Detección de *Listeria monocytogenes* en alimentos

Teresa Aymerich

IRTA. Industrias Agroalimentarias
Seguridad Alimentaria

Alimentaria, 26 marzo 2010
Barcelona

Número de casos asociados a enfermedades de origen zoonótico en la Unión Europea (2008)

190.566 casos *Campylobacter* (carne fresca de pollo)
131.468 casos *Salmonella* (huevos, carne pollo y cerdo)

8.346 casos *Yersinia enterocolitica* (carne de cerdo y derivados)

3.159 casos *Escherichia coli* VTEC (carne vaca y ternera)

1.381 casos *Listeria monocytogenes* (productos RTE pescado y carne)
619 casos *Brucella mellitensis*

670 casos *Triquinella* y 891 *Echinococcus*

EFSA 2010

Prevalencia de *L. monocytogenes* en diferentes productos en EU 2008

Programa de vigilancia de las zoonosis por aplicación del Real Decreto 1940/2004 (Directiva 2003/99/CE).

Listeria monocytogenes (%)

	Productos cárnicos y RTE
Ave	1,6 (0,1%)
Cerdo	1,9 (0,3%)
Ternera	2,6 (0,4%)

Pescado ahumado/ marinado	9,8 (0,5)
Ensaladas	6,3 (<0,1)
Sandwiches	3,2 (0,2)
Quesos (oveja/cabra)	2,5
Marisco y otros pesca	2,7 (0)

BFP y APPCC
Tratamientos

Fuentes contaminación
Materia prima
Superficies industriales
Potencial crecimiento alimento

Ubicua en alimentos

L. monocytogenes

1.381 casos/Europa 2008 (20,5% mortalidad)
1 brote epidémico EU 2008 (Austria, servicio catering)

EFSA (2010)

Explotadores de las empresas e inocuidad de los alimentos.

- Los operadores de empresas alimentarias tienen la obligación de asegurar la inocuidad del producto desde su producción hasta el consumidor mediante la aplicación de un sistema de autocontrol preventivo basado en el análisis de peligros y puntos críticos de control (APPCC) junto con la aplicación de prácticas higiénicas correctas (CE 852/2004 art.1).

- Los explotadores de las empresas alimentarias deben cumplir los criterios microbiológicos (CE 852/2004 art. 4). Ello implica efectuar pruebas para comparar con los valores establecidos para los criterios, mediante la toma de muestras, la realización de análisis y la aplicación de acciones correctoras, de conformidad con la legislación alimentaria y las instrucciones de la autoridad competente

- Los resultados de las pruebas dependen de los métodos analíticos utilizados y, por lo tanto, cada criterio microbiológico debe asociarse a un método de referencia determinado (CE 2073/2005 art. 5)

- No obstante, conviene que los explotadores de empresas alimentarias puedan usar métodos analíticos diferentes de los métodos de referencia, en particular métodos más rápidos, siempre que estos métodos alternativos produzcan resultados equivalentes (CE 2073/2005 art 5).

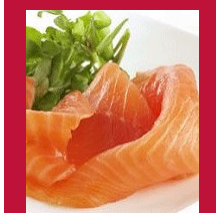
Criterios microbiológicos para *L. monocytogenes* Reglamento CE 2073/2005

Alimentos listos para el consumo destinados a los lactantes y para usos médicos especiales (*)

Antes que el alimento haya dejado el control inmediato del explotador de la empresa o durante la vida útil

(n=10 c=0)

Ausencia 25 g/ml



Alimentos listos para el consumo que pueden favorecer el desarrollo de *L. monocytogenes*, que no sean los destinados a los lactantes ni para usos médicos especiales

Antes que el alimento haya dejado el control inmediato del explotador de la empresa

(n=5 c=0)

En productos comercializados durante su vida útil

≤100 CFU/g

Alimentos listos para el consumo que no pueden favorecer el desarrollo de *L.monocytogenes*, que no sean los destinados a los lactantes ni para usos médicos especiales (*)

En productos comercializados durante su vida útil

(n=5 c=0)

