

VIII CONGRESO LATINOAMERICANO DE MICROBIOLOGÍA E HIGIENE DE ALIMENTOS



II Congreso Colombiano
de Microbiología de Alimentos

IV Congreso Internacional
de Microbiología Industrial

III Encuentro de Expertos
en Seguridad Alimentaria Frente
al Desarrollo Biotecnológico

18 - 21 de Mayo de 2005
Bogotá - Colombia

Los Desafíos de la Microbiología Frente a la Globalización

Organizadores



UNIVERSIDAD DE BOGOTÁ
JORGE TADEO LOZANO



Pontificia Universidad
JAVERIANA
Bogotá



UNIVERSIDAD DE LOS ANDES



International
Life Sciences
INSTITUTE



Universidad Jorge Tadeo Lozano
Pontificia Universidad Javeriana
International Life Sciences Institute, ILSI
Universidad de los Andes
ICMSF

VIII Congreso Latinoamericano de Microbiología e Higiene de Alimentos

II Congreso Colombiano de Microbiología de Alimentos

IV Congreso Internacional de Microbiología Industrial

III Encuentro de Expertos en Seguridad Alimentaria

Frente al Desarrollo Biotecnológico

**Bogotá, mayo 18 - 21 de 2005
Hotel Tequendama**

B.4.16

COLMIC
2005**CONCORDANCIA EN RESULTADOS DE SEROTIPIFICACION DE *Listeria monocytogenes* INVIMA / PASTEUR**A.I. Muñoz¹, P. Martín².

¹ Laboratorio de Microbiología de Alimentos. Subdirección de Alimentos y Bebidas Alcohólicas. Instituto Nacional de Vigilancia de Medicamentos y Alimentos. (INVIMA). Av. Calle 26 No. 51-60 Bogotá, D.C. Colombia. Correo electrónico: labmicroalim@yahoo.com

² Laboratorio de *Listeria*, Centro Nacional de Referencia, Centro Colaborativo de la OMS para la Listeriosis de Origen Alimentario, Instituto Pasteur, París, Francia.

Categoría: Investigación aplicada. Área de Aplicación: Otros. Otros.

Listeria monocytogenes es un patógeno intracelular oportunista causante de enfermedades como meningitis, meningoencefalitis, septicemias, abortos y gastroenteritis en humanos y en animales. La infección se produce, principalmente, por medio de alimentos contaminados, y forma parte de las enfermedades transmitidas por alimentos (ETA^S). Hay trece serovariedades; 1/2a, 1/2b, 1/2c, 3a, 3b, 3c, 4a, 4ab, 4b, 4c, 4d, 4e y 7. En el 2000 se inició la Red Nacional de Vigilancia de *L. monocytogenes* aislada de alimentos cuyo objetivo es la confirmación y la serotipificación de las cepas. Para lograr este propósito se estableció una cooperación internacional con el Laboratorio de Referencia del Instituto Pasteur. En el período 2000-2003 en el INVIMA se confirmaron y serotipificaron como *Listeria monocytogenes* 294 cepas; 6 pertenecientes al serotipo 1/2a, 21 al 1/2b, 19 al 1/2c, 1 al 3a, 7 al 3b, 1 al 4a, 217 al 4b, 5 al 4c, 17 al 4d - 4e; 62 cepas eran de *L. innocua*, 5 de *L. seeligeri*, y 2 *L. welshimeri*. Las 294 cepas de *L. monocytogenes* se enviaron al Instituto Pasteur y la concordancia de los serotipos según el coeficiente Kappa fue: *L. monocytogenes* 0,91, serotipo 1/2 a 0,42, 1/2b 0,86, 1/2c 0,80, 3a 1, 3b 0,87, 4a 1, 4b 0,96, 4c 0,60, y 4d-4e 0,95. La concordancia de especies fue 0,97, *L. monocytogenes* 0,97, *L. innocua* 0,97, *L. seeligeri* 1, *L. welshimeri* 1. Según las concordancias obtenidas tanto para serotipificación como para especies, la mayoría de los resultados del INVIMA se encuentran entre buenos y excelentes. Para los serotipos 1/2a y 4c se obtuvo concordancia moderada posiblemente debido a disminución en la expresión de factores somáticos, flagelares y factores ambientales como temperatura del laboratorio, que se deben controlar en forma precisa y que se pueden minimizar con la técnica alternativa de seroagrupamiento de *Listeria* por PCR.

