

Caracterización genómica de cepas persistentes de *Listeria monocytogenes* aisladas de alimentos y ambientes de producción en Chile entre 2000 y 2020

Genomic characterization of persistent *Listeria monocytogenes* strains isolated from food and production environments in Chile between 2000 and 2020

Marcela Paz Sánchez Troncoso², Julio Parra-Flores^{1,3}, Beatriz Daza-Prieto⁴, Solange Parra-Soto³, Natalia Bello-Escamilla⁵, Ariane Pietzka⁴ y Werner Ruppitsch⁶

¹Magíster en Salud Pública, Facultad Ciencias de la Salud y de los Alimentos, Universidad del Bío-Bío, Chile

²Laboratorio de Salud Pública, Ambiental y Laboral, SEREMI de Salud Región de Ñuble, Chile

³Departamento de Nutrición y Salud Pública, Facultad Ciencias de la Salud y de los Alimentos, Universidad del Bío-Bío, Chile

⁴Austrian Agency for Health and Food Safety, Institute for Medical Microbiology and Hygiene, Austria

⁵Departamento de Enfermería, Facultad Ciencias de la Salud y de los Alimentos, Universidad del Bío-Bío, Chile

⁶Medical University Innsbruck, Institute of Hygiene and Medical Microbiology, Austria.

Financiamiento: DICREA n° RE2340221 y FAPEI n° FP2429349

Conflictos de interés: Ninguno.

Recibido: 12 de mayo de 2025 / Aceptado: 21 de julio de 2025

Resumen

Introducción: *Listeria monocytogenes* representa un riesgo para poblaciones vulnerables causando casos y brotes con alta letalidad en el mundo y en Chile. **Objetivo:** Caracterizar genómicamente cepas de *L. monocytogenes* aisladas de alimentos y ambientes de producción en Chile (2000–2020) mediante secuenciación genómica completa, con el fin de aportar a la trazabilidad, vigilancia epidemiológica y mejorar las estrategias de control en salud pública e inocuidad alimentaria. **Metodología:** Fueron analizados 116 genomas de *L. monocytogenes* provenientes de alimentos y ambientes de producción. Se determinó el serotipo, tipos de secuencia (ST), complejo clonal (CC) y genoma central MLST, genes asociados a resistencia a antimicrobianos y virulencia. **Resultados:** *L. monocytogenes* fue prevalente en carnes, frutas, verduras y lácteos. Predominaron los serotipos 1/2a, 1/2b y 4b, mientras las ST1, ST5, ST8 y ST9 fueron predominantes. Se identificaron 21 *clusters*, destacando ST1, ST5 y ST8 por su persistencia en el tiempo. El 100% de los genomas tienen genes de estrés térmico *clpCEPL*, genes *bcrBC* de resistencia al cloruro de benzalconio y virulencia *inlA*, *prfA* y *hly*. **Conclusiones:** Se evidenció la persistencia de *L. monocytogenes* durante el período estudiado. Por ello, se recomienda implementar vigilancia genómica de *L. monocytogenes* en alimentos y casos clínicos en Chile.

Palabras clave: *Listeria monocytogenes*; secuenciación genómica completa (WGS); alimentos; genes de virulencia; genes de resistencia; persistencia.

Abstract

Background: *Listeria monocytogenes* poses a risk to vulnerable populations, resulting in cases and outbreaks with high mortality rates globally and in Chile. **Aim:** Genomically characterize strains of *L. monocytogenes* isolated from food and production environments in Chile (2000–2020) using whole genome sequencing to contribute to traceability, epidemiological surveillance, and optimize control strategies in public health and food safety. **Methodology:** A total of 116 *L. monocytogenes* genomes from food and production environments were analyzed. The serotype, sequence types (ST), clonal complex (CC), and core genome MLST were determined, as well as genes associated with antimicrobial resistance and virulence. **Results:** *L. monocytogenes* was prevalent in meat, fruit, vegetables, and dairy products. Serotypes 1/2a, 1/2b, and 4b predominated, while ST1, ST5, ST8, and ST9 were predominant. Twenty-one clusters were identified, with ST1, ST5, and ST8 standing out for their persistence over time. 100% of the genomes have *clpCEPL* heat stress genes, *bcrBC* benzalkonium chloride resistance genes, and *inlA*, *prfA*, and *hly* virulence genes. **Conclusions:** The persistence of *L. monocytogenes* was evident during the study period. Therefore, it is recommended that genomic surveillance of *L. monocytogenes* be implemented in food and clinical cases in Chile.

Keywords: *Listeria monocytogenes*; whole genome sequencing (WGS); food; virulence genes; resistance genes; persistence.

Correspondencia a:

Julio Parra Flores
juparra@ubiobio.cl

Introducción

Las enfermedades transmitidas por alimentos (ETA) son un problema de salud pública mundial. Según la Organización Mundial de la Salud (OMS), los lactantes, los niños menores, las mujeres embarazadas, las personas mayores y pacientes con enfermedades crónicas son particularmente vulnerables¹. Entre los microorganismos prevalentes e importantes en la producción de ETAs está *Listeria monocytogenes*. Este patógeno se adquiere por el consumo de alimentos contaminados y su importancia no solamente radica en su prevalencia, sino también por su alta letalidad, que obliga a llevar una vigilancia epidemiológica cada vez más minuciosa².

Listeria monocytogenes es una bacteria ubicua y persistente en las plantas de procesamiento de alimentos³. Este patógeno contamina alimentos como frutas y verduras frescas o congeladas, productos lácteos no pasteurizados, embutidos y pescados, debido a prácticas inadecuadas de higiene y manufactura⁴. De esos alimentos, los quesos, embutidos, carnes y pescados son los productos más frecuentemente asociados a brotes de este patógeno mundialmente, con una prevalencia en muestras de alimentos de hasta 6%^{5,6}.

La infección provocada por *L. monocytogenes* se denomina listeriosis y se manifiesta principalmente por abortos, septicemia, meningitis y, en casos graves, la muerte⁷. Entre 2005 y 2020, se reportaron en el mundo 3.628 casos de listeriosis vinculados a 127 brotes asociados al consumo de alimentos. De estos brotes, 54% se registraron en Europa y 38% en América. En cuanto a los alimentos involucrados, 31% de los brotes estuvieron asociados a productos cárnicos listos para el consumo, 28% a productos lácteos, 13% a frutas y hortalizas frescas o mínimamente procesadas, 12% a productos del mar, y el resto a alimentos con múltiples ingredientes, también listos para el consumo⁸. Las cepas de *L. monocytogenes* asociadas principalmente a casos y brotes de ETAs corresponden mayoritariamente a los serotipos 4b, 1/2a y 1/2b, siendo responsables de más de 90% de los casos de listeriosis en el mundo⁹. En Chile, se reportaron dos brotes significativos de listeriosis entre los años 2008 y 2009, con 165 y 73 casos, respectivamente. Estos eventos se vincularon al consumo de queso de cabra, embutidos y otros productos cárnicos. Los serotipos más frecuentemente identificados en dichos brotes fueron 4b (CC1) y 1/2a (CC9)¹⁰. En un estudio más reciente efectuado también en Chile, y luego de analizar 365 cepas aisladas de diversas fuentes entre 2008-2017, se encontró que los serotipos 1/2a, 1/2b y 4b fueron los mayormente reportados¹¹.