Métodos de referencia para la detección y cuantificación de *L.monocytogenes*

ISO 11290-1/A1-2004

- Detección

Ausencia /25g

ISO 11290-2/A1-2004

- Cuantificación

100 UFC/g

Método de referencia para la detección de *L.monocytogenes* ISO 11290-1/A1-2004

Muestra

25 g/ml MUESTRA

Preenriquecimiento

225 ml CALDO ½ FRASER
30ºC 24h

Enriquecimiento selectivo

CALDO FRASER
35-37ºC 48 h

Detección

Siembra ALOA y OXFORD o PALCALM
37ºC 24-48 h

ALOA: L.monocytogenes i L. ivannovii

Confirmación

CONFIRMACIÓN:
Reacción de Catalasa +
TSYEB (Movilidad),Tinción de Gram +

L. monocytogenes

CONFIRMACIÓN:
Agar Sangre (βeta-Hemolisis)
Carbohidratos (Xilosa -, Ramnosa +)
CAMP (*S.aureus*+, *R.equi* -)

5-7 días

Método de referencia para la enumeración de *L.monocytogenes* ISO 11290-2/A1-2004

Muestra

25g/ml muestra en 225 ml APT o HF sin antibióticos 1h 20ºC

Enumeración

0,1 ml Ottaviani-Agosti Agar 24/48 h 37ºC

Colonias características turquesa-azul con halo opaco

L.mono y L. ivannovii

Confirmación

CONFIRMACIÓN:

Agar Sangre (Beta-Hemolisis) +
Carbohidratos (Xilosa -, Ramnosa +)
Ensayo Camp *(+ S.aureus,- R.equi)*

Listeria monocytogenes

4-5 días

Métodos cromogénicos para recuento o confirmación de colonia

	L. monocytogenes	*L.ivannovii*	*L.innocua*
Agar *Listeria* ALOA (AES Chemunex)	Colonia azul+halo	Colonia azul+halo	Colonia azul+ no halo
Chrom ID Ottaviani Agosti (Biomerieux)	Colonia azul+halo	Colonia azul+halo	Colonia azul+ no halo
Oxoid Cromogénico OCLA	Colonia azul+halo	Colonia azul+halo	Colonia azul+ no halo
CHROMagar *Listeria*	Colonia azul+halo	Colonia azul+halo	Colonia azul+ no halo
CHROMagar identificación *Listeria*	Colonia malva	Colonia blanca	N.A.
R&F *L. monocytogenes* (Biosynth)	Colonia azul	Colonia azul	Colonia blanca
R&F cromogénico *L. monocytogenes* confirmación (Biosynth)	Colonia fluorescente (366 nm)+halo amarillo	Colonia no fluorescente sin halo	N.A.
RAPID' *L. monocytogenes* (Bio-Rad)	Colonia azul sin halo	Colonia azul+ halo amarillo	Colonia blanca

ISO/TS 11133-1:2009 de preparación de medios de cultivo:

Métodos analíticos alternativos CE 2073/2005

- Se autorizará el uso de métodos analíticos alternativos cuando los métodos estén validados con respecto al método de referencia establecido y si se utiliza un método comercial patentado, deber estar certificado por terceros conforme al protocolo de la norma EN/ISO 16140 u otros protocolos similares internacionalmente aceptados.

- Se consideran aquellos métodos comerciales o no, patentados o no adaptados a los requerimientos de la producción industrial que sean:

- Más simples en ejecución y/o automatización
- Más rápidos en análisis y/o respuesta
- Analíticamente deben ser equivalentes al método tradicional, pero incluso pueden aportar un valor analítico añadido mejorando :
  - ✓ en especificidad, exactitud y sensibilidad (cualitativo)
  - ✓ en linealidad, exactitud y sesgo (cuantitativo)
- Miniaturización
- Reducción de coste en personal y/o tiempo

Aplicación métodos alternativos

Los métodos alternativos se están aplicando ya tanto en laboratorios de autocontrol como en laboratorios de control oficial de alimentos.

La rapidez del análisis incide de forma importante en la detección precoz de anomalías y facilita y acelera la toma de decisiones en temas tan importantes como:

- Gestión de los ciclos de producción.
- Gestión de stocks y reducción del inmovilizado

Beneficio en seguridad alimentaria y economía de empresa

Se han desarrollado diferentes tipos de métodos alternativos que bien pueden aplicarse para optimizar alguna de las fases:

- ✓ de detección y/o cuantificación
- ✓ y/o confirmación de resultados .

