obtención del biofilm, se retiró el medio de los pocillos permaneciendo los biofilms adheridos a la superficie interior de los mismos. Posteriormente, se añadieron 225  $\mu$ l de SM (control tratamiento) y las diluciones de la suspensión fágica a unas concentraciones de  $10^8$ ,  $10^7$  y  $10^6$  UFP/ml). Como control adicional se utilizó un control sin tratamiento en el que se determinó el número de bacterias viables presentes en el biofilm tras 48 horas de incubación. Cada uno de los tratamientos se realizó por duplicado.

En todos los pocillos y tras los diferentes tratamientos se procedió a lavar con 250  $\mu$ l PBS los pocillos, a fin de eliminar los posibles restos de matriz disuelta y las células en suspensión no ancladas en la matriz polimérica del biofilm. Posteriormente, se analizó el contenido de bacterias viables de cada pocillo. Para ello, realizamos dos frotis sobre toda la superficie interna pocillo con un par de hisopos estériles, tras lo cual se introdujeron ambos hisopos en un tubo de ensayo conteniendo 9 ml de PBS, se agitaron durante un minuto en un agitador vortex, y se llevaron a cabo 4 diluciones seriadas.

En el caso del control sin tratamiento (biofilms de 48 horas) y el control con tratamiento (tratamiento con SM) se prepararon 4 diluciones sembrando en placas de TSA (2% agar) mediante el método de siembra en sábana las diluciones  $10^{-3}$  y  $10^{-4}$  respecto a la originada con los hisopos, para lo cual se extendieron 100  $\mu$ l de cada dilución en una placa mediante un asa de Digralsky.

En los tratamientos con las distintas concentraciones de fago se seleccionaron para recuento de viables aquellos pocillos en los que había una disminución significativa de la absorbancia respecto al control, y se prepararon diluciones seriadas para la posterior siembra en placa. Tras 24 horas de incubación a 32°C se procedió al recuento de viables (UFC/ml). Teniendo en cuenta que el biofilm formado en cada pocillo es disuelto en 9 ml de PBS, el recuento de viables por pocillo se obtendría multiplicando las UFC/ml obtenidas por 9.



# **RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

## 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### - 4.1. Determinación de la sensibilidad o resistencia de las distintas cepas de *L. monocytogenes* al producto fágico Listex P100.

Con objeto de evaluar la eficacia del producto Listex P100 como posible agente de biocontrol de *L. monocytogenes* en la industria alimentaria, procedimos a evaluar la capacidad antimicrobiana de dicho producto frente a una pequeña colección de cepas de *L. monocytogenes* que habían sido aisladas del entorno alimentario. La colección estaba formada por 11 cepas de *L. monocytogenes* (Tabla 5), de las cuales 6 habían sido aisladas de quesos asturianos y 5 de productos cárnicos.

Para llevar a cabo este ensayo se utilizó el protocolo denominado test del “spot” o “gota” con cultivos o/n de las 11 cepas. Estos cultivos se enfrentaron a 5 µl de la suspensión fágica Listex P100, y tras 24 horas de incubación a 32°C, se observó la presencia o ausencia de zonas de lisis. La presencia de zonas claras o de lisis indica sensibilidad de las células a la infección por el fago P100, componente principal del producto comercial Listex P100. La ausencia de zonas claras indica que las bacterias se han desarrollado en presencia de dicho fago y, por lo tanto, son resistentes a la infección por el mismo.

**Tabla 5- Sensibilidad/Resistencia de las cepas bacterianas al producto Listex P100 mediante protocolo del “spot”.**

| Cepa                             | Origen             | Listex P100 |
|----------------------------------|--------------------|-------------|
| <i>L. monocytogenes</i> 1        | Quesos asturianos  | S           |
| <i>L. monocytogenes</i> 2        | Quesos asturianos  | S           |
| <i>L. monocytogenes</i> 3        | Quesos asturianos  | S           |
| <i>L. monocytogenes</i> 22       | Quesos asturianos  | S           |
| <i>L. monocytogenes</i> 37       | Quesos asturianos  | S           |
| <i>L. monocytogenes</i> 41       | Quesos asturianos  | S           |
| <i>L. monocytogenes</i> 52       | Productos cárnicos | S           |
| <i>L. monocytogenes</i> 54-2     | Productos cárnicos | S           |
| <i>L. monocytogenes</i> 57-2     | Productos cárnicos | S           |
| <i>L. monocytogenes</i> INIA2530 | Productos cárnicos | S           |
| <i>L. monocytogenes</i> S12      | Productos cárnicos | S           |

En todos las placas se observó una zona de lisis en la posición en la que se había depositado la gota de la suspensión fágica (Tabla 5); por lo tanto, todas las cepas ensayadas son sensibles a la infección por el bacteriófago P100 presente en la solución comercial Listex P100.

Los resultados obtenidos concuerdan con los previamente descritos por Soni y Nannapaneni (2010) en los que se ensayaron 21 cepas diferentes *L. monocytogenes*, representantes de sus 13 serotipos, frente al fago P100 de la solución comercial fágica Listex P100, observando que los 21 aislamientos bacterianos fueron sensibles a la infección por el fago.

**- 4.2. Cálculo del título de la suspensión fágica Listex P100 y eficiencia de plaqueo para la distintas cepas de *L. monocytogenes*.**

Una vez que habíamos determinado que todas las cepas de *L. monocytogenes* eran sensibles a Listex P100, nos planteamos conocer si el grado de sensibilidad era el mismo para todas ellas, o si por el contrario, algunas serían más resistentes y, por ello, iban a requerir del uso de mayor cantidad de producto para su eliminación. Inicialmente, determinamos la concentración de fagos real en la suspensión comercial, ya que es posible que el título fágico haya variado con el transporte o almacenamiento de dicho producto. Además, necesitamos evaluar la capacidad del fago P100 para formar placas de lisis en las distintas cepas de la colección, la cual podría ser distinta a la que presente el fago sobre la cepa usada como huésped por la casa comercial. Para ello, una vez realizadas diluciones del producto se plaquearon sobre las distintas cepas por el método de la doble placa y se realizó un recuento del número de placas de lisis. Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 6.

**Tabla 6- Título de la suspensión fágica sobre las distintas cepas de *L. monocytogenes* ensayadas.**

| Cepa                             | Nº Placas de lisis | Dilución | Título (UFP/ml)      |
|----------------------------------|--------------------|----------|----------------------|
| <i>L. monocytogenes</i> 52       | 100                | -8       | $1 \times 10^{11}$   |
| <i>L. monocytogenes</i> 54-2     | 71                 | -8       | $7,1 \times 10^{10}$ |
| <i>L. monocytogenes</i> 57-2     | PL enanas          | -        | -                    |
| <i>L. monocytogenes</i> INIA2530 | 56                 | -8       | $5,6 \times 10^{10}$ |
| <i>L. monocytogenes</i> S12      | 29                 | -7       | $2,9 \times 10^9$    |

Se observó que el título de Listex P100 sobre las distintas cepas variaba en un rango entre  $10^9$  y  $10^{11}$  UFP/ml, estando siempre por debajo del título teórico del producto tras su fabricación ( $2 \times 10^{11}$  UFP/ml). Una vez determinados los valores del título sobre nuestra colección de cepas, establecimos como cepa control la cepa más sensible al fago, es decir, *L. monocytogenes* 52. Tomando dicha cepa como referencia, los valores de la eficiencia de plaqueo (EOP) del resto de las cepas se muestran en la Tabla 7. El grado de sensibilidad al producto es bastante variable entre cepas, ya que por ejemplo la cepa *L. monocytogenes* S12 es 100 veces más resistente que la cepa control *L. monocytogenes* 52. Por otro lado, las cepas *L. monocytogenes* 54-2 y *L. monocytogenes* INIA2530 tienen una sensibilidad semejante, aunque algo inferior al control.

**Tabla 7-** Eficiencia de plaqueo de la suspensión fágica sobre las distintas cepas de *L. monocytogenes* ensayadas.

| Cepa                             | Eficiencia de plaqueo |
|----------------------------------|-----------------------|
| <i>L. monocytogenes</i> 52       | 1                     |
| <i>L. monocytogenes</i> 54-2     | $7,1 \times 10^{-1}$  |
| <i>L. monocytogenes</i> 57-2     | -                     |
| <i>L. monocytogenes</i> INIA2530 | $5,6 \times 10^{-1}$  |
| <i>L. monocytogenes</i> S12      | $2,9 \times 10^{-2}$  |

Cabe señalar también que no fue posible determinar la eficiencia de plaqueo del bacteriófago P100 sobre las cepas aisladas de origen lácteo ni sobre la cepa *L. monocytogenes* 57-2, al no haberse obtenido placas de lisis aisladas en el caso del primer grupo, y por ser éstas de pequeñísimo tamaño en el caso de la cepa *L. monocytogenes* 57-2. El hecho de no dar lugar a placas de lisis aisladas, a pesar de que habían mostrado sensibilidad por el método de la gota, podría explicarse por la denominada “lisis desde afuera”, que ocurre cuando un alto número de fagos infectan al

mismo tiempo a una célula, dando lugar a la lisis de la misma sin que haya una infección real (Moak y Molineux, 2004; Rodríguez-Rubio y col., 2012).

