



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO FACULTAD DE  
QUÍMICA  
MAESTRÍA EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE LOS  
ALIMENTOS

**“INHIBICIÓN DE *Listeria monocytogenes* MEDIANTE  
AGENTES QUÍMICOS Y EL FAGO A511 EN SALCHICHA”**

**TESIS**

Que como parte de los requisitos para obtener el grado de:  
**MAESTRO EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS**

**Presenta:**

Lic. Adriana Nicole González Canizo

**Dirigido por:**

Dra. Sofía María Arvizu Medrano

**Co-Dirigido por:**

Dr. Mauricio Redondo Solano

Querétaro, Qro. diciembre, 2025.

**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 licenciatario 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 licenciatario.

 **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  
QUÍMICA

MAESTRÍA EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE LOS  
ALIMENTOS

**“INHIBICIÓN DE *Listeria monocytogenes* MEDIANTE  
AGENTES QUÍMICOS Y EL FAGO A511 EN SALCHICHA”**

**TESIS**

Que como parte de los requisitos para obtener el grado de:  
**MAESTRO EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS**

**Presenta:**

Lic. Adriana Nicole González Canizo

**Dirigido por:**

Dra. Sofía María Arvizu Medrano

**Co-Dirigido por:**

Dr. Mauricio Redondo Solano

Dra. Sofía María Arvizu Medrano

Presidente

Dr. Mauricio Redondo Solano

Secretario

Dra. Montserrat Hernández Iturriaga

Vocal

Dra. Angélica Godínez Oviedo

Suplente

M. en C. Adriana Araya Morice

Suplente

Centro Universitario Querétaro, Qro.

Diciembre, 2025.

México

## **DEDICATORIAS**

A mis padres, por buscar darme más de lo que ellos tuvieron, me han apoyado en estudiar todo lo que me guste, han sido mi mayor motivación para siempre querer ser mejor, tienen menos dudas sobre mí que yo misma, esto es un trabajo nuestro, porque ustedes me formaron y estoy aquí por ustedes.

A mi hermana, no te limites nunca, puedes hacer todo lo que quieras, busca en qué eres buena y esfuérzate.

A mí niña interna, la ciencia y vernos de bata en un laboratorio, fue algo que nos daba mucha ilusión y lo logramos.

Recuerda, fue, es y será difícil, pero siempre sale.

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 reproducible 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.



**ADRIANA NICOLE GONZÁLEZ CANIZO**

## AGRADECIMIENTOS

A mis padres, a lo mejor no siempre entendieron bien lo que hacía, pero siempre me ayudaron con lo que pudieron; llevarme en fines de semana al laboratorio o recogerme en la noche; las comidas o chistes de mi mamá, fueron el mejor consuelo en esos días que ni yo me aguantaba. Sé que siempre han querido lo mejor para mí y que me supere cada día, lo hicieron bien, son muy buenos padres y espero poder hacerlos sentir siempre orgullosos. A mi Mina, que me ayudó mucho a distraerme cuando me sentía mal, dejarme apapacharla y ser tan buena guardiana en mis noches en vela.

A la Dra. Sofí, gracias por darme un espacio y confiar en mí desde el servicio social, su buen ánimo y optimismo, fueron sostén para mí, me ayudó mucho en todo esto, no sólo en lo académico. Trabajar con alguien que se presta tanto para formar nuevos investigadores, que además sea una buena persona, es algo raro de ver en este mundo, gracias por esa forma tan especial de ser, la aprecio mucho.

A mis sinodales, por ayudarme con este trabajo; a la Dra. Monse, sabía de lo que era capaz, cuáles eran mis capacidades y logre sacarlas, siempre me recordó tratar de ser mejor. Dr. Mauricio, gracias por su disponibilidad para reunirnos y resolver dudas o hasta para la estancia. Dra. Angélica y Dra. Adriana por sus valiosos comentarios y aportaciones.

A la empresa por los muestreos, ganas de mejorar su producto y darle espacio a la investigación.

A mis amigos, los discípulos, es la primera vez en mucho tiempo que hago match tan bien con un grupo tan grande, son muy importantes para mí. Su ayuda con experimentos, esperarme tan tarde o acompañarme, fue muy valioso. Gracias por todas esas veces en que me hicieron ver el vaso medio lleno, los llevo en mi corazón siempre Juan Carlos, Paola, Luis, Toño, Ludy, Pau, David.

A Italia, fui tu aprendiz durante todo este viaje, muchas gracias por ser tan buena mentora y amiga, nunca me dejaste rendirme y logramos un congreso en Chile.

Agradecimiento especial a Paola, por las tardes para escribir, distraernos y abrirmos las puertas de tu casa, pero también por el apoyo fuera de. A Juan Carlos, gracias infinitas por ser mi bote salvavidas y motivarme constantemente para terminar, tu amor y apoyo constante fueron clave en este trabajo que es también, nuestro. Gracias por esos días enteros de trabajo arduo donde tampoco sabías muy bien qué hacía, pero siempre estuviste para mí, para alegrarme los días o hacerme compañía, jamás tuviste dudas de mí, formamos un gran equipo y lo logramos, una meta más juntos.

A SECIHTI por la beca otorgada.

## ÍNDICE

ÍNDICE .....	I
ÍNDICE DE CUADROS .....	V
ÍNDICE DE FIGURAS .....	VI
RESUMEN.....	1
ABSTRACT .....	2
1.INTRODUCCIÓN.....	3
2.ANTECEDENTES .....	5
2.1 Salchicha .....	5
2.1.1 Características generales.....	5
2.1.2 Proceso de elaboración.....	5
2.1.3 Sobrevivencia y desarrollo de microorganismos en salchicha .....	9
2.1.4 Prevalencia de <i>Listeria monocytogenes</i> y asociación con brotes de enfermedades .....	10
2.2 <i>Listeria monocytogenes</i> .....	12
2.2.1 Características generales.....	12
2.2.2 Listeriosis .....	13
2.3 Estrategias de control en producción de alimentos .....	15
2.3.1 Agentes químicos aplicados al control microbiano en alimentos .....	16
2.4 Agentes biológicos de control microbiano .....	18
2.4.1 Bacteriófagos .....	19
2.4.2 Fago A511.....	21
3.OBJETIVOS .....	22
3.1 Objetivo general .....	22
3.2 Objetivos específicos .....	22
4.MATERIALES Y MÉTODOS .....	23
4.1 Equipo y materiales .....	23
4.1.1 Equipo .....	23
4.1.2 Medios de cultivo .....	23
4.1.3 Soluciones.....	23
4.1.4 Reactivos .....	24
4.2 Material biológico.....	24
4.2.1 Salchicha.....	24
4.2.2 Cepas de <i>L. monocytogenes</i> .....	25

4.2.3 Bacteriófago .....	26
<b>4.3 Activación de cepas.....</b>	<b>27</b>
4.4 Detección de genes asociados a virulencia.....	27
4.5 Cuantificación del bacteriófago A511 .....	28
4.5.1 Evaluación de la capacidad del fago A511 para inhibir a diferentes cepas de <i>L. monocytogenes</i> .....	28
4.6 Selección de cepas de <i>L. monocytogenes</i> .....	28
4.7 Evaluación de la capacidad de formación de biopelículas .....	29
4.8 Evaluación de desarrollo de cepas en salchicha .....	30
Las placas se incubaron a 30 °C/24 h. ....	30
4.9 Evaluación de conservadores sobre el desarrollo de <i>L. monocytogenes in vitro</i> .....	31
4.10 Evaluación de la aplicación del conservador y Carniplus sobre la inhibición de <i>L. monocytogenes</i> en salchichas de pavo.....	32
4.11 Análisis estadístico .....	32
<b>5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....</b>	<b>33</b>
5.1 Detección de genes asociados a virulencia de <i>L. monocytogenes</i> en cepas aisladas de ambiente de producción de embutidos .....	33
5.2 Evaluación capacidad de inhibición del fago A511 sobre cepas de <i>L. monocytogenes</i> .....	37
5.3 Selección de cepas de <i>L. monocytogenes</i> según su potencial de virulencia y susceptibilidad a A511 .....	39
5.4 Evaluación de formación de biopelículas de cepas de <i>L. monocytogenes</i> ...42	42
5.5 Evaluación de desarrollo de cepas de <i>L. monocytogenes</i> en salchicha de pavo .....	46
5.6 Evaluación de conservadores en combinación con A511 para inhibir <i>L. monocytogenes in vitro</i> .....	49
5.7 Evaluación de la aplicación de A511 y carniplus sobre la inhibición de <i>L. monocytogenes</i> en salchichas de pavo.....	54
5.8 Determinación de parámetros cinéticos de la evaluación del fago A511 con Carniplus usando DMFit.....	58
<b>6. CONCLUSIONES .....</b>	<b>61</b>
<b>7. REFERENCIAS .....</b>	<b>62</b>
<b>8. ANEXOS.....</b>	<b>77</b>

## ÍNDICE DE CUADROS

<b>Cuadro 1.</b> Tipos de carnes utilizadas en la producción de salchichas. ....	6
<b>Cuadro 2.</b> Brotes asociados a embutidos en los últimos 10 años alrededor del mundo.....	11
<b>Cuadro 3.</b> Información nutrimental por 100 g de producto de la salchicha de pavo comercial. ....	24
<b>Cuadro 4.</b> Cepas de <i>L. monocytogenes</i> del ambiente de producción de embutidos. ....	25
<b>Cuadro 5.</b> Lista de genes involucrados con la virulencia de la cepa .....	27
<b>Cuadro 6.</b> Clasificación de cepas con capacidad de formación de polímeros .....	30
<b>Cuadro 7.</b> Conservadores y concentraciones evaluados sobre la inhibición del desarrollo de <i>L. monocytogenes</i> en caldo soya tripticasa.....	31
<b>Cuadro 8.</b> Capacidad de formación de biopelículas de cepas de <i>L. monocytogenes</i> a 30 °C ± 1 °C in vitro en CST. ....	42
<b>Cuadro 9.</b> Efecto de los tratamientos sobre los parámetros cinéticos de crecimiento (Fase lag, $\mu$ max) y población final de <i>L. monocytogenes</i> en salchicha de pavo incubada a 30 °C/48 h y 10 °C/14 días.....	59
<b>Anexo 1.</b> Condiciones de amplificación de genes involucrados con la virulencia de <i>L. monocytogenes</i> .....	77

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Diagrama de flujo de proceso de producción de salchichas cocidas (FAO-PRODAR, 2014) .....	7
<b>Figura 2.</b> Proceso de infección de un bacteriófago lítico. ....	20
<b>Figura 3.</b> Micrografía electrónica del fago A511 (Université Laval, 2024) .....	26
<b>Figura 4.</b> Muestras de la evaluación de la actividad lítica en placa. ....	28
<b>Figura 5.</b> Genes asociados con virulencia de <i>L. monocytogenes</i> identificados en el estudio .....	33
<b>Figura 6.</b> Presencia de genes asociados con virulencia de las 30 cepas recuperadas de <i>L. monocytogenes</i> .....	34
<b>Figura 7.</b> Zonas de inhibición generados por A511 usando como cepa replicante a LC11, empleando la técnica de agar doble capa, a $30\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ / 24 h en AST. ....	37
<b>Figura 8.</b> Susceptibilidad de cepas de <i>L. monocytogenes</i> a A511 a $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ / 24 h en AST, evaluada con el sistema de Chibber <i>et al.</i> (2018).....	38
<b>Figura 9.</b> Agrupación de cepas de <i>L. monocytogenes</i> , por clúster en JMP® 8.0, de acuerdo a los genes presentes y susceptibilidad a A511. Grupo 1 (rojo), Grupo 2 (naranja), Grupo 3 (azul), Grupo 4 (verde). ....	40
<b>Figura 10.</b> Gráfico de interacción de la media de densidad óptica (DO), a 595 nm de la tinción con cristal violeta (CV), de cepas de <i>L. monocytogenes</i> <i>in vitro</i> más un control (CST sin inocular) a 24 h y 48 h.....	44
<b>Figura 11.</b> Cinética de las cepas de <i>L. monocytogenes</i> en salchicha de pavo por 26 días a $4\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ .....	46
<b>Figura 12.</b> Cinética de crecimiento de cepas de <i>L. monocytogenes</i> (A) LC10, B) LC11, C) LC16, D) LC74, E) LC94, F) LC100) en CST en conjunto con A511 y el conservador, (a) Carniplus (0.125 %, 0.25 %, 0.5 %) y (b) Nisina (3.125 ppm, 6.25 ppm, 12.5 ppm) <i>in vitro</i> a $4\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 14 días.....	51
<b>Figura 13.</b> Cinética de crecimiento de una mezcla de cepas de <i>L. monocytogenes</i> en salchicha de pavo por 48 h a $30\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Carniplus [0.125 %] .....	54
<b>Figura 14.</b> Cinética de crecimiento de coctel de cepas de <i>L. monocytogenes</i> en salchicha de pavo por 14 días a $10\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Carniplus [0.125 %] .....	56

## RESUMEN

*Listeria monocytogenes*, es responsable de la listeriosis, enfermedad de alta letalidad (hasta 50 %) que afecta principalmente a personas inmunocomprometidas. Las salchichas cocidas, representan un vehículo recurrente del patógeno. La capacidad de *L. monocytogenes* para formar biopelículas favorece su persistencia en ambientes de producción y promueve la contaminación de los alimentos post-procesos. Aunque la industria cárnica usa conservadores químicos para controlar su crecimiento, se buscan opciones más naturales. Entre ellas, los bacteriófagos se destacan por su alta especificidad e inocuidad. El objetivo de este trabajo fue determinar la capacidad de inhibición de bacteriófagos en combinación con conservadores sobre *L. monocytogenes* en salchicha de pavo. Se detectaron por PCR la presencia de genes de virulencia en 30 cepas de *L. monocytogenes* provenientes del ambiente de producción de embutidos, entre los que destacaron *hlyA*, *prfA*, *plcB2*, *inlB* y *flaA* presentes en el 100 % de las cepas. Se seleccionaron cepas representativas con distintos perfiles genotípicos susceptibles al bacteriófago A511. También se evaluó su capacidad de formar biopelículas y su desarrollo en salchicha cocida a 4 °C; las cepas con mayor cantidad de genes de virulencia mostraron IFB más altos y aunque el alimento contenía conservadores, *L. monocytogenes* fue capaz de desarrollar ligeramente o sobrevivir. En cepas seleccionadas se evaluó *in vitro* la combinación del fago con los conservadores Nisina y Carniplus a diferentes concentraciones. Los resultados mostraron que las concentraciones más bajas (0.125 % Carniplus y 3.125 ppm Nisina), en presencia del fago A511, generaron mayor inhibición del crecimiento del patógeno, evidenciando compatibilidad entre ambos agentes. La evaluación en salchicha cocida confirmó que la combinación de A511 con Carniplus al 0.125 % fue efectiva tanto a 30 °C como a 10 °C. Estos resultados demuestran que el uso conjunto de bacteriófagos y conservadores a dosis bajas constituye una estrategia eficaz para inhibir *L. monocytogenes* en productos cárnicos listos para el consumo, ofreciendo una alternativa segura y sustentable frente a los métodos tradicionales.

**Palabras clave:** *Listeria monocytogenes*, bacteriófagos, conservadores, salchichas.

## ABSTRACT

*Listeria monocytogenes* is responsible for listeriosis, a highly lethal disease (up to 50%) that mainly affects immunocompromised individuals. Cooked sausages represent a recurrent vehicle for the pathogen. The ability of *L. monocytogenes* to form biofilms favors its persistence in production environments and promotes post-processing contamination of foods. Although the meat industry uses chemical preservatives to control its growth, more natural alternatives are being sought. Among these, bacteriophages stand out for their high specificity and safety. The aim of this study was to determine the inhibitory capacity of bacteriophages in combination with preservatives against *L. monocytogenes* in turkey sausage. The presence of virulence genes was detected by PCR in 30 *L. monocytogenes* strains isolated from the sausage production environment, among which *hlyA*, *prfA*, *plcB2*, *inlB*, and *flaA* were present in 100% of the strains. Representative strains with different genotypic profiles and susceptibility to bacteriophage A511 were selected. Their ability to form biofilms and to grow in cooked sausage at 4 °C was also evaluated; strains with a higher number of virulence genes showed higher biofilm formation indices (BFI), and although the food contained preservatives, *L. monocytogenes* was able to slightly develop or survive. Selected strains were tested *in vitro* for the combination of the phage with the preservatives nisin and Carniplus at different concentrations. The results showed that the lowest concentrations (0.125% Carniplus and 3.125 ppm nisin), in the presence of phage A511, generated greater inhibition of pathogen growth, evidencing compatibility between both agents. The evaluation in cooked sausage confirmed that the combination of A511 with 0.125% Carniplus was effective at both 30 °C and 10 °C. These results demonstrate that the combined use of bacteriophages and preservatives at low doses constitutes an effective strategy to inhibit *L. monocytogenes* in ready-to-eat meat products, offering a safe and sustainable alternative to traditional methods.

**Key Words:** *Listeria monocytogenes*, bacteriophages, preservatives, sausages.

## 1. INTRODUCCIÓN

De acuerdo con el Consejo Mexicano de la Carne, en 2024 el consumo de carnes frías en México creció alrededor de 2.4% respecto a 2023, en línea con la dinámica del mercado cárnico nacional. La producción nacional de carnes frías alcanzó cerca de 1.18 millones de toneladas, según lo difundido por el organismo. En el comercio exterior, las exportaciones de carnes frías sumaron aproximadamente 10,099 toneladas en 2024, lo que representó una disminución cercana al 50% frente a 2023; los principales destinos se mantuvieron en Estados Unidos y Centroamérica. En contraste, las importaciones de carnes frías fueron del orden de 63 mil toneladas en 2024, para atender la demanda interna en crecimiento (COMECARNE, 2024a; COMECARNE, 2024b).

Las exportaciones de los alimentos pueden verse limitadas por la falta de cumplimiento de estándares establecidos por los diferentes países destino. La calidad microbiológica y la presencia de patógenos son algunas de las causas que generan rechazos en frontera. *Listeria monocytogenes* es uno de los principales patógenos asociados a embutidos y representa un desafío significativo para la seguridad alimentaria y la salud pública (Parra-Bracamonte, *et al.*, 2020). Su ingreso puede ocurrir tanto en la producción de alimentos como a lo largo de la cadena alimentaria, debido a su ubicuidad en el ambiente; adicionalmente tienen la capacidad de formar biopelículas y es una bacteria psicrótrofa, lo que promueve su persistencia en el ambiente de producción de embutidos (Vidović *et al.*, 2022). Esta bacteria tiene una notable capacidad para sobrevivir y desarrollarse en diversos entornos estresantes propios de los alimentos, como bajos niveles de temperatura, pH y elevadas concentraciones de sal (Osek *et al.*, 2022). La presencia de este patógeno ocasiona riesgos para la salud de los consumidores y considerables pérdidas económicas (CDC, 2021).

Ante esta situación, se han desarrollado distintas estrategias para evitar su contaminación y desarrollo en alimentos; empleando desde compuestos químicos como conservadores, hasta biológicas como bacteriófagos. En el caso de los conservadores, estudios anteriores, como el de Uesugi & Moraru (2009) reportan que *Listeria innocua* (empleada como subrogado de *L. monocytogenes*) presenta

una reducción de 2.3 log UFC después de aplica Nisaplin en salchichas listas para el consumo. Sin embargo, una desventaja importante de los conservadores es que su eficacia puede depender fuertemente de la dosis, la matriz alimentaria, condiciones de almacenamiento (pH, aw, temperatura) y la presencia de biofilm: a veces dosis más altas no aumentan proporcionalmente la inhibición e incluso pueden favorecer mecanismos de adaptación bacteriana (Muchaamba *et al.*, 2021).

Por su parte, los bacteriófagos han demostrado ser una estrategia efectiva para evitar la proliferación bacteriana en productos alimenticios, fagos inhibitorios de *L. monocytogenes* se comienzan a comercializar, como el fago P100; Rossi *et al.* (2010) evaluaron este fago en salchichas brasileñas crudas, mostrando que fue capaz de reducir 2.5 log UFC entre los 0 y 10 días después de su adición a la matriz. Al ser una estrategia natural, tratándose de virus altamente específicos para una especie bacteriana, no generan daño en el consumidor, ni afectan las propiedades sensoriales del producto (Rendueles *et al.*, 2022).

Se puede observar que cada estrategia presenta un porcentaje de eficiencia distinto, que varía según la parte del procesamiento en que se aplique. Por ejemplo, la distribución del producto, es uno de los puntos de control que genera más problemas sobre el funcionamiento de las barreras empleadas para impedir la contaminación bacteriana, por lo que se busca generar barreras asociadas para maximizar la efectividad (Rendueles *et al.*, 2022).

El objetivo de este trabajo fue determinar la capacidad de inhibición de bacteriófagos en combinación con conservadores químicos sobre *L. monocytogenes* en salchicha.

## 2.ANTECEDENTES

### 2.1 Salchicha

#### 2.1.1 Características generales

Las salchichas son un producto formado a partir de una pasta de carne, que se embute en forma simétrica para después dejarlas en crudo, cocinarlas, escaldarlas o bien para pasarlas por un proceso de fermentación (Carballo, 2021). Los tipos más comunes de salchichas son Viena, Franckfort y Cocktail, la diferencia entre cada una es el tamaño, pero la clasificación se puede dar incluso por el tipo de carne que contenga en mayor cantidad, lo cual determinará el precio y calidad de la salchicha (Essien, 2003; Polon *et al.*, 2017).

De acuerdo a la NMX-F-065-1984, las salchichas deben ser al menos un 60% mezcla de carne de ternera, res o cerdo, en conjunto con la grasa de los mismos animales; se le pueden agregar condimentos o aditivos. Sin embargo, al tratarse de una NMX, su aplicación en la industria no es obligatoria, sino más de tipo sugerido; por lo que en muchas ocasiones la mezcla tiene porcentajes distintos o se puede agregar carne obtenida de otros animales, aunque estructuralmente se aprecia más la carne magra de canales de bovinos por su alta proporción tejido muscular-grasa, color y capacidad de retención de agua (Lonergan *et al.*, 2019).

Son un alimento originado en el continente europeo, Alemania siendo la sede, como un método de preservación para la carne (Carballo, 2021; Lonergan *et al.*, 2019), después se fueron añadiendo condimentos para aumentar la palatabilidad. Cada región las preparaba con las especias a su alcance, siendo creativos e innovadores al momento de preparar nuevas, dejando así una amplia variedad de salchichas que se siguen produciendo hasta el día de hoy (Lonergan *et al.*, 2019).

#### 2.1.2 Proceso de elaboración

El primer paso para producir salchichas es la selección de la carne, buscando que sea carne de alta calidad, con un color, sabor y textura característico, puede ser carne de ternera, cordero, cerdo, carnero y aves e incluso cortes de cabeza o sobrantes (Abdolghafour & Saghir, 2014), tal como se muestra en el **Cuadro 1**.

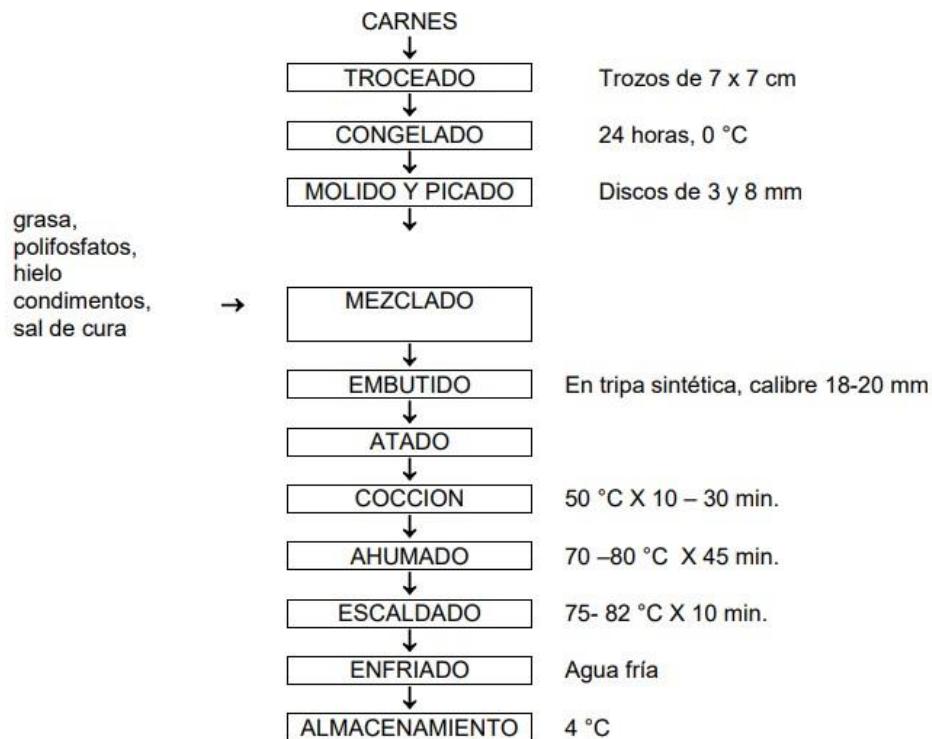
**Cuadro 1.** Tipos de carnes utilizadas en la producción de salchichas.