Los mayores desarrollos:

- ❑ Métodos cromogénicos en cuantificación.
- ❑ Variedad de protocolos y principios básicos en detección.(medios de cultivo diferenciales, métodos moleculares (hibridación y PCR), métodos inmunológicos)

Métodos alternativos validados para cuantificación/detección *L.monocytogenes*

Cuantificación

Detección

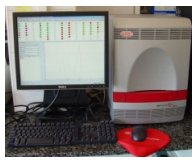
Medios de cultivo	Cromógenicos
Tests miniaturizados Manuales Automáticos	 API, Microgen *Listeria* ID Vitek, Biolog
Inmunoensayo Manuales Automáticos	 Oxoid Rapid test, Transia, Reveal, Tecra, kit Locate, Bioline, Rapidyme. *Tests rápidos para detección Listeria spp*. VIDAS®, Transia.
Tests genéticos automatizados PCR a tiempo Real Hibridación molecular	 BAX System, GeneDisc, IQ-Check, ADIAFOOD, Assurance GDS™ LumiProbe, Accuprobe, GeneQuence

Equipos comerciales validados y en formato listo para el uso

La introducción de estas metodologías en el Laboratorio dependerá de si el coste del equipo compensa la agilización de los ensayos.

¿Qué plataforma seleccionar?

Simplicidad
Nº de muestras
Coste
Rapidez
Conveniente
Servicio Técnico

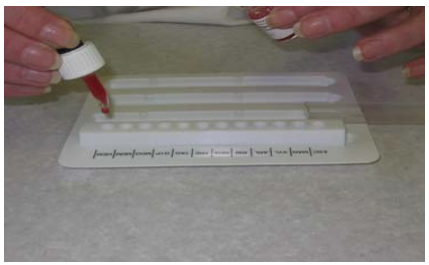


Test miniaturizados para confirmación de las colonias en agar Ottaviani-Agosti

Manuales

Rapidec® L.mono (AFNOR, Biomerieux)

API Listeria, Biomerieux



Microgen™ Listeria ID, con test para hemolisis (AOAC)

MiniAPI (Biomerieux)

Automáticos

VITEK
(Biomerieux)

Características y ventajas

Técnicas rápidas, sensibles y específicas para detección automatizada de *L. monocytogenes*

Técnica	Principio	Contaminación mínima inicial	Límite detección CFU/ml	Tiempo ejecución ensayo
ELFA	Ensayo inmunoenzimático tipo sandwich con detección fluorescente	2-3 cfu/muestra	10^4 CFU/ml	2 días
Hidridación ácidos nucleicos	Detección molecular colorimétrica ó luminométrica a nivel de rRNA, mediante un sistema de doble sonda	1 cfu/muestra	10^4-10^5 CFU/ml	1-2 días
PCR	Detección molecular fluorescente de ADN amplificado	1 cfu/muestra	10^2-10^4 CFU/ml	1-2 días

Procesado simultáneo de un gran nº de muestras después del enriquecimiento y/o para confirmación de colonias con reactivos listos para el empleo.

Detección inmunoenzimática fluorescente (ELFA) automatizada

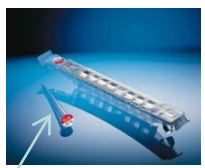
ELFA es una técnica ELISA en "sandwich", ligada a la immunoconcentración, de alta sensibilidad y especificidad para la detección de antígenos.

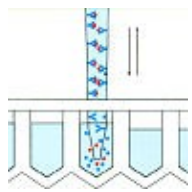
Minividas/Vidas (Biomerieux)

Un primer anticuerpo recubre el cono del tubo que actúa como pipeta y captura la diana

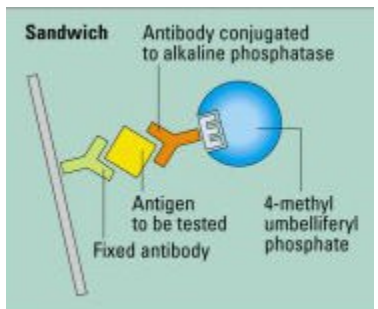
Un segundo anticuerpo conjugado con un enzima se fija al antígeno capturado.

