

**Universidad Autónoma De Querétaro**  
**Facultad de Ciencias Químicas**

**“Transferencia de genes de resistencia a QACs  
entre cepas de *Listeria* spp. aisladas en ambientes  
de producción de hortalizas congeladas”**

**Protocolo de Tesis**

Que como parte de los requisitos para obtener el grado de:

Maestro en Ciencia y Tecnología de Alimentos

**Presenta:**

Lic.M. Yarlenis Coello Delgado

Dirigido por: Dra. Montserrat Hernández Iturriaga

Querétaro, Qro. 2024

La presente obra está bajo la licencia:  
<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/deed.es>



CC BY-NC-ND 4.0 DEED

Atribución-NoComercial-SinDerivadas 4.0 Internacional

### Usted es libre de:

**Compartir** — copiar y redistribuir el material en cualquier medio o formato

La licenciante no puede revocar estas libertades en tanto usted siga los términos de la licencia

### Bajo los siguientes términos:



**Atribución** — Usted debe dar [crédito de manera adecuada](#), brindar un enlace a la licencia, e [indicar si se han realizado cambios](#). Puede hacerlo en cualquier forma razonable, pero no de forma tal que sugiera que usted o su uso tienen el apoyo de la licenciante.



**NoComercial** — Usted no puede hacer uso del material con [propósitos comerciales](#).



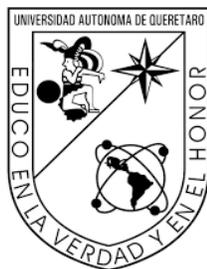
**SinDerivadas** — Si [remezcla, transforma o crea a partir](#) del material, no podrá distribuir el material modificado.

**No hay restricciones adicionales** — No puede aplicar términos legales ni [medidas tecnológicas](#) que restrinjan legalmente a otras a hacer cualquier uso permitido por la licencia.

### Avisos:

No tiene que cumplir con la licencia para elementos del material en el dominio público o cuando su uso esté permitido por una [excepción o limitación](#) aplicable.

No se dan garantías. La licencia podría no darle todos los permisos que necesita para el uso que tenga previsto. Por ejemplo, otros derechos como [publicidad, privacidad, o derechos morales](#) pueden limitar la forma en que utilice el material.



**Universidad Autónoma De Querétaro**

**Facultad de Ciencias Químicas**

**Maestría en Ciencias y Tecnología de Alimentos**

**“Transferencia de genes de resistencia a QACs entre cepas de *Listeria* spp. aisladas en ambientes de producción de hortalizas congeladas”**

**Protocolo de Tesis**

Que como parte de los requisitos para obtener el grado de:

Maestro en Ciencia y Tecnología de Alimentos

**Presenta:**

Lic.M. Yarlenis Coello Delgado

Dirigido por: Dra. Montserrat Hernández Iturriaga

Dra. Montserrat Hernández Iturriaga

Presidente

Dra. Angélica Godínez Oviedo

Secretario

Dr. Mauricio Redondo Solano

Vocal

Dr. Juan Ramiro Pacheco Aguilar

Suplente

Dr. Sergio Romero Gómez

Suplente

Declaro que los datos propios obtenidos en esta investigación fueron generados durante el desarrollo de mi trabajo de tesis de forma ética y que reporto detalles necesarios para que los resultados de esta tesis sean reproducibles en eventuales investigaciones futuras. Finalmente, este manuscrito de tesis es un trabajo original en el cual se declaró y dio reconocimiento a cualquier colaboración o cita textual presentadas en el documento.

**YARLENIS COELLO DELGADO**



## **DEDICATORIA**

Esta tesis la dedico a todas las personas que me brindaron su tiempo, preocupación y apoyo. En especial a mi familia; a mis asesores de tesis, la Facultad de Química y la Universidad Autónoma de Querétaro.

Muchas gracias

## **AGRADECIMIENTOS**

En primer lugar, quiero nombrar a mi asesora de tesis la Dra. Montse por darme la oportunidad de trabajar con ella y formar parte del grupo de inocuidad, gracias por sus enseñanzas, todo el conocimiento que me ha aportado y por la confianza depositada durante estos dos años. Le agradezco también el haberme facilitado siempre los medios suficientes para llevar a cabo todas las actividades propuestas durante el desarrollo de esta tesis. Además, quiero agradecerle por motivarme cada día y alentarme a que todo iría bien siempre con mucho cariño y empatía. No tengo palabras para expresar mi gratitud por su inmenso apoyo.

A todos mis sinodales por sus sugerencias, aportaciones y enseñanzas. Muchas gracias por el tiempo que han dedicado para leer este trabajo ....

Agradezco al Consejo Nacional de Humanidades, Ciencia y Tecnología (CONAHCYT) por otorgarme la beca de investigación que hizo posible la realización de este proyecto. A la Universidad Autónoma de Querétaro y la Facultad de Química por propiciar mi desarrollo profesional.

A todo el personal del Laboratorio LECRIMA, por su ayuda todo el tiempo, gracias por ese ambiente tan agradable y que me hizo sentir parte del equipo desde el primer momento. A la Señora Martha, la Dra. Angie, el Dr. Adrián, Marla, las chicas Abril, Fer, Vale, Ale y los chicos de servicio Iván y Alfonso...

A mi compañera Lory que estuvo conmigo en todos los momentos de estrés y alegría durante este largo camino. Qué bueno que compartimos y disfrutamos a pesar de todo esta compleja etapa de nuestras vidas. A todas las personas que conocí aquí en México y se convirtieron en parte de mi familia... Muchas gracias.

En último lugar y no porque sea menos importante, a mi familia, mis padres y hermanos porque siempre han sido mi motor impulsor a seguir adelante y luchar por un mejor futuro. A pesar de la difícil distancia durante estos dos años siempre han estado a mi lado, apoyándome y alentándome.



## INDICE DE CONTENIDO

DEDICATORIA.....	iv
AGRADECIMIENTOS .....	v
ÍNDICE DE ILUSTRACIONES.....	xi
ÍNDICE DE FIGURAS.....	xii
ÍNDICE DE TABLAS .....	xiv
RESUMEN.....	xv
ABSTRACT .....	xvi
1. INTRODUCCIÓN .....	1
2. ANTECEDENTES.....	3
2.1. Hortalizas.....	3
2.1.1 Procesamiento de hortalizas congeladas.....	4
2.1.2 Microorganismos presentes en hortalizas congeladas.....	6
2.1.3 Brotes de enfermedad asociados al consumo de hortalizas congeladas ..	7
2.2 Género <i>Listeria</i> .....	8
2.2.1 <i>Listeria monocytogenes</i> .....	9
2.2.1.1 Patogénesis y factores de virulencia .....	10
2.2.1.2 Listeriosis .....	11
2.3. Prevalencia de <i>L. monocytogenes</i> en alimentos .....	12
2.4 Persistencia de <i>L. monocytogenes</i> en entornos de procesamiento de alimentos .....	14
2.4.1 Formación de biopelículas como mecanismo de persistencia.....	15
2.4.2 Formación de biopelículas por <i>L. monocytogenes</i> .....	17

2.4.3 Control de biopelículas de <i>L. monocytogenes</i> en la industria alimentaria .....	19
2.5 Desinfectantes en la industria alimentaria .....	21
2.5.1 Compuestos de amonio cuaternario.....	22
2.6. Resistencia de <i>L. monocytogenes</i> a compuestos de amonio cuaternario ...	25
<b>3. JUSTIFICACIÓN .....</b>	<b>29</b>
<b>4. OBJETIVOS .....</b>	<b>30</b>
4.1 Objetivo general.....	30
4.2 Objetivos específicos.....	30
<b>5. MATERIALES Y MÉTODOS .....</b>	<b>31</b>
5.1 Descripción del sitio de muestreo .....	31
5.2 Recolección de muestras ambientales .....	31
5.3 Detección de <i>L. monocytogenes</i> y <i>Listeria</i> spp. ....	32
5.3.1 Confirmación de <i>L. monocytogenes</i> y <i>Listeria</i> spp. mediante PCR-Múltiplex .....	33
5.4 Detección de genes asociados con la resistencia a QACs.....	36
5.5 Evaluación de la resistencia fenotípica a QACs de cepas de <i>L. monocytogenes</i> portadoras y no portadoras de genes de resistencia en medio de cultivo sólido.	37
5.5.1 Preparación de los inóculos .....	37
5.5.2 Método de difusión en agar de pozo .....	37
5.5.3 Método de difusión en agar con discos .....	38
5.5.4 Clasificación de las cepas .....	38
5.6 Evaluación de la resistencia fenotípica de <i>L. monocytogenes</i> a QACs en suspensión y acero inoxidable.....	38

5.6.1 Cepas .....	38
5.6.2 Preparación de los inóculos .....	38
5.6.3 Aplicación de los tratamientos de desinfección en suspensión .....	39
5.6.4 Aplicación de los tratamientos de desinfección en acero inoxidable .....	39
5.7 Evaluación del efecto de la temperatura y substrato en la transferencia de genes asociados con la resistencia a QACs en cultivos mixtos de <i>Listeria</i> spp. y <i>L. monocytogenes</i> .....	40
5.7.1 Preparación del extracto vegetal .....	40
5.7.2 Preparación de los cultivos mixtos e inoculación .....	40
5.7.3 Verificación de la transferencia de genes de resistencia a QACs .....	41
5.8 Evaluación de resistencia fenotípica en cepas de <i>L. monocytogenes</i> receptoras de los genes de resistencia a QACs .....	42
5.9 Análisis estadístico .....	42
<b>6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....</b>	<b>44</b>
6.1 Prevalencia y distribución de <i>Listeria</i> spp. en un ambiente de producción de hortalizas congeladas .....	44
6.2 Presencia de genes asociados con la resistencia a QACs en cepas de <i>Listeria</i> spp. aisladas de un ambiente de producción de hortalizas congeladas .....	50
6.3. Resistencia fenotípica a QACs de cepas de <i>L. monocytogenes</i> portadoras y no portadoras de genes de resistencia al desinfectante .....	53
6.4 Evaluación del efecto de la temperatura y substrato en la probabilidad de transferencia de genes de resistencia a QACs entre cepas de <i>Listeria</i> spp. y <i>L. monocytogenes</i> en cultivos mixtos. ....	63
6.5 Evaluación de la resistencia fenotípica a QACs de <i>L. monocytogenes</i> receptoras de genes de resistencia al desinfectante .....	68
<b>7. CONCLUSIONES .....</b>	<b>73</b>

<b>8. RECOMENDACIONES.....</b>	<b>74</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>75</b>
<b>ANEXOS.....</b>	<b>90</b>
Anexo 1: Protocolo de titulación QACs.....	90
Anexo 2: Análisis de correlación entre presencia de genes de resistencia a QACs ( <i>bcrABC</i> y <i>qacH</i> ) y diámetros de inhibición según los métodos de difusión en agar.	

## ÍNDICE DE ILUSTRACIONES

**Ilustración 1.** Distribución de *L. monocytogenes* en diferentes áreas de producción de hortalizas congeladas. <sup>1</sup>El número entre paréntesis representa el número de aislados de *L. monocytogenes* en cada área entre el número total de aislados. ...47

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Mecanismo de invasión y diseminación celular de <i>L. monocytogenes</i> . Tomado de Sibanda & Buys, 2022. ....	11
<b>Figura 2.</b> Proceso de formación de biopelículas. Tomado de Giaouris & Simões, 2018.....	15
<b>Figura 3.</b> Elementos genéticos movilizados por transferencia horizontal intracelular e intercelular de genes entre una célula donante y una célula receptora. Tomado de Partridge <i>et al.</i> (2018). ....	25
<b>Figura 4.</b> Organización genética de la región del casete de resistencia <i>bcrABC</i> en el plásmido pLM80 de <i>L. monocytogenes</i> . Tomado de Elhanafi <i>et al.</i> (2010).....	27
<b>Figura 5.</b> Etapas de la producción de hortalizas congeladas. ....	31
<b>Figura 6.</b> Distribución de <i>Listeria</i> en superficies de no contacto y contacto con el alimento en una empresa procesadora de hortalizas congeladas .....	44
<b>Figura 7.</b> Distribución de <i>Listeria</i> spp. y <i>L. innocua</i> en diferentes áreas de producción de hortalizas congeladas.....	46
<b>Figura 8.</b> Prevalencia de <i>L. monocytogenes</i> en superficies en una empresa procesadora de hortalizas congeladas .....	48
<b>Figura 9.</b> Susceptibilidad de <i>L. monocytogenes</i> a QACs mediante dos métodos de difusión en agar. Las letras diferentes indican diferencias estadísticas significativas. ....	53
<b>Figura 10. A.</b> Diámetros de inhibición a QACs de aislados de <i>L. monocytogenes</i> portadores y no portadores del gen <i>bcrABC</i> . <b>B.</b> Diámetros de inhibición a QACs de aislados de <i>L. monocytogenes</i> portadores y no portadores de los genes <i>bcrABC</i> y <i>qacH</i> . *El gen <i>qacH</i> se encontró en dos aislados de <i>L. monocytogenes</i> que también portaban el gen <i>bcrABC</i> .....	57
<b>Figura 11.</b> Susceptibilidad de cepas de <i>L. monocytogenes</i> a QACs (1000 ppm) mediante método de difusión en agar de pozo. I: intermedia R: resistente S: sensible .....	59

**Figura 12.** Mapa de color del porcentaje de transferencia del gen *bcrABC* en cultivos mixtos de *L. innocua* y *L. monocytogenes* en diferentes condiciones de temperatura y sustrato. CS: Caldo soya; EV: Extracto vegetal. ....65

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Coloración de las colonias para cepas de <i>Listeria</i> spp. en el agar cromogénico RLM.....	33
<b>Tabla 2.</b> Iniciadores utilizados para el PCR-Múltiplex.....	34
<b>Tabla 3.</b> Mezcla de reacción para PCR-Múltiplex de <i>Listeria</i> spp.....	35
<b>Tabla 4.</b> Cebadores que se emplearon en la detección de genes de resistencia a QACs .....	36
<b>Tabla 5.</b> Prevalencia y distribución de <i>Listeria</i> spp. y <i>L. monocytogenes</i> en una empresa procesadora de hortalizas congeladas .....	45
<b>Tabla 6.</b> Tabla de contingencia de presencia y ausencia de las especies de <i>Listeria</i> aisladas del ambiente de producción de hortalizas congeladas. ....	49
<b>Tabla 7.</b> Prevalencia del gen <i>bcrABC</i> y <i>qacH</i> en aislados de <i>Listeria</i> . ....	51
<b>Tabla 8.</b> Susceptibilidad de <i>L. monocytogenes</i> a QACs mediante dos métodos de difusión en agar. ....	54
<b>Tabla 9.</b> Rangos de inhibición de <i>L. monocytogenes</i> a QACs mediante dos métodos de difusión en agar. ....	56
<b>Tabla 11.</b> Susceptibilidad de <i>L. monocytogenes</i> a QACs (200 ppm) mediante ensayo de reto microbiano en suspensión.....	60
<b>Tabla 12.</b> Susceptibilidad de <i>L. monocytogenes</i> a QACs mediante ensayo de reto microbiano en superficie de acero inoxidable. ....	61
<b>Tabla 13.</b> Frecuencia de transferencia del gen <i>bcrABC</i> en cultivos mixtos de <i>L. innocua</i> portadora y <i>L. monocytogenes</i> no portadora.....	63
<b>Tabla 14.</b> Susceptibilidad de <i>L. monocytogenes</i> nativas y receptoras del gen <i>bcrABC</i> a QACs mediante ensayo de difusión en agar. ....	68
<b>Tabla 15.</b> Susceptibilidad de <i>L. monocytogenes</i> nativas y receptoras del gen <i>bcrABC</i> a QACs (200 ppm) mediante ensayo de reto microbiano en suspensión. ....	69
<b>Tabla 16.</b> Susceptibilidad de <i>L. monocytogenes</i> nativas y receptoras del gen <i>bcrABC</i> a QACs mediante ensayo de reto microbiano en superficie de acero inoxidable.....	70

## RESUMEN

*Listeria monocytogenes* es un patógeno de gran interés para la industria de hortalizas congeladas. El intercambio de genes de resistencia a desinfectantes puede ocurrir entre especies no patógenas de *Listeria* y *L. monocytogenes*, favoreciendo la persistencia del patógeno en los ambientes de producción de alimentos. El objetivo de este proyecto fue determinar la prevalencia y distribución de *Listeria* spp. portadoras de genes de resistencia a compuestos de amonio cuaternarios (QACs) en un ambiente de producción de hortalizas congeladas y evaluar factores que influyen en la transferencia de genes entre especies de *Listeria*. Se recolectaron 150 muestras ambientales en una empresa de hortalizas congeladas y se investigó la presencia de seis especies de *Listeria* (*L. grayi*, *L. innocua*, *L. ivanovii*, *L. monocytogenes*, *L. seeligeri* y *L. welshimeri*) mediante técnicas microbiológicas y PCR Múltiplex. En las cepas de *Listeria* aisladas se buscó la presencia de los genes *qacH* y *bcrABC* mediante un ensayo de PCR y se evaluó la resistencia fenotípica de aislados de *L. monocytogenes* a QACs mediante pruebas de difusión en agar y reto microbiano. De las especies investigadas, se detectó a *L. monocytogenes* (15.3%), *L. innocua* (2.7%) y otras especies de *Listeria* (24.7 %); los genes *bcrABC* y *qacH* se encontraron en el 73.9 y 8.7 % de los aislados de *L. monocytogenes* respectivamente, mientras que solo se encontró el gen *bcrABC* en dos aislados de *L. innocua*. Los aislados de *L. monocytogenes* mostraron reducida susceptibilidad a QACs sin diferencias entre aislados portadores y no portadores de los genes *bcrABC* y *qacH*. Posteriormente se realizaron cultivos mixtos de *L. innocua* portadora del gen *bcrABC* y *L. monocytogenes* no portadora en caldo soya y extracto vegetal e incubaron a 4, 25 y 36 °C. Se observó transferencia del gen *bcrABC* en el 7.9 % de las reacciones en caldo soya y extracto vegetal y con mayores porcentajes a 25 (4.6 %) y 36 °C (2.8 %). En las cepas de *L. monocytogenes* receptoras del gen *bcrABC* se evaluó la resistencia fenotípica a QACs y no se observó mayor susceptibilidad en comparación con las cepas nativas no portadoras.

Palabras claves: *Listeria*, resistencia a QACs, transferencia de genes de resistencia

## **ABSTRACT**

*Listeria monocytogenes* is a pathogen of great interest to the frozen vegetable industry. Transfer of disinfectant resistance genes can occur between non-pathogenic *Listeria* spp. and *L. monocytogenes*, favoring the persistence of the pathogen in food production environments. The objective of this project was to determine the prevalence and distribution of *Listeria* spp. carrying genes for resistance to quaternary ammonium compounds (QACs) in a frozen vegetable production environment and to evaluate factors influencing gene transfer between *Listeria* species. We collected 150 environmental samples from a frozen vegetable company and investigated the presence of six *Listeria* species (*L. grayi*, *L. innocua*, *L. ivanovii*, *L. monocytogenes*, *L. seeligeri* and *L. welshimeri*) using microbiological techniques and multiplex PCR. *Listeria* isolates were screened for the presence of *qacH* and *bcrABC* genes by PCR assay and phenotypic resistance of *L. monocytogenes* isolates to QACs was evaluated by agar diffusion and microbial challenge tests. Of the species investigated, *L. monocytogenes* (15.3%), *L. innocua* (2.7%) and other *Listeria* species (24.7 %) were detected; the *bcrABC* and *qacH* genes were found in 73.9 and 8.7 % of *L. monocytogenes* isolates, respectively, while only the *bcrABC* gene was found in two *L. innocua* isolates. *L. monocytogenes* isolates showed reduced susceptibility to QACs with no differences between isolates carrying and not carrying the *bcrABC* and *qacH* genes. Subsequently, mixed cultures of *L. innocua* carrying the *bcrABC* gene and non-carrier *L. monocytogenes* were grown in soy broth and plant extract and incubated at 4, 25 and 36 °C. Transfer of the *bcrABC* gene was observed in 7.9 % of the reactions in soy broth and vegetable extract and with higher percentages at 25 (4.6 %) and 36 °C (2.8 %). Phenotypic resistance to QACs was evaluated in the *L. monocytogenes* strains that received the *bcrABC* gene and no greater susceptibility was observed compared to native strains that were not carriers.

Key words: *Listeria*, resistance to QACs, resistance gene transfer



## 1. INTRODUCCIÓN

Las hortalizas constituyen un alimento fundamental en la dieta de los humanos por su alto contenido nutricional, baja densidad de calorías y grasas (OMS, 2018). Debido a que son alimentos altamente perecederos se emplean tecnologías como la congelación para prolongar su vida de anaquel. Los productos congelados pueden ser considerados de bajo riesgo microbiológico, ya que tratamientos como el escaldado y la congelación eliminan y reducen los peligros biológicos durante su procesamiento, no obstante, el incumplimiento de medidas de limpieza, desinfección y buenas prácticas de manufactura puede propiciar la contaminación de los alimentos con microorganismos patógenos. Entre los patógenos involucrados en brotes de enfermedad asociados al consumo de hortalizas congeladas se encuentra *Listeria monocytogenes* (CDC, 2023).

*L. monocytogenes* pertenece al género *Listeria* y se considera la única especie patógena para los humanos. La infección por *L. monocytogenes* se denomina listeriosis, las manifestaciones clínicas dependen de la susceptibilidad del individuo, pueden presentarse infecciones focales moderadas, septicemia, meningitis y aborto en embarazadas (Fan *et al.*, 2019). La tasa de incidencia de esta enfermedad es baja, sin embargo, la tasa de letalidad reportada varía entre un 20 y 40 %, por lo que representa un importante problema de salud pública (Muñoz-Gallego *et al.*, 2017).

*L. monocytogenes* es una bacteria ubicua, que puede aislarse a partir de muestras de suelo, agua, materia vegetal y animales (Escartín, 2008). La principal vía de transmisión a los humanos son alimentos contaminados, principalmente carnes, lácteos, alimentos listos para el consumo, frutas y vegetales (Kurpas *et al.*, 2018). Este patógeno puede persistir en ambientes de procesamiento de alimentos, debido a su ubicuidad, potencial psicrótrofo y capacidad para formar biopelículas. Esta última característica favorece su protección frente a compuestos antimicrobianos y desinfectantes (Giaorius *et al.*, 2018; Duze *et al.*, 2021).

Los compuestos de amonio cuaternario (QACs) son desinfectantes comúnmente usados en la industria alimentaria contra *L. monocytogenes* (Aryal & Muriana, 2019; Carrascosa *et al.*, 2021). La resistencia de *L. monocytogenes* a QACs involucra diferentes mecanismos que incluyen la formación de biopelículas y la presencia de elementos genéticos móviles como plásmidos o transposones que contienen genes de resistencia a estos compuestos antimicrobianos. Entre los principales marcadores genéticos descritos sobresalen los genes *qacH* y *bcrABC* (Elhanafi *et al.*, 2010; Müller *et al.*, 2013 ).

En un estudio reciente del grupo de trabajo, se identificó el gen *bcrABC* asociado a la resistencia a QACs en cepas de *L. grayi*, *L. innocua*, *L. ivanovii* y *L. monocytogenes*. Las cepas de *L. innocua* transfirieron el gen *bcrABC* a *L. monocytogenes*, aunque este no se expresó (Vega Iturbe, 2022). Esto demuestra que las cepas no patógenas de *Listeria* pueden constituir un reservorio importante de genes de resistencia y favorecer el intercambio genético entre especies del género *Listeria* (Carvalho *et al.*, 2019).

La información acerca de la transferencia y expresión de genes de resistencia a QACs entre especies de *Listeria* spp. es aún limitada. Por lo tanto, el objetivo del presente proyecto fue determinar la prevalencia y distribución de cepas de *Listeria* spp. portadoras de genes de resistencia a QACs en un ambiente de producción de hortalizas congeladas y evaluar factores que pueden influir en la transferencia de estos genes entre especies del género *Listeria*.

## **2. ANTECEDENTES**

### **2.1. Hortalizas**

Las hortalizas son cualquier planta herbácea cultivada generalmente en huertos o regadíos, que se pueden utilizar como alimento, ya sea crudo o cocinado; mientras que las verduras son las hortalizas en las que la parte comestible está constituida por sus órganos verdes (hojas, tallos, inflorescencia). El término hortaliza incluye a las verduras y a las legumbres verdes (Basulto *et al.*, 2014).

La composición química de las hortalizas varía significativamente según el tipo y la procedencia. De forma general el contenido acuoso oscila entre el 90 y 80 % y la materia seca del 10 al 20 %; sus componentes se distribuyen de la siguiente forma: 3-20 % de hidratos de carbono, 1-5 % de compuestos nitrogenados, 0.6-2.5 % de fibra, 0.5-1.5 % de minerales y 0.1 a 0.9% de lípidos. El contenido de vitaminas oscila mucho de un tipo de hortaliza a otro, aunque siempre se encuentran en pequeña proporción sobresalen la provitamina A (beta caroteno), vitamina C, niacina, vitamina B1, vitamina B2 y los folatos; también contienen minerales como potasio, hierro y calcio; además de otros compuestos químicos en menores cantidades, como ácidos orgánicos, compuestos fenólicos, sustancias aromáticas y pigmentos (Mendoza *et al.*, 2010).

Las hortalizas, constituyen un alimento fundamental por su alto contenido nutricional, baja densidad de calorías y grasas contribuyendo a formar parte indispensable de la dieta de los humanos. Según la Organización Mundial de Salud (OMS) es recomendable el consumo de al menos 400 g o cinco porciones de frutas y verduras al día, lo que reduce el riesgo de desarrollar enfermedades no transmisibles y ayuda a garantizar una ingesta diaria suficiente de fibra dietética (OMS, 2018).

Las hortalizas constituyen el séptimo producto de mayor producción en el mundo, con más de 275 millones de toneladas anuales (FAOSTAT, 2015). México ocupa el oncenso lugar a nivel mundial en la producción de cultivos agrícolas, con una superficie cultivable de 24.6 millones de hectáreas destinadas a estos fines y una

producción de 268.6 millones de toneladas de productos agrícolas, así mismo se posiciona en el séptimo lugar como exportador a nivel mundial, destacando alimentos hortofrutícolas como aguacate, *berries*, jitomate, chile, brócoli, col, coliflor, entre otros alimentos (SIAP, 2022).

Las hortalizas debido a su alto contenido acuoso y actividad enzimática, son alimentos altamente perecederos, lo que conlleva a la implementación de tecnologías para asegurar su conservación, aumentar su tiempo de vida útil y así disponer de estos productos durante cualquier época del año. Una de las tecnologías más empleadas para estos fines es la congelación que permite relentecer las reacciones de deterioro y la actividad microbiana, propicia la preservación de las características sensoriales y nutrimentales de este tipo de productos, además de disminuir en un 25 % el desperdicio estimado a nivel de consumidor (Stancu *et al.*, 2016).

#### 2.1.1 Procesamiento de hortalizas congeladas.

Las principales etapas para el procesamiento y producción de hortalizas congeladas incluyen: recepción de la materia prima, lavado y desinfección, cortado, escaldado, congelación, empaque, almacenamiento y transporte (Panadero *et al.*, 2019).

La recepción es una etapa fundamental durante el procesamiento, es necesario que los proveedores sean confiables y cumplan buenas prácticas agrícolas durante la cosecha, además durante esta etapa se debe realizar una adecuada selección y clasificación de la materia prima para asegurar su homogeneidad y calidad. Posterior a este paso, los productos hortofrutícolas deben ser lavados y desinfectados cuidadosamente para eliminar restos de tierra, plaguicidas, materiales extraños, además de disminuir la carga microbiana inicial del material vegetal (Vivek *et al.*, 2019).

El procesado mínimo de algunos productos hortícolas requiere de la eliminación de la piel y/o semillas y la reducción del tamaño o troceado; estas manipulaciones tienen gran influencia en la calidad final del producto vegetal cortado y deben

realizarse produciendo el menor daño posible, con el fin de reducir al máximo los cambios fisiológicos, bioquímicos y microbiológicos (Sharma *et al.*, 2018).

El escaldado es otra operación relevante realizada como paso previo a la congelación. Es un pretratamiento que permite la inactivación de enzimas, la fijación del color y destrucción de microorganismos; las técnicas más utilizadas actualmente son el escaldado en agua caliente o en vapor (van der Sman, 2020). El proceso de escaldado varía según el tipo de producto tratado, generalmente se emplean temperaturas de 75 - 95 °C durante 1–10 min aproximadamente (Zhan *et al.*, 2018). Es un tratamiento que presenta varias ventajas como la estabilización de la textura, color, sabor, aroma y calidad nutricional, no obstante, si no se controla el tiempo y la temperatura durante este procedimiento, pueden verse afectada las características sensoriales del producto debido a pérdida de sólidos solubles y la generación de un sabor a cocido (van der Sman, 2020).

Otra etapa importante en el procesamiento de productos hortofrutícolas es la congelación. En la actualidad para frutas y hortalizas se emplea la congelación por chorro de aire frío forzado en túneles de cinta transportadora, con temperaturas que oscilan entre -18 y -40 °C y velocidades del aire del orden de 1.0 m/s; la velocidad de congelación del producto depende de varios factores como el tamaño del alimento, el coeficiente de transferencia de calor del medio refrigerante y la temperatura del congelador (van der Sman, 2020). Es necesario el control de la temperatura tanto de congelación como de almacenamiento del producto final durante toda la cadena de producción, distribución y consumo, para evitar cambios fisiológicos y microbiológicos que repercutan en la calidad del producto (Neri *et al.*, 2020).

El envasado es otra etapa determinante para prolongar la vida comercial de las frutas y hortalizas, ya que constituye una barrera física a la entrada de microorganismos u otros contaminantes y reduce la actividad respiratoria del tejido vegetal, lo que aumenta su vida de anaquel (Kader *et al.*, 1989).

El consumo de hortalizas congeladas aumenta en todo el mundo debido a la globalización y al ajetreado estilo de vida, además de que son productos que pueden ser almacenados durante mucho tiempo y aun así conservar su valor nutricional. Según informes del Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera (SIAP) en el año 2016 en México se generó un total de 280 mil toneladas de productos vegetales congelados, destinados en su mayoría a la exportación (SIAP, 2016).

#### 2.1.2 Microorganismos presentes en hortalizas congeladas

Entre los microorganismos no patógenos reportados en hortalizas predominan bacilos Gram negativos aerobios como *Enterobacter* spp., *Citrobacter* spp., *Halfnia alvei*, *Erwinia carotova*, *Pseudomonas* spp., *Flavobacterium* sp., *Proteus* sp., *Klebsiella* sp., *Xanthomonas* sp., y Gram positivos como *Lactobacillus* sp., *Enterococcus*, *Bacillus* y *Micrococcaceaea*, también hongos como *Alternaria* spp., *Cladosporium*, *Penicillium*, *Fusarium*, *Rhizopus*, *Mucor*, entre otros (Fernández Escartín, 2008).