En relación a estos resultados es importante señalar la formación de placas de lisis de distintos tamaños. En estudios previos se observó la formación de placas de lisis de diámetros comprendidos entre 3 y 4 mm para todas cepas (21 en total) ensayadas frente al fago P100 en medio sólido, a excepción de las cepas F4260 (serotipo 1/2b) y SLCC 2482 (serotipo 7) sobre las que produjo placas considerablemente más pequeñas (0,2 - 0,4 mm) (Soni y Nannapaneni, 2010). Es precisamente este pequeño tamaño, unido a la parcial turbidez de las mismas, lo que posiblemente impidiese su identificación y recuento en algunas de las cepas ensayadas en este trabajo.

#### **- 4.3. Determinación de la concentración inhibitoria mínima (MIC) del producto Listex P100.**

Con objeto de confirmar de manera experimental que la sensibilidad de las cepas es variable, procedimos a determinar la concentración inhibitoria mínima (MIC) del producto Listex P100 mediante el ensayo clásico para antimicrobianos. La MIC corresponde a la menor concentración de fagos capaz de inhibir el crecimiento planctónico de las distintas cepas de *L. monocytogenes* en medio líquido. Para ello, se hicieron diluciones seriadas de concentración decreciente del producto fágico (desde  $5 \times 10^9$  UFP /ml hasta 2,09 UFP/ml) (Tabla 8) y por duplicado en una placa microtiter, y se enfrentaron con cada cepa de *L. monocytogenes* en fase exponencial temprana ( $DO_{600} \approx 0,1$ ) (Tabla 9). Tras la incubación a 32°C, durante 24 horas, la dilución de menor concentración de fagos en la que no se produjo crecimiento microbiano proporciona el valor de la MIC (UFP/ml)

Asimismo, determinamos en este punto la concentración bacteriana en el cultivo al principio de la fase exponencial, tomando como modelo la cepa *L. monocytogenes* INIA2530. Mediante diluciones seriadas y recuento de viables, determinamos que una  $DO_{600} = 0,092$  es equivalente a una concentración bacteriana aproximada de  $6,4 \times 10^7$  UFC/ml.

**Tabla 8-** Concentración fágica en cada pocillo de la placa microtiter para la determinación de la MIC. Se ha tomado como concentración inicial del producto el título obtenido sobre la cepa *L. monocytogenes* 52 ( $10^{11}$  UFP /ml).

| Pocillo   | 1               | 2                  | 3                  | 4                  | 5                  | 6                  | 7                  | 8                  | 9               | 10   |
|-----------|-----------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|-----------------|------|
| (UFP /ml) | $5 \times 10^9$ | $4,55 \times 10^8$ | $4,13 \times 10^7$ | $3,75 \times 10^6$ | $3,41 \times 10^5$ | $3,11 \times 10^4$ | $2,82 \times 10^3$ | $2,56 \times 10^2$ | $2,3 \times 10$ | 2,09 |

Los resultados del cálculo de la MIC se presentan en la Tabla 9.

**Tabla 9-** Determinación de la MIC del producto fágico Listex P100 para las distintas cepas de *L. monocytogenes*.

| Cepa                             | DO <sub>600</sub> | Último pocillo sin crecimiento | MIC (UFP/ml)                            |
|----------------------------------|-------------------|--------------------------------|---|
| <i>L. monocytogenes</i> 1        | 0,105             | 2-3                            | $4,13 \times 10^7$ - $4,55 \times 10^8$ |
| <i>L. monocytogenes</i> 2        | 0,095             | 2                              | $4,55 \times 10^8$                      |
| <i>L. monocytogenes</i> 3        | 0,095             | 2                              | $4,55 \times 10^8$                      |
| <i>L. monocytogenes</i> 22       | 0,099             | 5                              | $3,41 \times 10^5$                      |
| <i>L. monocytogenes</i> 37       | 0,103             | 2-3                            | $4,13 \times 10^7$ - $4,55 \times 10^8$ |
| <i>L. monocytogenes</i> 41       | 0,098             | 5                              | $3,41 \times 10^5$                      |
| <i>L. monocytogenes</i> 52       | 0,109             | 7                              | $2,82 \times 10^3$                      |
| <i>L. monocytogenes</i> 54-2     | 0,106             | 5                              | $3,41 \times 10^5$                      |
| <i>L. monocytogenes</i> 57-2     | 0,098             | 2-3                            | $4,13 \times 10^7$ - $4,55 \times 10^8$ |
| <i>L. monocytogenes</i> INIA2530 | 0,108             | 6                              | $3,11 \times 10^4$                      |
| <i>L. monocytogenes</i> S12      | 0,108             | 4                              | $3,75 \times 10^6$                      |

Se observó que los valores de MIC oscilaban entre  $4,55 \times 10^8$  UFP/ml para las cepas *L. monocytogenes* 2 y 3, y  $2,82 \times 10^3$  UFP/ml para *L. monocytogenes* 52, que resultó ser la cepa más sensible al producto en este ensayo.

La comparación de los resultados de sensibilidad a la infección por el fago de las distintas cepas de *L. monocytogenes*, mediante su eficiencia de plaqueo y la MIC es acorde a lo esperado. Es decir, las cepas en las que el fago presenta una mayor eficiencia de plaqueo, son aquellas que presentan asimismo una menor MIC. Estos datos sitúan a la cepa *L. monocytogenes* 52 como la más propicia de las estudiadas para ser infectada por el bacteriófago P100, y por lo tanto, la más sensible al producto Listex P100, seguida de las cepas *L. monocytogenes* 54-2, *L. monocytogenes* INIA2530 y *L. monocytogenes* S12. Por el contrario, las cepas más resistentes al producto resultaron ser las cepas *L. monocytogenes* 1, 2, 3, 37 y 57-2, ya que la MIC fue  $10^5$  veces superior, mostrando relación con no haberse podido determinar el título de la suspensión fágica ni su eficiencia de plaqueo sobre estas mismas cepas. Por otra parte, no se ha observado una correlación entre sensibilidad/resistencia al producto y origen de las cepas, ya que dentro de las aisladas de carne por ejemplo, tenemos distintos grados de sensibilidad.

Una vez determinada la concentración de fagos efectiva para inhibir el crecimiento de cada una de las cepas (Tabla 9), y dado que conocemos de modo aproximado el número de bacterias en cada uno de los pocillos, podemos estimar la multiplicidad de infección (MOI) que resultó eficaz para inhibir el crecimiento de dichos cultivos (Tabla 10).



**Tabla 10-** Multiplicidad de infección efectiva para inhibir el crecimiento para las distintas cepas de *L. monocytogenes*.