Palabras clave: *Listeria monocytogenes*, *Listeria* en alimentos, *Listeria* serotipos.

B 4.17

ESTUDIO COMPARATIVO DE LA TÉCNICA DE DILUCIÓN Y PLAQUE EN PLACAS DE AGAR BAIRD PARKER Y PETRIFILM STAPH EXPRESS PARA EL RECUENTO DE *Staphylococcus aureus* EN PASTELES CON CREMAM. Zazopulos¹, S. Núñez¹, M. Cid² y E. Domínguez²

¹ Universidad Santa María, sede Viña del Mar. Correo electrónico: miguel.zazopulos@usm.cl

² Laboratorio de Medio Ambiente, Servicio de Salud Viña del Mar-Quillota.

Categoría: Investigación aplicada. Área de aplicación: Inocuidad alimentaria.

Sistemas de gestión de inocuidad de alimentos y bebidas.

En el presente estudio se realiza un estudio comparativo de la técnica de dilución y plaqueo sobre dos métodos, convencional de agar de Baird Parker y el simplificado utilizando las placas Petrifilm Staph Express para la determinación y enumeración de *Staphylococcus aureus* en alimentos. El trabajo se desarrolló utilizando una serie de muestras de pasteles con diferentes tipos de cremas y rellenos, las primeras se utilizaron en forma natural pero al ser los recuentos muy bajos <10UFC/g, no servían para la comparación de ambos métodos. Por lo tanto, se decidió modificar el diseño del experimento, contaminando las muestras en forma unívoca con *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, en un nivel tal que se pudieran recuperar entre 25 y 35 colonias por placa cuando se sembrara una misma alícuota de la dilución madre del alimento. Se emplearon el agar de Baird Parker para el método convencional y el Petrifilm como método alternativo. Al mismo tiempo el alimento se sembraba sobre agar Nutritivo estándar 1, un medio no selectivo que sirvió de referencia para estimar el número de bacterias viables y cultivables que se podrían cuantificar y con ello estimar la recuperación de los microorganismos en los medios sujetos a estudio. El número de muestras superó las 100 unidades. Los valores de recuperación promedio para Baird Parker con de 25.06 colonias por placa y Petrifilm, 17.2 colonias por placa, mientras que para el Agar nutritivo Estándar 1, de 25.5 colonias por placa, lo que muestra un grado patrón de recuperación excelente para Baird Parker si se está tomando como patrón de recuperación el Agar Nutritivo estándar 1. Las desviaciones estándar fueron de 2.74 para Petrifilm y 4.55 colonias por placa para Baird Parker, lo que indica que en el primero existe una mejor precisión de resultados cuando se analiza la repetitividad del método. En las muestras sin contaminar que fueron analizadas en un principio, los resultados mostraron un número alto de falsos positivos, 52.9%, en las placas de Petrifilm. A partir de los resultados obtenidos se puede concluir que pese que Petrifilm presenta ventajas en cuanto a la facilidad en el ahorro de tiempo de preparación y siembra y una mayor precisión en los datos, su recuperabilidad e índice de falsos positivos es deficiente en comparación a Baird Parker, lo que presenta limitaciones para ser utilizado como método rápido de determinación y enumeración de *Staphylococcus aureus*, en pasteles con crema. Por lo tanto, Baird Parker sigue siendo un método mucho más sensible y fiable en la recuperación del microorganismo, a pesar de su menor precisión.



CONCORDANCIA DE LOS RESULTADOS DE SEROTIPIFICACION DE *Listeria monocytogenes* INVIMA / PASTEUR.

Muñoz¹, A.I., Martín², P., Jacquet², C.