Elementos	Tipos de carne
<b>Carnes con las mejores cualidades aglutinantes</b>	Carne de toro Carne deshuesada de vaca Chuletas de ternera
<b>Carnes con cualidades aglutinantes bastante buenas</b>	Carne de cabeza de res Carrilleras de ternera Ternera deshuesada Carne de cabeza de ternera Recortes de cerdo extra magros y magros Carne de cabeza de cerdo Carrilleras de cerdo
<b>Carnes con cualidades aglutinantes pobres</b>	Corazones de res Carne de comadreja Menudencias de res Recortes de lengua de res Recortes de cerdo regulares Corazones y papada de cerdo Grasa de jamón de cerdo Mejillas y corazones de oveja
<b>Carnes de relleno. Estos ingredientes deben limitarse a menos del 25% de la fórmula por su alto contenido de tejido conectivo.</b>	Labios de buey Tripas de ternera Labios, callos y morros de cerdo

Traducida y modificada (Lonergan *et al.*, 2019).

Además de las carnes del **Cuadro 1**, también se utiliza carne de aves, como pollo y pavo, que son un recurso barato en comparación con la carne roja (Lonergan *et al.*, 2019). Este tipo de salchichas sin cocción, tendrán una consistencia suave, una humedad elevada por la alta retención de agua y como consecuencia, una corta vida de anaquel, de aproximadamente 8 días (FAO-PRODAR, 2014; Martinez *et al.*, 2006)

Lo siguiente es cortarla en piezas lo suficientemente pequeñas para pasar con facilidad a través de la boquilla del molinillo, para cada tipo de embutido existe una granulometría de la masa adecuada, que, de no cumplirse, el embutido podría perder su forma (**Figura 1**). Es recomendable que la carne este casi congelada para facilitar su manipulación (Polon *et al.*, 2017), impidiendo la desnaturalización de proteínas y la oxidación de lípidos, para obtener una emulsión (Zhang *et al.*, 2023); también facilita el corte, con lo que se desgasta menos el equipo y se minimiza la contaminación (Polon *et al.* 2017).



**Figura 1.** Diagrama de flujo de proceso de producción de salchichas cocidas (FAO-PRODAR, 2014).

Una vez cortada y molida la carne, se reserva en el congelador mientras se pesan el resto de ingredientes, el pesaje correcto de los mismos será crucial para obtener la pasta deseada, de lo contrario el embutido podría tener un rechazo organoléptico, proliferación de microorganismos contaminantes o pérdida de materia prima (Polon *et al.*, 2017).

Después se agregan las sales, condimentos y otros sazonadores en una mezcladora, hasta lograr una mezcla compacta evitando la formación de burbujas de aire (FAO-PRODAR, 2014; Polon *et al.*, 2017). Al mismo tiempo que se mezcla se pica nuevamente la carne, obteniendo una mezcla homogénea, con mayor

extracción de proteínas de la carne que permite una emulsión estable (Abdolghafour & Saghir, 2014).

La mezcla (no mayor a 2°C) pasa a la máquina embutidora, usando fundas naturales (intestinos de cerdos u ovejas), o artificiales (hechas de colágeno y celulosa) (Abdolghafour & Saghir, 2014). El equipo pasa la mezcla por un pistón eléctrico que comprime la pasta para hacerla pasar por la boquilla en donde se colocan las fundas (Polon *et al.*, 2017). Luego se dividen las porciones de carne con nudos después de ciertos centímetros, según el tamaño del producto final con hilo de algodón, acumulándose en poleas (Knipe, 2024).

Para el caso de las salchichas cocidas, anteriormente se usaban hornos, tanques o freidoras para cocinarlas (Knipe, 2024), actualmente los métodos de cocción se han ido modernizando para evitar la contaminación o daños al producto, ya que este es un punto de control que determinará la vida de anaquel de la salchicha. Entre las opciones de cocción están cámaras herméticas donde se inyecta vapor, pulverizadores de agua o calor seco, pero el más económico es el uso de tinas con una temperatura aproximada de 70°C (Abdolghafour & Saghir, 2014; Carvalho *et al.*, 2020; DiegoZarate *et al.*, 2021) posteriormente o durante la cocción se hace el ahumado y luego la pasteurización (Knipe, 2024).

Después de todo el proceso, se da un enfriamiento del embutido con un baño de agua fría o en hielo directamente, luego se cuelgan en poleas nuevamente para secarse y se remueve la funda con máquina. Ahora ya se puede pasar al área de empaque (**Figura 1**), una vez salido el producto del procesamiento térmico es necesario que se mantenga como máximo a 4°C para alargar la vida de anaquel. Los empaques en este caso suelen ser películas plásticas (Abdolghafour & Saghir, 2014; FAO, s.f), aunque de igual modo se siguen innovando materiales. Como es el caso de Yaghoubi *et al.* (2024), que emplearon una película activa de alginato de calcio con nanopartículas de nisina, con una buena actividad antimicrobiana después de 3 a 5 días.

La idea de generar salchichas cocidas es ofrecer alimentos que impliquen menos tiempo para prepararse, por ello son listos para el consumo. Esta implicación hace que la gente confié en que el alimento está libre de cualquier patógeno, pero la contaminación se puede dar en varias partes durante el proceso de producción,

postteriormente a la cocción y hasta el momento en que llega a ser consumida (Buchanan *et al.*, 2017).

### 2.1.3 Sobrevivencia y desarrollo de microorganismos en salchicha

La salchicha contiene varios ingredientes que pueden afectar la sobrevivencia y desarrollo de los microorganismos que pueden ingresar durante el proceso; entre ellos se encuentra el cloruro de sodio (sal), empleada para dar y realzar sabor o solubilizar las proteínas miofibrilares, aumentar la retención de agua para formar la textura de gel deseada, reduciendo la actividad de agua y la posibilidad de desarrollo de los microorganismos presentes (Abdolghafour & Saghir, 2014; Sirini *et al.*, 2022). Se agrega de 1.5% a 2.5% de sal y en algunos productos se sustituye el cloruro de sodio por cloruro de potasio o una combinación de ambas (Lonergan *et al.*, 2019; Sirini *et al.*, 2022).

La grasa es otro componente importante para la construcción de una salchicha, ésta determina la textura, jugosidad, sabor, igual que el costo final del producto. (Lonergan *et al.*, 2019). No obstante, estudios recientes buscan alternativas para disminuir el porcentaje de grasa, buscando carnes o polímeros que ayuden a mantener las características aceptadas con un porcentaje menor de grasa, como puede ser la carne de pavo (Carvalho *et al.*, 2020; Carballo, 2021; Sirini *et al.*, 2022; Ruotong *et al.*, 2024). La tendencia de contar con salchichas que contengan menor grasa se debe a las repercusiones a la salud de un consumo alto de grasas y a la digestión ineficiente en bebés y adultos mayores. Adicionalmente, la grasa permite que el patógeno se proteja del jugo gástrico y las lipasas pancreáticas, favoreciendo su sobrevivencia y su legada al lumen intestinal donde puede establecer una infección (De la Senc & Diciembre, 2016).

El agua, es un ingrediente empleado en forma líquida o sólida, suele usarse para disolver y dispersar las sales de cura, así como controlar la temperatura durante el procesamiento, por lo que se recomienda que sea agua fría, preferentemente hielo (Abdolghafour & Saghir, 2014; Lonergan *et al.*, 2019). Ésta afecta las propiedades del color, sabor y apariencia, por lo que su uso está regulado, permitiendo en salchichas frescas un 3% y en cocidas un 10% (Lonergan *et al.*, 2019).

Las sales de curado más comúnmente empleadas en salchichas son el nitrato y/o nitrito de sodio y de potasio, pues tienen capacidad antimicrobiana, particularmente sobre *Clostridium botulinum*, pero de igual manera se ha visto que retrasan de manera efectiva el crecimiento bacteriano de una amplia gama de microorganismos (Oliveira *et al.*, 2005; Rosa & Degáspari, 2013). El tipo de salchicha se ha visto que puede afectar la efectividad de estas sales, pues en las salchichas de cerdo fermentadas, la concentración de nitrito de sodio disminuye rápidamente, lo cual compromete la inocuidad del alimento; por ello se han buscado alternativas para combinar con estas sales de cura o definitivamente sustituirlas (Vedovatto *et al.*, 2019).

#### 2.1.4 Prevalencia de *Listeria monocytogenes* y asociación con brotes de enfermedades

Los embutidos al ser productos adicionados de sal, de algunos inhibidores y ser cocidos, podrían considerarse alimentos seguros; pero a pesar de la generación de barreras constantes, siguen existiendo casos de enfermedad debido a salchichas (**Cuadro 2**), siendo el microorganismo con mayor frecuencia implicado en brotes de embutidos, *L. monocytogenes*. El Centro de Control de Enfermedades (CDC, por sus siglas en inglés), reconoce que para la carne de res, puerco, cabra y oveja hay una tendencia a presentar con mayor regularidad *Salmonella*, *Escherichia coli* y *Yersinia enterolitica*, mientras que, para la carne de aves, principalmente pollo o pavo, la prevalencia más relevante es de *Salmonella*, *Campylobacter*, así como *Clostridium perfringens*, asociados a contaminación cruzada en su mayoría o cuando hay deficiencias en el manejo del alimento en la cadena de producción (CDC, 2023). Se sabe que hay una prevalencia de *L. monocytogenes* en el ambiente de producción de salchichas, en la carne picada se ha reportado entre el 16 al 50% y hasta del 70 al 100% cuando ocurre contaminación cruzada (Jay, 1996). Mudadu *et al.* (2022) encontraron *L. monocytogenes* en el 26.6% (4/15) de muestras de salchichas fermentadas después de 13 días de almacenamiento a  $8^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ ; la cual tiende a ser la temperatura común empleada por los consumidores antes de ingerir el producto.

**Cuadro 2.** Brotes asociados a embutidos en los últimos 10 años alrededor del mundo.

	<b>Tipo de alimento</b>	<b>Periodo</b>	<b>Referencia</b>
<b><i>Salmonella</i></b>	Salchicha	de 2020-2021	Pardos <i>et al.</i> , 2023.
<b><i>enterica</i> serotipo</b>	puerco		
<b><i>Bovismorbifican</i></b>	fermentada		
<b><i>s</i></b>			
<b><i>Listeria sp.</i></b>	Carnes frías	Agosto 2020- octubre 2020	CDC, 2021.
<b><i>S. Typhimurium</i></b>	Salchicha cruda de cerdo	2018-2019	Helmuth <i>et al.</i> , 2019
<b><i>L. monocytogenes</i></b>	Morcilla	2018-2019	Halbedel <i>et al.</i> , 2020
<b><i>L. monocytogenes</i></b>	Salchicha lista para el consumo	2014-2019	Adler <i>et al.</i> , 2020
<b><i>L. monocytogenes</i></b>	Jamón	2018	CDC, 2018.
<b><i>L. monocytogenes</i></b>	Alimentos listos para el consumo	2017	Thomas <i>et al.</i> , 2020
<b><i>L. monocytogenes</i></b>	Embutidos	2014	Dahl <i>et al.</i> , 2017

En el caso de México, Castañeda-Ruelas *et al.* (2022), obtuvieron cepas de *L. monocytogenes* de jamón y salchichas que mostraban resistencia a antibióticos, principalmente ácido nalidíxico, ceftazidima, junto con sulfitoxazol, que son empleados para mantener la salud del animal, así como para engorda. El uso desmedido de estos antibióticos hace que el tratamiento contra el patógeno sea cada vez menos eficiente y ejerce una presión de selección sobre las cepas. ang *et al.* (2023), reportaron una correlación entre la resistencia a antibióticos con la

sobrevivencia de las cepas ante tratamientos físicos, aquellas cepas más resistentes a antibióticos fueron las que sobrevivieron mejor a tratamientos de estrés físico, que son comunes durante la producción y conservación del producto.

Del mismo modo, Jiménez-Edeza *et al.* (2020), al analizar salchichas de marcas de distribución más populares a nivel nacional, reportan que el porcentaje de salchichas contaminadas con *L. monocytogenes* es 4.2%, sin importar si se trata de venta en paquete o a granel. Los consumidores se expondrán al patógeno si consumen el alimento sin ningún tratamiento térmico.

No obstante, se carece de datos epidemiológicos en México que puedan relacionar directamente la listeriosis con el consumo de alimentos, pues no se reportan y analizan los brotes asociados al consumo de alimentos, mostrando un área de oportunidad a mejorar y establecer qué alimentos y patógenos son los relevantes para nuestra población. En otros países se ha evidenciado la prevalencia de *L. monocytogenes* en salchichas, la probabilidad de haber personas infectadas por ingesta de alimentos contaminados existe (Castañeda-Ruelas *et al.*, 2014; Jiménez Edeza *et al.*, 2020).

## 2.2 *Listeria monocytogenes*

El género *Listeria* contiene 18 especies, de las cuales *L. ivanovii* y *L. monocytogenes* se relacionan con la listeriosis en rumiantes y humanos (Letchumanan *et al.*, 2018; Olaimat *et al.*, 2018), son aisladas en su mayoría del tracto gastrointestinal de los mismos o de alimentos de origen animal. Forman parte de la familia Listeriaceae, del grupo “*Listeria* sensu stricto” (Olaimat *et al.*, 2018). Por antígenos somáticos (O) y flagelares (H) se reconocen 13 serotipos de la especie, donde el área de alimentos en conjunto con el medio de producción suele presentar los serotipos 1/2a, 1/2b, 1/2c y 4b (Jamshidi & Zeinali, 2019).

### 2.2.1 Características generales

*Listeria monocytogenes*, un microorganismo Gram-positivo, catalasa positiva, facultativamente anaerobio en forma bacilar, presenta movilidad en el intervalo de temperaturas de 22-28°C, siendo no móvil por encima de los 30°C, debido a un

flagelo perítico. Su capacidad de crecimiento abarca desde -0,4°C hasta 45°C, con una temperatura óptima de 37°C, reconociéndola como psicrótrofa (Abdollahzadeh *et al.*, 2014).

Este patógeno destaca por su notable capacidad de sobrevivir y mantenerse viable en condiciones desafiantes, tales como una baja actividad de agua ( $aw < 0.90$ ), un amplio rango de pH entre 4.6 y 9.5, y una elevada tolerancia a la salinidad de hasta 20 % NaCl (Bucur *et al.*, 2018). Aunque estas condiciones suelen limitar el crecimiento activo de la mayoría de los patógenos, *L. monocytogenes* puede persistir durante largos períodos y reanudar su multiplicación cuando el ambiente vuelve a ser favorable. Esta capacidad adaptativa explica su presencia recurrente en entornos de procesamiento de alimentos y su potencial para resistir los procesos de sanitización (Wang *et al.*, 2022).

Es una bacteria ambiental, puede encontrarse tanto en suelo como en agua, debido a esto la contaminación es difícil de evitar. Existen registros de haberse encontrado tanto en personas como en animales sanos, por lo que se puede portar a la bacteria sin saberlo (Jamshidi & Zeinali, 2019). Es conocida por persistir de manera prolongada en ambientes de alimentos, puesto que tiene la capacidad de formar biopelículas, de esta manera se puede adherir a diversas superficies, favoreciendo su permanencia en el entorno (Chen, 2012; Jamshidi & Zeinali, 2019).

Tiene la capacidad de rotar entre ser saprófita o virulento según las condiciones del ambiente (Matereke & Okoh, 2020). Tal como menciona Cordero *et al.* (2016), donde muestra que *L. monocytogenes* se adapta a bajas temperaturas, primero censa la temperatura, al ser baja comienza a crecer a una tasa baja y desencadena la expresión adaptativa de genes, generando cambios fisiológicos, como en la composición de la membrana celular, la síntesis de proteínas de choque térmico y la generación de sustancias crioprotectoras; con este proceso adaptativo, logra mejorar la velocidad de crecimiento.

### 2.2.2 Listeriosis

*L. monocytogenes* es el causante de la listeriosis, que puede manifestarse como infecciones esporádicas o brotes, con una tasa de letalidad del 20-30% a nivel mundial (Buchanan *et al.*, 2017), siendo una de las principales causas de muerte relacionado a ETAs (Chen, 2012). Cada cepa tiene un potencial de virulencia

distinto, algunas pueden ser muy virulentas mientras otras son agentes no infecciosos, se han establecido marcadores confiables para diferenciar las virulentas de las que no lo son (Jamshidi & Zeinali, 2019).

*L. monocytogenes* puede ingresar a través del alimento, atraviesa las barreras epiteliales para así lograr la invasión celular utilizando las proteínas de superficie llamadas internalinas, una vez dentro de las células del huésped puede generar la replicación intracelular (Matereke & Okoh, 2020; Jamshidi & Zeinali, 2019). Dentro de los factores de virulencia conocidos están las hemolisinas, también llamadas listeriolisinas, las cuales son toxinas influenciadas por el pH, éstas ayudan a la internalización de la bacteria en las células del huésped mediante la generación de poros en las membranas (Matereke & Okoh, 2020).

Es así que se pueden generar 2 tipos de cuadros clínicos de acuerdo a la salud de la persona infectada, puede ser una listeriosis gastrointestinal febril no invasiva entre aquellas personas que son inmunocompetentes y una listeriosis invasiva entre aquellos inmunocomprometidos o susceptibles como pueden ser personas de la tercera edad, mujeres embarazadas o recién nacidos (Matereke & Okoh, 2020; Jamshidi & Zeinali, 2019).

La gastroenteritis tiene un periodo de incubación corto, desde unas pocas horas hasta 2 a 3 días donde aparece fiebre leve, diarrea vómitos y náuseas (Shamloo, et al., 2019), en cambio la invasiva puede aparecer desde un par de días hasta 3 meses. Las complicaciones se dirigen más hacia las personas susceptibles, donde las embarazadas pueden tener abortos espontáneos, muerte fetal o partos prematuros, mientras en el resto del grupo llegan a presentar meningitis o septicemia. Un factor de virulencia destacado es la isla de patogenicidad LIPI-1, la cual contiene genes que sintetizan a LLO y actA, éstas son proteínas que permiten la propagación de la infección en las células del huésped. Al eliminarlos el patógeno pierde gran parte de su virulencia, lo que lleva a pensar que mantenerlos es crítico para la supervivencia de la bacteria (Lecuit, 2020).

Hasta el momento se desconoce la dosis mínima infectante de *L. monocytogenes*; un nivel alto de contaminación en alimento es cuando la concentración es mayor a  $10^4$  UFC/g, pues ya puede generar listeriosis, si la concentración es de  $10^2$  UFC/g se ha visto que el riesgo de presentar el cuadro clínico es bajo, pero en las personas

inmunocomprometidas ya se podría generar la enfermedad (Letchumanan *et al.*, 2018). A pesar de que la enfermedad no es tan común, en el año 2020 se reportó 1876 casos confirmados de listeriosis invasiva en países miembros de la Unión Europea, con un 97% de hospitalizaciones (EFSA y ECDC, 2021); para el año 2023, se notificaron 2993 casos confirmados en la UE/EEE, el máximo histórico desde que existe vigilancia a escala europea; entre los casos con información clínica disponible, el 96.6% requirió hospitalización y se registraron 340 defunciones (ECDC, 2025). Para el caso de Estados Unidos, se estiman 1600 casos por año con una tasa de hospitalizaciones superior al 90% (Osek *et al.*, 2022).

Al ser la salchicha una matriz con alto contenido en proteínas y grasas, ofrece un ambiente propicio para la proliferación de los microorganismos y puede favorecer la sobrevivencia del patógeno durante el paso por el tracto digestivo, incrementando la posibilidad de que se presente la enfermedad (Massia *et al.*, 2024).

### 2.3 Estrategias de control en producción de alimentos

Se generan barreras para tratar de evitar la sobrevivencia y desarrollo de los patógenos en los alimentos, como es el tratamiento térmico (Niklas *et al.*, 2023), preservación de la cadena de frío (Massia *et al.*, 2024), el uso de aditivos (Balzan *et al.*, 2017), procesos de<sup>o</sup> fermentación (Carballo, 2021), generar sistemas de control en el flujo de producción (Polon *et al.*, 2017), mejorar los empaques (Parrini *et al.*, 2020), entre otros.

La estrategia más efectiva para evitar la contaminación por *L. monocytogenes* es la prevención; por ello, la producción de embutidos debe operar dentro de un riguroso sistema de Buenas Prácticas de Manufactura (BPM) y un plan HACCP integral, como lo recomienda oficialmente la política canadiense para alimentos listos para consumir (Health Canada, 2023)

Sin embargo, la persistencia de *L. monocytogenes* está estrechamente relacionada con su capacidad para formar biopelículas sobre distintas superficies, incluidas las de acero inoxidable y plástico, que son de uso común en las plantas de procesamiento. Estas estructuras protectoras dificultan la eliminación total del patógeno, incluso cuando los programas de limpieza y desinfección se ejecutan correctamente, lo que convierte a la biopelícula en una fuente recurrente de

contaminación. Por ello, se recomienda incorporar barreras adicionales de control, tales como agentes biológicos o conservadores compatibles, para reducir la probabilidad de persistencia microbiana (Olaimat *et al.*, 2018).

Lo más común en la industria de alimentos, es utilizar tratamientos térmicos para eliminar cualquier microorganismo contaminante en los productos. Se ha descrito que para la inactivación de *L. monocytogenes* se requieren tratamientos de 55 °C por 10 minutos o 65°C por 12 segundos; aunque la bacteria puede generar proteínas de choque térmico (HSPs, por sus siglas en inglés) y se han encontrado 3 clases de genes involucrados por el momento (Osek *et al.*, 2022).

Otra estrategia es conjuntar factores físicos o químicos, como Wang *et al.* (2023), que observaron la respuesta del microorganismo ante calor, pH ácido y alcalino, radiación UV y estrés osmótico. Sus resultados muestran que las cepas de *L. monocytogenes* tienden a ser más resistentes a estos factores que otras especies del mismo género, además esta resistencia va ligada a la resistencia a antibióticos.

### 2.3.1 Agentes químicos aplicados al control microbiano en alimentos

El uso de aditivos suele ser común en los embutidos para realzar características o para evitar el desarrollo de patógenos y deterioradores (Zeng, 2007). En este sentido algunos de los aditivos más controversiales son los nitritos ( $\text{NO}_2$ ) y nitratos ( $\text{NO}_3$ ), ambos empleados para el curado de la carne, impidiendo el crecimiento de microorganismos, retrasando la rancidez, estabilizando el color y generando las propiedades organolépticas de un ahumado; todo esto permite el alargamiento de la vida de anaquel de la carne, además de darle un valor agregado (Ferysiuk & Wojciak, 2020).

No obstante, el uso de este tipo de conservadores se ha relacionado con problemas a la salud, al encontrar en estudios recientes N-nitroso-diisopropilamina (NDIPA) en jamón y salchichas empleando una técnica acoplada de espectrometría de masas con cromatografía de gases (Yang *et al.*, 2019), ésta es una sustancia química cancerígena que surge a partir de los nitritos y nitratos. Adicionalmente, se reconoce que se pueden generar compuestos volátiles a partir de los mismos conservadores, como el N-Nitrodimetilamina o N-Nitrosodimetilamida, que son considerados los

más peligrosos en términos de carcinogenicidad y genotoxicidad (De Mey *et al.*, 2017; Ferysiuk & Wojciak, 2020).

Los ascorbatos y eritorbatos también son empleados como agentes de aceleración del curado. Estos suelen reaccionar con nitritos para producir óxido nítrico, ayudando a estabilizar el color rojo, al mismo tiempo que inhiben la formación de nitrosaminas; siendo una opción para disminuir los riesgos asociados a cáncer por el uso de nitritos. El ahumado es otra técnica de conservación empleada en salchichas, puede aplicarse con la quema de madera o el ahumado líquido sintético (Lonergan *et al.*, 2019), este tratamiento influye en la composición de la microbiota, de acuerdo a la temperatura y tiempo de aplicación. Aunque Modzelewska-Kapituła & Maj-Sobotka (2014), encontraron que seguían estando presentes células de *L. monocytogenes* en salchicha con este tratamiento, pero el desarrollo de la bacteria era menor, por lo que se podría complementar el uso de este conservador con otro, dado que proporciona un sabor particular del gusto del consumidor.

Los ácidos orgánicos son otra alternativa química utilizada, generados a partir de la fermentación de ciertos compuestos, mayormente por bacterias ácido lácticas, obteniendo como producto ácido acético, láctico, propiónico o fórmico. Estos productos (principalmente el ácido láctico) han demostrado una capacidad antimicrobiana sobre *L. monocytogenes* tanto en carne aviar como en vegetales, actuando como agente de control de pH sin cambiar el aroma del producto (Amiri *et al.*, 2021; Davidson & Taylor, 2007). El uso de éstos, aparte de aplicarse directamente al alimento, se suele utilizar como un método de descontaminación para superficies. Los ácidos orgánicos en su forma no disociada permitiendo que el ácido entre a la célula bacteriana, generando protones que acidifican el citoplasma y afectan su metabolismo (Davidson & Taylor, 2007).

Se ha visto un creciente interés por parte de la población para reducir o eliminar por completo el uso de conservadores sintéticos de los productos alimenticios, dado que la correlación entre el uso excesivo de los mismos con daños a la salud de quien consume, generando toxicidad se sigue observando en estudios. Es por ello que las industrias productoras de alimentos han generado un punto de atención hacia el uso de conservadores naturales, menos invasivos para el consumidor, pero

que tengan la misma efectividad para prevenir la sobrevivencia y desarrollo de los microorganismos en el alimento (Prakash *et al.*, 2017).

