



Métodos analíticos para investigación y recuento de *Listeria monocytogenes* en alimentos

Mar Carretero
Laboratorio Regional de Salud Pública

Il Jornadas formativas de Salud Pública CSIT. Madrid, 4 septiembre, de 2019



Dirección General de Salud Pública





Esquema

Papel de los Laboratorios de control oficial

Métodos analíticos implementados en el LRSP

3 Conclusiones









Responsabilidad de comercializar alimentos seguros
Asegurar que tienen todas las etapas bajo control.
Cumplir y verificar los requisitos establecidos en la Legislación.
Reglamento 2073/2005

Laboratorio Control Oficial

Identificar *Listeria m.*Recuento *Listeria m*Emitir resultados válidos

Programas de control oficial
Verificar cumplimiento
legislación R 2073/2005
Medidas en caso de brotes
Alertas
Retirada del producto
Sanciones





LABORATORIOS DE CONTROL OFICIAL







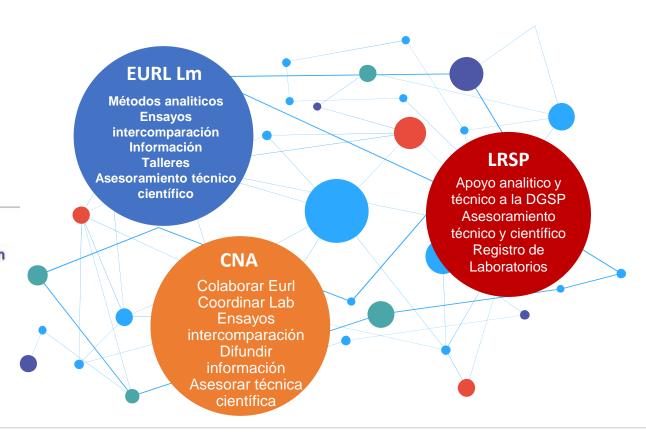




Centro Nacional Alimentacion



Laboratorio Regional de Salud Pública





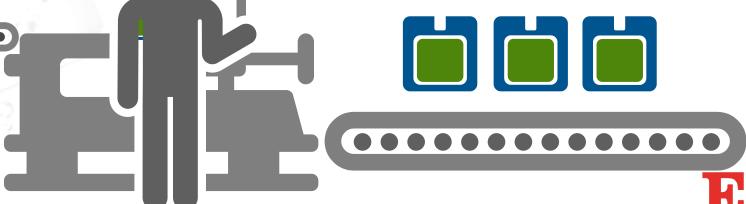
Laboratorios control oficial norma ISO 17025:2017

válidos. "Hacerlo bien"

Un sistema que asegure la imparcialidad la consistencia y fiabilidad "Una vez bien... siempre bien"

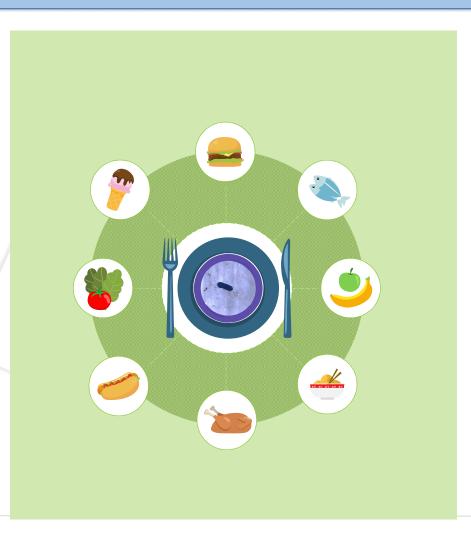
Capacidad de emitir resultados





Entidad Nacional de Acreditación





¿Cómo asegurar la validez de los resultados?

UNE-EN ISO 11290:2018 Microbiología de la cadena alimentaria. Método horizontal para la detección y el recuento de Listeria monocytogenes y de Listeria spp.

