

ASEQURA: Hacia una nueva generación de modelos predictivos en la cadena alimentaria para *Listeria monocytogenes*: cuantificación de la transferencia de biofilm e integración de factores de virulencia y persistencia

Juan José Rodríguez Herrera / Instituto de Investigaciones Marinas (CSIC)

Marta López Cabo / Instituto de Investigaciones Marinas (CSIC)

Elena Carrasco Jiménez / Universidad de Córdoba

Antonio Valero Díaz / Universidad de Córdoba



UNIVERSIDAD
DE
CÓRDOBA



AseQura



CONTEXTO Y OBJETIVOS

Mayor incidencia de especies capaces de formar biofilms.

Necesidad de conocer los mecanismos de supervivencia y persistencia en industrias asociados a la contaminación cruzada, y su impacto sobre el riesgo hacia el consumidor.

- **Evaluar cuantitativamente el riesgo** de listeriosis atribuible a la contaminación microbiana en cadenas de procesamiento de alimentos listos para el consumo de origen animal.
- Proponer **estrategias de gestión del riesgo** con objeto de reducir la incidencia de listeriosis asociada a cadenas de procesamiento que puedan entrañar un mayor riesgo.

Elicitación de Conocimiento Experto-EKE

Procedimiento para clasificación de cepas basado en PCA



ASEQURA

Elicitación de Conocimiento Experto (*Expert Knowledge Elicitation*, EKE)

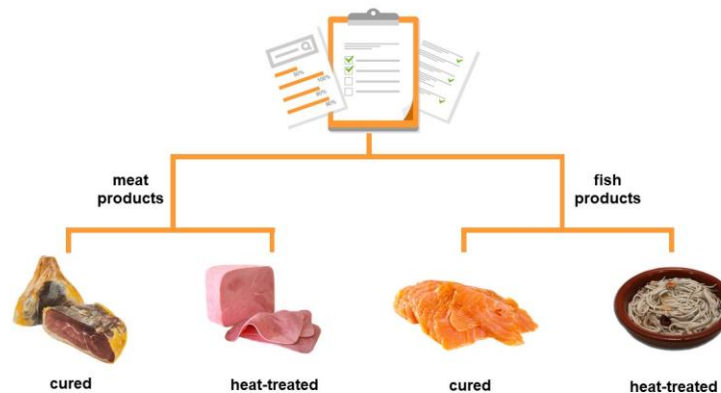
- EKE
- Biofilms y transferencia
- Fase gastrointestinal
- Evaluación de riesgos

Bloque 1

Rondas 1-2. ¿En qué etapas, actividades o equipos de una planta de procesamiento de **productos listos para consumo** hay mayor probabilidad de contaminación con *L. monocytogenes*?

Ronda 3. ¿Qué porcentaje de unidades se habrá contaminado en cada etapa?

Ronda 3: ¿Cuál será la concentración de *L. monocytogenes* en las unidades contaminadas en dicha etapa?

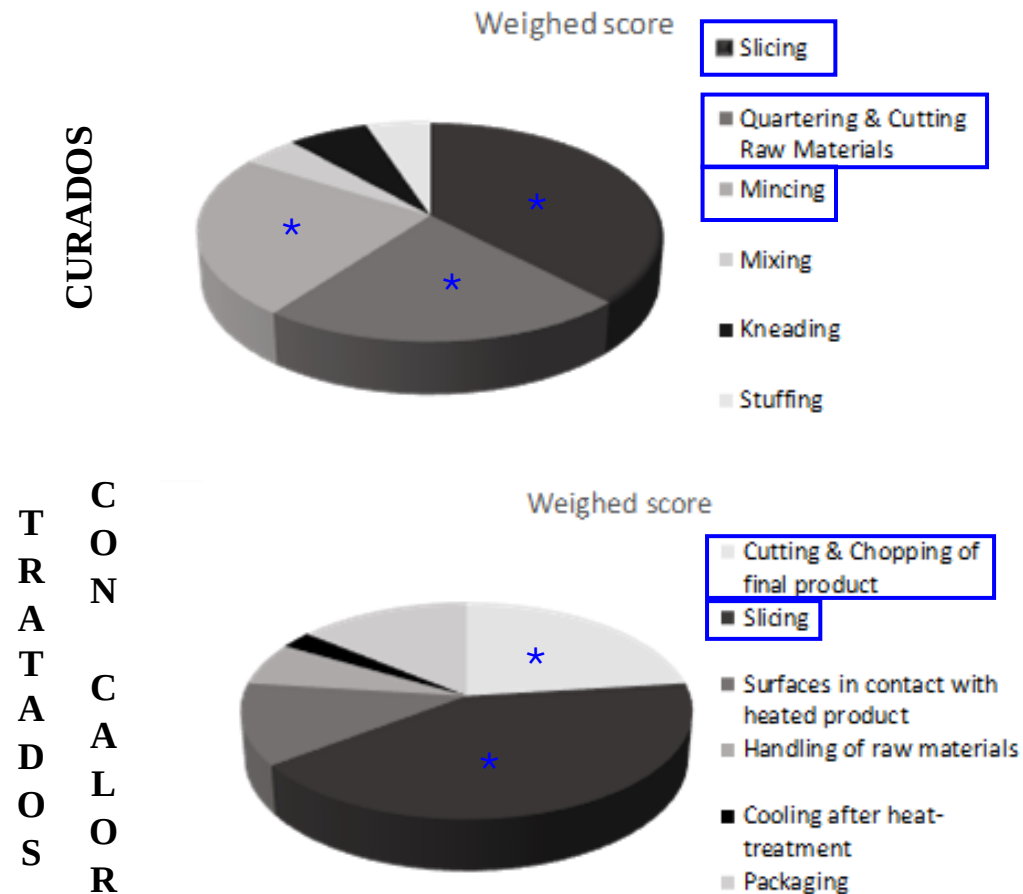


ASEQURA

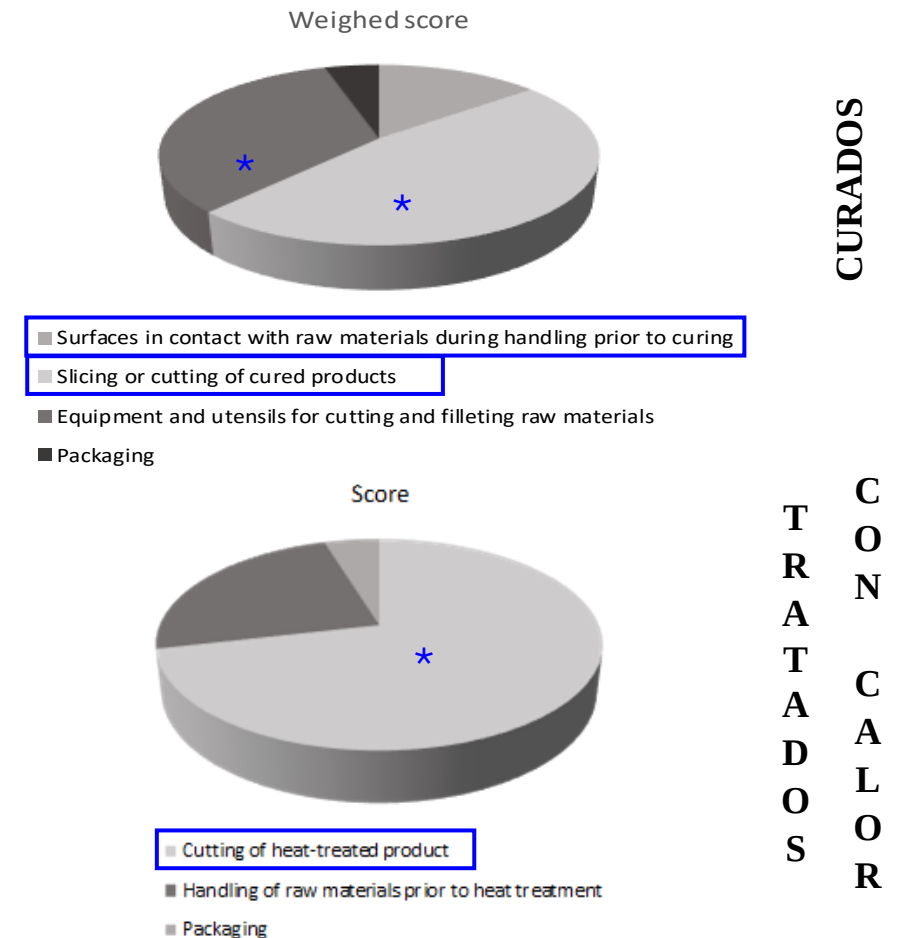
- EKE
- Biofilms y transferencia
- Fase gastrointestinal
- Evaluación de riesgos

Bloque 1. Rondas 1-2

PRODUCTOS CÁRNICOS



PRODUCTOS PESQUEROS



ASEQURA

Bloque 1. Ronda 3

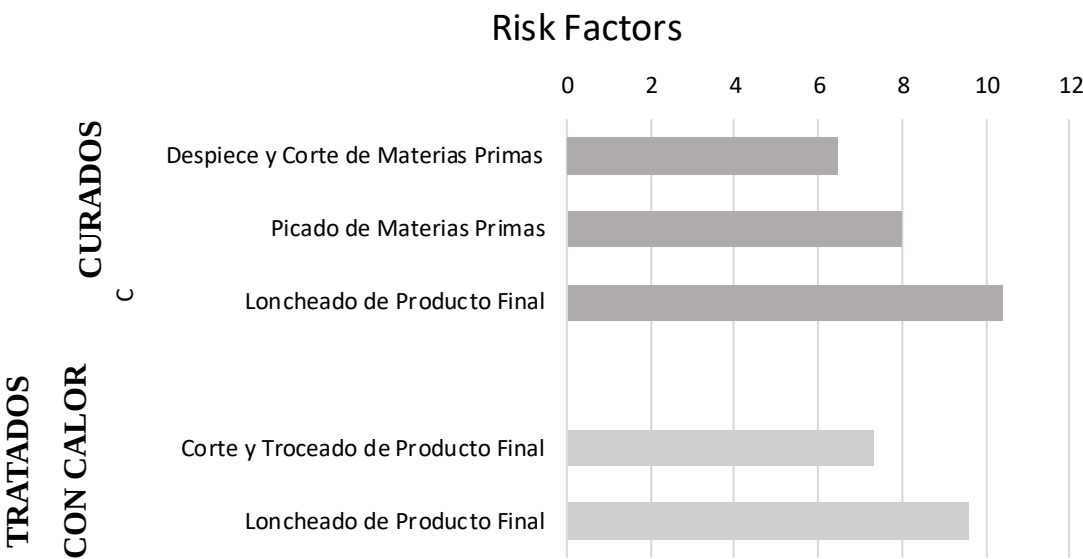
- EKE
- Biofilms y transferencia
- Fase gastrointestinal
- Evaluación de riesgos

Estimación de Factores de Riesgo de Contaminación

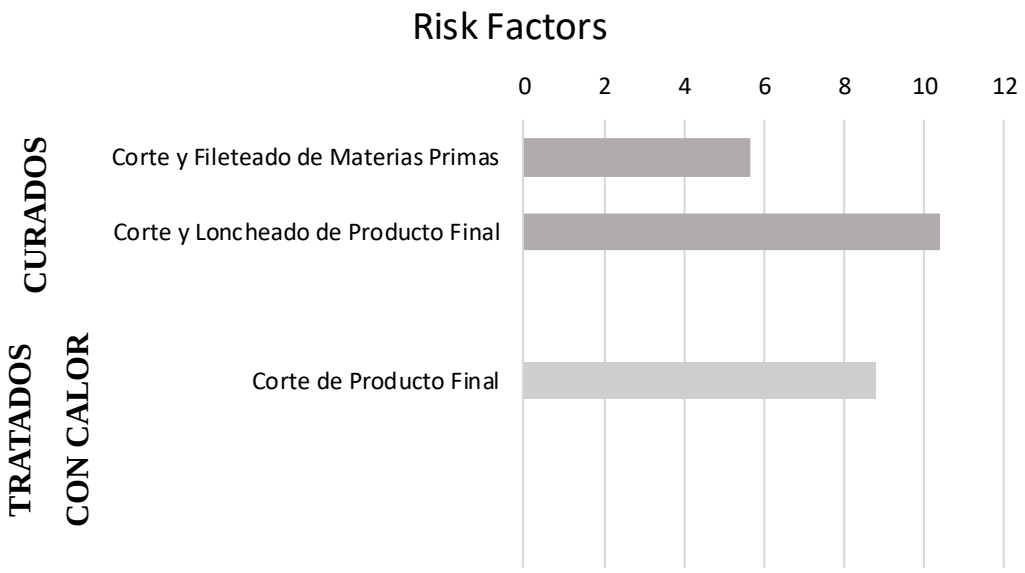
- ¿Qué porcentaje de unidades se habrá contaminado en cada operación?
- ¿Cuál será la concentración de *L. monocytogenes* en las unidades contaminadas en dicha operación?