## 2.4 Agentes biológicos de control microbiano

Aplicaciones novedosas han surgido como tratamientos en alimentos para inhibir la proliferación bacteriana, un ejemplo son los extractos de plantas, que pueden contener aceites esenciales en conjunto con compuestos fenólicos. Igualmente se pueden emplear derivados antimicrobianos de animales como pueden ser las lisozimas y derivados microbianos, como son: endolisinas, y bacteriocinas. Las bacterias antagonistas y los bacteriófagos también son empleados para inhibir microorganismos, siendo estos agentes biológicos no generan reacciones adversas a la salud de quien consume (de Oliveira *et al.*, 2015; Rodríguez-Rubio *et al.*, 2015).

Las bacteriocinas son péptidos o proteínas con actividad antimicrobiana sobre cepas similares genéticamente, encontradas en bacterias Gram negativas y positivas, por ello tanto su estructura como mecanismo de acción es diverso, dividiéndolas en cinco clases. Dentro de las ventajas que presentan está la estabilidad a altas temperaturas, así como a pH bajo. Son eficientes a bajas concentraciones, en temperaturas de refrigeración y se consideran seguras para el consumidor. En la industria de alimentos se suelen aplicar a productos lácteos, carne procesada, vegetales y algunas bebidas (Amiri *et al.*, 2021; Rendueles *et al.*, 2022). Su uso puede disminuir el uso de conservadores convencionales, además de minimizar la temperatura del tratamiento térmico, haciendo que su uso en alimentos genere productos más frescos con mayor aceptabilidad sensorial y nivel nutricional (Rendueles *et al.*, 2022)

La nisina es el ejemplo más común de bacteriocina. Es un péptido de 34 aminoácidos generado de la fermentación de la leche por cepas modificadas de *Lactobacillus lactis*. Tiene una actividad antimicrobiana, principalmente hacia bacterias formadoras de esporas, pero es igual de eficiente hacia otras bacterias Gram positivas, como *L. monocytogenes* (Amiri *et al.*, 2021). La capacidad de inhibición está dada por la interacción de carga positiva de la nisina, con la carga negativa de la membrana, lo que genera un rompimiento del complejo enzimático que hace la síntesis de membrana. Su uso es seguro, pues se ha visto que se

genera de forma natural en varios productos lácteos y su actividad se ve afectada por el medio donde se encuentra, siendo más eficiente en un medio acuoso a pH bajo. Se reconoce el gran potencial de la nisin para inhibir la formación de biopelículas o romper las preformadas, por otro lado, hacia hongos, bacterias Gram negativas y virus es de baja a casi nula, por lo que no puede ser la única barrera empleada (Tavares *et al.*, 2024).

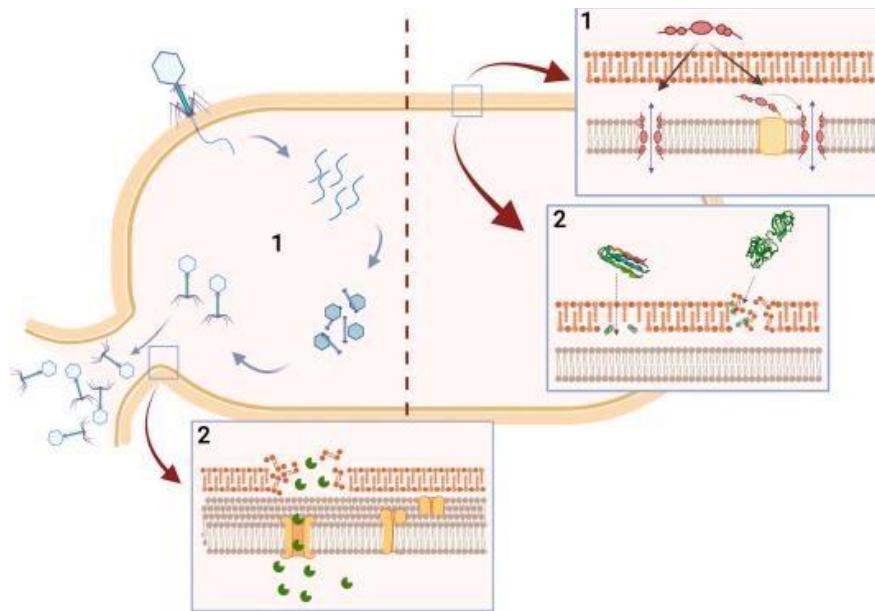
Se han visto mecanismos de resistencia a este bioconservador, como modificaciones estructurales a la envoltura celular, impidiendo la interacción entre las bacteriocinas con las células por cambios en la fluidez de la membrana; cambios en las cargas superficiales, producción de exopolisacáridos, supresión de receptores de bacteriocinas considerados no esenciales, activación de bombas de flujo, haciendo que su uso deba ser monitoreado constantemente (Rendueles *et al.*, 2022).

#### 2.4.1 Bacteriófagos

Los bacteriófagos (fagos) son virus que se encuentran de manera abundante en el ambiente, son agentes infecciosos de bacterias y suelen estar donde estén las bacterias blanco, como agua, alimentos e incluso el intestino humano (Kawacka *et al.*, 2020). Son altamente específicos para células bacterianas, por lo que son generalmente reconocidos como seguros (GRAS, por sus siglas en inglés) y están autorizados para su aplicación en alimentos (Komora *et al.*, 2021). Se emplean en alimentos listos para el consumo sin alterar las propiedades organolépticas del producto y pueden aumentar la vida útil del producto (Perera *et al.*, 2015).

Estos virus están compuestos por una cápside de proteínas que rodea el genoma, ADN o ARN, la cual es a menudo esférica o elongada cuyo tamaño dependerá del tipo de bacteriófago. Pueden tener estructuras accesorias como una cola, fibras alrededor de la cola que le facilitan la entrada a la célula bacteriana (Karczewska *et al.*, 2023). Hay fagos de tipo lítico, que alteran el metabolismo bacteriano para generar la muerte celular del huésped, usando su propia maquinaria celular para hacer copias de sí mismo. Hacia el fin del ciclo lítico se codifican proteínas con actividad muranolítica, las endolisinias que rompen la célula para liberar a las nuevas partículas virales (Rendueles *et al.*, 2022). También hay lisogénicos, que incorporan su material genético al de la bacteria, al ser muy variable su genoma puede ser

replicado, permitiendo generar más viriones e infectar otras bacterias (Karczewska *et al.*, 2023) (**Figura 2**). Debido a esto, los fagos sirven como estrategia de control de las poblaciones microbianas, dan paso a la evolución bacteriana al promover la transferencia de genes y la diversificación, además de servir como herramientas para el control de infecciones (Kawacka *et al.*, 2020).



**Figura 2.** Proceso de infección de un bacteriófago lítico. (1) Efecto de holina y endolisina. (2) Interacción de bacteriocinas con membrana celular (Rendueles *et al.*, 2022).

Varios estudios han mostrado a *L. monocytogenes* como un buen candidato a ser tratado con fagos, actualmente ya hay fagos comercializados (Listex™ P100 y ListShield™) y se pueden emplear en carnes, pescado ahumado o fermentado, leche, queso, frutas recién cortadas, vegetales y otros productos listos para el consumo (Kawacka *et al.*, 2020). El uso acoplado con otros tratamientos ha mostrado un aumento en la efectividad, pues el tipo de matriz empleada podría definir qué tan bien responde el fago, para tratar de evitar la resistencia de las cepas patógenas (Rendueles *et al.*, 2022). Los fagos responden bien en medios líquidos, pero en caso de matrices sólidas es necesario tener una buena superficie de contacto, lo que permite la diseminación prolífica del fago. Es necesario emplear fagos líticos, no lisogénicos o se puede tener una resistencia a tratamientos en menor tiempo (Kawacka *et al.*, 2020).

## 2.4.2 Fago A511

El bacteriófago A511 es un fago lítico de amplio espectro que infecta eficazmente a *L. monocytogenes* y se ha considerado como herramienta de biocontrol en alimentos listos para el consumo. Por ejemplo, estudios han mostrado que A511 puede reducir recuentos de *L. monocytogenes* entre  $\approx 0,4$  y  $5,0$  log UFC en diversas matrices alimentarias como hot dogs, pescado o ensaladas refrigeradas, cuando se aplica a dosis del orden de  $10^8$  PFU/g y luego se almacena a  $6$  °C (Guenther *et al.*, 2009).

En otro nivel, se ha esclarecido su mecanismo estructural: la base del puesto de adherencia (baseplate) del fago sufre una transformación simétrica al unirse al huésped, lo que facilita la inyección de ADN en la célula (Guerrero-Ferreira *et al.*, 2019). Gracias a estas características, A511 ha sido considerado como candidato para el control de *Listeria* en modalidades industriales, aunque su eficacia depende de factores como la concentración inicial, la temperatura de almacenamiento, la accesibilidad de la bacteria y la interacción con la matriz alimentaria (Grigore-Gurgu *et al.*, 2024).

### **3.OBJETIVOS**

#### 3.1 Objetivo general

Determinar la capacidad de inhibición del fago A511 en combinación con conservadores sobre *L. monocytogenes* en salchicha de pavo.

#### 3.2 Objetivos específicos

- 1.- Seleccionar cepas de *L. monocytogenes* según su potencial de virulencia y susceptibilidad a A511
2. Caracterizar la formación de biopelículas y la capacidad de desarrollo en salchicha de pavo de cepas de *L. monocytogenes* seleccionadas.
- 3.- Evaluar el efecto del fago A511 y conservadores sobre *L. monocytogenes in vitro*.
- 4.- Evaluar la aplicación de bacteriófagos y conservadores sobre la inhibición de *L. monocytogenes* en salchicha de pavo.

## **4. MATERIALES Y MÉTODOS**

### 4.1 Equipo y materiales

#### 4.1.1 Equipo

- Centrífuga METRIX® Velocity 14
- Termociclador Techne®
- Cámara de electroforesis BIORAD®
- VarioskanFlash®
- Incubadora Barnstead® Lab Line 120V Model No. 150
- Homogenizador VX-200 Vortex Mixer Labnet®

#### 4.1.2 Medios de cultivo

- Agar Soya Trypticase (DIBICO®)
- Caldo Soya Trypticase (DIBICO®)
- Agar bacteriológico (DIBICO®)
- Agar Oxford Modificado

#### 4.1.3 Soluciones

- Buffer de fosfatos (PBS) 1x Sigma Aldrich®
- Buffer SM (0.05 M Tris-HCl, 0.1 M NaCl, 0.01 M MgSO<sub>4</sub>, pH = 7.5)
- Solución salina isotónica (SSI) 0.85 %
- Cristal violeta al 0.1 %
- Etanol al 95 %

- Peptona de caseína 0.1 % (DIBICO®)
- NaCl 1M (DIBICO®)

#### 4.1.4 Reactivos

- Glicerol (Meyer®)

#### 4.2 Material biológico

##### 4.2.1 Salchicha

Se utilizó una salchicha tipo Viena de pavo cocinada, la cual fue proporcionada directamente de una empresa productora local.

**Cuadro 3.** Información nutrimental por 100 g de producto de la salchicha de pavo comercial.

Macromolécula	Contenido
<b>Proteínas</b>	9.76 g
<b>Grasas totales</b>	9.41 g
<b>Grasas saturadas</b>	2.84 g
<b>Grasas trans</b>	0.0 mg
<b>Hidratos de carbono disponibles</b>	8.62 g
<b>Azúcares</b>	Menor a 0.39 g
<b>Azúcares añadidos</b>	0.0 g
<b>Fibra dietética</b>	3.39 g
<b>Sodio</b>	750 mg

#### 4.2.2 Cepas de *L. monocytogenes*

Las cepas de *L. monocytogenes* fueron previamente aisladas de superficies del ambiente de producción de embutidos. Su identidad ya fue previamente confirmada por PCR punto final, las cuales se presentan a continuación (**Cuadro 4**).

**Cuadro 4.** Cepas de *L. monocytogenes* del ambiente de producción de embutidos.

Cepa	Punto de muestreo	Observación
LC2	Equipo	Post limpieza
LC3	Equipo	Post limpieza
LC5	Equipo	Post limpieza
LC6	Equipo	Post limpieza
LC7	Utensilio de limpieza de pisos	Post limpieza
LC10	Equipo	Antes limpieza
LC11	Equipo	Antes limpieza
LC15	Equipo	Antes limpieza
LC16	Equipo	Post limpieza
LC17	Utensilio de limpieza de pisos	Antes limpieza
LC18	Equipo	Antes limpieza
LC19	Utensilio de limpieza de pisos	Post limpieza
LC20	Equipo	Antes limpieza
LC21	Equipo	Antes limpieza
LC44	Charola	Durante limpieza
LC45	Mandil	Durante limpieza
LC46	Charola	Durante limpieza
LC47	Equipo	Durante limpieza
LC48	Equipo	Durante limpieza
LC51	Equipo	Durante limpieza

<b>LC52</b>	Utensilio de limpieza de pisos	Durante limpieza
<b>LC63</b>	Equipo	Durante limpieza
<b>LC65</b>	Charola	Durante limpieza
<b>LC71</b>	Equipo	Durante limpieza
<b>LC74</b>	Bomba	Durante limpieza
<b>LC75</b>	Utensilio de limpieza de pisos	Durante limpieza
<b>LC92</b>	Charola	Durante limpieza
<b>LC93</b>	Equipo	Durante limpieza
<b>LC94</b>	Equipo	Durante limpieza
<b>LC100</b>	Utensilio de limpieza de pisos	Durante limpieza

\*Las cepas estuvieron almacenadas en congelación a -20 °C en caldo soya tripticasa (CST) con 40% de glicerol.

#### 4.2.3 Bacteriófago

Se empleó el fago lítico A511 de la familia Herelleviridae y género *Pectenomvirus*, que es de morfo tipo A1 con una multiplicidad de infección (MOI, por sus siglas en inglés) de 0.1. Este fago ha sido empleado para identificar distinguir especies del género *Listeria* y en particular *L. monocytogenes*. El bacteriófago fue donado por la Universidad Laval, Canadá (<https://www.phage.ulaval.ca/en/home/>).



**Figura 3.** Micrografía electrónica del fago A511 (Université Laval, 2024)

#### 4.3 Activación de cepas

Para activar las cepas se tomó un asada de la suspensión stock y se inoculó en 3 mL de CST (Difco, Detroit, MI, EE. UU.), y se incubó a 30°C por 24 h, se hicieron dos subcultivos sucesivos. El último subcultivo se incubó sólo 18 h.

#### 4.4 Detección de genes asociados a virulencia

Se realizó PCR punto final para detectar los genes asociados con la virulencia de las cepas (**Cuadro 5**), siguiendo las condiciones que se reportan para cada gen (Anexo 1).

**Cuadro 5.** Lista de genes involucrados con la virulencia de la cepa

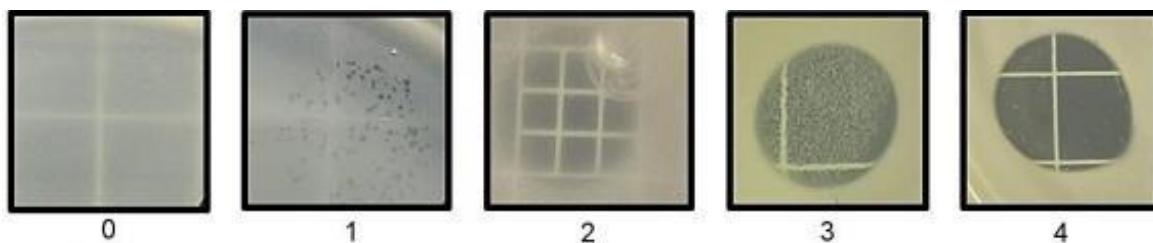
Gen	Secuencia iniciadora (5'-3')	Referencia
<b>hlyA</b>	F: GCAATTCGAGCCTAACCTA R: ACTGCGTTGTTAACGTTGA	Żurawik <i>et al.</i> , 2024
<b>actA1</b>	F: AATAACAACAGTGAACAAAGC R: TATCACGTACCCATTAC	Ward <i>et al.</i> , 2004
<b>prfA</b>	F: ATGAACGCTCAAGCAGAAGA R: CGAAAGCACCTTGTAGTATTG	Roy <i>et al.</i> , 2023
<b>plcA</b>	F: GGGTCGACTAGGAATAATATGTTGTTG R: GGTCTAGATTCTAGTCCTGCTGTCC	Camilli <i>et al.</i> , 1993
<b>mpl</b>	F: TGATGAAATAAAGGTCCACG R: CAACCCATAATGAACAAACG	Chen <i>et al.</i> , 2017
<b>plcB2</b>	F: TTGTGATGAATACTTACAAAC R: TTTGCTACCATGTCTTCC	Ward <i>et al.</i> , 2004
<b>inIB</b>	F: AAGCAMGATTCATGGGAGAGT R: TTACCGTTCCATCAACATCATAACTT	Rouhi <i>et al.</i> , 2024
<b>agrA</b>	F: CGAATGCCTACACATCAAGGTA R: TCACCACACCTTTGTCGTATC	Autret <i>et al.</i> , 2003
<b>flaA</b>	F: TTACTAGATCAAACGTCTCC R: AAGAAAAGCCCCCTCGTCC	Borucki & Call., 2003

#### 4.5 Cuantificación del bacteriófago A511

Para determinar la concentración de los bacteriófagos con capacidad de inhibición se trabajó con la técnica de agar doble capa (López-Gachuzo, 2023). Para ello, tubos con 3 mL de agar suave en los que se agregaron 100  $\mu$ L de la cepa del patógeno con 100  $\mu$ L de la solución con el bacteriófago, se homogenizaron y se vertieron en placas de AST. Las placas se incubaron a 30 °C por 24 h y se contaron las zonas de inhibición del césped bacteriano para reportar las UFP/mL.

##### 4.5.1 Evaluación de la capacidad del fago A511 para inhibir a diferentes cepas de *L. monocytogenes*

Se realizó una prueba de hospederos con la técnica de agar doble capa para cada una de las 30 cepas de *L. monocytogenes*, para ello, a 3 mL de agar suave (CST con agar bacteriológico al 0.6 %) se le agregaron 500  $\mu$ L de cepa bacteriana en una concentración de  $\sim 10^4$  UFC/mL y 100  $\mu$ L de la suspensión del fago ( $\sim 10^3$  UFP/mL). Se homogenizó la mezcla y se vertió en una placa de AST y se dejó solidificar a temperatura ambiente. Se evaluó la actividad lítica siguiendo el sistema común de Chhibber *et al.* (2018) (**Figura 4**).



**Figura 4.** Muestras de la evaluación de la actividad lítica en placa: 0) Placas sin lisis, 1) placas de lisis individuales, 2) turbidez en toda la zona de lisis, 3) lisis completa pero ligeramente turbia, 4) lisis completa (Bueno-González, 2023).

#### 4.6 Selección de cepas de *L. monocytogenes*

Se seleccionaron cepas de *L. monocytogenes* con diferentes perfiles de potencial de virulencia (4.4) y susceptibilidad a A511 (4.5.1) Para ello, con los datos génicos

y susceptibilidad al fago se realizó una matriz de datos que se llevó a analizar por análisis de cluster en el programa JMP® 8.0. De acuerdo a los grupos formados, se seleccionaron cepas representantes de los diferentes grupos (clústeres) obtenidos en el análisis multivariado de similitud, aquellos con diferentes perfiles o características que fueran representativos de los diferentes grupos conformados.

#### 4.7 Evaluación de la capacidad de formación de biopelículas

Utilizando el ensayo en microplaca de tinción con cristal violeta (CV) descrito por O'Toole *et al.* (2011), se evaluó la formación de exopolisacáridos de las cepas.

En cada pocillo de la microplaca se agregaron 180 µL de CST con 20 µL de la cepa, en una concentración de  $1 \times 10^6$  UFC/mL, se evaluó cada cepa por triplicado, dejando entre cada grupo de pocillos por cepa, un pocillo sin inocular que se consideró como control. Se llevó a incubación a 30 °C por 48 h, haciendo mediciones después de 24, 48 h de la densidad óptica (DO) a 600 nm en el lector de placas Varioskan.

Luego de la medición se decantó el caldo y se hicieron lavados para descartar células planctónicas. Los lavados fueron primero con 200 µL de solución salina isotónica (SSI) y después con 200 µL de metanol al 99 %, dejándolos actuar por 15 min. Después se eliminó el metanol para después añadir 200 µL de la solución de CV a 0.1 % (p/v) por 5 min. Pasado el tiempo se decantó el colorante y se eliminó el exceso con dos lavados más de SSI; se dejó secar la placa a temperatura ambiente. El CV retenido en la biopelícula formada en cada pocillo se solubilizó con 200 µL de ácido acético glacial al 30 % y se midió la DO a 595 nm.

Se clasificaron las cepas de acuerdo al sistema de Han *et al.* (2016) para clasificación de índice de formación de biopelículas (IFB) (**Cuadro 6**), basado en los valores de DO antes y después de teñir, en relación con el control, cuya fórmula es

$$\text{IFB} = \frac{AB - CW}{GB - GW}$$

Donde

AB: absorbancia de pozos teñidos con CV

CW: absorbancia del blanco teñido con CV

GB: absorbancia de cultivos en suspensión

GW: absorbancia de pozos sin inocular

**Cuadro 6.** Clasificación de cepas con capacidad de formación de polímeros

Criterio	Valor de IFB
Nulo	<0.35
Débil	0.35-0.69
Moderado	0.70-1.09
Fuerte	>1.10

(Han *et al.*, 2016).

#### 4.8 Evaluación de desarrollo de cepas en salchicha

Para esta evaluación, se utilizaron cepas seleccionadas de *L. monocytogenes* (4.6) de acuerdo a los resultados del objetivo 1 y fueron inducidas a la resistencia a rifampicina por selección.

Se usaron 40 g de salchicha comercial (dos porciones de salchicha de 20 g del alimento) y fueron inoculados con 100  $\mu$ L de las cepas de manera individual mediante goteo ( $\sim 1 \times 10^6$  UFC), se empacaron al vacío y se llevaron a 4 °C. A los 3, 7, 9 14 y 26 días de almacenamiento se tomaron por triplicado porciones de 40 g y se homogenizaron en 50 mL de diluyente de peptona (0.1 %, DP) usando un homogenizador automático (®Bag mixer, interscience). A partir de la suspensión del alimento, se realizaron diluciones decimales en DP y se hizo el recuento del patógeno por extensión en superficie en agar soya tripticasa (AST) adicionado de rifampicina (100 ppm).

Las placas se incubaron a 30 °C/24 h.

#### 4.9 Evaluación de conservadores sobre el desarrollo de *L. monocytogenes* *in vitro*

Los conservadores empleados fueron Carniplus, basado en ácidos orgánicos, e Inbac ACN, cuyo principio activo es la nisin. Las concentraciones empleadas de conservador fueron determinadas como la mínima, media y máxima, de acuerdo a las recomendaciones de los fabricantes. En microplacas de 96 pozos, se agregaron 20  $\mu$ L de la cepa activada y lavada (~6 log UFC) a pocillos que contenían 200  $\mu$ L de medio de cultivo con los conservadores, de acuerdo a lo marcado en el **Cuadro 7**. Se incubaron las microplacas a 4 °C/ 4 semanas y se realizaron mediciones periódicas de la DO a 600 nm. Se hicieron tres réplicas en tres experimentos completamente independientes.

**Cuadro 7.** Conservadores y concentraciones evaluados sobre la inhibición del desarrollo de *L. monocytogenes* en caldo soya tripticasa.

Conservador	Concentración
Carniplus	0.125 %
Carniplus	0.25 %
Carniplus	0.5 %
Inbac ACN	3.125 ppm
Inbac ACN	6. 25 ppm
Inbac ACN	12.5 ppm

A los 7 y 14 días de incubación se determinó la viabilidad en AST, tomando 50  $\mu$ L de cada pozo y se realizaron diluciones decimales en DP (0.1 %). Se tomaron 100  $\mu$ L de la dilución decimal para inocular por extensión en superficie en AST con rifampicina (100 ppm). Las placas se incubaron a 30 °C/24 h. Posteriormente, se realizó el conteo en placa para estimar la población viable.

#### 4.10 Evaluación de la aplicación del conservador y Carniplus sobre la inhibición de *L. monocytogenes* en salchichas de pavo.

Se realizó un coctel de las cepas de *L. monocytogenes* seleccionadas, activando las cepas según el punto 4.3, exceptuando que el segundo cultivo era de 12 h, en lugar de 18 h. A partir de las suspensiones activadas y lavadas se hicieron diluciones decimales en DP (0.1 %) para tener la concentración requerida (~4 Log UFC/mL). Se mezclaron 240  $\mu$ L de la suspensión de cada cepa en un tubo estéril, se llevó hasta 6 mL, completando el volumen con DP (0.1 %) y se homogenizó usando un vórtex.

Se elaboraron salchichas tipo coctel con el conservador y concentración seleccionada en 4.9 y salchichas sin conservador siguiendo el proceso de elaboración que describe FAOPRODAR (2024). Dos salchichas cocidas y enfriadas se inocularon por goteo con 50  $\mu$ L de la mezcla de cepas de *L. monocytogenes*, se dejaron secar en campana de flujo laminar por 30 min y posteriormente se inoculó por goteo el bacteriófago (~3 Log UFP), se homogenizó de forma manual. Se empacaron al vacío y se incubaron a 30 °C y 10 °C. Como controles se incluyeron salchichas inoculadas sólo con el coctel de cepas de *L. monocytogenes* (CO), otras con bacteriófago sin conservador (F) y otras sólo con conservador (CA), en las concentraciones ya mencionadas

Periódicamente se hizo el recuento, de la bacteria como lo descrito en 4.8.