Las hortalizas durante las etapas de cosecha y procesamiento se encuentran expuestas a la contaminación con microorganismos patógenos, las principales fuentes de contaminación son la tierra, el agua de riego, el tipo de abono utilizado, la presencia de materia fecal humana o animal, la maquinaria y equipos. La naturaleza y abundancia de los microorganismos contaminantes como bacterias, hongos, virus y parásitos es muy variable entre los diferentes cultivos y productos (Fernández Escartín, 2008).

Los microorganismos predominantes en las hortalizas congeladas son las bacterias ácido lácticas, *Leucnostonoc* y *Streptococcus* (Fernández Escartín, 2008). Dentro de los principales patógenos involucrados destacan norovirus, virus de la hepatitis A, *Escherichia coli*, *Salmonella enterica* y *Listeria monocytogenes* (Nasheri *et al.*, 2019; Ortiz-Solà *et al.*, 2020).

Desde el punto de vista microbiológico, no existen criterios establecidos específicamente para los productos congelados. La Unión Europea ha establecido algunos criterios microbiológicos para frutas y verduras precortadas listas para el consumo; por ejemplo, especifica un límite de tolerancia de *L. monocytogenes* de 100 UFC/g de alimento; además, se incluyen criterios de higiene del proceso, especificando niveles aceptables de *Escherichia coli* (menos de 100 UFC/g de alimento) y ausencia de *Salmonella* en 25 g de alimento (EC, 2005).

### 2.1.3 Brotes de enfermedad asociados al consumo de hortalizas congeladas

En los EE. UU. los brotes de enfermedad más recientes asociados al consumo de hortalizas congeladas han sido ocasionados por el patógeno *L. monocytogenes*. En 2016 en EE. UU. se notificó un brote multiestatal de listeriosis con 9 personas infectadas y 3 muertes, el análisis epidemiológico reveló la presencia de *L. monocytogenes* en maíz congelado, así como en muestras ambientales de la empresa implicada; como medida fueron retirados un total de 450 productos de consumo procesados en las instalaciones implicadas (CDC, 2016).

En 2018 la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA por sus siglas en inglés *European Food Safety Authority*) informó un brote de listeriosis asociado al consumo de maíz y otras verduras congeladas que afectó a Austria, Dinamarca, Finlandia, Suecia y el Reino Unido desde 2015. Se notificaron 47 casos de infección, de los cuales 9 personas fallecieron. Los estudios epidemiológicos detectaron la presencia de la misma cepa de *Listeria* que afectó a dos personas del brote en productos congelados como espinacas y judías verdes en una empresa húngara en 2016, 2017 y 2018, por lo que sugirieron que las cepas persistieron en la planta de procesamiento a pesar de los procedimientos de limpieza y desinfección que se realizaron (EFSA, 2021).

Los principales factores que pueden aumentar la contaminación y/o crecimiento de microorganismos patógenos durante el procesamiento de hortalizas congeladas son la calidad de las materias primas y del agua utilizada en el proceso, las condiciones higiénicas del entorno de procesamiento, las combinaciones de tiempo y

temperatura utilizadas para el escaldado, enfriamiento, congelación y almacenamiento. Adicionalmente, después de la producción diversos factores pueden influir en la sobrevivencia de los microorganismos patógenos como las características intrínsecas del alimento congelado, las condiciones de tiempo y temperatura durante el almacenamiento y descongelación, así como las condiciones de cocción aplicadas (EFSA, 2020).

*L. monocytogenes* se reconoce como el patógeno más importante implicado en brotes de este tipo de alimentos debido a la severidad y letalidad de la enfermedad que produce. Además de los problemas de salud que genera, se producen daños económicos y financieros por la retirada de gran cantidad de productos contaminados; se estima que la pérdida económica por retiro es casi un promedio de 10 millones de dólares, también las marcas pueden resultar afectadas por pérdida de mercados y de la confianza de los consumidores (Cinar & Onbaşı, 2020).

## 2.2 Género *Listeria*

El género *Listeria* actualmente incluye 20 especies, que se subdividen en dos grupos: (i) *Listeria sensu strictu*, que incluye a *L. monocytogenes*, *L. seeligeri*, *L. marthii*, *L. ivanovii*, *L. welshimeri* y *L. innocua*; grupo (ii) *Listeria sensu lato*, que incluye las especies *L. grayi*, *L. fleischmannii*, *L. weihenstephanensis*, *L. rocourtiae*, *L. floridensis*, *L. cornellensis*, *L. riparia*, *L. aquatica*, *L. grandensis*, *L. newyorkensis*, *L. goaensis*, *L. booriae*, *L. costaricensis* y *L. thailandensis* (Nwaiwu, 2020). Esta división se basa en la relación de las especies con *L. monocytogenes*, la primera especie del género clasificada y las más relevante en términos de salud pública e impacto económico (Orsi & Wiedmann, 2016).

Solamente *L. monocytogenes* y *L. ivanovii* son consideradas patógenas, la primera para el hombre y la segunda para bovinos y rumiantes (Velge & Roche, 2010). En la industria alimentaria suele emplearse la detección *Listeria* spp. como un grupo índice del patógeno *L. monocytogenes* y se usa *L. innocua* como microorganismo subrogado de *L. monocytogenes* debido a la similitud en el comportamiento, tolerancia y origen de las especies de *Listeria* (Hasani *et al.*, 2020).

### 2.2.1 *Listeria monocytogenes*

*L. monocytogenes* fue descubierta a principios de la década de 1920, como causa de una infección sistémica en cobayos y conejos (Murray *et al.*, 1926). No obstante, su origen alimentario se demostró formalmente a mediados de la década de 1980, en el contexto de las investigaciones epidemiológicas de un gran brote en Canadá, que se relacionó con la ingestión de ensalada de col contaminada (Schlech *et al.*, 1983).

Considerando los antígenos somáticos (O) y flagelar (H), las cepas de *L. monocytogenes* pueden ser clasificadas en más de 13 serotipos (1/2a, 1/2b, 1/2c, 3a, 3b, 3c, 4a, 4ab, 4b, 4c, 4d, 4e, 7), no obstante, sobresalen los serotipos 1/2b, 1/2a y 4b como los involucrados en el 96% de las infecciones humanas reportadas (Matle *et al.*, 2019).

*L. monocytogenes* es un bacilo Gram positivo, no esporulado y anaerobio facultativo. Características bioquímicas que permiten su identificación son la prueba de catalasa con reacción positiva, oxidasa negativa y la presencia de *B* hemólisis en agar sangre. Una particularidad que distingue a este patógeno es su notable potencial psicrótrofo, con capacidad de crecimiento a temperaturas desde 1 °C a 45 °C, pH óptimo de 7.0 con límites de 4.5 a 8.0, actividad de agua óptima de 0.97 aunque puede desarrollar en valores de hasta 0.93 y tolerancia a altas concentraciones de sal (Fernández Escartín, 2008).

Es una bacteria ubicua, se encuentra ampliamente distribuida en la naturaleza, se aísla a partir del suelo, agua, materia vegetal y animales, pero particularmente de los ecosistemas relacionados con el procesamiento y manejo en general de los alimentos (Fernández Escartín, 2008). La principal vía de transmisión a los humanos son alimentos contaminados, principalmente carnes, lácteos, alimentos procesados listos para el consumo, frutas y vegetales (Kurpas *et al.*, 2018).

### 2.2.1.1 Patogénesis y factores de virulencia

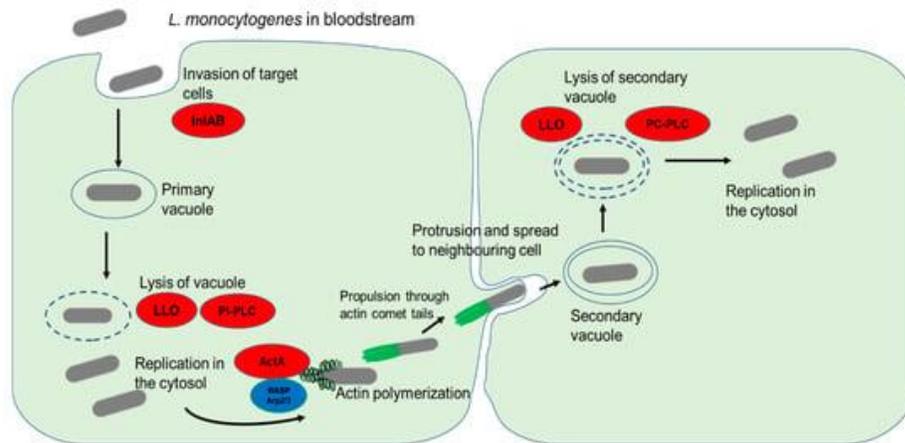
El tracto gastrointestinal es el primer sitio de entrada de *L. monocytogenes* al hospedero, al igual que otros patógenos, atraviesa la barrera intestinal y se multiplica en las células epiteliales, donde si el sistema inmunitario no es capaz de controlar eficientemente la infección, puede continuar su multiplicación y diseminación al torrente sanguíneo y ganglios linfáticos y posteriormente atravesar otras barreras fisiológicas como la hematoencefálica y la placentaria (Lecuit, 2020).

El proceso infeccioso de *L. monocytogenes* comprende varias etapas como la adhesión e invasión de la célula hospedera, el escape de la vacuola fagocítica, multiplicación intracelular y proliferación extracelular (Vera *et al.*, 2013). Durante este proceso, destaca su capacidad de multiplicación en células del sistema inmunitario como monocitos y macrófagos, la evasión de la fagocitosis y la multiplicación y diseminación entre las células (Lecuit, 2005).

En una primera instancia, *L. monocytogenes* invade varios tipos de células, incluidas las células no fagocíticas, mediante la utilización de dos internalinas, *InIA* y *InIB*. La primera se une al receptor E-cadherina localizada en la superficie de varios tipos de células, incluyendo el enterocito, mientras que para *InIB* destaca el receptor para el factor de crecimiento de hepatocito (receptor Met), estas internalinas median la adhesión e internalización del patógeno a través del proceso de fagocitosis (Materreke & Okoh, 2020).

Una vez en el interior de la célula, la vacuola fagocítica es rápidamente lisada por la secreción de la toxina listeriolisina O, codificada por el gen *hylA*, la cual induce la formación de poros en el fagosoma, además actúan dos fosfolipasas C, fosfatidilinositol-PLC y fosfatidilcolina-PLC, codificadas por los genes *plcA* y *plcB* respectivamente, que le permiten escapar de la vacuola fagocítica hacia el citoplasma celular (Figura 1) (Sibanda & Buys, 2022).

En el citoplasma, *L. monocytogenes* se replica rápidamente y produce la proteína de superficie inductora del ensamblaje de actina (ActA), que facilita el movimiento intracelular, permitiendo la invasión a células vecinas; de esta manera, *L. monocytogenes* se replica y propaga dentro del hospedero evitando el espacio extracelular y evadiendo el sistema inmunitario (Disson *et al.*, 2021).



**Figura 1.** Mecanismo de invasión y diseminación celular de *L. monocytogenes*. Tomado de Sibanda & Buys, 2022.

### 2.2.1.2 Listeriosis

La infección por *L. monocytogenes* se denomina listeriosis, considerada una enfermedad transmitida por los alimentos (ETA). Las manifestaciones clínicas de la listeriosis dependen de la susceptibilidad de los individuos, se presentan desde infecciones focales moderadas (no invasiva) hasta infecciones graves (invasiva) como septicemia, meningitis y aborto o la listeriosis del recién nacido en pacientes perinatales (Fan *et al.*, 2019).

La listeriosis no invasiva se caracteriza por síntomas gastroentéricos y febriles leves como diarrea, fiebre, dolor de cabeza y dolor muscular, el período de incubación es de unos pocos días y afecta fundamentalmente a individuos sanos que han ingerido alimentos contaminados con una elevada concentración de *L. monocytogenes* (OMS, 2018a).

En el caso de la listeriosis invasiva, los grupos poblacionales de riesgo incluyen ancianos, niños, mujeres embarazadas y personas inmunodeprimidas donde la severidad de la enfermedad puede ser mayor (Lepe, 2020). La dosis infectante es variable, desde menos de 100 células hasta concentraciones mayores y depende de la cantidad de alimento contaminado consumido, la virulencia de la cepa bacteriana y la susceptibilidad del hospedero (Allard *et al.*, 2019).

La tasa de incidencia de listeriosis es baja comparada con otros patógenos como *Salmonella* spp. y *E. coli*, según la OMS la incidencia anual es de 0.1 a 10 casos por millón (OMS, 2018a), sin embargo, es alarmante la elevada tasa de letalidad reportada que puede variar entre un 20 y 40 % (Muñoz-Gallego *et al.*, 2017). El período de incubación de la enfermedad suele ser de una a dos semanas, pero incluso puede llegar hasta 90 días, lo que dificulta el estudio epidemiológico para identificar el alimento involucrado (OMS, 2018a).

Según estimaciones del CDC (de sus siglas en inglés *Centers for Disease Control and Prevention*) en el periodo de 2015 a 2021 en EE. UU. se reportaron 51 brotes, 446 enfermedades, 384 hospitalizaciones y 56 muertes asociados a este patógeno (CDC, 2023). En la Unión Europea la incidencia reportada de listeriosis es baja; en el año 2018 fue de 0.47 por 100,000 habitantes, en el 2020 se notificaron 5,146 casos transmitidos por alimentos y agua (EFSA, 2021). Dentro de los alimentos frecuentemente involucrados en brotes de listeriosis en los últimos años sobresalen los listos para su consumo y vegetales frescos y congelados (CDC, 2023).

En México la información sobre listeriosis es escasa, no es una enfermedad de declaración obligatoria, lo que limita el conocimiento real de la incidencia de este patógeno (Castañeda-Ruelas *et al.*, 2014).

### 2.3. Prevalencia de *L. monocytogenes* en alimentos

*L. monocytogenes* es un patógeno que contamina comúnmente plantas de procesamiento de alimentos, puede encontrarse en materias primas, el medio ambiente, equipos y en el producto final. En un estudio realizado en 2013 en

Estonia, de un total de 21,574 muestras de alimentos analizadas, 554 resultaron positivas para *L. monocytogenes*, los productos contaminados con mayor frecuencia fueron carne cruda (18.70 %), ensaladas mixtas (18.50 %) y leche cruda (18.10 %) sobresaliendo el serotipo 1/2a en la mayoría de los aislamientos (Kramarenko *et al.*, 2013). En Turquía en 2018 se notificó la prevalencia de *L. monocytogenes* (8.50 %), *L. innocua* (7.00 %), *L. welshimeri* (4.50 %) y *L. seeligeri* (0.50 %) en alimentos listos para consumo; *L. monocytogenes* se aisló con mayor frecuencia de alimentos como carne roja cocida (41.20 %), productos de pollo cocido (23.50 %), productos del mar (17.60 %), ensaladas de verduras (11.80 %) y productos lácteos (5.90 %) (Şanlıbaba *et al.*, 2018).

Estudios más recientes reportan la prevalencia de *L. monocytogenes* en diferentes tipos de alimentos. Abdeen *et al.* (2021) reportaron en Egipto la presencia de este patógeno en alimentos como carne picada (14.00 %), filete de pescado (8.00 %), salchichas (6.00 %) y leche cruda (6.00 %). En otro estudio realizado en Polonia se reportó que la prevalencia de *L. monocytogenes* fue de 10.60 %, los alimentos de mayor contaminación fueron albóndigas (53.00 %), croquetas (45.50 %), ensaladas (5.20 %), sushi (20.00 %), sándwiches (20.00 %), productos de pescado (15.50 %) y productos vegetales como brotes (33.30 %) y zanahoria (10.00 %) (Szymczak *et al.*, 2020).

En México varios autores han reportado la presencia de *L. monocytogenes* tanto en alimentos como en superficies en los entornos de producción de alimentos. En un estudio realizado en 2012, se estableció la incidencia y distribución de este patógeno a lo largo del proceso de producción de una planta procesadora de hortalizas congeladas, se obtuvo una incidencia de *Listeria* spp. y *L. monocytogenes* de 10.04 y 6.69 %, 9.29 y 5.58 % y 28.78 y 27.27 % en producto, superficies de contacto directo y superficies de no contacto con el producto alimenticio respectivamente (Godínez Oviedo *et al.*, 2012). En el 2019 se notificó la presencia de *L. monocytogenes* en lomo de cerdo (15.90 %) y en superficies inertes (20.80 %) en mataderos Tipo Inspección Federal (FIT) en Sonora (Figuroa-López *et al.*,

2019); en el 2021 se reportó la presencia de *L. monocytogenes* en queso fresco (3.33 %), así como su aislamiento de un tanque de leche a granel (Soria-Herrera *et al.*, 2021). También la presencia del patógeno en aguacates Hass comercializados en un mercado de Guadalajara, se obtuvieron aislamientos de *Listeria* spp. (13.80 %), *L. monocytogenes* (8.00 %), *L. innocua* (7.60 %), *L. welshimeri* (1.30 %) y *L. grayi* (0.90 %) (García-Frutos *et al.*, 2020).

2.4 Persistencia de *L. monocytogenes* en entornos de procesamiento de alimentos  
La persistencia de *L. monocytogenes* en los entornos de procesamiento de alimentos se considera un factor determinante que propicia la contaminación de los alimentos. Se ha descrito que este patógeno puede persistir incluso por meses o años, lo que trae como consecuencia una contaminación recurrente a los productos alimenticios y constituye, por tanto, un problema relevante de inocuidad alimentaria (Ferreira *et al.*, 2014). Este patógeno se ha aislado de varios lugares en el entorno de producción de alimentos, como mataderos, desagües, cintas transportadoras, congeladores, ahumaderos, maquinarias de corte y envasado, pisos, paredes, pediluvios y conductos de aire (Mørretrø & Langsrud, 2004).

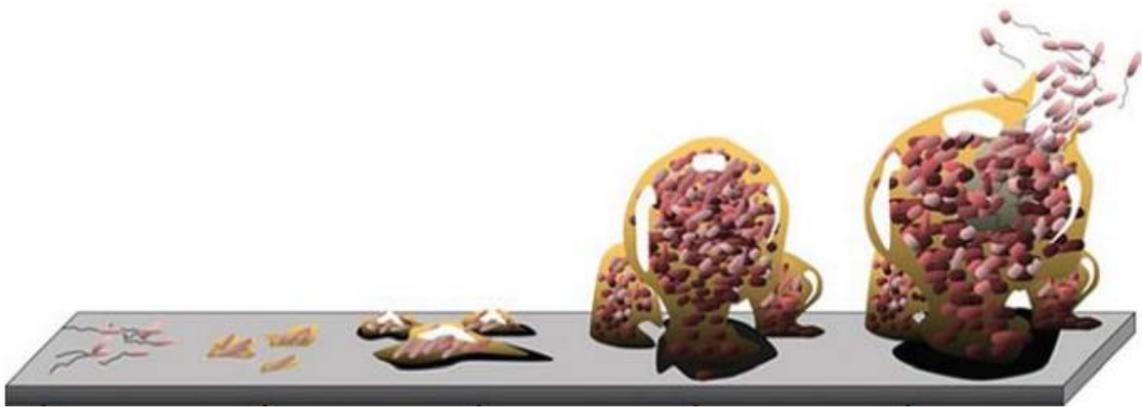
La persistencia de *L. monocytogenes* suele asociarse con inadecuadas prácticas de higiene y una incorrecta implementación de procedimientos operativos estándares de saneamiento (Dufour, 2011). Las dificultades para eliminar completamente células adheridas a superficies de difícil limpieza y desinfección dentro del entorno alimentario, propician la sobrevivencia y eventual desarrollo del microorganismo patógeno. Esta posible explicación es la más aceptada y no la teoría de que pueda haber presencia de cepas con características únicas que le permitan su persistencia en estos entornos (Carpentier & Cerf, 2011).

Por otro lado, otros autores argumentan que la persistencia bacteriana está probablemente relacionada con la formación de biopelículas, condición que le confiere resistencia frente a diferentes factores estresantes como elevadas temperaturas, bajo pH, desecación, rayos ultravioletas y salinidad (Mazaheri *et al.*, 2021). Estudios realizados han sugerido que cepas persistentes muestran una

mayor capacidad de formación de biopelículas en relación con las no persistentes (Borucki *et al.*, 2003).

#### 2.4.1 Formación de biopelículas como mecanismo de persistencia

Las biopelículas son agregados de células bacterianas adheridas entre sí a superficies o interfases, mediante la autoproducción de polímeros extracelulares (William Costeton *et al.*, 1995). El proceso de formación de biopelículas implica varios pasos como la adhesión y deposición sobre la superficie, la secreción de sustancias poliméricas extracelulares (EPS), la maduración y dispersión de la biopelícula (Figura 2) (Giaouris & Simões, 2018).



**Figura 2.** Proceso de formación de biopelículas. Tomado de Giaouris & Simões, 2018.

La adhesión de las células bacterianas a la superficie es un proceso fundamental que se ve influenciado por varios factores como las propiedades químicas y físicas de la superficie celular, del sustrato y la composición del medio circundante (Chmielewski & Frank, 2003). La presencia de estructuras en la superficie celular como flagelos, pilis, adhesinas y cápsula, así como la concentración bacteriana inicial; además las características de la superficie como carga, hidrofobicidad, topografía, presencia de materia orgánica y condiciones ambientales de pH, temperatura, nutrientes y humedad son factores que pueden influir en una mayor adhesión (Zhang *et al.*, 2021; Lezzoum-Atek *et al.*, 2019).

Posterior a la adhesión, las células bacterianas se desarrollan en microcolonias como resultado de la agregación, proliferación celular y la producción de EPS (Chmielewski & Frank, 2003). En biopelículas maduras, el EPS representa más del 90 % de la materia seca, esta matriz está compuesta de polisacáridos, ácidos nucleicos, proteínas, lípidos y otros biopolímeros (Colagiorgi *et al.*, 2017; Flemming & Wingender, 2010). El EPS producido forma una red polimérica tridimensional que interconecta e inmoviliza las células en la biopelícula y las protege contra agresiones externas; también está relacionado con la comunicación célula-célula y la degradación de sustancias (Colagiorgi *et al.*, 2016).

La composición y cantidad de EPS varía según el género y la especie bacteriana, lo que puede determinar la forma y estructura de la biopelícula (Costa *et al.*, 2018). Las biopelículas pueden desarrollarse como una estructura organizada durante la maduración; pueden exhibir una estructura de monocapa o microcolonias de múltiples capas, con canales para la distribución de nutrientes y moléculas de señalización dentro de esta estructura (Sauer *et al.*, 2022).

A partir de biopelículas maduras puede ocurrir la dispersión de células a otras superficies, lo que permite la formación de nuevas microcolonias en otros sustratos (Toyofuku *et al.*, 2015). La dispersión puede ser de forma activa donde el desprendimiento de las células ocurre como respuesta a cambios en el entorno, como el estrés antimicrobiano, la presencia de enzimas que degraden la matriz y falta de nutrientes, o de forma pasiva mediada por fuerzas externas como las fuerzas de corte o erosión (Flemming *et al.*, 2016).

Las células se encuentran densamente empaquetadas en las biopelículas, donde se genera una acumulación de moléculas de señalización, metabolitos y productos de secreción y además ocurre cierta comunicación celular mediada fundamentalmente por el sistema del *Quorum Sensing* (QS), que les permite a las bacterias regular la expresión de genes en respuesta a la densidad celular (Fuqua *et al.*, 1994).

El QS contribuye a la formación y mantenimiento de un alto grado de organización entre las comunidades bacterianas en la biopelícula; mediante este sistema las células regulan su metabolismo y se comunican al sintetizar y detectar pequeñas moléculas de señalización llamadas autoinductores (Skandamis & Nychas, 2012). Estas moléculas de señalización regulan la expresión de genes relacionados con el desarrollo, competencia, motilidad y virulencia de especies bacterianas dentro de la biopelícula (Saxena *et al.*, 2019).

La formación de biopelículas ofrece importantes ventajas a los microorganismos. En primer lugar, la protección contra condiciones adversas del medio ambiente como compuestos químicos antimicrobianos, estrés nutricional y oxidativo, tratamientos térmicos y ácidos, exposición a la luz ultravioleta, cambios de pH, choque osmótico, desecación, además de favorecer la sobrevivencia ante baja disponibilidad de nutrientes (Bridier *et al.*, 2015; Jefferson, 2004). En segundo lugar, promueve la adquisición de nuevos rasgos genéticos mediante la transferencia horizontal de genes entre las comunidades bacterianas en la biopelícula (Madsen *et al.*, 2012).

Las biopelículas formadas en las superficies en contacto con los alimentos representan un relevante problema en la industria alimentaria, pues constituye una fuente de contaminación persistente de bacterias patógenas al alimento, lo que conduce a la transmisión de enfermedades y a una disminución de la vida útil de los productos (Giaouris & Simões, 2018). Además de la importante repercusión en el contexto de la salud pública, también trae como consecuencia daños económicos, estimados como más de 50,000 millones de dólares anuales solo en los EE. UU. (Scharff, 2012).

#### 2.4.2 Formación de biopelículas por *L. monocytogenes*

*L. monocytogenes* muestra alto potencial de adhesión a gran variedad de superficies en contacto con alimentos como poliestireno, polipropileno, vidrio, acero inoxidable, cuarzo, mármol y granito, pudiendo alcanzar concentraciones de  $10^4$ – $10^7$  UFC/cm<sup>2</sup> (Gram *et al.*, 2007; Silva *et al.*, 2008). Se ha notificado su aislamiento de diferentes lugares del ambiente de producción como mataderos, desagües,

cintas transportadoras, congeladores, ahumaderos, maquinaria de corte y envasado, pisos, paredes y conductos de aire (Møretør & Langsrud, 2004).

La capacidad de formación de biopelículas de *L. monocytogenes* difiere entre cepas, las que pueden ser clasificadas como productoras de biopelículas débiles, moderadas y fuertes (Harvey *et al.*, 2007). Las biopelículas de *L. monocytogenes* pueden exhibir diferentes características fenotípicas según las condiciones de cultivo, en condiciones estáticas se observan como una capa homogénea de células y/o microcolonias con una morfología similar a la de las células planctónicas, mientras que en condiciones de flujo continuo se visualizan microcolonias de forma esférica rodeadas por una red de cadenas tejidas de células alargadas (Rieu *et al.*, 2008).

La formación de biopelículas de *L. monocytogenes* varía significativamente de acuerdo a las diferentes condiciones de crecimiento como temperatura y sustrato; se ha descrito que muestra una capacidad de adhesión rápida de solo pocas horas en superficies de acero inoxidable, también muestra mayor capacidad de formación de biopelículas a temperaturas de 4, 12 y 22 °C en superficies de vidrio en comparación con poliestireno y acero inoxidable, mientras que a 37 °C es similar la capacidad de formación en acero inoxidable y vidrio y menor en poliestireno (Di Bonaventura *et al.*, 2008).

Además de las condiciones ambientales, la expresión de determinantes moleculares como factores de motilidad (flagelos y fimbrias), sistemas de transducción de señales como el sistema *LuxS* y el sistema de señalización del QS mediado por péptidos *Agr*, exopolímeros, la proteína asociada a biopelícula (BapL) y segundos mensajeros como el diguanilato cíclico (c-di-GMP) parecen contribuir a una mayor capacidad de formación de biopelícula en *L. monocytogenes* (Renier *et al.*, 2011).

También las interacciones que se establecen en biopelículas mixtas entre diferentes géneros bacterianos y *L. monocytogenes* influye de manera positiva o negativa en

su crecimiento en la biopelícula; puede ocurrir competencia por nutrientes o secreción de agentes antimicrobianos como bacteriocinas que pueden inhibir el desarrollo de *L. monocytogenes* (Guillier *et al.*, 2008). También se ha descrito que la presencia de microorganismos como *Staphylococcus* y *Pseudomonas* spp. pueden influir positivamente, al contrario de otros géneros como *Bacillus* spp. que pueden inhibir la adhesión y formación de biopelículas de múltiples cepas *L. monocytogenes* (Mazaheri *et al.*, 2020).

La formación de biopelículas de *L. monocytogenes* favorece su protección contra gran variedad de factores, como rayos ultravioletas, metales tóxicos, ácidos, desecación, salinidad, compuestos antimicrobianos y desinfectantes (Bucur *et al.*, 2018). Se ha asociado la formación de biopelículas a una mayor resistencia a agentes antimicrobianos, debido probablemente a limitaciones de difusión y penetración del compuesto a través de la matriz de la biopelícula, donde células en las capas inferiores están expuestas a concentraciones muy por debajo de las concentraciones mínimas inhibitorias (Abdallah *et al.*, 2014). También puede haber una expresión alterada de genes, transferencia de genes de resistencia a agentes antimicrobianos o mutaciones, lo que aumenta en general la resistencia a los antimicrobianos y limita la eficacia de estos compuestos contra este patógeno, posibilitando la persistencia del *L. monocytogenes* durante largos períodos de tiempo en los ambientes de producción de alimentos (Banerji *et al.*, 2022; Matereke & Okoh, 2020).

#### 2.4.3 Control de biopelículas de *L. monocytogenes* en la industria alimentaria

Se han implementado diferentes estrategias para el control y erradicación de biopelículas de *L. monocytogenes* en la industria alimentaria, estas se basan fundamentalmente en la inhibición de la adherencia y colonización de superficies, la interferencia con las señales moleculares que modulan el crecimiento de las biopelículas y la desintegración de la matriz de EPS (Da Silva & De Martinis, 2012).

El control de biopelículas de *L. monocytogenes* en plantas de procesamiento de alimentos se realiza principalmente mediante métodos de limpieza y desinfección

de equipos y superficies, no obstante, estos métodos convencionales son más efectivos contra células bacterianas depositadas recientemente en la superficie que sobre las células sésiles (Fagerlund *et al.*, 2017).

Actualmente se investigan nuevas herramientas basadas en enzimas y bacteriófagos, como agentes de control biológico contra biopelículas en ambientes de procesamiento de alimentos. Estudios recientes con tratamientos enzimáticos han mostrado reducciones de aproximadamente 6.9 log UFC/cm<sup>2</sup> para cepas de *L. monocytogenes* (Mazaheri *et al.*, 2020). También se ha descrito la utilización de bacteriófagos con reducciones considerables en la población de *L. monocytogenes* en alimentos y superficies (Figueiredo & Almeida, 2017; Sadekuzzaman *et al.*, 2017); no obstante, hay relativamente poca información disponible sobre estas herramientas.