Estos factores se estiman a partir de los productos del porcentaje de unidades contaminadas y la concentración de *L. monocytogenes* en tales unidades

PRODUCTOS CÁRNICOS



PRODUCTOS PESQUEROS



Elicitación de Conocimiento Experto (*Expert Knowledge Elicitation*, EKE)

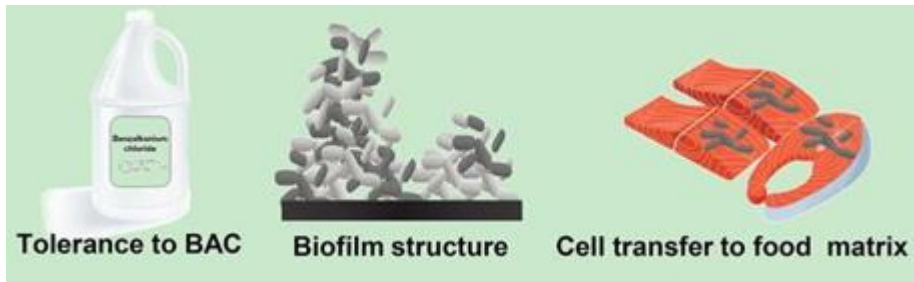
Bloque 2

¿En qué lugares de una planta de procesamiento de **productos listos para consumo** hay mayor probabilidad de que se desarrollen focos de contaminación en los que persista y se detecte ocasionalmente *L. monocytogenes*?

Los desagües y sumideros, por un lado, y las zonas o puntos de instalaciones, mobiliario o equipos de difícil acceso para su limpieza y desinfección, por otro, fueron claramente identificados como los puntos de plantas de procesamiento donde hay mayor probabilidad de que se desarrollen focos de contaminación en los que persista *L. monocytogenes* para las cuatro categorías de alimentos por las que se preguntaron.

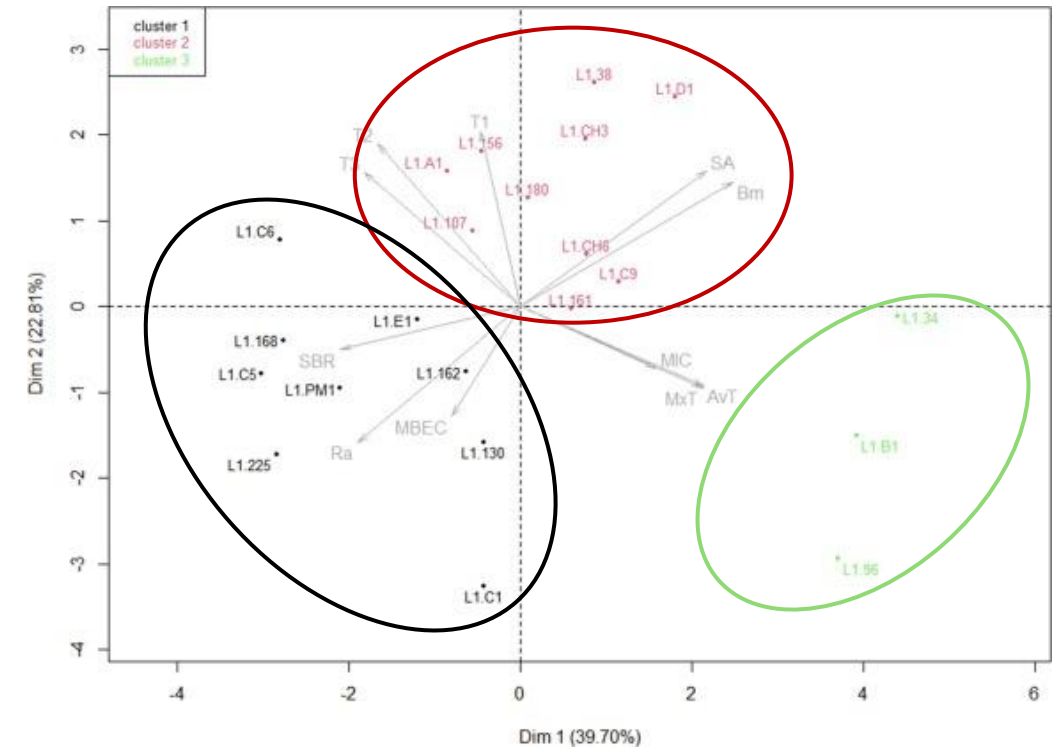
ASEQURA

Caracterización de Biopelículas. Agrupación de Cepas



- Resistencia a la desinfección (cloruro de benzalconio)
- Parámetros estructurales (biomasa, altura, biovolumen, rugosidad...)
- Transferencia de células a alimento (salmón ahumado)

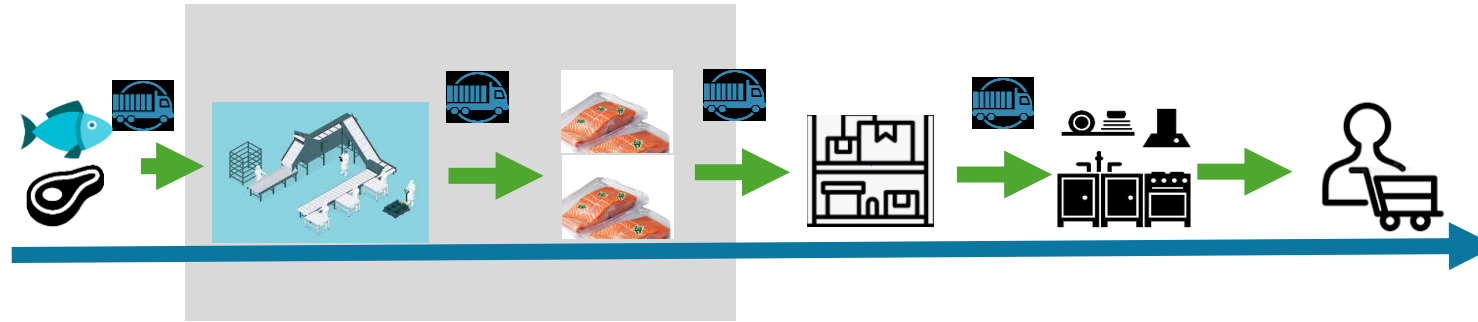
- EKE
- **Biofilms** y transferencia
- Fase gastrointestinal
- Evaluación de riesgos



Biofilms y transferencia

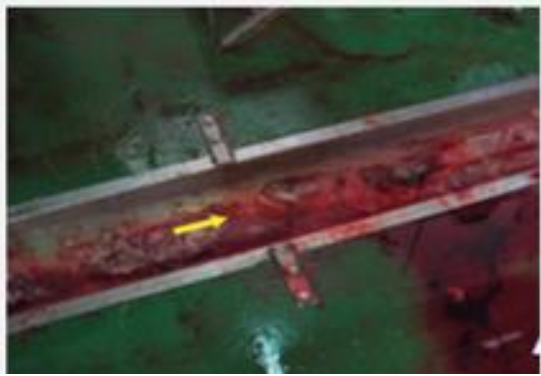


- EKE
- Biofilm y transferencia
- Fase gastrointestinal
- Evaluación de riesgos

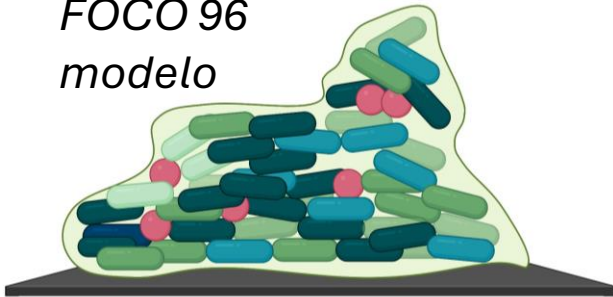


OBJETIVO: QMRA que incorpore el **riesgo** asociado a la transferencia por contacto de células de *L. monocytogenes* desde **biofilms** formados en superficies de la industria alimentaria al alimento.

FOCO 96



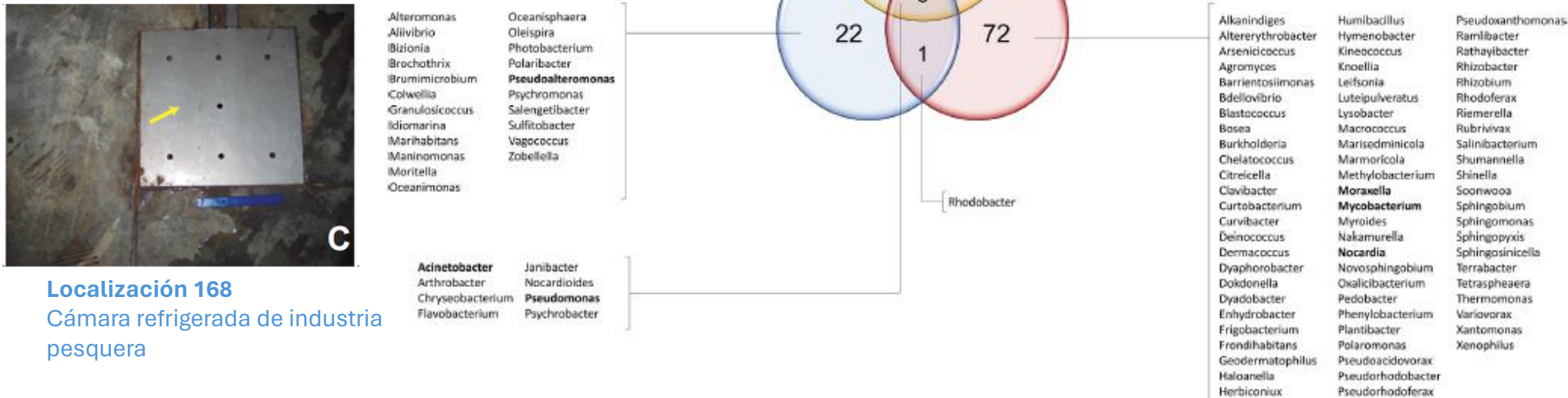
*FOCO 96
modelo*



Importancia de considerar
los **focos de contaminación modelo**.

Ejemplos de composición de focos de contaminación

- Mayor diversidad microbiana en la industria cárnica y láctica.
- Gram negativas predominantes en los focos procedentes de las industrias cárnica y pesquera y Gram positivas en el foco de la industria láctica.