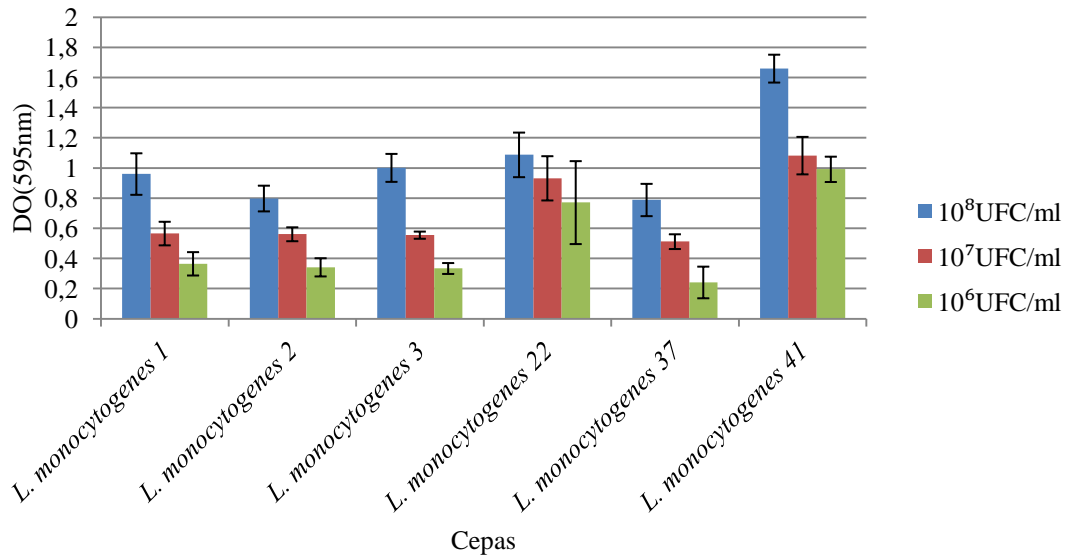
| Cepa                             | Nº células (UFC/ml) | Nº fagos (UFP/ml)  | MOI                   |
|----------------------------------|---------------------|--------------------|-----------------------|
| <i>L. monocytogenes</i> 1        | $6,4 \times 10^7$   | $2,48 \times 10^8$ | 3,88                  |
| <i>L. monocytogenes</i> 2        | $6,4 \times 10^7$   | $4,55 \times 10^8$ | 7,11                  |
| <i>L. monocytogenes</i> 3        | $6,4 \times 10^7$   | $4,55 \times 10^8$ | 7,11                  |
| <i>L. monocytogenes</i> 22       | $6,4 \times 10^7$   | $3,41 \times 10^5$ | $5,33 \times 10^{-3}$ |
| <i>L. monocytogenes</i> 37       | $6,4 \times 10^7$   | $2,48 \times 10^8$ | 3,88                  |
| <i>L. monocytogenes</i> 41       | $6,4 \times 10^7$   | $3,4 \times 10^5$  | $5,33 \times 10^{-3}$ |
| <i>L. monocytogenes</i> 52       | $6,4 \times 10^7$   | $2,82 \times 10^3$ | $4,41 \times 10^{-5}$ |
| <i>L. monocytogenes</i> 54-2     | $6,4 \times 10^7$   | $3,41 \times 10^5$ | $5,33 \times 10^{-3}$ |
| <i>L. monocytogenes</i> 57-2     | $6,4 \times 10^7$   | $2,48 \times 10^8$ | 3,88                  |
| <i>L. monocytogenes</i> INIA2530 | $6,4 \times 10^7$   | $3,11 \times 10^4$ | $4,86 \times 10^{-4}$ |
| <i>L. monocytogenes</i> S12      | $6,4 \times 10^7$   | $3,75 \times 10^6$ | $5,86 \times 10^{-2}$ |

Se observó una gran variación en la MOI necesaria para la inhibición del crecimiento de cada cepa ( $7,11 - 4,41 \times 10^{-5}$ ), lo que confirmaba que la sensibilidad de las cepas es muy diferente. Este hecho nos permite prever que la aplicación del producto para la eliminación de la bacteria precisará una concentración tal, que garantice la eliminación de todas las cepas y, por lo tanto, dicha concentración ha de fijarse como la efectiva contra la cepa más resistente.

#### **- 4.4. Capacidad de formación de biofilms de cepas de *L. monocytogenes* sobre superficies abióticas**

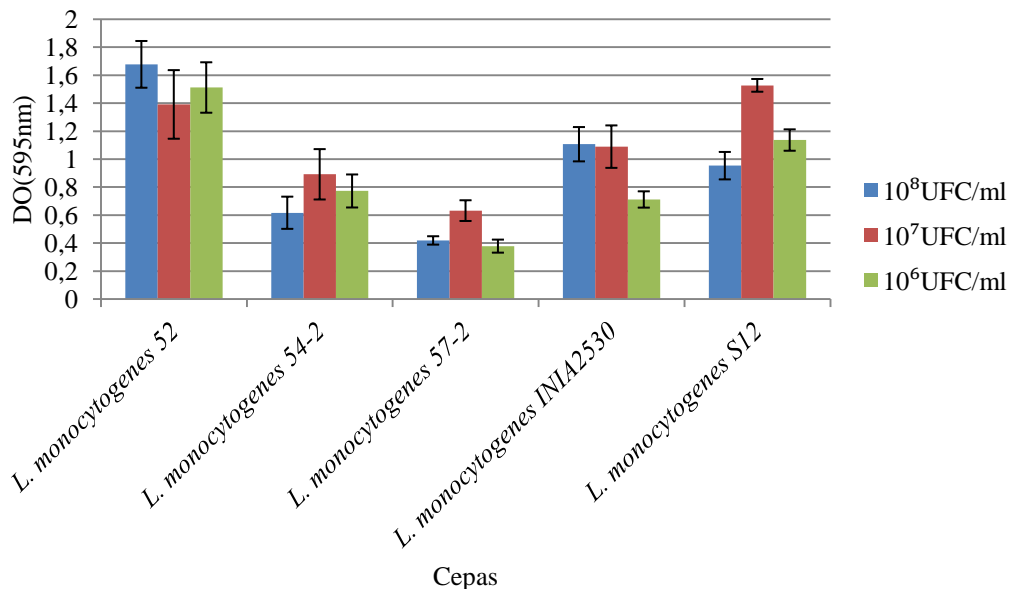
##### **- 4.4.1. Selección de las cepas con mayor capacidad de formación de biofilm.**

La capacidad de formación de biofilms sobre superficies abióticas es una de las principales características de *L. monocytogenes*, lo que le confiere la propiedad de adherirse sobre superficies de la industria alimentaria. Por otro lado, estos biofilms confieren a las bacterias una protección adicional frente a antimicrobianos y desinfectantes, lo que las hace persistentes en determinados ambientes (Mah y O'Toole, 2001). Por lo tanto, la evaluación de la eficacia del producto Listex P100 como desinfectante para la industria alimentaria ha de realizarse preferentemente frente a biofilms de la bacteria que frente a bacterias en cultivo planctónico. Inicialmente, es preciso determinar si las cepas aisladas de la industria cárnica poseían la capacidad de formar biofilms. Para ello, se procedió a determinar en el laboratorio sobre una superficie de poliestireno la cantidad de biomasa total (material extracelular más bacterias adheridas) que son capaces de generar a partir de distintas concentraciones de inóculo ( $10^8$ ,  $10^7$  y  $10^6$  UFC/ml), la cual se cuantificó mediante tinción con Cristal Violeta. Los resultados obtenidos en este ensayo se muestran en la Figuras 4 y 5. Los inóculos de  $10^8$ UFC/ml dieron lugar a un biofilm más compacto tras 24 h de incubación en las cepas de origen lácteo, lo que se corresponde con valores más elevados de biomasa total y, consecuentemente, de  $DO_{595}$  (Fig. 4).



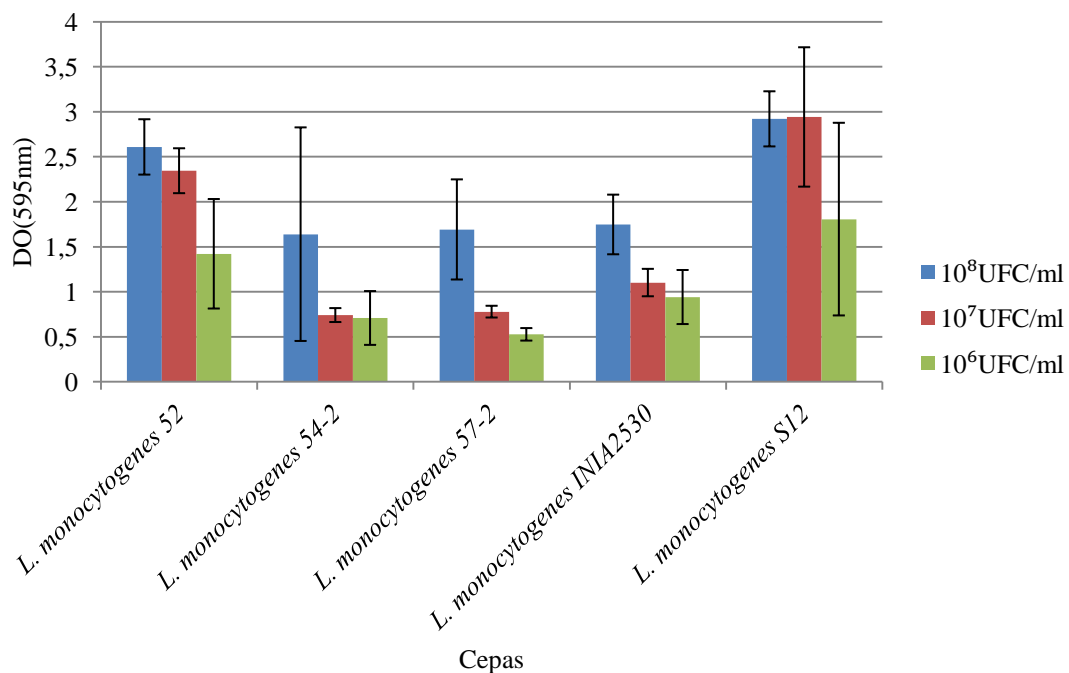
**Figura 4-** Biomasa total de biofilm de  $\pm 24$  horas, expresada como  $DO_{595}$ , desarrollados por las distintas cepas de *L. monocytogenes* de origen lácteo, a partir de distintos inóculos ( $10^8$ ,  $10^7$  y  $10^6$  UFC/ml). Los datos son medias  $\pm$  desviaciones standard de 18 experimentos independientes, cada uno llevado a cabo en triplicado.