También el uso de péptidos antimicrobianos como bacteriocinas y compuestos naturales como los aceites esenciales y extractos de hierbas pueden contribuir a controlar la adhesión inicial y la formación de biopelículas por parte de *L. monocytogenes* en superficies abióticas en contacto con alimentos (Desai *et al.*, 2012; Winkelströter *et al.*, 2011).

Los inhibidores de QS también se han descrito como herramientas de biocontrol importantes contra biopelículas; el proceso de inhibición puede ser por diferentes mecanismos como la inhibición de la síntesis, transporte y secreción de moléculas autoinductoras como furanonas halogenadas, N-acil homoserina lactonas y acilasas; se ha sugerido la utilización de estos compuestos en combinación con otras estrategias de control como enzimas y surfactantes para aumentar su eficiencia (Giaouris & Simões, 2018).

Las estrategias de biocontrol actuales contra biopelículas de *L. monocytogenes* parecen prometedoras, no obstante, su implementación resulta costosa, limitando su utilización. Sin embargo, una adecuada implementación de procedimientos de limpieza y desinfección, buenas prácticas de higiene (BPH), buenas prácticas de

manufactura (BPM), procedimientos estandarizados de saneamiento (POES) y un plan de Análisis de Peligros y Puntos Críticos de Control (HACCP de sus siglas en inglés *Hazard Analysis and Critical Control Points*) constituyen una estrategia efectiva para evitar el establecimiento de microorganismos en los ambientes de producción de alimentos (Ferreira *et al.*, 2014).

## 2.5 Desinfectantes en la industria alimentaria

La desinfección es el proceso que consiste en la eliminación de microorganismos patógenos mediante el uso de agentes químicos o físicos. En la industria alimentaria los desinfectantes se utilizan para controlar, reducir e inactivar patógenos transmitidos por los alimentos y reducir los microorganismos de importancia para la salud pública a niveles considerados seguros (Denyer & Stewart, 1998).

Los desinfectantes pueden clasificarse como bactericidas si provocan la muerte del microorganismo o bacteriostáticos si solo limitan su desarrollo. Su mecanismo de acción es amplio, pueden destruir la pared celular, causar daños a nivel citoplasmático, la oxidación de biomoléculas como enzimas, proteínas, ácidos nucleicos, también pueden inhibir el transporte activo de diferentes sustancias a través de la membrana y causar la desnaturalización e inhibición de la síntesis de enzimas involucradas en el metabolismo microbiano (Skowron *et al.*, 2018).

Muchos factores podrían afectar su eficiencia, como, por ejemplo: el tipo y concentración del desinfectante, el tiempo de exposición, los microorganismos objetivo, el tipo de superficie, el pH, la presencia de residuos de alimentos o materia orgánica, la temperatura y la humedad relativa (Cappitelli *et al.*, 2014).

Un desinfectante ideal debe ser de amplio espectro y efectividad, rápida acción, fácil de preparar, soluble en agua, estable en el tiempo y en las disoluciones, compatible con el medio ambiente, no corrosivo, no tóxico, seguro para su uso y económico (Yoo, 2018).

Existen diferentes tipos de desinfectantes empleados en los entornos de procesamiento de alimentos con diferente eficacia y modo de acción. Los

desinfectantes más utilizados en los programas de desinfección incluyen agentes oxidantes como compuestos a base de halógeno, ácido peracético, ozono y peróxido de hidrógeno, soluciones a base de cloro, que incluyen cloro líquido, hipocloritos y cloraminas y compuestos tensoactivos como compuestos de amonio cuaternario (QACs). Las soluciones a base de cloro y QACs como el cloruro de benzalconio son los más comúnmente usados en la industria alimentaria contra *L. monocytogenes* (Carrascosa *et al.*, 2021; Aryal & Muriana, 2019).

#### 2.5.1 Compuestos de amonio cuaternario

Los QACs están clasificados dentro del grupo de los tensioactivos catiónicos. Su estructura química general comprende una porción catiónica compuesta por un átomo de nitrógeno unido a cuatro cadenas alquílicas y una porción aniónica de cloruro o bromuro generalmente (Mohapatra *et al.*, 2023).

Los QACs se clasifican en función de la naturaleza de los grupos alquílicos, la ramificación de la cadena carbonada y la presencia de grupos aromáticos; estas variaciones pueden afectar la actividad antimicrobiana del compuesto en términos de dosis y acción contra diferentes grupos de microorganismos, por ejemplo, longitudes de grupo metilo de 12 y 16 carbonos suelen mostrar la mayor actividad antimicrobiana (Gerba, 2015).

Los principales QACs utilizados en la desinfección en la industria alimentaria incluyen el cloruro de benzalconio o cloruro de alquildimetil bencil amonio que contiene una mezcla de moléculas con longitudes de cadena de 12 y 16 carbonos, cloruro de estearalconio, cloruro de isotiazolio benzalconio, cloruro/bromuro de cetrimonio (cetrimida), cloruro de cetilpiridinio y cloruro de didecildimetilamonio (DeLeo *et al.*, 2020).

La actividad antimicrobiana de los QACs se basa en la interacción con fosfolípidos de membrana y proteínas bacterianas estructurales, la desestabilización de la estructura celular provocando la salida de material intracelular como moléculas de bajo peso molecular, proteínas y ácidos nucleicos, resultando en una lisis rápida de

la célula. Estos compuestos han mostrado un amplio espectro de actividad antimicrobiana y se utilizan generalmente en concentraciones que varían de 50 a 500 ppm (Chapman, 2003).

Los QACs son agentes tensioactivos estables, de baja toxicidad, altamente solubles en compuestos polares y estables en presencia de materia orgánica, lo que los hace muy adecuados para su uso en la industria alimentaria (Bureš, 2019).

Se ha demostrado la eficacia de los desinfectantes a base de QACs contra *L. monocytogenes*, no obstante, varios factores pueden reducir su efectividad, como la presencia de materia orgánica, el crecimiento de biopelículas, una limpieza insuficiente antes de la desinfección y/o un enjuague inadecuado después de este proceso, lo que expone a las bacterias a concentraciones subletales del desinfectante y podría conducir a una presión selectiva para la adquisición de genes de resistencia o a la adaptación de bacterias inicialmente susceptibles (Aarestrup *et al.*, 2007; Aase *et al.*, 2000).

## 2.6 Resistencia bacteriana a desinfectantes

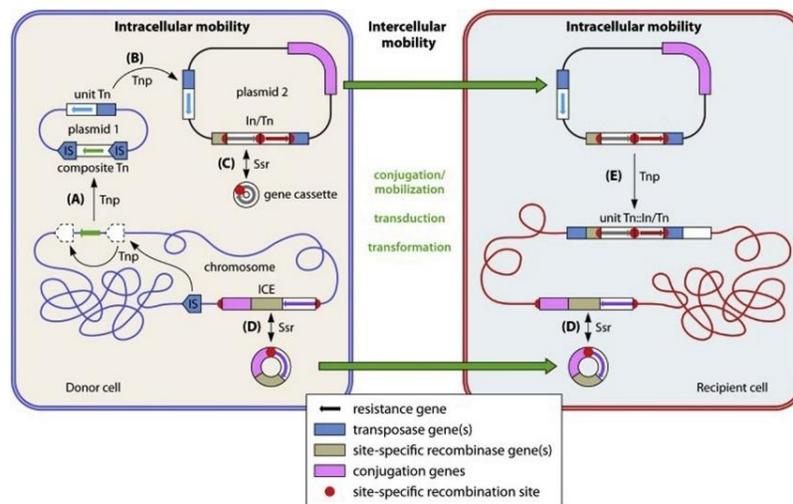
En la industria alimentaria, la resistencia es la capacidad de un microorganismo de crecer o sobrevivir a una mayor concentración de un compuesto tóxico en comparación con la mayoría de las cepas dentro de una especie o género (Sundheim *et al.*, 1998).

La resistencia de los microorganismos a los desinfectantes incluye dos mecanismos fundamentales: la resistencia intrínseca y adquirida. La resistencia intrínseca es la capacidad natural de las células bacterianas de presentar una menor sensibilidad a un agente específico, debido a alteraciones fenotípicas, bombas de expulsión del compuesto antimicrobiano y la inactivación del desinfectante; mientras que la resistencia extrínseca o adquirida resulta de cambios genéticos en una célula bacteriana, debido a mutaciones o a la adquisición de elementos genéticos móviles como plásmidos y transposones (Russell, 1999).

La resistencia que adquieren las bacterias inmersas en biopelículas a los desinfectantes se considera una forma de resistencia fenotípica, ya que es inducida principalmente por una adaptación fisiológica al modo de vida de la biopelícula y puede perderse o reducirse notablemente cuando las células vuelvan al estado planctónico (Rodríguez-López *et al.*, 2018).

Otro mecanismo de resistencia intrínseco se debe a la presencia de bombas de expulsión ubicadas a nivel de membrana celular, que captan al compuesto antimicrobiano y lo expulsan hacia el exterior celular, evitando su acción. También puede ocurrir la inactivación del desinfectante por reacciones enzimáticas, debido a modificaciones estructurales en el sitio de acción, limitándose la interacción entre el desinfectante y la superficie celular (Mc Carlie *et al.*, 2020).

En el caso de la resistencia adquirida, los mecanismos de transferencia de genes de resistencia a desinfectantes no están tan esclarecidos, no se conoce del todo si los elementos genéticos pueden transferirse a través conjugación, transducción o transformación (Partridge *et al.*, 2018). Los elementos genéticos como transposones, secuencias de inserción, integrones y casetes de genes pueden moverse dentro o entre moléculas de ADN, mientras que entre bacterias puede haber transferencia de secuencias de inserción, plásmidos y bacteriófagos portadores de genes de resistencia (Figura 3). Las interacciones entre estos elementos genéticos móviles es un punto clave que puede causar la rápida aparición de resistencia bacteriana a los desinfectantes (Partridge *et al.*, 2018).



**Figura 3.** Elementos genéticos movilizados por transferencia horizontal intracelular e intercelular de genes entre una célula donante y una célula receptora. Tomado de Partridge *et al.* (2018).

## 2.6. Resistencia de *L. monocytogenes* a compuestos de amonio cuaternario

La resistencia a los desinfectantes de células de *L. monocytogenes* inmersas en biopelículas puede asociarse a una menor penetración del desinfectante en la biopelícula, a una fisiología alterada de las células de la biopelícula, a la protección en biopelículas de especies mixtas o a la ocurrencia de células persistentes (Yuan *et al.*, 2021). Las cepas de *L. monocytogenes* que son resistentes a los QACs pueden formar incluso biopelículas más rápido que las cepas sensibles, lo que aumenta la probabilidad de su supervivencia (Nakamura *et al.*, 2013).

La resistencia de *L. monocytogenes* a estos compuestos antimicrobianos conlleva a alteraciones fenotípicas como el estado viable no cultivable (VBNC) y modificaciones en su superficie celular (Mereghetti *et al.*, 2000; Noll *et al.*, 2020). Se ha descrito que dicha resistencia está determinada genéticamente en lugar de una adaptación fenotípica (Noll *et al.*, 2020).

La transferencia horizontal de genes asociados con la resistencia a QACs entre especies no patógenas del género *Listeria* como *L. innocua* y *L. welshimeri* a *L. monocytogenes* puede ocurrir, e ilustra que las cepas no patógenas encontradas

comúnmente en plantas de procesamiento de alimentos y que están expuestas con mayor frecuencia al desinfectante, pueden constituir un reservorio importante de genes de resistencia (Carvalho *et al.*, 2019).

Las cepas de *L. monocytogenes* con resistencia genotípica a los QACs pueden tener mutaciones que conducen a una reducción de la permeabilidad celular (Mereghetti *et al.*, 2000). Por ejemplo, las cepas resistentes pueden tener modificaciones en los ácidos grasos y fosfolípidos de la membrana (Fox *et al.*, 2011), que puede conducir a una superficie celular más aniónica e hidrofóbica, lo que dificulta que los QACs atraviesen la membrana y entren en la célula (Bonazzi *et al.*, 2009).

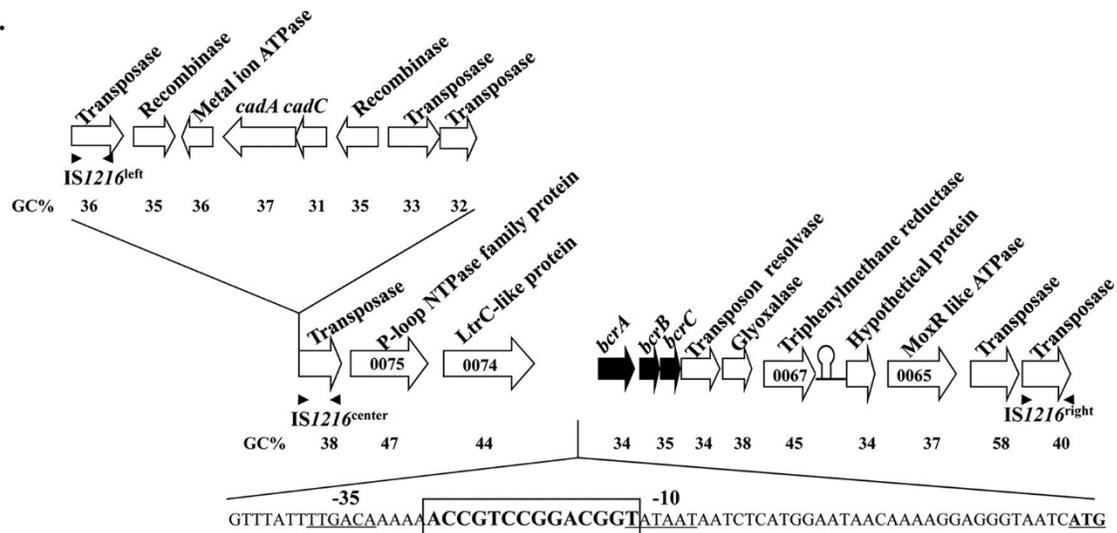
La tolerancia de *L. monocytogenes* al cloruro de benzalconio varía entre las cepas (Aase *et al.*, 2000; Mereghetti *et al.*, 2000; Heir *et al.*, 2004). Los mecanismos involucrados en la alta tolerancia de *Listeria* a los QACs no están muy esclarecidos del todo, sin embargo, se conoce de la presencia de determinantes genéticos y de sistemas de bombas de expulsión que han sido encontrados en la mayoría de los aislamientos resistentes (Martínez-Suárez *et al.*, 2016).

Se han identificado varios genes de resistencia a QACs encontrados generalmente en elementos genéticos móviles como plásmidos o transposones y que codifican para proteínas responsables de la expulsión de estos compuestos antimicrobianos. Entre los principales marcadores genéticos descritos sobresalen los genes *qacH* y *bcrABC* (Elhanafi *et al.*, 2010; Müller *et al.*, 2013).

Los genes de resistencia a QACs denominados *qacA* y *qacB* se encuentran en plásmidos grandes y codifican la parte proteica de la superfamilia de facilitadores principales (MFS), mientras que los genes denominados *smr*, *qacG*, *qacH* y *qacJ* se encuentran en plásmidos pequeños de menos de 3 kb y codifican la parte proteica de la familia de resistencia a multifármacos (SMR). Todas las proteínas codificadas por estos genes de resistencia están incrustadas en la membrana (Bragg *et al.*, 2014).

El casete *bcrABC* se identificó por primera vez en un plásmido grande (pLM80) identificado en las cepas implicadas en el brote de listeriosis de perros calientes de 1998-1999. Este casete parece ser parte de un transposón compuesto que también incluye genes que confieren resistencia al cadmio (Figura 4) (Elhanafi *et al.*, 2010). Varias investigaciones han reportado la transferencia del plásmido que contiene al gen *bcrABC* entre especies de *Listeria* spp. (Katharios-Lanwermeier *et al.*, 2012).

A.



**Figura 4.** Organización genética de la región del casete de resistencia *bcrABC* en el plásmido pLM80 de *L. monocytogenes*. Tomado de Elhanafi *et al.* (2010)

En un estudio reciente se determinó la presencia de los genes *qacH* y *bcrABC* en cepas de *Listeria* spp. aisladas a partir de muestras ambientales colectadas en una planta procesadora de hortalizas congeladas. En dicha investigación no se detectó la presencia del gen *qacH*, mientras que el gen *bcrABC* estuvo presente en el 46 % de las cepas, específicamente en cepas de *L. grayi* (43 %), *L. innocua* (45 %), *L. ivanovii* (40 %) y *L. monocytogenes* (52 %); cepas de *L. innocua* transfirieron el gen *bcrABC* a *L. monocytogenes*, aunque este no se expresó de manera fenotípica bajo las condiciones experimentales (Vega Iturbe, 2022).

La tolerancia de *Listeria* spp. a estos compuestos se ha asociado también a la sobreexpresión de bombas de eflujo endógenas debido a mutaciones en elementos reguladores, lo que puede ocurrir debido a la exposición a los QACs o al estrés

inducido por estos compuestos (Tezel y Pavlostathis, 2015). Estas bombas suelen estar codificadas cromosómicamente y afectan a un amplio espectro de compuestos antimicrobianos; se conoce de dos genes endógenos que codifican para bombas de expulsión de múltiples fármacos (genes *mdrL* y *lde*) (Martínez-Suárez *et al.*, 2016).

La bomba de eflujo *MdrL* puede extruir antibióticos, metales pesados y bromuro de etidio (EtBr) y la bomba *Lde* está asociada con la resistencia a las fluoroquinolonas, naranja de acridina y al EtBr; estudios han reportado la sobreexpresión de estos genes en cepas resistentes a QACs (Blair *et al.*, 2014). No obstante, en otras investigaciones se ha indicado que la presencia de estos genes no parece ser suficiente para impartir resistencia a los desinfectantes o antibióticos, si no que están involucrados en la adaptación de cepas sensibles de *L. monocytogenes* a cloruro de benzalconio y a otros QACs (Romanova *et al.*, 2006). En otro estudio también se observó que la expresión del gen *emrE* que codifica también para una bomba de expulsión de compuestos antimicrobianos puede aumentar la tolerancia de *L. monocytogenes* a los QACs (Kovacevic *et al.*, 2016).

A pesar de los múltiples estudios ya realizados, no queda del todo esclarecido el papel que desempeñan exactamente los determinantes genéticos identificados hasta el momento en la resistencia de *L. monocytogenes* a QACs.

### 3. JUSTIFICACIÓN

El consumo de hortalizas congeladas aumenta notablemente en el mundo, al igual que el número de brotes de enfermedad asociados a este tipo de productos, sobresaliendo *L. monocytogenes* como uno de los patógenos de mayor relevancia por la letalidad de la enfermedad que ocasiona en personas susceptibles.

*L. monocytogenes* es una bacteria ubicua, psicrótrofa y con capacidad de formación de biopelículas en variadas superficies. Esta potencial capacidad, limita la acción de desinfectantes como los QACs, debido a una limitada difusión y penetración de estos compuestos en las células y a la transferencia de genes de resistencia entre las poblaciones bacterianas inmersas en las biopelículas.

Las especies no patógenas de *Listeria* también colonizan frecuentemente los ambientes de producción de alimentos y se ha descrito la posibilidad de intercambio de genes de resistencia a QACs entre especies de *Listeria* spp., lo que podría favorecer la persistencia de la especie patógena en los entornos de procesamiento de alimentos.

Hasta el momento, la información sobre los mecanismos de transferencia y expresión de genes de resistencia a QACs, no está del todo esclarecido. Por lo tanto, es necesario realizar más estudios para establecer si la presencia, transferencia y expresión de estos genes es determinante en la resistencia bacteriana a estos desinfectantes, lo que permitiría mejorar el control del patógeno *L. monocytogenes* en la industria alimentaria.

## 4. OBJETIVOS

### 4.1 Objetivo general

Determinar la prevalencia y distribución de cepas de *Listeria* spp. portadoras de genes de resistencia a QACs en un ambiente de producción de hortalizas congeladas y evaluar factores que influyen en la transferencia de genes entre especies del género *Listeria*.

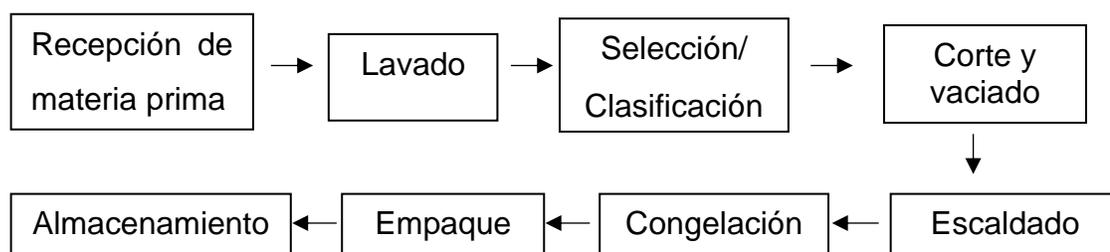
### 4.2 Objetivos específicos

1. Determinar la prevalencia y la distribución de cepas de *Listeria* spp. en un ambiente de producción de hortalizas congeladas.
2. Detectar la presencia de genes asociados con la resistencia a QACs en cepas de *Listeria* spp.
3. Evaluar la resistencia fenotípica a QACs de cepas de *L. monocytogenes* portadoras y no portadoras de genes de resistencia al desinfectante.
4. Evaluar el efecto de la temperatura y substrato en la probabilidad de transferencia de genes de resistencia a QACs entre cepas de *Listeria* spp. y *L. monocytogenes* en cultivos mixtos.
5. Evaluar la resistencia fenotípica a QACs de cepas de *L. monocytogenes* receptoras de genes de resistencia al desinfectante.

## 5. MATERIALES Y MÉTODOS

### 5.1 Descripción del sitio de muestreo

Este estudio se realizó en colaboración con una empresa mexicana dedicada a la producción de alimentos congelados: frutas, verduras y productos elaborados. La empresa procesa hortalizas como brócoli, coliflor, espinaca, zanahoria, entre otros destinados principalmente a la exportación. El procesamiento de hortalizas congeladas incluye diferentes pasos que se muestran en la Figura 5.



**Figura 5.** Etapas de la producción de hortalizas congeladas.

La desinfección de superficies inertes como pisos y paredes se lleva a cabo mediante la aplicación de detergentes y desinfectantes como ácido peracético y sales cuaternarias de amonio fundamentalmente.

### 5.2 Recolección de muestras ambientales

Primeramente, se desarrolló una evaluación observacional dentro de la empresa para conocer el proceso de producción y se establecieron puntos de muestreo en las áreas de procesamiento de corte y vaciado, escaldado y congelación y empaque.

Durante el periodo comprendido entre septiembre y noviembre de 2023, se realizaron tres muestreos longitudinales en las zonas establecidas como puntos de muestreo. Se tomaron muestras ambientales que incluyeron pisos, coladeras, paredes, desagües u otros tipos de muestras correspondientes a zonas de difícil limpieza consideradas relevantes en la investigación.

La recolección de las muestras se realizó con una esponja estéril (Nasco Whirl-Pak<sup>®</sup>, USA) previamente humedecida en 10 mL de caldo neutralizante (CN; Dibico<sup>®</sup>, México) y se almacenaron en bolsas estériles. Antes de muestrear se exprimieron las esponjas en la bolsa para eliminar el exceso de caldo y se frotó la esponja horizontal y verticalmente 10 veces sobre la superficie a muestrear (aproximadamente 100 cm<sup>2</sup>). Las muestras se transportaron desde la empresa hasta el laboratorio LECRIMA en hieleras con geles refrigerantes para ser analizadas de manera inmediata.

### 5.3 Detección de *L. monocytogenes* y *Listeria* spp.

En las muestras recolectadas se investigó la presencia de *L. monocytogenes* y *Listeria* spp. mediante el método descrito en el Manual Analítico Bacteriológico (BAM por sus siglas en inglés *Bacteriological Analytical Manual*) (BAM, 2022). Se adicionaron 225 mL de caldo de enriquecimiento tamponado para *Listeria* (BLEB; Neogen<sup>®</sup>) en la bolsa con la esponja utilizada en el muestreo, se homogeneizaron las muestras en un homogeneizador mecánico (Stomacher, Bag Mixer<sup>®</sup> 400 Interscience Inc) por 1 min a velocidad media y se incubaron a 30 °C por 4 h. Posteriormente en condiciones asépticas se adicionaron los agentes selectivos en una concentración final en el medio de 10 mg/L de acriflavina, 50 mg/L cicloheximidina y 40 mg/L ácido nalidíxico, se mezclaron y continuó la incubación a 30 °C por 24-48 h.

Al término del tiempo de incubación se estirió el cultivo en dos medios selectivos y diferenciales. El agar Oxford modificado para *Listeria* (MOX; Acumedia, USA) se incubó a 36 °C por 24-48 h; este medio contiene esculina y las colonias típicas de especies de *Listeria* se observan de aproximadamente 1 mm de diámetro, color gris a negro rodeadas de un halo negro. Como segundo medio selectivo se utilizó el agar Rapid'*L.mono* (RLM; Biorad<sup>®</sup>) y las placas se incubaron a 36 °C por 24-48 h; este medio permite la distinción de las seis especies del género *Listeria* más comunes a través de la presencia de una fosfolipasa específica para fosfatidil inositol (PI-PLC) que genera la formación de colonias azul/verdosas y por la

capacidad para fermentar el monosacárido xilosa lo que hace virar el indicador del medio produciéndose halos amarillos alrededor de las colonias. Después del periodo de incubación se realizó la lectura de las placas y se registraron los resultados obtenidos según lo mostrado en la Tabla 1.

**Tabla 1.** Coloración de las colonias para cepas de *Listeria* spp. en el agar cromogénico RLM.

Especie	PI-PLC	Xilosa	Coloración de las colonias
<i>L. grayi</i>	-	-	Blancas
<i>L. innocua</i>	-	-	Blancas
<i>L. ivanovii</i>	+	+	Azul/verdosas con halo amarillo
<i>L. monocytogenes</i>	+	-	Azules
<i>L. seeligeri</i>	-	+	Blancas con halo amarillo
<i>L. welshimeri</i>	-	+	Blancas con halo amarillo

Las cepas de *Listeria* spp. y *L. monocytogenes* se aislaron en agar soya tripticaseína (AST; Dibico®, México) suplementado con 0.6 % de extracto de levadura (EL; BD Bioxon®, México) (ASTEL).

### 5.3.1 Confirmación de *L. monocytogenes* y *Listeria* spp. mediante PCR-Múltiple

Se realizó la confirmación de las especies de *Listeria* mediante un método de PCR-Múltiple ya estandarizado en el grupo de trabajo (Vega Iturbe, 2022). Los cebadores que se emplearon se listan en la Tabla 2.

A partir de las cepas presuntivas a las diferentes especies de *Listeria* aisladas en el medio ASTEL en el apartado anterior 5.3, se inoculó una colonia de cada cepa en un tubo con 3 mL de caldo soya tripticaseína (CST; Dibico®, México) suplementado con extracto de levadura (CSTEL) y se incubó a 36 °C por 24 h. Posterior a la incubación se transfirió 1 mL a un tubo Eppendorf estéril, se centrifugó por 3 min a 12 000 g (Centrífuga; Dynamica, Dynam-D3-V15U-110), se decantó el sobrenadante y se adicionó 1 mL de solución salina isotónica estéril (SSI; NaCl, 0.85%). Se repitió el mismo procedimiento de centrifugación y el pellet se resuspendió en 1 mL de agua destilada estéril. La suspensión se colocó en un

termobloque (Eppendorf, Thermo ST AT Plus) a 95 °C por 15 min y se enfrió en hielo por 10 min. Posteriormente se centrifugó nuevamente por 3 min a 12 000 g y se extrajo el sobrenadante que contenía el ADN, el cual se conservó a -20 °C hasta su posterior uso.

**Tabla 2.** Iniciadores utilizados para el PCR-Múltiplex

Especie	Primer	Secuencia (5'-3')	Amplicón (pb)	Ref.
Género	prs-F	GCTGAAGAGATTGCGAAAGAAG	370	(Doumith <i>et al.</i> , 2004)
	prs-R	CAAAGAAACCTTGGATTTGCGG		
<i>L. grayi</i>	JOgrayi-F	GCGGATAAAGGTGTTCCGGGTCAA	201	(Ryu <i>et al.</i> , 2013)
	JOgrayi-R	ATTTGCTATCGTCCGAGGCTAGG		
<i>L. innocua</i>	lin0464-F	CGCATTTATCGCCAAAACCTC	749	(Liu <i>et al.</i> , 2003)
	lin0464-R	TCGTGACATAGACGCGATTG		
<i>L. ivanovii</i>	liv22-228-F	CGAATTCCTTATTCACTTGAGC	463	(Liu <i>et al.</i> , 2004)
	liv22-228-R	GGTGCTGCGAACTTAACTCA		
<i>L. monocytogenes</i>	lomo1030-F	GCTTGTATTCACTTGGATTTGTCTGG	509	(Ryu <i>et al.</i> , 2013)
	lomo1030-R	ACCATCCGCATATCTCAGCCAACT		
<i>L. seeligeri</i>	Iseelin-F	GTACCTGCTGGGAGTACATA	673	
	Iseelin-R	CTGTCTCCATATCCGTACAG		
<i>L. welshimeri</i>	lwe1801-F	CGTGGCACAATAGCAATCTG	281	
	lwe1801-R	GACATGCCTGCTGAACTAGA		

En una campana de flujo laminar se preparó la mezcla de reacción siguiendo las especificaciones listadas en la Tabla 3. Posteriormente se transfirieron 23 µL de la mezcla de reacción a un tubo Eppendorf y se adicionaron 2 µL del ADN bacteriano. Se realizó un PCR con desnaturalización inicial a 95 °C por 5 min, seguido de 30 ciclos de desnaturalización a 95 °C por 30 s, alineamiento a 60 °C por 60 s, extensión a 72 °C por 60 s y una extensión final a 72 °C por 5 min.

**Tabla 3.** Mezcla de reacción para PCR-Múltiplex de *Listeria* spp.

PCR-Múltiplex	
Volumen (µL)	Componentes
1.2	Agua libre de nucleasas
12.0	GoTaq Green PCR Master mix (Promega®, México)
0.4	prs-F (10 µM)
0.4	prs-R (10 µM)
0.6	lmo1030-F (10 µM)
0.6	lmo1030-R (10 µM)
0.8	liv22-228-F (10 µM)
0.8	liv22-228-R (10 µM)
0.6	JO grayi-F (10 µM)
0.6	JO grayi-R (10 µM)
0.8	lin0464-F (10 µM)
0.8	lin0464-R (10 µM)
1.2	lseelin-F (10 µM)
1.2	lseelin-R (10 µM)
0.5	lwe1801-F (10 µM)
0.5	lwe1801-R (10 µM)

La detección de los productos amplificados se realizó mediante electroforesis en gel de agarosa al 1.0 % (Agarosa ultrapura, Bioline®) teñido con *Sybr safe gel DNA stain* (Invitrogen®, USA). Las condiciones de la corrida electroforética fueron de 100 V durante 30 min para lograr una adecuada separación de las bandas, se reveló el gel en un fotodocumentador (Enduro GDS, Labnet) y se identificaron las especies según el peso molecular del amplicón generado (ver Tabla 2).