#### 4.11 Análisis estadístico

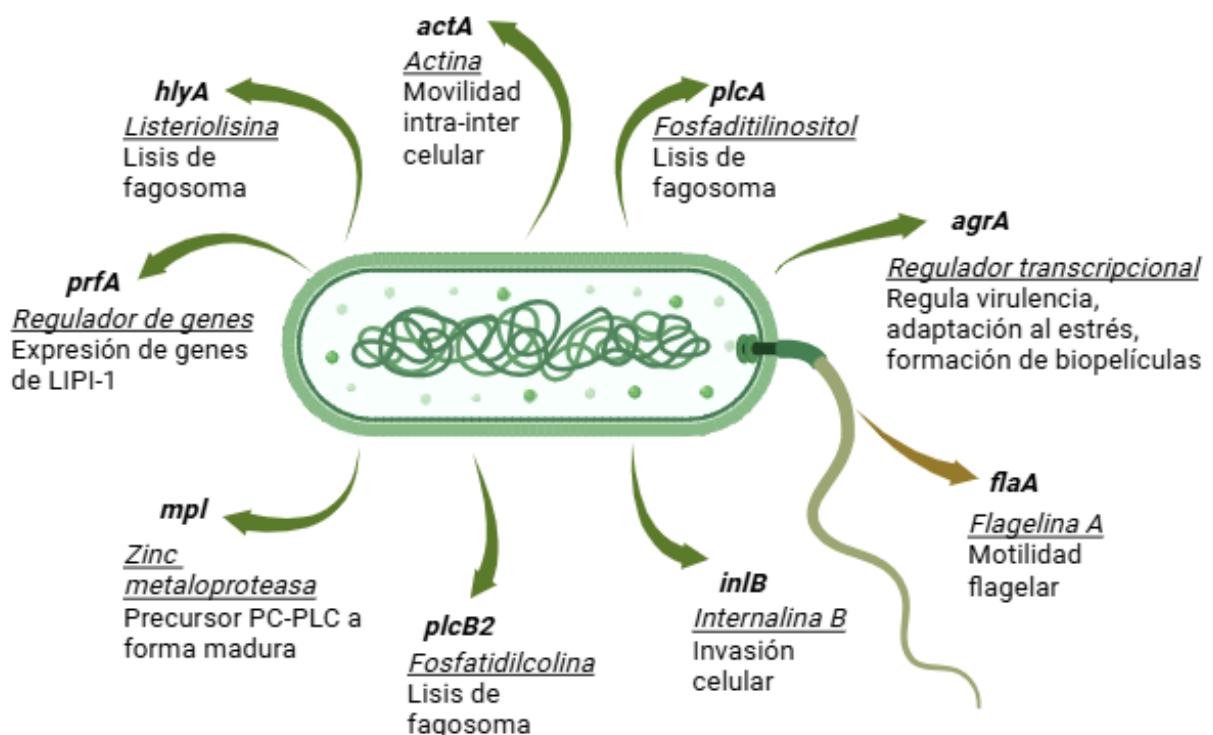
Todos los datos se analizaron con el programa R versión 4.2.2 (<https://www.r-project.org/>) y Rstudio versión 2023.03.0+386 (Posit Software, PBC; <https://posit.co/>). Se llevó a cabo un análisis de varianza ( $\alpha=0.05$ ) y comparación de medias (Tukey) del incremento de DO en la evaluación de los conservadores *in vitro* de las diferentes cepas y de la concentración viable del patógenos en el alimento durante el estudio de reto. Todos los resultados fueron reportados como la media  $\pm$  la desviación estándar (DE) de tres réplicas.

Los datos de las cinéticas del coctel de cepas de *L. monocytogenes* en salchicha, se modelaron usando el programa DMFit, en la plataforma ComBase (<https://www.combase.cc>), ajustando con el modelo de Baranyi y Roberts. Para la generación de grupos por cluster se empleó JMP® 8.0

## 5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 5.1 Detección de genes asociados a virulencia de *L. monocytogenes* en cepas aisladas de ambiente de producción de embutidos

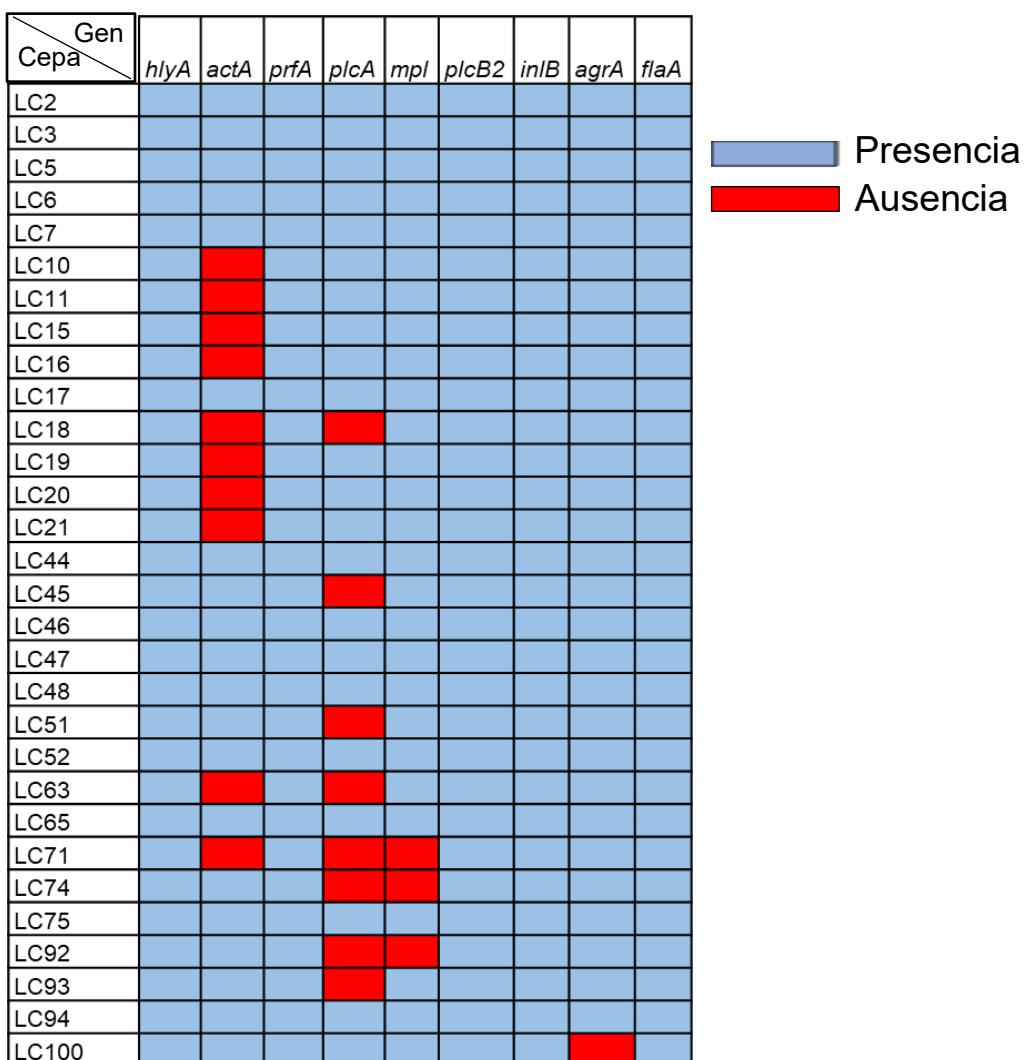
Se evaluó la presencia de nueve genes asociados con virulencia. Los genes y su respectiva función aparecen en la **Figura 5**.



**Figura 5.** Genes asociados con virulencia de *L. monocytogenes* identificados en el estudio

En la **Figura 6**, se muestra que 14 cepas presentaron todos los genes de estudio, por lo que el 46.6 % de las cepas muestra un potencial de virulencia alto. Unas pocas cepas presentaron ausencia de múltiples genes, lo que sugiere la coexistencia de cepas con diferentes niveles de potencial de patogenicidad dentro del mismo ambiente de producción. Si bien no se estudió expresión, la sola presencia de los genes indica que, las cepas podrían llegar a expresar los factores

de virulencia y capacidad para enfermar personas si se le presentan a la bacteria las condiciones favorables para ello; aunque su riesgo efectivo dependerá de la expresión y funcionalidad de estos genes (Monroy-Pérez *et al.*, 2024).



**Figura 6.** Presencia de genes asociados con virulencia de las 30 cepas recuperadas de *L. monocytogenes*.

Esta heterogeneidad coincide con lo observado por Chen *et al.* (2020), quienes mencionan que los aislados de ambientes de procesamiento tienden a mostrar diversidad genómica porque coexisten linajes persistentes (frecuentemente del serotipo 1/2a o 1/2b) y cepas transitorias de menor virulencia.

Los genes *hlyA*, *prfA*, *plcB2*, *inlB* y *flaA* estuvieron presentes en el 100 % de las cepas analizadas, mientras que *agrA* se detectó en 29 de las 30 cepas (97 %). Esta elevada prevalencia indica que las cepas ambientales conservan los elementos centrales del sistema de virulencia de *L. monocytogenes*, incluyendo la hemolisina

(*hlyA*), el regulador maestro *prfA*, y los genes implicados en invasión (*invB*) y motilidad (*flaA*). El que estos genes esenciales se mantengan concuerda con lo reportado por Chen *et al.* (2020) y Schiavano *et al.* (2023), quienes describen que incluso las cepas aisladas en ambientes de procesamiento mantienen el núcleo básico de virulencia, aunque con un potencial de patogenicidad reducido.

*hlyA*, codificador de la listeriolisina O, fue detectado en todas las cepas, lo que concuerda con su carácter altamente conservado y su papel indispensable en la lisis del fagosoma.

De igual manera, *prfA*, regulador maestro de la isla de patogenicidad LIPI-1, también se presentó en todas las cepas, esto se esperaba dado que su pérdida suele ser letal o inactiva la virulencia (Scortti *et al.*, 2007).

Estos resultados son coherentes con trabajos de Schiavano *et al.* (2023), y Guel-García *et al.* (2024), quienes observaron que más del 90 % de los aislamientos de *Listeria* en plantas cárnicas portan los genes de LIPI-1, aunque algunos presentan mutaciones de baja virulencia o interrupciones en *prfA* o *actA*, cuyo último caso sucedió en el presente estudio y se describirá en este apartado.

Curiosamente, las cepas que presentaron todos los genes son en su mayoría recuperadas de equipo, tanto antes, como después de la limpieza (**Cuadro 4**), que se puede tratar de cepas adaptadas a los sanitizantes empleados por el personal de la planta de alimentos, posibles productoras de biopelículas, polímero que les permite resistir a la limpieza.

Las cepas presentaron distribución parcial de los genes *actA* (20/30; 66 %), *plcA* (22/30; 73 %) y *mpl* (27/30; 90 %), esto aporta información clave sobre la adaptabilidad ambiental de las cepas. Dichos genes son también parte del isloide LIPI-1 y actúan de manera coordinada, regulados por *prfA*, para permitir la invasión celular, por lo que la ausencia de uno, explica el porqué de la ausencia del otro (Quereda *et al.*, 2021).

*actA* codifica la proteína ActA, esencial para la polimerización de actina y la propagación intracelular; su ausencia se asocia con cepas menos invasivas (Tsitsos *et al.*, 2025; Kawacka & Olejnik-Schmidt, 2024). *plcA* codifica una fosfolipasa C que facilita la ruptura del fagosoma, y su pérdida puede limitar la diseminación celular. Finalmente, *mpl* participa en la maduración de otras proteínas asociadas a la virulencia; aunque varias cepas lo presentan, su ausencia en algunas podría reflejar

una presión selectiva hacia cepas más adaptadas al ambiente industrial, donde los mecanismos de supervivencia y persistencia son prioritarios frente a la invasión (Kawacka & Olejnik-Schmidt, 2024; Wiktorczyk-Kapischke *et al.*, 2023).

Las cepas con menor amplificación de los genes de LIPI-1, fueron LC18, LC63, LC71, LC74 y LC92, las cuales se recuperaron principalmente de equipos durante la limpieza (**Cuadro 4**), mostrando nuevamente, supervivencia sobre invasión.

El que hubiera ausencia de la amplificación no siempre es por ausencia como tal del gen: pudo deberse a variaciones en las secuencias diana (mutaciones, delecciones), presencia de alelos truncos que no son detectados por el par de primers usado, o problemas técnicos de la PCR (calidad del ADN, inhibidores). Biológicamente, la reducción de frecuencia de *actA* y *plcA* en aislamientos de ambientes de alimentos es coherente con la literatura, pues se han visto aislamientos alimentarios con menos genes determinantes de invasión que las cepas clínicas (Kawacka & Olejnik-Schmidt, 2024; Schiavano *et al.*, 2023; Papatzimos *et al.*, 2022).

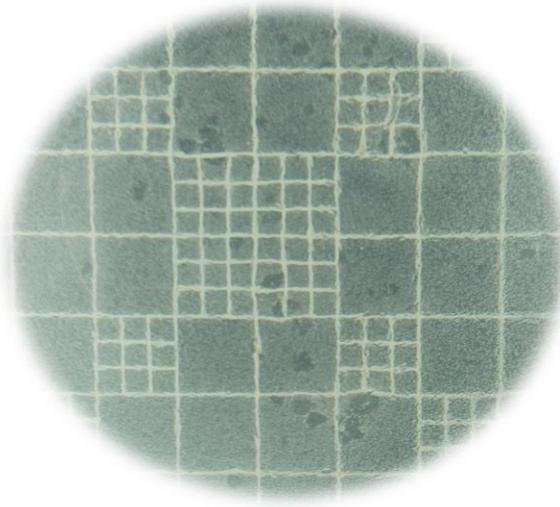
Estudios en plantas de embutidos en Europa y Latinoamérica han mostrado patrones similares: alta prevalencia de *hlyA*, *prfA* y detección menor de *actA* y *plcA* en los aislamientos (Schiavano *et al.*, 2023; Papatzimos *et al.*, 2022; Guel-García *et al.*, 2024; Montero *et al.*, 2015). De hecho, las proporciones obtenidas son muy similares a las reportadas por Parra-Flores *et al.* (2022) en Chile, donde las cepas de *Listeria* recuperadas de drenajes y superficies de contacto presentaban entre 4 y 7 genes de virulencia, con predominio del clúster LIPI-1.

Esto respalda que las cepas ambientales de plantas cárnicaas mantienen genes mínimos necesarios para sobrevivir y adherirse, pero no necesariamente el completo potencial patógeno de cepas clínicas.

Un caso particular, fue la cepa LC100, que no tuvo amplificación el gen *agrA*, esta cepa también fue recuperada durante la limpieza, pero de un utensilio de limpieza; *agrA* es parte del sistema de *quorum sensing agr*, su función reguladora sobre biofilm y virulencia lo hace importante para la persistencia ambiental. La ausencia podría indicar una desventaja de persistencia asociada a *agr*, pero su presencia en el resto de las cepas sugiere capacidad de formar biofilm (Cordero *et al.*, 2021).

## 5.2 Evaluación capacidad de inhibición del fago A511 sobre cepas de *L. monocytogenes*

Se hizo una evaluación de las 30 cepas, para determinar si eran todas susceptibles al fago A511, el cual ha sido ampliamente caracterizado por su amplio espectro y eficacia lítica contra cepas de diferentes serotipos (Klumpp & Loessner, 2013) (**Figura 7**).

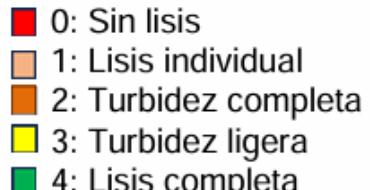


**Figura 7.** Zonas de inhibición generados por A511 usando como cepa replicante a LC11, empleando la técnica de agar doble capa, a  $30^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ / 24 h en AST.

Los resultados se expresaron mediante una escala de 0 a 4, donde 0 corresponde a ausencia de lisis y 4 a lisis completa.

En la **Figura 8** se observa que la mayoría de las cepas (aproximadamente 80 %) presentaron lisis nula o débil (valores 0–1), mientras que solo unas pocas mostraron turbidez ligera o lisis completa (valores 3–4). En particular, LC11 mostró lisis completa (valor 4), y LC94 lisis moderada (valor 3); ambas podrían considerarse altamente susceptibles al fago A511. El resto de las cepas presentaron una respuesta limitada, lo que refleja heterogeneidad en la sensibilidad dentro de la población ambiental analizada.

Cepa	Lisis	Cepa	Lisis	Cepa	Lisis
LC2	0	LC18	0	LC52	0
LC3	0	LC19	0	LC63	0
LC5	0	LC20	0	LC65	0
LC6	0	LC21	0	LC71	0
LC7	0	LC44	0	LC74	1
LC10	1	LC45	1	LC75	0
LC11	4	LC46	0	LC92	0
LC15	0	LC47	0	LC93	0
LC16	1	LC48	0	LC94	3
LC17	0	LC51	0	LC100	0



0: Sin lisis  
1: Lisis individual  
2: Turbidez completa  
3: Turbidez ligera  
4: Lisis completa

**Figura 8.** Susceptibilidad de cepas de *L. monocytogenes* a A511 a 30 °C/ 24 h en AST, evaluada con el sistema de Chibber *et al.* (2018).

Los resultados concuerdan con lo reportado por varios autores, quienes destacan que *L. monocytogenes* muestra gran variabilidad entre cepas, en la respuesta a fagos líticos, incluso dentro de un mismo serotipo o linaje (Dalmasso *et al.*, 2016; Rossi *et al.*, 2020). Klumpp & Loessner (2013) demostraron que A511 posee un rango de hospedero muy amplio ( $\approx 95\%$  de cepas tipo 1/2a, 1/2b, 4b), pero existen cepas resistentes que carecen de receptores adecuados o presentan modificaciones en la pared celular.

Rossi *et al.* (2020) observaron que, en aislamientos industriales, la proporción de cepas con lisis completa por A511 no superó el 15%, porcentaje similar al encontrado en el presente estudio ( $\sim 10\%$ ).

La baja proporción de cepas totalmente sensibles podría deberse a alteraciones en los receptores del fago, principalmente en los ácidos teicoicos de la pared celular (WTA, por sus siglas en inglés), donde A511 se une a residuos de rhamnosa o N-acetilglucosamina (Denes *et al.*, 2014). Variaciones genéticas en genes de la ruta WTA (como *tagO*, *rmlA*, *rmlT*) han sido asociadas con resistencia natural a fagos, lo cual es entendible con el origen ambiental de las cepas aisladas, ya que, al estar constantemente bajo la presión de los fagos naturalmente presentes, se pudo haber favorecido mutantes resistentes.

Al comparar los resultados genéticos con los datos de lisis, se observó que las cepas que conservan el conjunto completo de genes de LIPI-1 (*hlyA*, *actA*, *prfA*, *plcA*, *mpl*, *plcB2*) mostraron, en general, mayor susceptibilidad al fago (valores 3–4), mientras que aquellas con ausencias en *actA* o *plcA* tienden a mostrar lisis nula o leve. Este comportamiento sugiere que la integridad del isloide de virulencia podría estar relacionada con la conservación de estructuras superficiales reconocidas por A511. Estudios de Kim *et al.* (2018) y Murray *et al.* (2022) sustentan esta hipótesis: cepas más virulentas, que conservan genes de virulencia intactos, suelen mantener una pared celular más “típica”, lo que las hace vulnerables a fagos. En cambio, cepas persistentes o adaptadas al ambiente presentan modificaciones en sus WTA y pierden receptores al fago, lo que a la vez reduce su virulencia y aumenta su resistencia a fagos.

Por lo tanto, los resultados sugieren una correlación inversa entre resistencia al fago y virulencia genética, indicando que las adaptaciones que permiten sobrevivir en el ambiente de producción podrían también conferir resistencia frente al biocontrol con fagos.

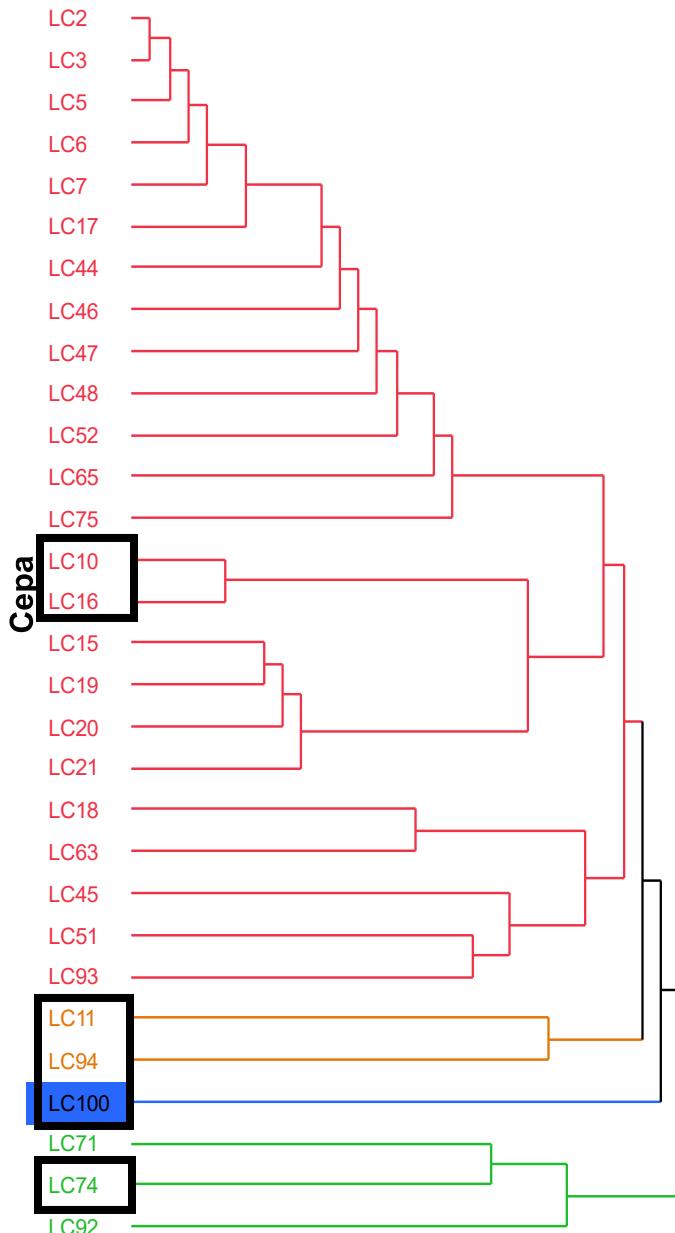
Estos hallazgos tienen relevancia para la implementación de estrategias de biocontrol con fagos en productos cárnicos. La presencia de cepas resistentes a A511 indica que el uso de un solo fago puede no ser suficiente para eliminar completamente las poblaciones ambientales de *L. monocytogenes*. Es por ello que, la literatura recomienda utilizar cocteles de fagos o combinaciones con conservadores para aumentar la eficacia (Ahmadi *et al.*, 2020; Guenther *et al.*, 2009).

Además, la coexistencia de cepas con diferente perfil genético podría ser muestra de que la eficacia del fago puede depender del linaje y de su compendio génico.

### 5.3 Selección de cepas de *L. monocytogenes* según su potencial de virulencia y susceptibilidad a A511

A partir de los resultados de la detección génica y de la susceptibilidad al fago A511, se realizó un análisis de agrupamiento jerárquico (análisis de cluster) con el propósito de identificar similitudes de relación entre las cepas de *L. monocytogenes*. El dendrograma obtenido permitió diferenciar cuatro grupos principales, cuyas

características se determinaron tanto por el número y tipo de genes de virulencia presentes como por su nivel de sensibilidad al fago (**Figura 9**).



**Figura 9.** Agrupación de cepas de *L. monocytogenes*, por clúster en JMP® 8.0, de acuerdo a los genes presentes y susceptibilidad a A511. Grupo 1 (rojo), Grupo 2 (naranja), Grupo 3 (azul), Grupo 4 (verde).

\* Los recuadros indican las cepas seleccionadas.

- Grupo I (rojo): Más genes de virulencia y baja susceptibilidad a A511

Este grupo fue el más numeroso y estuvo conformado por la mayoría de los aislados bacterianos. Las cepas de este clúster presentaron alta presencia de genes de virulencia. Sin embargo, mostraron lisis nula o mínima (0-1) frente al fago.

Desde el punto de vista ecológico, este grupo representa cepas potencialmente persistentes en el ambiente de producción, capaces de resistir el biocontrol por fagos sin perder del todo su capacidad de invasión.

- Grupo II (naranja): Más genes de virulencia y alta susceptibilidad a A511

Las cepas incluidas en este grupo conservaron un perfil génico muy similar al del grupo rojo, es decir, con la presencia de la mayoría de los genes de virulencia, pero, a diferencia de él, mostraron lisis completa o moderada (3-4) frente al fago.

Esto indica que, aunque conservan el potencial virulento, no han desarrollado mecanismos de resistencia a la infección del fago.

- Grupo III (azul): Ausencia de *agrA* y resistencia total a A511

Representado sólo por la cepa LC100, se caracterizó por la ausencia del gen *agrA* y una resistencia completa (lisis 0) frente al fago. *agrA* forma parte del sistema regulador *agr*, que controla la expresión coordinada de genes de virulencia, factores de adhesión y formación de biofilm. En consecuencia, LC100 representa un linaje fuertemente adaptado al ambiente de producción, con virulencia regulatoria disminuida pero mayor capacidad de persistencia y resistencia al biocontrol por el fago.