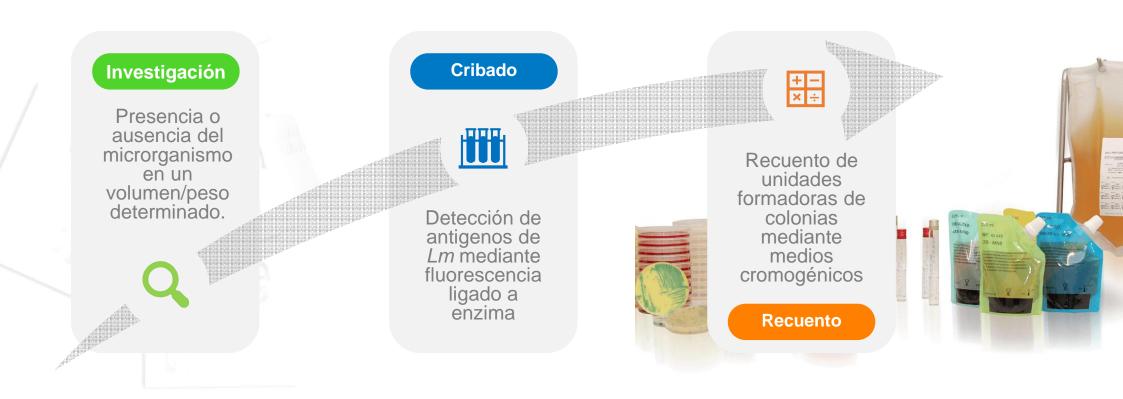
Parte 1: Método de detección.

Parte 2: Método de recuento.





Métodos análisis Lm Acreditados en el LRSP







Métodos análisis Lm Acreditados en el LRSP



Métodos análisis de Listeria monocytogenes en alimentos



Según la categoría del Reglamento 2073/2005 el tipo de alimento en cuanto pH y Aw y el lugar de muestreo el Técnico solicitara un perfil analítico para Ausencia en 25 g o recuento en g.



Categorías de alimentos	Plan d de mu	e toma estras	Límit	es	Método analítico	Fase en la que se				
3 3	n	С	m	М	de referencia	aplica el criterio				
1.1Alimentos listos para el consumo destinados a lactantes, y alimentos listos para el consumo destinados a usos médicos especiales (4)	10	0	Ausei 25 g	ncia en	EN/ISO 11290-1	Productos comercializados durante su vida útil				
1.2Alimentos listos para el	5	0	100 ufc/g(5	5)	EN/ISO 11290-2	Productos comercializados durante su vida útil				
consumo que puedan favorecer el desarrollo de Listeria monocytogenes	5	0	Ausei 25 (7)	ncia en	EN/ISO 11290-1	Antes de que haya dejado el control del explotador de la empresa que lo ha producido				
1.3Alimentos listos para el consumo que no puedan favorecer el desarrollo de Listeria monocytogenes(*4, 8)	5	0	100 u	fc/g	EN/ISO 11290-2	Productos comercializados durante su vida útil				



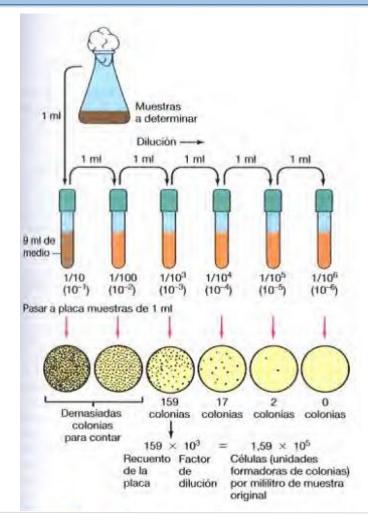






Preparación: pesar medir la cantidad de muestra a analizar preparar la dilución madre









Enriquecimiento primario medio selectivo liquido incubar 30±1°C durante 25±1horas

 Caldo Fraser semi es una modificación que contiene la mitad de acido nalidíxico y acriflavina para la recuperación de células estresadas. Es el medio en al metodología ISO para enriquecimiento primario. 1. Control 2. Listeria moncytogenes 3. E. coli 4. E. faecalis

Caldo Fraser contiene citrato de hierro amoniacal y cloruro de litio que se ennegrecen con el crecimiento de Listeria.



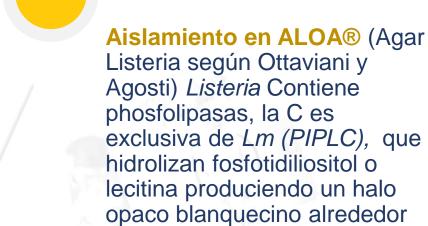


Enriquecimiento secundario

En Caldo Fraser incubación 0,1 ml del enriquecimiento primario en 10 ml de caldo a $37\pm1\,^{\circ}C$ durante 24 ± 2 horas y durante 48 ± 2 horas.