Las cepas que resultaron positivas para *Listeria* spp. y *L. monocytogenes* mediante la identificación bioquímica y molecular, se almacenaron a -70 °C en CST con 10 % de glicerol hasta su posterior uso.

#### 5.4 Detección de genes asociados con la resistencia a QACs

La presencia de genes de resistencia a QACs (genes *qacH* y *bcrABC*) en las cepas de *Listeria* spp. aisladas se detectó mediante el ensayo de PCR de punto final descrito por Møretø *et al.* (2017) con algunas modificaciones. Brevemente, se realizó el procedimiento de extracción de ADN bacteriano descrito en el apartado 5.3.1.

Para la amplificación de los genes *qacH* y *bcrABC* se utilizaron los cebadores descritos en la Tabla 4. La mezcla de reacción incluyó 18 µL de *Gotaq Green Master Mix* (Promega, México), los cebadores se usaron a una concentración de 0.2 µM y se añadió 2 µL de ADN para completar un volumen final de 20 µL. Las reacciones se realizaron en un termociclador (Applied Biosystems, USA), las condiciones de ciclado para el gen *qacH* fueron las siguientes: 15 min de desnaturalización inicial a 95 °C, 30 ciclos: desnaturalización a 94 °C por 30 s, alineamiento a 56 °C por 90 s, extensión a 72 °C por 30 s y una etapa de extensión final a 72 °C por 10 min. Para las condiciones de termociclado del gen *bcrABC*, la temperatura de alineamiento de los cebadores fue a 60 °C y la extensión se realizó durante 90 s.

**Tabla 4.** Cebadores que se emplearon en la detección de genes de resistencia a QACs

Gen	Primer	Secuencia 5'-3'	Pares de bases (pb)	Referencia
<i>qacH</i>	<i>qacH</i> fwd	ATG TCA TAT CTA TAT TTA GC	366	(Müller <i>et al.</i> , 2013)
	<i>qacH</i> rev	TCA CTC TTC ATT AAT TGT AAT AG		
<i>bcrABC</i>	BcF	GAATGGATCCTTCAATTAGATCGAG GCACG	1312	(Elhanafi <i>et al.</i> , 2010)
	BcR	GTATGAATTCGTATAATCCGGATGC TGCCC		

Los productos amplificados se visualizaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 0.9 % teñido con *Sybr safe gen DNA stain*, la corrida de los productos amplificados de los genes *qacH* y *bcrABC* se realizó a 100 V por 30 min.

Las cepas de *Listeria* spp. y *L. monocytogenes* que resultaron portadoras de los genes de resistencia se conservaron a -70 °C en CST con 10 % de glicerol hasta su posterior uso.

5.5 Evaluación de la resistencia fenotípica a QACs de cepas de *L. monocytogenes* portadoras y no portadoras de genes de resistencia en medio de cultivo sólido.

Se utilizó el desinfectante formulado a base de sales cuaternarias de quinta generación BETA QUAT 4 (Beta Procesos, SA de CV, México) en diferentes concentraciones (50, 200, 500 y 1000 ppm). El día del experimento se prepararon las soluciones según las especificaciones del producto y se verificaron mediante titulación química por el método del ferricianuro (Anexo 1) (EPA, 1982).

#### 5.5.1 Preparación de los inóculos

A partir de los cultivos de los aislados de *L. monocytogenes* conservados en ultracongelación, se realizó una transferencia (asada de aproximadamente 10 µL) a CST y se incubaron por 24 h a 36 °C. Después de la incubación los cultivos se estriaron en ASTEL y se incubaron por 24 h a 36 °C. Finalizada la incubación, de cada placa se tomaron varias colonias y se preparó una suspensión bacteriana en SSI a una turbidez equivalente al 0.5 de la escala Mc-Farland ( $1 \times 10^8$  células). Además, con la finalidad de comparar la resistencia fenotípica a QACs de cepas aisladas de otros ambientes de producción diferentes al ambiente de estudio, se incluyeron la cepa de referencia *L. monocytogenes* ATCC 19115, cepas de *L. monocytogenes* aisladas del ambiente de producción de queso ranchero (Q12, Q16, Q19), procesamiento de aguacate (A80) y brócoli (B79) de las cuales se preparó una suspensión bacteriana del mismo modo descrito previamente.

#### 5.5.2 Método de difusión en agar de pozo

De cada suspensión bacteriana se inocularon 5 µL en tubos con 10 mL de ASTEL atemperados a 45 °C, se homogeneizaron en vortex y vertieron en cajas Petri estériles que se dejaron solidificar por 10 min. En cada caja ya solidificada se realizaron cuatro perforaciones (6 mm de diámetro) con pipetas Pasteur estériles y se depositaron en cada pozo 15 µL de BETA QUAT 4 en diferentes concentraciones

(50, 200, 500 y 1000 ppm). Las placas se incubaron por 24 h a 36 °C y se midieron con una regla los diámetros de los halos de inhibición (mm) de la zona alrededor de cada perforación.

#### 5.5.3 Método de difusión en agar con discos

De cada suspensión bacteriana se inocularon 5 µL en tubos con 10 mL de ASTEL atemperados a 45 °C, se homogeneizaron en vortex por 8 s y vertieron en cajas Petri estériles que se dejaron solidificar por 10 min. Sobre discos de papel de filtro estériles (6 mm de diámetro) se depositaron 15 µL de diferentes concentraciones de BETA QUAT 4 (50, 200, 500 y 1000 ppm), se secaron por 10 min y colocaron sobre la superficie de la placa ya solidificada. Las placas se incubaron por 24 h a 36 °C y se midieron los diámetros de los halos de inhibición (mm) de la zona alrededor de cada disco.

#### 5.5.4 Clasificación de las cepas

Las cepas se clasificaron en sensibles (>24 mm), sensibles intermedias (17-24 mm) y resistentes (<17 mm) tomando como puntos de corte los diámetros de inhibición de la cepa de referencia *L. monocytogenes* ATCC 19115 con la mayor concentración del desinfectante BETA QUAT 4 (1000 ppm).

### 5.6 Evaluación de la resistencia fenotípica de *L. monocytogenes* a QACs en suspensión y acero inoxidable

#### 5.6.1 Cepas

En esta serie de experimentos se emplearon tres cepas de *L. monocytogenes* aisladas de la empresa seleccionadas en función de la presencia de los genes *bcrABC* y *qacH* de resistencia a QACs (aislado portador de un gen, de los dos genes o de ningún gen de resistencia) y con fines comparativos la cepa de colección *L. monocytogenes* ATCC 19115 y dos cepas aisladas de otros ambientes de producción (no portadoras de los genes *bcrABC* y *qacH*).

#### 5.6.2 Preparación de los inóculos

A partir del vial mantenido en ultracongelación, las cepas seleccionadas de *L. monocytogenes* se sembraron en CSTELE e incubaron por 24 h a 36 °C. Posterior a

la incubación de cada cepa se tomó una asada (aproximadamente 10 µL) y se inoculó en 10 mL de CSTEEL e incubaron nuevamente por 24 h a 36 °C. Finalizada la incubación, con la finalidad de concentrar cada cepa y obtener una suspensión bacteriana con concentraciones mayores a 9 Log UFC/mL, cada cepa se centrifugó a 12 000 g por 3 min, se decantó el sobrenadante y el pellet se resuspendió en 3 mL de agua destilada estéril.

#### 5.6.3 Aplicación de los tratamientos de desinfección en suspensión

Se tomó como base la NMX-BB-040-CFSI-1999 con algunas modificaciones. De cada suspensión bacteriana (apartado 5.6.2) se inocularon 100 µL en 9.9 mL del desinfectante BETA QUAT 4 (200 ppm) y se dejaron en contacto durante 30 s. Rápidamente se transfirió 1 mL de la suspensión a caldo neutralizante (CN; Dibico®), se realizaron diluciones decimales seriadas y se cuantificó la población sobreviviente mediante vaciado en placas de ASTEL. Las placas se incubaron por 24 h a 36 °C y se cuantificó la población sobreviviente, así como la reducción logarítmica de acuerdo con la siguiente fórmula:

$$\text{Reducción Log (UFC/mL)} = I - S$$

Donde:

I= Población inicial Log (UFC/mL)

S =Población sobreviviente Log (UFC/mL)

#### 5.6.4 Aplicación de los tratamientos de desinfección en acero inoxidable

De cada suspensión bacteriana (apartado 5.6.2) se inocularon 100 µL en placas de acero inoxidable estériles (2.0 x 2.0 cm), se dejaron secar por 35 min y se colocaron asépticamente con unas pinzas estériles dentro de tubos Eppendorf que contenían 10 mL del desinfectante BETA QUAT 4 (200 y 500 ppm) y se dejaron en contacto durante 30 s y 2 min. De manera aséptica con unas pinzas estériles rápidamente se transfirió la placa de acero inoxidable a CN, se homogenizó en vortex por 60 s, se realizaron diluciones decimales seriadas y se cuantificó la población sobreviviente mediante vaciado en placas de ASTEL. Las placas se incubaron por 24 h a 36 °C y

se cuantificó la población sobreviviente, así como la reducción logarítmica de acuerdo con la fórmula descrita previamente.

### 5.7 Evaluación del efecto de la temperatura y sustrato en la transferencia de genes asociados con la resistencia a QACs en cultivos mixtos de *Listeria* spp. y *L. monocytogenes*

La evaluación inicial de la capacidad de las cepas de *Listeria* para transferir genes de resistencia a QACs se realizó en suspensión en CSTEL y en un extracto vegetal

#### 5.7.1 Preparación del extracto vegetal

Se preparó un extracto vegetal empleando espinaca congelada (CAMPO VIVO) a una concentración 1:10 (p/v) con agua desionizada y se sometió a un proceso de escaldado a 100 °C por 60 s. Posteriormente la mezcla se esterilizó por filtración de membrana (0.45 µm). A esta suspensión se le denominó extracto vegetal (EV) y se conservó en congelación hasta su posterior uso.

#### 5.7.2 Preparación de los cultivos mixtos e inoculación

A partir de los aislados del apartado 5.4 se seleccionaron dos cepas de *L. innocua* portadoras del gen *bcrABC* y dos de *L. monocytogenes* no portadoras. Los criterios de selección fueron la especie (*Listeria* spp. donante y *L. monocytogenes* receptora), la presencia de los genes *bcrABC* y *qacH* (*L. innocua* portadora del gen *bcrABC* y *L. monocytogenes* no portadora) y en los aislados de *L. monocytogenes* se consideró la susceptibilidad a BETA QUAT 4 mediante el método de difusión en agar de pozo (aislados más sensibles).

Se prepararon cuatro tipos de cultivos mixtos:

- Cultivo mixto 1 (CM1): *L. innocua* portadora del gen *bcrABC* (Cepa YCD\_LIN001) y *L. monocytogenes* (Cepa YCD\_LM021) no portadora resistente a rifampicina (200 ppm)
- Cultivo mixto 2 (CM2): *L. innocua* portadora del gen *bcrABC* (Cepa YCD\_LIN001) y *L. monocytogenes* (Cepa YCD\_LM022) no portadora resistente a rifampicina (200 ppm)

- Cultivo mixto 3 (CM3): *L. innocua* portadora del gen *bcrABC* (Cepa YCD\_LIN003) y *L. monocytogenes* (Cepa YCD\_LM021) no portadora resistente a rifampicina (200 ppm)
- Cultivo mixto 4 (CM4): *L. innocua* portadora del gen *bcrABC* (Cepa YCD\_LIN003) y *L. monocytogenes* (Cepa YCD\_LM022) no portadora resistente a rifampicina (200 ppm)

A partir de los viales individuales de las cepas de *L. innocua* y *L. monocytogenes* conservadas a -70 °C, se tomaron 10 µL y se inocularon en tubos de 3 mL de CSTEEL e incubaron a 36 °C por 24 h. Posterior a la incubación de cada cultivo se tomó individualmente 1 mL, se centrifugó a 12 000 g por 3 min y el pellet se resuspendió en 1 mL de SSI y se realizaron diluciones seriadas de cada cepa en 9 mL de DP. A partir de estas suspensiones bacterianas se prepararon los cultivos mixtos anteriormente descritos en una proporción 1:10 de la cepa no portadora (100 células) y de la cepa portadora (1000 células); para ello y de acuerdo al cultivo mixto se inocularon 100 µL de cada cepa en 10 mL de DP y se homogenizaron en vortex por 8 s. De cada uno de los cultivos mixtos se inocularon 10 µL en 1 mL de cada sustrato (CSTEEL y EV) y se incubaron por 10 días a 4, 25 y 36 °C.

### 5.7.3 Verificación de la transferencia de genes de resistencia a QACs

Posterior al tiempo de incubación se realizó el lavado de cada vial y el paquete celular se resuspendió en 200 µL de SSI, 100 µL se conservaron en refrigeración hasta obtener el resultado de PCR para la detección del gen *bcrABC*, mientras que los restantes 100 µL se sembraron por extensión en superficie en placas de RLM suplementado con Rifampicina (200 ppm) (RLM/R) y se incubaron 48 h 36 °C. Al finalizar la incubación todas las colonias con morfología típica de *L. monocytogenes* que desarrollaron en la placa se recuperaron con un hisopo, se resuspendieron en 1 mL de agua destilada estéril y se realizó la extracción térmica del ADN según la metodología descrita en el apartado 5.3.1.

Se realizó PCR para la detección del gen *bcrABC* siguiendo la metodología descrita en el apartado 5.4. La presencia de este gen en las colonias de las cepas de *L. monocytogenes* indicó que la transferencia tuvo lugar y se realizó PCR para la confirmación de las especies *L. monocytogenes* y *L. innocua*, esta última con la finalidad de descartar la presencia de posibles mutantes que pudieran interferir con el resultado.

Los viales de los cultivos mixtos reservados en refrigeración en donde se observó transferencia del gen *bcrABC* se lavaron con SSI y se sembraron por extensión en superficie en placas de RLM/R y se incubaron 48 h a 36 °C. Posterior al tiempo de incubación se seleccionaron colonias con morfología típica de *L. monocytogenes* y se les realizó PCR para la confirmación de la presencia del gen *bcrABC* y se conservaron a -70 °C en CST con 10 % de glicerol hasta su posterior uso.

5.8 Evaluación de resistencia fenotípica en cepas de *L. monocytogenes* receptoras de los genes de resistencia a QACs

Las cepas de *L. monocytogenes* receptoras del gen *bcrABC* se sometieron a la misma metodología descrita para los ensayos de difusión en agar, suspensión y acero inoxidable (apartados 5.5 y 5.6) y los resultados se compararon con la cepa nativa no portadora de genes de resistencia para poder detectar diferencias en cuanto a la resistencia al desinfectante BETA QUAT 4.

5.9 Análisis estadístico

Todos los ensayos se realizaron por triplicado con tres réplicas en cada ocasión. Los análisis estadísticos se llevaron a cabo con el programa *R Studio* (Versión 4.2.2).

En el ensayo de resistencia fenotípica a QACs de cepas de *L. monocytogenes* se realizó un diseño multifactorial, los factores a evaluar fueron el método utilizado (perforación o disco), las diferentes concentraciones del desinfectante (50, 200, 500 y 1000 ppm) y la variable respuesta fue el diámetro de inhibición del crecimiento bacteriano. Se realizó un análisis de varianza (ANOVA) y la prueba de Tukey para contrastar diferencias entre los dos métodos, también se analizó cada método por

separado mediante ANOVA y prueba de *Tukey* teniendo en cuenta el diámetro de inhibición de cada cepa en cada una de las concentraciones del desinfectante evaluadas. Finalmente, se realizó una correlación de *Pearson* y prueba *t de student* para evaluar la asociación entre la presencia de genes de resistencia (*bcrABC* y *qacH*) y el diámetro de inhibición de los aislados.

En los ensayos de reto microbiano en suspensión y superficie de acero inoxidable se realizó un ANOVA y prueba de *Tukey*. Se evaluaron 4 tratamientos (combinaciones de concentración y tiempo) y la variable respuesta fue la población sobreviviente.

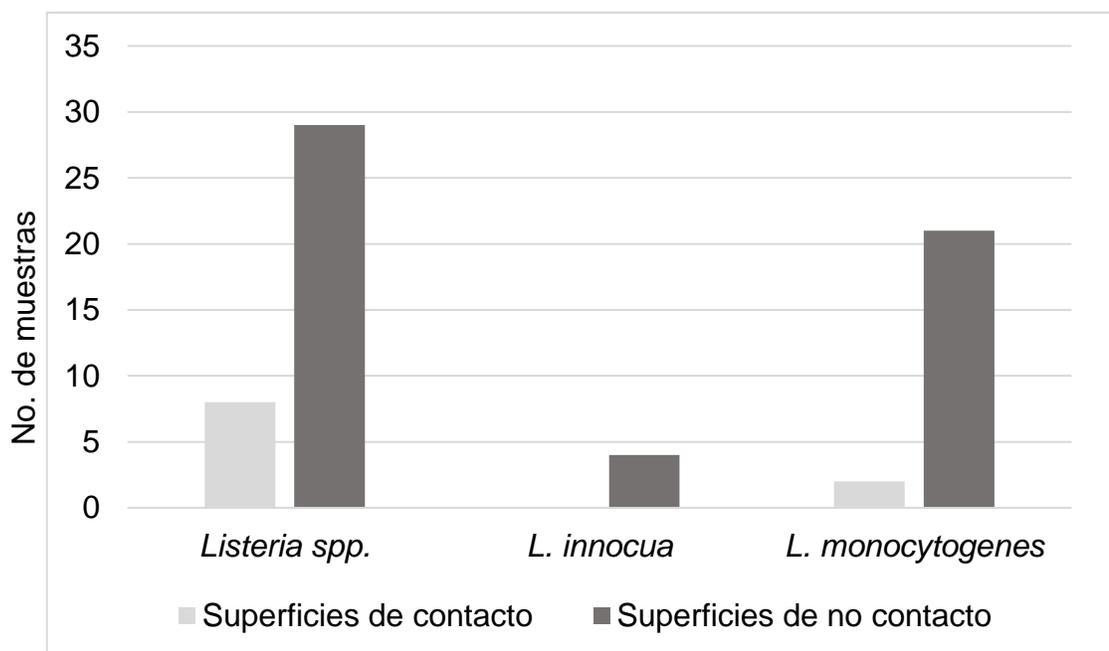
En los ensayos con cultivos mixtos para la evaluación de la transferencia de genes de resistencia a QACs, se realizó un diseño trifactorial, los factores evaluados fueron: cultivo mixto (combinación de cepa donante y receptora), temperatura y substrato y la variable respuesta fue la transferencia del gen *bcrABC*. Se realizó ANOVA y prueba de *Tukey*.

En el ensayo de resistencia fenotípica a QACs de las cepas de *L. monocytogenes* receptoras del gen *bcrABC* se realizó la prueba *t de student* para contrastar diferencias con respecto a las cepas nativas no portadoras del gen *bcrABC*.

## 6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 6.1 Prevalencia y distribución de *Listeria* spp. en un ambiente de producción de hortalizas congeladas

Se analizaron un total de 150 muestras procedentes del ambiente de procesamiento de la empresa de hortalizas congeladas, en las muestras colectadas se determinó una prevalencia de 15.3, 2.7 y 24.7 % de *L. monocytogenes*, *L. innocua* y *Listeria* spp., respectivamente (Tabla 5). Las especies se aislaron en mayor medida de superficies de no contacto con el alimento en el ambiente de producción (Figura 6). No se detectó la presencia de *L. seeligeri*, *L. ivanovii*, *L. welshimeri* y *L. grayi*, por lo que los aislamientos reportados como *Listeria* spp. no incluyen las especies anteriormente mencionadas, sino que comprenden especies no identificadas por el método de PCR Multiplex empleado en este estudio.



**Figura 6.** Distribución de *Listeria* en superficies de no contacto y contacto con el alimento en una empresa procesadora de hortalizas congeladas

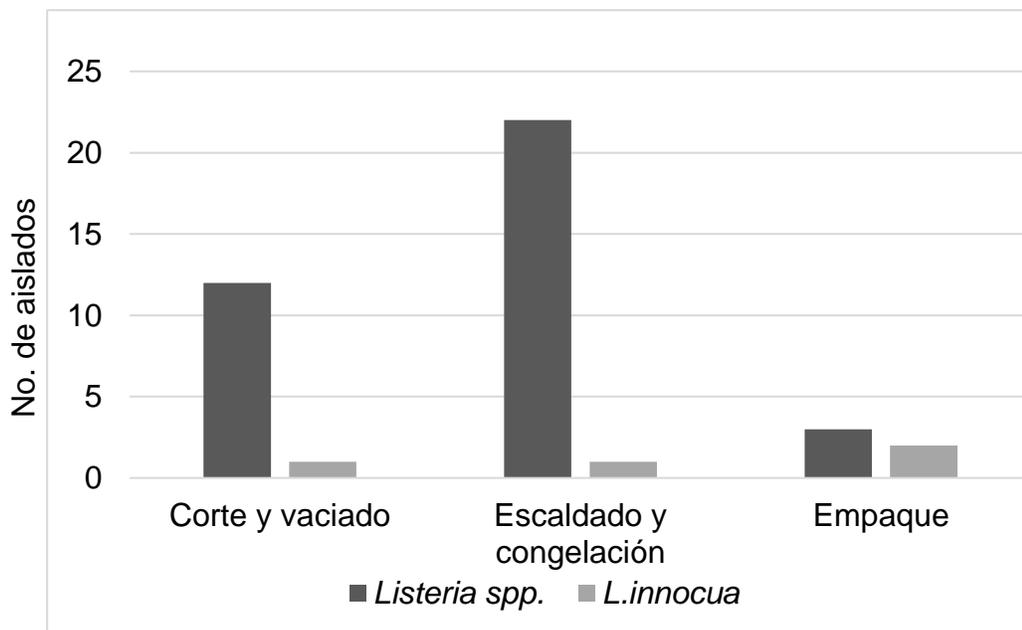
**Tabla 5.** Prevalencia y distribución de *Listeria* spp. y *L. monocytogenes* en una empresa procesadora de hortalizas congeladas

Zona	Tipo de superficie	Muestra	No. de muestras	No. de muestras positivas (%)		
				<i>L. innocua</i>	<i>L. monocytogenes</i>	<i>Listeria</i> spp.
<b>Corte y vaciado</b>	Contacto	Banda	8	0 (0.0)	0 (0.0)	2 (25.0)
	No contacto	Coladera	11	0 (0.0)	0 (0.0)	2 (18.2)
	No contacto	Piso	13	1 (7.7)	0 (0.0)	8 (61.5)
	No contacto	Paredes	2	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)
<b>Escaldado y congelación</b>	Contacto	Banda	17	0 (0.0)	2 (11.8)	5 (29.4)
	No contacto	Coladera	15	0 (0.0)	6 (40.0)	2 (13.3)
	No contacto	Piso	8	0 (0.0)	4 (50.0)	2 (25.0)
	No contacto	Paredes	30	0 (0.0)	2 (6.60)	9 (30.0)
	No contacto	Serpentín	9	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (11.1)
	No contacto	Hawaiana	5	0 (0.0)	1 (20.0)	3 (60.0)
	No contacto	Residuos	15	1 (6.7)	2 (13.3)	0 (0.0)
<b>Empaque</b>	Contacto	Banda	4	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (25.0)
	No contacto	Coladera	6	1 (16.7)	5 (83.3)	1 (16.7)
	No contacto	Piso	5	1 (20.0)	1 (20.0)	0 (0.0)
	No contacto	Residuos	2	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (50.0)
<b>Total</b>			<b>150</b>	<b>4 (2.7)</b>	<b>23 (15.3)</b>	<b>37 (24.7)</b>

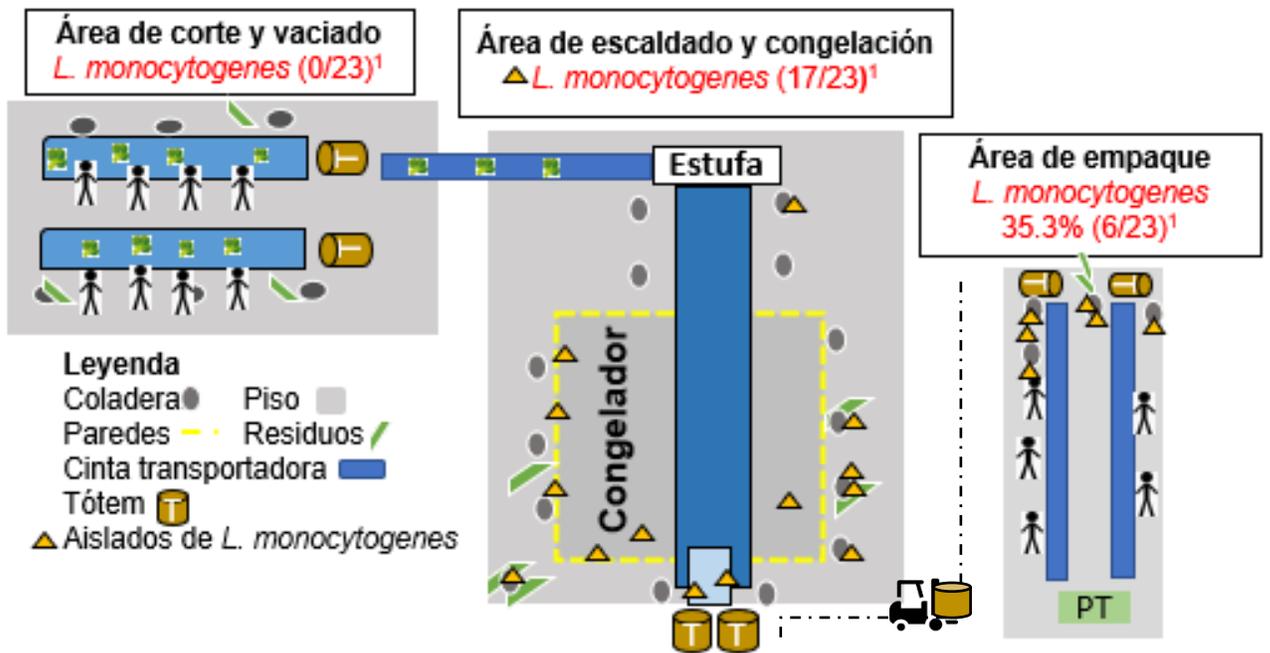
La prevalencia encontrada de *L. monocytogenes* (14.0 % en superficies de no contacto y 1.3 % en superficies contacto con el alimento) coincide con lo reportado anteriormente en otras investigaciones realizadas en este mismo ambiente de producción de hortalizas congeladas. Esquivel Hernández *et al.* (2009) encontraron una prevalencia de *L. monocytogenes* de 19.6 % en superficies de no contacto directo con alimentos; en otro estudio Godínez Oviedo *et al.* (2012) reportaron prevalencias menores de *L. monocytogenes* (8.5 %) y *Listeria* spp. (10.0 %) aisladas igualmente de superficies de no contacto en el ambiente de procesamiento. En

estudios más recientes otros autores han reportado porcentajes de prevalencias similares a los obtenidos en nuestro estudio. En un estudio realizado en España, Truchado *et al.* (2022) reportaron una prevalencia de 17.9 % de *L. monocytogenes* aislada de superficies de una empresa de hortalizas congeladas; Pracser *et al.* (2024) determinaron que la prevalencia de *L. monocytogenes* y *Listeria spp.* en una instalación europea de procesamiento de vegetales congelados fue de 10.7 % y 57.1 % respectivamente.

Con respecto a la ubicación, se encontró la presencia de *Listeria spp.* (especies diferentes a las seis detectadas por PCR Multiplex) en todas las áreas de producción, en mayor medida en las áreas de corte y vaciado (8.0 %) y escaldado y congelación (14.7 %), mientras que la presencia de *L. innocua* se detectó con menor frecuencia en todas las áreas de procesamiento (Figura 7). Por otra parte, *L. monocytogenes* se aisló con elevada frecuencia en el área central de producción correspondiente a las zonas de escalado, congelación y empaque (Ilustración 1).



**Figura 7.** Distribución de *Listeria spp.* y *L. innocua* en diferentes áreas de producción de hortalizas congeladas



**Ilustración 1.** Distribución de *L. monocytogenes* en diferentes áreas de producción de hortalizas congeladas. <sup>1</sup>El número entre paréntesis representa el número de aislados de *L. monocytogenes* en cada área entre el número total de aislados.

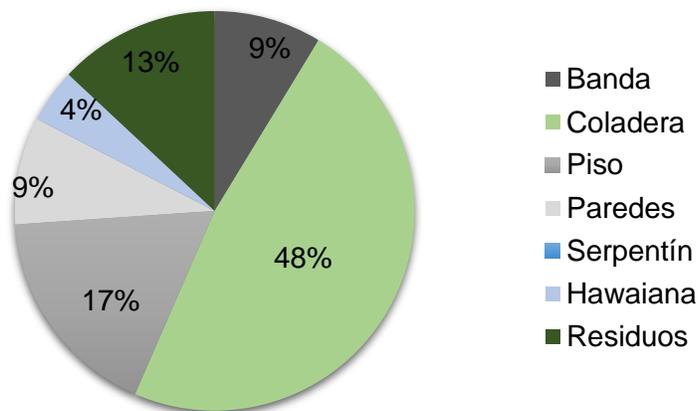
La presencia de *Listeria* spp. en todas las áreas de producción y en mayor medida en el área de corte y vaciado era de esperarse debido a la ubicuidad de este género que se encuentra ampliamente distribuido en la naturaleza (Kurpas *et al.*, 2018). En este sentido, los productos vegetales frescos deben considerarse una fuente probable de introducción de *Listeria* a la instalación de procesamiento como se demostró en un estudio realizado en EE. UU por Magdovitz *et al.* (2021) quienes encontraron una elevada prevalencia de *Listeria* spp. (33.1 %) y en menor porcentaje de *L. monocytogenes* (5.9 %) en productos hortofrutícolas frescos que se usaban como materia prima para la producción de alimentos congelados.

La elevada presencia de *L. monocytogenes* en el área central del proceso de producción (escaldado y congelación) evidencia que el patógeno encontró un ambiente propicio para establecerse y persistir en las superficies de no contacto, lo que podría propiciar la contaminación recurrente de los alimentos que ahí se producen. Los principales factores que pueden generar un aumento de la contaminación de *L. monocytogenes* a los alimentos en esta etapa de

procesamiento incluyen: las condiciones higiénicas del ambiente, la calidad microbiológica del agua, así como las combinaciones de tiempo/temperatura utilizadas para los procesos de escaldado, enfriamiento y congelación (Koutsoumanis *et al.*, 2020).