Por el contrario, las cepas de *L. monocytogenes* aisladas de productos cárnicos dieron lugar a biofilms que, tras 24 horas de incubación, no presentan una relación entre cantidad de biomasa final y concentración de inóculo (Fig. 5).



**Figura 5-** Biomasa total de biofilms de  $\pm 24$  horas, expresada como  $DO_{595}$ , desarrollados por distintas cepas de *L. monocytogenes* de origen cárnico, a partir de distintos inóculos ( $10^8$ ,  $10^7$  y  $10^6$  UFC/ml). Los datos son medias  $\pm$  desviaciones standard de 15 experimentos independientes, cada uno llevado a cabo en triplicado.

Sin embargo, entre este segundo grupo de cepas puede intuirse que las dos mejores cepas formadoras de biofilm son *L. monocytogenes* 52 y S12, es posible que para este grupo de cepas los biofilms no hayan alcanzado aún un estado de desarrollo representativo de un biofilm maduro. Por ello, se procedió a obtener biofilms durante un periodo más largo de incubación (48 horas), tras el cual se cuantificó la biomasa mediante tinción con Cristal Violeta. Los resultados obtenidos confirmaron un mayor grado de desarrollo en los biofilms de 48 h, a juzgar por los mayores valores de DO (Figura 6). A la vista de estos resultados, se identifican las cepas *L. monocytogenes* 52 y *L. monocytogenes* S12 como las mejor formadoras de biofilm del conjunto de cepas analizado, a partir de inóculos de  $10^8$  y  $10^7$  UFC/ml, respectivamente. Por lo tanto, procedimos a seleccionar estas cepas para utilizarlas como modelo de laboratorio en los posteriores ensayos de eliminación de biofilms mediante el producto Listex P100.



**Figura 6-** Biomasa total de biofilms de  $\pm 48$  horas, expresada como  $DO_{595}$  desarrollados por distintas cepas de *L. monocytogenes* de origen cárnico a partir de distintos inóculos ( $10^8$ ,  $10^7$  y  $10^6$  UFC/ml). Los datos son medias  $\pm$  desviaciones standard de 15 experimentos independientes, cada uno llevado a cabo en triplicado.

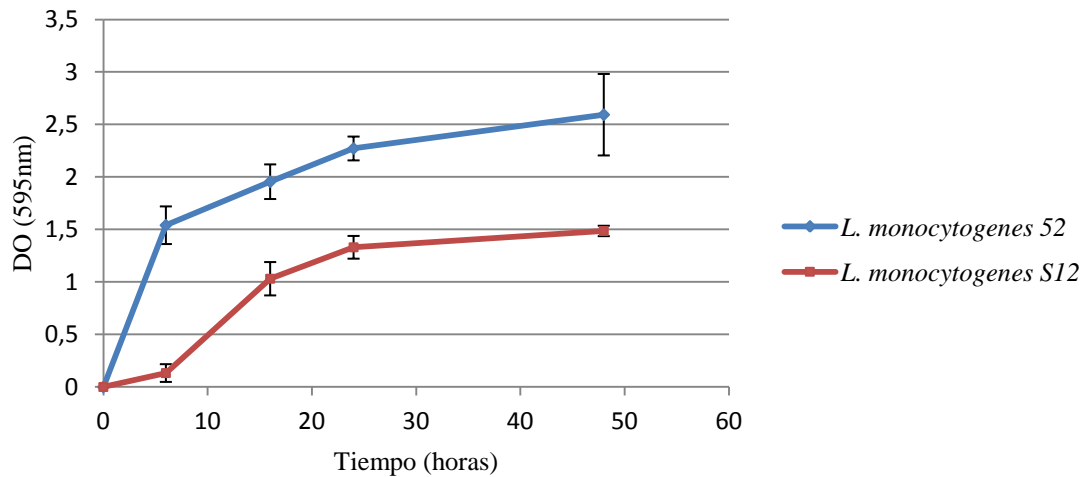
Estos resultados son acordes a los descritos previamente por Norwood y Gilmour (2001), quienes pusieron de manifiesto que la capacidad para la formación de biofilms es un proceso multifactorial, en el que interviene la forma de crecimiento de las propias cepas formadoras del mismo, además de otros factores entre los que destacan el

tipo de material o tratamiento de la superficie seleccionada, las posibles interacciones entre microorganismos, las condiciones ambientales, el pH y la temperatura.

#### **- 4.4.2. Seguimiento temporal del proceso de formación de biofilms sobre una superficie abiótica.**

El desarrollo de un biofilm es un proceso complejo que implica varias etapas de desarrollo, desde la fase de adherencia a la superficie hasta el estado de biofilm maduro y de dispersión (Nikolaev y Plakunov, 2007). Para un mejor conocimiento del proceso de desarrollo de biofilms generados por las cepas *L. monocytogenes* 52 y S12, se procedió a realizar una cuantificación a distintos tiempos de incubación de la biomasa total generada.

Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 7, en la que se observa que *L. monocytogenes* S12 tiene una fase de adherencia más larga, ya que tarda 6 horas en empezar la fase exponencial. Por su lado *L. monocytogenes* 52, alcanza la fase exponencial tardía en ese mismo tiempo. La fase de crecimiento exponencial en las dos cepas, termina a las 24 horas en la que se alcanzan los valores máximos de OD siendo de  $2,3 \pm 0,1$  para *L. monocytogenes* 52 y de  $1,3 \pm 0,1$  para *L. monocytogenes* S12. En ambos casos, estos valores se consideraron indicativos de biofilm maduro, ya que es cuando comienza la fase estacionaria y se estabiliza, no obteniéndose diferencias estadísticamente significativas a las 48 horas ( $P > 0.05$ ). Asimismo, los valores obtenidos para cada una de las cepas fueron muy diferentes a lo largo de todo el proceso, mostrando mayor capacidad de desarrollo del biofilm la cepa *L. monocytogenes* 52 que alcanza valores de DO tras 48 horas de incubación de  $2,6 \pm 0,4$ , mientras que la cepa S12 muestra valores de  $1,5 \pm 0,1$ .



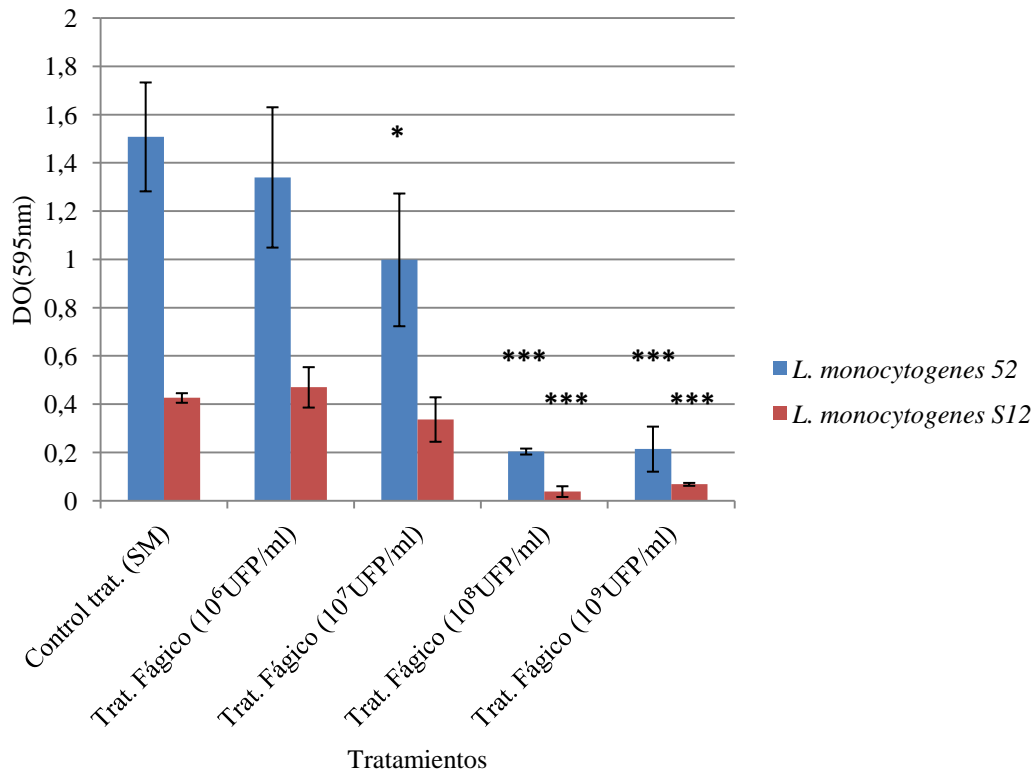
**Figura 7-** Evolución de la formación de biofilm a lo largo del período de incubación. Los datos son medias  $\pm$  desviaciones standard de 4 experimentos independientes, cada uno llevado a cabo en triplicado.