- Grupo IV (verde): Menos genes de virulencia y baja a nula susceptibilidad a A511

Conformado por las cepas LC71, LC74 y LC92, este grupo de cepas mostró menor presencia de genes asociados con virulencia y una lisis nula o ligera (0-1) frente al fago. Estas cepas parecen representar linajes ambientalmente especializados, con pérdida de genes no esenciales para la supervivencia en el entorno, pero con alta tolerancia a A511 y condiciones adversas. Su importancia radica no en el riesgo patogénico directo, sino en su papel como reservorio ambiental de *Listeria* resistente al control convencional.

Para los experimentos posteriores, se seleccionaron seis cepas representativas de los cuatro grupos identificados: LC10, LC11, LC16, LC74, LC94 y LC100. Esta

selección abarcó aislados con perfiles varios de virulencia y susceptibilidad fágica; se recuperaron en su mayoría de equipo a diferentes tiempos de limpieza (**Cuadro 4**).

#### 5.4 Evaluación de formación de biopelículas de cepas de *L. monocytogenes*

De las cepas seleccionadas, se les determinó su capacidad de formar biopelículas en placa, mediante el índice de formación de biopelículas (IFB). Los resultados mostraron una variabilidad marcada entre cepas y tiempos, lo que sugiere diferencias intrínsecas en la capacidad de adherencia y maduración de biopelículas (**Cuadro 8**).

**Cuadro 8.** Capacidad de formación de biopelículas de cepas de *L. monocytogenes* a  $30^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$  *in vitro* en CST.

Cepa	24 h	48 h
LC10	$0.52 \pm 0.17^{\text{ab}}$	$2.79 \pm 0.15^{\text{a}}$
LC11	$0.59 \pm 0.03^{\text{ab}}$	$2.88 \pm 0.17^{\text{a}}$
LC16	$0.65 \pm 0.08^{\text{ab}}$	$1.05 \pm 0.07^{\text{c}}$
LC74	$0.29 \pm 0.02^{\text{b}}$	$1.39 \pm 0.08^{\text{b}}$
LC94	$1.00 \pm 0.07^{\text{a}}$	$2.83 \pm 0.13^{\text{a}}$
LC100	$0.92 \pm 0.03^{\text{a}}$	$1.01 \pm 0.10^{\text{c}}$

Criterio	Valor IFB
Nulo	<0.35
Débil	0.35-0.69
Moderado	0.70-1.09
Fuerte	>1.10

Los resultados se expresan como la media  $\pm$  la DE de tres experimentos independientes ( $n=3$ ). Las letras indican diferencias significativas entre cepas en cada tiempo ( $\alpha=0.05$ ).

\***IFB**: Índice de formación de biopelículas

\***CST**: Caldo soya tripticasa

A las 24 h, la mayoría de las cepas presentaron formación débil o moderada de biopelícula.

A las 48 h, se observó un incremento significativo del IFB en varias cepas, indicando maduración de la biopelícula con el tiempo. Las cepas con este comportamiento fueron, LC10 (2.79), LC11 (2.88) y LC94 (2.83), que alcanzaron valores de formación fuerte.

Estos resultados reflejan que la capacidad de formación de biopelículas es heterogénea y dependiente de la cepa, tal como se ha descrito con anterioridad en cepas ambientales de *L. monocytogenes* (Lee *et al.*, 2017; Combrouse *et al.*, 2013).

Al comparar estos datos con los perfiles genéticos, se observa que las cepas LC10, LC11 y LC94, que mostraron valores más altos de IFB a 48 h, pertenecen a los grupos con mayor presencia de genes de virulencia (*hlyA*, *prfA*, *plcA*, *agrA*, *flaA*).

El gen *agrA*, presente en estas cepas, codifica un regulador del sistema *quorum sensing* que estimula la formación y maduración de biopelículas mediante la regulación coordinada de proteínas de superficie y exopolisacáridos (Cordero *et al.*, 2021). Esta asociación respalda la observación de que las cepas con *agrA* funcional tienden a desarrollar biopelículas más robustas.

Por el contrario, la cepa LC100, que carece de este gen, mostró únicamente formación moderada, sin alcanzar los niveles de las cepas que presentaron el regulador, lo que evidencia el papel clave de *agrA* en este proceso. Gómez *et al.* (2015) y Rieu *et al.* (2007) también han reportado que mutantes *agrA* de *L. monocytogenes* presentan biofilms menos estructurados y menor capacidad de dispersión celular.

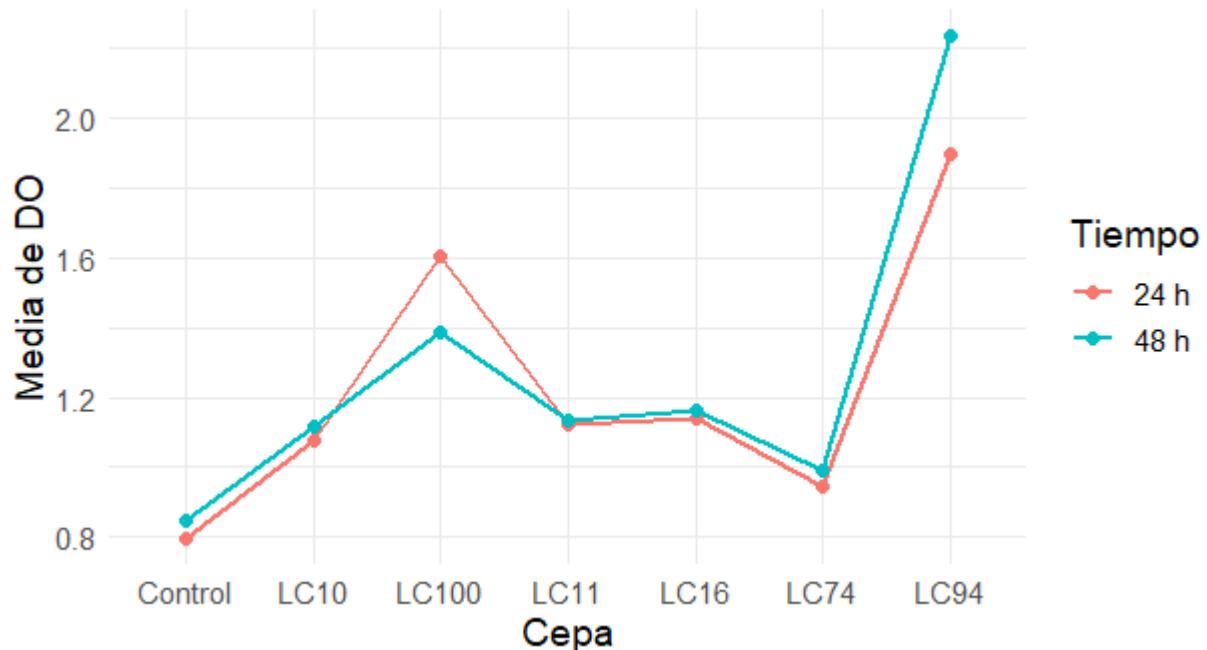
Del mismo modo, las cepas LC74 y LC16, caracterizadas por una menor dotación de genes de virulencia y baja o intermedia susceptibilidad al fago, mostraron formación débil a moderada, lo que sugiere que la pérdida parcial de genes de virulencia podría acompañarse de una disminución en la capacidad de adhesión o producción del exopolisacárido.

Un aspecto interesante es la tendencia inversa entre la susceptibilidad al fago A511 y la capacidad de formar biopelículas. Las cepas más sensibles al fago (LC11, LC94) presentaron biopelículas más fuertes, lo que podría explicarse por la exposición de receptores al fago en células planctónicas durante las primeras etapas de crecimiento, mientras que las cepas más resistentes (LC74, LC100) formaron biopelículas más delgadas o menos organizadas.

Esto concuerda con lo reportado por Mendonça *et al.* (2012) y Sillankorva *et al.* (2010), quienes observaron que las cepas con baja producción de exopolímeros suelen presentar modificaciones en la pared celular que confieren resistencia tanto al fago como a otros agentes antimicrobianos y que las biopelículas densas pueden limitar el acceso de los fagos, que serían necesarias para cepas susceptibles.

La variabilidad en la capacidad de formación de biopelículas entre las cepas refleja distintas estrategias adaptativas dentro del área de producción de embutidos. Las cepas con fuerte formación (LC10, LC11, LC94) podrían presentar un riesgo de persistencia elevado, ya que las biopelículas actúan como barreras protectoras frente a desinfectantes y fagos (Gandhi & Chikindas, 2007). En cambio, cepas como LC74 o LC100, aunque menos virulentas, pueden mantenerse viables por largos períodos en nichos específicos, contribuyendo a la re-contaminación entre lapsos de tiempo en las líneas de producción.

Para una comparación más profunda, se hizo un gráfico de interacción, dado que el ANOVA bifactorial mostró una interacción significativa entre el factor cepa y el factor tiempo ( $p < 0.05$ ) (**Figura 10**), ahora con la densidad óptica (DO) obtenida de la tinción con CV, comparando entre tiempos para ver el efecto de este factor sobre la producción del biofilm.



**Figura 10.** Gráfico de interacción de la media de densidad óptica (DO), a 595 nm de la tinción con cristal violeta (CV), de cepas de *L. monocytogenes* *in vitro* más un control (CST sin inocular) a 24 h y 48 h.

\*CST: Caldo soya tripticasa

En general, se observó un incremento moderado en la DO entre ambos tiempos para la mayoría de las cepas, lo que concuerda con el patrón típico de desarrollo de biopelículas, similar al estudio de Burdová *et al.* (2024), donde la maduración de la matriz extracelular se consolida entre las 24 y 48 h de incubación.

Sin embargo, la cepa LC100 mostró un comportamiento distintivo, evidenciando una marcada interacción entre el tiempo de incubación y la producción de la biopelícula. A las 24 h, LC100 presentó una DO alta ( $\approx 1.6$ ), lo que sugiere una rápida capacidad de adhesión y formación inicial de la biopelícula, distinguiendo a LC100 como un “productora rápida”. A las 48 h, la DO disminuyó ligeramente, posiblemente porque la cepa llegó a una fase de dispersión o pasó por una reorganización celular. Este patrón ha sido descrito previamente en cepas hipervirulentas o con alta capacidad metabólica, en las cuales la acumulación temprana de biomasa se acompaña de una pérdida de estabilidad estructural en etapas posteriores (Wiktorczyk-Kapischke *et al.*, 2023b). Aunque, la falta de amplificación de *agrA*, que permite la adaptación al ambiente y producción de biofilm, podría ser el factor causante del comportamiento.

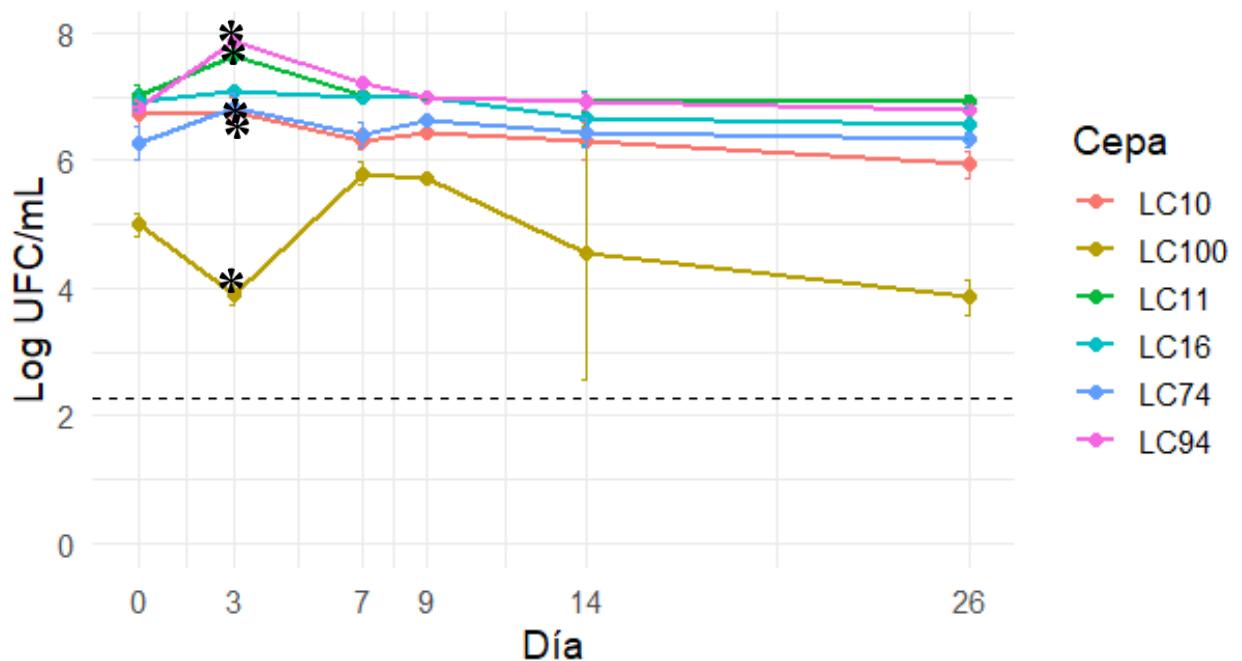
Por el contrario, las cepas LC10, LC11, LC16 y LC74 mantuvieron valores de DO similares entre 24 y 48 h, lo que indica una formación de biopelícula más estable y sostenida en el tiempo, aunque de menor magnitud. Este comportamiento puede relacionarse con diferencias genéticas en la expresión de genes reguladores como *prfA*, *agr* y *sigB*, asociados con la transición entre crecimiento planctónico y biofilm (Paiva *et al.*, 2025; Romeo *et al.*, 2025).

En contraste, la cepa LC94 presentó una DO considerablemente mayor a 48 h que a 24 h, lo que sugiere una capacidad de acumulación de biomasa más sostenida o tardía. Este patrón puede relacionarse con cepas que tienen menor velocidad para iniciar la adhesión, pero mayor capacidad para acumular matriz extracelular o persistir en la superficie. Se ha sugerido que la persistencia en ambientes industriales de *L. monocytogenes* está asociada con cepas que presentan ciertas adaptaciones genómicas (por ejemplo, genes implicados en adhesión, (EPS), tolerancia a desinfectantes). En este sentido, LC94 podría corresponder a una cepa con “perfil de persistencia” en contraste con LC100, que forma rápido pero quizás no

mantiene tanto la fase de acumulación de biopelícula (Wiktorczyk-Kapischke *et al.*, 2023a; Mazaheri, *et al.*, 2021).

### 5.5 Evaluación de desarrollo de cepas de *L. monocytogenes* en salchicha de pavo

Para esta parte, las seis cepas seleccionadas se indujeron con resistencia a rifampicina para ser marcadas y se inocularon  $\sim 6$  log UFC de cada una de ellas, en dos unidades de salchicha de pavo cocida, las cuales contenían como conservadores, nitrito de sodio. La cinética resultante muestra las trayectorias de recuento logarítmico a lo largo del tiempo, donde algunas cepas (LC10, LC11, LC94) mantienen o apenas disminuyen su población ( $\sim 6$ –7 log), mientras que otra (LC100) presenta una caída progresiva que llega bajo el límite de detección de la técnica usada ( $<2$  Log UFC/g) hacia el día 26 (**Figura 11**).



**Figura 11.** Cinética de las cepas de *L. monocytogenes* en salchicha de pavo por 26 días a  $4\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

Los resultados se expresan como la media  $\pm$  la DE de tres experimentos independientes. \* Indica diferencias significativas ( $\alpha=0.05$ ) en la concentración de células en cada tiempo.

La línea punteada indica límite de detección 2.26 Log UFC/mL

Los resultados demuestran que, bajo refrigeración a 4 °C y con conservadores, *L. monocytogenes* no necesariamente desarrolla, muestra estabilidad o hasta ligera reducción a lo largo del tiempo. Este patrón concuerda con estudios recientes que demuestran que las condiciones de refrigeración junto con aditivos como eritorbato de sodio y nitrito, limitan el crecimiento de *Listeria* en productos cárnicos listos para consumo (Guéraud *et al.*, 2023; Nieto *et al.*, 2023), tal como se muestra en el presente. La mayoría de las cepas no crecieron significativamente, lo que indica que el sistema de conservación (nitrito + eritorbato + vacío + refrigeración) funcionó como una barrera eficaz para el crecimiento.

El eritorbato (isómero del ascorbato) acelera la conversión de nitrito a óxido nítrico y actúa como agente reductor/antioxidante, lo que puede potenciar la eficacia antilisteria del sistema curado y estabilizar el color del embutido (Molina *et al.*, 2024). Sin embargo, el hecho de que ciertas cepas desarrollaron ligeramente y mantuvieran recuentos elevados sin reducción notable a lo largo del almacenamiento (LC11, LC94) sugiere que el sistema de conservación no fue bactericida para todas las cepas, sino más bien bacteriostática, permitiendo la supervivencia de la población inicial. Este resultado enfatiza la importancia de evitar la presencia del patógeno en el alimento, ya que este podrá sobrevivir y llegar al consumidor.

Se observa un comportamiento similar entre las cepas, a excepción de LC100, la tolerancia a ciertas estrategias de control de los patógenos suele mostrar diferencias entre cepas, como se ha reportado en *L. monocytogenes* ante conservadores y frío (Wiktorczyk-Kapischke *et al.*, 2023b). Estudios en jamón cocido y productos afines muestran que formulaciones con 100 ppm de nitrito + ascorbato mantienen a *Listeria* sin crecimiento a 4 °C (por semanas), mientras que a 7 °C alguna combinación concreta puede perder eficacia (Nieto *et al.*, 2023).

Durante el almacenamiento a 4 °C, las cepas LC10, LC11 y LC94 (altamente virulentas, *agrA+*, formadoras de biopelículas fuertes y sensibles al fago) mantuvieron recuentos estables (~6–7 log) durante los 26 días, evidenciando capacidad para mantenerse viables ante el nitrito y eritorbato. Por el contrario, LC100 (*agrA-* y resistente al fago) mostró reducción progresiva (~4 log), lo que

sugiere que la ausencia del regulador *agrA* y la menor capacidad de formación de biopelículas disminuyeron su capacidad de persistencia en la matriz cárnica.

Estos hallazgos coinciden con estudios recientes que muestran que el nitrito de sodio combinado con ascorbato/eritórbato inhibe el crecimiento de *Listeria* en productos curados sin eliminar completamente las células adaptadas (Guéraud *et al.*, 2023; Nieto *et al.*, 2023; Modzelewska-Kapituła *et al.*, 2022). A bajas temperaturas, el efecto es fundamentalmente bacteriostático, dependiendo de la cepa y de su capacidad de formar biofilm o tolerar el estrés oxidativo inducido por el nitrito (Manso *et al.*, 2020).

En la cepa LC100, se observó una barra de desviación estándar particularmente amplia alrededor del día 14 de almacenamiento. Esta variabilidad se atribuye a dificultades en el aislamiento de la cepa marcada con rifampicina, ya que, en comparación con las demás cepas, LC100 mostró menor capacidad de adaptación al antibiótico empleado como marcador de selección. En una de las réplicas biológicas, el crecimiento fue notoriamente reducido, lo que generó una dispersión más amplia en los recuentos.

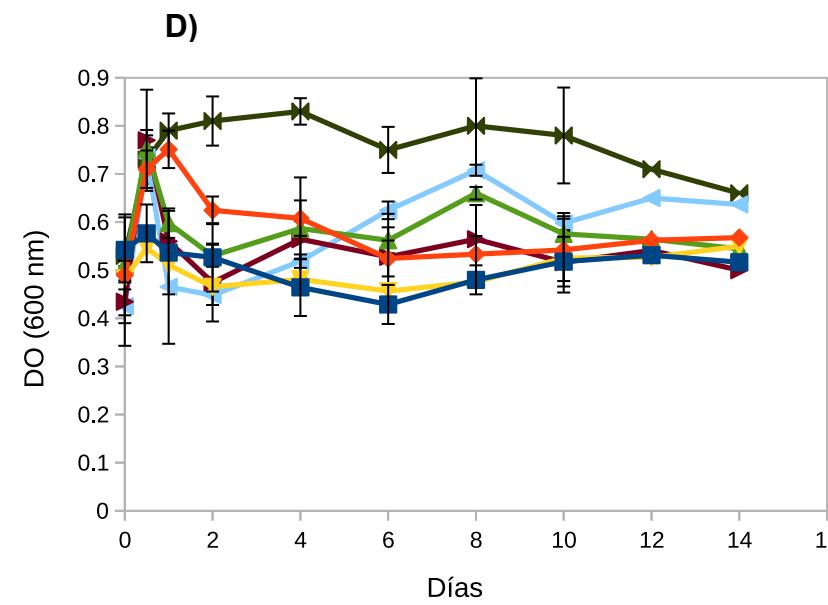
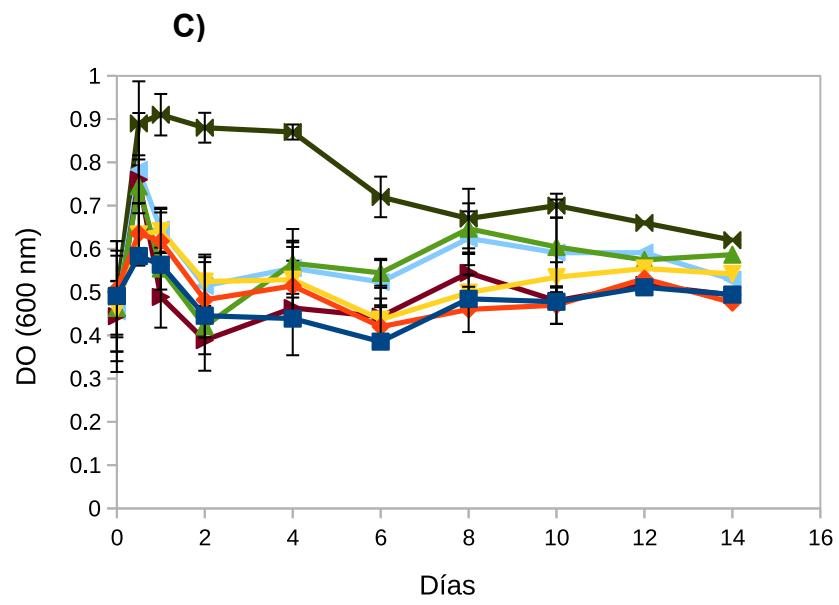
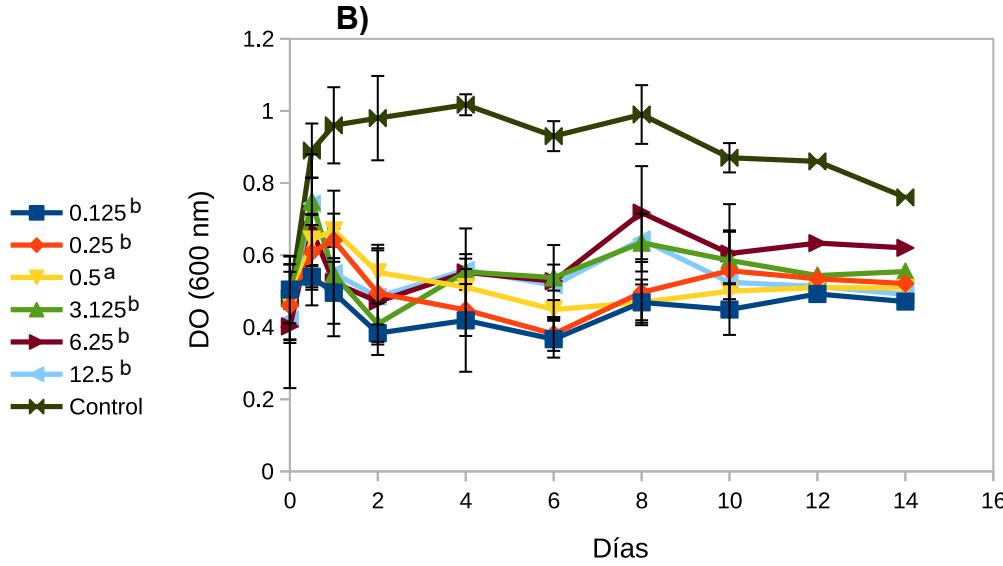
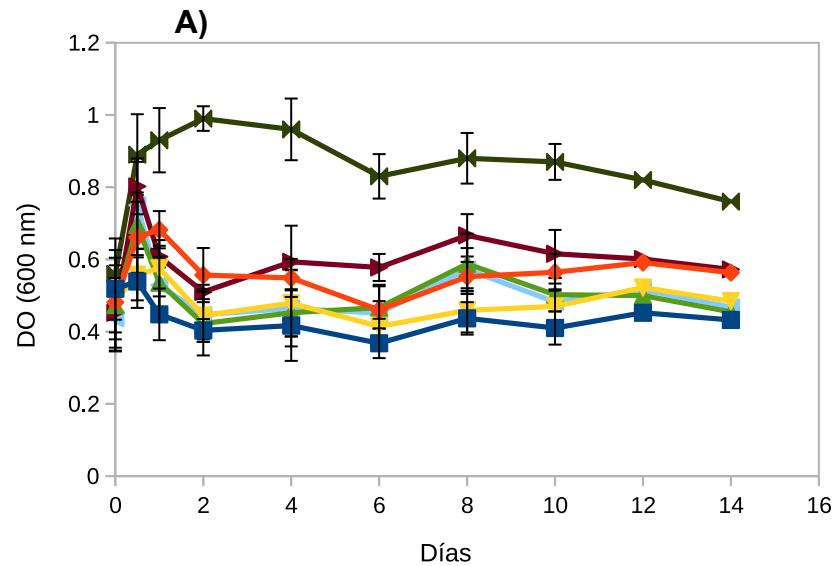
Este comportamiento sugiere que la adquisición de resistencia estable a rifampicina pudo representar un estrés fisiológico adicional para LC100, afectando su viabilidad inicial antes de estabilizarse en el medio de la matriz cárnica. Casos similares han sido descritos en cepas de *L. monocytogenes* que, tras mutaciones espontáneas para marcadores antibióticos, presentan períodos de ajuste metabólico y variaciones en la tasa de crecimiento hasta restablecer su equilibrio poblacional (Fay *et al.*, 2023).