La secuenciación del genoma completo (en inglés *whole genome sequencing*-WGS), ha facilitado el estudio en profundidad de los microorganismos patógenos al

generar información que permite determinar relaciones y diferencias taxonómicas entre ellos, reemplazando como estándar de oro a la tipificación por electroforesis en gel por campos pulsados (PFGE). WGS no solo se utiliza para la identificación de los aislados, sino también, para la elaboración de genotipificación clásica mediante tipificación de secuencias multilocus de 7 loci (en inglés *multilocus sequence typing*-MLST) o extensiva con esquemas MLST de genoma central (cgMLST); además, el análisis de polimorfismos de un solo nucleótido, variantes de un solo nucleótido, serotipificación molecular, detección de genes asociados con la resistencia a los antimicrobianos y la virulencia, entre otros^{12,13}.

Por ello, considerando el impacto en salud pública de *L. monocytogenes*, especialmente por su asociación con brotes de ETA, el control eficaz de esta bacteria resulta prioritario. En este contexto, la identificación precisa de serotipos, tipos de secuencia (ST) y perfiles genómicos comparativos (cgMLST) a través de herramientas de tipificación molecular, como la WGS, se convierte en una herramienta clave para la vigilancia epidemiológica, la trazabilidad de brotes y la implementación de estrategias de prevención y control a lo largo del tiempo¹⁴.

Objetivo

Caracterizar genómicamente cepas de *L. monocytogenes* aisladas de alimentos y ambientes de producción en Chile (2000-2020) mediante WGS, con el fin de aportar a la trazabilidad, vigilancia epidemiológica y mejorar las estrategias de control en salud pública e inocuidad alimentaria.

Material y Método

Cepas estudiadas

Se analizaron 116 genomas completos de cepas de *L. monocytogenes* aisladas de alimentos y superficies de producción en Chile, desde el año 2000 hasta el 2020, de las cuales 53 se encuentran almacenadas en la BBDD *Bacterial Isolate Genome Sequence* Instituto Pasteur (BIGSdb-Pauster), Francia, y 63 cepas de estudios realizados por grupo de investigación de la Universidad del Bío-Bío (UBB).

Selección de genomas de estudio

Se accedió a la base de datos *Bacterial Isolate Genome Sequence* Instituto Pasteur (BIGSdb-Pauster), Francia, ubicada en el sitio <https://bigsdb.pasteur.fr/listeria/> con registro y acceso otorgado por los administradores. Posteriormente se descargó la base completa de datos general a fin de seleccionar los genomas de interés con

las variables de genoma completo, Chile, origen alimentos o superficies y creando una matriz de selección con 53 genomas seleccionados. Los *contigs* de los genomas seleccionados fueron descargados en formato fasta e ingresados en el *software* Ridom SeqSphere+ v10.0.1. Además, al análisis se le adicionaron 63 genomas de *L. monocytogenes* aislados por el grupo de investigación en epidemiología molecular de patógenos en alimentos de la UBB en estudios efectuados en las regiones Metropolitana, Ñuble y Maule.

Identificación del serotipo, secuencia tipo (ST) y secuencias multilocus de genoma central (cgMLST)

A partir de los genomas completos de las cepas de *L. monocytogenes*, se determinaron los serotipos mediante la extracción específica de secuencias objetivo, utilizando las plantillas de tarea *L. monocytogenes* 5-plex PCR Serogroup del *software* SeqSphere+ v. 10.0.1 (2024-05). Este procedimiento utilizó fragmentos de cinco regiones del ADN (*lmo118*, *lmo0737*, *ORF2110*, *ORF2829* y *prf*) como control interno de amplificación, tal como fue descrito previamente¹⁵. Las secuencias tipos (ST) y complejos clonales (CC) se determinaron utilizando las plantillas de tarea de los esquemas MLST disponibles en SeqSphere+ v. 10.0.1 (2024-05). La confirmación de los ST en las cepas involucró fragmentos de siete genes constitutivos: *abcZ*, *bglA*, *cat*, *dapE*, *dat*, *ldh* e *ihkA*¹⁶, junto con los perfiles de la base de datos MLST de *Listeria* del Instituto Pasteur (<http://bigsd.bpasteur.fr/Listeria/Listeria.html>). El análisis de tipificación de secuencias multilocus del genoma central (cgMLST) se llevó a cabo utilizando el perfil de 1.701 loci correspondientes a complejos tipos (CT) de cgMLST¹⁷, utilizando las plantillas de tarea de SeqSphere+ v. 10.0.1 (2024-05). Se definió un *cluster* cgMLST como un grupo de aislamientos con menos de 10 alelos diferentes entre las cepas estudiadas.

Detección de genes de virulencia y resistencia a antimicrobianos

Los genes de virulencia fueron identificados utilizando la plantilla de tarea VFDB v.2.0 en SeqSphere+ para datos de WGS¹⁸. Para el procedimiento de escaneo de objetivos, se establecieron umbrales con una identidad requerida $\geq 90\%$ respecto a la secuencia de referencia y una alineación de la secuencia de referencia $\geq 99\%$.

Para los genes de resistencia a antimicrobianos se utilizó *Comprehensive Antibiotic Resistance Database* (CARD) con los parámetros predeterminados “*perfect*” y “*strict*” para el análisis de secuencias de genes de resistencia antimicrobiana¹⁹. Además, se complementó con la plantilla de tarea AMRFinderPlus v.3.11.26, disponible en el *software* Ridom SeqSphere+ 10.0.1, utilizando el

método EXACT con una configuración de 100%, junto con la alineación BLAST de secuencias de proteínas contra la base de datos de AMRFinderPlus²⁰.

Resultados

Se evaluó la distribución de las cepas de *L. monocytogenes* según los principales grupos alimentarios definidos por el Reglamento Sanitario de los Alimentos de Chile. Los grupos 10 (carnes y productos cárneos) y 14 (frutas y verduras) concentraron a 46% de los aislamientos positivos. En cambio, los grupos 1 y 15 presentaron valores inferiores a 10%. Adicionalmente, 36% de las cepas aisladas no registran con precisión la fuente alimentaria de origen (Tabla 1).

El esquema clásico de MLST y complejo clonal (CC) mostró que 48% de las cepas de *L. monocytogenes* fueron tipificadas como ST8 (CC8), ST1 (CC1), ST5 (CC5) y ST9 (CC9) con 14-13-12 y 9%, respectivamente. Por otra parte, los principales serotipos identificados fueron 1/2a (serogrupo IIa), 1/2b (serogrupo IIb) y 4b (serogrupo IVb) con 34-28 y 27%, respectivamente (Tabla 2).