En vista de los resultados obtenidos, y de experimentos que se han llevado a cabo por otros grupos de investigación con fines similares (Soni y Nannapaneni, 2010), se utilizarán biofilms maduros de 48 h de incubación, para evaluar la efectividad del producto fágico Listex P100 con el fin de eliminar biofilms.

#### - 4.5. Tratamiento de biofilms de *L. monocytogenes* con Listex P100.

##### - 4.5.1. Evaluación de la eficacia del producto fágico mediante cuantificación de la biomasa total.

El objetivo de este ensayo es conocer la concentración necesaria de producto que debe aplicarse a los biofilms para que se produzca la mayor reducción de biomasa total (cuantificada mediante tinción con Cristal Violeta), en relación con la disminución de la misma que produce el efecto mecánico del lavado. Para ello, se obtuvieron biofilms de 48 horas, que se trataron durante 4 horas a 32°C con diferentes concentraciones del producto fágico Listex P100. Como control de lavado se utilizaron pocillos tratados con tampón SM, en las mismas condiciones que aquellos tratados con el producto fágico. Los resultados obtenidos tras el tratamiento y posterior tinción se muestran en la Figura 8.



**Figura 8-** Biomasa media total en biofilm de 48 horas, expresada como DO<sub>595</sub>, tras distintos tratamientos con Listex P100 (10<sup>6</sup>, 10<sup>7</sup>, 10<sup>8</sup> y 10<sup>9</sup> UFP/ml). El control de lavado ha sido tratado con tampón SM. Los datos son medias  $\pm$  desviaciones standard de 10 experimentos independientes, cada uno llevado a cabo en triplicado. Los datos marcados con asterisco (\*) son estadísticamente significativos comparados con el control de tratamiento (\* P < 0,05; \*\* P < 0,01; \*\*\* P < 0,001).

El tratamiento de los biofilms de 48 h desarrollados por las cepas *L. monocytogenes* 52 y S12 con la suspensión fágica dio lugar a diferencias de DO<sub>595</sub>, en muchos casos significativas, respecto a los biofilms control del tratamiento, no sometidos a la acción de Listex P100. También se observaron diferencias significativas entre los distintos tratamientos.

En ambas cepas, todos los tratamientos (incluso el tratamiento control con SM) provocaron descensos significativos ( $P < 0,001$ ) de la DO<sub>595</sub> respecto al control sin tratamiento.

En la cepa 52 se observaron claras diferencias de DO<sub>595</sub> tras el lavado con SM y los tratamientos con 10<sup>7</sup> ( $P < 0,05$ ) y 10<sup>8</sup> y 10<sup>9</sup> UFP/ml de Listex P100 ( $P < 0,001$ ), mientras que la diferencia con el tratamiento con 10<sup>6</sup> es pequeña ( $P > 0,05$ ). Tampoco se observaron diferencias significativas entre las reducciones de DO provocadas por los tratamientos con 10<sup>6</sup> y 10<sup>7</sup> UFP/ml ( $P > 0,05$ ). Sin embargo, los tratamientos más

intensos ( $10^8$  y  $10^9$  UFP/ml) provocaron reducciones de la  $DO_{595}$  similares ( $P > 0,05$ ) y mucho más acusadas que los demás tratamientos ( $P < 0,001$ ).

Los biofilms desarrollados por la cepa S12 mostraron diferente sensibilidad a los tratamientos que la cepa 52. Así, en la cepa S12 no se detectaron diferencias significativas entre las  $DO_{595}$  observadas tras el lavado con SM y los tratamientos con  $10^6$  y  $10^7$  UFP/ml de Listex P100 ( $P > 0,05$ ). Los tratamientos con  $10^8$  y  $10^9$  UFP/ml de Listex P100 dieron a una reducción similar de la  $DO_{595}$  de los biofilms ( $P > 0,05$ ) pero significativamente distintas al resto de los tratamientos ( $P < 0,001$ ).

A la vista de estos resultados podemos determinar que el tratamiento con menor concentración que produce los resultados de eliminación de biofilm estadísticamente más significativos en ambas cepas es el tratamiento con  $10^8$  UFP/ml. Este tratamiento produce sobre los biofilms una reducción de la biomasa total medida como  $DO_{595}$  del  $90\% \pm 20\%$  en la cepa 52 y de  $90\% \pm 10\%$  en la cepa S12, respecto al control tratado con SM.

Por lo tanto, una vez determinada que la concentración más efectiva en la eliminación de biomasa total es  $10^8$  UFP/ml se procedió a confirmar este dato mediante la determinación del número de viables de las cepas *L. monocytogenes* 52 y S12, tras el tratamiento. Estos resultados guardan relación con los obtenidos por Soni y Nannapaneni (2010), quienes mostraron diferencias significativas ( $P < 0,05$ ) entre la DO obtenida tras la tinción con Cristal Violeta de biofilms de 21 cepas de *L. monocytogenes* y la obtenida en los mismos biofilms tras 24 horas de incubación en presencia de la solución fágica Listex P100 a una concentración aproximada de  $10^{11}$  UFP/ml.

#### **- 4.5.2. Evaluación de la eficacia del producto fágico Listex P100 mediante la técnica del recuento de viables.**

El objetivo de este ensayo es confirmar la eficacia del producto en lo que se refiere no solo a eliminación de la matriz extracelular del biofilm, sino también a la reducción o erradicación de células vivas.

El experimento se realizó de manera semejante a lo indicado en el apartado 3.7.1, generando biofilms de 48 horas con las cepas *L. monocytogenes* 52 y S12. Tras



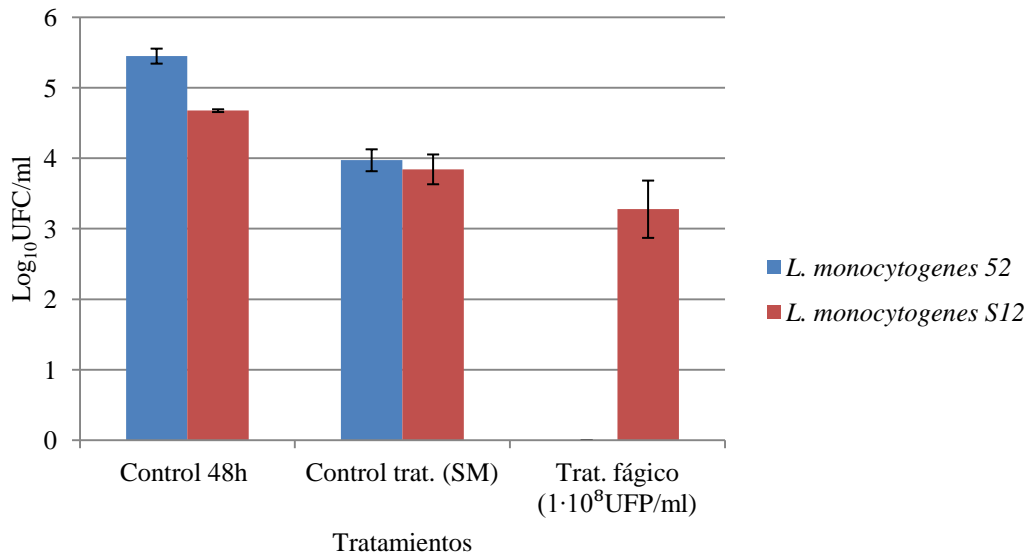
este proceso, se dividieron los biofilms generados por cada cepa en 3 grupos que siguen un tratamiento distinto: En un primer grupo (I) se procedió a realizar el conteo de viables en los biofilms maduros sin ningún tipo de tratamiento; el segundo grupo (II) fue sometido al tratamiento con la suspensión fágica en una concentración  $1 \times 10^8$  UFP/ml e incubado durante 4 horas, y en el último grupo (III) (control) se cuantificó la disminución de viables que produjo el tratamiento mecánico de arrastre o lavado, para lo cual se trató con tampón SM durante 4 horas.