RESULTADOS

Entidad 1: Laboratorio de Microbiología de Alimentos, Subdirección de Alimentos y Bebidas Alcohólicas, Instituto Nacional de Vigilancia de Medicamentos y Alimentos, (INVIMA), Av. Calle 26 No. 51-60 Bogotá, D.C. Colombia. labmicroalim@isaboo.com
Entidad 2: Laboratorio de *Listeria*, Centro Nacional de Referencia, Centro Colaborativo de la OMS para la Listeriosis de Origen Alimentario, Instituto Pasteur, París, Francia.

Categoría: Investigación aplicada
Área de aplicación: vigilancia y control a nivel nacional de *Listeria monocytogenes* en alimentos.

Listeria monocytogenes es un patógeno intracelular oportunista causante de enfermedades como meningitis, meningococis, septicemias, abortos y gastroenteritis en humanos y en animales. La infección se produce, principalmente, por medio de alimentos contaminados, y forma parte de las enfermedades transmitidas por alimentos (ETA). Hay traza serovariedades; 1/2a, 1/2b, 1/2c, 3a, 3b, 3c, 4a, 4ab, 4b, 4c, 4d, 4e y 7. En el 2000 se inició la Red Nacional de Vigilancia de *L. monocytogenes* aislada de alimentos cuyo objetivo es la confirmación y la serotipificación de las cepas. Para lograr este propósito se estableció una cooperación internacional con el Laboratorio de Referencia del Instituto Pasteur. En el periodo 2000-2003, en el INVIMA se confirmaron y serotipificaron 294 cepas como *L. monocytogenes*: 6 pertenecientes al serotipo 1/2a, 21 al 1/2b, 19 al 1/2c, 1 al 3a, 7 al 3b, 1 al 4a, 217 al 4b, 5 al 4c, 17 al 4d, 4e; 62 cepas eran de *L. innocua*, 5 de *L. seeligeri*, y 2 *L. welshimeri*. Las 294 cepas de *L. monocytogenes* se enviaron al Instituto Pasteur y la concordancia de los serotipos según el coeficiente kappa fue: *L. monocytogenes*, 0,91; serotipo 1/2 a, 0,42; 1/2b, 0,88; 1/2c, 0,80; 3a, 1; 3b, 0,87; 4a, 1; 4b, 0,96; 4c, 0,60; y, 4d-4e, 0,95. La concordancia de especies fue de 0,97: *L. monocytogenes*, 0,97; *L. innocua*, 0,97; *L. seeligeri*, 1; *L. welshimeri*, 1. Según las concordancias obtenidas tanto para serotipificación como para especies, la mayoría de los resultados del INVIMA se encuentran entre buenos y excelentes. Para los serotipos 1/2a y 4c se obtuvo concordancia moderada, posiblemente, debido a disminución en la expresión de factores somáticos y flagelares y a factores ambientales, como la temperatura del laboratorio que se debe controlar en forma precisa y que se pueden minimizar con la técnica alternativa de serogrupo de *Listeria* por PCR.

Palabras clave: *Listeria monocytogenes*, *Listeria* en alimentos, *Listeria* serotipos.

Tabla 1. Concordancia de los resultados de especies de *Listeria*.

Especies	<i>L. monocytogenes</i>	<i>L. innocua</i>	<i>L. seeligeri</i>	<i>L. welshimeri</i>	Total de especies
INVIMA	294	62	5	2	363
Instituto Pasteur	293	61	5	2	361
No. De acuerdos	293	61	5	2	361
Concordancia	0,97	0,97	1	1	0,97

Tabla 2. Concordancia de los resultados de tipificación serológica de *Listeria monocytogenes*.

Resultados	Serotipo									TOTAL
	1/2a	1/2b	1/2c	3a	3b	4a	4b	4c	4d-4e	
INVIMA	6	21	19	1	7	1	217	5	17	294
Instituto Pasteur	14	18	15	1	6	1	220	3	16	294
No De acuerdos	6	18	15	1	6	1	217	3	16	283
Concordancia	0,42	0,86	0,80	1	0,87	1	0,96	0,60	0,95	0,91

Objetivos

Confirmación y serotipificación de *Listeria monocytogenes* y confirmación de especies de *Listeria* aisladas de alimentos por el Laboratorio de Microbiología de Alimentos del INVIMA y de los diferentes laboratorios de alimentos de las Seccionales de Salud del país que conforman la Red Nacional de *Listeria*.