Al utilizar el esquema de análisis cgMLST para determinar cepas estrechamente relacionadas, se obtuvieron 27 *clusters*. Los principales grupos son ST1 con cinco *clusters* (*cluster* 1, 9, 10, 11 y 12), ST8 con cuatro *clusters* (*cluster* 2, 4, 18 y 19) y ST3, ST5 y ST14 presentaban solo dos *clusters* (*cluster* 5 y 13; 3 y 6; 26 y 27, respectivamente). Mientras que ST9 solo se agrupó con un *clusters* con dos cepas (*clusters* 24) (Figura 1).

El 100% de las cepas presentaron genes asociados a la resistencia de antimicrobianos fosfomicina (*fosX*) y a lincosamidas (*lin*). Además, de la presencia del cassette *brcBC* asociado a bacitracina. Junto a esto, tres cepas ST426 (CC426) presentaron genes *fexA* de resistencia a cloranfenicol y florfenicol (Tabla 3).

Respecto de genes de virulencia, destaca la presencia de genes asociados al estrés ambiental *clpCEPL* en 97%

Tabla 1. Distribución de cepas de *Listeria monocytogenes* aisladas de alimentos y medio ambiente

Origen de las cepas	n	%
Carnes y productos cárneos (Grupo 10)	30	26
Frutas y verduras (Grupo 14)	23	20
Leche y productos lácteos (Grupo 1)	9	8
Comidas y platos preparados (Grupo 15)	6	5
Medio ambiente de producción	6	5
Alimentos no especificados	42	36
Total	116	100

Tabla 2. Frecuencia de secuencias tipo (ST), complejo clonal (CC) y serotipos de las cepas de *Listeria monocytogenes* estudiadas

Secuencia tipo (ST)	Complejo clonal (CC)	n° (%)	Serotipo
ST8	CC8	16 (14%)	1/2a
ST1	CC1	15 (13%)	4b
ST5	CC5	14 (12%)	1/2b
ST9	CC9	10 (9%)	1/2c
ST3	CC3	9 (8%)	1/2b
ST 14	CC14	8 (7%)	1/2a
ST2	CC2	4 (3%)	4b
ST6	CC6	4 (3%)	4b
ST37	CC37	4 (3%)	1/2a
ST 121	CC121	4 (3%)	1/2a
ST279	CC279	3 (2,6%)	4b
ST426	CC426	3 (2,6%)	1/2b
ST2763	CC5	3 (2,6%)	1/2b
ST7	CC7	2 (2%)	1/2a
ST193	CC193	2 (2%)	1/2a
ST363	CC5	2 (2%)	1/2b
ST388	CC388	2 (2%)	4b
ST398	CC19	2 (2%)	1/2a
ST938	CC938	2 (2%)	1/2a
ST Individuales			
ST218	CC218		4b
ST288	CC288		1/2b
ST392	CC392	5 (4,3%)	1/2b
ST451	CC11		1/2a
ST1395	CC6		4b
ND	-----	2 (2%)	4b
n° cepas		116 (100%)	

ND: no determinadas, probables nuevos ST

de los aislados y a resistencia térmica *clpL* (AAA+) en 17%, siendo principalmente de alimentos como cecinas crudas o cocidas. Respecto de genes de virulencia, los principales genes *inlAB*, *hly* y *prfA*, se encontraban en 93-97 y 98% respectivamente (Tabla 3).

Al evaluar la persistencia se observó que, al agrupar las cepas por año de aislamiento, existen cepas estrechamente relacionadas en años diferentes, estableciendo así la persistencia temporal. Destacan entre los clones, CC8 (ST8, serotipo 1/2a) con una mayor prevalencia y que fueron aisladas en los años 2010, 2012, 2015, 2017-2020. De igual forma CC1 (ST1, serotipo 4b) y CC5 (ST5, serotipo 1/2b) estrechamente relacionadas fueron aislados durante los años 2001, 2004, 2009, 2010, 2018 y 2020 (Figura 2 y Tabla 4).

Tabla 3. Frecuencia de genes de resistencia y virulencia en las cepas de *Listeria monocytogenes* en estudio

	n°	%
Gen de resistencia		
<i>vgaG</i> (Lincosamida)	116	100
<i>fosX</i> (Fosfomicina)	115	99
<i>brcBC</i> (Bacitracina)	18	16
<i>clpCEP</i> (estrés ambiental y biocidas)	112	97
<i>clpL</i> (calor)	20	17
Gen de virulencia		
<i>inlAB</i>	108	93
<i>inlC</i>	112	97
<i>prfA</i>	114	98
<i>Hly</i>	112	97
N° cepas	116	100