Los resultados de los recuentos se expresaron en UFC/ml y se muestran en la Tabla 11, y el descenso en el número de viables después de los distintos tratamientos se muestra en la Figura 9.

**Tabla 11-** Número de viables (UFC/ml) en biofilms de 48 horas, tratados con Listex P100 ( $10^8$  UFP/ml) y con SM durante 4 horas a 32°C.

| Cepa                        | Control (biofilm 48 h) (I) | Tratamiento con suspensión fágica (II) | Control de lavado (tratamiento con SM) (III) |
|-----------------------------|----------------------------|--|--|
| <i>L. monocytogenes</i> 52  | $3,35 \times 10^5$         | <10                                    | $7,3 \times 10^3$                            |
|                             | $2,37 \times 10^5$         | <10                                    | $1,21 \times 10^4$                           |
| <i>L. monocytogenes</i> S12 | $4,6 \times 10^4$          | $3,68 \times 10^3$                     | $9,85 \times 10^3$                           |
|                             | $4,9 \times 10^4$          | $9,8 \times 10^2$                      | $4,95 \times 10^3$                           |

Los datos del número de viables en los biofilm sin tratar son acordes a los obtenidos con Cristal Violeta, ya que observamos cómo la cepa *L. monocytogenes* 52 muestra valores de  $DO_{595}$  superiores a la cepa *L. monocytogenes* S12 (Figura 7). Por otro lado, observamos que el tratamiento de los pocillos tratados con SM produce un efecto de lavado que reduce el número de células viables en  $1,4 \pm 0,2 \log_{10}$  UFC/ml en el caso de la cepa *L. monocytogenes* 52, y  $0,9 \pm 0,2 \log_{10}$  UFC/ml en la cepa S12 (Figura 9).



**Figura 9-** Efecto del lavado y eficacia de la solución Fágica Listex P100 ( $10^8$  UFP/ml), tras 4 horas de incubación, en la reducción del número de viables en biofilms de 48 horas de *L. monocytogenes* 52 y *L. monocytogenes* S12. Los datos son medias  $\pm$  desviaciones standard de 6 experimentos independientes, cada uno llevado a cabo en triplicado.

En cuanto al tratamiento con el producto fágico (Figura 9) observamos cómo en la cepa bacteriana *L. monocytogenes* 52, tras las 4 horas de tratamiento, se produjo una acusada reducción en la viabilidad celular que no hizo posible el recuento de viables (reducción de  $5,4 \pm 0,1 \log_{10}$ UFC/ml respecto al nivel antes del tratamiento), mientras que en la cepa *L. monocytogenes* S12 se detectaron  $10^3$  UFC/ml (reducción de  $1,4 \pm 0,4 \log_{10}$ UFC/ml). Para determinar la actividad listericida real del tratamiento fágico, es decir, cuantificar la reducción en la concentración celular en los biofilms debida a la infección por parte del fago P100, procedemos a descontar la reducción en la concentración celular correspondiente al proceso mecánico de lavado del biofilm (cuantificada con el tratamiento control con SM) de la reducción obtenida por el tratamiento fágico a concentración  $10^8$  UFP/ml. Así, para la cepa *L. monocytogenes* 52 se obtiene una reducción real de  $3,9 \pm 0,1 \log_{10}$  UFC/ml respecto a su carga inicial de  $5,4 \pm 0,1 \log_{10}$  UFC/ml, mientras para la cepa *L. monocytogenes* S12 la reducción listericida real no fue significativa respecto a la producida por el efecto mecánico de lavado.

Los resultados muestran una clara diferencia entre ambas cepas con respecto a su sensibilidad al producto fágico, así mientras en la cepa *L. monocytogenes* 52 se produce una importante reducción en el número de viables con el tratamiento fágico

respecto al tratamiento control, esta diferencia no es significativa para la cepa *L. monocytogenes* S12. Este resultado guarda relación con la diferente eficiencia de plaqueo de ambas cepas, ya que es 100 veces superior para la cepa 52 que para la cepa S12 ( $2,9 \times 10^{-2}$  versus 1) (Tabla 7). También apoya este resultado su diferente MIC para el producto Listex P100, que es del orden de 1.000 veces superior para la cepa *L. monocytogenes* S12 ( $3,75 \times 10^6$  UFP/ml) que para la cepa *L. monocytogenes* 52 ( $2,82 \times 10^3$  UFP/ml) (Tabla 9).

Sin embargo, merece la pena destacar que el grado de sensibilidad de estas cepas al producto Listex P100 no se corresponde con la resistencia al mismo que se podría deducir de la cantidad de biofilm formado por cada una de ellas. Así, la cepa *L. monocytogenes* 52 tiene una mayor capacidad de formación de biofilm (valores de 2,6 de DO) mientras que la cepa *L. monocytogenes* S12, más resistente al producto, formaba un biofilm menos compacto (valores de 1,5 de DO) (Figura 7).

Los resultados obtenidos sobre biofilms formados por la cepa *L. monocytogenes* 52 concuerdan con el descenso en el número de viables observado previamente tras la utilización de Listex P100 para combatir *L. monocytogenes* en filete de salmón crudo (Soni y Nannapaneni, 2010) y en filete fresco de bagre (Soni y col., 2010). En estos estudios se determinó la influencia de la dosis de bacteriófago P100 en la reducción en las concentraciones de *L. monocytogenes*. Asimismo, se observó que la descontaminación de *L. monocytogenes* mediante la utilización del bacteriófago P100 ( $10^8$  UFP/g) dio lugar a unas reducciones de 1,8; 2,5 y 3,5  $\log_{10}$  UFC/g respecto a las cargas iniciales de 2, 3 y 4  $\log_{10}$  UFC/g, a 4°C o 22°C.

Por otro lado, es importante señalar que la efectividad del fago P100 contra biofilms de *Listeria*, formados por cepas con alta sensibilidad al fago (como es la cepa *L. monocytogenes* 52), viene a corroborar resultados previos de eliminación de esta bacteria mediante fagos. Así, se ha comprobado que el uso de fagos como bioconservantes es eficaz en evitar la contaminación por este patógeno de productos listos para el consumo (Bigot y col., 2011), quesos (Guenther y Loessner, 2011), Soni y col., 2011), jamón (Holck y Berg, 2009) y fruta (Oliveira y col., 2014). Este hecho unido a los resultados obtenidos en su aplicación como desinfectantes en este trabajo y en otros previos (Arachchi y col., 2013) apuntan hacia una futura aplicación de los mismos a nivel industrial.

## **CONCLUSIONES**

## 5. CONCLUSIONES

- 1- Todas las cepas de *L. monocytogenes* de origen alimentario ensayadas son sensibles a la infección por el bacteriófago P100 de *Listeria*, lo que se deduce de su sensibilidad al producto Listex P100.
- 2- La eficiencia de la infección por el bacteriófago P100 es variable en las distintas cepas de *L. monocytogenes* ensayadas, como lo demuestran la MIC y la eficiencia de plaqueo del producto fágico.
- 3- Existe también una importante variabilidad entre las cepas de *L. monocytogenes* en cuanto a su capacidad de formación de biofilm, independientemente del origen de las mismas (lácteo y cárnico).
- 4- La concentración fágica de elección del producto Listex P100 para la eliminación de los biofilms de las cepas de *L. monocytogenes* 52 y *L. monocytogenes* S12, aisladas de carne, es  $10^8$  UFP/ml. El tratamiento de biofilms de dichas cepas durante 4 horas da lugar a una eliminación de aproximadamente el 90% de la biomasa total, produciendo además una reducción en el número de viables de  $3,9 \log_{10}$ UFC/ml sobre la cepa *L. monocytogenes* 52.

# **ABREVIATURAS**

## ABREVIATURAS

ADN: ácido desoxirribonucleico.

AECOSAN: Agencia Española de Consumo, Seguridad Alimentaria y Nutrición.

AESAN: Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición.

BPH: buenas prácticas de higiene.

CAC: Comisión del Código Alimentario.

CE: Comunidad Europea.

DO: densidad óptica.

EDO: enfermedades de declaración obligatoria.

EE.UU.: Estados Unidos.

EFSA: European Food Safety Authority.

EN: European Norm.

EOP: efficiency of plating.

EPA: Agencia de Protección Ambiental.

FAO: Food and Agriculture Organization.

FDA: Food and Drug Administration.

GRAS: generally recognized as safe.

ISO: International Organization for Standardization.

LPS: lipopolisacárido.

LSD: diferencia significativa mínima.

MIC: concentración mínima inhibitoria.

MOI: multiplicity of infection.

OMS: Organización Mundial de la Salud.