En la zona de empaque también se encontró *L. monocytogenes* en superficies de no contacto (35.3 %), por lo que el producto terminado podría contaminarse si se producen fallas en el cumplimiento de las Buenas Prácticas de Manufactura. Es importante resaltar que a pesar de que el producto terminado se almacena a temperaturas de  $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ , se ha reportado la sobrevivencia de *L. monocytogenes* durante períodos prolongados a temperaturas de congelación, por lo que prácticas inadecuadas durante la manipulación, descongelación, almacenamiento, cocción y consumo podrían propiciar el desarrollo de este patógeno hasta niveles considerados como no seguros (Bardsley *et al.*, 2019).

Con respecto al tipo de superficie, las coladeras, pisos, paredes y residuos fueron en donde se encontraron las prevalencias más altas de *L. monocytogenes* (Figura 8).



**Figura 8.** Prevalencia de *L. monocytogenes* en superficies en una empresa procesadora de hortalizas congeladas

Estos resultados concuerdan con lo reportado en la literatura, donde este género se ha aislado con mayor frecuencia de superficies como cintas transportadoras, congeladores, coladeras, pisos y paredes en instalaciones de procesamiento de alimentos (Møretrø & Langsrud, 2004; Belias *et al.*, 2022). El análisis de la prevalencia y distribución de *L. monocytogenes* en las superficies del ambiente de producción permitió identificar los principales nichos ecológicos donde se estaba albergando este patógeno, información que la empresa usó rápidamente para enfocarse en estas zonas de mayor contaminación e implementar medidas de limpieza y desinfección más rigurosas para el control y eliminación de este patógeno.

Algo interesante que se observó en el análisis de las especies de *Listeria* encontradas, es que en las muestras a partir de las cuales se aisló *L. innocua*, el 75 % de estas también fueron positivas para *L. monocytogenes* y en las muestras en las cuales se aisló *Listeria* spp. el 8.1 % también fueron positivas para la especie patógena (Tabla 6).

**Tabla 6.** Tabla de contingencia de presencia y ausencia de las especies de *Listeria* aisladas del ambiente de producción de hortalizas congeladas.

Especies		<i>L. monocytogenes</i>		
		Ausencia	Presencia	Total
<b><i>L. innocua</i></b>	Ausencia	126	20	146
	Presencia	1	3	4
	<b>Total</b>	127	23	150
<b><i>Listeria</i> spp.</b>	Ausencia	93	20	113
	Presencia	34	3	37
	<b>Total</b>	<b>127</b>	<b>23</b>	<b>150</b>

La presencia de *L. monocytogenes* y *L. innocua* en la misma muestra sugiere que esta última especie pudieran ser un buen grupo índice de la presencia del patógeno

en este ambiente de producción. El término microorganismo índice se refiere a microorganismos marcadores cuya presencia en número superior a determinados límites indica la posible presencia de patógenos ecológicamente similares (Busta *et al.*, 2003). En un estudio realizado en esta empresa de hortalizas congeladas por Godínez Oviedo *et al.* (2012), encontraron una correlación positiva entre la presencia de *Listeria* spp. y *L. monocytogenes* en productos y superficies de contacto directo y no contacto con el alimento, por lo que concluyeron que la presencia de *Listeria* spp. en cualquier tipo de muestra puede emplearse como indicador de la presencia de *L. monocytogenes* en este ambiente de producción. En este sentido sería conveniente continuar analizando un mayor número de muestras ambientales, identificar las especies de *Listeria* que ahí se encuentran y evaluar si existe correlación entre la presencia de estas especies y *L. monocytogenes* en este ambiente de producción, lo que posibilitaría a la empresa tomar decisiones más rápidamente en caso de encontrar la presencia de este microorganismo índice.

#### 6.2 Presencia de genes asociados con la resistencia a QACs en cepas de *Listeria* spp. aisladas de un ambiente de producción de hortalizas congeladas

Se obtuvieron 23 aislados de *L. monocytogenes*, 4 de *L. innocua* y 37 de otras especies de *Listeria* (diferentes a *L. seeligeri*, *L. ivanovii*, *L. welshimeri* y *L. grayi*). Se detectaron los genes *bcrABC* y *qacH* en el 73.9 y 8.7 % de los aislamientos de *L. monocytogenes* respectivamente y se encontró la presencia de ambos genes en dos aislados de este patógeno (8.7 %). En dos aislados de *L. innocua* se encontró la presencia del gen *bcrABC* y ninguno de los aislados de *Listeria* spp. presentaron los genes de resistencia a QACs (Tabla 7).

La elevada prevalencia encontrada del gen *bcrABC* en los aislados de *L. monocytogenes* es superior a lo reportado en varios estudios. Previamente en una investigación realizada en la empresa de estudio se detectó la presencia del gen *bcrABC* en el 46 % de las cepas de *Listeria* aisladas del ambiente de producción, específicamente en cepas de *L. grayi* (43 %), *L. innocua* (45 %), *L. ivanovii* (40 %) y *L. monocytogenes* (52 %), mientras que no se detectó la presencia del gen *qacH*

en ninguna de las cepas (Vega Iturbe, 2022). Møretrø *et al.* (2017) encontraron los genes *qacH* y *bcrABC* en el 22.0 y 8.0 % respectivamente en aislados de *L. monocytogenes* procedentes de diferentes ambientes de producción de alimentos. En otro estudio Cooper *et al.* (2021) detectaron el gen *bcrABC* y *qacH* en el 41.5 y 1.09 % respectivamente en cepas de *L. monocytogenes* aisladas igualmente de diversos ambientes de procesamiento de alimentos.

**Tabla 7.** Prevalencia del gen *bcrABC* y *qacH* en aislados de *Listeria*.

Especie	Gen <i>bcrABC</i>	Gen <i>qacH</i>	Ambos genes
	% (+/n) <sup>1</sup>		
<i>L. monocytogenes</i>	73.9 (17/23)	8.7 (2/23)	8.7 (2/23)
<i>L. innocua</i>	50.0 (2/4)	0.0 (0/4)	0.0 (0/4)
<i>Listeria</i> spp.	0.0 (0/37)	0.0 (0/37)	0.0 (0/37)

<sup>1</sup>El número entre paréntesis representa el número de aislados donde se encontró el gen entre el número total de aislados.

Existe poca información sobre la distribución del gen *bcrABC* en especies no patógenas del género *Listeria*. Se ha reportado la presencia de este gen principalmente en cepas de *L. innocua* y *L. welshimeri* procedentes de diferentes ambientes de producción de alimentos (Maćkiw *et al.*, 2021; Bolten *et al.*, 2022).

El casete *bcrABC* se identificó por primera vez en el plásmido pLM80 de la cepa *L. monocytogenes* H7550 (aislada en un brote de *hot dogs* de 1998-1999 en EE UU). Este determinante genético está compuesto por un regulador transcripcional de la familia TetR (*bcrA*) y dos genes (*bcrB* y *bcrC*) que forman parte de la familia de proteínas SMR (sistemas de eflujo de múltiples fármacos dependientes de protones) y se ha descrito que confiere resistencia al cloruro de benzalconio, así como otros compuestos a base de QACs (Elhanafi *et al.*, 2010).

Con respecto al gen *qacH* este solo se encontró en dos aislados de *L. monocytogenes*, no detectándose en las restantes especies del género. Nuestros

resultados coinciden con lo reportado por Müller *et al.* (2014) quienes no encontraron la presencia de este gen en cepas de *L. innocua*, *L. seeligeri*, *L. welshimeri* y *L. ivanovii* aisladas de entornos de producción de alimentos. El gen *qacH* se identificó en el transposón Tn 6188 y codifica para la proteína transportadora QacH que pertenece a la pequeña familia de proteínas de resistencia a múltiples fármacos (SMR) y se ha descrito que confiere tolerancia a QACs. Se ha asociado la presencia de este transposón a cepas de *L. monocytogenes* fundamentalmente, no obstante, deben analizarse más especies no patógenas del género *Listeria* para fortalecer esta hipótesis (Müller *et al.*, 2014).

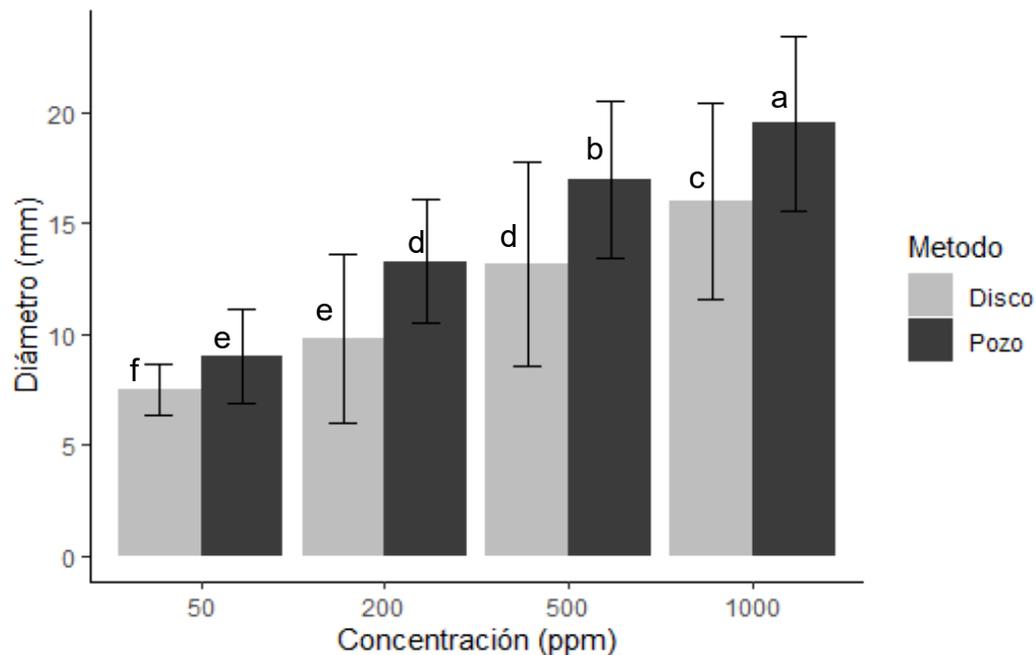
Existe mucha heterogeneidad en cuanto a la distribución de estos marcadores de resistencia a QACs en cepas de *Listeria* aisladas de ambientes de procesamiento de alimentos; no obstante, resulta muy interesante la elevada proporción de *L. monocytogenes* portadoras del gen *bcrABC* en nuestro estudio, lo que podría asociarse a un proceso de selección ambiental por el uso continuo y excesivo de QACs en el ambiente de producción estudiado (Cheng *et al.*, 2023). Las especies portadoras de estos genes se aislaron fundamentalmente de superficies como coladeras, pisos y residuos, en las cuales se emplean las mayores concentraciones del desinfectante QAC que pueden ascender hasta 1000 ppm según sus procedimientos de desinfección.

La importancia del hallazgo de cepas portadoras de estos determinantes genéticos radica en la resistencia que podrían conferirles a desinfectantes a base de QACs en el ambiente de producción. En varias investigaciones se ha reportado que aislados positivos a estos determinantes de resistencia exhiben mayores valores de concentración mínima inhibitoria (CMI) para el cloruro de benzalconio en comparación con aislados que no los contienen y además se ha observado una mayor sensibilidad en mutantes que carecen de estos (Müller *et al.*, 2013; Minarovičová *et al.*, 2018; Cooper *et al.*, 2021; Cheng *et al.*, 2023). Contradictoriamente, en otros estudios no han podido establecer una correlación

positiva entre la presencia de estos genes de resistencia y mayores valores de CMI siendo un tema poco esclarecido aún (Martínez *et al.*, 2016; Ebner *et al.*, 2015).

### 6.3. Resistencia fenotípica a QACs de cepas de *L. monocytogenes* portadoras y no portadoras de genes de resistencia al desinfectante

El análisis de varianza demostró que existen diferencias estadísticas significativas entre el método de difusión en agar de pozo y el método de difusión en agar de disco, las concentraciones evaluadas y las cepas de *L. monocytogenes* ( $p < 0.05$ ). Con respecto a los dos métodos de difusión, en ambos casos se apreció una relación proporcional entre concentración y diámetro de inhibición, con diferencias estadísticas significativas entre las concentraciones del desinfectante evaluadas ( $p < 0.05$ ). Así mismo se observaron mayores valores de inhibición con el método de difusión de pozo en comparación con el método de difusión de disco que tuvo menor sensibilidad (Figura 9).



**Figura 9.** Susceptibilidad de *L. monocytogenes* a QACs mediante dos métodos de difusión en agar. Las letras diferentes indican diferencias estadísticas significativas.

Las discrepancias entre los dos métodos pueden asociarse a diferentes cinéticas de difusión del desinfectante sobre el agar cuando es aplicado superficialmente en el disco y a través del agar cuando es colocado en un pozo, apreciándose mayor difusión con el método de pozo y por ende mayores diámetros de inhibición. Las pruebas de difusión en agar se han usado fundamentalmente para evaluar la actividad antimicrobiana de antibióticos y extractos vegetales, pero existe poca literatura de su utilización para la evaluación de susceptibilidad a desinfectantes, lo que limita la comparación de los datos que obtuvimos con otros estudios de la misma naturaleza (Holder *et al.*, 1994; Hussein *et al.*, 2021). En general estas pruebas son simples de realizar, de bajo costo, facilitan probar una amplia gama de microorganismos y agentes antimicrobianos, así como la interpretación de resultados (Balouiri *et al.*, 2016), por lo que podrían ser una buena y rápida herramienta de prueba para la evaluación de susceptibilidad a desinfectantes.

Por otra parte, no se observaron diferencias significativas en los diámetros de inhibición entre los aislados de la empresa, pero sí hubo diferencias significativas con respecto a la cepa de referencia ATCC y las cepas aisladas de otros ambientes de producción de queso ranchero (Q12, Q16, Q19), procesamiento de aguacate (A80) y brócoli (B79), los cuales presentaron mayores diámetros de inhibición en cada una de las concentraciones del desinfectante a base de QACs ( $p < 0.05$ ) (Tabla 8 y 9).

**Tabla 8.** Susceptibilidad de *L. monocytogenes* a QACs mediante dos métodos de difusión en agar.

Cepas	Método de difusión en agar de pozo				Método de difusión en agar de disco			
	Concentración (ppm)				Concentración (ppm)			
	50	200	500	1000	50	200	500	1000
Diámetro de inhibición (mm)								
YCD_LM001	8.8 ± 0.7 <sup>1</sup>	11.8 ± 0.7	15.4 ± 0.9	17.9 ± 0.6	7.0 ± 0.0	8.3 ± 1.3	11.4 ± 1.2	13.3 ± 2.1
YCD_LM002	8.4 ± 1.3	11.8 ± 1.4	15.1 ± 0.6	17.9 ± 0.8	7.0 ± 0.0	8.1 ± 0.8	11.0 ± 0.7	13.0 ± 1.9
YCD_LM003	8.4 ± 0.9	12.0 ± 0.9	15.1 ± 0.6	18.4 ± 1.0	7.0 ± 0.0	7.7 ± 1.0	11.4 ± 0.7	14.3 ± 1.3

YCD_LM004	8.4 ± 0.7	12.3 ± 0.7	15.8 ± 1.2	18.0 ± 1.0	7.0 ± 0.0	7.8 ± 1.2	11.7 ± 1.0	13.3 ± 2.1
YCD_LM005	8.4 ± 0.7	12.2 ± 0.8	15.7 ± 0.9	18.3 ± 1.0	7.0 ± 0.0	8.0 ± 1.5	11.7 ± 1.0	14.8 ± 1.7
YCD_LM006	8.1 ± 0.8	12.4 ± 1.0	15.8 ± 1.1	17.9 ± 0.8	7.0 ± 0.0	8.0 ± 0.8	11.0 ± 1.0	14.7 ± 1.0
YCD_LM007	8.6 ± 0.5	12.8 ± 1.5	16.1 ± 1.1	18.1 ± 0.6	7.0 ± 0.0	8.0 ± 1.1	10.7 ± 1.0	14.9 ± 1.2
YCD_LM008	8.3 ± 0.9	12.2 ± 0.4	15.4 ± 0.7	16.9 ± 0.8	7.0 ± 0.0	7.8 ± 0.9	11.4 ± 0.5	13.9 ± 1.8
YCD_LM009	8.1 ± 0.9	12.2 ± 1.2	15.8 ± 0.8	17.9 ± 0.6	7.0 ± 0.0	8.3 ± 0.9	11.6 ± 1.1	15.3 ± 0.5
YCD_LM010	8.2 ± 0.7	12.3 ± 1.2	15.8 ± 0.8	18.4 ± 0.5	7.0 ± 0.0	7.7 ± 1.0	10.4 ± 1.2	13.8 ± 2.2
YCD_LM011	7.8 ± 0.4	12.4 ± 0.5	15.7 ± 1.1	17.8 ± 0.8	7.2 ± 0.4	8.2 ± 1.4	10.9 ± 1.5	13.7 ± 2.1
YCD_LM012	7.9 ± 0.5	12.0 ± 0.7	15.1 ± 0.3	17.2 ± 0.4	7.0 ± 0.0	8.4 ± 1.2	11.6 ± 1.1	14.9 ± 0.9
YCD_LM013	7.3 ± 0.4	11.8 ± 0.7	14.9 ± 0.9	17.4 ± 1.4	7.0 ± 0.0	8.6 ± 1.1	11.2 ± 1.4	14.1 ± 1.6
YCD_LM014	8.1 ± 0.6	11.7 ± 0.7	15.1 ± 0.6	17.8 ± 1.0	7.0 ± 0.0	8.1 ± 0.8	11.3 ± 0.5	15.3 ± 0.5
YCD_LM015	7.7 ± 0.5	12.0 ± 0.9	15.2 ± 0.7	18.0 ± 0.0	7.0 ± 0.0	7.9 ± 1.4	10.8 ± 1.4	14.2 ± 1.4
YCD_LM016	7.8 ± 0.8	11.6 ± 0.8	15.0 ± 0.0	17.0 ± 0.5	7.0 ± 0.0	8.4 ± 1.2	10.6 ± 1.9	14.9 ± 0.9
YCD_LM017	8.0 ± 0.5	12.0 ± 0.0	14.9 ± 0.3	17.1 ± 0.3	7.0 ± 0.0	8.0 ± 1.5	10.7 ± 1.2	13.7 ± 1.7
YCD_LM018	8.2 ± 0.8	11.9 ± 0.8	14.2 ± 0.8	16.6 ± 0.5	7.0 ± 0.0	7.8 ± 0.9	10.3 ± 0.5	13.4 ± 2.3
YCD_LM019	7.9 ± 0.7	13.1 ± 2.8	14.7 ± 0.7	16.6 ± 0.9	7.0 ± 0.0	7.7 ± 1.0	10.3 ± 1.6	12.4 ± 2.2
YCD_LM020	7.5 ± 0.4	11.8 ± 1.1	15.2 ± 0.8	17.0 ± 1.0	7.0 ± 0.0	7.9 ± 1.4	11.0 ± 1.5	14.4 ± 1.2
YCD_LM021	7.9 ± 0.8	12.1 ± 0.8	15.2 ± 0.7	18.1 ± 1.2	7.0 ± 0.0	9.3 ± 1.0	11.4 ± 0.8	15.0 ± 0.7
YCD_LM022	7.8 ± 0.6	12.0 ± 0.9	15.3 ± 0.9	18.3 ± 1.5	7.0 ± 0.0	9.4 ± 0.7	11.8 ± 0.8	15.0 ± 0.7
YCD_LM023	7.8 ± 0.8	11.4 ± 0.9	15.7 ± 0.7	16.6 ± 1.1	7.0 ± 0.0	8.4 ± 1.2	11.6 ± 1.4	14.0 ± 1.7
ATCC 19115	13.2 ± 1.4	18.1 ± 2.1	23.8 ± 2.2	25.7 ± 0.9	8.2 ± 1.4	14.9 ± 3.7	20.4 ± 1.9	22.7 ± 2.6
Q12	12.7 ± 1.2	17.7 ± 1.4	23.6 ± 1.3	28.4 ± 1.7	10.4 ± 1.5	16.9 ± 2.1	23.2 ± 1.1	24.9 ± 1.3
Q16	12.8 ± 1.6	20.1 ± 0.6	25.0 ± 0.0	27.4 ± 1.4	9.4 ± 0.9	17.7 ± 2.0	21.4 ± 1.0	25.0 ± 0.9
Q19	12.0 ± 1.7	18.3 ± 1.4	23.2 ± 1.5	26.3 ± 2.1	9.9 ± 0.8	17.1 ± 2.1	23.4 ± 0.5	25.4 ± 1.0
A80	14.0 ± 0.0	19.3 ± 1.4	25.2 ± 0.8	28.9 ± 1.3	10.2 ± 7.7	19.7 ± 0.9	22.8 ± 0.4	25.2 ± 1.4
B79	11.4 ± 1.0	14.9 ± 0.3	19.6 ± 0.7	23.3 ± 1.0	7.7 ± 0.9	13.1 ± 0.9	16.3 ± 1.6	18.4 ± 1.7

<sup>1</sup>Los datos representan la media ± desviación estándar de 9 valores.

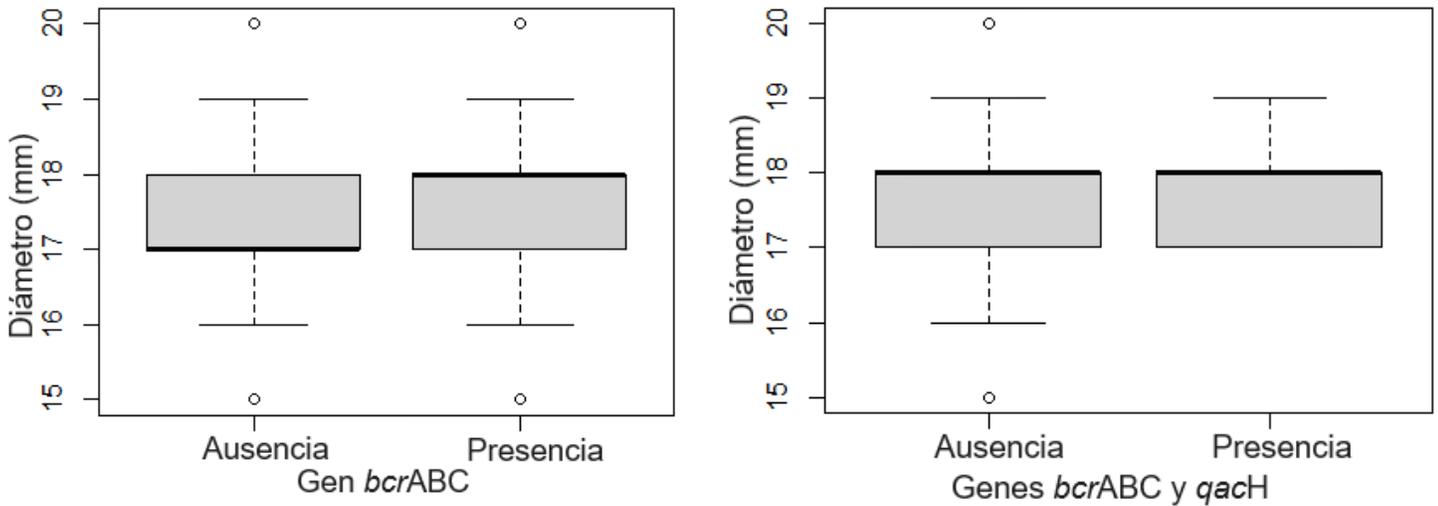
**Tabla 9.** Rangos de inhibición de *L. monocytogenes* a QACs mediante dos métodos de difusión en agar.

Cepas	Método de difusión en agar de pozo				Método de difusión en agar de disco			
	Concentración (ppm)				Concentración (ppm)			
	50	200	500	1000	50	200	500	1000
	Diámetro de inhibición (mm)							
Aislados <sup>1</sup>	7.0 - 11.0 <sup>1</sup>	10.0 -17.0	13.0 -18.0	15.0 -20.0	7.0 -8.0	7.0 - 11.0	9.0 -14.0	10.0 -17.0
Cepas amb. <sup>2</sup>	10.0 -15.0	14.0 -21.0	18.0 -26.0	22.0 -30.0	7.0 -13.0	11.0 -21.0	15.0 -25.0	17.0 -27.0
ATCC 19115	13.2 ±1.4 <sup>3</sup>	18.1 ± 2.1	23.8 ± 2.2	25.7 ± 0.9	8.2 ± 1.4	14.9 ± 3.7	20.4 ± 1.9	22.7 ± 2.6

<sup>1</sup>Rango de inhibición de todos los aislados de *L. monocytogenes* de la empresa. <sup>2</sup>Rango de inhibición de todas las cepas de *L. monocytogenes* de otros ambientes. <sup>3</sup>Los datos correspondientes a la cepa ATCC 19115 representan la media ± desviación estándar de 9 valores.

La reducida sensibilidad de los aislados de *L. monocytogenes* podría asociarse a la exposición continua a residuos del desinfectante QACs en el ambiente de producción, debido a procedimientos de limpieza y enjuague insuficientes antes y después de la desinfección, lo que se ha reportado propicia la adaptación de las cepas (Minarovicova *et al.*, 2018; Moretro *et al.*, 2017; Nordholt *et al.*, 2021). Los principales mecanismos de resistencia de *L. monocytogenes* a QACs incluyen modificaciones en la superficie celular, formación de biopelículas y sistemas de bombas de eflujo codificado en el cromosoma y en elementos genéticos móviles (Tong *et al.*, 2021; Duze *et al.*, 2021).

Como se mencionó anteriormente, en nuestro estudio determinamos la presencia de los genes asociados a la resistencia a QACs (*bcrABC* y *qacH*) y al realizar los análisis estadísticos no se observó correlación entre mayores diámetros de inhibición y la presencia del gen *bcrABC*, los dos genes (*bcrABC* y *qacH*) o ningún gen en los aislados de *L. monocytogenes* (Anexo 2) (Figuras 10A, 10B).



**Figura 10. A.** Diámetros de inhibición a QACs de aislados de *L. monocytogenes* portadores y no portadores del gen *bcrABC*. **B.** Diámetros de inhibición a QACs de aislados de *L. monocytogenes* portadores y no portadores de los genes *bcrABC* y *qacH*. \*El gen *qacH* se encontró en dos aislados de *L. monocytogenes* que también portaban el gen *bcrABC*.

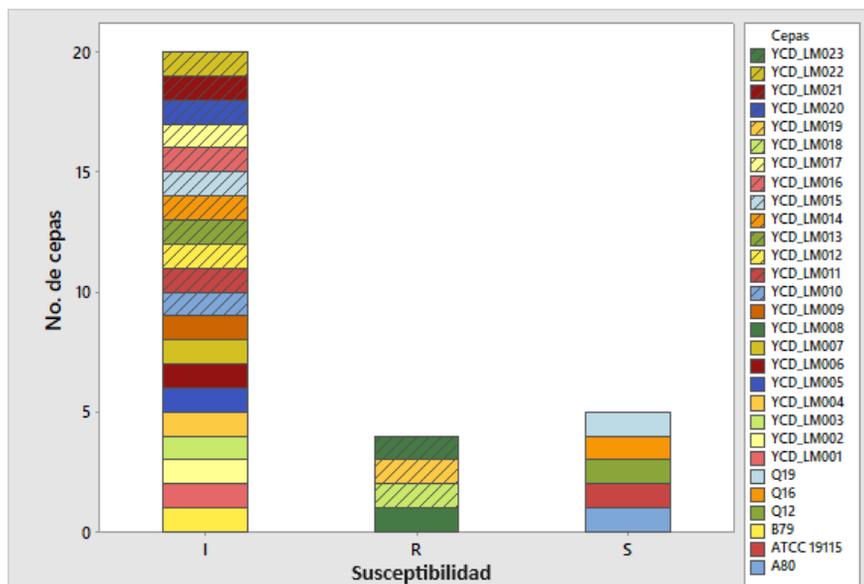
Lo anterior sugiere que la resistencia a QACs en estos aislados no se relaciona directamente con la presencia de estos dos marcadores específicamente o en este caso que no se estén expresando fenotípicamente, por lo que podrían estar involucrados otros mecanismos, por lo que es necesario realizar estudios de secuenciación genómica y mutagénesis para dilucidar el papel exacto de estos genes en la resistencia a este desinfectante. Debido a lo anterior, se decidió en lo sucesivo continuar el análisis de susceptibilidad de los aislados de *L. monocytogenes* sin agruparlos por la presencia de un gen, ambos genes o ausencia de genes.

La resistencia a QACs en cepas de *L. monocytogenes* se ha asociado en algunos casos a mecanismos de resistencia intrínsecos fundamentalmente dado por alteraciones de la superficie celular como cambios en la forma, tamaño y rugosidad, aumento de la cantidad de ácidos teicoicos, modificación del perfil de fosfolípidos, así como del espesor y grado de reticulación del peptidoglicano, lo que limita la

entrada del desinfectante al interior celular (Mereghetti *et al.*, 2000; To *et al.*, 2002; Duze *et al.*, 2021). También se han reportado cepas de *L. monocytogenes* resistentes al cloruro de benzalconio con sobreexpresión de bombas de eflujo, principalmente mayor expresión de los genes cromosómicos *mdrL* y *lde* que codifican bombas de eflujo de múltiples fármacos de la superfamilia de facilitadores principales y expulsan compuestos como antibióticos, metales pesados y bromuro de etidio (Mata *et al.*, 2000; To *et al.*, 2002).

Los ensayos de difusión en agar son de los métodos comúnmente usados para evaluar la resistencia bacteriana a antibióticos y según el diámetro de la zona de inhibición se clasifican las cepas como sensibles, intermedias y resistentes (CLSI, 2015). A diferencia de los antibióticos no existen puntos de corte establecidos para desinfectantes específicos, de igual forma al revisar la literatura se encontraron pocos estudios en donde clasifiquen la susceptibilidad de *Listeria* a QACs mediante estas pruebas de difusión en agar lo que limita la comparación de los datos entre los estudios.

Njagi *et al.* (2005) evaluaron la efectividad de desinfectantes (incluido QACs) contra bacterias procedentes de un entorno avícola mediante el método de difusión de pozo y consideraron diámetros inferiores o iguales a 10 mm para cepas resistentes (R) y por encima de este valor cepas susceptibles (S). En este estudio, establecimos un criterio de clasificación, en base a los resultados obtenidos con el método de difusión en agar de pozo que resultó ser el más sensible y tomando como puntos de corte los diámetros de inhibición de las cepas más sensibles (cepas de otros ambientes de producción) con la concentración de uso más alta del desinfectante. Según los criterios establecidos el 82.6 % (19/23) de los aislados se clasificaron con susceptibilidad intermedia, el 17.4 % (4/23) como resistentes y las cepas de otros ambientes de producción, incluida la cepa de colección ATCC fueron sensibles a QACs (1000 ppm) (Figura 11).