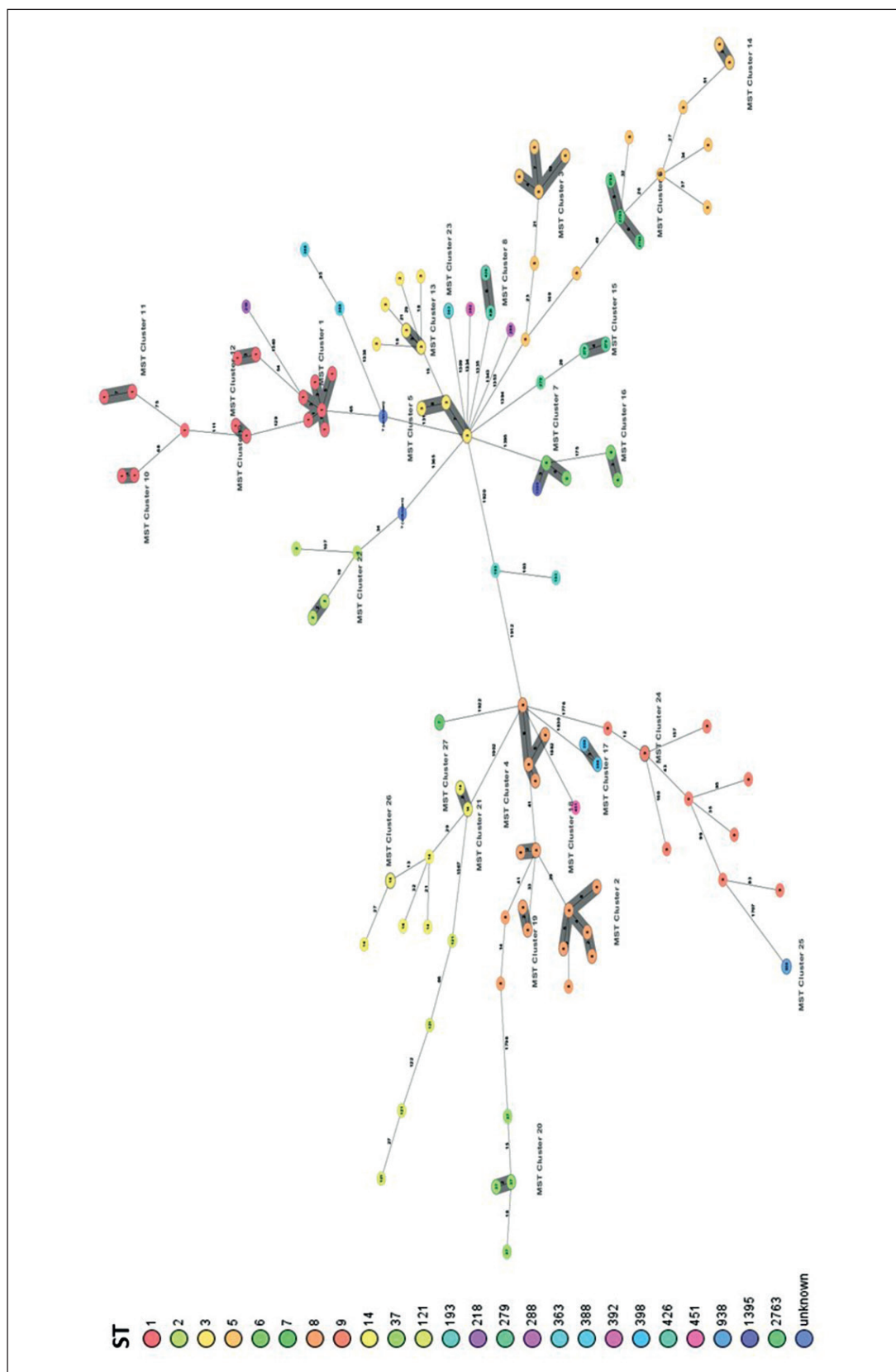


Figura 1. Árbol de expansión mínima (MST) de 116 cepas de *Listeria monocytogenes* aisladas de alimentos y superficies de producción. Los clusters se determinaron base al esquema cgMLST que comprende 1.701 genes diana para *L. monocytogenes*. Los aislados se representan como círculos de colores según la secuencia tipo (ST) clásico y los números negros indican las diferencias alelicas entre ellos.

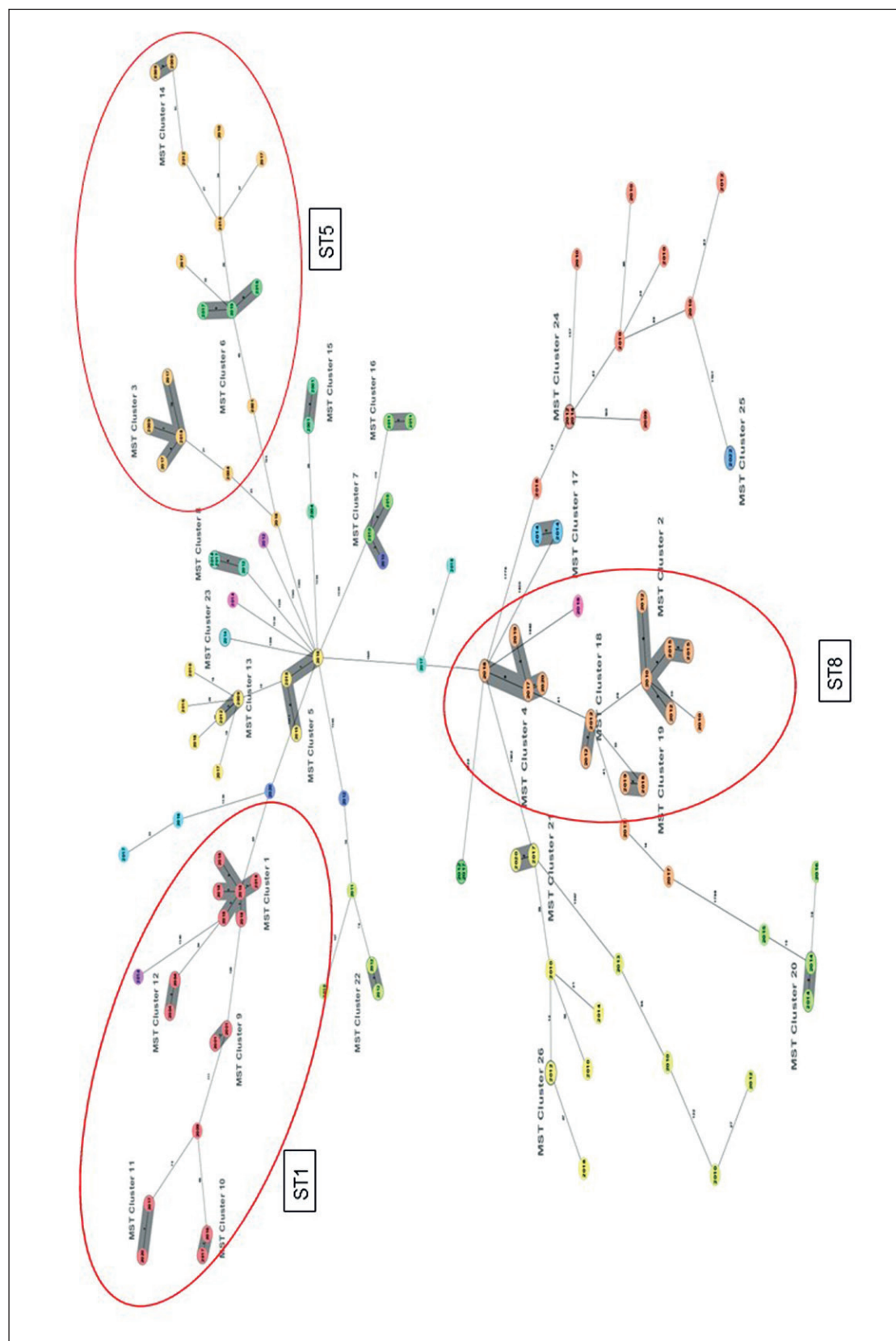


Figura 2. Análisis de los clusters de cepas de *Listeria monocytogenes* por año de aislamiento. *L. monocytogenes* ST8, ST1 y ST5 son los grupos con mayor representación y se muestran con óvalos de color rojo.

Tabla 4. Persistencia de ST y CC de *Listeria monocytogenes* más frecuentes según año de aislamiento

Secuencia tipo y complejo clonal	Años de aislamiento
ST8 (CC8)	2010, 2012, 2015, 2017, 2018, 2019, 2020
ST1 (CC1)	2001, 2004, 2009, 2009, 2016, 2017, 2018, 2020
ST5 (CC5)	2001, 2004, 2009, 2010, 2012, 2017, 2018
ST9 (CC9)	2009, 2010, 2012, 2014, 2018

Discusión

Listeria monocytogenes es un microorganismo de importancia en salud pública mundial, responsable de 0,34 casos de listeriosis por cada 100.000 personas y una tasa de mortalidad de alrededor de 26%²¹. En Chile, la prevalencia es similar y se ha establecido que la principal fuente de contaminación por este microorganismo son los alimentos listos para el consumo²².