Aislamiento en Palcam

de la colonia.

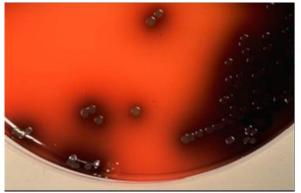
contiene esculina y citrato de hierro manitol y rojo fenol. *Lm* hidroliza la esculina formando un halo negro. El rojo fenol cambia de rojo a amarillo.



Una placa Enriquecimiento 1º (Palcam FS)
Una placa Enriquecimiento 2º 24 h
(Palcam F 24h)
Una Placa Enriquecimiento 2º 48h
(Palcam F 48h)

Una placa Enriquecimiento1º (ALOAFS)
Una placa Enriquecimiento 2º 24 h
(ALOA F 24h)
Una Placa Enriquecimiento 2º 48h
(ALOA F 48h)

37 $\pm 1~^{\circ}C$ durante 24 \pm 3 horas Se puede prolongar otras 24 \pm 3 h



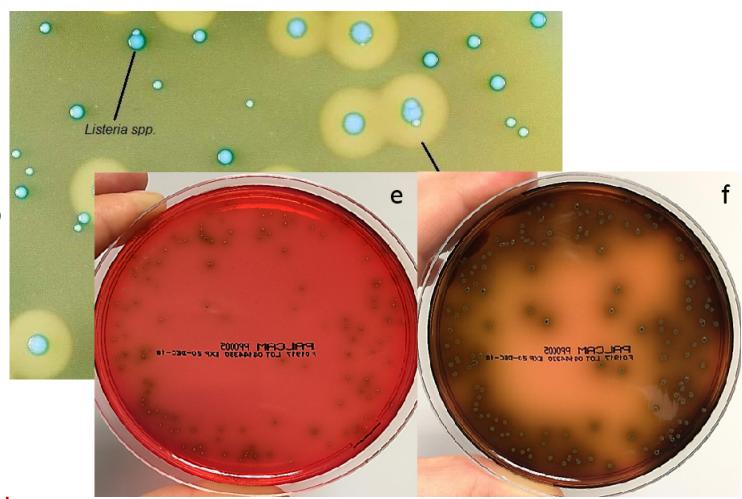




Identificación presuntiva

- Examen 6 placas buscando colonias típicas.
- En ALOA verde azuladas con halo opaco
- En PALCAM verdosas rodeadas halo oscuro y a las 48 horas 2mm incrustadas en agar y depresión central

Seleccionar 5 colonias sobre cada placa y si hay menos de 5 sobre cada placa seleccionar todas





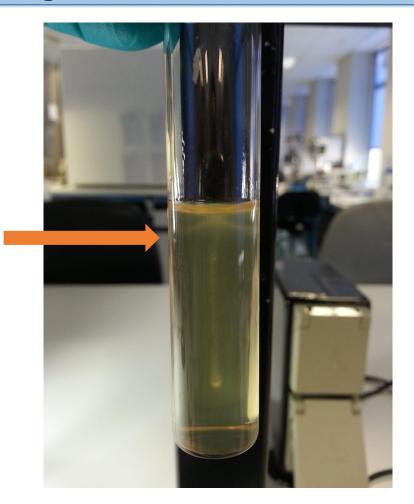


Identificación género y especie

Aislamiento colonias sobre **TYSA**, (Agar Triptona soja levadura), incubar $37\pm1\,^{\circ}C$ durante 24 horas.

Pruebas de cribado opcionales (catalasas, Gram, siembra en Oxford).

Examen movilidad Agar movilidad 48 horas a 25±1°C (en sombrilla)



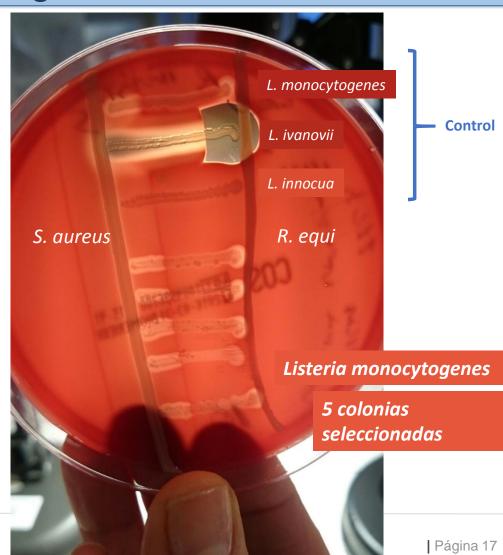




Identificación género y especie

Obligatorio Test de CAMP (Christie, Atkins y Munch Petersen)