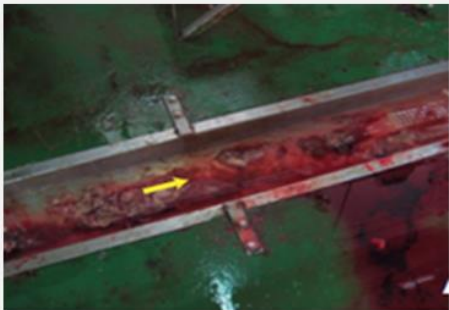


Localización 107

Rodríguez et al. 2016

Persistencia de *L. monocytogenes*

Foco 96

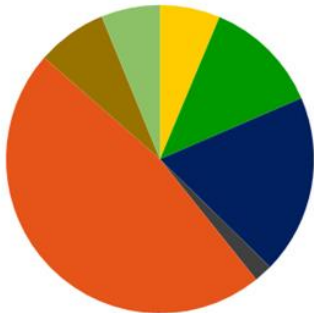


2017



Firmicutes Actinobacteriota Proteobacteria Acidobacteriota
Bacteroidota Planctomycetota Euryarchaeota

2022



Firmicutes Actinobacteriota Proteobacteria Acidobacteriota
Bacteroidota Planctomycetota Euryarchaeota

Foco 107

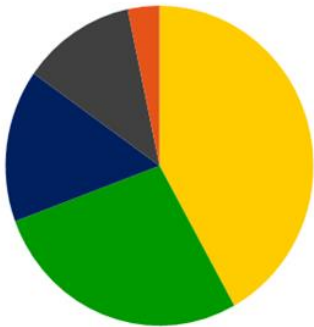


2017

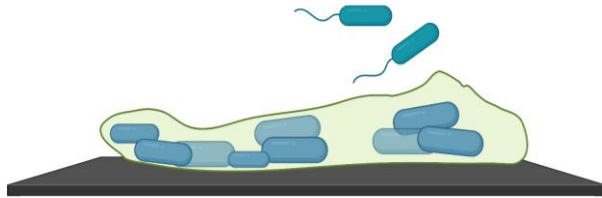


Firmicutes Actinobacteriota Proteobacteria
Acidobacteriota Bacteroidota

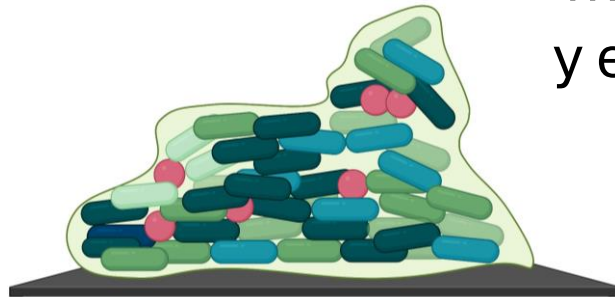
2022



Firmicutes Actinobacteriota Proteobacteria
Acidobacteriota Bacteroidota



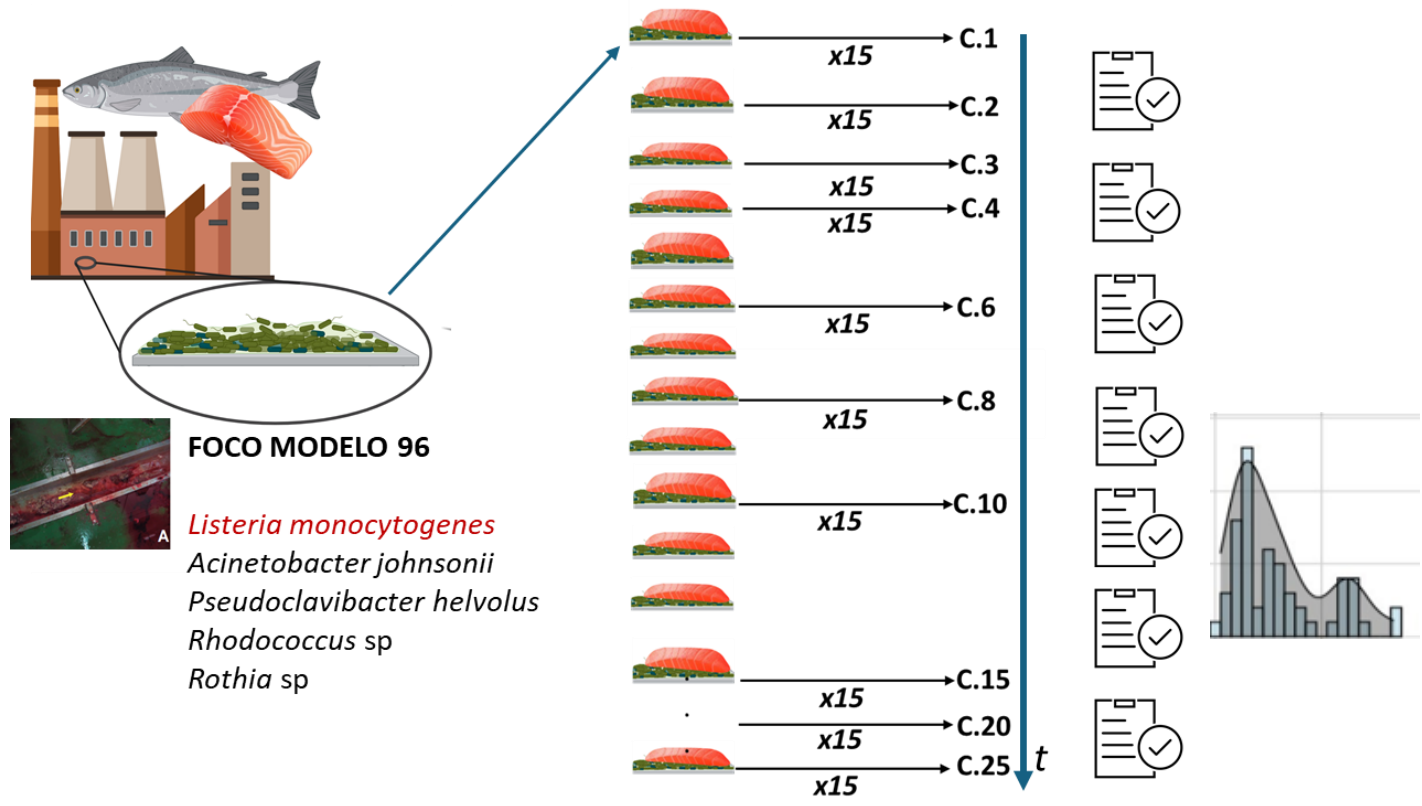
El trabajo realizado en **ASEQURA** demostró que la microbiota presente en los focos de *Listeria monocytogenes* condiciona la tasa de transferencia y el crecimiento posterior de *Listeria monocytogenes* en el alimento tras la contaminación cruzada



- EKE
- Biofilm y transferencia
- Fase gastrointestinal
- Evaluación de riesgos

Transferencia por contacto de *L. monocytogenes*

Transferencia



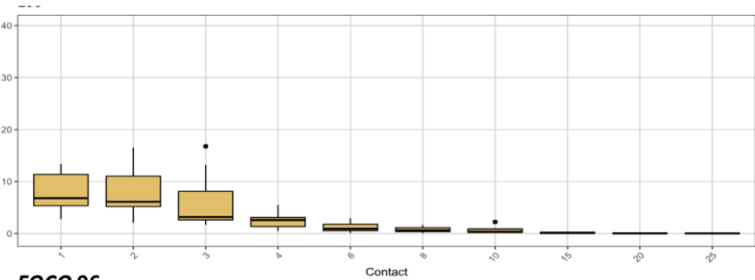
Almacenamiento

5-6°C
 VP

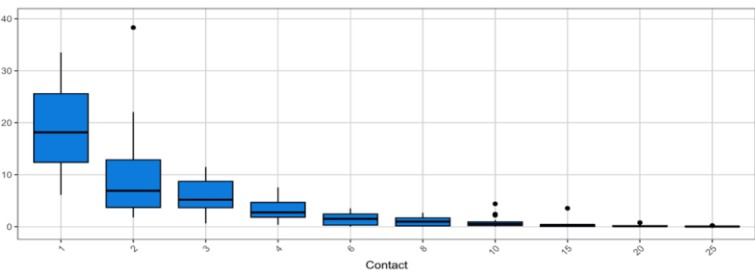


Obtención de datos

Biofilm monoespecie de *Listeria monocytogenes* 96

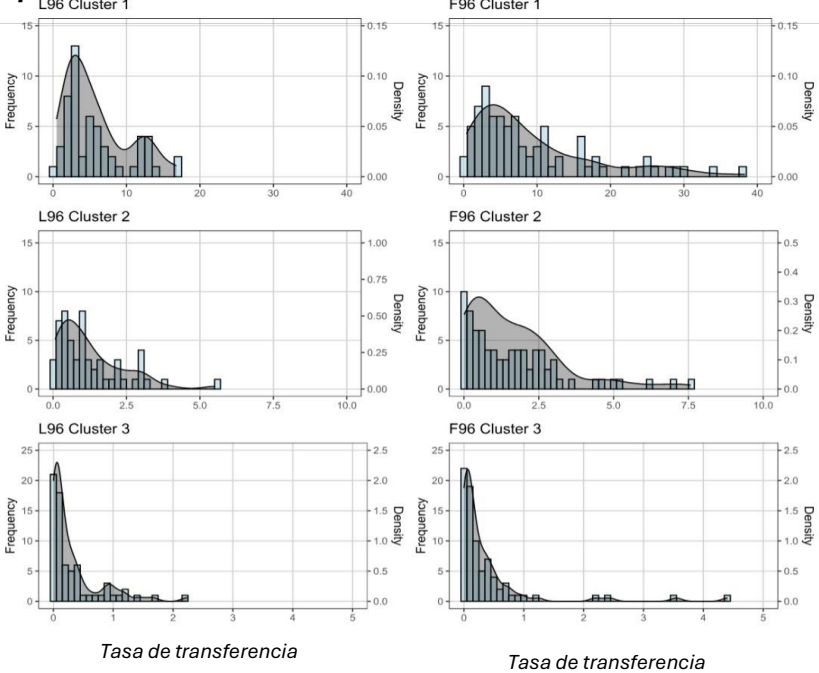


FOCO 96



L96 N°cél's adheridas: 6.98 ± 0.28 CFU/cm²
F96 N°cél's adheridas: 6.13 ± 0.24 CFU/cm²

Función de probabilidad



- EKE
- Biofilm y transferencia
- Fase gastrointestinal
- Evaluación de riesgos

Cálculo de la probabilidad

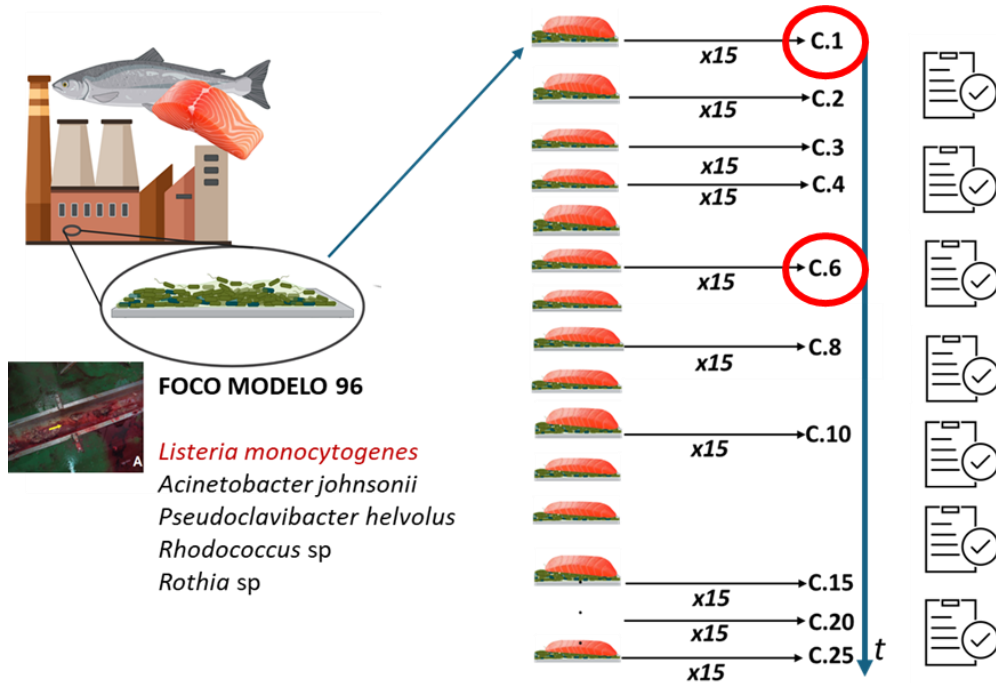
La probabilidad de que la tasa de transferencia (%CFU/g) esté en un Intervalo determinado.