En nuestro estudio, se determinó que 46% de todas las cepas estudiadas fueron aisladas de alimentos pertenecientes a matrices de productos cárnicos, frutas y verduras. En cambio, los productos lácteos y los platos preparados representaron 8 y 5%, respectivamente. En contraste a nuestros resultados, Tirziu y cols., en el año 2022, reportaron una tasa de positividad de *L. monocytogenes* de 7,7% en 221 muestras analizadas, siendo los productos cárnicos, cárnicos listos para el consumo y lácteos los prevalentes, con tasas de 12,8 - 6,8 y 7,2 %, respectivamente²³. Daza-Prieto y cols., en el año 2024 encontraron una prevalencia de 0,7% en 22.593 muestras recolectadas en Montenegro entre 2014 y 2022. De estas muestras, 80% de los aislados de *L. monocytogenes* (n = 160) provenían de diversas carnes (cerdo, res, pollo y mezclas), 16% de productos lácteos (mozzarella, queso de vaca, mantequilla, leche fresca), y el resto de pescado listo para consumir, verduras congeladas, superficies en contacto con alimentos en plantas de producción y algunas de origen no determinado²⁴, siendo estos resultados de positividad mayor a nuestro estudio. En un brote extendido en Sudáfrica por *L. monocytogenes*, las prevalencias de positividad variaron entre muestras de carne importada (12,4%) y nacional (15,0%), siendo mayores en carne procesada (19,5%), seguidas de alimentos listos para el consumo (13,5%) y productos cárnicos en bruto o carne cruda (10,1%)²⁵.

En nuestra investigación, las cepas de *L. monocytogenes* provenientes de frutas y verduras representaron 20%. En Estados Unidos de América (E.U.A.), la contaminación por *L. monocytogenes* en ensaladas de frutas listas para consumo osciló entre 0,5 y 2,4%. En España, *L. monocytogenes* fue detectado en 0,7% de las ensaladas de frutas mínimamente procesadas²⁶. De manera similar, entre

los años 2000 y 2001, un estudio realizado en ensaladas de deli y de fruta en E.U.A. reportó una prevalencia de 2,4%²⁷. Por ello, la alta positividad de *L. monocytogenes* en nuestro estudio resalta la necesidad de un mejor control en la producción de frutas y verduras, alimentos muy consumidos en Chile.

Por otro lado, en las matrices alimentarias asociadas a leches y productos lácteos, solo se identificó *L. monocytogenes* en 8% de las cepas estudiadas. Esta situación difiere notablemente de la ocurrida en 2008, cuando se reportó un brote en Chile asociado a quesos Brie y Camembert¹¹. Sin embargo, estudios recientes muestran que el porcentaje de *L. monocytogenes* aisladas en productos lácteos es similar al porcentaje observado en el presente estudio²³. En Chile, en 2014 se reportó una prevalencia de 8,8% de *L. monocytogenes* en quesillos comerciales y artesanales vendidos en la ciudad de Chillán²⁸. Asimismo, Schöbitz y cols., en el año 2001 encontraron que en quesos elaborados con leche recolectada por pequeños agricultores en el sur de Chile no se detectó presencia de *L. monocytogenes*. En contraste, en quesos producidos en plantas industriales sí se observó una presencia significativa de este patógeno, tanto en la leche como en el producto final²⁹. Por ello, la presencia de *L. monocytogenes* en alimentos listos para el consumo representa un riesgo constante de enfermedad en grupos poblacionales susceptibles como niños, mujeres embarazadas y adultos mayores.

Al analizar los serotipos predominantes en este estudio, destaca que 62% de las cepas de este patógeno pertenecían a los grupos IIa y IIb, siendo el serotipo 4b el más frecuente (26%). Estos datos coinciden con otros estudios realizados en Europa, China e India, donde se ha reportado que el serogrupo más común es el IIa^{24,30,31}. En Chile, los serotipos 1/2a, 1/2b y 4b han sido los más frecuentemente detectados en alimentos y en casos clínicos de listeriosis³². Esto es similar a un estudio realizado en Inglaterra sobre vegetales congelados, donde se identificó el serotipo 1/2a como el prevalente entre los aislados de *L. monocytogenes*, seguido por los serotipos 1/2b y 4b³³. En este contexto, los serotipos 1/2b y 4b se asocian con mayor frecuencia a la listeriosis en humanos, mientras que el serotipo 1/2a se detecta de forma más regular en alimentos y en entornos de procesamiento alimentario³⁴.

Al utilizar el esquema clásico de MLST, las cepas fueron identificadas como *L. monocytogenes* con las secuencias tipo ST8, ST1, ST5 y ST9, los que representan casi 50% de los genomas analizados en nuestro estudio. En Austria, se detectó *L. monocytogenes* ST5 en alimentos como quesos, con una prevalencia de 92,4%. En China, se encontró *L. monocytogenes* ST5 en productos cárnicos listos para el consumo con una prevalencia de 95,2%. Asimismo, también en ese país, se identificó *L. monocytogenes* ST9 en alimentos listos para el consumo, leche pasteurizada y carne de cerdo cruda, con prevalencias de 12,5 y 35,9%, respectivamente³⁵. Además, otros autores han reportado una prevalencia de *L. monocytogenes* ST3 de 16% en carne de cerdo³⁶. Considerando que en nuestro estudio se detectaron *L. monocytogenes* ST5 y ST9, y que estos genotipos han sido asociados a casos clínicos en diferentes partes del mundo, resulta evidente que la presencia de *L. monocytogenes* ST9 (CC9) en cepas chilenas representa un riesgo persistente, especialmente porque este genotipo fue vinculado al brote de listeriosis más grande registrado en Chile en el año 2008, con 119 contagios y de los cuales el clon 009 fue identificado en 78 cepas estudiadas³⁷.

En nuestro estudio se identificaron en *L. monocytogenes* los complejos clonales CC8, CC1, CC5 y CC9, los que han sido documentados en diversas investigaciones como clones hipervirulentos y asociados a casos clínicos de listeriosis^{38,39}. En un contexto internacional, el complejo clonal CC1 es el prevalente y muestra mayor persistencia en diferentes líneas relacionadas con el procesamiento de alimentos⁴⁰. En la presente investigación, *L. monocytogenes* CC1 se posicionó como uno de los complejos predominantes, con una diferencia de solo un punto porcentual (13%) respecto al complejo clonal más frecuente, el CC8 (14%). Además, los complejos CC8 y CC9, también entre los más abundantes en este estudio, se han asociado con brotes epidémicos de listeriosis. La literatura científica señala que estos complejos son mayormente aislados de productos cárnicos⁴¹, situación que se refleja en nuestros hallazgos, dado que las principales matrices alimentarias de las 116 cepas aisladas corresponden al grupo 10 según la categorización del RSA.