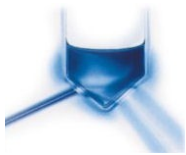
Detección: La actividad enzimática genera una sustancia fluorescente al catalizar el sustrato adecuado





Cartucho 10 pocilllos





370 nm 450 nm

Transia system (Biocontrol)

Sistema similar en formato microplaca

VIDAS/miniVIDAS *L.monocytogenes* (Biomerieux)

12/60 tests

Ensayo 50 h

25 g o ml de productos ó 1/10 superficies

VIDAS® LDUO

225 ml LX caldo
22-26 h 30ºC

0,1 ml 6 ml LX caldo
6-8 h

1-2 ml
Calentar 95-100ºC 5 min

Aplicar 500 µl

Resultados 127 min

DLMO - <0,05 DLMO – DLMO +
DLIS .- < 0,1 DLIS + >0,1 DLIS +

Confirmar DLIS Confirmar DLMO DLIS

VIDAS ® LMOII

225 ml ½ Fraser
24-26 h 30ºC

1ml en 9ml Fraser
24-26 h 37ºC

1-2 ml
Calentar 95-100ºC 5 min

Aplicar 500 µl

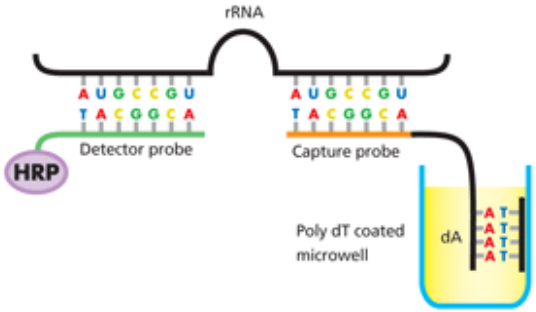
Resultados 70 min

DLMO - < 0,05
DLMO + >0,05

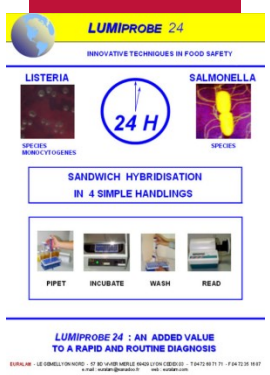
Confirmar DLMO

IRTA fitec tècnica

Aplicación de métodos de detección molecular mediante hidridación RNA-DNA para *L.monocytogenes*



Los diferentes sistemas disponibles en el mercado y validados por AOAC y/o AFNOR se basan en un sistema de hibridación de ácidos nucleicos de doble especificidad mediante una sonda de captura para rRNA y una sonda detectora y con reactivos listos para el empleo.



Ensayo	Detección	Certificación	Aplicación	Tiempo ensayo	Nº muestras
GeneQuence (Neogen Corp.)	Colorimétrica (450nm)	AOAC	Después enriquecimiento (48h)	1h50 min	93 muestras. Robotizado 450m/8h y 2-4 patógenos simultáneos
LumiProbe (EuroProbe)	Luminométrica	AFNOR	Después enriquecimiento específico (20h)	2h	Individual o placa 96. 1-200 tests/dia
AccuProbe (GeneProbe Inc, Biomerieux)	Luminométrica	AFNOR	A partir de colonias en agar Palcam y después enriquecimiento ½ HF 24-48 h	30 min	Individual o microplaca

PCR a tiempo real

La PCR en tiempo real detecta la fluorescencia emitida en cada ciclo de amplicación de manera que el equipo monitoriza la amplificación y detecta simultáneamente.

La reacción y la detección se realiza en tubo cerrado y en los sistemas comerciales con reactivos listos al empleo, evitando contaminaciones cruzadas y agilizando la obtención de resultados.

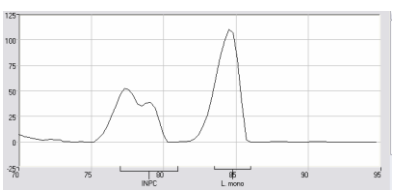
Los sistemas comerciales generan un resultado de positivo /negativo que no requiere personal especializado.

Gran precisión, exactitud y sensibilidad.

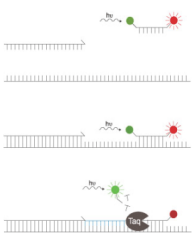
Reacciones en uniplex y multiplex (2-4 dianas) dependiendo del equipo.