	L96	F96
[0,10]	0.78	0.65
[10,20]	0.21	0.22
[20,30]	0	0.08
[30, 40]	0	0.03

La microbiota presente en el foco de contaminación de *L. monocytogenes* aumenta la probabilidad de tasas elevadas de transferencia de células desde biofilms a salmón ahumado y disminuye la probabilidad de obtener tasas de transferencia bajas, entre un 0 y un 10%



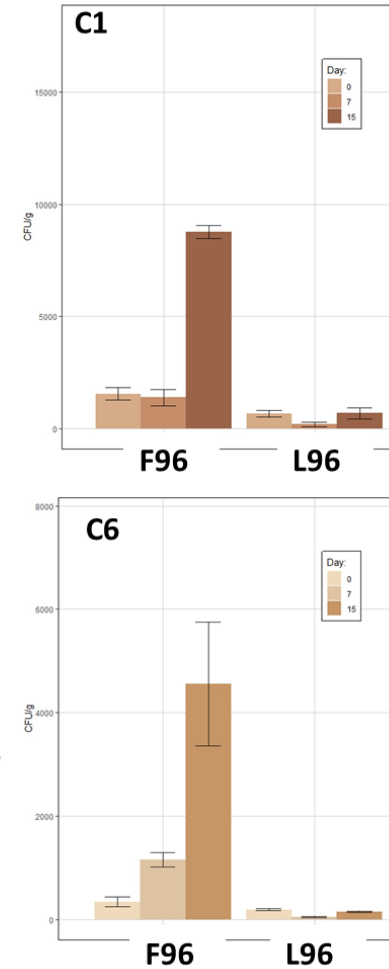
Almacenamiento



5-6°C
VP



5-6°C
VP



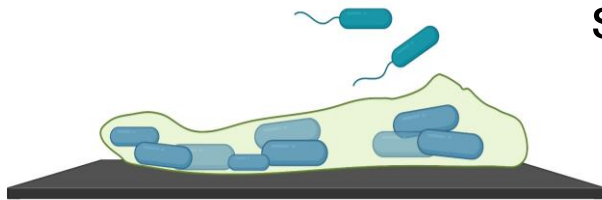
- EKE
- **Biofilm y transferencia**
- Fase gastrointestinal
- Evaluación de riesgos

- Las células de *L. monocytogenes* que proceden del foco 96 tienen más capacidad de crecer (>riesgo) durante el almacenamiento que las que proceden del biofilm monoespecie.

- EKE
- **Biofilm y transferencia**
- Fase gastrointestinal
- Evaluación de riesgos

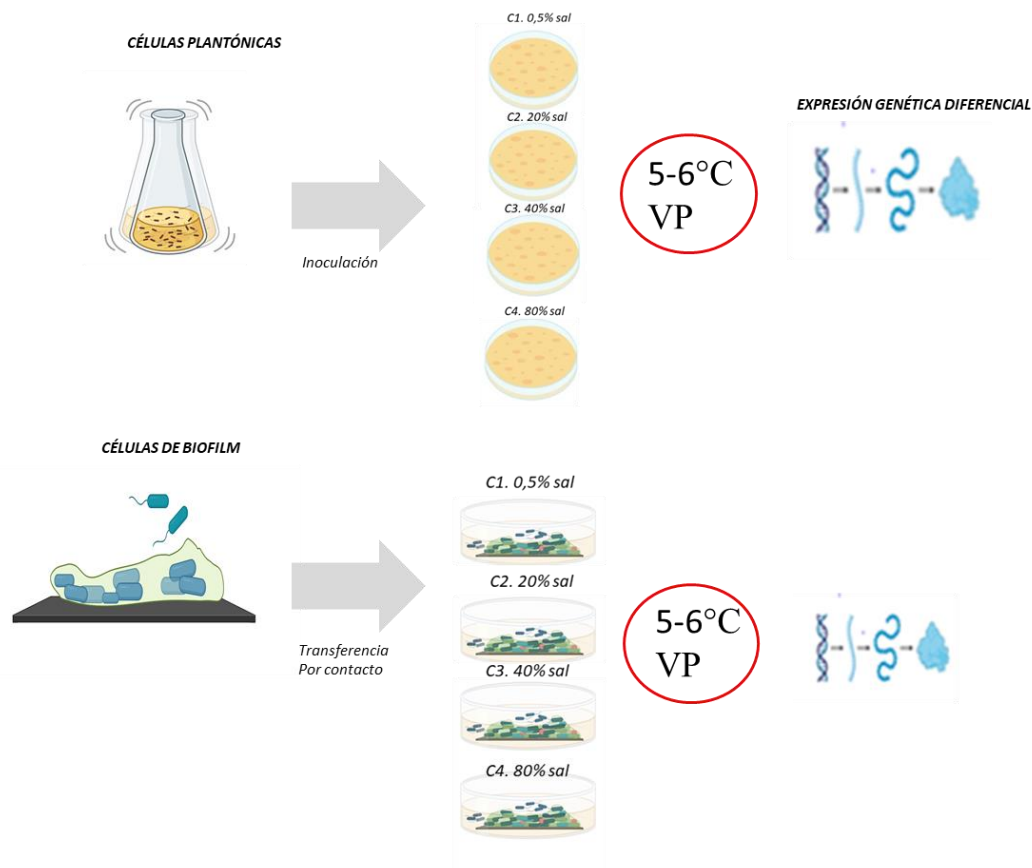


El trabajo realizado en **ASEQURA** demostró un cambio en la expresión de genes **clave** para la supervivencia y virulencia de *L. monocytogenes* en células de biofilm y respecto a plantónicas en un sistema experimental modelo bajo condiciones de estrés.

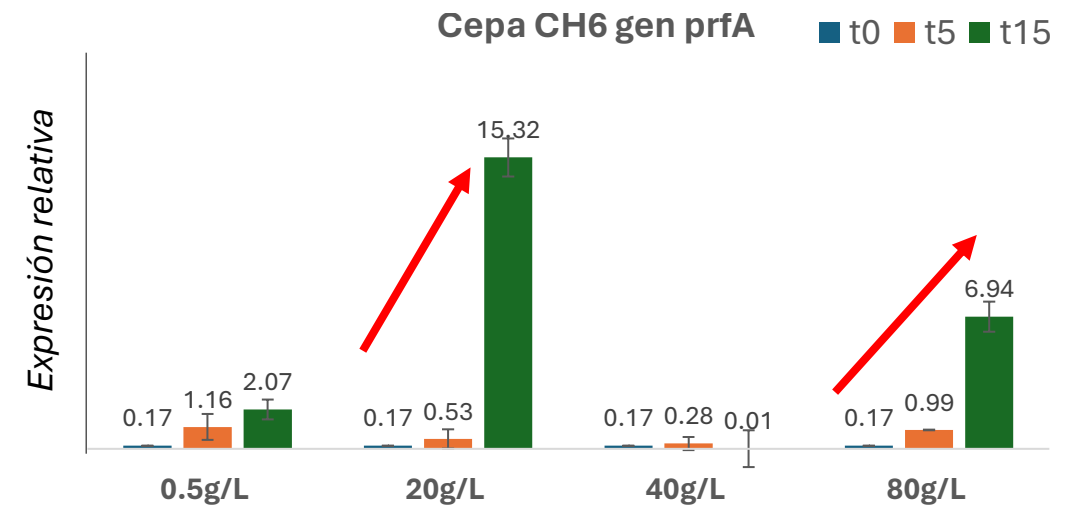
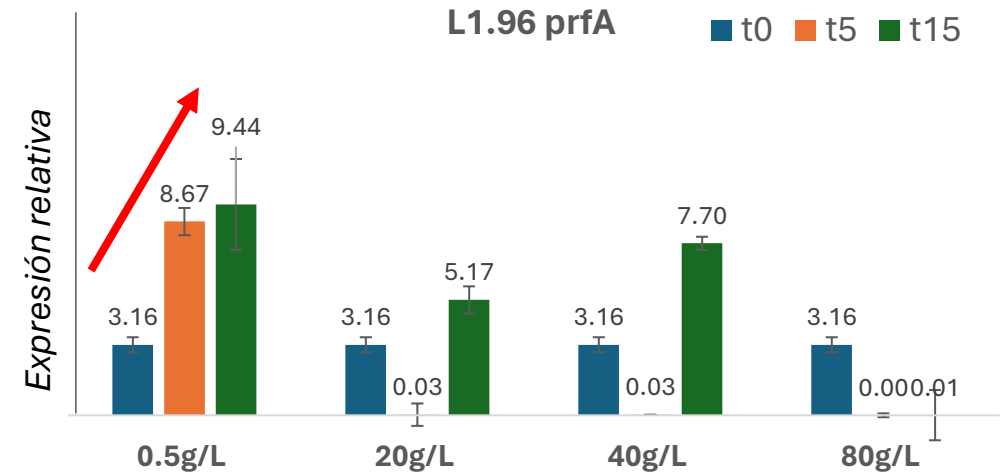


Expresión génica diferencial de **pfrA** bajo condiciones de estrés osmótico y oxidativo

- EKE
- **Biofilm y transferencia**
- Fase gastrointestinal
- Evaluación de riesgos



- Ej: Se incrementa la expresión génica de *prfA* (x15) a concentración elevada de sal (20 g/l) a tiempos de almacenamiento largos en células de biofilm transferidas a un sistema modelo respecto a plantónicas (>riesgo).