La presencia de los genes de resistencia antimicrobiana *vggA* y *fosX* en casi 100% de las cepas analizadas es un hallazgo de considerable relevancia, ya que estos genes confieren resistencia a lincosamidas y a fosfomicina, respectivamente. Diversos estudios han vinculado la existencia de estos genes con la persistencia de *L. monocytogenes* en diversos entornos de procesamiento de alimentos. Esto se atribuye a que, además de brindar resistencia a agentes antimicrobianos, facilitan la resistencia cruzada a desinfectantes y antisépticos, promoviendo la formación de biopelículas y aumentando la capacidad de supervivencia y diseminación de la bacteria⁴².

Además, se identificaron genes de resistencia a desinfectantes, entre los cuales destacan sistemas de bombas de flujo como el asociado al cassette *bcrABC*. Aunque solo 16% de las cepas analizadas en este estudio portaba este gen, su presencia constituye un indicador de persistencia. Diversos estudios han reportado que, al conferir resistencia a biocidas, *L. monocytogenes* puede adaptarse y mantener su presencia en diferentes alimentos y en entornos de procesamiento, facilitando su supervivencia en el tiempo⁴³.

En el análisis de los genes de virulencia en el presente estudio, se observó que en casi 100% de las cepas se detectaron los genes *inlA*, *inlB* y *prfA*, los que constituyen herramientas fundamentales para la patogenicidad de *L. monocytogenes*. La alta frecuencia de estos genes también ha sido reportada en otros estudios realizados en Europa y en Chile⁴⁴. Los genes de internalinas (*inlA*, *inlB* e *inlP*) están implicados en la invasión placentaria y en la penetración de células trofoblásticas, lo que resulta especialmente preocupante debido a su asociación con complicaciones durante el embarazo. La presencia de estos genes está vinculada a la potencial ocurrencia de muerte fetal, aborto espontáneo, parto prematuro y diseminación de infección fetal, con una mortalidad fetal y neonatal que puede alcanzarse en torno a 20-60%. La infección puede producirse en cualquier etapa del embarazo, aunque es más frecuente detectarla en el tercer trimestre⁴⁵.

La evaluación de la persistencia temporal de *L. monocytogenes* se considera un indicador crítico para identificar los complejos clonales (CC) de mayor prevalencia en matrices alimentarias, facilitando la detección de fuentes de contaminación y la implementación de medidas de control específicas. Estudios realizados en entornos industriales de procesamiento de alimentos demuestran que la monitorización de la persistencia mediante cgMLST permite caracterizar la recurrencia de cepas específicas, contribuyendo a estrategias de control y mitigación⁴⁶. En esta investigación, se evidenció la persistencia de *L. monocytogenes* ST8 (CC8), ST1 (CC1), ST5 (CC5) y en menor medida ST9 (CC9) en diversas matrices durante los últimos 20 años, mediante análisis genómico comparativo. La literatura científica sostiene que la línea clonal CC8 se configura como una de las más persistentes en plantas de procesamiento de productos refrigerados listos para el consumo, representando un riesgo continuo de recontaminación y brotes⁴⁷. En Brasil, se documentó la persistencia de *L. monocytogenes* ST9 durante nueve años consecutivos, mientras que, en Austria, *L. monocytogenes* ST5 se identificó en quesos en un período comprendido entre 2001 y 2010^{48,49}. En Noruega, entre 2016 y 2020 se aislaron clones de *L. monocytogenes* ST1 (CC1), ST8 (CC8) y ST9 (CC9) en muestras clínicas y alimentarias, evidenciando su continuidad en diferentes contextos epidemiológicos y ambientales⁵⁰.

La evidencia generada en este estudio confirma la persistencia interanual de cepas de *L. monocytogenes*, lo cual contribuye a mantener la presencia del patógeno en diferentes matrices, sustentando la continuidad del riesgo sanitario. Esto prioriza la necesidad de enfoques preventivos integrales que optimicen la seguridad alimentaria y reduzcan la carga de enfermedad en la población⁵¹.

Entre las limitaciones metodológicas del estudio, cabe señalar que la base de datos de Pasteur analizada carecía de registros completos sobre las matrices alimentarias de las cuales fueron aisladas las cepas, así como de datos geográficos precisos de las localidades de origen. La incorporación de esta información geoespacial facilitaría la realización de análisis de distribución y concentración de complejos clonales, permitiendo identificar focos de persistencia y focalizar intervenciones de control más eficaces en salud pública. Por

ello, el uso de WGS, así como la completa información epidemiológica en Chile es indispensable para medidas racionales de vigilancia.

Conclusiones

Este estudio evidencia la persistencia prolongada de *L. monocytogenes* en ambientes alimentarios, asociada a factores genéticos que favorecen su resistencia y virulencia. La caracterización genómica resalta el valor de la vigilancia molecular como herramienta para anticipar riesgos y mejorar las estrategias de control en la cadena alimentaria. Fortalecer la implementación de tecnologías como la WGS, incluso mediante colaboraciones con instituciones académicas, es esencial para una respuesta oportuna y eficaz frente a esta amenaza persistente para la salud pública.