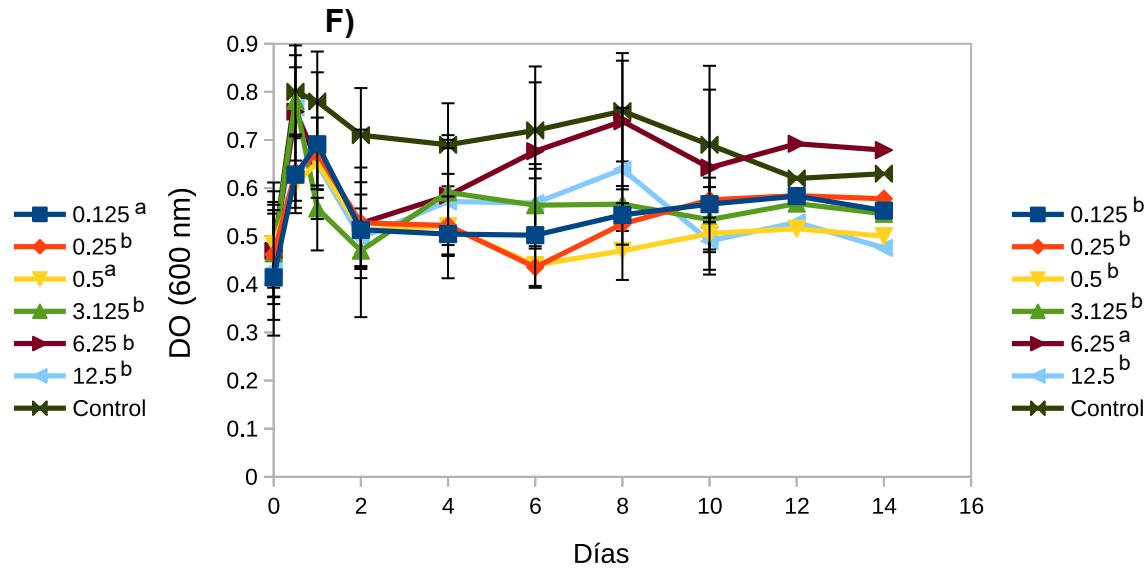
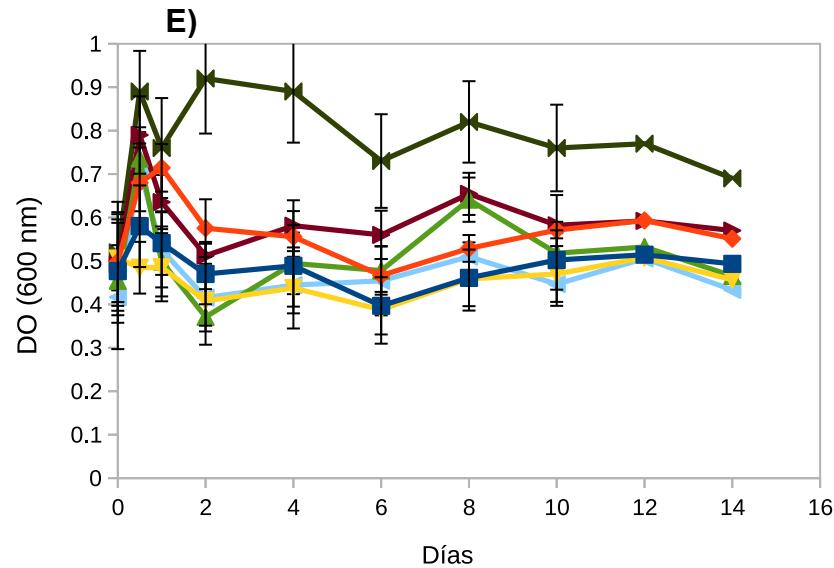
Las cepas con cinéticas más estables (LC10, LC11, LC94) tenían perfiles génicos robustos y, aunque susceptibles al fago en algunos casos, supieron mantenerse bajo el sistema con nitrito/eritórbato. Esto sugiere que el potencial de persistencia no depende únicamente de la susceptibilidad al fago. En contraste, LC100, con menor dotación genética y resistencia al fago, presentó la mayor reducción, lo que sugiere que cepas con menor virulencia genética pueden responder mejor al sistema de conservadores + frío.

Esto enfatiza que la dotación genética, la resistencia al fago, la capacidad de formación de biopelículas y la tolerancia al nitrito/eritórbato actúan como factores interrelacionados en la sobrevivencia en productos curados.

## 5.6 Evaluación de conservadores en combinación con A511 para inhibir *L. monocytogenes* *in vitro*

Finalmente, se evaluó la eficacia del fago A511, por separado y combinado con conservadores de origen alternativo a los comunes en industria cárnica, esto a temperatura de refrigeración (4 °C). Los resultados se muestran en la **Figura 12**. Las concentraciones de conservador fueron seleccionadas, de acuerdo a las recomendaciones de los fabricantes.





**Figura 12.** Cinética de crecimiento de cepas de *L. monocytogenes* (**A**) LC10, **B**) LC11, **C**) LC16, **D**) LC74, **E**) LC94, **F**) LC100) en CST en conjunto con A511 y el conservador, (a) Carniplus (0.125 %, 0.25 %, 0.5 %) y (b) Nisina (3.125 ppm, 6.25 ppm, 12.5 ppm) *in vitro* a  $4^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$  durante 14 días. Los resultados se expresan como la media  $\pm$  DE de tres experimentos independientes. Las letras indican diferencias significativas ( $\alpha=0.05$ ) de día 0.5 vs día 14 por cada tratamiento.

DO: densidad óptica a 600 nm. **Control:** Cepa en CST sin fago ni conservador

Los ANOVA por cepa permiten comparar Carniplus y Nisina en tres concentraciones cada uno, siempre en presencia del fago A511.

Si usamos la DO final de cada cepa, se observa un patrón, con frecuencia, las concentraciones más bajas de ambos conservadores generan menor DO (que podría estar relacionada a mayor inhibición) que sus concentraciones medias y altas.

Si se toma como ejemplo a LC10 (**Figura 12 A**), la DO final con Carniplus 0.125 % fue aproximadamente 0.24, mientras que con Nisina 3.125 ppm alcanzó 0.25, y el control mostró 0.40. Este contraste evidencia que las concentraciones bajas de los conservadores, al actuar en conjunto con el fago A511, provocaron una disminución más pronunciada en la biomasa bacteriana que las concentraciones intermedias o altas.

Patrones similares aparecen en varias de las otras cepas (LC11, LC16, LC74; que suben cuando se pasa de la dosis baja a la media/alta), lo que descarta una relación “a mayor dosis, mayor inhibición” y sugiere hormesis o efecto paradójico dependiente de la cepa/entorno.

El efecto hormético o inhibición no lineal, puede explicar este comportamiento de dos maneras: donde a bajas concentraciones, el conservador puede afectar el equilibrio osmótico o la integridad de membrana sin provocar una respuesta adaptativa marcada. Mientras, a altas concentraciones, las células de *L. monocytogenes* pueden activar mecanismos de tolerancia (p. ej., estrés salino, proteínas chaperonas, o sistemas de detoxificación), reduciendo la eficacia aparente del tratamiento (D'Onofrio *et al.*, 2023; Wiktorczyk-Kapischke *et al.*, 2021). En el caso de Nisina, dosis altas pueden inducir una respuesta adaptativa de membrana o agregación del péptido que disminuye su biodisponibilidad efectiva, algo que ya ha sido reportado en medios ricos y a baja temperatura (Abdelaziz *et al.*, 2024; Heir *et al.*, 2023).

Para Carniplus, que contiene mezclas de sales y fosfatos, concentraciones altas pueden alterar el pH local o el potencial redox de forma que afecte la actividad del fago A511 o promueva una reversión parcial del estrés osmótico (Lemos Junior *et al.*, 2024; Sae-Ueng *et al.*, 2024); por eso, la dosis intermedia o baja podría ser más efectiva en sinergia con el fago.

LC10 y LC11 (**Figura 12 A, B**): mantienen DO relativamente altas aún con Nisina 12.5 ppm o Carniplus 0.5 %. El control siempre es mayor, pero la contención a dosis bajas iguala o supera a la de dosis altas. Esto es coherente con cepas con alto repertorio génico de virulencia y biofilm: necesitan “barreras finas” más que “barreras fuertes” (la sinergia con el fago depende de que la barrera no lo perjudique).

LC16 y LC94 (**Figura 12 C, E**): El efecto del conservador fue más determinante que la concentración ( $p < 0.05$ ). Biológicamente, encaja con el modo de acción: Nisina actúa rápido sobre membrana; Carniplus ejerce estrés sostenido iónico/fosfato. LC74 (**Figura 12 D**): hubo inhibición apreciable en dosis bajas; a 4 °C la diferenciación por concentración es pequeña (contención de la cepa más que letalidad).

LC100 (**Figura 12 F**): Es la única cepa que no muestra diferencias claras, estadísticamente en DO final ( $p > 0.05$ ), entre el control y la presencia de conservadores y el fago, sin embargo, está influenciada la respuesta por su baja capacidad para desarrollar de la cepa una vez que se seleccionó la cepa resistente a rifampicina.

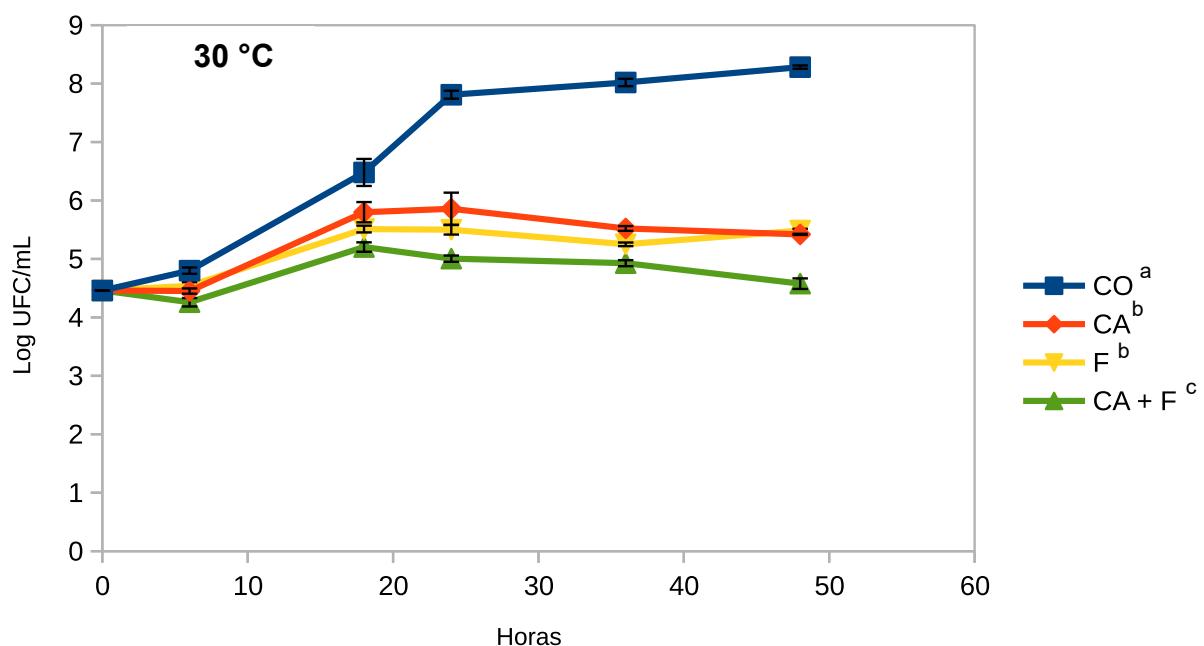
Las cepas con más amplificación de genes de virulencia e IFB alto (LC10, LC11, LC94) toleran mejor los tratamientos; las menos dotadas (LC74, LC100) responden con DO más bajas. Reproduce lo ya visto en la sección **5.2** lisis por A511 y **5.5** crecimiento en salchicha.

La evidencia reciente aconseja combinar barreras, optimizando tipo de conservador y condiciones antes que “subir dosis” (Gonzales-Barron *et al.*, 2024). Por lo que, a partir de estos resultados, se decidió usar Carniplus para su evaluación posterior en la matriz alimentaria, ya que generó los menores niveles de DO para la mayoría de las cepas.

## 5.7 Evaluación de la aplicación de A511 y carniplus sobre la inhibición de *L. monocytogenes* en salchichas de pavo

La determinación de combinación más eficiente de concentración-conservador y fago fue, Carniplus 0.125 % de la parte **5.6**, con esto nos lleva ahora a aplicarlo en la salchicha de pavo. Se optó por un coctel de cepas de las seleccionadas con anterioridad, lo cual se asemeja más a la situación del área de producción, donde las cepas muestran diversidad de rasgos.

Dado que en experimentos anteriores se evaluó una temperatura de refrigeración (4 °C), en esta parte se buscó evaluar una temperatura donde *L. monocytogenes* fuera capaz de desarrollar sin problemas, es decir, la óptima de desarrollo (30 °C) (**Figura 13**).



**Figura 13.** Cinética de crecimiento de una mezcla de cepas de *L. monocytogenes* en salchicha de pavo por 48 h a 30 °C ± 1 °C.

Los resultados se expresan como la media ± la DE de tres datos. Las letras indican diferencias significativas ( $\alpha=0.05$ ) entre tratamientos.

**CO:** control inoculado sólo con *L. monocytogenes*. **CA:** Carniplus [0.125 %]. **F:** fago A511. **CA + F:** Carniplus [0.125 %] combinado con el fago.

Se observaron diferencias claras entre CO y los diferentes tratamientos. En CO, la población se incrementó rápidamente desde las 4 log UFC/g iniciales hasta superar las 8 log UFC/g a las 48 h, lo cual corresponde a un crecimiento exponencial típico para *L. monocytogenes* en condiciones cercanas a su temperatura óptima de desarrollo. Este comportamiento coincide con lo reportado por Jia *et al.* (2021), quienes describen tasas específicas elevadas y periodos de adaptación muy cortos cuando la bacteria crece entre 25 y 30 °C en matrices cárnicas y lácteas.

En contraste, el tratamiento con CA al 0.125 % produjo un crecimiento mucho más lento y un valor máximo cercano a 5.8 log UFC/g hacia las 18–24 h, manteniéndose prácticamente estable hasta las 48 h. Este comportamiento sugiere un efecto bacteriostático, ya que el aditivo limita la velocidad de crecimiento, pero no elimina a la población.

La adición únicamente del fago A511, aplicado a una concentración superficial de 3 log UFP/g, generó una cinética muy similar a la obtenida en presencia de CA: la población aumentó durante las primeras 24 h y luego permaneció estable alrededor de 5.5 log UFC/g. Este resultado es consistente con observaciones previas donde A511, aunque efectivo para reducir el inóculo inicial, puede no impedir que repunte el crecimiento en fases posteriores, sobre todo a temperaturas favorables, debido a la combinación de subpoblaciones menos susceptibles o parcialmente resistentes (Ahmadi *et al.*, 2020).

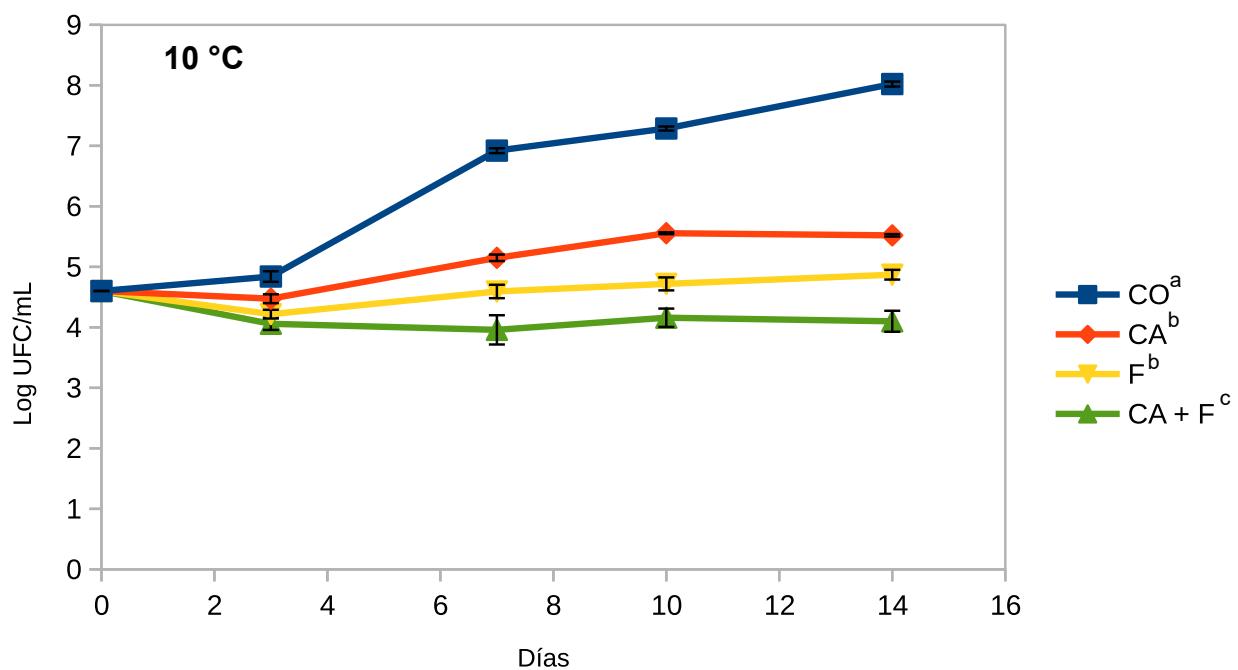
En presencia de la mezcla de F + CA 0.125 %, la densidad poblacional se mantiene ( $\approx$  5 log UFC/g) a 24 h y luego disminuye gradualmente hasta  $\approx$  4.2 log UFC/mL a las 48 h. Este descenso refleja una sinergia evidente entre el fago y el conservador. El CA reduce la tasa de crecimiento celular al generar un entorno osmóticamente estresante, lo que vuelve lenta la división bacteriana y brinda más tiempo al fago para replicarse y lisar las células susceptibles. A su vez, el fago amplifica su acción en una población que ya se encuentra fisiológicamente comprometida, lo que explica la caída observada entre las 24 y 48 h. De hecho, este patrón de, pico bajo seguido de reducción, es un indicador clásico de sinergia o, al menos, de aditivos funcionales entre agentes con modos de acción complementarios (Tüzemen *et al.*, 2024; Li *et al.*, 2021).

Los resultados afirman la tendencia vista *in vitro*, incluso a una temperatura alta de 30 °C, donde el crecimiento de *Listeria* es muy rápido, la combinación F + CA puede

evitar el aumento poblacional y mantener la carga por debajo del nivel inicial. Que el mismo patrón se repita ahora en una matriz cárnea real confirma que esta dosis baja es compatible y sinérgica con A511.

La composición del cóctel bacteriano explica en parte la cinética observada. Las cepas LC10 y LC11, previamente caracterizadas como portadoras de múltiples genes de virulencia y alta capacidad de formación de biopelículas, pueden contribuir a la persistencia que queda en los tratamientos individuales. Por el contrario, LC74 y LC94, con menor carga de genes de virulencia, responderían de manera más sensible al estrés combinado, favoreciendo la reducción global del cóctel. Esta relación entre la base genética, la formación de biopelículas y la susceptibilidad a estrategias de conservación fue ya evidente en los ensayos de lisis por A511 y en las pruebas de crecimiento a 4 °C en salchichas con nitrito y eritorbato.

Se realizó el ensayo bajo 10 °C, el cual representó una simulación de temperatura de abuso, en la que *L. monocytogenes* mantiene actividad metabólica y puede multiplicarse lentamente en productos refrigerados (**Figura 14**).



**Figura 14.** Cinética de crecimiento de coctel de cepas de *L. monocytogenes* en salchicha de pavo por 14 días a 10 °C ± 1 °C.

Los resultados se expresan como la media ± la DE de tres datos. Las letras indican diferencias significativas ( $\alpha=0.05$ ) entre tratamientos.

**CO:** control inoculado sólo con *L. monocytogenes*. **CA:** Carniplus [0.125 %]. **F:** fago A511. **CA + F:** Carniplus [0.125 %] combinado con el fago.

Los resultados se expresan como la media  $\pm$  la DE de tres datos. Las letras indican diferencias significativas ( $\alpha=0.05$ ) entre tratamientos.

En CO, la población mostró un crecimiento desde 4 log UFC/g iniciales hasta superar las 8 log UFC/g al día 14, confirmando la capacidad de la bacteria para proliferar incluso a bajas temperaturas. Este comportamiento concuerda con lo reportado por Jia *et al.* (2021), quienes observaron que *L. monocytogenes* puede duplicar su número cada 1.5–2 días a 10 °C en matrices cárnicas y lácteas, manteniendo tasas de crecimiento positivas por más de dos semanas.

En cambio, las salchichas tratadas únicamente con CA 0.125 % mostraron un incremento inicial moderado, alcanzando valores cercanos a 5.7 log UFC/mL hacia los días 8–10 y manteniéndose estables hasta el final del ensayo. Este comportamiento indica que, a baja temperatura, el conservador ejerce un efecto bacteriostático más prolongado, retardando el crecimiento sin reducir de forma significativa la población. Resultados similares fueron reportados por Bodie *et al.* (2023), quienes documentaron que combinaciones salinas y fosfatadas pueden limitar parcialmente el crecimiento de *Listeria* en carnes listas para consumo, aunque su eficacia se reduce conforme avanza el almacenamiento.

El tratamiento con F, por sí solo logró un control más marcado, con valores que se estabilizaron alrededor de 4.5–4.8 log UFC/mL durante todo el periodo de 14 días. A diferencia del CO y de CA, la curva de F mostró una fase estacionaria temprana, sin incremento sostenido, lo que sugiere una bacteriostasis efectiva, la cual esta inducida por lisis del fago de manera recurrente (Konopacki *et al.*, 2020). Este patrón coincide con los resultados de Ahmadi *et al.* (2020), quienes demostraron que el fago A511 mantiene su eficacia en modelos de carne cocida almacenados entre 4 y 10 °C, logrando reducciones de hasta 2 log en comparación con controles sin fago. La combinación de F + CA 0.125 % presentó un efecto destacado ( $p < 0.05$ ): la población bacteriana disminuyó levemente en las primeras 48 h y se estabilizó alrededor de 3.8–4.0 log UFC/mL casi hasta el final del ensayo, sin mostrar signos de recuperación. Esto sugiere una sinergia real entre ambos tratamientos, capaz no

solo de contener el crecimiento, sino de mantener la población por debajo del nivel inicial a lo largo de dos semanas. Este resultado respalda lo visto a 30 °C, donde la combinación de los dos agentes también generó un efecto superior a los dos por separado, pero ahora se ve que el efecto se mantiene y se potencia en condiciones de refrigeración. Esta acción combinada a bajas dosis ya había sido evidenciada en las pruebas *in vitro*, donde las concentraciones menores de conservador se asociaron con mayores reducciones de densidad óptica.

El hecho de que la combinación haya mantenido estable la población incluso a 10 °C, indica que la estrategia de barreras múltiples es particularmente eficiente cuando la tasa de replicación de la bacteria es baja. En este caso, el fago tiene más tiempo para adsorberse y propagarse, mientras que el conservador limita la velocidad metabólica, evitando que la bacteria recupere su número inicial.

Además, los resultados concuerdan con la respuesta genotípica observada previamente: cepas como LC10 y LC11, más resistentes y con mayor potencial de virulencia, son mejor contenidas cuando las condiciones de estrés no son extremas, como a 10 °C, lo que reduce la posibilidad de supervivencia de subpoblaciones resistentes.

## 5.8 Determinación de parámetros cinéticos de la evaluación del fago A511 con Carniplus usando DMFit.

De acuerdo a los resultados del punto **5.7**, se tomaron las cinéticas para determinar sus parámetros cinéticos.

La comparación de los parámetros cinéticos obtenidos revela diferencias sustanciales en la fisiología del coctel de *L. monocytogenes*, los resultados son los siguientes (**Figura 15**).

**Cuadro 9.** Efecto de los tratamientos sobre los parámetros cinéticos de crecimiento (Fase lag,  $\mu_{max}$ ) y población final de *L. monocytogenes* en salchicha de pavo incubada a 30 °C/48 h y 10 °C/14 días.