Tiempo del ensayo: 40 min -3,30 h dependiendo del equipo y la tecnología utilizada

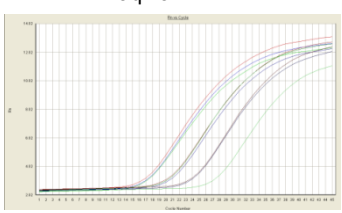
SYBRgreen



Sondas



TaqMan



Equipos y ensayos validados para detección de *L. monocytogenes* mediante PCR a tiempo real

Ensayo	Casa Comercial	Entidad certificadora	Matrices	Año
BAX®System with automated detection PCR assay for screening *Listeria monocytogenes*	DuPont Qualicon, Inc.	AOAC	Variedad de alimentos	2002
BAX®System Real.Time PCR assay for *Listeria monocytogenes 24E*	DuPont Qualicon, Inc	AOAC AFNOR	Espinacas, queso procesado, frankfurts, gambas cocidas, superficies acero inoxidable	2009
Roche/Biotecon Diagnostics LightCycler *Listeria monocytogenes* Detection Kit in combination with ShortPrep foodproof II kit	Roche Diagnostics GmbH BIOTECON Diagnostics GmbH	AOAC	Variedad de alimentos	2004
ADIAFOOD Rapid Pathogen Detection System for *Listeria monocytogenes*	AES Chemunex	AOAC	Variedad alimentos	2004
GeneDisc *cycler Listeria monocytogenes*	Gene Systems ®	AFNOR	Variedad alimentos	2004
Assurance GDS™ for *Listeria monocytogenes*	Biocontrol Systems, Inc.	AOAC		2007
IQ-Check *Listeria monocytogenes* II	Bio-Rad Laboratories	AOAC AFNOR	Salmón ahumado, queso, frankfurt, pavo/	2008

BAX®System with automated detection PCR assay for screening *L.monocytogenes* 24E

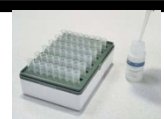
Enriquecimiento caldo LEB24
37ºC 24 h

10:00 Se crea la plantilla de los ensayos a realizar en el termociclador y se calienta el equipo.

10:05 Se diluye el agente de lisis 1:8 ml en agua estéril y se combina 4:1 con el agente lítico 2

10:10 Se transfieren 50 µl de los agentes líticos combinados a los tubos de lisis donde se añade 0,5 ml de muestra enriquecida y se incuba 30 m 37 C.

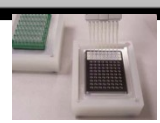
10:50 Se mezcla la proteasa con el tampón de lisis y se transfieren 200 µl de buffer de lisis a nuevos tubos de lisis



10:55 Se transfieren 5 µL del lisado celular (muestra) a los tubos con proteasa.

11:00 Se incuban 30 minutes at 55 C y 10 minutes a 95 C.

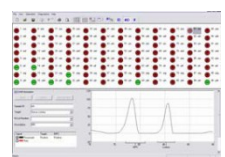
<u>Se enfria</u> 5 m en el bloque frio.



11:45 Se hidratan las tabletas de PCR en un segundo bloque frío con 30 µL de lisado frío.

11:50 Se cierran los tubos de PCR y se posicionan en el termociclador y se realiza la PCR

15:20 Se obtienen los resultados



IRTA fitec tècnica

Estudio de la incidencia de *L. monocytogenes* en industrias artesanales de embutidos mediante Rti-PCR (BAX system) y recuento de viables (ALOA).

10 pequeñas industrias de embutidos tradicionales
(5 por duplicado)

500 cm^2 superficie

Equipamiento:

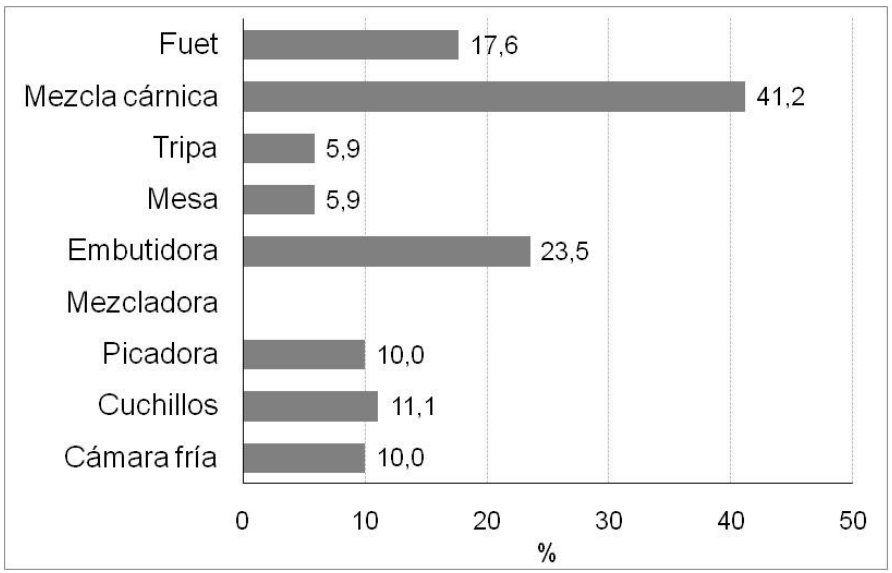
Mezcladora
Picadora
Embutidora
Cámara fría
Cuchillos
Mesas

25 g de producto

Productos/ materia Prima:

Mezcla cárnica inicial
Tripa Natural
Producto final (Fuet)

Presencia *L. monocytogenes* en industrias artesanales de embutidos



Nº muestras evaluadas:

Fuet, 17
Mezcla cárnica, 17
Tripa, 17
Mesa, 17
Embutidora, 17
Mezcladora, 10
Picadora, 10
Cuchillos, 9
Cámara fría, 10

Presencia en valores inferiores a 100 ufc/g

Otros equipos de PCR a tiempo real validados y disponibles con reactivos listos para el empleo

ADIAFOOD® (AES Chemunex).

Protocolo simple e análisis en tres pasos:

- ❑ Enriquecimiento en 18 h
- ❑ Extracción ADN :< 30 minutos en el mismo termociclador
- ❑ Amplicación y detección: 2 h 30 min

Rti-PCR de doble especificidad con cebadores y sonda.
Formato microplaca (88 muestras más controles) y tiras de 8.

Interpretación de resultados automático y redacción de informe

***IQ*-Check. Bio-Rad**

- ❑ Enriquecimiento HF 25h + TSB 3-5 h ó LSB 25 h.
- ❑ Lisis rápida
- ❑ Rti- PCR doble especificidad con cebadores y sonda

Confirmación de resultados mediante siembra 100µl en ALOA

ASSURANCE GDS Genetic Detection System (Biocontrol Systems Inc.)

Determinación *Listeria* y *L. monocytogenes* 24h

Preenriquecimiento

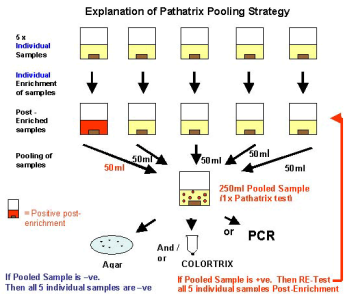
Inmnunoconcentración de 1 ml de la muestra mediante Ac asociados a partículas paramagnéticas

Pipeta Pickpen, con 8 imanes protegidos en puntas de silicona, atrapa las bolitas magnéticas que contienen las bacterias a estudio.

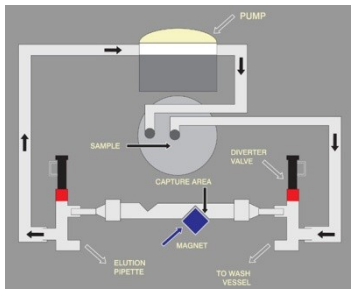
Extracción parcial ADN a partir 5 µl muestra concentrada.