**Figura 11.** Susceptibilidad de cepas de *L. monocytogenes* a QACs (1000 ppm) mediante método de difusión en agar de pozo. I: intermedia R: resistente S: sensible

Curiosamente los aislados de *L. monocytogenes* clasificados como resistentes fueron colectados de pisos y coladeras, y según los procedimientos de desinfección en la empresa para ese tipo de superficie de no contacto directo con el alimento se utilizan las concentraciones más elevadas del desinfectante que pueden ser de hasta 1000 ppm. De los aislados categorizados resistentes solo uno portaba el gen *bcrABC*, mientras que en los restantes en tres aislados no se detectó la presencia de los genes (*bcrABC* y *qacH*), no encontrándose de esta forma asociación entre la presencia de genes y una mayor resistencia a QACs.

En aras de seguir explorando la susceptibilidad de los aislados de *L. monocytogenes* portadores y no portadores de genes de resistencia a QACs, se realizaron ensayos de reto microbiano en suspensión y superficie de acero inoxidable. Para ello se seleccionaron aislados que portaran un gen, los dos genes y ningún gen de resistencia a QACs, así como la cepa de colección ATCC y dos cepas aisladas de otros ambientes de producción (Tabla 10).

**Tabla 10.** Susceptibilidad de *L. monocytogenes* a QACs (200 ppm) mediante ensayo de reto microbiano en suspensión.

Cepas	Características		Población inicial	Población <sup>2</sup> sobreviviente Log UFC/mL	Reducción
	Origen	Presencia/ausencia de genes de resistencia			
YCD_LM007	Empresa de hortalizas congeladas	<i>bcrABC</i> y <i>qacH</i>	10.2 ± 0.1 <sup>1</sup>	1.0 ± 0.0 <sup>2</sup>	9.2 ± 0.1
YCD_LM008		<i>bcrABC</i>	10.1 ± 0.2	1.0 ± 0.0	9.1 ± 0.2
YCD_LM018		Ausencia	10.3 ± 0.1	1.0 ± 0.0	9.3 ± 0.1
Q16	Empresa de queso ranchero	Ausencia	10.2 ± 0.1	1.0 ± 0.0	9.2 ± 0.1
A80	Empresa de procesamiento de aguacate	Ausencia	9.3 ± 0.1	1.0 ± 0.0	8.3 ± 0.1
ATCC 19115	Colección	Ausencia	10.3 ± 0.0	1.0 ± 0.0	9.3 ± 0.0

<sup>1</sup>Los datos representan la media ± desviación estándar de 9 valores. <sup>2</sup>Límite de detección de la técnica de vaciado en placa (< 10 UFC/mL).

El método en suspensión, permitió reducciones en las poblaciones microbianas de más de 5 Log UFC/mL en todos los casos, sin diferencias estadísticas entre las cepas ( $p > 0.05$ ). Según las pruebas de eficacia para este tipo de desinfectante, que está aprobado para su uso en superficies de no contacto con alimentos se requiere una reducción microbiana de 3 Log (99.9%) en las concentraciones de uso y tiempo de exposición recomendados por el fabricante, tal como se describe en la etiqueta del producto (EPA, 2012). En este tipo de pruebas las células tienen contacto directo con el desinfectante, no interfieren otros factores que puedan disminuir su eficacia, por el contrario, en la industria alimentaria pueden influir la presencia de materia orgánica y la formación de biopelículas en superficies (Kragh *et al.*, 2024).

Por su parte, en el ensayo en superficie de acero inoxidable se evaluaron diferentes combinaciones de concentración y tiempo de contacto del desinfectante simulando las condiciones de uso de QACs en la empresa. Al aplicar concentraciones de 200 ppm (30 s y 2 min de contacto) y 500 ppm (30 s de contacto) no se alcanzaron

reducciones de 3 Log UFC/cm<sup>2</sup> en ninguno de los casos, mientras que la aplicación de 500 ppm por 2 min fue el tratamiento que permitió el menor número de sobrevivientes con reducciones de más de 3 Log UFC/cm<sup>2</sup> (Tabla 11).

**Tabla 11.** Susceptibilidad de *L. monocytogenes* a QACs mediante ensayo de reto microbiano en superficie de acero inoxidable.

Cepas	Población inicial (Log UFC/cm <sup>2</sup> )	Población sobreviviente (Log UFC/cm <sup>2</sup> )				Reducción (Log UFC/cm <sup>2</sup> )			
		T1	T2	T3	T4	T1	T2	T3	T4
YCD_LM007	8.6 ± 0.5 <sup>1</sup>	6.5 ± 0.6	5.8 ± 0.5	6.0 ± 0.5	4.4 ± 0.4	1.9 ± 0.5	2.9 ± 0.7	2.6 ± 0.7	4.3 ± 0.6
YCD_LM008	7.9 ± 0.4	6.4 ± 0.8	6.2 ± 0.4	6.3 ± 0.3	4.5 ± 0.7	1.2 ± 0.5	1.6 ± 0.6	1.6 ± 0.3	3.4 ± 0.9
YCD_LM018	8.4 ± 0.9	6.9 ± 1.0	6.5 ± 0.6	6.6 ± 1.1	5.1 ± 0.5	1.6 ± 0.6	2.0 ± 0.6	1.9 ± 0.6	3.3 ± 0.8
Q16	8.8 ± 0.1	6.7 ± 0.5	6.5 ± 0.2	6.6 ± 1.0	5.3 ± 0.3	1.2 ± 0.8	2.2 ± 0.3	2.1 ± 0.9	3.5 ± 0.2
A80	8.1 ± 0.4	6.6 ± 0.5	5.7 ± 0.5	5.9 ± 0.9	3.3 ± 0.7	1.0 ± 0.7	2.3 ± 0.6	2.1 ± 0.6	4.8 ± 1.1
ATCC 19115	8.7 ± 0.1	6.4 ± 1.4	6.3 ± 0.7	5.5 ± 0.7	4.3 ± 1.2	1.5 ± 0.6	2.3 ± 0.6	3.2 ± 0.7	4.4 ± 1.3

<sup>1</sup>Los datos representan la media ± desviación estándar de 9 valores. **T1:** Tratamiento 1 (200 ppm 30 s de contacto); **T2:** Tratamiento 2 (200 ppm 2 min de contacto); **T3:** Tratamiento 3 (500 ppm 30 s de contacto); **T4:** Tratamiento 4 (500 ppm 2 min de contacto).

Estos resultados concuerdan con lo reportado por otros autores. Belessi *et al.* (2011) no encontraron reducciones mayores a 4 Log UFC/cm<sup>2</sup> de *L. monocytogenes* adheridas a superficies de acero inoxidable al aplicar un desinfectante a base de QACs (1%) con 6 min de contacto. Boucher *et al.* (2021) evaluaron la susceptibilidad de 14 cepas de *L. monocytogenes* adheridas a superficies de acero inoxidable a dos desinfectantes a base de QACs a 200 ppm por 2 min de contacto y no observaron reducciones mayores a 5 Log UFC en todos los casos.

Durante la evaluación de la eficacia de los desinfectantes en superficies inertes como el acero inoxidable existen diversos factores que pueden influir como la capacidad intrínseca de adhesión de cada cepa a la superficie, lo que puede repercutir en la cantidad de bacterias sobrevivientes; también las características de

la superficie, si presenta poros o abrasiones que dificulte la desinfección y eliminación de las bacterias (Maillard *et al.*, 2005). Las pruebas de evaluación en superficie predicen mejor la concentración de uso más apropiada del desinfectante en comparación con las pruebas de suspensión. Para la industria no sería rentable el uso de desinfectantes en concentraciones más elevadas debido a costos, contaminación medioambiental y consideraciones toxicológicas. Es importante diseñar pruebas de eficacia de desinfectantes que tengan en cuenta las recomendaciones de uso y aplicación de cada producto, así como los factores y condiciones del ambiente de producción.

Por otra parte, no se apreciaron diferencias significativas en la población sobreviviente de las cepas de origen ambiental o los aislados de la empresa, solo destacó la cepa A80 procedente de un ambiente de procesamiento de aguacate con el menor número de sobrevivientes en todos los tratamientos. De igual forma, no se encontraron diferencias entre los aislados portadores de los genes *bcrABC* y *qacH* y las cepas que no presentaban estos marcadores de resistencia a QACs, lo que coincide con lo observado en los ensayos de difusión en agar donde todos los aislados mostraron rangos de inhibición similares independientemente de la presencia o ausencia de los marcadores de resistencia a QACs (genes *bcrABC* y *qacH*). Estos resultados concuerdan con lo reportado por Kragh *et al.* (2024), donde los valores de concentración mínima bactericida y la supervivencia de 19 cepas de *L. monocytogenes* procedentes de ambientes de producción de alimentos después de una exposición de 5 min a 50 mg/L (equivalente a 50 ppm) de cloruro de benzalconio fue similar entre los aislados independientemente de la presencia/ausencia de genes de resistencia a QACs (*qacH*, *brcABC*, *emrC* y *emrE*).

A pesar de no encontrar correlación entre la presencia de los genes *bcrABC* y *qacH* y mayor resistencia fenotípica a QACs, es necesario realizar más estudios para esclarecer los mecanismos de resistencia a QACs en los aislados de *L. monocytogenes*. Por otra parte, debido a la localización de estos marcadores en elementos genéticos móviles podrían tener un papel importante en la transferencia

de genes de resistencia a QACs entre especies de *Listeria*, por lo que resulta relevante explorar en las especies no patógenas portadoras si la transferencia de estos determinantes a *L. monocytogenes* le confiere o no mayor resistencia a este desinfectante.

6.4 Evaluación del efecto de la temperatura y substrato en la probabilidad de transferencia de genes de resistencia a QACs entre cepas de *Listeria* spp. y *L. monocytogenes* en cultivos mixtos.

Se conformaron cuatro cultivos mixtos con cepas de *L. innocua* donante del gen *bcrABC* y *L. monocytogenes* receptoras y se realizaron en total 216 reacciones de transferencia en diferentes condiciones de substrato y temperatura durante 10 días de incubación. Se observó transferencia del gen *bcrABC* de *L. innocua* a *L. monocytogenes* en el 7.9 % de las reacciones, así mismo la frecuencia de transferencia fue variable en las réplicas realizadas (Tabla 12).

**Tabla 12.** Frecuencia de transferencia del gen *bcrABC* en cultivos mixtos de *L. innocua* portadora y *L. monocytogenes* no portadora.

Cultivos Mixtos	Sus	Réplica 1			Réplica 2			Réplica 3			Total		
		4° C	25° C	36° C	4° C	25° C	36° C	4° C	25° C	36° C	4° C	25° C	36° C
LIN001/ LM021	CS	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/9	0/9	0/9
	EV	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/9	0/9	0/9
LIN001/ LM022	CS	0/3	<b>1/3</b>	0/0	0/3	<b>1/3</b>	<b>1/3</b>	0/3	<b>1/3</b>	0/3	0/9	<b>3/9</b>	<b>1/9</b>
	EV	0/3	<b>1/3</b>	0/0	0/3	0/3	0/3	0/3	<b>2/3</b>	<b>2/3</b>	0/9	<b>3/9</b>	<b>2/9</b>
LIN003/ LM021	CS	<b>1/3</b>	0/3	<b>1/3</b>	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	<b>1/9</b>	0/9	<b>1/9</b>
	EV	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/9	0/9	0/9
LIN003/ LM022	CS	0/3	<b>2/3</b>	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	<b>1/3</b>	<b>1/3</b>	0/9	<b>3/9</b>	<b>1/9</b>
	EV	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	<b>1/3</b>	<b>1/3</b>	0/9	<b>1/9</b>	<b>1/9</b>

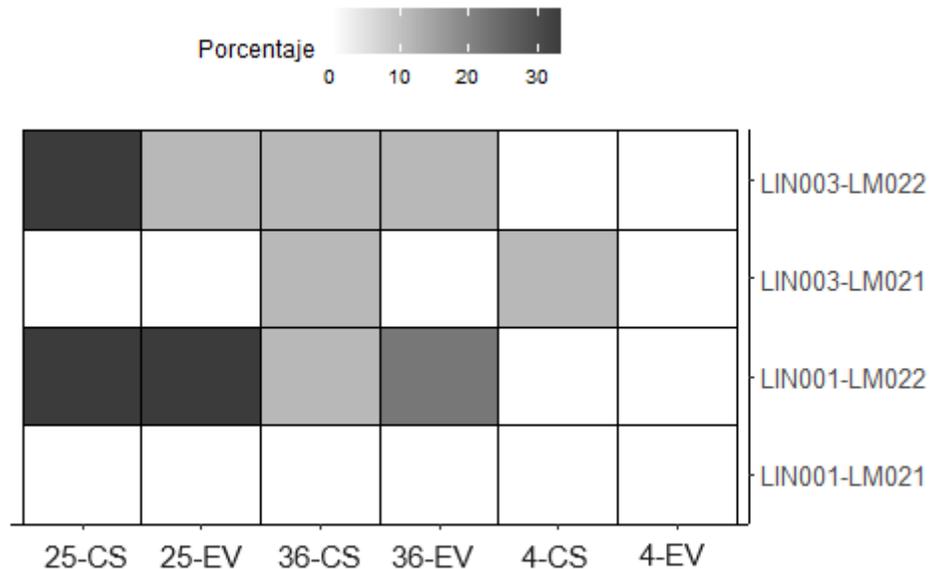
Sus: Sustratos; CS: Caldo soya tripticasa; EV: Extracto vegetal

Se ha identificado la presencia del gen *bcrABC* en el plásmido pLM80 fundamentalmente, pero también en otros plásmidos en el género *Listeria*. En un estudio realizado por Schmitz-Esser *et al.* (2021) encontraron la presencia del gen *bcrABC* en el 46 % de plásmidos de 1921 genomas de *L. monocytogenes* analizados. Se conoce que el plásmido pLM80 (80 kb de tamaño) codifica para proteínas de transporte asociadas a la superficie, así como para un posible aparato de transferencia de plásmidos, por lo que podría ser la conjugación el principal mecanismo de transferencia del gen *bcrABC* entre especies de este género (Nelson *et al.*, 2004). Varios estudios han reportado la transferencia conjugativa del gen *bcrABC* entre *Listeria* spp. no patógenas a *L. monocytogenes* (Lemaître *et al.*, 1998; Dutta *et al.*, 2013).

La conjugación es un mecanismo de transferencia de material genético, que requiere el contacto directo entre bacterias donantes y receptoras, la formación de un aparato conjugativo y la posterior adhesión a la superficie de la bacteria receptora, lo que depende en gran medida de la densidad de bacterias, su motilidad y el medio en que ocurre la transferencia (Goessweiner-Mohr *et al.*, 2015). La formación de parejas de apareamiento es un paso limitante en la conjugación en medios líquidos debido a la competencia entre bacterias; pudiera ser esta una posible explicación a los pocos eventos de transferencia observados, ya que se ha reportado interacción inhibitoria entre *L. innocua* y *L. monocytogenes* que resulta en un mayor crecimiento de *L. innocua* y disminución de la densidad celular de *L. monocytogenes*, lo que conllevaría a una reducción de pares de apareamientos y por tanto menor transferencia del gen *bcrABC* (Cornu *et al.*, 2002; Alderliesten *et al.*, 2020).

En este sentido, se encontraron diferencias significativas en los porcentajes de transferencia del gen *bcrABC* entre las combinaciones de cepas donantes (*L. innocua*) y receptoras (*L. monocytogenes*) en los cultivos mixtos ( $p < 0.05$ ). Se observó escasa frecuencia de transferencia del gen *bcrABC* con la cepa YCD\_LM021 receptora, mientras que se apreciaron mayores frecuencias con

YCD\_LM022 receptora independientemente de las cepas de *L. innocua* donantes (Figura 12).



**Figura 12.** Mapa de color del porcentaje de transferencia del gen *bcrABC* en cultivos mixtos de *L. innocua* y *L. monocytogenes* en diferentes condiciones de temperatura y sustrato. CS: Caldo soya; EV: Extracto vegetal.

La probabilidad de transferencia del gen *bcrABC* dependió notablemente de la combinación de cepas utilizadas como donantes y receptoras en los cultivos mixtos, lo que puede deberse a características intrínsecas de cada cepa para transferir y adquirir exitosamente material genético; a su vez los menores porcentajes de transferencia del gen *bcrABC* en los cultivos mixtos con la cepa YCD\_LM021 receptora podría asociarse a una mayor interacción inhibitoria entre *L. innocua* y dicha cepa en particular.

Se ha reportado que la frecuencia de transferencia de plásmidos depende en gran medida de las cepas donantes y receptoras (Lemaitre *et al.*, 1998). En un estudio realizado por Katharios *et al.* (2012) observaron que la eficiencia de transferencia conjugativa del gen *bcrABC* entre *Listeria* spp. a otras listerias no patógenas y a *L.*

*monocytogenes* dependió en gran medida de las cepas donantes y receptoras, con mayor variabilidad en las cepas receptoras.

Adicionalmente, fue indistinta la frecuencia de transferencia del gen *bcrABC* en caldo soya o extracto vegetal, lo que puede asociarse a que ambos sustratos permitieron un estado fisiológico de *Listeria* adecuado para la conjugación. Varios estudios han demostrado que la disponibilidad de nutrientes influye notablemente debido al estado fisiológico de las cepas donantes y receptoras (Dröge *et al.*, 1999; Hausner *et al.*, 1999). Por otra parte, los medios líquidos representan ambientes homogéneos que propician encuentros aleatorios entre cepas donantes y receptoras, lo que favorece en gran medida la transferencia conjugativa; no obstante, no se aproximan a las condiciones reales del ambiente de producción, como las biopelículas en superficies donde la influencia es más marcada. En un estudio realizado por Ma *et al.* (2013) encontraron que altas concentraciones de nutrientes permitieron la formación de biopelículas densas y compactas con menor eficiencia de transferencia de plásmidos, al contrario de bajas concentraciones de nutrientes con biopelículas más porosas y llenas de agua y por tanto mejor propagación de genes por transferencia de plásmidos conjugativos.

Por otra parte, se observaron mayores porcentajes de transferencia del gen *bcrABC* a temperaturas de 25 y 36 °C, mientras que a 4 °C la transferencia fue casi inexistente. Esta mayor frecuencia de transferencia a 25 °C podría asociarse a la movilidad flagelar dependiente de temperatura en *L. monocytogenes* (a temperaturas superiores a 30 °C se reprime la transcripción del gen flagelar, mientras que a temperaturas inferiores a 30 °C se transcribe dicho gen), lo que propicia la movilidad, el contacto entre las células y a su vez mayor transferencia conjugativa (Peel *et al.*, 1988; Kamp *et al.*, 2011). Además, la escasa transferencia del gen *bcrABC* en condiciones de bajas temperaturas puede deberse a una menor densidad de *Listeria* después de 10 días de incubación a 4 °C.

Nuestros resultados coinciden con lo reportado por Katharios *et al.* (2012), quienes encontraron mayor transferencia del gen *bcrABC* entre especies no patógenas de

*Listeria* a 25 °C que a 37 °C, mientras que la adquisición por *L. monocytogenes* fue igualmente eficiente en ambas temperaturas. En otro estudio realizado por Van Meervenne *et al.* (2015) reportaron una reducción de la transferencia conjugativa (resistencia a antibióticos) de *Lactobacillus sakei* a *L. monocytogenes* con la disminución de la temperatura (menos de 7 °C).

En ambientes de procesamiento de alimentos, otros factores como la formación de biopelículas podrían influir en la transferencia y diseminación de plásmidos conjugativos entre especies de *Listeria*. Se han reportado mayores tasas de conjugación en biopelículas que en cultivos planctónicos, debido fundamentalmente a que son microambientes con altas densidades bacterianas que presentan estructuras como canales y poros que favorecen el contacto entre las células y la propagación de elementos genéticos móviles (Sørensen *et al.*, 2005; Kelly *et al.*, 2009; Madsen *et al.*, 2012). En un estudio previo del grupo de trabajo se observó transferencia del gen *bcrABC* de *L. innocua* a *L. monocytogenes* en biopelículas de acero inoxidable en el 17 % (13/78) de los ensayos (Vega *et al.*, 2022).

También, se ha descrito que la frecuencia de conjugación se ve influenciada negativamente por la competencia de poblaciones microbianas autóctonas, que influye directamente en los pares de apareamiento y por ende en la frecuencia de conjugación (Grohmann, 2011). Otro factor a tener en cuenta es el pH ya que puede afectar la estabilidad de las proteínas involucradas en los mecanismos de transferencia génica y además en el estado fisiológico de cepas donantes y receptoras; el rango de pH que posibilita mayores frecuencias de transferencia conjugativa es entre 6 y 8 (Lafuente *et al.* 1996).

Finalmente, es importante considerar una posible subestimación de los eventos de transferencia, se utilizaron métodos tradicionales de cultivo, los cuales tienen limitantes como no distinguir entre un número exacto de eventos de transferencia, la selección de los transconjugantes (expansión clonal de la población receptora) y además la aparición de bacterias en estado viable no cultivable lo que sesga la cuantificación de las poblaciones donantes, receptoras y transconjugantes

(Sørensen *et al.*, 2005). Es recomendable para futuros estudios explorar otros métodos para estudiar la transferencia de plásmidos y genes, como el uso de genes reporteros como el gen que codifica para la proteína verde fluorescente (Haagensen *et al.*, 2002; Brito *et al.*, 2021).

#### 6.5 Evaluación de la resistencia fenotípica a QACs de *L. monocytogenes* receptoras de genes de resistencia al desinfectante

Se evidenció transferencia del gen *bcrABC* de *L. innocua* a *L. monocytogenes* en diferentes condiciones de sustrato y temperatura, se seleccionaron transconjugantes y se evaluó la resistencia fenotípica a QACs mediante ensayos de difusión en agar y reto microbiano en suspensión y superficie inerte.

En los ensayos de difusión en agar no se observaron diferencias estadísticas significativas en los diámetros de inhibición de las cepas de *L. monocytogenes* nativas y después de recibir el gen *bcrABC* (Tabla 13).

**Tabla 13.** Susceptibilidad de *L. monocytogenes* nativas y receptoras del gen *bcrABC* a QACs mediante ensayo de difusión en agar.

Cepas	Método de difusión en agar de pozo				Método de difusión en agar de disco			
	Concentración (ppm)				Concentración (ppm)			
	50	200	500	1000	50	200	500	1000
	Diámetro de inhibición (mm)							
YCD_LM021	7.9 ± 0.8 <sup>1</sup>	12.1 ± 0.8	15.2 ± 0.7	18.1 ± 1.2	7.0 ± 0.0	9.3 ± 1.0	11.4 ± 0.8	15.0 ± 0.7
YCD_LM022	7.8 ± 0.6	12.0 ± 0.9	15.3 ± 0.9	18.3 ± 1.5	7.0 ± 0.0	9.4 ± 0.7	11.8 ± 0.8	15.0 ± 0.7
YCD_LM021R	7.0 ± 0.0	11.4 ± 0.5	16.0 ± 0.7	19.3 ± 1.0	7.0 ± 0.0	9.8 ± 0.7	14.4 ± 0.7	18.3 ± 0.7
YCD_LM022R	7.0 ± 0.0	11.8 ± 0.8	17.8 ± 1.3	20.2 ± 0.7	7.0 ± 0.0	9.3 ± 0.5	13.6 ± 0.5	16.6 ± 0.5

<sup>1</sup>Los datos representan la media ± desviación estándar de 9 valores. YCD\_LM021 y YCD\_LM022 (Cepas Nativas); YCD\_LM021R y YCD\_LM022R (Cepas receptoras del gen *bcrABC*).

La adquisición del gen *bcrABC* en *L. monocytogenes* no le confirió significativamente mayor susceptibilidad al desinfectante, lo que coincide con resultados anteriores (apartado 6.3) donde no se encontró correlación entre la

presencia del gen *bcrABC* en aislados de *L. monocytogenes* y mayores diámetros de inhibición a QACs.

Por otra parte, en el ensayo de reto microbiano en suspensión se observaron elevadas reducciones microbianas e igualmente no hubo diferencias significativas entre las cepas nativas y después de adquirir el gen *bcrABC* ( $p < 0.05$ ) (Tabla 14).

**Tabla 14.** Susceptibilidad de *L. monocytogenes* nativas y receptoras del gen *bcrABC* a QACs (200 ppm) mediante ensayo de reto microbiano en suspensión.

Cepa	Identificación de las cepas	Población inicial	Población sobreviviente <sup>2</sup>	Reducción
Nativa	YCD_LM021	10.3 ± 0.0 <sup>1</sup>	1.0 ± 0.0 <sup>a</sup>	9.3 ± 0.0
	YCD_LM022	10.4 ± 0.1	1.0 ± 0.0 <sup>a</sup>	9.4 ± 0.1
Receptora	YCD_LM021R	10.3 ± 0.0	1.0 ± 0.0 <sup>a</sup>	9.3 ± 0.0
	YCD_LM022R	10.3 ± 0.0	1.0 ± 0.0 <sup>a</sup>	9.3 ± 0.0

<sup>1</sup>Los datos representan la media ± desviación estándar de 9 valores. <sup>2</sup>Límite de detección de la técnica de vaciado en placa (< 10 UFC/mL).

Finalmente, en el ensayo de susceptibilidad en superficie de acero inoxidable las reducciones microbianas no alcanzaron 5 Log UFC/cm<sup>2</sup>, se observaron diferencias entre las cepas YCD\_LM021 nativa y después de adquirir el gen *bcrABC*, exhibiendo en este último caso mayor número de sobrevivientes en todos los tratamientos con QACs, mientras que entre las cepas YCD\_LM022 nativa y receptora estadísticamente no fueron significativas las diferencias (Tabla 15).

**Tabla 15.** Susceptibilidad de *L. monocytogenes* nativas y receptoras del gen *bcrABC* a QACs mediante ensayo de reto microbiano en superficie de acero inoxidable.

Cepas	Población inicial (Log UFC/cm <sup>2</sup> )	Población sobreviviente (Log UFC/cm <sup>2</sup> )				Reducción (Log UFC/cm <sup>2</sup> )			
		T1	T2	T3	T4	T1	T2	T3	T4
YCD_LM021	8.5 ± 0.7 <sup>1</sup>	6.6 ± 0.5	5.2 ± 0.3	5.7 ± 0.4	4.6 ± 0.9	1.8 ± 0.8	3.3 ± 0.9	2.8 ± 0.9	3.9 ± 1.5
YCD_LM022	8.1 ± 0.6	6.8 ± 0.8	6.0 ± 0.3	6.1 ± 0.5	5.4 ± 0.7	0.9 ± 0.4	2.0 ± 0.6	1.9 ± 0.4	2.7 ± 0.5
YCD_LM021R	8.5 ± 0.4	6.9 ± 0.9	6.5 ± 0.2	6.7 ± 0.7	5.6 ± 0.4	1.3 ± 0.3	2.1 ± 0.5	1.9 ± 0.4	3.0 ± 0.7
YCD_LM022R	8.5 ± 0.4	6.6 ± 1.4	6.4 ± 0.8	6.5 ± 0.6	4.3 ± 0.6	1.4 ± 0.4	2.0 ± 0.8	1.9 ± 0.3	4.2 ± 0.9

<sup>1</sup>Los datos representan la media ± desviación estándar de 9 valores. **T1:** Tratamiento 1 (200 ppm 30 s de contacto); **T2:** Tratamiento 2 (200 ppm 2 min de contacto); **T3:** Tratamiento 3 (500 ppm 30 s de contacto); **T4:** Tratamiento 4 (500 ppm 2 min de contacto).

De forma general las variaciones de la población sobreviviente no fueron tan diferentes en todas las cepas, se puede suponer que la adquisición del gen *bcrABC* no confirió una elevada resistencia fenotípica a QACs en comparación con las cepas nativas no portadoras. La variabilidad observada en los recuentos de sobrevivientes podría asociarse al efecto de adhesión y posterior desprendimiento del inóculo bacteriano de las placas de acero inoxidable. También es importante tener en cuenta el estado fisiológico de las bacterias sobrevivientes al tratamiento con QACs. Se ha reportado disminución del número de unidades formadoras de colonias en la población de *L. monocytogenes* expuestas a altas concentraciones de cloruro de benzalconio debido a la inducción de un estado viable no cultivable (Noll *et al.*, 2020).

Podríamos considerar que como en resultados previos la presencia de este determinante genético no tenga un papel relevante en la resistencia a QACs en los aislados de *L. monocytogenes*. No obstante, tampoco tenemos certeza de si ocurrió expresión fenotípica del gen *bcrABC* en los transconjugantes de *L.*

*monocytogenes*, siendo necesarios estudios de expresión y transcripción génica para corroborar estas hipótesis.

El casete *bcrABC* está conformado por un regulador transcripcional *bcrA* de la familia TetR y dos genes *bcrB* y *bcrC* de resistencia a múltiples fármacos pequeños (SMR) que codifican proteínas de sistemas de eflujo dependientes de protones en bacterias Gram-positivas y Gram-negativas (Elhanafi *et al.*, 2010). La familia TetR se ha encontrado ampliamente distribuida en microorganismos ambientales y se ha descrito que generalmente actúan como represores transcripcionales, no obstante, aún no está del todo esclarecido el papel exacto de *bcrA* en la regulación transcripcional del gen *bcrABC* (Ramos *et al.*, 2005). Es importante para la expresión de genes adquiridos por transferencia horizontal una correcta integración en el genoma de la bacteria receptora y no sufrir mecanismos de regulación que impidan su expresión y transcripción en una proteína funcional (Susanna *et al.*, 2006).

Se ha reportado la influencia de concentraciones subletales de cloruro de benzalconio en los niveles de expresión génica de este determinante. En varios estudios la exposición a concentraciones subletales de cloruro de benzalconio (10 µg/mL) mejoró los niveles de transcripción de *bcrABC*, no obstante, en ausencia de este compuesto también se detectó transcripción, lo que sugirió que el cloruro de benzalconio reprime levemente o que otras moléculas aún no identificadas influyan en la transcripción basal en ausencia del desinfectante (Elhanafi *et al.*, 2010; Tamburro *et al.*, 2015). La temperatura es otro factor que tiene un importante impacto en la expresión de genes involucrados en la virulencia y las adaptaciones ambientales en *L. monocytogenes*, se ha descrito que temperaturas de 4 a 25 °C han mejorado los niveles de transcripción del gen *bcrABC* en cepas de *L. monocytogenes*, no obstante, aún no se conoce el mecanismo de expresión de *bcrABC* dependiente de temperatura en esta especie (Elhanafi *et al.*, 2010).