Referencias bibliográficas

- Horeh M.B, Elbakidze L, Sant'Anna A.C. Foodborne illnesses and product liability in the US. *Agricultura and Resource Economic Review* 2023; 52:1-42. doi: 10.1017/age.2022.25.
- Letchumanan V, Wong P.C, Goh B.H, Ming L.C, Pus-parajah P, Wong S.H, et al. A review on the characteristics, taxonomy and prevalence of *Listeria monocytogenes*. *Prog Microbes Mol Biol* 2018;1:a0000007. doi: https://doi.org/10.36877/pmm.b.a0000007.
- Chowdhury B, Anand S. Environmental persistence of *Listeria monocytogenes* and its implications in dairy processing plants. *Compr Rev Food Sci Food Saf* 2023; 22: 4573-99. doi: 10.1111/1541-4337.13234.
- EFSA Panel on Biological Hazards (BIOHAZ), Koutsoumanis K., Alvarez-Ordóñez A, Bolton D, Bover-Cid S, Chemaly M, Davies R, et al. The public health risk posed by *Listeria monocytogenes* in frozen fruit and vegetables including herbs, blanched during processing. *EFSA Journal*. 2020; 18(4): e06092. doi: https://doi.org/10.2903/j.efsa.2020.6092
- Kurpas M, Wiecek K, Osek J. Ready-to-eat meat products as a source of *Listeria monocytogenes*. *J Vet Res* 2018; 62: 49-55. doi: 10.1515/jvetres-2018-0007.
- Ryser E. Chapter 11. *Listeria* in the Foodborne Infections and Intoxications, eds. G. Morris., D. Vugia (Amsterdam, Academic Press, Fifth Edition). 2021. p. 201-220. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-819519-2.00028-1
- Halbedel S, Wilking H, Holzer A, Kleta S, Fischer M.A, Lüth S, et al. Large nationwide outbreak of invasive listeriosis associated with blood sausage, Germany, 2018-2019. *Emerg Infect Dis* 2020; 26: 1456-64. doi: 10.3201/eid2607.200225
- World Health Organization. *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat (RTE) foods: attribution, characterization and monitoring-meeting report; microbiological risk assessment series No. 38; Food and Agriculture Organization of the United Nations: Rome, Italy, 2022. p. 1-184. https://doi.org/10.4060/cc2400en.
- Bergholz TM, Shah MK, Burall LS, Rakic-Martinez M, Datta AR. Genomic and phenotypic diversity of *Listeria monocytogenes* clonal complexes associated with human listeriosis. *Appl Microbiol Biotechnol* 2018; 102: 3475-85. doi: 10.1007/s00253-018-8852-5
- Montero D, Boderio M, Riveros G, Lapierre L, Gaggero A, Vidal RM, et al. Molecular epidemiology and genetic diversity of *Listeria monocytogenes* isolates from a wide variety of ready-to-eat foods and their relationship to clinical strains from listeriosis outbreaks in Chile. *Front Microbiol* 2015; 6: 384. doi: 10.3389/fmicb.2015.00384.
- Paduro C, Montero D.A, Chamorro N, Carreño L.J, Vidal M, Vidal R. Ten years of molecular epidemiology surveillance of *Listeria monocytogenes* in Chile 2008-2017. *Food Microbiol* 2020; 85: 103280. doi: 10.1016/j.fm.2019.103280.
- Leopold S.R, Goering R.V, Witten A, Harmsen D, Mellmann A. Bacterial whole-genome sequencing revisited: portable, scalable, and standardized analysis for typing and detection of virulence and antibiotic resistance genes. *J Clin Microbiol* 2014; 52(7): 2365-70. doi: 10.1128/JCM.00262-14.
- Hurley D, Luque-Sastre L, Parker C.T, Huynh S, Eshwar A.K, Nguyen S.V, et al. Whole-genome sequencing-based characterization of 100 *Listeria monocytogenes* isolates collected from food processing environments over a four-year period. *mSphere* 2019; 4: e00252-19. doi: 10.1128/mSphere.00252-19.
- Moura A, Criscuolo A, Pouseele H, Maury M.M, Leclercq A, Tarr C, et al. Whole genome-based population biology and epidemiological surveillance of *Listeria monocytogenes*. *Nat Microbiol* 2016; 2:16185. doi: 10.1038/nmicrobiol.2016.185.
- Hyden P, Pietzka A, Lennkh A, Murer A, Springer B, Blaschitz M, et al. Whole genome sequence-based serogrouping of *Listeria monocytogenes* isolates. *J Biotechnol* 2016; 235: 181-6. doi: 10.1016/j.jbiotec.2016.06.005.
- Salcedo C, Arreaza L, Alcalá B, de la Fuente L, Vázquez J.A. Development of a multilocus sequence typing method for analysis of *Listeria monocytogenes* clones. *J Clin Microbiol* 2003; 41(2): 757-62. doi: 10.1128/JCM.41.2.757-762.2003.
- Ruppitsch W, Pietzka A, Prior K, Bletz S, Fernandez H.L, Allerberger F, et al. Defining and evaluating a core genome multilocus sequence typing scheme for whole-genome sequence-based typing of *Listeria monocytogenes*. *J Clin Microbiol*. 2015; 53(9): 2869-76. doi: 10.1128/JCM.01193-15.
- Liu B, Zheng D, Zhou S, Chen L, Yang J. VFDB 2022: a general classification scheme for bacterial virulence factors. *Nucleic Acids Res*