Efecto del tracto gastrointestinal sobre *Listeria*

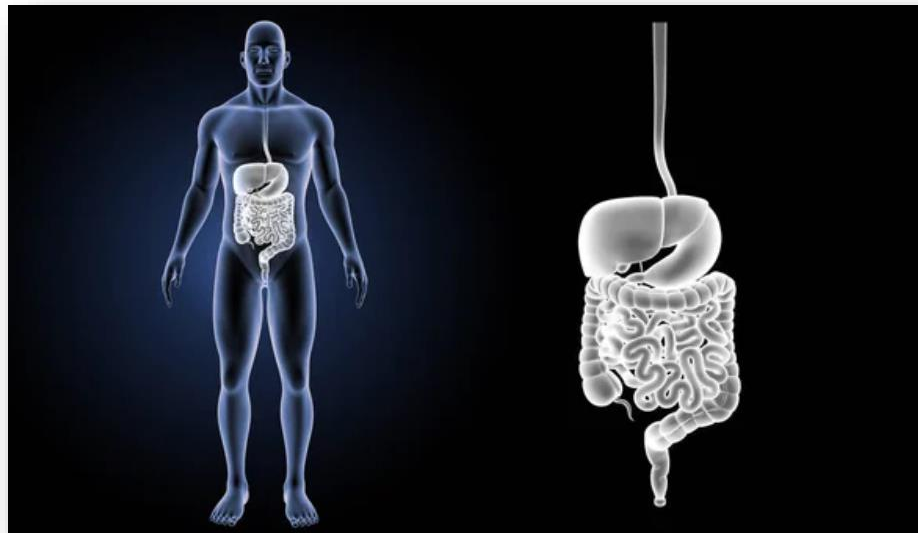


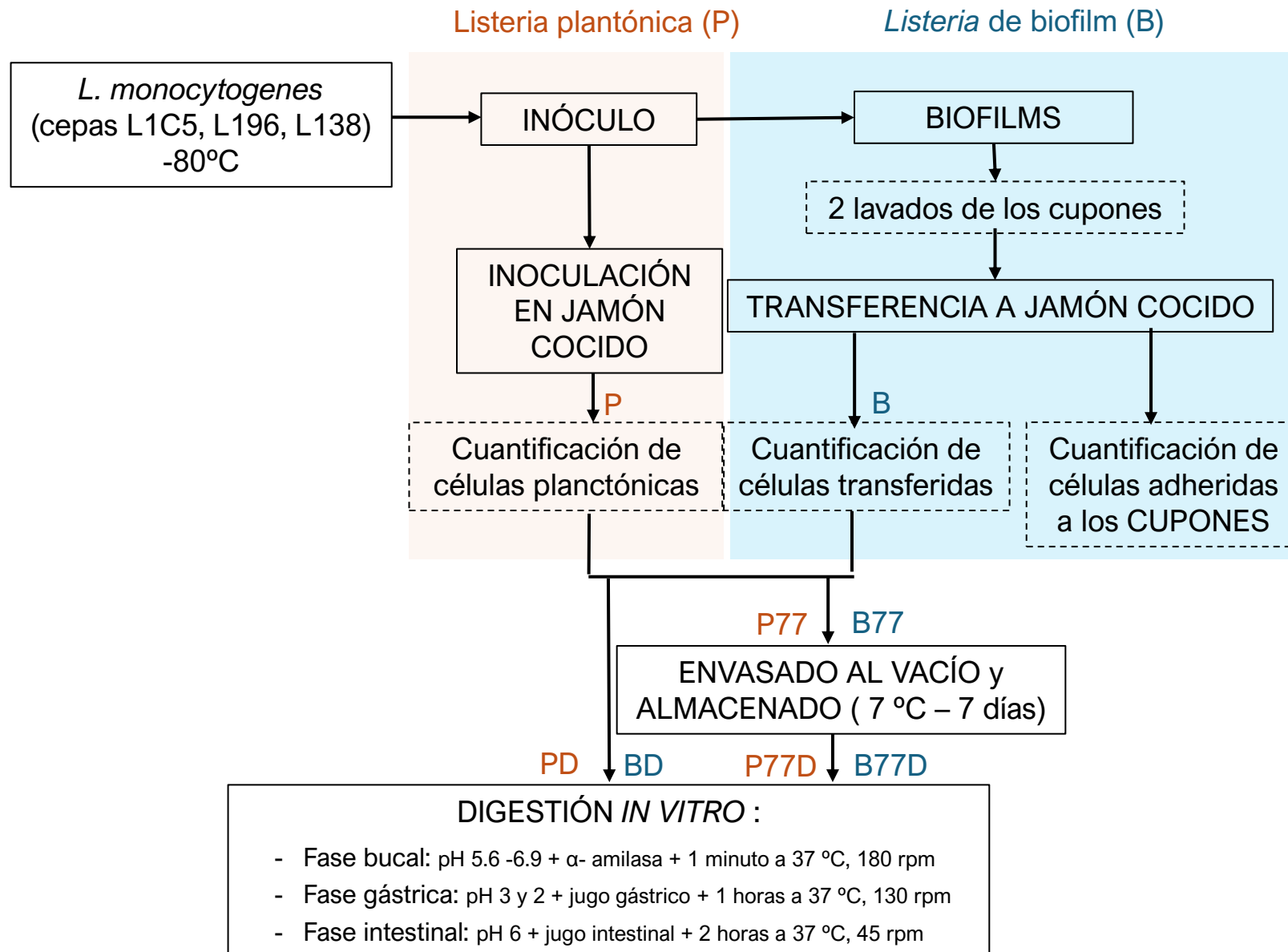
UNIVERSIDAD
DE
CÓRDOBA



- EKE
- Biofilm y transferencia
- **Fase gastrointestinal**
- Evaluación de riesgos

Más allá del alimento: ¿efecto del tracto gastrointestinal sobre *Listeria*?

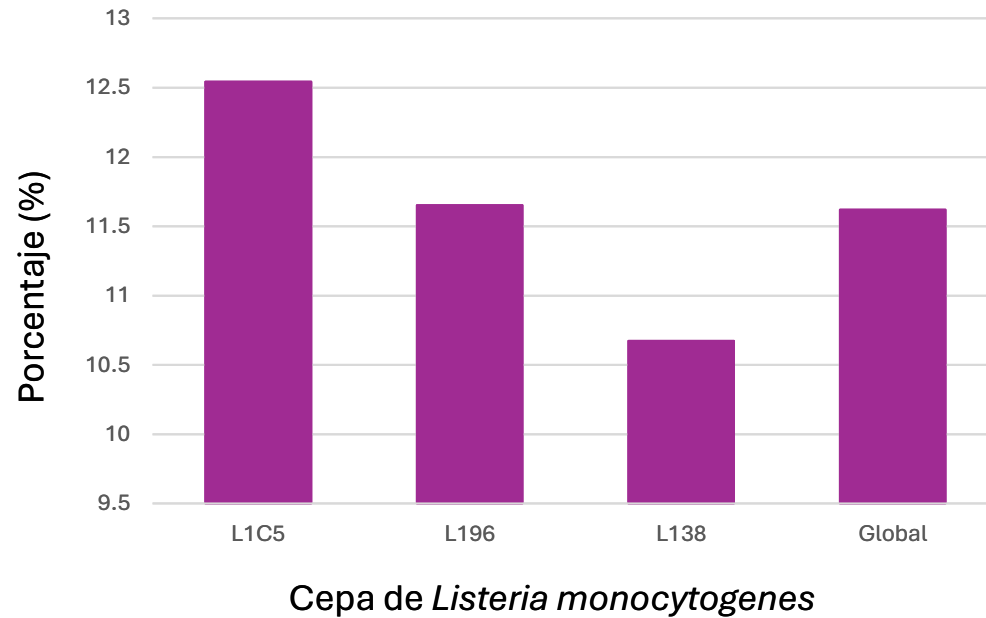




- EKE
- Biofilm y transferencia
- **Fase gastrointestinal**
- Evaluación de riesgos

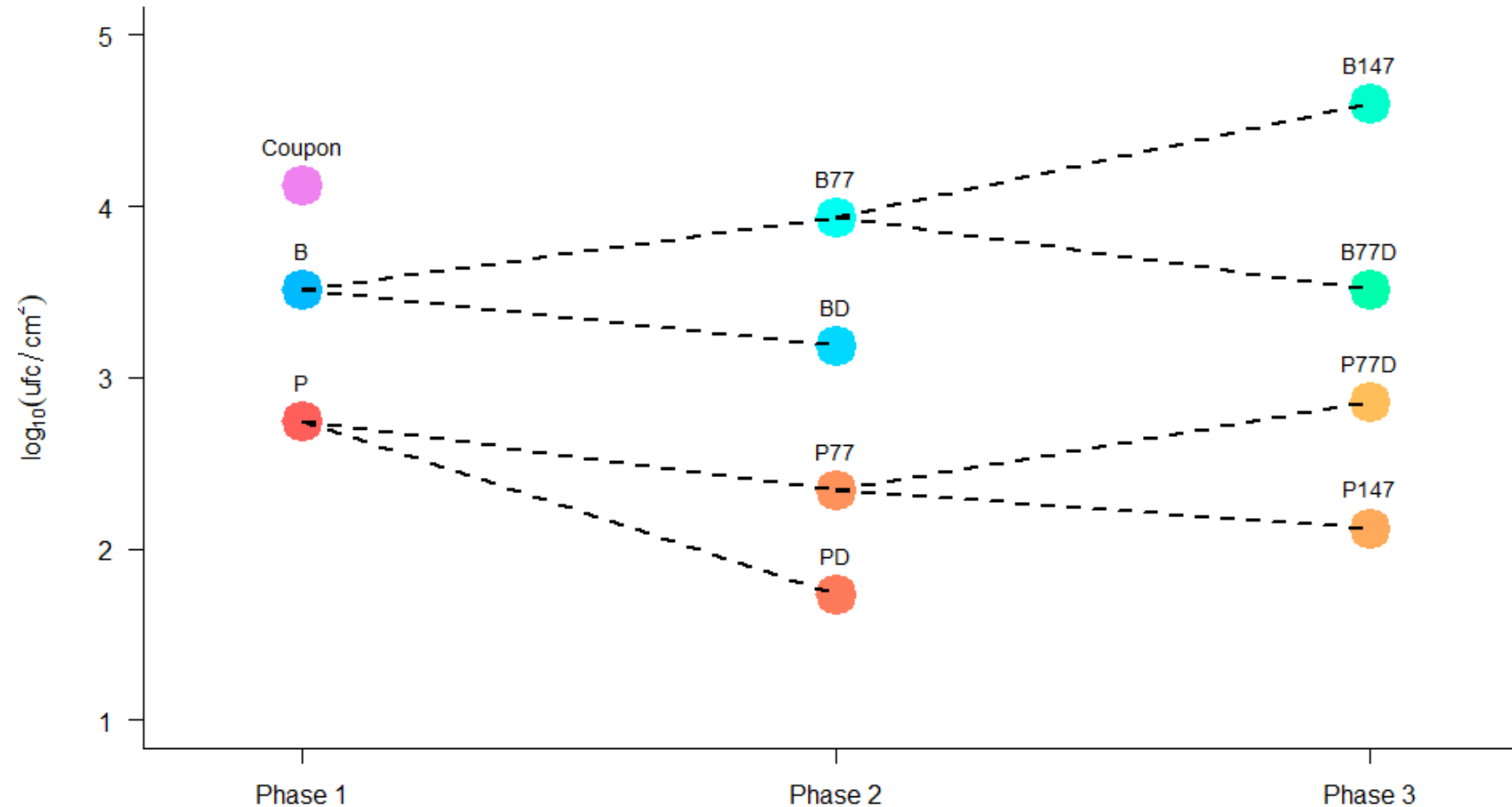
- EKE
- Biofilm y transferencia
- **Fase gastrointestinal**
- Evaluación de riesgos

Resultados: Tasas de transferencia de *L. monocytogenes*



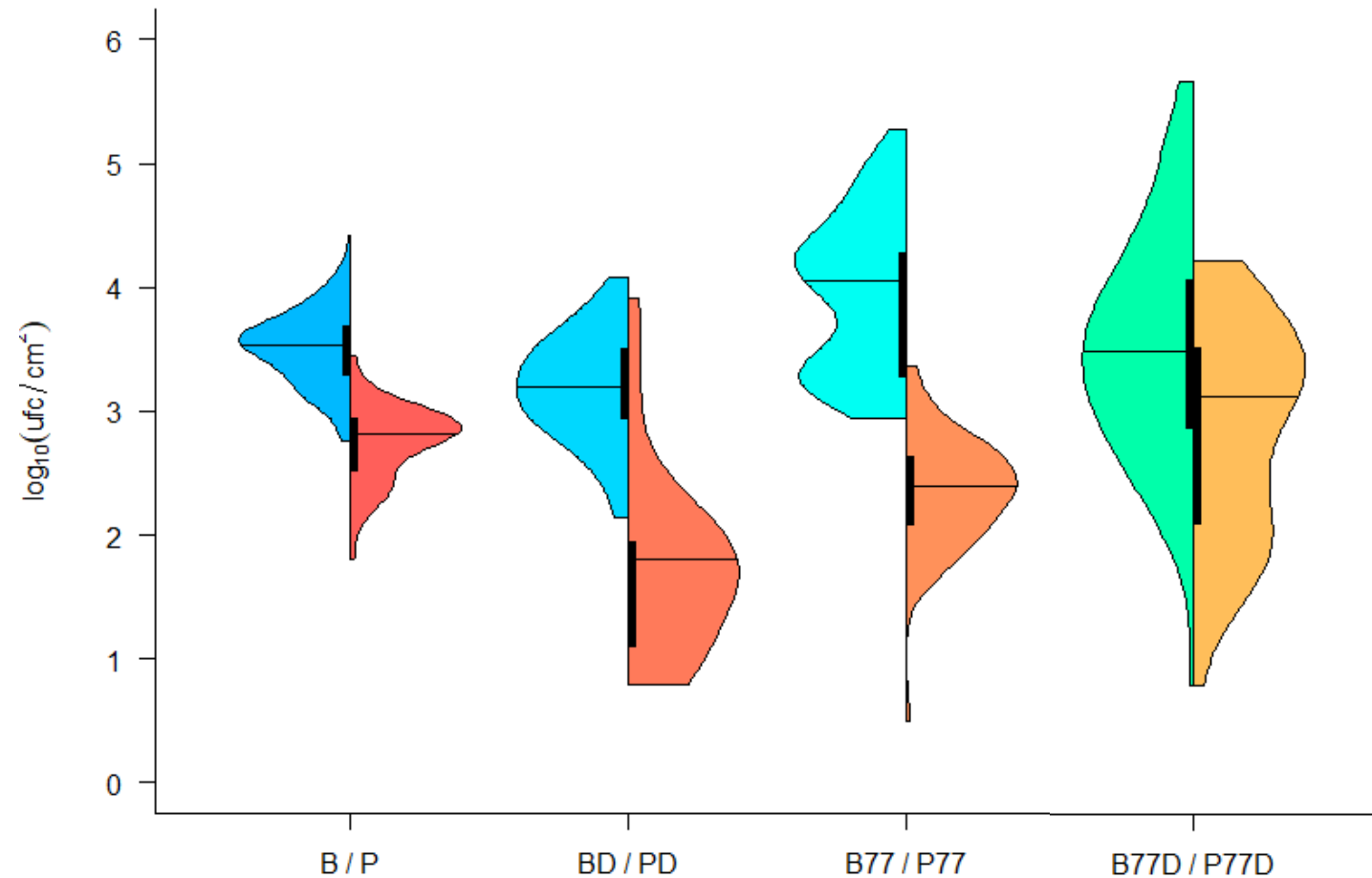
- EKE
- Biofilm y transferencia
- **Fase gastrointestinal**
- Evaluación de riesgos

Resultados: Concentración de *L. monocytogenes*



- EKE
- Biofilm y transferencia
- **Fase gastrointestinal**
- Evaluación de riesgos

Resultados: Concentración de *L. monocytogenes*



- EKE
- Biofilm y transferencia
- **Fase gastrointestinal**
- Evaluación de riesgos

Trabajo en curso:

Análisis genético mediante **PCR cuantitativa** de las células **planctónicas** y **transferidas** de **biofilm** de forma **previa** y **posterior a la digestión gastrointestinal simulada *in vitro*** para determinar los **genes de virulencia de *Listeria monocytogenes*** implicados.