Identificación género y especie

Obligatorio Hemolisis: Incubar en Agar Columbia COS 24-48 h a 37±1 °C. Zonas claras y estrechas



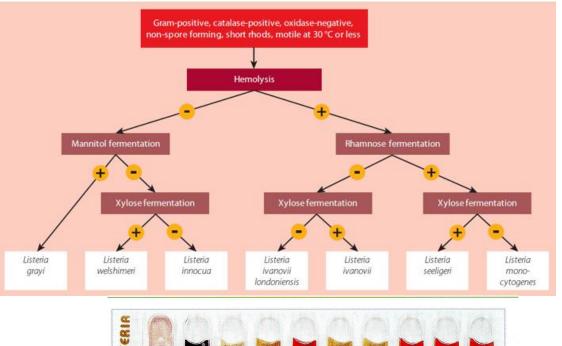




Identificación género y especie

Obligatorio: Utilización de glúcidos medinate tiras/galerias que contiene sustancias deshidrtadas que detectan la actividad enzimatica, fermentación de carbohidratos.







API® Analitical Profile Index





Identificación género y especie

Expresión de resultados Ausencia o presencia en la cantidad de producto examinado en g o ml (25 g).





Investigación de Listeria monocitogenes cribado negativo mediante ELFA (Ensayo de Fluorescencia Ligado a Enzima)



Investigación de Listeria monocitogenes cribado negativo ELFA



Cribado por ensayo inmunológico

Detección antígenos *Lm* mediante método ELFA por sistema automatizado VIDAS®:

Se fijan los antígenos a los anticuerpos policionales anti-*Listeria*

Los Ac conjugados marcados con fosfatasa alcalina son aspirados y se fijan sobre cualquier antígeno de *Lm*

El enzima del conjugado cataliza la hidrólisis del sustrato emitiendo una fluorescencia detectada a 450 nm

Umbral e interpretación de resultados valor del test < de 0,05 negativo ≥ 0,05 positivo

En los positivos Continua siembra en ALOA....



Permite descartar los negativos en 48 h



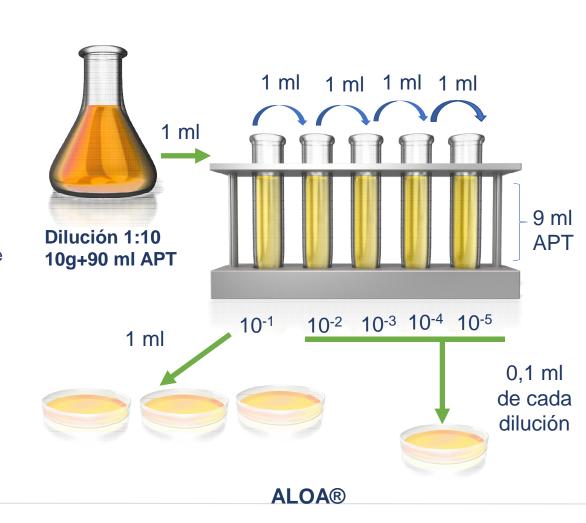




Preparación de diluciones

Si se solicita también investigación puede prepararse a partir del Fraser semi, si no Agua Peptona Tampona (APT).

- Siembra 1ml si la muestras es liquida o 1 ml suspensión madre en 3 placas ALOA.(el recuento será como 1 placa)
- Resto diluciones transferir 0,1 ml a ALOA 1 placa por dilución.
- Si el cliente considera aceptable como límite inferior 10 ufc para líquidos o 100 ufc para sólidos se siembra. (10⁻²)
- Incubar en 37±1 °C 20-24 horas
- Re-incubar 20-24 horas.