30 °C			
Tratamiento	Fase Lag (h)	$\mu_{max}$	Población final (Log UFC/g)
<b>CO</b>	9.233 ± 2.947	0.224 ± 0.0537 <sup>a</sup>	8.158 ± 0.139 <sup>c</sup>
<b>CA</b>	ND	0.0742 ± 0.0221 <sup>b</sup>	5.42 ± 0.01 <sup>a</sup>
<b>F</b>	ND	0.0621 ± 0.0269 <sup>b</sup>	5.435 ± 0.109 <sup>a</sup>
<b>CA + F</b>	ND	0.0367 ± 0.0588 <sup>c</sup>	4.906 ± 0.181 <sup>b</sup>
10 °C			
Tratamiento	Fase Lag (D)	$\mu_{max}$	Población final (Log UFC/g)
<b>CO</b>	2.517 ± 2.172	0.548 ± 0.248 <sup>b</sup>	7.682 ± 0.379 <sup>a</sup>
<b>CA</b>	0.681 ± 4.667	0.0956 ± 0.0362 <sup>a</sup>	5.52 ± 0.020 <sup>b</sup>
<b>F</b>	4.535 ± 6.262	0.0754 ± 0.096 <sup>a</sup>	4.869 ± 0.202 <sup>c</sup>
<b>CA + F</b>	ND	-0.0173 ± 0.017 <sup>c</sup>	4.1 ± 0.173 <sup>d</sup>

Las letras dentro de la misma columna indican diferencias significativas ( $\alpha=0.05$ ) entre tratamientos.

**CO:** control inoculado sólo con *L. monocytogenes*. **CA:** Carniplus [0.125 %]. **F:** fago A511. **CA + F:** Carniplus [0.125 %] combinado con el fago. **ND:** No determinado.

Los datos muestran que *L. monocytogenes* mantiene una elevada capacidad de crecimiento tanto a 30 °C como a 10 °C en salchicha de pavo, aunque con dinámicas cinéticas notablemente distintas. En el control a 30 °C, se confirma un comportamiento exponencial clásico para temperaturas cercanas al óptimo. En contraste, a 10 °C la  $\mu_{max}$  del control disminuye más del doble y la fase lag se extiende hasta ~2.5 días, aunque la población logra superar 7.6 log UFC/g hacia el día 14, lo cual encaja con la capacidad de *Listeria* para mantener duplicaciones lentas durante el almacenamiento refrigerado prolongado (Shrestha *et al.*, 2022; Ogunniyi *et al.*, 2021).

Los tratamientos individuales de CA y F muestran patrones similares en ambas temperaturas: reducciones significativas en  $\mu_{max}$ , ausencia de fase lag detectable

a 30 °C y una población final estabilizada en 5.4-5.7 Log UFC/g, demostrando tener un efecto bacteriostático (Kawacka *et al.*, 2020; Majou & Christieans, 2018).

La sinergia entre A511 y Carniplus resulta evidente al comparar los parámetros cinéticos y las poblaciones finales en ambas temperaturas. A 30 °C, la combinación reduce  $\mu_{max}$ , al valor más bajo entre los tratamientos y limita la población final a ~4.9 log UFC/g, significativamente inferior al control y a los tratamientos individuales. A 10 °C, la sinergia se intensifica:  $\mu_{max}$  se torna negativa, lo cual indica un comportamiento de inactivación, y la población final se mantiene sin evidencia de recuperación (Kawacka *et al.*, 2020; Rodríguez-Rubio *et al.*, 2015).

La mayor eficacia de la combinación de estrategias a 10 °C, puede explicarse por la interacción entre la reducción de división bacteriana y la replicación dependiente del hospedero del fago: la baja temperatura retrasa la recuperación fisiológica de *L. monocytogenes*, permitiendo una adsorción prolongada y ciclos de infección recurrentes por A511, mientras que el conservador limita el metabolismo basal y el potencial de replicarse. De este modo, ambos tratamientos en conjunto, impiden tanto el crecimiento exponencial como la aparición de una población de escape, fenómeno descrito en otros sistemas de biocontrol con fagos a baja temperatura (Fokas *et al.*, 2025; Ranveer *et al.*, 2024; Kawacka *et al.*, 2020).

Los resultados confirman que la combinación de A511 con Carniplus al 0.125 % mantiene su eficacia tanto en condiciones de crecimiento rápido (30 °C) como en condiciones de abuso de temperatura (10 °C), mostrando incluso un comportamiento más estable en este último caso.

## 6. CONCLUSIONES

La conservación del núcleo básico de genes de virulencia y la pérdida parcial de otros indican que las cepas analizadas son diversas en cuanto a su perfil de virulencia, que va desde cepas atenuadas, pero funcionales capaces de sobrevivir en superficies industriales y resistir condiciones de estrés sin necesariamente mantener un alto potencial patogénico, otras cepas más virulentas, que son más vulnerables al biocontrol por fagos y las cepas persistentes y resistentes al fago que representan el mayor desafío para la inocuidad alimentaria, al sobrevivir tanto a los desinfectantes como a los fagos. Esto refuerza la necesidad de mantener programas de monitoreo molecular, tanto en la industria cárnica, como en las cadenas de producción de alimentos listos para el consumo, para detectar clones persistentes y prevenir brotes asociados a *L. monocytogenes*. Integrar el perfil genético, la sensibilidad a fagos y la capacidad de formación de biopelículas permite identificar cepas de alto riesgo y diseñar estrategias de control más efectivas.

La combinación nitrito + eritórbato en salchicha de pavo cocida actúa principalmente como barrera bacteriostática para *L. monocytogenes* a 4 °C. Sin embargo, la sobrevivencia del patógeno puede representar un riesgo al consumidor.

La combinación del fago A511-Carniplus al 0.125 % logra evitar el desarrollo y promover la inactivación de *L. monocytogenes* en salchicha, mientras que cada tratamiento por separado solo genera un efecto bacteriostático. Esta estrategia combinada no solo reduce la carga microbiana, sino que también disminuye el riesgo de proliferación en escenarios de abuso de temperatura, contribuyendo a mejorar la seguridad alimentaria sin depender de concentraciones elevadas de aditivos.

## 7.REFERENCIAS

- Abdelaziz, M. N. S., Maung, A. T., El-Telbany, M., Lwin, S. Z. C., Noor Mohammadi, T., Zayda, M., Wang, C., Damaso, C. H., Lin, Y., Masuda, Y., Honjoh, K., & Miyamoto, T. (2024). Applications of bacteriophage in combination with nisin for controlling multidrug-resistant *Bacillus cereus* in broth and various food matrices. *Food Research International*, 191, 114685. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2024.114685>
- Abdolghafour, B. & Saghir, A. (2014). Development in sausage production and practices-A review. *Journal of Meat Science and Technology*. 2 (3):40-50.
- Abdollahzadeh, E., Rezaei, M., & Hosseini, H. (2014). Antibacterial activity of plant essential oils and extracts: The role of thyme essential oil, nisin, and their combination to control *Listeria monocytogenes* inoculated in minced fish meat. *Food Control*, 35(1), 177-183. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2013.07.004>
- Adler, M., Lüth, S., Kleta, S. & Al Dahouk, S. (2020). Draft genome sequence of a *Listeria monocytogenes* isolate of core genome multilocus sequence typing complex type2521 from ready-to-eat meat sausage related to an outbreak (Sigma1) in Germany. *Microbiol Resour Announc* 9:e00267-20
- Ahmadi, H., Barbut, S., Lim, L.-T., & Balamurugan, S. (2020). Examination of the Use of Bacteriophage as an Additive and Determining Its Best Application Method to Control *Listeria monocytogenes* in a Cooked-Meat Model System. *Frontiers in Microbiology*, 11. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.00779>
- Amiri, S., Moghanjougi, Z. M., Bari, M. R., & Khaneghah, A. M. (2021). Natural protective agents and their applications as bio-preservatives in the food industry. *Italian Journal Of Food Science*, 33(SP1): 55-68. <https://doi.org/10.15586/ijfs.v33isp1.2045>
- Autret, N., Raynaud, C., Dubail, I., Berche, P., & Charbit, A. (2003). Identification *agr* Locus of *Listeria monocytogenes*: Role in Bacterial Virulence. *Infection and Immunity*, 71(8), 4463–4471. <https://doi.org/10.1128/iai.71.8.4463-4471.2003>
- Balzan, S., Taticchi, A., Cardazzo, B., Urbani, S., Servili, M., Di Lecce, G. & Fasolato, L. (2017). Effect of phenols extracted from a by-product of the oil mill on the shelf-life of raw and cooked fresh pork sausages in the absence of chemical additives. *LWT - Food Science and Technology*, 85, 89–95. doi: 10.1016/j.lwt.2017.07.001
- Bodie, A. R., O'Bryan, C. A., Olson, E. G., & Ricke, S. C. (2023). Natural Antimicrobials for *Listeria monocytogenes* in Ready-to-Eat Meats: Current

Challenges and Future Prospects. *Microorganisms*, 11(5), 1301. <https://doi.org/10.3390/microorganisms11051301>

Borucki, M. K., & Call, D. R. (2003). *Listeria monocytogenes* Serotype Identification by PCR. *Journal of Clinical Microbiology*, 41(12), 5537–5540. <https://doi.org/10.1128/jcm.41.12.5537-5540.2003>

Bremer, V., Leitmeyer, K., Jensen, E., Metzel, U., Meczulat, H., Weise, E., Werber, D., Tschaep, H., Kreienbrock, L., Glaser, S., & Ammon, A. (2004). Outbreak of *Salmonella* Goldcoast infections linked to consumption of fermented sausage, Germany 2001. *Epidemiology And Infection*, 132(5), 881-887. <https://doi.org/10.1017/s0950268804002699>

Buchanan, R. L., Gorris, L. G. M., Hayman, M. M., Jackson, T. C., & Whiting, R. C. (2017). A review of *Listeria monocytogenes*: An update on outbreaks, virulence, dose-response, ecology, and risk assessments. *Food Control*, 75, 1–13. <https://doi.org/10.1016/J.FOODCONT.2016.12.016>

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. *Frontiers In Microbiology*, 9. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02700>

Burdová, A., Véghová, A., Minarovičová, J., Drahovská, H., & Kaclíková, E. (2024). The Relationship between Biofilm Phenotypes and Biofilm-Associated Genes in Food-Related *Listeria monocytogenes* Strains. *Microorganisms*, 12(7), 1297. <https://doi.org/10.3390/microorganisms12071297>

Camilli, A., Tilney, L. G., & Portnoy, D. A. (1993). Dual roles of *plcA* in *Listeria monocytogenes* pathogenesis. *Molecular Microbiology*, 8(1), 143-157. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.1993.tb01211.x>

Carballo, J. (2021). Sausages: Nutrition, Safety, Processing and Quality Improvement. *Foods*. 19;10(4):890. doi: 10.3390/foods10040890. PMID: 33921562

Carvalho, L.T., Lorenzo, J.M., de Carvalho, F.A.L., Bellucci, E.R.B., Trindade, M.A. & Domínguez, R. (2020). Use of Turkey Meat Affected by White Striping Myopathy for the Development of Low-Fat Cooked Sausage Enriched with Chitosan. *Foods* 9(12):1866. <https://doi.org/10.3390/foods9121866>

Castañeda-Ruelas, G., Eslava-Campos, C., Castro-del Campo, N., León-Félix, J. & Chaidez-Quiroz, C. (2014). Listeriosis en México: importancia clínica y epidemiológica. *Salud Pública de México*, 56(6), 654-659. Recuperado (2024), de [http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S003636342014000600016&lng=es&tlng=es](http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S003636342014000600016&lng=es&tlng=es).

- Castañeda-Ruelas, G. M., Jiménez-Edeza, M., Galván-Gordillo, S. V., HerreraLópez, V. M., & Hernández-Pérez, C. F. (2022). Antibiotipo de cepas *Listeria* aisladas de embutidos en México. *Acta De Ciencia En Salud*, (20). Recuperado (2024) de <https://actadecienciaensalud.cotonala.udg.mx/index.php/ACS/article/view/134>
- CDC. (2021). Outbreak of *Listeria* Infections Linked to Deli Meats. Recuperado (2024), de sitio web: <https://www.cdc.gov/listeria/outbreaks/delimeat-1020/index.html>
- CDC. (2023). Foods That Can Cause Food Poisoning. Recuperado (2023), de sitio web: <https://www.cdc.gov/foodsafety/foods-linked-illness.html#poultry>
- Chen Y., Chen M., Wang J., Wu Q., Cheng J., Zhang J., et al., (2020). Heterogeneity, characteristics, and public health implications of *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat foods and pasteurized milk in China. *Front. Microbiol.* 11:642. doi: 10.3389/fmicb.2020.00642,
- Chen, J., Healey, S., Regan, P. M., Laksanalamai, P., & Hu, Z. (2017). PCR-based methodologies for detection and characterization of *Listeria monocytogenes* and *Listeria ivanovii* in foods and environmental sources. *Food Science And Human Wellness*, 6(2), 39-59. <https://doi.org/10.1016/j.fshw.2017.03.001>
- Chen, Y. (2012). Food and Drug Administration. Bad Bug Book, Foodborne Pathogenic Microorganisms and Natural Toxins. Second Edition. [*Listeria monocytogenes*, pp. 99-103].
- COMECARNE (2019). Normas oficiales mexicanas. Consejo Mexicano de la Carne. <https://comecarne.org/nom/>
- Consejo Mexicano de la Carne. (2024a). Panorama del mercado cárnico de México ante la sequía. <https://comecarne.org/panorama-del-mercado-carnico-de-mexico-ante-la-sequia>
- Consejo Mexicano de la Carne. (2024). Compendio Estadístico 2024 – Industria cárnica mexicana. <https://comecarne.org/compendio-estadistico-2024>
- Cordero, N., Maza, F., Navea-Perez, H., Aravena, A., Marquez-Fontt, B., Navarrete, P., Figueroa, G., Gonzalez, M., Latorre, M., & Reyes-Jara, A. (2016). Different transcriptional responses from slow and fast growth rate strains of *Listeria monocytogenes* adapted to low temperature. *Frontiers in Microbiology*, 7(MAR). <https://doi.org/10.3389/FMICB.2016.00229>
- Cratwrigth, E.J., Jackson, K.A., Jhonson, S.D., Graves, L.M., Silk, B.J. & Mahon, B.E. (2013) Listeriosis outbreaks and associated food vehicles, United States, 1998-2008. *Emerg Infect Dis*, 19:1-9.

- Dahl, V., Sundqvist, L., Hedenström, I., Löfdahl, M., Alm, E., Ringberg, H., ... & Jernberg, C. (2017). A nationwide outbreak of listeriosis associated with coldcuts, Sweden 2013-2014. *Infection ecology & epidemiology*, 7(1), 1324232.
- Davidson, P.M. & Taylor, T.M. (2007). Chemical preservatives and Natural Antimicrobial Compounds. *Food Microbiology: Fundamentals and frontiers* 3ra. Edición. Washington, Estados Unidos, Ed. Doyle and Beuchat, ASM press, pp. 713-745
- De la Senc, G. C., & Diciembre. (2016). Guías alimentarias para la población española (SENC, 2016); la nueva pirámide de la alimentación saludable. *Nutrición Hospitalaria*. <https://doi.org/10.20960/nh.827>
- De Mey, E., De Maere, H., Paelinck, H. & Fraeye, I. (2017). Volatile N-nitrosamines in meat products: potential precursors, influence of processing, and mitigation strategies. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 57 (13), 2909–2923. <https://doi.org/10.1080/10408398.2015.1078769>
- de Oliveira, T. L. C., Ramos, A. L. S., Ramos, E. M., Piccoli, R. H., & Cristianini, M. (2015). Natural antimicrobials as additional hurdles to preservation of foods by high pressure processing. *Trends in Food Science & Technology*, 45(1), 60–85. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2015.05.007>
- Dewey-MattiA, D., Manikonda, K., Hall, A.J., Wise, M.E. & Crowe, S.J. (2018). Surveillance for Foodborne Disease Outbreaks — United States, 2009–2015. *MMWR Surveill Summ*, 67(No. SS-10):1–11. DOI: <http://dx.doi.org/10.15585/mmwr.ss6710a1>
- Diego-Zarate, L. M., Méndez-Zamora, G., Rivera-De Alba, J. A., & Flores-Girón, E. (2021). Efecto del nopal (*Opuntia spp.*) deshidratado en polvo sobre las propiedades fisicoquímicas y sensoriales de salchichas Viena. *Biotecnia*, 23(2), 89-95.
- D'Onofrio, F., Schirone, M., Paparella, A., Krasteva, I., Tittarelli, M., Pomilio, F., Iannetti, L., D'Alterio, N., & Luciani, M. (2023). Stress Adaptation Responses of a *Listeria monocytogenes* 1/2a Strain via Proteome Profiling. *Foods*, 12(11), 2166. <https://doi.org/10.3390/foods12112166> EFSA y ECDC. (2021). El informe sobre zoonosis One Health 2020 de la Unión Europea. *EFSA J*. 19:6971. doi: 10.2903/j.efsa.2021.6971
- European Centre for Disease Prevention and Control. Listeriosis. In: ECDC. *Annual Epidemiological Report for 2023*. Stockholm: ECDC; 2025
- Essien, E. (2003). Definition of sausages. *Sausage Manufacture*, 5–8. doi:10.1533/9781855737167.5

FAO-PRODAR. (2014). Procesados de carnes Fichas técnicas. Recuperado (2024), de sitio web: <http://www.fao.org/3/a-au165s.pdf>

Fay, M. L., Salazar, J. K., Ren, Y., Wu, Z., Mate, M., Khouja, B. A., Lingareddygari, P., & Liggans, G. (2023). Growth Kinetics of *Listeria monocytogenes* and *Salmonella enterica* on Dehydrated Vegetables during Rehydration and Subsequent Storage. *Foods*, 12(13), 2561. <https://doi.org/10.3390/foods12132561>

Ferysiuk, K. & Wojciak, K.M. (2020). Reduction of nitrite in meat products through the application of various plant-based ingredients. *Antioxidants* 9 (8), 1–28. <https://doi.org/10.3390/antiox9080711>.

Fokas, R., Giormezis, N., & Vantarakis, A. (2025). Synergistic Approaches to Foodborne Pathogen Control: A Narrative Review of Essential Oils and Bacteriophages. *Foods*, 14(9), 1508. <https://doi.org/10.3390/foods14091508>

Gonzales-Barron, U., Cadavez, V., De Oliveira Mota, J., Guillier, L., & Sanaa, M. (2024). A Critical Review of Risk Assessment Models for *Listeria monocytogenes* in Meat and Meat Products. *Foods*, 13(3), 359. <https://doi.org/10.3390/foods13030359>

Graham, C., Whyte, R., Gilpin, B., Cornelius, A. J., Hudson, J., Morrison, D., Graham, H., & Nicol, C. (2005). Outbreak of campylobacteriosis following precooked sausage consumption. *Australian And New Zealand Journal Of Public Health*, 29(6), 507-510. <https://doi.org/10.1111/j.1467-842x.2005.tb00239.x>

Grigore-Gurgu, L., Bucur, F. I., Mihalache, O. A., & Nicolau, A. I. (2024). Comprehensive Review on the Biocontrol of *Listeria monocytogenes* in Food Products. *Foods*, 13(5), 734. <https://doi.org/10.3390/foods13050734>

Guel-García, P., García De León, F. J., Aguilera-Arreola, G., Mandujano, A., Mireles-Martínez, M., Oliva-Hernández, A., Cruz-Hernández, M. A., Vasquez-Villanueva, J., Rivera, G., Bocanegra-García, V., & Martínez-Vázquez, A. V. (2024). Prevalence and Antimicrobial Resistance of *Listeria monocytogenes* in Different Raw Food from Reynosa, Tamaulipas, Mexico. *Foods*, 13(11), 1656. <https://doi.org/10.3390/foods13111656>

Guenther, S., Huwyler, D., Richard, S., & Loessner, M. J. (2009). Virulent Bacteriophage for Efficient Biocontrol of *Listeria monocytogenes* in Ready-To-Eat Foods. *Applied and Environmental Microbiology*, 75(1), 93–100. <https://doi.org/10.1128/aem.01711-08>

Guéraud, F., Buisson, C., Promeyrat, A., Naud, N., Fouché, E., Bézirard, V., Dupuy, J., Plaisancié, P., Héliès-Toussaint, C., Trouilh, L., Martin, J.-L., Jeuge, S., Keuleyan, E., Petit, N., Aubry, L., Théodorou, V., Frémaux, B., Olier, M., Caderni, G., ... Pierre, F. (2023). Effects of sodium nitrite reduction, removal

or replacement on cured and cooked meat for microbiological growth, food safety, colon ecosystem, and colorectal carcinogenesis in Fischer 344 rats. Npj Science of Food, 7(1). <https://doi.org/10.1038/s41538-023-00228-9>

Guerrero-Ferreira, R. C., Hupfeld, M., Nazarov, S., Taylor, N. M., Shneider, M. M., Obbineni, J. M., Loessner, M. J., Ishikawa, T., Klumpp, J., & Leiman, P. G. (2019). Structure and transformation of bacteriophage A511 baseplate and tail upon infection of *Listeria* cells. The EMBO Journal, 38(3). <https://doi.org/10.15252/embj.201899455>

Halbedel, S., Wilking, H., Holzer, A., Kleta, S., Fischer, M.A., Lüth, S., Pietzka, A., Huhulescu, S., Lachmann, R., Krings, A., Ruppitsch, W., Leclercq, A., Kamphausen, R., Meincke, M., Wagner-Wiening, C., Contzen, M., Kraemer, I.B., Al Dahouk, S., Allerberger, F., Stark, K. & Flieger, A. (2020). Large Nationwide Outbreak of Invasive Listeriosis Associated with Blood Sausage, Germany, 2018-2019. Emerg Infect Dis., 26(7):1456-1464. doi: 10.3201/eid2607.200225. PMID: 32568037; PMCID: PMC7323541.

Health Canada. (2023). Policy on *Listeria monocytogenes* in Ready-to-Eat Foods. Government of Canada. <https://www.canada.ca/en/health-canada/services/food-nutrition/legislation-guidelines/policies/listeria-monocytogenes-ready-to-eat-foods.html>

Heir, E., Jensen, M. R., Aasli, A. W., Berget, I., & Holck, A. L. (2023). Reduction and Growth Inhibition of *Listeria monocytogenes* by Use of Anti-Listerial Nisin, P100 Phages and Buffered Dry Vinegar Fermentates in Standard and Sodium-Reduced Cold-Smoked Salmon. Foods, 12(24), 4391. <https://doi.org/10.3390/foods12244391>

Helmuth, I.G., Espenhain, L., Ethelberg, S., Jensen, T., Kjeldgaard, J., Litrup, E., Schjørring, S. & Müller, L. (2019). An outbreak of monophasic *Salmonella* Typhimurium associated with raw pork sausage and other pork products, Denmark 2018–19. Epidemiology and Infection 147, e315, 1–7. <https://doi.org/10.1017/S0950268819002073>

Jamshidi, A., & Zeinali, T. (2019). Significance and Characteristics of *Listeria monocytogenes* in Poultry Products. International Journal of Food Science, 2019, 1-7. <https://doi.org/10.1155/2019/7835253>

Jay, J. (1996). Prevalence of *Listeria* spp. in meat and poultry products. Food Control 7:209–214

Jia, Z., Huang, L., Wei, Z., Yao, Y., Fang, T., & Li, C. (2021). Dynamic kinetic analysis of growth of *Listeria monocytogenes* in pasteurized cow milk. Journal of Dairy Science, 104(3), 2654–2667. <https://doi.org/10.3168/jds.2020-19442>

Jiménez-Edeza, M., Castillo-Burgos, M., Germán-Báez, L. J., & Castañeda-Ruelas, G. M. (2020). Venta a granel de embutidos: una tendencia de

comercialización asociada al riesgo de enfermedades trasmítidas por alimentos en Culiacán, México. Revista mexicana de ciencias pecuarias, 11(3), 848-858. <https://doi.org/10.22319/rmcp.v11i3.5274>.

Karczewska, M., Strzelecki, P., Szalewska-Pałasz, A. & Nowicki, D. (2023). How to Tackle Bacteriophages: The Review of Approaches with Mechanistic Insight. International Journal of Molecular Sciences, 24(5):4447. <https://doi.org/10.3390/ijms24054447>

Kawacka, I., & Olejnik-Schmidt, A. (2024). High Prevalence of Virulence-Associated Genes and Length Polymorphism in *actA* and *inlB* Genes Identified in *Listeria monocytogenes* Isolates from Meat Products and Meat-Processing Environments in Poland. Pathogens, 13(6), 444. <https://doi.org/10.3390/pathogens13060444>

Kawacka, I., Olejnik-Schmidt, A., Schmidt, M., & Sip, A. (2020). Effectiveness of Phage-Based Inhibition of *Listeria monocytogenes* in Food Products and Food Processing Environments. Microorganisms, 8(11), 1764. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8111764>

Knipe, C. L. (2024). Sausages, types of cooked. Encyclopedia of Meat Sciences (Third Edition) 399-406. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-85125-1.001575>

Komora, N., Maciel, C., Amaral, R. A., Fernandes, R., Castro, S. M., Saraiva, J. A., & Teixeira, P. (2021). Innovative hurdle system towards *Listeria monocytogenes* inactivation in a fermented meat sausage model - high pressure processing assisted by bacteriophage P100 and bacteriocinogenic *Pediococcus acidilactici*. Food Research International, 148, 110628. doi: 10.1016/j.foodres.2021.110628

Konopacki, M., Grygorcewicz, B., Dołęgowska, B., Kordas, M., & Rakoczy, R. (2020). PhageScore: A simple method for comparative evaluation of bacteriophages lytic activity. Biochemical Engineering Journal, 161, 107652. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2020.107652>

Kurpas, M., Wieczorek, K. & Osek, J. (2018). Ready-to-eat meat products as a source of *Listeria monocytogenes*. J Vet Res, 61(1):49-55.