- Termociclador a tiempo real: Rotor-Gene™ (termociclador centrifugo de 3 canales)
- PCR de doble especificidad mediante cebadores y sonda específica MGB.
- Ensayo PCR 2 h

Separación inmunomagnética recirculante (RIMS). Pathatrix *Listeria* species pooling test system

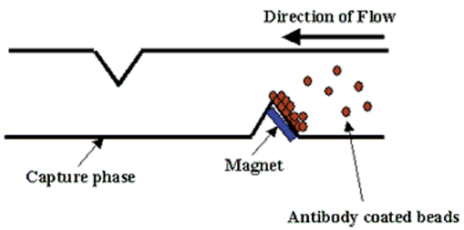


Matrix Microscience (AOAC validated)

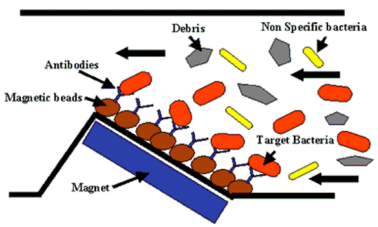


Esquema del area de captura

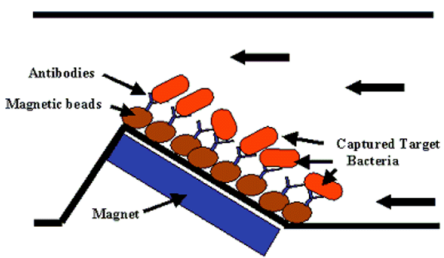
Unión anticuerpos al magneto



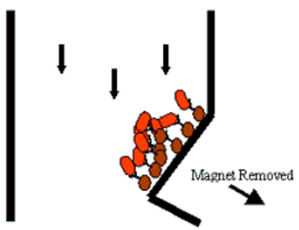
Recirculación caldo enriquecimiento



Lavado



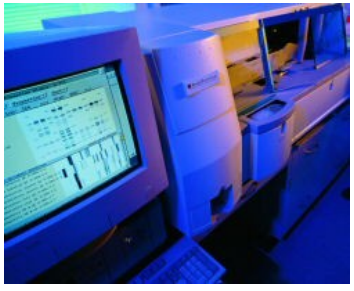
Liberación

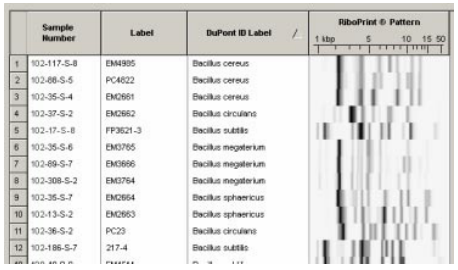


Tipificación molecular de cepas

Detección de las fuentes de contaminación y trazabilidad a nivel de cepa.
Mejora del control del proceso y del ambiente

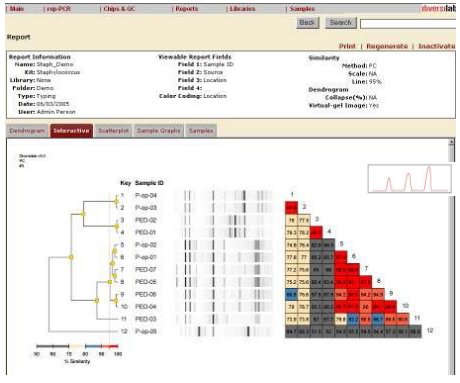
- Patrones de restricción de ARN ribosómico. Riboprinter® de DuPont Qualicon



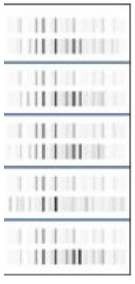


	Sample Number	Label	DuPont ID Label	RiboPrint ® Pattern (1 kbp, 5, 10, 15, 50)
1	102-117-S-8	EM4935	Bacillus cereus	
2	102-88-S-5	PC4622	Bacillus cereus	
3	102-35-S-4	EM2661	Bacillus cereus	
4	102-37-S-2	EM2662	Bacillus circulans	
5	102-17-S-8	FP3621-3	Bacillus subtilis	
6	102-35-S-6	EM3765	Bacillus megaterium	
7	102-89-S-7	EM3666	Bacillus megaterium	
8	102-308-S-2	EM3764	Bacillus megaterium	
9	102-35-S-7	EM2664	Bacillus sphaericus	
10	102-13-S-2	EM2663	Bacillus sphaericus	
11	102-36-S-2	PC23	Bacillus circulans	
12	102-186-S-7	217-4	Bacillus subtilis	

- Mediante Rep-PCR DNA Fingerprint . DiversiLab™ de Biomerieux



Top match



Scatterplot

IRTA
RECERCA I TECNOLOGIA AGROALIMENTÀRIES

"INVESTIGANT EL PRESENT APROPANT EL FUTUR"

WWW.IRTA.ES