O/n: overnight.

P/v: porcentaje masa-volumen

RTE: ready to eat.

SIM: Sistema de Información Microbiológica.

TSA: agar triptona-soja.

TSB: caldo triptona-soja.

UE: Unión Europea.

UFC: unidades formadoras de colonia.

UFP: unidades formadoras de placa.

US: United States.

USDA: US Department of Agriculture.

V/v: porcentaje volumen-volumen.



# **BIBLIOGRAFÍA**

---

**BIBLIOGRAFÍA**

- Abedon S.T.** (2008). Bacteriophage ecology: population growth, evolution, and impact of bacterial viruses. Cambridge University Press, Cambridge; New York.
- Ackermann H.W.** (2003). Bacteriophage observations and evolution. *Research in Microbiology*, 154(4): 245-251.
- Ackermann H.W.** (2007). 5500 phages examined in the electron microscope. *Archives of Virology*, 142: 227-243.
- Ackermann H.W.** (2001). Frequency of morphological phage descriptions in the year 2000. Brief review. *Arch. Virol.* 146: 843-857.
- AESAN.** (2010). Informe del Comité Científico de la Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición (AESAN) en relación a los biofilms y su repercusión en la seguridad alimentaria. *Revista del comité científico nº 12*: 37-61.
- AESAN.** (2011). Informe del Comité Científico de la Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición (AESAN) en relación a los estudios de vida útil para *Listeria monocytogenes* en determinados productos alimenticios. *Revista del comité científico nº 14*. Número de referencia: AESAN-2011-003.
- Arachchi G. J. G., Cridge A.G., Dias-Wanigasekera B. M., Cruz C. D., McIntyre L., Liu R., Flint S.H., y Mutukumira A. N.** (2013). Effectiveness of phages in the decontamination of *Listeria monocytogenes* adhered to clean stainless steel, stainless steel coated with fish protein, and as a biofilm. *J Ind. Microbiol. Biotechnol.* 40: 1105–1116.
- Arias-Echandi M.L., y Florencia A. G.** (1999). Contaminación microbiológica de los alimentos en Costa Rica. Una revisión de 10 años. *Rev. Biomed*; 11:113-122.
- Barrow P.A., y Soothill J.S.** (1997). Bacteriophages therapy and prophylaxis: rediscovery and renewed assessment of potential. *Trends in Microbiology*, 5(7): 268-271.
- Borucki M.K., Peppin J.D., White D., Loge F., y Call D.R.** (2003). Variation in biofilm formation among strains of *Listeria monocytogenes*. *Applied and Environmental Microbiology*, 69: 7336-7342.

- Bremer P. J., Fillery S. y McQuillan A. J.** (2006). Laboratory scale clean-in-place (CIP) studies on the effectiveness of different caustic and acid wash steps on the removal of dairy biofilms. *International Journal of Food Microbiology*, 106, 254–262.
- Brüssow H.** (2005). Phage therapy: the *E. coli* experience. *Microbiology*. 151(7): 2133-2140.
- Carlton R.M., Noordman W.H., Biswas B., de Meester E.D., y Loessner M.** (2005). Bacteriophage P100 for control of *Listeria monocytogenes* in foods: genome sequence, bioinformatic analysis, oral toxicity study and applications. *Regulatory Toxicology and Pharmacology* 43: 301–312.
- Carpentier B., y Cerf O.** (1993). Biofilms and their consequences with particular references to hygiene in the food industry. *Journal of Applied Bacteriology*, 75: 499-511.
- Chávez-Peña C., Ayala-Mendivil N. A., Ramírez O. T., y Palomares L.A.** (2010). Efecto de la densidad celular y la multiplicidad de infección sobre la producción de baculovirus recombinantes en cultivos de células de insecto. *Red de Revistas Científicas de América Latina, el Caribe, España y Portugal*. Tip. Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas, vol. 13, núm.2: 62-72.
- Cherubin C.E., Appleman M.D., y Heseltine P.N.R.** (1991). Epidemiological spectrum and current treatment of listeriosis. *Rev. Infect. Dis.* 13: 1108-14.
- Chibani-Chennoufi S., Bruttin A., Dillmann M.L., y Brüssow H.** (2004). Phage-Host interaction: an ecological perspective. *Journal of Bacteriology* 186(12): 3677-3686.
- Chmielewsky R.A.N., y Frank J.F.** (2003). Biofilm formation and control in food processing facilities. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 2: 22-32.
- Coates A., y Hu Y.** (2007). Novel approaches to developing new antibiotics for bacterial infections. *British Journal of Pharmacology*, 152: 1147-1154.

- Comisión del Codex Alimentarius.** (1999). Documento de debate sobre el control de *Listeria monocytogenes* en los alimentos. (Preparado por la Delegación de Alemania con la ayuda de Austria, Dinamarca, Francia, Japón, Noruega, el Reino Unido, la Comisión Europea y la Comisión Internacional sobre las Normas para los Alimentos (ICMSF)) Tema 10 del Programa conjunto FAO/OMS sobre las normas alimentarias Comité del Codex sobre la higiene de los alimentos.
- Costerton J.W.** (1995). Overview of microbial biofilms. *Journal of Industrial Microbiology*, 15, 137-140.
- de la Fuente N. M., Barboza J. E.** (2010). Inocuidad y bioconservación de alimentos. *Acta Universitaria*, Universidad de Guanajuato, México, vol. 20, núm.1: 43-52.
- Dini C.** (2011). Aislamiento y caracterización molecular de bacteriófagos de bacterias enteropatógenas para biocontrol de enfermedades transmitidas por alimentos (ETA). Tesis doctoral, Facultad de Ciencias Exactas, Departamento de Ciencias Biológicas. Universidad Nacional de La Plata.
- Donlan R.M., y Costerton J.W.** (2002). Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clinical Microbiology Reviews*, 15 (2): 167-193.
- EFSA.** (2013). EFSA reports on *Listeria* levels in certain ready-to-eat foods. Disponible en: <<http://www.efsa.europa.eu/en/press/news/130627.htm>> [Fecha de consulta: 4 de julio de 2014].
- FAO/ OMS.** (2004). Evaluación de riesgos de *Listeria monocytogenes* en alimentos listos para el consumo. Resumen interpretativo. Serie de evaluación de riesgos microbiológicos 4.
- FSANZ.** Food Standards Australia New Zealand agency. Supporting document 1. Risk assessment report. Application A1045. Disponible en: <[http://www.foodstandards.gov.au/code/applications/documents/A1045\\_SD1.pdf](http://www.foodstandards.gov.au/code/applications/documents/A1045_SD1.pdf)> [Fecha de consulta: 4 de julio de 2014].
- García P., Martínez B., Obeso J.M. y Rodríguez A.** (2008). Bacteriophages and their application in food safety. *Letters in Applied Microbiology*, 47: 479-485.
- Gray M.L., y Killinger A.H.** (1966). *Listeria monocytogenes* and listeric infection. *Bacteriol Rev.* 30: 309-382.

- Guenther S., Huwyler D., Richard S. y Loessner M.J.** (2009). Virulent Bacteriophage for Efficient Biocontrol of *Listeria monocytogenes* in Ready-To-Eat Foods. *Applied and Environmental Microbiology* 75(1): 93–100.
- Hagens S., y Offerhaus M. L.** (2009). Bacteriófagos: Nueva Arma para la Seguridad Alimentaria Disponible en: [http://alimentariaonline.com/PaDs9lu5/wp-content/uploads/MLC030\\_fagos.pdf](http://alimentariaonline.com/PaDs9lu5/wp-content/uploads/MLC030_fagos.pdf) [Fecha de consulta: 4 de julio de 2014].
- Hermoso J., García J., y García P.** (2007). Taking aim on bacterial pathogens: form phage therapy to enzybiotics. *Current Opinion in Microbiology*. 10: 461-467.
- Holck A., y Berg J.** (2009). Inhibition of *Listeria monocytogenes* in Cooked Ham by Virulent Bacteriophages and Protective Cultures. *Applied and environmental Microbiology* Vol. 75, No. 21: 6944–6946.
- Kerr, K.G., Kite, P., Heritage, J. y Hawkey, P.M.** (1995). Typing of epidemiologically associated environmental and clinical strains of *Listeria monocytogenes* by random amplification of polymorphic DNA. *J. Food Protec.*, 58: 609-613.
- Keskinen, L.A., Todd, E.C.D. y Ryser, E.** (2008). Transfer of Surface-Dried *Listeria monocytogenes* from Stainless Steel Knife Blades to Roast Turkey Breast. *Journal of Food Protection*, 71: 176-181.
- Koneman, Winn, Allen ,Janda, Procop, Schrenberger, y Woods.**(2008).Koneman Diagnóstico microbiológico. Texto y Atlas en color. 6ª edición. Editorial médica Panamericana. (14): 728-733.
- Kraigsley, A., Ronney, P.D. y Finkel, S.E.** (2002). Dynamics of self-propagating fronts of motile bacteria. Disponible en: <http://carambola.usc.edu/research/biophysics/bacterialfronts.html>[Fecha de consulta: 3 de julio de 2014].
- Kutter E. y Sulakvelidze A.** (2005). “Bacteriophage therapy in humans,” in *Bacteriophages: Biology and Application*, E. Kutter and A. Sulakvelidze, Eds., pp. 381–436, CRC Press, Boca Raton, Fla, USA, 2005.
- Lamont RF, Sobel J, Mazaki-Tovi S, Kusanovic JP, Vaisbuch E, y Kim SK.** (2011). Listeriosis in human pregnancy: a systematic review. *J Perinat Med.* (39): 227-36.