Lecuit, M. (2020). *Listeria monocytogenes*, a model in infection biology. Cellular Microbiology, 22(4). <https://doi.org/10.1111/cmi.13186>

Lemos Junior, W. J. F., Santinello, D., Mohammadzadeh, S., Treu, L., Sant'Ana, A. S., & Campanaro, S. (2024). Polyphosphate in food systems: Their roles and applications in foods and contribution to sustainable processing practices. Trends in Food Science & Technology, 152, 104696. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2024.104696>

- Letchumanan, V., Wong, P.C., Goh, B.H., *et al.* A review on the characteristics, taxonomy and prevalence of *Listeria monocytogenes*. (2018). *Prog Microbes Mol Biol*, 1(1): a0000007.
- Li, X., He, Y., Wang, Z., Wei, J., Hu, T., Si, J., Tao, G., Zhang, L., Xie, L., Abdalla, A. E., Wang, G., Li, Y., & Teng, T. (2021). A combination therapy of Phages and Antibiotics: Two is better than one. *International Journal of Biological Sciences*, 17(13), 3573–3582. <https://doi.org/10.7150/ijbs.60551>
- Lonergan, S. M., Topel, D. G., & Marple, D. N. (2019). Sausage processing and production. *The Science of Animal Growth and Meat Technology*, 229–253. doi:10.1016/b978-0-12-815277-5.00014-7
- Majou, D., & Christieans, S. (2018). Mechanisms of the bactericidal effects of nitrate and nitrite in cured meats. *Meat Science*, 145, 273–284. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2018.06.013>
- Manso, B., Melero, B., Stessl, B., Jaime, I., Wagner, M., Rovira, J., & Rodríguez-Lázaro, D. (2020). The Response to Oxidative Stress in *Listeria monocytogenes* Is Temperature Dependent. *Microorganisms*, 8(4), 521. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8040521>
- Martinez L., Djenane D., Cilla I., Beltran J.A. & Roncales P. (2006). Effect of varying oxygen concentrations on the shelf-life of fresh pork sausages packaged in modified atmosphere. *Food Chemistry*, 94: 219225.
- Massia, A. G., Laroque, D. A., O. de Moraes J., Heidtmann, S., M. Buosi, D. T. & Carciof B. (2024). Prior freezing impact on the growth kinetics of *Listeria monocytogenes* in hot dog sausages. *Food Control*, 157 <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2023.110186>.
- Maszewska, A., & Różalski, A. (2019). Isolation and Purification of *Proteus mirabilis* Bacteriophage. *Proteus Mirabilis*, 231–240. doi:10.1007/978-1-4939-96018\_20
- Matereke, L. T., & Okoh, A. I. (2020). *Listeria monocytogenes* Virulence, Antimicrobial Resistance and Environmental Persistence: A Review. *Pathogens*, 9(7), 528. <https://doi.org/10.3390/pathogens9070528>
- Mazaheri, T., Cervantes-Huamán, B. R. H., Bermúdez-Capdevila, M., Riolles-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*, 9(1), 181. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9010181>
- Modzelewska-Kapituła, M., Lemański, A., Zduńczyk, W., & Zadernowska, A. (2022). Investigation of the Possibility of *Listeria monocytogenes* Growth in

Alternatively Cured Cooked Sausages—A Case Study. *Applied Sciences*, 12(23), 12429. <https://doi.org/10.3390/app122312429>

Modzelewska-Kapituła, M., & Maj-Sobotka, K. (2014). The microbial safety of ready-to-eat raw and cooked sausages in Poland: *Listeria monocytogenes* and *Salmonella* spp. occurrence. *Food Control*, 36(1), 212-216. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2013.08.035>

Molina, J. R. G., Frías-Celayeta, J. M., Bolton, D. J., & Botinestean, C. (2024). A Comprehensive Review of Cured Meat Products in the Irish Market: Opportunities for Reformulation and Processing. *Foods*, 13(5), 746. <https://doi.org/10.3390/foods13050746>

Monroy-Pérez, E., Hernández-Jaimes, T., Morales-Espinosa, R., Delgado, J., Martínez-Gregorio, H., García-Cortés, L., Herrera-Gabriel, P., De Lira-Silva, A., Vaca-Paniagua, F. & Paniagua-Contreras, G. (2024). Analysis of *in vitro* expression of virulence genes related to antibiotic and disinfectant resistance in *Escherichia coli* as an emerging periodontal pathogen. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 15(14):1412007. doi: 10.3389/fcimb.2024.1412007.

Montero, D., Bodero, M., Riveros, G., Lapierre, L., Gaggero, A., Vidal, R. M., & Vidal, M. (2015). Molecular epidemiology and genetic diversity of *Listeria monocytogenes* isolates from a wide variety of ready-to-eat foods and their relationship to clinical strains from listeriosis outbreaks in Chile. *Frontiers in Microbiology*, 6. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00384>

Muchaamba, F., Wambui, J., Stephan, R., & Tasara, T. (2021). Cold Shock Proteins Promote Nisin Tolerance in *Listeria monocytogenes* Through Modulation of Cell Envelope Modification Responses. *Frontiers in Microbiology*, 12. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.811939>

Mudadu, A. G., Piras, G., Melillo, R., Salza, S., Cau, S., Virgilio, S., Meloni, D. & Mele, P. (2022). Survival of Naturally Contaminating *Listeria monocytogenes* in Commercial Mediterranean-Style Dry Fermented Sausages during Storage. *Journal of Food Protection*, 85(11): 1576-1583. <https://doi.org/10.4315/JFP-22-023>

Nieto, G., Peñalver, R., Ortuño, C., Hernández, J. D., & Guillén, I. (2023). Control of the Growth of *Listeria monocytogenes* in Cooked Ham through Combinations of Natural Ingredients. *Foods*, 12(18), 3416. <https://doi.org/10.3390/foods12183416>

Niklas, A., A. Borge, G. I., Rødbotten, R., Berget, I., Müller, M., S. Herrmann, S., Granby, K. & Kirkhus, B. (2023). Levels of nitrate, nitrite and nitrosamines in model sausages during heat treatment and *in vitro* digestion – The impact of adding nitrite and spinach (*Spinacia oleracea L.*). *Food Research*

Ogunniyi, A. D., Dandie, C. E., Brunetti, G., Drigo, B., Aleer, S., Hall, B., Ferro, S., Deo, P., Venter, H., Myers, B., Donner, E., & Lombi, E. (2021). Neutral electrolyzed oxidizing water is effective for pre-harvest decontamination of fresh produce. *Food Microbiology*, 93, 103610. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2020.103610>

Olaimat, A. N., Al-Holy, M. A., Shahbaz, H. M., Al-Nabulsi, A. A., Abu Ghoush, M. H., Osaili, T. M., ... Holley, R. A. (2018). Emergence of Antibiotic Resistance in *Listeria monocytogenes* Isolated from Food Products: A Comprehensive Review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. doi:10.1111/1541-4337.12387

Oliveira, M. J. de, Araújo, W. M. C., & Borgo, L. A (2005). Quantificação de nitrato e nitrito em lingüiças do tipo frescal. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 25(4), 736–742. 10.1590/S0101-20612005000400018

Osek, J., Lachtara, B., & Wieczorek, K. (2022). *Listeria monocytogenes* – How This Pathogen Survives in Food-Production Environments? *Frontiers In Microbiology*, 13. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.866462>

Paiva, J., Silva, V., Poeta, P., & Saraiva, C. (2025). Antimicrobial Resistance Profile and Biofilm Formation of *Listeria monocytogenes* Isolated from Meat. *Antibiotics*, 14(5), 454. <https://doi.org/10.3390/antibiotics14050454>

Papatzimos, G., Kotzamanidis, C., Kyritsi, M., Malissiova, E., Economou, V., Giantzi, V., Zdragas, A., Hadjichristodoulou, C., & Sergelidis, D. (2021). Prevalence and characteristics of *Listeria monocytogenes* in meat, meat products, food handlers and the environment of the meat processing and the retail facilities of a company in Northern Greece. *Letters in Applied Microbiology*, 74(3), 367–376. <https://doi.org/10.1111/lam.13620>

Pardos de la Gandara, M., Fournet, N., Bonifait, L., Lefèvre, S., Chemaly, M., Grastilleur, C., Cadel-Six, S., Fach, P., Pignault, A., Brisabois, A., JourdanDa Silva, N. & Weill, F. (2023). Countrywide multi-serotype outbreak of *Salmonella* Bovismorbificans ST142 and monophasic *Salmonella* Typhimurium ST34 associated with dried pork sausages in France, September 2020\* to January 2021. *Euro Surveill*, 28(2):pii=2200123. <https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2023.28.2.2200123>

Parra-Bracamonte, G. M., Lopez-Villalobos, N., Morris, S. T., & Vázquez-Armijo, J. F. (2020). An overview on production, consumer perspectives and quality assurance schemes of beef in Mexico. *Meat Science*, 108239. doi: 10.1016/j.meatsci.2020.108239

- Parra-Flores, J., Holý, O., Bustamante, F., Lepuschitz, S., Pietzka, A., Contreras-Fernández, A., Castillo, C., Ovalle, C., Alarcón-Lavín, M. P., Cruz-Córdova, A., Xicohtencatl-Cortes, J., Mancilla-Rojano, J., Troncoso, M., Figueroa, G., & Ruppitsch, W. (2022). Virulence and Antibiotic Resistance Genes in *Listeria monocytogenes* Strains Isolated From Ready-to-Eat Foods in Chile. *Frontiers in Microbiology*, 12. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.796040>
- Parrini, S., Sirtori, F., Acciaioli, A., Becciolini, V., Crovetti, A., Franci, O., *et al.* (2020). Effect of replacement of synthetic vs. Natural curing agents on quality characteristics of cinta senese frankfurter-type sausage. *Animals*, 10(1), 14. <https://doi.org/10.3390/ani10010014>.
- Perera, M. N., Abuladze, T., Li, M., Woolston, J., & Sulakvelidze, A. (2015). Bacteriophage cocktail significantly reduces or eliminates *Listeria monocytogenes* contamination on lettuce, apples, cheese, smoked salmon and frozen foods. *Food Microbiology*, 52, 42–48. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2015.06.006>.
- Polon, P. E., Alves, A. F., Olivo, J. E., Paraíso, P. R., & Andrade, C. M. (2017). Production optimization in sausage industry based on the demand of the products. *Journal of Food Process Engineering*, 41(2), e12644. doi:10.1111/jfpe.12644
- Prakash, B., Kujur, A., Singh, P. P., Kumar, A., & Yadav, A. (2017). Plants-derived bioactive compounds as functional food ingredients and food preservative. *Journal of Nutrition & Food Science*, 2, 005
- Prokop, A., Gouin, E., Villiers, V., Nahori, M., Vincentelli, R., Duval, M., Cossart, P., & Dussurget, O. (2017). OrfX, a Nucleomodulin Required for *Listeria monocytogenes* Virulence. *MBio*, 8(5). <https://doi.org/10.1128/mbio.01550-17>
- Quereda, J. J., Morón-García, A., Palacios-Gorba, C., Dessaix, C., García-del Portillo, F., Pucciarelli, M. G., & Ortega, A. D. (2021). Pathogenicity and virulence of *Listeria monocytogenes*: A trip from environmental to medical microbiology. *Virulence*, 12(1), 2509–2545. <https://doi.org/10.1080/21505594.2021.1975526>
- Ranveer, S. A., Dasriya, V., Ahmad, M. F., Dhillon, H. S., Samtiya, M., Shama, E., Anand, T., Dhewa, T., Chaudhary, V., Chaudhary, P., Behare, P., Ram, C., Puniya, D. V., Khedkar, G. D., Raposo, A., Han, H., & Puniya, A. K. (2024). Positive and negative aspects of bacteriophages and their immense role in the food chain. *Npj Science of Food*, 8(1). <https://doi.org/10.1038/s41538-023-00245-8>
- Rendueles, C., Duarte, A. C., Escobedo, S., Fernández, L., Rodríguez, A., García, P., & Martínez, B. (2022). Combined use of bacteriocins and bacteriophages as food biopreservatives. A review. *International Journal of Food Microbiology*, 368, 109611. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2022.109611>

- Rodríguez-Rubio, L., García, P., Rodríguez, A., Billington, C., Hudson, J. A., & Martínez, B. (2015). Listeriaphages and coagulin C23 act synergistically to kill *Listeria monocytogenes* in milk under refrigeration conditions. International Journal of Food Microbiology, 205, 68–72. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2015.04.007>.
- Romeo, M., Lasagabaster, A., Lavilla, M., & Amárita, F. (2025). Genetic Diversity, Biofilm Formation, and Antibiotic Resistance in *Listeria monocytogenes* Isolated from Meat-Processing Plants. Foods, 14(9), 1580. <https://doi.org/10.3390/foods14091580>
- Rosa, T. A. M., & Degáspari, C. H. (2013). Quantitative determination of nitrate and nitrite cured salts in Italian type salamis sausages sold in Colombo city – Paraná. Visão Acadêmica, (4), 14. 10.5380/acd.v14i4.35108
- Rossi, L., De Castro Almeida, R. C., Lopes, L. S., Figueiredo, A. C. L., Ramos, M. P. P., & De Almeida, P. F. (2011). Occurrence of *Listeria* spp. in Brazilian fresh sausage and control of *Listeria monocytogenes* using bacteriophage P100. Food Control, 22(6), 954-958. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2010.12.001>
- Rouhi, A. M., Falah, F., Azghandi, M., Behbahani, B. A., Mortazavi, S. A., Yazdi, F. T., & Vasiee, A. (2024). Investigating the effect of *Lactiplantibacillus plantarum* TW57-4 in preventing biofilm formation and expression of virulence genes in *Listeria monocytogenes* ATCC 19115. Lebensmittel-Wissenschaft + Technologie (Print), 191, 115669. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2023.115669>
- Ruotong, G., Jian, X., Pei, L., Chunlei, M., Xiaoyun, Z., Wudan, C., Yaqiu, K. & Qilin H. (2024). Emulsified sausages with yeast protein as an animal fat replacer: Effects on nutritional composition, spatial structure, gel performance, and sensory quality. Meat Science, 210. doi.org/10.1016/j.meatsci.2024.109433
- Sae-Ueng, U., Bunsuwansakul, C., Showpanish, K., Phironrit, N., Sapcharoenkun, C., Treetong, A., & Thadajarassiri, J. (2024). Revealing bacteriophage capabilities: pH and NaCl concentration effects on RSJ2 phage infectivity and stiffness. Journal of King Saud University - Science, 36(8), 103344. <https://doi.org/10.1016/j.jksus.2024.103344>
- Schiavano, G. F., Guidi, F., Pomilio, F., Brandi, G., Salini, R., Amagliani, G., Centorotola, G., Palma, F., Felici, M., Lorenzetti, C., & Blasi, G. (2023). *Listeria monocytogenes* Strains Persisting in a Meat Processing Plant in Central Italy: Use of Whole Genome Sequencing and In Vitro Adhesion and Invasion Assays to Decipher Their Virulence Potential. Microorganisms, 11(7), 1659. <https://doi.org/10.3390/microorganisms11071659>

- Scortti, M., Monzó, H.J., Lacharme-Lora, L., Lewis, D.A., Vázquez-Boland, J. A. (2007) The PrfA virulence regulon. *Microbes Infect.* Aug;9(10):1196-207. doi: 10.1016/j.micinf.2007.05.007. Epub 2007 May 7. PMID: 17764998.
- Sebranek, J. G., Jackson-Davis, A. L., Myers, K. L. & Lavieri, N. A. (2012). Beyond celery and starter culture: advances in natural/organic curing processes in the United States. *Meat Sci.* 92:267–273.
- Secretaría de patrimonio y fomento social. (1984). NMX-F-065-1984. ALIMENTOS. - SALCHICHAS. - ESPECIFICACIONES. Recuperado (2024), de sitio web: <https://comecarne.org/wp-content/uploads/2013/07/NMX-F-065-1984.pdf>
- Shamloo, E., Hosseini, H., Abdi Moghadam, Z., Halberg Larsen, M., Haslberger, A. & Alebouyeh, M. (2019). Importance of *Listeria monocytogenes* in food safety: a review of its prevalence, detection, and antibiotic resistance. *Iran J Vet Res.* Fall;20(4):241-254. PMID: 32042288; PMCID: PMC6983307.
- Shrestha, S., Erdmann, J. J., & Smith, S. A. (2022). Predicting the Growth of *Listeria monocytogenes* in Cooked, Sliced Deli Turkey Breast as a Function of Clean-Label Antimicrobials, pH, Moisture, and Salt. *Journal of Food Protection*, 85(6), 945–955.
- Sirini, N., Munekata, P.E.S., Lorenzo, J.M., Stegmayer, M.Á., Pateiro, M., Pérez-Álvarez, J.Á., Sepúlveda, N., Sosa-Morales, M.E., Teixeira, A., FernándezLópez, J., et al. (2022). Development of Healthier and Functional Dry Fermented Sausages: Present and Future. *Foods* 11(8):1128. <https://doi.org/10.3390/foods11081128>
- Stepanović, S., Vuković, D., Dakić, I., Savić, B., & Švabić-Vlahović, M. (2000). A modified microtiter-plate test for quantification of staphylococcal biofilm formation. *Journal of Microbiological Methods*, 40(2), 175–179. doi:10.1016/s0167-7012(00)00122-6
- Tavares, T. D., Ribeiro, A. R., Silva, C., Antunes, J. C., Felgueiras, H. P. (2024). Combinatory effect of nisin antimicrobial peptide with bioactive molecules: A review. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 91. <https://doi.org/10.1016/j.jddst.2023.105246>.
- Tüzemen, N. Ü., Önal, U., Merdan, O., Akca, B., Ener, B., Özakın, C., & Akalın, H. (2024). Synergistic antibacterial activity of ceftazidime–avibactam in combination with colistin, gentamicin, amikacin, and fosfomycin against carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae*. *Scientific Reports*, 14(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-024-67347-5>
- Tsitsos, A., Peratikos, P., Damianos, A., Kyritsi, M. A., Arsenos, G., Hadjichristodoulou, C., Soutos, N., Gousia, P., & Economou, V. (2025). Prevalence, molecular characterization, antibiotic resistance, and investigation of transmission pathways of *Listeria monocytogenes* strains

isolated along the beef production chain. *Food Microbiology*, 129, 104745. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2025.104745>

Uesugi, A. R., & Moraru, C. I. (2009). Reduction of *Listeria* on Ready-to-Eat Sausages after Exposure to a Combination of Pulsed Light and Nisin. *Journal Of Food Protection*, 72(2), 347-353. <https://doi.org/10.4315/0362-028x-72.2.347>

Université Laval. (2024). Phages Catalog. Recuperado (2024), de sitio web: <https://www.phage.ulaval.ca/?pageDemandee=phage&noPhage=394&id=41&L=1>

Vedovatto, E., Steffens, C., Cansian, R. L., Backes, G. T., & Verlindo, R. (2019). Avaliação de diferentes culturas starters na elaboração de salame tipo italiano. *Ciência Animal Brasileira*, 20. 10.1590/1809-6891v20e-47777.

Vidović, S., Paturi, G., Gupta, S., & Fletcher, G. C. (2022). Lifestyle of *Listeria monocytogenes* and food safety: Emerging listericidal technologies in the food industry. *Critical Reviews In Food Science And Nutrition*, 1-19. <https://doi.org/10.1080/10408398.2022.2119205>

Wang, H., Feng, M., Anwar, T. M., Chai, W., Ed-Dra, A., Kang, X., Rantsiou, K., Kehrenberg, C., Yue, M., & Li, Y. (2023). Change in antimicrobial susceptibility of *Listeria spp.* in response to stress conditions. *Frontiers In Sustainable Food Systems*, 7. <https://doi.org/10.3389/fsufs.2023.1179835>

Ward, T.J., Gorski, L., Borucki, M.K., Mandrell, R.E., Hutchins, J. & Pupedis, K. (2004) Intraspecific phylogeny and lineage group identification based on the prfA virulence gene cluster of *Listeria monocytogenes*. *Journal of Bacteriology*, 186(15):4994-5002. doi: 10.1128/JB.186.15.4994-5002.2004

Wiktorczyk-Kapischke, N., Skowron, K., & Wałecka-Zacharska, E. (2023a). Genomic and pathogenicity islands of *Listeria monocytogenes*—overview of selected aspects. *Frontiers in Molecular Biosciences*, 10. <https://doi.org/10.3389/fmlob.2023.1161486>

Wiktorczyk-Kapischke, N., Wałecka-Zacharska, E., Korkus, J., Grudlewska-Buda, K., Budzyńska, A., Wnuk, K., Gospodarek-Komkowska, E., & Skowron, K. (2023b). The influence of stress factors on selected phenotypic and genotypic features of *Listeria monocytogenes* – a pilot study. *BMC Microbiology*, 23(1). <https://doi.org/10.1186/s12866-023-03006-5>

Wiktorczyk-Kapischke, N., Skowron, K., Grudlewska-Buda, K., Wałecka-Zacharska, E., Korkus, J., & Gospodarek-Komkowska, E. (2021). Adaptive Response of *Listeria monocytogenes* to the Stress Factors in the Food Processing Environment. *Frontiers in Microbiology*, 12. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.710085>

Yaghoubi, M., Alirezalu, K., Mohammad Mazloomi, S., Marcinkowska-Lesiak, M., Azadmard-Damirchi, S., Hadi Peighambardoust, S., Hesari, J., Rastgoo, A., Phimolsiripol, Y., & Mousavi Khaneghah, A. (2024). Enhancing beef sausage packaging with calcium alginate active film infused with nisin and  $\epsilon$ -polylysine nanoparticles and beetroot extract. LWT, 191. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2023.115665>

Yang, G., Li, B. & Li, Y. (2019). Determination of 13 kinds of volatile N-nitrosamines in sausage and ham products by gas chromatography tandem mass spectrometry. Journal of Food Safety and Quality, 10 (24), 8436-8443.

Zeng, Q. (2007). Principles of Food Processing and Storage. Chemical Industry Prees, Beijing.

Zhang, R., Realini, C. E., Brad Kim, Y. H. & Farouk, M. (2023). Challenges and processing strategies to produce high quality frozen meat. Meat Science 205, 109311. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2023.109311>

Żurawik, A., Kasperski, T., Olechowska-Jarząb, A., Szczesiul-Paszkiewicz, P., Żak, I., Wójcicki, M., Maćkiw, E., & Chmielarczyk, A. (2024). Genetic Diversity, Virulence Factors and Antibiotic Resistance of *Listeria monocytogenes* from Food and Clinical Samples in Southern Poland. Pathogens, 13(9), 725. <https://doi.org/10.3390/pathogens13090725>

## 8.ANEXOS

**Anexo 1.** Condiciones de amplificación de genes involucrados con la virulencia de *L. monocytogenes*

Gen	Condiciones	Referencia
<i>hlyA</i>	94 °C, 4 min; 35 ciclos de 94 °C, 30 s; 0 °C, 30 s; extensión 72 °C, 2 min; extensión final: 72 °C, 10 min.	Żurawik <i>et al.</i> , 2024
<i>actA1</i>	25 ciclos de 15 segundos a 94 °C, 10 segundos a 56 °C y 10 segundos a 72 °C.	Ward <i>et al.</i> , 2004
<i>prfA</i>	1 ciclo a 95 °C durante 30 segundos, seguido de 40 ciclos a 95 °C durante 5 segundos y 60 °C durante 30 segundos, y pasos de disociación a 95 °C durante 15 segundos y 60 °C durante 30 segundos.	Roy <i>et al.</i> , 2023
<i>plcA</i>	95 °C durante 2 min; 35 ciclos de: 95 °C durante 15 s, 62 °C durante 30 s y 72 °C (extensión).	Camilli <i>et al.</i> , 1993
<i>mpl</i>	94 °C durante 3 minutos; 35 ciclos de: 94 °C durante 30 segundos, 60 °C durante 30 segundos y 72 °C durante 40 segundos; seguido de una extensión final a 72 °C durante 10 minutos.	Chen <i>et al.</i> , 2017
<i>plcB2</i>	25 ciclos de 15 segundos a 94 °C, 10 segundos a 56 °C y 10 segundos a 72 °C.	Ward <i>et al.</i> , 2004
<i>inIB</i>	1 ciclo a 95 °C durante 30 segundos, seguido de 40 ciclos a 95 °C durante 5 segundos y 60 °C durante 30 segundos, y pasos de disociación a 95 °C durante 15 segundos y 60 °C durante 30 segundos.	Rouhi <i>et al.</i> , 2024
<i>agrA</i>	95 °C 4 min; 30–35 ciclos: 95 °C 30 s → 57–60 °C 30 s; 72 °C 30–60 s; 72 °C 5–10 min	Autret <i>et al.</i> , 2003
<i>flaA</i>	95 °C 3 min; 30 ciclos: 95 °C 30 s; 54 °C 30 s; 72 °C 1 min; 72 °C 10 min	Borucki & Call., 2003