Los genes de virulencia que se están estudiando son: 16 S, PLCB, PRFA, INLA, INLB, INLC, INLJ, ARG, PLCA, HLY, FLAA, SIGB, LMO2672.



- EKE
- Biofilm y transferencia
- **Fase gastrointestinal**
- Evaluación de riesgos

Conclusiones

1. Se demostró un **efecto protector del jamón cocido** sobre *L. monocytogenes*.
2. Se observa una **mayor supervivencia de las células de biofilm** en comparación con las células planctónicas. Y por tanto, una mayor resistencia de las células de *L. monocytogenes* en el estado de biofilm.
3. Tanto las células planctónicas como las transferidas desde biofilm han **sobrevivido a la digestión gastrointestinal simulada *in vitro* a pH 3**.
4. Para las tres cepas hubo un **crecimiento simbólico tras la digestión a pH 2** en todas las etapas estudiadas.
5. El estado de **biofilm** y la conservación en **refrigeración potencian la supervivencia del patógeno**.

JORNADA: *LISTERIA MONOCYTOGENES*. UN RETO PARA LA SEGURIDAD ALIMENTARIA

Evaluación del riesgo de listeriosis: factores a tener en cuenta

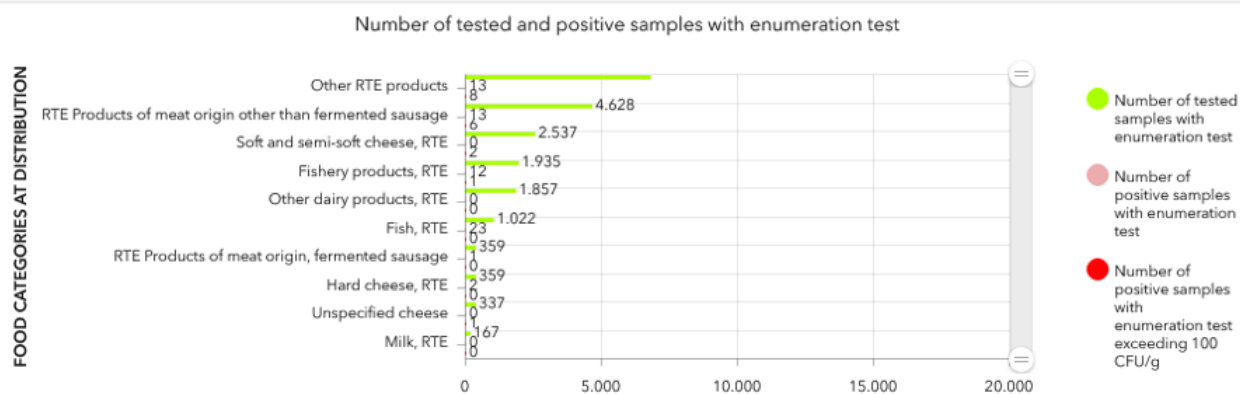
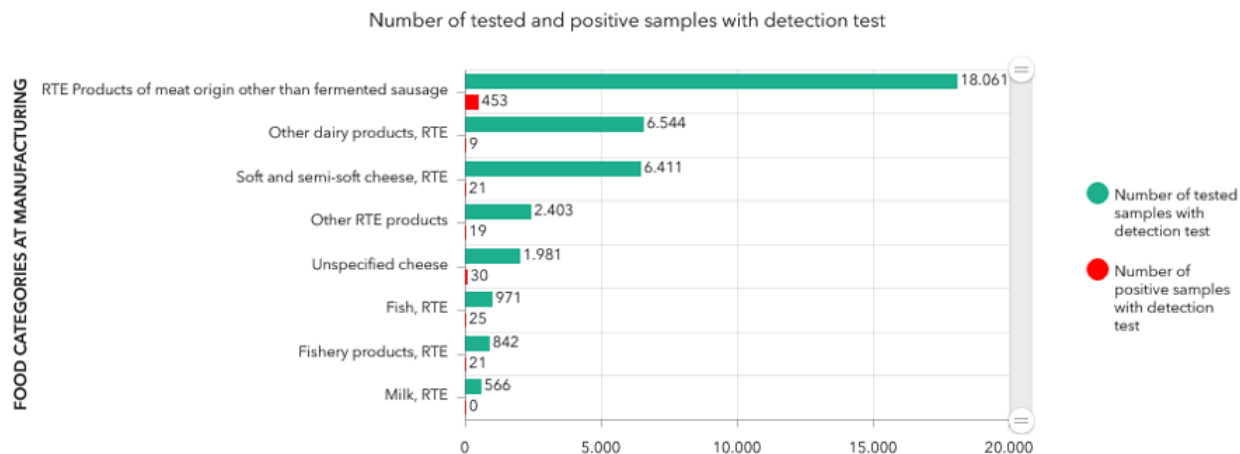


- EKE
- Biofilm y transferencia
- Fase gastrointestinal
- Evaluación de riesgos

Causas potenciales del incremento del riesgo de enfermedades de transmisión alimentaria

- ✓ Incremento en las tendencias de **consumo de alimentos de origen animal**;
- ✓ La **producción industrializada** y la **globalización** puede conllevar una mayor presencia de patógenos emergentes en alimentos;
- ✓ Cambio en los **estilos de vida** y **hábitos alimenticios** que resultan en un mayor consumo de alimentos listos para el consumo y fuera del hogar, donde la probabilidad de contaminación de alimentos podría ser mayor;
- ✓ Incremento de enfermedades de origen alimentario **inducidas por viajes**;
- ✓ Envejecimiento poblacional;
- ✓ **Inadecuadas prácticas de manipulación** durante la producción y distribución de alimentos

Listeriosis – uno de los principales problemas de seguridad alimentaria



Alerta alimentaria por presencia de *Listeria monocytogenes* en queso fresco de cabra y vaca de Andalucía

16.09.21

La Consejería de Salud y Familias, a través de la Dirección General de Salud Pública y Ordenación Farmacéutica, ha sido informada por la empresa Quesos Los Vázquez S.L., sita en la localidad de Castilleja del Campo (Sevilla) en aplicación de su sistema de autocontrol, de la presencia de *Listeria monocytogenes* en un lote de Queso fresco de leche de cabra y vaca en presentación de 250 grs. con fechas de caducidad 02.10.21. (Lote 0904-4) que han sido distribuidos en las provincias de Cádiz, Huelva y Sevilla, activando la empresa su protocolo de retirada del producto mediante comunicación a sus clientes.

Alerta por presencia de *Listeria monocytogenes* en productos cárnicos procedentes de España (Ref. 2023/272)

Junta de Andalucía
Consejería de Salud y Consumo

Salud a lo largo
de la vida

Sistema
sanitario
público

Seguridad
alimentaria

Más temas

La consejería

Servicios

Buscar

Inicio > Temas > Seguridad alimentaria > Alertas alimentarias >

Alerta alimentaria por presencia de *Listeria monocytogenes* en queso fresco de cabra y mezcla de Andalucía

Fecha y hora: 24/10/2023 16:30

04 de marzo

La Consejería de Salud y Familias, a través de la Dirección General de Salud Pública y Ordenación Farmacéutica, ha tenido conocimiento de la presencia de *Listeria monocytogenes* en queso fresco, semicurado y curado de cabra y mezcla que han sido distribuidos en la provincia de Málaga, procedentes de la empresa HERMANOS VARGAS JIMENEZ S.L sita en la localidad de San Pedro (Málaga), con la marca El Llano Jaral, refrigerados, presentados en envases de 2 kg, 1 kg, 500 gr y 250 gr, y en todos los formatos de caducidad. La empresa ha activado su protocolo de retirada del producto mediante comunicación a sus clientes.

Los datos de los productos implicados son:

- **NOMBRE DEL PRODUCTO:** QUESO FRESCO, SEMICURADO Y CURADO DE LECHE DE CABRA Y MEZCLA.
- **MARCA:** EL LLANO JARAL.
- **PRESENTACIÓN:** Envases de 2 kg, 1 kg, 500 gr y 250 gr.

La Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición (AESAN) ha sido informada por la comunidad autónoma de Andalucía, a través del Sistema Coordinado de Intercambio Rápido de Información (SCIRI), de la presencia de *Listeria monocytogenes* en productos cárnicos de la marca Industrias Cárnicas Sierra Nevada SL, con nº de RGSEA 0003545/GR.

Se recomienda a las personas que tengan en su domicilio los productos incluidos en esta alerta se abstengan de consumirlos.

La Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición ha tenido conocimiento a través del Sistema Coordinado de Intercambio Rápido de Información (SCIRI), de una notificación de alerta trasladada por las autoridades sanitarias de la Junta de Andalucía relativa a la presencia de *Listeria monocytogenes* en productos cárnicos de la marca Industrias Cárnicas Sierra Nevada SL.

Fases de la evaluación de riesgos

La **evaluación de riesgos** se basa en la evaluación científica de los efectos adversos conocidos y potenciales sobre la salud humana que surgen de la exposición a peligros originados en los alimentos.



**Actores de la esfera
alimentaria**

- ✓ Identificación del peligro
- ✓ Caracterización del peligro
- ✓ Evaluación de la exposición
- ✓ Caracterización del riesgo

- ✓ Transparencia
- ✓ Con base científica
- ✓ Enfoque de sistemas
- ✓ Integración de modelos matemáticos



Aplicaciones en evaluación de riesgos

Caracterización de la variabilidad de cepas de *L. monocytogenes* de origen clínico y alimentario

Objetivo

Conocer el comportamiento de cepas aisladas de *L. monocytogenes* en relación con su resistencia a condiciones de pH y [NaCl], estudiando el efecto de la procedencia de las mismas a través del desarrollo de modelos predictivos.