Por otra parte, la cepa YCD\_LM021R tuvo un ligero aumento en la población sobreviviente a los diferentes tratamientos con QACs en comparación con la cepa no portadora, algo curioso es que fue la cepa receptora con menos eventos de transferencia en los cultivos mixtos; pudiera ser debido a características intrínsecas que limitaron la adquisición del gen *bcrABC*, pero a su vez que tuviera más éxito la internalización y expresión de dicho determinante genético.

En varias investigaciones de transferencia se ha encontrado que transconjugantes exhiben mayor resistencia en comparación con cepas receptoras, no obstante, no existe literatura donde evalúen la resistencia fenotípica de los transconjugantes mediante los ensayos realizados en nuestro trabajo, lo que dificulta la comparación de los datos. Katharios-Lanwermyer *et al.* (2012) evaluaron la transferencia conjugativa del gen *bcrABC* de *L. innocua* y otras especies no patógenas de *Listeria* a *L. monocytogenes* y encontraron que los transconjugantes exhibieron CMI elevadas para CB (35 a 40 µg/mL), en comparación con las cepas receptoras que tenían CMI de 10 µg/mL. En otro estudio realizado por Lemaitre *et al.* (1998) observaron que posterior a la transferencia conjugativa de plásmidos que confieren resistencia a diferentes antimicrobianos como el cloruro de benzalconio, transconjugantes de *L. innocua* y *L. monocytogenes* inicialmente sensibles aumentaron la CMI del cloruro de benzalconio a 16 µg/mL mientras que las cepas receptoras inicialmente tenían CMI de 2 a 8 µg/mL.

Es importante continuar abordando las interrogantes que surgen con la realización de este proyecto y en este sentido realizar estudios de secuenciación, expresión y transcripción génica para comprender el papel de los determinantes *bcrABC* y *qacH* en los mecanismos de resistencia de aislados de *L. monocytogenes* a QACs.

## 7. CONCLUSIONES

- Las coladeras y los pisos de las áreas de escaldado y congelación se identificaron como los principales reservorios de *L. monocytogenes*, lo que indica la colonización y persistencia del patógeno en las superficies de no contacto en este ambiente de producción.
- Se encontró la presencia de los genes de resistencia a QACs (*bcrABC* y *qacH*) en aislados de *L. monocytogenes* y *L. innocua*, no obstante, no se observó relación entre la presencia de estos determinantes genéticos y mayor resistencia fenotípica a QACs.
- Los aislados de *L. monocytogenes* de la empresa mostraron menor sensibilidad a QACs en comparación con cepas de *L. monocytogenes* aisladas de otros ambientes de producción, lo que sugiere la adaptación de *L. monocytogenes* en el ambiente de producción de estudio, lo cual podría asociarse no a la presencia de los genes *bcrABC* y *qacH*, sino a otros mecanismos de resistencia intrínsecos como alteraciones de la superficie celular, formación de biopelículas o sobreexpresión de bombas de eflujo codificadas en el cromosoma.
- La especie *L. innocua* pudo transferir el gen *bcrABC* a *L. monocytogenes* en suspensión, en un extracto vegetal y en mayor medida a temperaturas de 25 y 36 °C, lo que sugiere el potencial de transferencia de genes de resistencia a QACs entre especies no patógenas de *Listeria* a *L. monocytogenes* en el ambiente de estudio e incita a replantear la tolerancia y utilización de *Listeria* spp. como microorganismo indicador de la presencia del patógeno en el ambiente de producción.
- La adquisición del gen *bcrABC* por *L. monocytogenes* no confirió mayor resistencia fenotípica a QACs, no obstante, queda la incertidumbre si realmente ocurrió expresión fenotípica del gen *bcrABC* en los transconjugantes.

## 8. RECOMENDACIONES

- Evaluar el potencial de *L. innocua* como microorganismo índice de *L. monocytogenes* en este ambiente de producción.
- Realizar estudios de secuenciación de los aislados de *L. monocytogenes* para esclarecer el papel de los genes *bcrABC* y *qacH* en la resistencia fenotípica a desinfectantes a base de QACs.
- Explorar escenarios más realistas con influencia de otras microbiotas en las reacciones de transferencia del gen *bcrABC* entre especies de *Listeria*.
- Explorar otros métodos para evaluar la transferencia de plásmidos y genes, como el uso de genes reporteros como el gen de la proteína verde fluorescente.
- Realizar estudios de expresión y transcripción del determinante de resistencia *bcrABC* en los transconjugantes de *L. monocytogenes*.

## BIBLIOGRAFÍA

- Aarestrup, F. M., Knöchel, S., & Hasman, H. (2007). Antimicrobial Susceptibility of *Listeria monocytogenes* from Food Products. <https://Home.Liebertpub.Com/Fpd>, 4(2), 216–221. <https://doi.org/10.1089/FPD.2006.0078>
- Aase, B., Sundheim, G., Langsrud, S., & Marit Rørvik, L. (2000). Occurrence of and a possible mechanism for resistance to a quaternary ammonium compound in *Listeria monocytogenes*. In *International Journal of Food Microbiology* (Vol. 62). [www.elsevier.nl/locate/ijfoodmicro](http://www.elsevier.nl/locate/ijfoodmicro)
- Alderliesten, J. B., Duxbury, S. J., Zwart, M. P., De Visser, J. A. G., Stegeman, A., & Fischer, E. A. (2020). Effect of donor-recipient relatedness on the plasmid conjugation frequency: a meta-analysis. *BMC microbiology*, 20, 1-10.
- Abdallah, M., Benoliel, C., Drider, D., Dhulster, P., & Chihib, N. E. (2014). Biofilm formation and persistence on abiotic surfaces in the context of food and medical environments. In *Archives of Microbiology* (Vol. 196, Issue 7). <https://doi.org/10.1007/s00203-014-0983-1>
- Allard, M. W., Strain, E., Rand, H., Melka, D., Correll, W. A., Hintz, L., Stevens, E., Timme, R., Lomonaco, S., Chen, Y., Musser, S. M., & Brown, E. W. (2019). Whole genome sequencing uses for foodborne contamination and compliance: Discovery of an emerging contamination event in an ice cream facility using whole genome sequencing. *Infection, Genetics and Evolution*, 73, 214–220. <https://doi.org/10.1016/J.MEEGID.2019.04.026>
- Aryal, M., & Muriana, P. M. (2019). Efficacy of Commercial Sanitizers Used in Food Processing Facilities for Inactivation of *Listeria monocytogenes*, *E. Coli* O157:H7, and *Salmonella* Biofilms. *Foods* 2019, Vol. 8, Page 639, 8(12), 639. <https://doi.org/10.3390/FOODS8120639>
- BAM. (2022). Bacteriological Analytical Manual (BAM) - Chapter 10: Detection of *Listeria monocytogenes* in Foods and Environmental Samples, and Enumeration of *Listeria monocytogenes* in Foods (A. D. Hitchins, K. Jinneman, & Y. Chen, Eds.). <https://www.fda.gov/food/laboratory-methods-food/bacteriological-analytical-manual-bam>
- Balouiri, M., Sadiki, M., & Ibensouda, S. K. (2016). Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: A review. *Journal of pharmaceutical analysis*, 6(2), 71-79.
- Banerji, R., Karkee, A., Kanojiya, P., Patil, A., & Saroj, S. D. (2022). Bacterial communication in the regulation of stress response in *Listeria monocytogenes*. In *LWT* (Vol. 154). <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2021.112703>
- Bardsley, C. A., Truitt, L. N., Pfuntner, R. C., Danyluk, M. D., Rideout, S. L., & Strawn, L. K. (2019). Growth and Survival of *Listeria monocytogenes* and *Salmonella* on Whole and Sliced Cucumbers. *Journal of Food Protection*, 82(2), 301–309. <https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-18-341>
- Basulto, J., Moñino, M., Farran, A., Baladia, E., Manera, M., Cervera, P., Romero-de-Ávila, M. D., Miret, F., Astiasarán, I., Bonany, J., Gelabert, V., Ballesteros, J. M., Martínez, A., Palou, A., Labrador, J., Marques-Lopes, I., Russolillo, G., Alonso, M., Riquelme, F., ... Martínez, N. (2014). Recomendaciones de manipulación doméstica de frutas y hortalizas para

preservar su valor nutritivo. *Revista Española de Nutrición Humana y Dietética*, 18(2), 100–115. <https://doi.org/10.14306/renhyd.18.2.85>

- Belessi, C. E. A., Gounadaki, A. S., Psomas, A. N., & Skandamis, P. N. (2011). Efficiency of different sanitation methods on *Listeria monocytogenes* biofilms formed under various environmental conditions. *International Journal of Food Microbiology*, 145, S46-S52.
- Belias, A., Sullivan, G., Wiedmann, M., & Ivanek, R. (2022). Factors that contribute to persistent *Listeria* in food processing facilities and relevant interventions: A rapid review. *Food Control*, 133, 108579. <https://doi.org/10.1016/J.FOODCONT.2021.108579>
- Blair, J. M. A., Richmond, G. E., & Piddock, L. J. V. (2014). Multidrug efflux pumps in Gram-negative bacteria and their role in antibiotic resistance. *Http://Dx.Doi.Org/10.2217/Fmb.14.66*, 9(10), 1165–1177. <https://doi.org/10.2217/FMB.14.66>
- Bonazzi, M., Lecuit, M., & Cossart, P. (2009). *Listeria monocytogenes* internalin and E-cadherin: from structure to pathogenesis. *Cellular Microbiology*, 11(5), 693–702. <https://doi.org/10.1111/J.1462-5822.2009.01293.X>
- Borucki, M. K., Peppin, J. D., White, D., Loge, F., & Call, D. R. (2003). Variation in Biofilm Formation among Strains of *Listeria monocytogenes*. *Applied and Environmental Microbiology*, 69(12), 7336–7342. <https://doi.org/10.1128/AEM.69.12.7336-7342.2003/ASSET/D42F888C-553C-4166-B86E-7A3A0934085E/ASSETS/GRAPHIC/AM1230694003.JPEG>
- Boucher, C., Waite-Cusic, J., Stone, D., & Kovacevic, J. (2021). Relative performance of commercial citric acid and quaternary ammonium sanitizers against *Listeria monocytogenes* under conditions relevant to food industry. *Food Microbiology*, 97, 103752.
- Bragg, R., Jansen, A., Coetzee, M., van der westhuizen, W., & Boucher, C. (2014). Bacterial resistance to quaternary ammonium compounds (QAC) disinfectants. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 808, 1–13. [https://doi.org/10.1007/978-81-322-1774-9\\_1](https://doi.org/10.1007/978-81-322-1774-9_1)
- Bridier, A., Sanchez-Vizueté, P., Guilbaud, M., Piard, J. C., Naïtali, M., & Briandet, R. (2015). Biofilm-associated persistence of food-borne pathogens. *Food Microbiology*, 45(PB), 167–178. <https://doi.org/10.1016/J.FM.2014.04.015>
- Brito, I. L. (2021). Examining horizontal gene transfer in microbial communities. *Nature Reviews Microbiology*, 19(7), 442-453.
- Bucur, F. I., Grigore-Gurgu, L., Crauwels, P., Riedel, C. U., & Nicolau, A. I. (2018). Resistance of *Listeria monocytogenes* to Stress Conditions Encountered in Food and food processing environments. In *Frontiers in Microbiology* (Vol. 9, Issue NOV). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02700>
- Bureš, F. (2019). Quaternary Ammonium Compounds: Simple in Structure, Complex in Application. *Topics in Current Chemistry*, 377(3), 1–21. <https://doi.org/10.1007/S41061-019-0239-2/METRICS>

- Busta, F. F., Suslow, T. V., Parish, M. E., Beuchat, L. R., Farber, J. N., Garrett, E. H., & Harris, L. J. (2003). The Use of Indicators and Surrogate Microorganisms for the Evaluation of Pathogens in Fresh and Fresh-Cut Produce. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 2(1 SUPPL.), 179–185. <https://doi.org/10.1111/J.1541-4337.2003.TB00035.X>
- Cappitelli, F., Polo, A., & Villa, F. (2014). Biofilm Formation in Food Processing Environments is Still Poorly Understood and Controlled. In *Food Engineering Reviews* (Vol. 6, Issues 1–2). <https://doi.org/10.1007/s12393-014-9077-8>
- Carpentier, B., & Cerf, O. (2011). Review — Persistence of *Listeria monocytogenes* in food industry equipment and premises. *International Journal of Food Microbiology*, 145(1), 1–8. <https://doi.org/10.1016/J.IJFOODMICRO.2011.01.005>
- Carrascosa, C., Raheem, D., Ramos, F., Saraiva, A., & Raposo, A. (2021). Microbial Biofilms in the Food Industry—A Comprehensive Review. *International Journal of Environmental Research and Public Health* 2021, Vol. 18, Page 2014, 18(4), 2014. <https://doi.org/10.3390/IJERPH18042014>
- Carvalho, F. T., Vieira, B. S., Vallim, D. C., Carvalho, L. A., Carvalho, R. C. T., Pereira, R. C. L., & Figueiredo, E. E. S. (2019). Genetic similarity, antibiotic resistance and disinfectant susceptibility of *Listeria monocytogenes* isolated from chicken meat and chicken-meat processing environment in Mato Grosso, Brazil. *LWT*, 109, 77–82. <https://doi.org/10.1016/J.LWT.2019.03.099>
- Castañeda-Ruelas, G., Eslava-Campos, C., Castro-Del Campo, N., León-Félix, J., & Chaidez-Quiroz, C. (2014). Listeriosis in Mexico: Clinical and epidemiological importance. In *Salud Publica Mex* (Vol. 56).
- CDC. (2023). National Outbreak Reporting System (NORS) Dashboard | CDC. National Outbreak Reporting System (NORS). <https://wwwn.cdc.gov/norsdashboard/>
- Chapman, J. S. (2003). Biocide resistance mechanisms. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 51(2), 133–138. [https://doi.org/10.1016/S0964-8305\(02\)00097-5](https://doi.org/10.1016/S0964-8305(02)00097-5)
- Cheng, Y., Wang, X., Liu, Y., Qin, X., Li, Z., & Dong, Q. (2023). Growth and survival characteristics of *Listeria monocytogenes* of different sources and subtypes. *LWT*, 184, 115114.
- Chmielewski, R. A. N., & Frank, J. F. (2003). Biofilm formation and control in food processing facilities. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 2(1). <https://doi.org/10.1111/j.1541-4337.2003.tb00012.x>
- Cinar, A., & Onbaşı, E. (2020). Monitoring environmental microbiological safety in a frozen fruit and vegetable plant. *Food Science and Technology*, 41(1), 232–237. <https://doi.org/10.1590/FST.10420>
- Colagiorgi, A., Bruini, I., Di Ciccio, P. A., Zanardi, E., Ghidini, S., & Ianieri, A. (2017). *Listeria monocytogenes* Biofilms in the Wonderland of Food Industry. *Pathogens* 2017, Vol. 6, Page 41, 6(3), 41. <https://doi.org/10.3390/PATHOGENS6030041>

- Colagiorgi, A., Di Ciccio, P., Zanardi, E., Ghidini, S., & Ianieri, A. (2016). A Look inside the *Listeria monocytogenes* Biofilms Extracellular Matrix. *Microorganisms* 2016, Vol. 4, Page 22, 4(3), 22. <https://doi.org/10.3390/MICROORGANISMS4030022>
- Commission Regulation (EC) No 2073/2005 of 15 November 2005 on microbiological criteria for foodstuffs. (2005). In Off. J. Eur. Union (pp. 50, 1-26.).
- Cooper, A. L., Carrillo, C. D., Deschênes, M., & Blais, B. W. (2021). Genomic Markers for Quaternary Ammonium Compound Resistance as a Persistence Indicator for *Listeria monocytogenes* Contamination in Food Manufacturing Environments. *Journal of Food Protection*, 84(3), 389–398. <https://doi.org/10.4315/JFP-20-328>
- Cornu, M., Kalmokoff, M., & Flandrois, J. P. (2002). Modelling the competitive growth of *Listeria monocytogenes* and *Listeria innocua* in enrichment broths. *International Journal of Food Microbiology*, 73(2-3), 261-274.
- Costa, O. Y. A., Raaijmakers, J. M., & Kuramae, E. E. (2018). Microbial extracellular polymeric substances: Ecological function and impact on soil aggregation. *Frontiers in Microbiology*, 9(JUL), 1636. <https://doi.org/10.3389/FMICB.2018.01636/BIBTEX>
- Da Silva, E. P., & De Martinis, E. C. P. (2012). Current knowledge and perspectives on biofilm formation: the case of *Listeria monocytogenes*. *Applied Microbiology and Biotechnology* 2012 97:3, 97(3), 957–968. <https://doi.org/10.1007/S00253-012-4611-1>
- DeLeo, P. C., Huynh, C., Pattanayek, M., Schmid, K. C., & Pechacek, N. (2020). Assessment of ecological hazards and environmental fate of disinfectant quaternary ammonium compounds. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 206, 111116. <https://doi.org/10.1016/J.ECOENV.2020.111116>
- Denyer, S. P., & Stewart, G. S. A. B. (1998). Mechanisms of action of disinfectants. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 41(3–4), 261–268. [https://doi.org/10.1016/S0964-8305\(98\)00023-7](https://doi.org/10.1016/S0964-8305(98)00023-7)
- Desai, M. A., Soni, K. A., Nannapaneni, R., Schilling, M. W., & Silva, J. L. (2012). Reduction of *Listeria monocytogenes* Biofilms on Stainless Steel and Polystyrene Surfaces by Essential Oils. *Journal of Food Protection*, 75(7), 1332–1337. <https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-11-517>
- Di Bonaventura, G., Piccolomini, R., Paludi, D., D’Orio, V., Vergara, A., Conter, M., & Ianieri, A. (2008). Influence of temperature on biofilm formation by *Listeria monocytogenes* on various food-contact surfaces: relationship with motility and cell surface hydrophobicity. *Journal of Applied Microbiology*, 104(6), 1552–1561. <https://doi.org/10.1111/J.1365-2672.2007.03688.X>
- Disson, O., Moura, A., & Lecuit, M. (2021). Making Sense of the Biodiversity and Virulence of *Listeria monocytogenes*. In *Trends in Microbiology* (Vol. 29, Issue 9). <https://doi.org/10.1016/j.tim.2021.01.008>
- Doumith, M., Buchrieser, C., Glaser, P., Jacquet, C., & Martin, P. (2004). Differentiation of the major *listeria monocytogenes* serovars by multiplex PCR. *Journal of Clinical Microbiology*,

42(8), 3819–3822. <https://doi.org/10.1128/JCM.42.8.3819-3822.2004/ASSET/0B81C874-4729-456B-809E-D76A6A34076C/ASSETS/GRAPHIC/ZJM0080444840001.JPEG>

- Dröge, M., Pühler, A., & Selbitschka, W. (1999). Horizontal gene transfer among bacteria in terrestrial and aquatic habitats as assessed by microcosm and field studies. *Biology and fertility of soils*, 29, 221-245.
- Dufour, C. (2011). Application of EC regulation no. 2073/2005 regarding *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat foods in retail and catering sectors in Europe. *Food Control*, 22(9). <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2010.07.012>
- Dutta, V., Elhanafi, D., & Kathariou, S. (2013). Conservation and distribution of the benzalkonium chloride resistance cassette bcrABC in *Listeria monocytogenes*. *Applied and environmental microbiology*, 79(19), 6067-6074.
- Duze, S. T., Marimani, M., & Patel, M. (2021). Tolerance of *Listeria monocytogenes* to biocides used in food processing environments. *Food Microbiology*, 97, 103758. <https://doi.org/10.1016/J.FM.2021.103758>
- Ebner, R., Stephan, R., Althaus, D., Brisse, S., Maury, M., & Tasara, T. (2015). Phenotypic and genotypic characteristics of *Listeria monocytogenes* strains isolated during 2011–2014 from different food matrices in Switzerland. *Food Control*, 57, 321-326.
- EFSA. (2020). *Listeria* en verduras congeladas: cómo disminuir los riesgos | EFSA. <https://www.efsa.europa.eu/es/news/listeria-frozen-vegetables-how-reduce-risks>
- Environmental Protection Agency (EPA). Office of Pesticide Programs. Chemical, Biological Investigations Branch, & Association of Official Analytical Chemists. (1982). Manual of chemical methods for pesticides and devices. Association of Official Analytical Chemist. ( USDA, nd <https://www.astm.org/e1153-22.html>
- EPA. (2012). Pautas de prueba de rendimiento del producto: OCSPP 810.2300 Desinfectantes para uso en superficies duras: recomendaciones de datos de eficacia [EPA 712-C-07-091]. <https://www.regulations.gov/document/EPA-HQ-OPPT-2009-0150-0022> ).
- Elhanafi, D., Utta, V., & Kathariou, S. (2010). Genetic characterization of plasmid-associated benzalkonium chloride resistance determinants in a *listeria monocytogenes* train from the 1998 -1999 outbreak. *Applied and Environmental Microbiology*, 76(24), 8231–8238. <https://doi.org/10.1128/AEM.02056-10/ASSET/4E7916C1-4D47-44D6-997A-D8EC8CB7E6FC/ASSETS/GRAPHIC/ZAM9991016160005.JPEG>
- Escartín Fernández, E. (2008). Microbiología e inocuidad de los alimentos (Universidad Autónoma de Querétaro, Ed.; Segunda).
- Fagerlund, A., Møretrø, T., Heir, E., Briandet, R., & Langsruda, S. (2017). Cleaning and disinfection of biofilms composed of *Listeria monocytogenes* and background microbiota from meat processing surfaces. *Applied and Environmental Microbiology*, 83(17). [https://doi.org/10.1128/AEM.01046-17/SUPPL\\_FILE/ZAM999118021S1.PDF](https://doi.org/10.1128/AEM.01046-17/SUPPL_FILE/ZAM999118021S1.PDF)

- Fan, Z., Xie, J., Li, Y., & Wang, H. (2019). Listeriosis in mainland China: A systematic review. In *International Journal of Infectious Diseases* (Vol. 81). <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2019.01.007>
- Figueiredo, A. C. L., & Almeida, R. C. C. (2017). Antibacterial efficacy of nisin, bacteriophage P100 and sodium lactate against *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat sliced pork ham. *Brazilian Journal of Microbiology*, 48(4), 724–729. <https://doi.org/10.1016/J.BJM.2017.02.010>
- Figueroa-López, A. M., Maldonado-Mendoza, I. E., López-Cervantes, J., Verdugo-Fuentes, A. A., Ruiz-Vega, D. A., & Cantú-Soto, E. U. (2019). Prevalence and characterization of *Listeria monocytogenes* isolated from pork meat and on inert surfaces. *Brazilian Journal of Microbiology*, 50(3), 817–824. <https://doi.org/10.1007/S42770-019-00073-7/METRICS>
- Flemming, H. C., & Wingender, J. (2010). The biofilm matrix. *Nature Reviews Microbiology* 2010 8:9, 8(9), 623–633. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2415>
- Flemming, H. C., Wingender, J., Szewzyk, U., Steinberg, P., Rice, S. A., & Kjelleberg, S. (2016). Biofilms: An emergent form of bacterial life. In *Nature Reviews Microbiology* (Vol. 14, Issue 9). <https://doi.org/10.1038/nrmicro.2016.94>
- Fox, E. M., Leonard, N., & Jordan, K. (2011). Molecular Diversity of *Listeria monocytogenes* Isolated from Irish Dairy Farms. <https://Home.Liebertpub.Com/Fpd>, 8(5), 635–641. <https://doi.org/10.1089/FPD.2010.0806>
- Fuqua, W. C., Winans, S. C., & Peter Greenberg<sup>2</sup>, E. (1994). MINIREVIEW Quorum Sensing in Bacteria: the LuxR-LuxI Family of Cell Density-Responsive Transcriptional Regulators. *JOURNAL OF BACTERIOLOGY*, 176(2), 269–275. <https://journals.asm.org/journal/jb>
- García-Frutos, R., Martínez-Chávez, L., Cabrera-Díaz, E., Gutiérrez-González, P., Montañez-Soto, J. L., Varela-Hernández, J. J., & Martínez-González, N. E. (2020). *Salmonella*, *Listeria monocytogenes*, and Indicator Microorganisms on Hass Avocados Sold at Retail Markets in Guadalajara, Mexico. *Journal of Food Protection*, 83(1), 75–81. <https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-19-273>
- Gerba, C. P. (2015). Quaternary ammonium biocides: Efficacy in application. *Applied and Environmental Microbiology*, 81(2), 464–469. <https://doi.org/10.1128/AEM.02633-14/ASSET/EC26DE87-915B-47CF-ABED>
- Giaouris, E. E., & Simões, M. V. (2018). Pathogenic Biofilm Formation in the Food Industry and Alternative Control Strategies. In *Foodborne Diseases*. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-811444-5.00011-7>
- Godínez Oviedo, A., curp, & GOOA891027MHGDVN00. (2012). Incidencia y distribución de *Listeria monocytogenes* en una planta procesadora de hortalizas congeladas: Impacto de las características del patógeno en su capacidad para prevalecer en el ambiente. <https://ri-ng.uaq.mx/handle/123456789/578>
- Goessweiner-Mohr, N., Arends, K., Keller, W., & Grohmann, E. (2015). Conjugation in gram-positive bacteria. *Plasmids: Biology and Impact in Biotechnology and Discovery*, 237–256.

- Gram, L., Bagge-Ravn, D., Ng, Y. Y., Gyomai, P., & Vogel, B. F. (2007). Influence of food soiling matrix on cleaning and disinfection efficiency on surface attached *Listeria monocytogenes*. *Food Control*, 18(10), 1165–1171. <https://doi.org/10.1016/J.FOODCONT.2006.06.014>
- Grohmann, E. (2011). Horizontal gene transfer between bacteria under natural conditions. *Microbes and Microbial Technology: Agricultural and Environmental Applications*, 163-187.
- Guillier, L., Stahl, V., Hezard, B., Notz, E., & Briandet, R. (2008). Modelling the competitive growth between *Listeria monocytogenes* and biofilm microflora of smear cheese wooden shelves. *International Journal of Food Microbiology*, 128(1), 51–57. <https://doi.org/10.1016/J.IJFOODMICRO.2008.06.028>
- Harvey, J., Keenan, K. P., & Gilmour, A. (2007). Assessing biofilm formation by *Listeria monocytogenes* strains. *Food Microbiology*, 24(4), 380–392. <https://doi.org/10.1016/J.FM.2006.06.006>
- Hasani, E., Labidi, S., Mohacsi-Farkas, C., & Kisko, G. (2020). Comparison of biofilm formation between non-pathogenic *Listeria* strains under different stress conditions. *Progress in Agricultural Engineering Sciences*, 16(S2), 73–80. <https://doi.org/10.1556/446.2020.20009>
- Haagensen, J. A., Hansen, S. K., Johansen, T., & Molin, S. (2002). In situ detection of horizontal transfer of mobile genetic elements. *FEMS microbiology ecology*, 42(2), 261-268.
- Hausner, M., & Wuertz, S. (1999). High rates of conjugation in bacterial biofilms as determined by quantitative in situ analysis. *Applied and environmental microbiology*, 65(8), 3710-3713.
- Holder, I. A., & Boyce, S. T. (1994). Agar well diffusion assay testing of bacterial susceptibility to various antimicrobials in concentrations non-toxic for human cells in culture. *Burns*, 20(5), 426-429.
- Hussein, K. N., Molnár, T., Pinter, R., Toth, A., Ayari, E., Friedrich, L., ... & Kiskó, G. (2021). In vitro antimicrobial activity of plant active components against *Pseudomonas lundensis* and *Listeria monocytogenes*. *Progress in Agricultural Engineering Sciences*, 16(S2), 163-172.
- Jefferson, K. K. (2004). What drives bacteria to produce a biofilm? *FEMS Microbiology Letters*, 236(2), 163–173. <https://doi.org/10.1016/J.FEMSLE.2004.06.005>
- Jonas Stenlørkke Madsen, Mette Burmølle, Lars Hestbjerg Hansen, Søren Johannes Sørensen, La interconexión entre la formación de biopelículas y la transferencia horizontal de genes, *FEMS Immunology & Medical Microbiology*, volumen 65, número 2, julio de 2012, páginas 183–195, <https://doi.org/10.1111/j.1574-695X.2012.00960.x>
- Kader, A. A., Zagory, D., & Kerbel, E. L. (2009). Modified atmosphere packaging of fruits and vegetables. [Http://Dx.Doi.Org/10.1080/10408398909527490](http://dx.doi.org/10.1080/10408398909527490), 28(1), 1–30. <https://doi.org/10.1080/10408398909527490>

- Kamp HD, Higgins DE (2011) A Protein Thermometer Controls Temperature-Dependent Transcription of Flagellar Motility Genes in *Listeria monocytogenes*. *PLoS Pathog* 7(8): e1002153. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002153>
- Katharios-Lanwermeier, S., Rakic-Martinez, M., Elhanafi, D., Ratani, S., Tiedje, J. M., & Kathariou, S. (2012). Coselection of cadmium and benzalkonium chloride resistance in conjugative transfers from nonpathogenic *Listeria spp.* to other listeriae. *Applied and Environmental Microbiology*, 78(21), 7549–7556. [https://doi.org/10.1128/AEM.02245-12/SUPPL\\_FILE/ZAM999103773SO1.DOCX](https://doi.org/10.1128/AEM.02245-12/SUPPL_FILE/ZAM999103773SO1.DOCX)
- Kelly, B. G., Vespermann, A., & Bolton, D. J. (2009). Horizontal gene transfer of virulence determinants in selected bacterial foodborne pathogens. *Food and Chemical Toxicology*, 47(5), 969-977.
- Koutsoumanis, K., Alvarez-Ordóñez, A., Bolton, D., Bover-Cid, S., Chemaly, M., Davies, R., De Cesare, A., Herman, L., Hilbert, F., Lindqvist, R., Nauta, M., Peixe, L., Ru, G., Simmons, M., Skandamis, P., Suffredini, E., Jordan, K., Sampers, I., Wagner, M., ... Allende, A. (2020). The public health risk posed by *Listeria monocytogenes* in frozen fruit and vegetables including herbs, blanched during processing. *EFSA Journal*, 18(4), 1–102. <https://doi.org/10.2903/J.EFSA.2020.6092>
- Kovacevic, J., Ziegler, J., Walecka-Zacharska, E., Reimer, A., Kitts, D. D., & Gilmour, M. W. (2016). Tolerance of *Listeria monocytogenes* to quaternary ammonium sanitizers is mediated by a novel efflux pump encoded by *emrE*. *Applied and Environmental Microbiology*, 82(3), 939–953. [https://doi.org/10.1128/AEM.03741-15/SUPPL\\_FILE/ZAM999116894SO1.PDF](https://doi.org/10.1128/AEM.03741-15/SUPPL_FILE/ZAM999116894SO1.PDF)
- Kragh, M. L., Ivanova, M., Dalgaard, P., Leekitcharoenphon, P., & Hansen, L. T. (2024). Sensitivity of 240 *Listeria monocytogenes* isolates to common industrial biocides is more dependent on the presence of residual organic matter or biofilm than on genetic determinants. *Food Control*, 158, 110244.
- Kramarenko, T., Roasto, M., Meremäe, K., Kuningas, M., Põltsama, P., & Elias, T. (2013). *Listeria monocytogenes* prevalence and serotype diversity in various foods. *Food Control*, 30(1), 24–29. <https://doi.org/10.1016/J.FOODCONT.2012.06.047>
- Kurpas, M., Wiczorek, K., & Osek, J. (2018). Ready-to-eat meat products as a source of *Listeria monocytogenes*. In *Journal of Veterinary Research (Poland)* (Vol. 62, Issue 1). <https://doi.org/10.2478/jvetres-2018-0007>
- Lafuente, R., Maymó-Gatell, X., Mas-Castellà, J., & Guerrero, R. (1996). Influence of environmental factors on plasmid transfer in soil microcosms. *Current Microbiology*, 32, 213-220.
- Lecuit, M. (2005). Understanding how *Listeria monocytogenes* targets and crosses host barriers. In *Clinical Microbiology and Infection* (Vol. 11, Issue 6). <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2005.01146.x>
- Lecuit, M. (2020). *Listeria monocytogenes*, a model in infection biology. In *Cellular Microbiology* (Vol. 22, Issue 4). Blackwell Publishing Ltd. <https://doi.org/10.1111/cmi.13186>