- 2022; 50(D1): D912-D917. doi: 10.1093/nar/gkab1107.
19. Alcock B.P, Raphenya A.R, Lau T.T, Tsang K.K, Bouchard M, Edalatmand A, et al. CARD 2020: antibiotic resistance surveillance with the comprehensive antibiotic resistance database. *Nucleic Acids Res* 2020; 48(D1): D517-D525. doi: 10.1093/nar/gkz935.
 20. Feldgarden M, Brover V, Gonzalez-Escalona N, Frye JG, Haendiges J, Haft DH, et al. AMRFinderPlus and the reference gene catalog facilitate examination of the genomic links among antimicrobial resistance, stress response, and virulence. *Sci Rep* 2021; 11(1): 12728. doi: 10.1038/s41598-021-91456-0.
 21. Liu Y.Y, Chen C.C, Yang C.H, Hsieh H.Y, He JX, Lin H.H, et al. LmTraceMap: A *Listeria monocytogenes* fast-tracing platform for global surveillance. *PLoS One* 2022; 17(5): e0267972. doi: 10.1371/journal.pone.0267972.
 22. Bustamante F, Maury-Sintjago E, Leal FC, Acuña S, Aguirre J, Troncoso M, et al. Presence of *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat artisanal Chilean foods. *Microorganisms* 2020; 8(11):1669. doi: 10.3390/foods14020290.
 23. Tirziu E, Herman V, Nichita I, Morar A, Imre M, Ban-Cucerzan A, et al. Diversity and antibiotic resistance profiles of *Listeria monocytogenes* serogroups in different food products from the Transylvania Region of Central Romania. *J Food Prot* 2022; 85(1):54-9. doi: 10.4315/JFP-21-172
 24. Daza Prieto B, Pietzka A, Martinovic A, Ruppitsch W, Zuber Bogdanovic I. Surveillance and genetic characterization of *Listeria monocytogenes* in the food chain in Montenegro during the period 2014-2022. *Front Microbiol* 2024; 15: 1418333. doi: 10.3389/fmicb.2024
 25. Matle I, Mbatha K.R, Madoroba E. A review of *Listeria monocytogenes* from meat and meat products: epidemiology, virulence factors, antimicrobial resistance and diagnosis. *Onderstepoort J Vet Res* 2020; 87(1): e1-e20. doi: 10.4102/ojvr.v87i1.1869.
 26. Abadias M, Usall J, Anguera M, Solsona C, Viñas I. Microbiological quality of fresh, minimally-processed fruit and vegetables, and sprouts from retail establishments. *Int J Food Microbiol* 2008; 123(1-2): 121-9. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2007.12.013.
 27. Gombas D.E, Chen Y, Clavero RS, Scott V.N. Survey of *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat foods. *J Food Prot* 2003; 66(4): 559-69. doi: 10.4315/0362-028x-66.4.559.
 28. Costa M, Retamal R, Rodríguez A, Chavarria P, Parra J, Contreras A, et al. Inocuidad microbiológica de quesillos comerciales y artesanales expendidos en Chillán. *Rev Chil Nutr* 2016; 43(2): 172-9. doi: http://dx.doi.org/10.4067/S0717-75182016000200010
 29. Schöbitz R, Marin M, Horzella M, Carrasco E. Presencia de *Listeria monocytogenes* en leche cruda y quesos frescos artesanales. *Agro sur*. 2001; 29(2):114-9. doi: https://doi.org/10.4206/agrosur.2001.v29n2-04
 30. Shen J, Zhang G, Yang J, Zhao L, Jiang Y, Guo D, et al. Prevalence, antibiotic resistance, and molecular epidemiology of *Listeria monocytogenes* isolated from imported foods in China during 2018 to 2020. *Int J Food Microbiol* 2022; 382:109916. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2022.109916.
 31. Swetha C.S, Porteen K, Elango A, Ronald B.S, Senthil Kumar T.M, Milton A.P, et al. Genetic diversity, virulence and distribution of antimicrobial resistance among *Listeria monocytogenes* isolated from milk, beef, and bovine farm environment. *Iran J Vet Res* 2021; 22(1): 1-8. doi: 10.22099/ijvr.2020.37618.5472.
 32. Toledo V, den Bakker H.C, Hormazábal J.C, González-Rocha G, Bello-Toledo H, Toro M, et al. Genomic diversity of *Listeria monocytogenes* isolated from clinical and non-clinical samples in Chile. *Genes* 2018; 9(8): 396. doi: 10.3390/genes9080396.
 33. Willis C, McLauchlin J, Aird H, Amar C, Barker C, Dallman T, et al. Occurrence of *Listeria* and *Escherichia coli* in frozen fruit and vegetables collected from retail and catering premises in England 2018-2019. *Int J Food Microbiol* 2020; 334: 108849. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2020.108849.
 34. Tricoli M.R, Massaro C, Arrigo I, Diquattro O, Di Bernardo F, Galia E, et al. Characterization of *Listeria monocytogenes* strains isolated in Palermo (Sicily and Italy) during the years 2018-2020 from severe cases of listeriosis. *Antibiotics* 2024; 13(1): 57. doi: 10.3390/antibiotics13010057.
 35. Chen Y, Chen M, Wang J, Wu Q, Cheng J, Zhang J, et al. Heterogeneity, characteristics, and public health implications of *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat foods and pasteurized milk in China. *Front Microbiol* 2020; 11: 642. doi: 10.3389/fmicb.2020.00642
 36. Luo L, Zhang Z, Wang H, Wang P, Lan R, Deng J, et al. A 12-month longitudinal study of *Listeria monocytogenes* contamination and persistence in pork retail markets in China. *Food Control*. 2017; 76: 66-73. https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2016.12.037
 37. Ministerio de Salud de Chile. Instituto de Salud Pública. Vigilancia de Laboratorio de *Listeria monocytogenes* procedente de enfermedad invasora. Chile, 2006-2018. https://www.ispch.cl/sites/default/files/BoletinListeria-17062019B%20(1).pdf
 38. Amarasekara N.R, Swamy A.S, Paudel S.K, Jiang W, Li K, Shen C, et al. Hypervirulent clonal complex (CC) of *Listeria monocytogenes* in fresh produce from urban communities. *Front Microbiol* 2024; 15: 1307610. doi: 10.3389/fmicb.2024.1307610.
 39. Fotopoulou E.T, Jenkins C, Barker C.R, Painset A, Didelot X, Simbo A, et al. Genomic epidemiology of the clinically dominant clonal complex 1 in the *Listeria monocytogenes* population in the UK. *Microb Genom* 2024; 10(1):001155. doi: 10.1099/mgen.0.001155.
 40. Moura A, Lefrancq N, Wirth T, Leclercq A, Borges V, Gilpin B, et al. Emergence and global spread of *Listeria monocytogenes* main clinical clonal complex. *Sci Adv* 2021; 7(49): eabj9805. doi: 10.1126/sciadv.abj9805.
 41. Wang Y, Ji Q, Li S, Liu M. Prevalence and genetic diversity of *Listeria monocytogenes* isolated from retail pork in Wuhan, China. *Front Microbiol* 2021; 12: 620482. doi: 10.3389/fmicb.2021.620482.
 42. Silva A, Silva V, Gomes J.P, Coelho A, Batista R, Saraiva C, et al. *Listeria monocytogenes* from food products and food associated environments: antimicrobial resistance, genetic clustering and biofilm insights. *Antibiotics* 2024; 13(5): 447. doi: https://doi.org/10.3390/antibiotics13050447.
 43. Unrath N, McCabe E, Macori G, Fanning S. Application of whole genome sequencing to aid in deciphering the persistence potential of *Listeria monocytogenes* in food production environments. *Microorganisms* 2021; 9(9): 1856. doi: 10.3390/microorganisms9091856.
 44. Wiśniewski P, Zakrzewski AJ, Zadernowska A, Chajęcka-Wierzchowska W. Antimicrobial resistance and virulence characterization of *Listeria monocytogenes* strains isolated from food and food processing environments. *Pathogens* 2022; 11(10): 1099. doi: 10.3390/pathogens11101099.
 45. Parra-Flores J, Daza-Prieto B, Chavarria P, Troncoso M, Stöger A, Figueroa G, et al. From traditional typing to genomic precision: whole-genome sequencing of *Listeria monocytogenes* isolated from refrigerated foods in Chile. *Foods* 2025; 14(2): 290. doi: 10.3390/foods14020290.
 46. Bardsley C.A, Orsi R.H, Clark S, Murphy C.M, McEntire J.C, Wiedmann M, et al. Role of whole genome sequencing in assessing resident and transient *Listeria monocytogenes* in a produce packinghouse. *J Food Prot* 2024; 87(1): 100201. doi: 10.1016/j.jfp.2023.100201.
 47. Knudsen G.M, Nielsen J.B, Marvig R.L, Ng Y, Worning P, Westh H, et al. Genome-wide analyses of *Listeria monocytogenes* from food-processing plants reveal clonal diversity and date the emergence of persisting sequence types. *Environ Microbiol Rep* 2017; 9(4): 428-40. doi: 10.1111/1758-2229.12552.
 48. Camargo A.C, Moura A, Avillan J, Herman N, McFarland AP, Sreevatsan S, et al. Whole-genome sequencing reveals *Listeria monocytogenes* diversity and allows identification of long-term persistent strains in Brazil. *Environ Microbiol* 2019; 21(12):4478-4487. doi: 10.1111/1462-2920.14726.

49. Muhterem-Uyar M, Ciolacu L, Wagner KH, Wagner M, Schmitz-Esser S, Stessl B. New aspects on *Listeria monocytogenes* ST5-ECVI predominance in a heavily contaminated cheese processing environment. *Front Microbiol* 2018; 9:64. doi: 10.3389/fmicb.2018.00064.
50. Fagerlund A, Idland L, Heir E, Møretø T, Aspholm M, Lindbäck T, et al. Whole-genome sequencing analysis of *Listeria monocytogenes* from rural, urban, and farm environments in Norway: genetic diversity, persistence, and relation to clinical and food isolates. *Appl Environ Microbiol* 2022; 88(6): e0213621. doi: 10.1128/aem.02136-21.
51. Lakicevic B, Jankovic V, Pietzka A, Ruppitsch W. Whole genome sequencing as the gold standard approach for control of *Listeria monocytogenes* in the food chain. *J Food Prot* 2023; 86(1):100003. doi: 10.1016/j.jfp.2022.10.002.