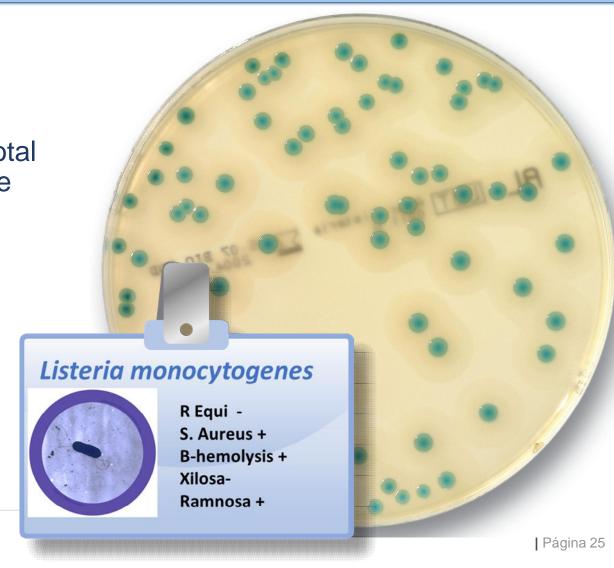


Recuento colonias

Contar colonias **presuntas**. Se contaran las que contengan en total menos de 150 colonias (se puede refrigerar las placas si no se va hacer recuento de en las 4 horas siguientes).

Confirmación

Si tienen mas de 150 y están separadas entre si se procede a confirmación con 5 colonias si no se hacen re-aislamientos.





Cálculos y expresión resultados

$N=\sum a/[(V1 * d1 * n1) + (V2 * d2 * n2)]$

N: nº de L. monocytotenes en la muestra expresado en ufc/g/ml.

a: suma de las colonias de *Listeria m* identificados en las diluciones

V1: Volumen inoculado en la primera dilución seleccionada.

V2: Volumen inoculado en la segunda dilución seleccionada.

d1:Primera dilución seleccionada.

d2:Segunda dilución seleccionada.

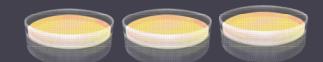
n1:número de placas sometidas a recuento con la primera dilución empleada.

n2 :número de placas sometidas a recuento con la segunda dilución empleada.









Dil 1 ml ALOA 48h

2 colonias típicas

2 colonias tipicas

1 colonias típicas

Resultado:

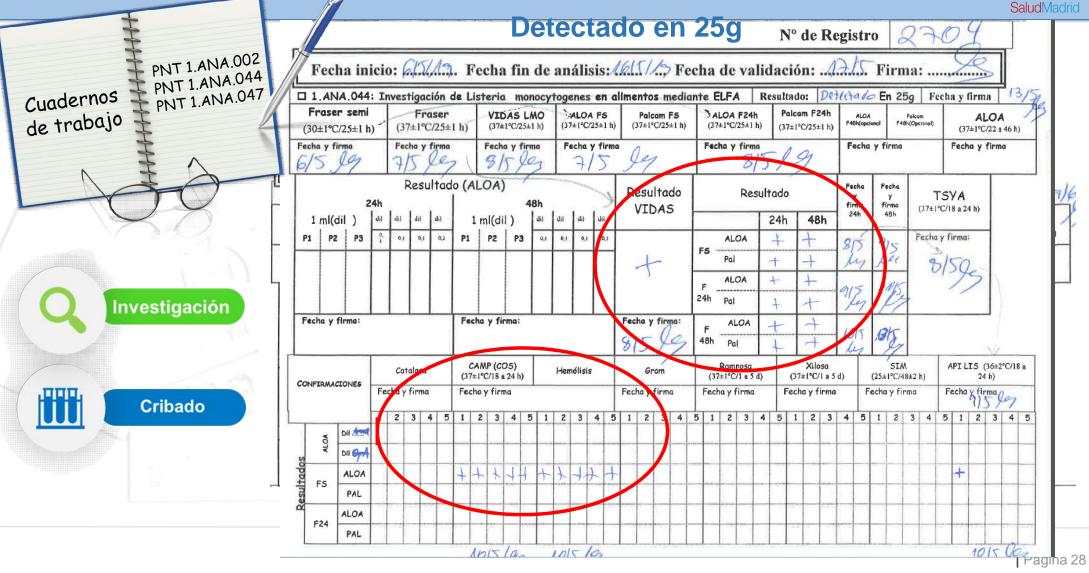
5.0 E1 ufc/g= 50 ufc/g



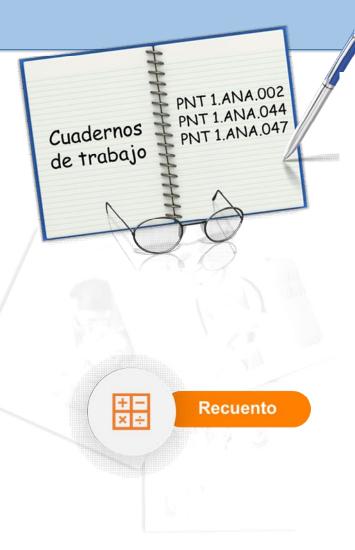
Aproximadamente 7 días

Página 27









Recuento 5.0 E1 ufc/g

	ICI):	t./.	h.L	<i>[</i>	F	ech	ıa	fin	d	e a	ná	lis	is:	12	161	19	Fe	eh	a d	e v	ali	ida	ci	ón	: .(12	1.4.	2.]	Fir	m	a:	••••			•••	
.ANA.0	47:	Lis	ter	ia n	non	осу	rtog	en	es, 1	rec	:ue	nto											11.		ulta ha s		rmo	1		5	5.1	0	6	1	Ufo	:/g	12
												AL	.04	A (37:	±1°C/2	22 a 46	5 h)																(T5Y		h)
Fecha y	firn	ıa	_			7	16	5/	19		(Q	7																				Feci	ha O	y fire	19	le
		c	24 fil -1	4h l 1 m	1						,	24 dil -1									8h 1 1m	ľ.							4 dil -	8h -1 0,	1						/
Placa 1			Plac	ca 2			Ple	aca 3							× ×	Plac	a 1			Pla 2	ca 2			,	Placa	3			C	7							
Fecha y	firn	ıa													Fe	cho	ı y f	irm	a		NO	0/	6	1	1	9											
Catalosa CAMP (COS) Opcional (37±1°C/18 e 24 h)										Hen	nólisi	is		Ramnosa (37±1°C/1 a 5 d)				Xilosa (37±1°C/1 a 5 d)						(25±	M 48±2 onal	h)		API LIS (36±2°C/18 a 24									
NFIRMACIONE	s	Fech	y fi	rma		Fe	cha y	firi	na 11 p	6	Q	19			F	echa	y firr	na		Fech	na y f	irma	1		Fech	a y f	irma		F	echa	y fir	rma	ê		Fech	ay fii	rma
₹ Dil		1 2	3	4	5	1	2	3	4	5	1	2	3	4 1	5 1	2	3	4	5	1	2 3	3 4	4 5	5	1 3	2 3	3 4	5	5 1	2	3	4	4 8	-	1 2	2 3	4
ALOA PLOA	-	+	+	+		7		-	7	1	7	7	-	71)	+			+	+	-	+	-	+	+	+	-	1	+	+	+				- 1	1	72	- Constitution

| Pagina 29

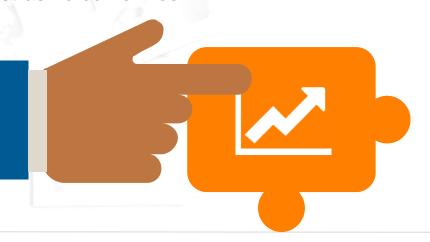


Algunos datos del LRSP

ANÁLISIS DE Lm 2019

Investigación de *Lm* 378 determinaciones todas ausencia.

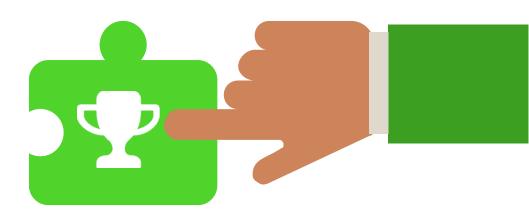
Recuento *Lm 190* muestras de n=5 (951 recuentos) 3 muestras no conformes



ASEGURAMIENTO DE LA VALIDEZ

Controles de calidad internos cada tres meses

Ejercicios de Intercomparación *Lm* (5 en 2019) resultados favorables z-score







Conclusiones



Los laboratorios designados para el control oficial deben garantizar unos resultados sólidos y fiables siempre, en programas de control oficial y durante las crisis.

Consistencia



La acreditación es un instrumento fundamental para .garantizar una actuación de alto nivel en los laboratorios, require un **esfuerzo considerable** de recursos, cualificación y gestión.

Acreditación



El LRSP continua
implementando nuevos
métodos para mejorar la
oferta analitica y de apoyo
técnico a la Dirección
General de Salud Pública

Mejora







iMuchas Gracias!