Justificación

Una de las funciones del Laboratorio de Microbiología de Alimentos del INVIMA, como laboratorio nacional de referencia de patógenos transmitidos por alimentos, es la confirmación y serotipificación de *L. monocytogenes* de los aislamientos hechos por el INVIMA y por los laboratorios de alimentos de los entes territoriales que conforman la Red Nacional de *Listeria*.

Materiales y métodos

En el periodo comprendido entre 2000 y 2003, se confirmaron en el laboratorio 363 cepas de *Listeria* utilizando las siguientes reacciones bioquímicas: coloración de Gram, prueba de catalasa, hemólisis, prueba de Camp, fermentación de carbohidratos (xilosa, ramosa y manitol); y movilidad en forma de sombrilla.

Para la serotipificación de las cepas confirmadas como *L. monocytogenes* se utilizó el estuche de sueros anti-factoriales para *Listeria* producidos en el laboratorio con el apoyo del Biotero del INS, siguiendo el protocolo enseñado por el Instituto Pasteur correspondiente al esquema desarrollado por Peterson, modificado por Seeliger and Höhne, el cual consta de los factores somáticos "O" (I, II, IV, V/VI, VI, VII, VIII, IX, X, XI, XII/XIII, XII, XIII, XIV, XV) y de los factores flagelares "H" (A, AB, C, D, E).

Las bacterias se prepararon para aglutinación con factores O en cultivos sucesivos: agar Columbia, caldo TPB y agar AT más glucosa; después se incubaron por calor a 100C durante una hora; se lavaron 3 veces con solución salina de tampón fosfato (PBS), y se suspendieron en solución de fenol al 0,5% quedando listas para la aglutinación. Para la aglutinación con factores H, las bacterias se cultivaron en agar Columbia; luego, en caldo TPB y se incubaron a 22C por 24-72 horas, quedando listas para su aglutinación.

Para obtener los resultados de concordancia con el Instituto Pasteur, se utilizó el coeficiente kappa de Cohen.

Análisis

La mayoría de concordancias obtenidas en los resultados tanto en la serotipificación de *L. monocytogenes* como en la confirmación de especies, se encuentran entre buenas y excelentes; los serotipos 1/2a y 4c obtuvieron concordancias moderadas debido, posiblemente, a una disminución en la expresión de los factores somáticos y flagelares y a los factores externos a la bacteria como son la temperatura del laboratorio y la perfecta limpieza de las láminas utilizadas para la aglutinación que hacen, muchas veces, que la reproducibilidad no siempre sea satisfactoria.

Conclusión

Debe controlarse la temperatura del laboratorio y la perfecta limpieza de las láminas para que no se presenten errores de aglutinación. También, minimizar los factores que alteran la reacción de aglutinación antígeno anticuerpo mediante la utilización de la técnica alternativa de serogrupo de *Listeria* por PCR.

BIBLIOGRAFIA

1. Institut Pasteur. Centre National de Référence des *Listeria*. Centre collaborateur de L'OMS pour la listeriose d'origine alimentaire. Laboratoire des *Listeria*. Protocole de serotypie. Paris: Institut Pasteur; 1997.
2. Seeliger HPR, Höhne K. Serotyping of *Listeria monocytogenes* and related species. En: Bergan T, Novis J, eds. Methods in microbiology. 1979 p. 33-48.
3. Muñoz AI, Díaz G. Listeriosis. Santa Fe de Bogotá: INVIMA-INS; 1998.
4. Hitchins AD. *Listeria monocytogenes*. En: FDA Bacteriological Analytical Manual, Food and Drug Administration. 8^o ed. 1995. p. 10.01-10.13
5. Doumith M et al. Differentiation of the major *Listeria monocytogenes* serovars by multiplex PCR. J. Clin Microbiol 2004; 42 (8): 3819-22.
6. Bonnardel P. Pour tout savoir ou presque sur le test éstatique Kappa: le coefficient Kappa. 1995. Consultado en http://www.kapachez.icaali.fr/kappa_2juges.htm