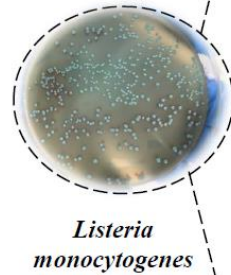
Inter-strain variability on the cardinal parameters (pH and A_w) of clinical and food isolates of *Listeria monocytogenes* using turbidimetric measurements

Salud María Serrano Heredia^{a,*}, Yvan Le Marc^b, Javier Sánchez Martín^a, Arícia Possas^a, Elena Carrasco Jiménez^{a,*}, Antonio Valero Díaz^a

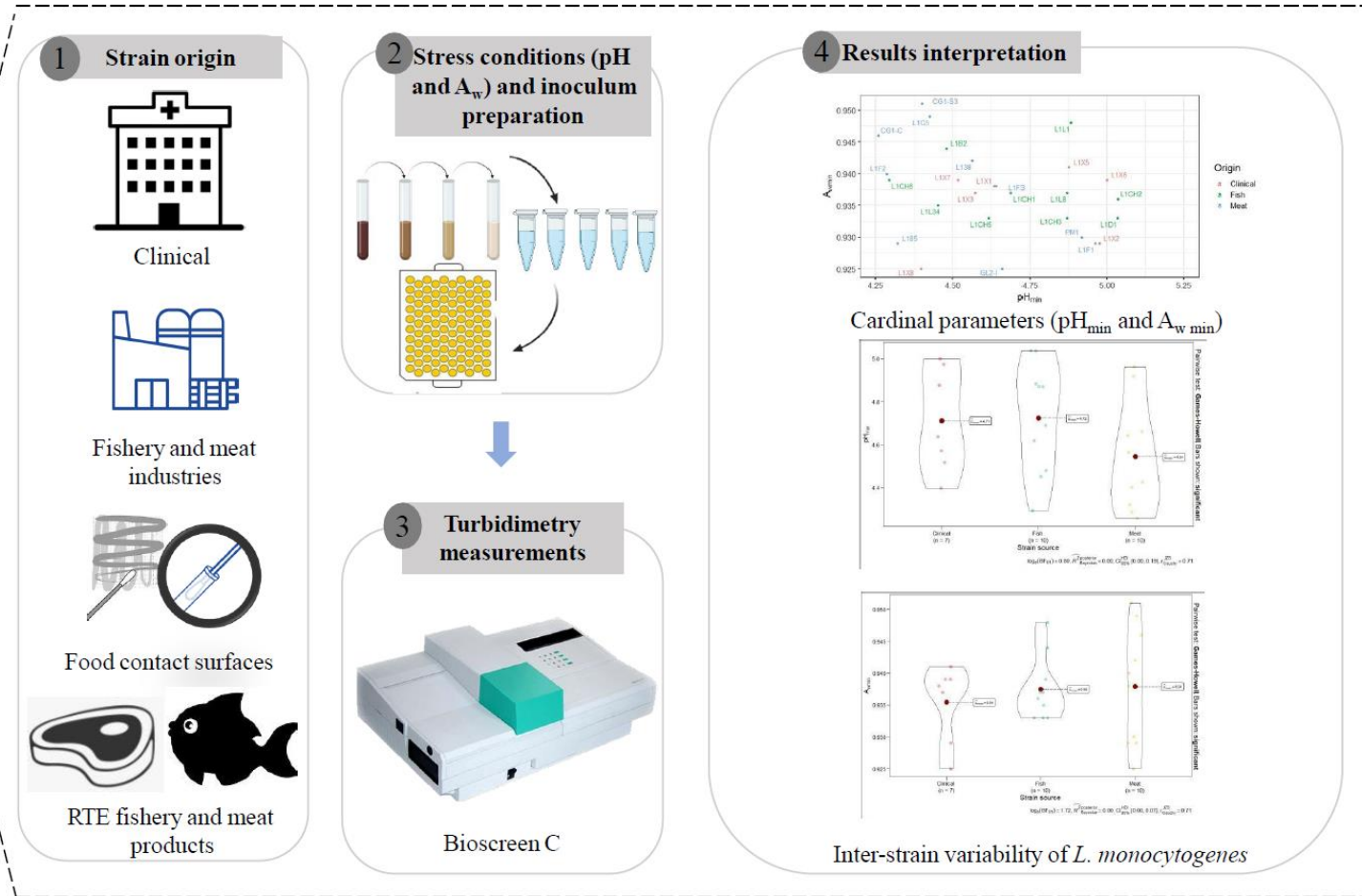
Aplicaciones en evaluación de riesgos

26 cepas:

- 7 Origen clínico
- 10 industrias pesqueras (superficies y producto)
- 9 industrias cárnicas (superficies y producto)

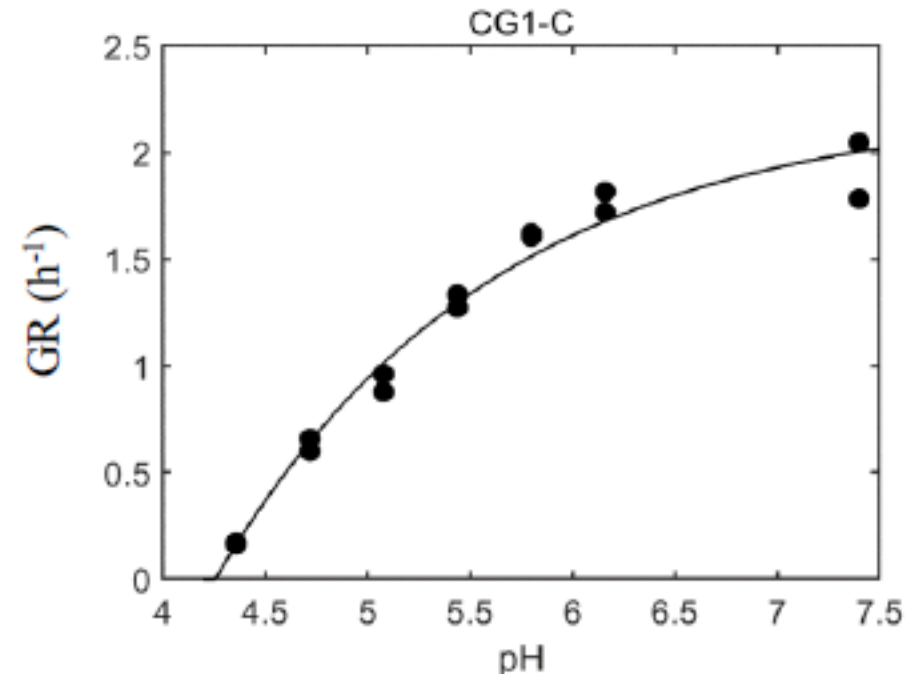
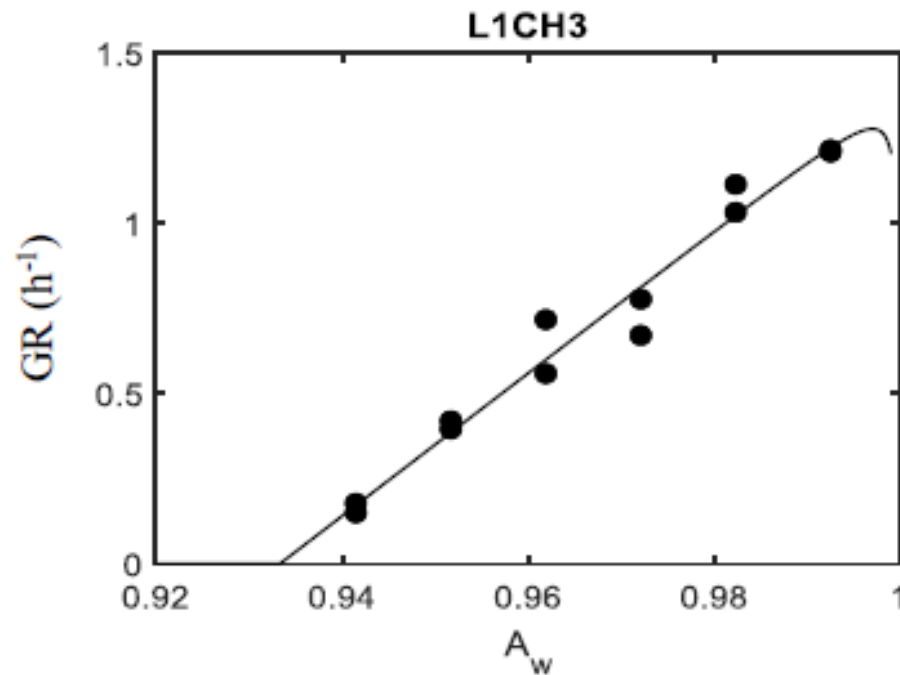