- Lemaitre, J. P., Echchannaoui, H., Michaut, G., Divies, C., & Rousset, A. (1998). Plasmid-mediated resistance to antimicrobial agents among listeriae. *Journal of food protection*, 61(11), 1459-1464.
- Lepe, J. A. (2020). Current aspects of listeriosis. In *Medicina Clinica* (Vol. 154, Issue 11, pp. 453–458). Ediciones Doyma, S.L. <https://doi.org/10.1016/j.medcli.2020.02.001>
- Lezzoum-Atek, S., Bouayad, L., & Hamdi, T. M. (2019). Influence of some parameters on the ability of *Listeria monocytogenes*, *Listeria innocua*, and *Escherichia coli* to form biofilms. *Veterinary World*, 12(3). <https://doi.org/10.14202/vetworld.2019.459-465>
- Liu, D., Ainsworth, A. J., Austin, F. W., & Lawrence, M. L. (2003). Identification of *Listeria innocua* by PCR targeting a putative transcriptional regulator gene. *FEMS Microbiology Letters*, 223(2), 205–210. [https://doi.org/10.1016/S0378-1097\(03\)00378-1](https://doi.org/10.1016/S0378-1097(03)00378-1)
- Liu, D., Ainsworth, A. J., Austin, F. W., & Lawrence, M. L. (2004). PCR detection of a putative N-acetylmuramidase gene from *Listeria ivanovii* facilitates its rapid identification. *Veterinary Microbiology*, 101(2), 83–89. <https://doi.org/10.1016/J.VETMIC.2004.03.015>
- Ma, H., & Bryers, J. D. (2013). Non-invasive determination of conjugative transfer of plasmids bearing antibiotic-resistance genes in biofilm-bound bacteria: effects of substrate loading and antibiotic selection. *Applied microbiology and biotechnology*, 97, 317-328.
- Maćkiw, E., Korsak, D., Kowalska, J., Felix, B., Stasiak, M., Kucharek, K., & Postupolski, J. (2021). Incidence and genetic variability of *Listeria monocytogenes* isolated from vegetables in Poland. *International Journal of Food Microbiology*, 339, 109023. <https://doi.org/10.1016/J.IJFOODMICRO.2020.109023>
- Madsen, J. S., Burmølle, M., Hansen, L. H., & Sørensen, S. J. (2012). The interconnection between biofilm formation and horizontal gene transfer. *FEMS Immunology & Medical Microbiology*, 65(2), 183–195. <https://doi.org/10.1111/J.1574-695X.2012.00960.X>
- Magdovitz, B. F., Gummalla, S., Garren, D., Thippareddi, H., Berrang, M. E., & Harrison, M. A. (2021). Prevalence of *Listeria* Species and *Listeria monocytogenes* on Raw Produce Arriving at Frozen Food Manufacturing Facilities. *Journal of Food Protection*, 84(11), 1898–1903. <https://doi.org/10.4315/JFP-21-064>
- Maillard, J. Y. (2005). Testing the effectiveness of disinfectants and sanitisers. In *Handbook of hygiene control in the food industry* (pp. 641-671). Woodhead Publishing.
- Martínez-Suárez, J. V., Ortiz, S., & López-Alonso, V. (2016). Potential impact of the resistance to quaternary ammonium disinfectants on the persistence of *Listeria monocytogenes* in food processing environments. In *Frontiers in Microbiology* (Vol. 7, Issue MAY). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00638>
- Mata, M. T., Baquero, F., & Perez-Diaz, J. C. (2000). A multidrug efflux transporter in *Listeria monocytogenes*. *FEMS Microbiology Letters*, 187(2), 185-188.
- Matereke, L. T., & Okoh, A. I. (2020b). *Listeria monocytogenes* Virulence, Antimicrobial Resistance and Environmental Persistence: A Review. *Pathogens* 2020, Vol. 9, Page 528, 9(7), 528. <https://doi.org/10.3390/PATHOGENS9070528>

- Matle, I., Mbatha, K. R., Lentsoane, O., Magwedere, K., Morey, L., & Madoroba, E. (2019). Occurrence, serotypes, and characteristics of *Listeria monocytogenes* in meat and meat products in South Africa between 2014 and 2016. *Journal of Food Safety*, 39(4), e12629. <https://doi.org/10.1111/JFS.12629>
- Mazaheri, T., Cervantes-Huamán, B. R. H., Bermúdez-Capdevila, M., Ripolles-Avila, C., & Rodríguez-Jerez, J. J. (2021). *Listeria monocytogenes* Biofilms in the Food Industry: Is the Current Hygiene Program Sufficient to Combat the Persistence of the Pathogen? *Microorganisms* 2021, Vol. 9, Page 181, 9(1), 181. <https://doi.org/10.3390/MICROORGANISMS9010181>
- Mazaheri, T., Ripolles-Avila, C., Hascoët, A. S., & Rodríguez-Jerez, J. J. (2020). Effect of an enzymatic treatment on the removal of mature *Listeria monocytogenes* biofilms: A quantitative and qualitative study. *Food Control*, 114, 107266. <https://doi.org/10.1016/J.FOODCONT.2020.107266>
- Mc Carlie, S., Boucher, C. E., & Bragg, R. R. (2020). Molecular basis of bacterial disinfectant resistance. *Drug Resistance Updates*, 48, 100672. <https://doi.org/10.1016/J.DRUP.2019.100672>
- Mereghetti, L., Quentin, R., Marquet-Van Der Mee, N., & Audurier, A. (2000). Low sensitivity of *Listeria monocytogenes* to quaternary ammonium compounds. *Applied and Environmental Microbiology*, 66(11). <https://doi.org/10.1128/AEM.66.11.5083-5086.2000>
- Minarovičová, J., Veghova, A., Mikulášová, M., Chovanova, R., Šoltýs, K., Drahovska, H., & Kacířková, E. (2018). Benzalkonium chloride tolerance of *Listeria monocytogenes* strains isolated from a meat processing facility is related to presence of plasmid-borne bcr ABC cassette. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 111, 1913-1923.
- Mohapatra, S., Yutao, L., Goh, S. G., Ng, C., Luhua, Y., Tran, N. H., & Gin, K. Y. H. (2023). Quaternary ammonium compounds of emerging concern: Classification, occurrence, fate, toxicity and antimicrobial resistance. *Journal of Hazardous Materials*, 445, 130393. <https://doi.org/10.1016/J.JHAZMAT.2022.130393>
- Møretrø, T., & Langsrud, S. (2004). *Listeria monocytogenes*: biofilm formation and persistence in food-processing environments. *Biofilms*, 1(2), 107–121. <https://doi.org/10.1017/S1479050504001322>
- Møretrø, T., Schirmer, B. C. T., Heir, E., Fagerlund, A., Hjemli, P., & Langsrud, S. (2017). Tolerance to quaternary ammonium compound disinfectants may enhance growth of *Listeria monocytogenes* in the food industry. *International Journal of Food Microbiology*, 241, 215–224. <https://doi.org/10.1016/J.IJFOODMICRO.2016.10.025>
- Müller, A., Rychli, K., Muhterem-Uyar, M., Zaiser, A., Stessl, B., Guinane, C. M., Cotter, P. D., Wagner, M., & Schmitz-Esser, S. (2013). Tn6188 - A Novel Transposon in *Listeria monocytogenes* Responsible for Tolerance to Benzalkonium Chloride. *PLOS ONE*, 8(10), e76835. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0076835>
- Müller, A., Rychli, K., Zaiser, A., Wieser, C., Wagner, M., & Schmitz-Esser, S. (2014). The *Listeria monocytogenes* transposon Tn6188 provides increased tolerance to various

- quaternary ammonium compounds and ethidium bromide. *FEMS Microbiology Letters*, 361(2), 166–173. <https://doi.org/10.1111/1574-6968.12626>
- Muñoz-Gallego, I., Candela Ganoza, G., Chaves, F., San Juan, R., & Orellana, M. A. (2017). *Listeria monocytogenes* bacteraemia over an 11-year period: Clinical and epidemiologic characteristics in the south area of Madrid. In *Journal of Infection* (Vol. 75, Issue 3). <https://doi.org/10.1016/j.jinf.2017.05.004>
- Murray, E. G. D., Webb, R. A., & Swann, M. B. R. (1926). A disease of rabbits characterised by a large mononuclear leucocytosis, caused by a hitherto undescribed bacillus *Bacterium monocytogenes* (n.sp.). *The Journal of Pathology and Bacteriology*, 29(4). <https://doi.org/10.1002/path.1700290409>
- Nasheri, N., Vester, A., & Petronella, N. (2019). Foodborne viral outbreaks associated with frozen produce. *Epidemiology & Infection*, 147, e291. <https://doi.org/10.1017/S0950268819001791>
- Nelson, K. E., Fouts, D. E., Mongodin, E. F., Ravel, J., DeBoy, R. T., Kolonay, J. F., ... & Fraser, C. M. (2004). Whole genome comparisons of serotype 4b and 1/2a strains of the foodborne pathogen *Listeria monocytogenes* reveal new insights into the core genome components of this species. *Nucleic acids research*, 32(8), 2386-2395.
- Neri, L., Faieta, M., Di Mattia, C., Sacchetti, G., Mastrocola, D., & Pittia, P. (2020). Antioxidant Activity in Frozen Plant Foods: Effect of Cryoprotectants, Freezing Process and Frozen Storage. *Foods* 2020, Vol. 9, Page 1886, 9(12), 1886. <https://doi.org/10.3390/FOODS9121886>
- Njagi, L. W., Mbutia, P. G., Bebor, L. C., Nyaga, P. N., Minga, U., & Olsen, J. E. (2005). A study on effectiveness of seven disinfectants against possible bacteria contaminants of coops and premises inhabited by indigenous chickens and ducks. *The Kenya Veterinarian*, 29, 113-118.
- Noll, M., Trunzer, K., Vondran, A., Vincze, S., Dieckmann, R., Al Dahouk, S., & Gold, C. (2020). Benzalkonium chloride induces a VBNC state in *Listeria monocytogenes*. *Microorganisms*, 8(2). <https://doi.org/10.3390/microorganisms8020184>
- Nordholt, N., Kanaris, O., Schmidt, S. B., & Schreiber, F. (2021). Persistence against benzalkonium chloride promotes rapid evolution of tolerance during periodic disinfection. *Nature Communications*, 12(1), 6792.
- Nwaiwu, O. (2020). What are the recognized species of the genus *Listeria*? *Access Microbiology*, 2(9). <https://doi.org/10.1099/acmi.0.000153>
- OMS. (2018). Alimentación sana. Alimentación Sana. <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/healthy-diet>
- Orsi, R. H., & Wiedmann, M. (2016). Characteristics and distribution of *Listeria* spp., including *Listeria* species newly described since 2009. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 100(12), 5273–5287. <https://doi.org/10.1007/S00253-016-7552-2/TABLES/1>

- Ortiz-Solà, J., Viñas, I., Colás-Medà, P., Anguera, M., & Abadias, M. (2020). Occurrence of selected viral and bacterial pathogens and microbiological quality of fresh and frozen strawberries sold in Spain. *International Journal of Food Microbiology*, 314, 108392. <https://doi.org/10.1016/J.IJFOODMICRO.2019.108392>
- Panadero, I. G., Álvarez-Ortí, M., Rabadán, A., & Pardo, J. E. (2019). El sistema APPCC como herramienta para reducir el riesgo de aparición de *Listeria monocytogenes* en vegetales congelados. [https://doi.org/10.26754/c\\_agroing.2019.com.3357](https://doi.org/10.26754/c_agroing.2019.com.3357)
- Partridge, S. R., Kwong, S. M., Firth, N., & Jensen, S. O. (2018). Mobile genetic elements associated with antimicrobial resistance. *Clinical Microbiology Reviews*, 31(4). <https://doi.org/10.1128/CMR.00088-17>
- Peel, M., Donachie, W., & Shaw, A. (1988). Temperature-dependent expression of flagella of *Listeria monocytogenes* studied by electron microscopy, SDS-PAGE and Western blotting. *Microbiology*, 134(8), 2171-2178.
- Pracser, N., Zaiser, A., Ying, H. M. K., Pietzka, A., Wagner, M., & Rychli, K. (2024). Diverse *Listeria monocytogenes* in-house clones are present in a dynamic frozen vegetable processing environment. *International Journal of Food Microbiology*, 410, 110479. <https://doi.org/10.1016/J.IJFOODMICRO.2023.110479>
- Ramos, J. L., Martínez-Bueno, M., Molina-Henares, A. J., Terán, W., Watanabe, K., Zhang, X., ... & Tobes, R. (2005). The TetR family of transcriptional repressors. *Microbiology and molecular biology reviews*, 69(2), 326-356.
- Renier, S., Hébraud, M., & Desvaux, M. (2011). Molecular biology of surface colonization by *Listeria monocytogenes*: An additional facet of an opportunistic Gram-positive foodborne pathogen. In *Environmental Microbiology* (Vol. 13, Issue 4). <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2010.02378.x>
- Rieu, A., Briandet, R., Habimana, O., Garmyn, D., Guzzo, J., & Piveteau, P. (2008). *Listeria monocytogenes* EGD-e biofilms: No mushrooms but a network of knitted chains. *Applied and Environmental Microbiology*, 74(14), 4491–4497. <https://doi.org/10.1128/AEM.00255-08/ASSET/FD6E89B0-31D4-4EBE-95FA-8F5B844FC1E9/ASSETS/GRAPHIC/ZAM0140890140004.JPEG>
- Rodríguez-López, P., Rodríguez-Herrera, J. J., Vázquez-Sánchez, D., & Cabo, M. L. (2018). Current knowledge on *Listeria monocytogenes* biofilms in Food-Related environments: Incidence, resistance to biocides, ecology and biocontrol. In *Foods* (Vol. 7, Issue 6). MDPI Multidisciplinary Digital Publishing Institute. <https://doi.org/10.3390/foods7060085>
- Romanova, N. A., Wolffs, P. F. G., Brovko, L. Y., & Griffiths, M. W. (2006). Role of efflux pumps in adaptation and resistance of *Listeria monocytogenes* to benzalkonium chloride. *Applied and Environmental Microbiology*, 72(5), 3498–3503. <https://doi.org/10.1128/AEM.72.5.3498-3503.2006>
- Russell, A. D. (1999). Bacterial resistance to disinfectants: present knowledge and future problems. *Journal of Hospital Infection*, 43(SUPPL. 1), S57–S68. [https://doi.org/10.1016/S0195-6701\(99\)90066-X](https://doi.org/10.1016/S0195-6701(99)90066-X)

- Ryu, J., Park, S. H., Yeom, Y. S., Shrivastav, A., Lee, S. H., Kim, Y. R., & Kim, H. Y. (2013). Simultaneous detection of *Listeria* species isolated from meat processed foods using multiplex PCR. *Food Control*, 32(2), 659–664. <https://doi.org/10.1016/J.FOODCONT.2013.01.048>
- Sadekuzzaman, M., Yang, S., Mizan, M. F. R., Kim, H. S., & Ha, S. Do. (2017). Effectiveness of a phage cocktail as a biocontrol agent against *L. monocytogenes* biofilms. *Food Control*, 78, 256–263. <https://doi.org/10.1016/J.FOODCONT.2016.10.056>
- Şanlıbaba, P., Tezel, B. U., & Çakmak, G. A. (2018). Prevalence and antibiotic resistance of *listeria monocytogenes* isolated from ready-to-eat foods in Turkey. *Journal of Food Quality*, 2018. <https://doi.org/10.1155/2018/7693782>
- Sauer, K., Stoodley, P., Goeres, D. M., Hall-Stoodley, L., Burmølle, M., Stewart, P. S., & Bjarnsholt, T. (2022). The biofilm life cycle: expanding the conceptual model of biofilm formation. *Nature Reviews Microbiology* 2022 20:10, 20(10), 608–620. <https://doi.org/10.1038/s41579-022-00767-0>
- Saxena, P., Joshi, Y., Rawat, K., & Bisht, R. (2019). Biofilms: Architecture, Resistance, Quorum Sensing and Control Mechanisms. *Indian Journal of Microbiology*, 59(1), 3–12. <https://doi.org/10.1007/S12088-018-0757-6/METRICS>
- Scharff L, R. (2012). Economic Burden from Health Losses Due to Foodborne Illness in the United States. *Journal of Food Protection*, 75(1), 123–131. [https://doi.org/10.4315/0362-028X\\_JFP-11-058](https://doi.org/10.4315/0362-028X_JFP-11-058)
- Schmitz-Esser, S., Anast, J. M., & Cortes, B. W. (2021). A large-scale sequencing-based survey of plasmids in *Listeria monocytogenes* reveals global dissemination of plasmids. *Frontiers in Microbiology*, 12, 653155.
- Schlech, W. F., Lavigne, P. M., Bortolussi, R. A., Allen, A. C., Haldane, E. V., Wort, A. J., Hightower, A. W., Johnson, S. E., King, S. H., Nicholls, E. S., & Broome, C. V. (1983). Epidemic Listeriosis — Evidence for Transmission by Food. *New England Journal of Medicine*, 308(4), 203–206. <https://doi.org/10.1056/NEJM198301273080407>
- Sharma, P., Shehin, V. P., Kaur, N., & Vyas, P. (2018). Application of edible coatings on fresh and minimally processed vegetables: a review. *Food Control*, 85, 295–314. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2018.05.014>
- Sibanda, T., & Buys, E. M. (2022). *Listeria monocytogenes* Pathogenesis: The Role of Stress Adaptation. *Microorganisms* 2022, Vol. 10, Page 1522, 10(8), 1522. <https://doi.org/10.3390/MICROORGANISMS10081522>
- Silva, S., Teixeira, P., Oliveira, R., & Azeredo, J. (2008). Adhesion to and viability of *Listeria monocytogenes* on food contact surfaces. *Journal of Food Protection*, 71(7), 1379–1384. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-71.7.1379>
- Skandamis, P. N., & Nychas, G. J. E. (2012). Quorum Sensing in the Context of Food Microbiology. *Applied and Environmental Microbiology*, 78(16), 5473–5482. <https://doi.org/10.1128/AEM.00468-12>

- Skowron, K., Hulisz, K., Gryń, G., Olszewska, H., Wiktorczyk, N., & Paluszak, Z. (2018). Comparison of selected disinfectants efficiency against *Listeria monocytogenes* biofilm formed on various surfaces. *International Microbiology*, 21(1–2), 23–33. <https://doi.org/10.1007/S10123-018-0002-5/FIGURES/4>
- Soria-Herrera, R. J., Dominguez-Gonzalez, K. G., Rumbo-Pino, R., Piña-Lazaro, A., Alvarez-Perez, J. J., Rivera-Gutierrez, S., Ponce-Saavedra, J., Ortiz-Alvarado, R., Gonzalez-Y-Merchand, J. A., Yahuaca-Juarez, B., & Cerna-Cortes, J. F. (2021). Occurrence of Nontuberculous *Mycobacteria*, *Salmonella*, *Listeria monocytogenes*, and *Staphylococcus aureus* in Artisanal Unpasteurized Cheeses in the State of Michoacan, Mexico. *Journal of Food Protection*, 84(5), 760–766. <https://doi.org/10.4315/JFP-20-286>
- Sørensen, S. J., Bailey, M., Hansen, L. H., Kroer, N., & Wuertz, S. (2005). Studying plasmid horizontal transfer in situ: a critical review. *Nature Reviews Microbiology*, 3(9), 700–710.
- Stancu, V., Haugaard, P., & Lähteenmäki, L. (2016). Determinants of consumer food waste behaviour: Two routes to food waste. *Appetite*, 96, 7–17. <https://doi.org/10.1016/J.APPET.2015.08.025>
- Sundheim, G., Langsrud, S., Heir, E., & Holck, A. L. (1998). Bacterial resistance to disinfectants containing quaternary ammonium compounds. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 41(3–4), 235–239. [https://doi.org/10.1016/S0964-8305\(98\)00027-4](https://doi.org/10.1016/S0964-8305(98)00027-4)
- Susanna, K. A., Den Hengst, C. D., Hamoen, L. W., & Kuipers, O. P. (2006). Expression of transcription activator ComK of *Bacillus subtilis* in the heterologous host *Lactococcus lactis* leads to a genome-wide repression pattern: a case study of horizontal gene transfer. *Applied and environmental microbiology*, 72(1), 404–411.
- Szymczak, B., Szymczak, M., & Trafiałek, J. (2020). Prevalence of *Listeria* species and *L. monocytogenes* in ready-to-eat foods in the West Pomeranian region of Poland: Correlations between the contamination level, serogroups, ingredients, and producers. *Food Microbiology*, 91, 103532. <https://doi.org/10.1016/J.FM.2020.103532>
- The European Union One Health 2020 Zoonoses Report. (2021). *EFSA Journal*, 19(12). <https://doi.org/10.2903/J.EFSA.2021.6971>
- Tong, C., Hu, H., Chen, G., Li, Z., Li, A., & Zhang, J. (2021). Disinfectant resistance in bacteria: Mechanisms, spread, and resolution strategies. *Environmental research*, 195, 110897.
- Toyofuku, M., Inaba, T., Kiyokawa, T., Obana, N., Yawata, Y., & Nomura, N. (2015). Environmental factors that shape biofilm formation. *OUP*, 80(1), 7–12. <https://doi.org/10.1080/09168451.2015.1058701>
- Truchado, P., Gil, M. I., Querido-Ferreira, A. P., Capón, C. L., Álvarez-Ordoñez, A., & Allende, A. (2022). Frozen Vegetable Processing Plants Can Harbour Diverse *Listeria monocytogenes* Populations: Identification of Critical Operations by WGS. *Foods*, 11(11). <https://doi.org/10.3390/foods11111546>
- van der Sman, R. G. M. (2020). Impact of Processing Factors on Quality of Frozen Vegetables and Fruits. *Food Engineering Reviews*, 12(4), 399–420. <https://doi.org/10.1007/S12393-020-09216-1/FIGURES/4>

- Van Meervenue, E., Van Coillie, E., Van Weyenberg, S., Boon, N., Herman, L., & Devlieghere, F. (2015). Low Temperature and modified atmosphere: hurdles for antibiotic resistance transfer? *Journal of food protection*, 78(12), 2191-2199.
- Vega Iturbe, M. A. (2022). Interacción entre especies no patógenas del género *Listeria* y *Listeria monocytogenes* en biopelículas y su relación con la resistencia a compuestos cuaternarios de amonio.
- Velge, P., & Roche, S. M. (2010). Variability of *Listeria monocytogenes* virulence: A result of the evolution between saprophytism and virulence? In *Future Microbiology* (Vol. 5, Issue 12). <https://doi.org/10.2217/fmb.10.134>
- Vivek, K., Suranjoy Singh, S., Ritesh, W., Soberly, M., Baby, Z., Baite, H., Mishra, S., & Pradhan, R. C. (2019). A review on postharvest management and advances in the minimal processing of fresh-cut fruits and vegetables. In *Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences* (Vol. 8, Issue 5, pp. 1178–1187). Slovak University of Agriculture. <https://doi.org/10.15414/jmbfs.2019.8.5.1178-1187>
- William Costeton, J., Lewandowski, Z., Caldwell, D. E., Korber, D. R., & Appin-Scott, H. M. (1995). MICROBIAL BIOFILMS. 711–745.
- Winkelströter, L. K., Gomes, B. C., Thomaz, M. R. S., Souza, V. M., & De Martinis, E. C. P. (2011). *Lactobacillus sakei* 1 and its bacteriocin influence adhesion of *Listeria monocytogenes* on stainless steel surface. *Food Control*, 22(8), 1404–1407. <https://doi.org/10.1016/J.FOODCONT.2011.02.021>
- Yoo, J. H. (2018). Review of disinfection and sterilization - Back to the basics. *Infection & Chemotherapy*, 50(2), 101–109. <https://doi.org/10.3947/IC.2018.50.2.101>
- Yuan, L., Sadiq, F. A., Wang, N., Yang, Z., & He, G. (2021). Recent advances in understanding the control of disinfectant-resistant biofilms by hurdle technology in the food industry. In *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* (Vol. 61, Issue 22). <https://doi.org/10.1080/10408398.2020.1809345>
- Zhan, X., Zhu, Z., & Sun, D. W. (2018). Effects of pretreatments on quality attributes of long-term deep frozen storage of vegetables: a review. *Food Control*, 59(5), 743–757. <https://doi.org/10.1080/10408398.2018.1496900>
- Zhang, X., Wang, S., Chen, X., & Qu, C. (2021). Review controlling *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat meat and poultry products: An overview of outbreaks, current legislations, challenges, and future prospects. In *Trends in Food Science and Technology* (Vol. 116). <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2021.07.014>

## ANEXOS

Anexo 1: Protocolo de titulación QACs

**Determinación de compuestos de amonio cuaternario por el método del ferricianuro (EPA 1982).**

**Principio del Método:** El exceso de solución de ferricianuro se hace reaccionar con compuestos de amonio cuaternario para formar un precipitado insoluble que se filtra de la solución de muestra. Se determina el exceso de ferricianuro en el filtrado mediante valoración con tiosulfato estándar y el porcentaje de cuaternario se calcula a partir de la cantidad de ferricianuro utilizado.

### Reactivos:

1. Solución tampón: disuelva 130 gramos de acetato de sodio en 400 mL de agua, añadir 42 mL de ácido acético y completar hasta 500 mL.
2. Solución de ferricianuro: disolver 6,6 gramos de ferricianuro de potasio en agua y completar hasta un litro (aprox. 0,02 N)
3. Solución de sulfato de zinc: disuelva 20 gramos de hepta-sulfato de zinc hidratar en 180 mL de agua.
4. Tiosulfato de sodio, solución estándar 0,02 N - diluir 100 mL Tiosulfato de sodio estándar 0,1 N hasta 500 mL.
5. Ácido clorhídrico (0.1 N)
6. Yoduro de potasio, ACS, cristales.
7. Solución indicadora de almidón

### Equipos:

1. Baño de vapor
2. Aparato de filtración
3. Aparato de titulación

#### 4. Material de vidrio habitual de laboratorio

##### **Procedimiento:**

Pesar una porción de muestra equivalente a 0,5 gramos de compuesto de amonio cuaternario en un matraz volumétrico de 100 mL y disolverla en aproximadamente 50 mL de agua. Si la muestra no es fácilmente soluble, caliéntela en un baño de vapor durante unos 10 minutos mezclando ocasionalmente; enfriar y agregar 5 mL de la solución tampón.

Añadir exactamente, con una pipeta, 30 mL de la solución de ferricianuro, haciendo girar el matraz durante la adición. Completar el volumen con agua, mezclar bien y dejar reposar durante media hora, mezclando ocasionalmente.

Filtrar, desechando los primeros 10 mL del filtrado. Pipetee 50 mL del filtrado en un matraz Erlenmeyer con tapón de vidrio de 300 mL, agregue 10 mL de agua, 1-2 gramos de yoduro potásico y 10 mL (1+1) de ácido clorhídrico. Mezclar bien y dejar reposar 2 minutos. Añadir 10 mL de solución de sulfato de zinc, mezclar y dejar reposar 2-5 minutos más.

Valorar con solución estándar de tiosulfato de sodio 0,02 N, añadiendo solución indicadora de almidón cerca del final de la titulación.

Repita el procedimiento anterior exactamente, usando una porción idéntica (30 mL) de solución de ferricianuro a la que se usó con la muestra. Esto servirá como un blanco para los reactivos y proporciona una base para el cálculo.

Calcular el porcentaje de nitrógeno y el porcentaje de amonio cuaternario compuestos de la siguiente manera:

$$\%N = \frac{(\text{Blank ml} - \text{Sample ml})(N \text{ Na}_2\text{S}_2\text{O}_3)(.0140)(100)}{(\text{grams sample})}$$

0.0140 = milliequivalent weight of nitrogen

% Quaternary = % nitrogen X nitrogen to quaternary factor

Anexo 2: Análisis de correlación entre presencia de genes de resistencia a QACs (*bcrABC* y *qacH*) y diámetros de inhibición según los métodos de difusión en agar.

- Análisis en R Studio (Correlación de *Pearson*)

**Pearson's product-moment correlation**

data: Corre\$Diametro.mm. and Corre\$gen.*bcrABC*

t = 0.23753, df = 67, **p-value = 0.813**

alternative hypothesis: true correlation is not equal to 0

95 percent confidence interval: -0.2091097 0.2638757

sample estimates: cor **0.02900657**

**Pearson's product-moment correlation**

data: Corre\$Diametro.mm. and Corre\$gen.*qacH*

t = 0.74306, df = 67, **p-value = 0.46**

alternative hypothesis: true correlation is not equal to 0

95 percent confidence interval: -0.1494721 0.3202354

sample estimates: cor **0.09040696**

- Análisis en R Studio (Prueba *t de student*)

Welch Two Sample t-test

data: Diametro by Genes *bcrABC* y *qacH*

t = -0.20136, df = 23.238, p-value = **0.8422**

alternative hypothesis: true difference in means between group Ausencia and group Presencia is not equal to 0

95 percent confidence interval: -0.8468967 0.6965699

sample estimates: mean in group Ausencia mean in group Presencia

**17.61111**

**17.68627**