- Lee Wong, A.C.** (1998). Biofilms in Food Processing Enviroments. *Journal of Dairy Science*, 81: 2765-2770.
- Mattila-Sandholm, T. y Wirtanen, G.** (1992). Biofilm formation in the industry: A review. *Food Reviews International*, 8 (4): 573-603.
- López, V., Suárez, M., Chico-Calero, I., Navas, J., y Martínez-Suárez, J. V.** (2006). *Listeria monocytogenes* en alimentos: ¿son todos los aislamientos igual de virulentos? *Revista Argentina de Microbiología* [en línea], 38: Disponible en: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=213016794011> [Fecha de consulta: 3 de julio de 2014] ISSN 0325-7541.
- Mah T-F. C. y O’Toole G. A.** (2001). Mechanisms of biofilm resistance to antimicrobial agents. *TRENDS in Microbiology* Vol.9 No.1:34-39
- Matsuzaki S., y Rashed M.** (2005). Bacteriophage therapy: a revitalized therapy against bacterial infectious diseases. *Journal of Infection and Chemotherapy*, 11: 211-219.
- Miettinen H.** (2006). *Listeria monocytogenes* in fish farming and processing. Academic dissertation. Department of Food and Environmental Hygiene. Faculty of Veterinary Medicine. University of Helsinki, Finland.
- Muñoz A.I., y Díaz G.** (1998). Listeriosis. Santafé de Bogotá: INVIMA-INS; p. 64.
- Murray P.R., Rosenthal K.S., y Pfaller M.A.** (2009). *Medical Microbiology*, 6th Edition. Mosby Elsevier. 4: 39-57.
- Nelson J.** (1990). Where are *Listeria* likely to be found in dairy plants? *Dairy Food Environ San* 10(6): 344-5.
- Nikolaev Y. A., y Plakunov V. K.** (2007). Biofilm—“City of Microbes” or an Analogue of Multicellular Organisms? ISSN 0026-2617, *Microbiology*, Vol. 76, No. 2: 125–138.
- Norwood D., y Gilmour A.** (2001). The differential adherence capabilities of two *Listeria monocytogenes* strains in monoculture and multispecies biofilms as a function of temperature. *Leters. Appl. Microbiol.* 33: 320-324.
- Noterman S.** (1994). The significance of biofouling to the food industry. *J Food Technol.* 48(7):13- 14.
- Oliveira M., Viñas I., Colàs P., Anguera M., Usall J., Abadias M.,** (2013). Effectiveness of a bacteriophage in reducing *Listeria monocytogenes* on fresh-cut fruits and fruit juices. *Food Microbiology* 38: 137-142.

- OMS.** (1988). Food borne listeriosis. World Health Organization Working group. Bull World Health Organ. 66: 421- 428.
- Parrilla F. y Vaqué J.** (2014) Incidence study of listeriosis in Spain. Gaceta Sanitaria vol.28 no.1 Barcelona ene.-feb. 2014.
- Pini, P.N. y Gilbert, R.J.** (1988). The occurrence in the U.K. of *Listeria* species in raw chickens and soft cheeses. Int. J. Food Microbiol. 6: 317-326
- Pinner, R.W., Schuchat, A. Swaminathan, B. Hayes, P.S. Deaver, K.A., Weaver, R.E. Plikaytis, B.D., Reeves, M., Broome, C.V., Wenger, J.D. and the Listeria Study Group.** (1992). Role of foods in sporadic listeriosis. II. Microbiological and epidemiological investigation. J. Amer. Med. Assoc. 267. 2046-2050.
- Roberts T., y Pinner R.** (1990). Economic impact of disease caused by *L. monocytogenes*. En: Miller, Smith y Somkuti, 1990. 137-149.
- Rocourt J. and Cossart P.** (1997). *Listeria monocytogenes*. En "Food microbiology: fundamentals and frontiers" Doyle M. P., Beuchat L. R., y Montville T. J. (eds.). Editorial American Society for Microbiology: 337-352.
- Rocourt J.** (1999). The genus *Listeria* and *Listeria monocytogenes*: phylogenetic position, taxonomy, and identification. En: *Listeria, listeriosis and food safety*, 2 ed. Ryser, E.T. y Marth, E.H. (eds.). Marcel Dekker, New York, USA .1-20.
- Ronda, C., Vázquez, M., y López, R.,** (2003). Los bacteriófagos como herramienta para combatir infecciones en acuicultura. Revista AquaTIC, 18:3-10.
- Schöbitz R., Ciampi L. y Nahuelquin Y.** (2009) *Listeria monocytogenes* a permanent threat for the food industry AGRO SUR 37(1): 1-8, DOI:10.4206/agrosur.2009.v37n1-01
- Schönberg, A., Teufel, P. y Weise, E.** (1989). Serovars of *Listeria monocytogenes* and *Listeria innocua* from food. Acta Microbiol. Hung. 36: 249-253.
- Schwartz B., Hexteer D., Gaventa S., Brown G.R., Gellin B.G, Broome C.V, Hightower A.W., Hirschhorn R.B., Porter J.D., Hayes P.S., Bibb W.F., Lorber B., y Faris D.G.** (1989). Investigation of an outbreak of Listeriosis: New hypotheses for the etiology of epidemic *L. monocytogenes* infections. J. Infect. Dis. 159 (4):680-685.

- Schlech W.F., Lavigne P.M., Bortolussi R.A., Alien A.C., Haldane E.V., y Wort A.J.** (1983). Epidemic listeriosis-evidence for transmission by food. *N Engl J Med*; 308: 203-6.
- Seeliger H.P.** (1983) *International Journal of Systematic Bacteriología* 33: 439.
- Segundo A. N., Hernández B. E., López V. O., Torres A O.** (2010). Los bacteriófagos como una alternativa en el tratamiento de enfermedades infecciosas Bacterianas (Fagoterapia). *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas*, vol. 41: 17-26.
- Serra, P.G.** (2003). Estudio de biofilms: formación y consecuencia.
- Simões M., Simões L. C., Machado, I., Pereira, M. O., y Vieira, M. J.**(2006). Control offlow-generated biofilms using surfactants – evidence of resistance and recovery. *Food and Bioproducts Processing*, 84, 338–345
- Simões, M., Simões, L.C., y Vieira M. J.** (2010).A review of current and emergent biofilm control strategies. *LWT - Food Science and Technology* 43: 573–583.
- Soni K.A., y Nannapaneni R.** (2010). Removal of *Listeria monocytogenes* Biofilms with Bacteriophage P100. *Journal of Food Protection*, Vol. 73, No. 8: 1519–1524.
- Soni K.A., Nannapaneni R., y Hagens S.** (2010). Reduction of *Listeria monocytogenes* on the surface of fresh channel catfish fillets by bacteriophage Listex P100. *Foodborne Pathogens and Disease*, 7, 427-434.
- Sulakvelidze A., Alavidze Z. y** (2001). Bacteriophage therapy. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* vol. 45 no. 3: 649-659.
- Sulakvelidze, A., Alavidze, Z., y Morris, G.** (2001). Bacteriophage therapy. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 43(3):649-659.
- Spricigo D.A.** (2011). La desinfección basada en bacteriófagos como herramienta de biocontrol de *Salmonella* en alimentos. Tesis doctoral, Programa de Biotecnología. Universitat Autònoma de Barcelona.
- UE.** (2005). Reglamento (CE) N° 2073/2005 de la Comisión de 15 de noviembre de 2005 relativo a los criterios microbiológicos aplicables a los productos alimenticios. DO L 338 de 22 de diciembre de 2005: 12-45.
- Zúñiga C.** (1994). El control microbiológico de la calidad. San José, Costa Rica, Universidad de Costa Rica.