Listeria monocytogenes



Aplicaciones en evaluación de riesgos

Ajuste de modelos de microbiología predictiva

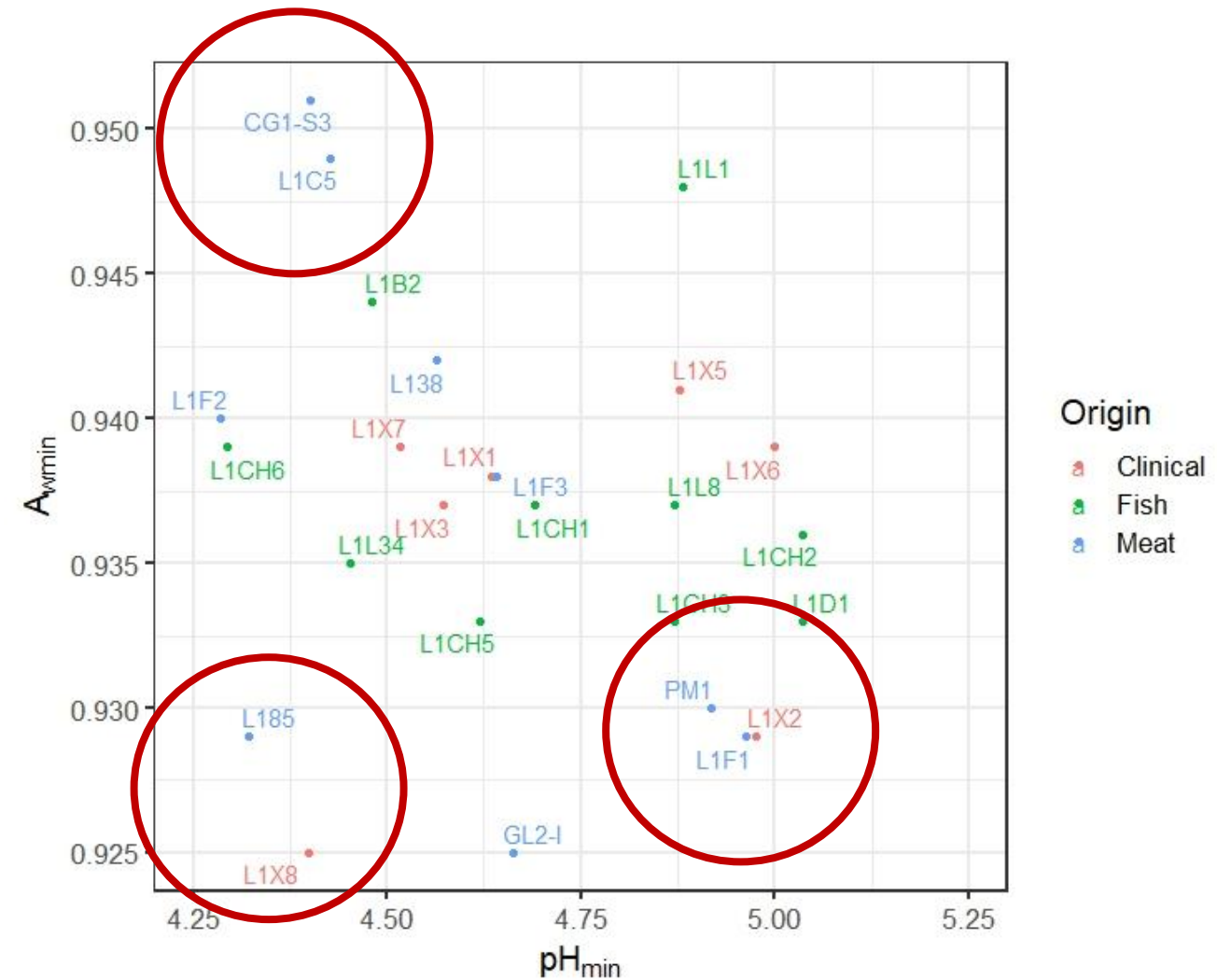


Aplicaciones en evaluación de riesgos

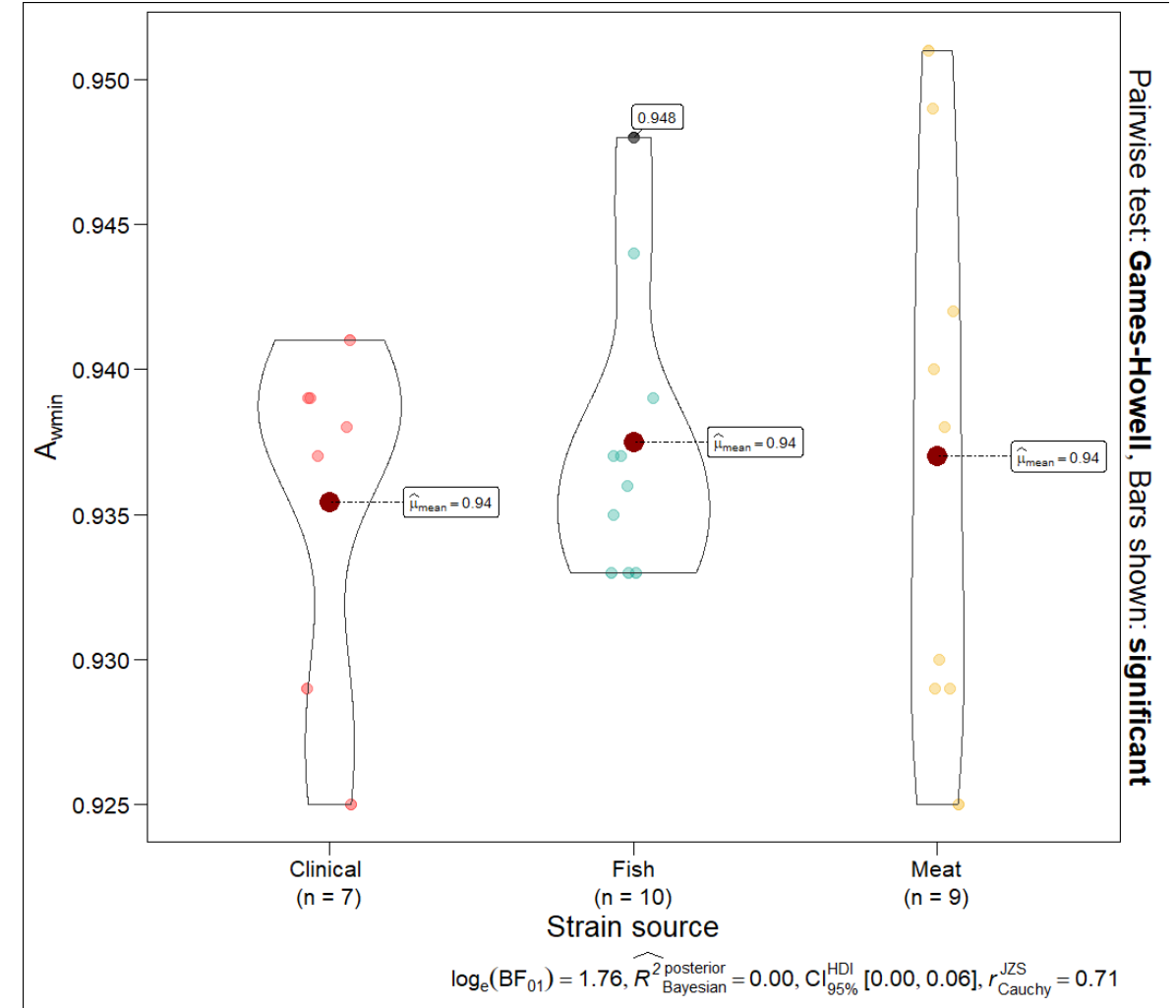
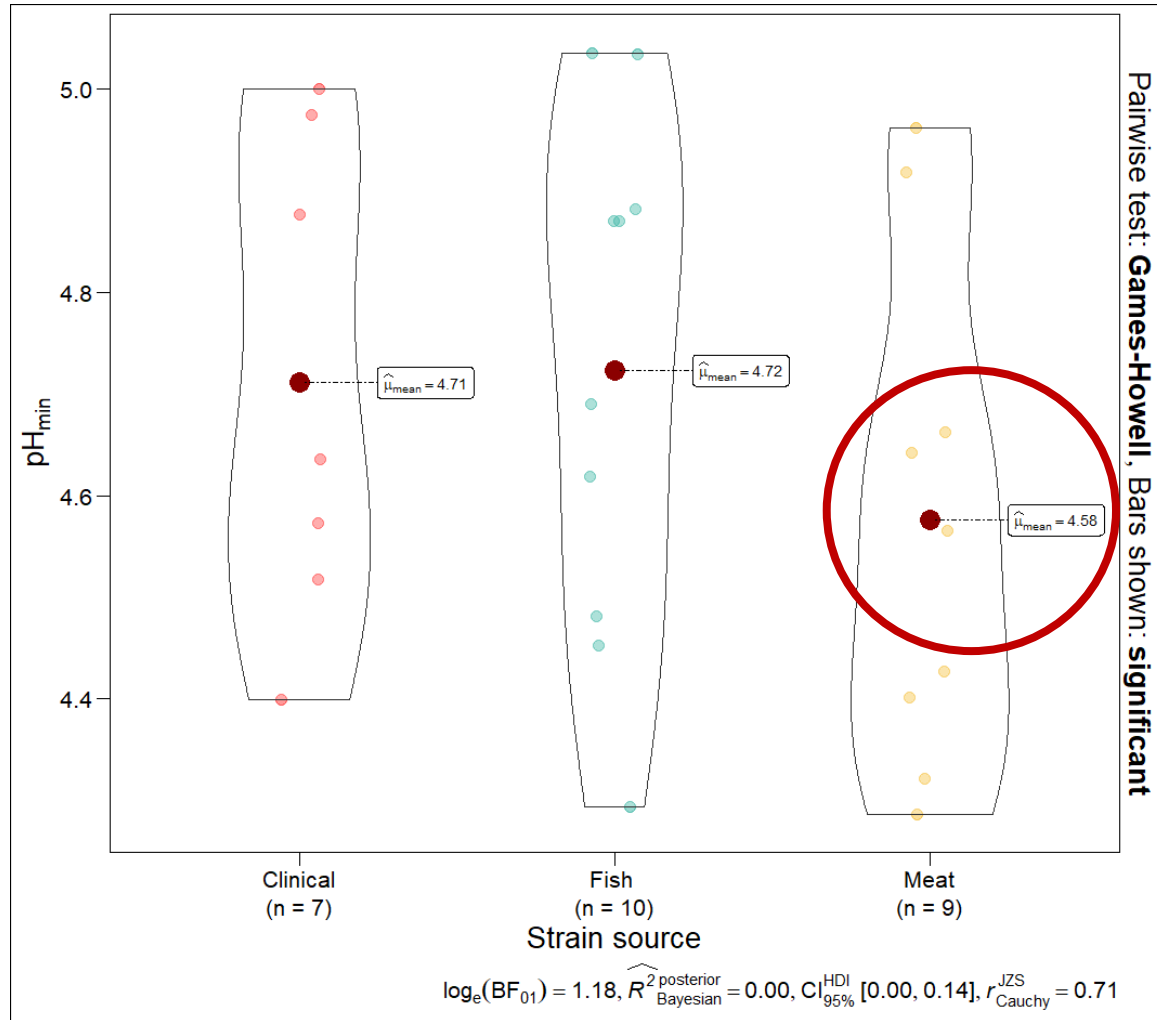
Las cepas procedentes de **industrias cárnicas** presentan valores de pH y a_w más extremos

En general, **alta variabilidad biológica** en cuanto a la resistencia a condiciones de estrés para las cepas seleccionadas.

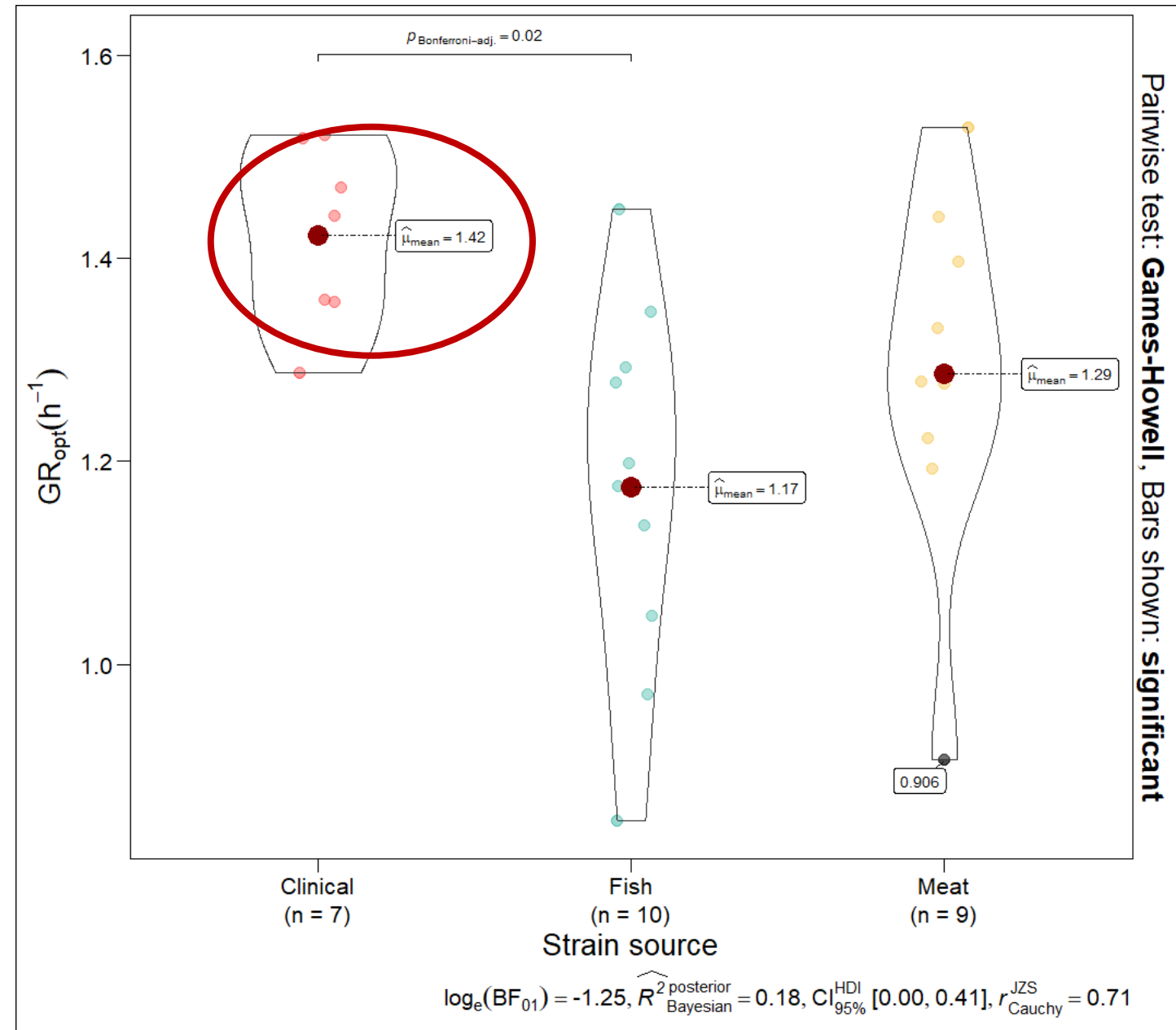
Implicaciones directas sobre la estimación del riesgo: **capacidad de supervivencia** durante el almacenamiento.



Aplicaciones en evaluación de riesgos



Crecimiento más rápido de **cepas de origen clínico**



Conclusiones

- ✓ La resistencia a la inhibición debido a condiciones limitantes de NaCl y pH refleja una alta variabilidad entre las cepas de *L. monocytogenes*.
- ✓ Los parámetros calculados de *L. monocytogenes* se han incorporado en modelos de microbiología predictiva para considerar la variabilidad natural existente en el crecimiento del patógeno.