

La persistencia de *Listeria monocytogenes* en industrias alimentarias desde una perspectiva genómica.

Avelino Álvarez Ordóñez / Universidad de León



UNIVERSIDAD
DE
CÓRDOBA



AseQura



- *L. monocytogenes* considerado entre los principales patógenos persistentes en ambientes de procesado en industrias alimentarias
- Con alto impacto en salud pública en:
 - Carne y productos cárnicos
 - Pescados
 - Productos lácteos
 - Productos vegetales
- Con pruebas sólidas de brotes relacionados con cepas persistentes en el ambiente de la planta de producción
- Con numerosos estudios que han demostrado el aislamiento en nichos de forma recurrente durante años

Persistence of microbiological hazards in food and feed production and processing environments

EFSA Panel on Biological Hazards (BIOHAZ) | Konstantinos Koutsoumanis | Ana Allende | Declan Bolton | Sara Bover-Cid | Marianne Chemaly | Alessandra De Cesare | Lieve Herman | Friederike Hilbert | Roland Lindqvist | Maarten Nauta | Romolo Nonno | Luisa Peixe | Giuseppe Ru | Marion Simmons | Panagiotis Skandamis | Elisabetta Suffredini | Edward Fox | Rebecca (Becky) Gosling | Beatriz Melero Gil | Trond Møretrø | Beatrix Stessl | Maria Teresa da Silva Felício | Winy Messens | Ancuta Cezara Simon | Avelino Alvarez-Ordóñez

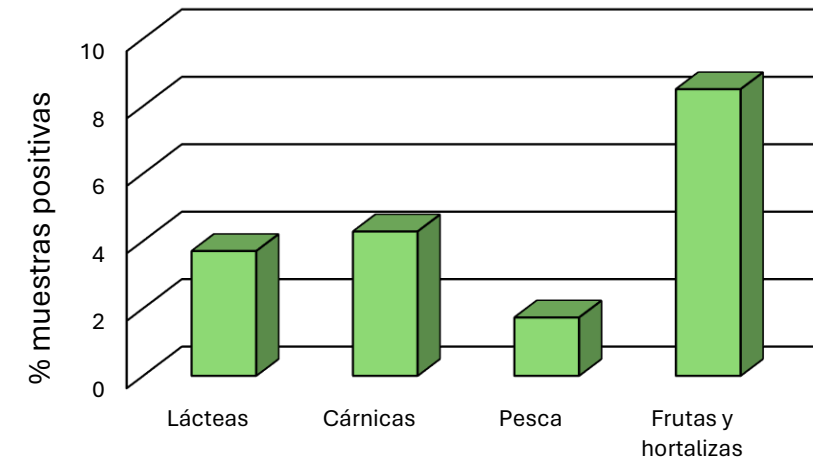
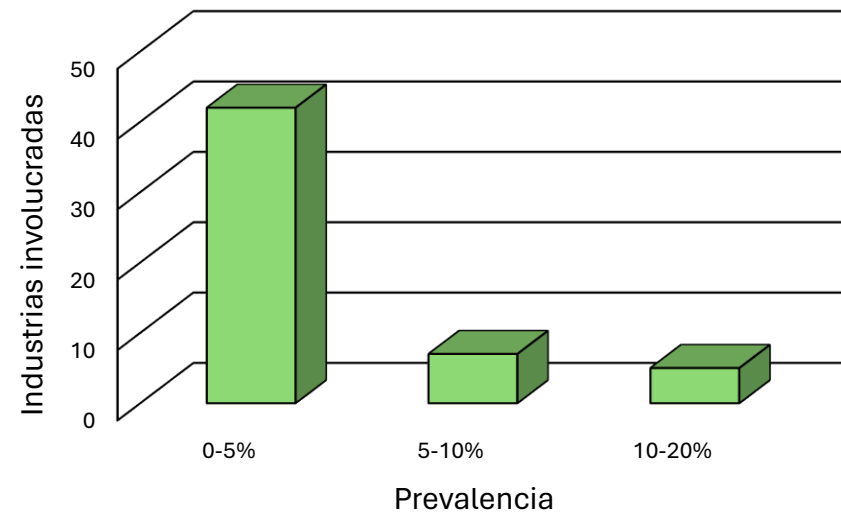
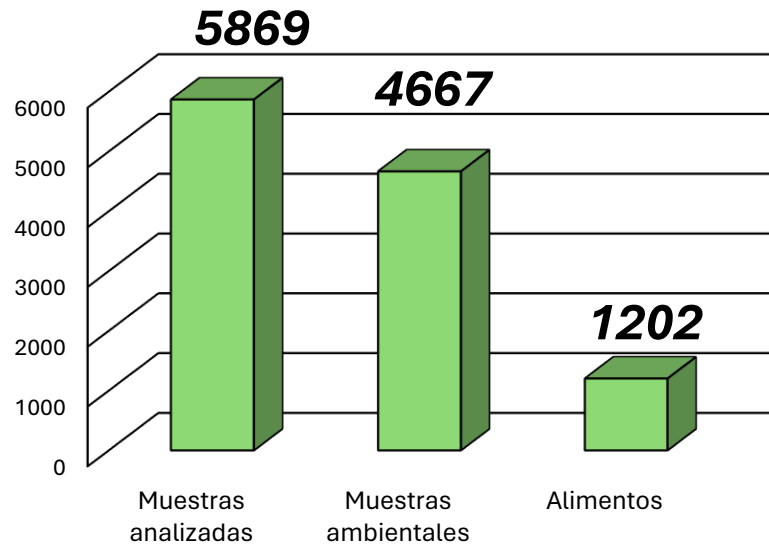
TABLE 2 Overview of bacterial hazards of the highest public health (PH) relevance in the various food and feed production and processing sectors in the EU/EEA indicating which of those have been assessed as most relevant for persistence in the respective FFPE of these sectors.

Bacterial pathogen	Pathogens of highest PH relevance in sector and/or persisting in the FFPE of sector						
	F	M	FS	D	E	FV	LMF
<i>Bacillus cereus sensu lato</i>							
<i>Campylobacter jejuni/coli</i>							
<i>Clostridium botulinum/perfringens</i>							
<i>Cronobacter sakazakii</i>							
<i>Listeria monocytogenes</i>							
Pathogenic <i>E. coli</i>							
<i>Staphylococcus aureus</i>							
<i>Salmonella enterica</i>							
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>							

Notes: Orange cells: bacterial pathogens of highest PH relevance in the specified/specific sector but not considered as most relevant bacterial food safety hazards associated with persistence in the FFPE in the specified/specific sector; Red cells: bacterial pathogens of highest PH relevance and considered as most relevant bacterial food safety hazards associated with persistence in the FFPE in the specified/specific sector; blank cells: bacterial pathogens not considered of highest PH relevance in the specified/specific sector.

Abbreviations: F, feed for food animal production sector; M, meat sector, excluding low moisture food (LMF) products; FS, fish and seafood sector, excluding LMF products; D, dairy sector, excluding LMF products; E, egg sector, excluding LMF products; FV, fruit and vegetable sector, excluding LMF products; LMF, low moisture food sector.

- La contaminación de alimentos y ambientes de procesado en industrias no es infrecuente
- Hay una pequeña proporción de industrias con serios problemas de contaminación recurrente en alimentos y ambientes de producción



A 3-year multi-food study of the presence and persistence of *Listeria monocytogenes* in 54 small food businesses in Ireland



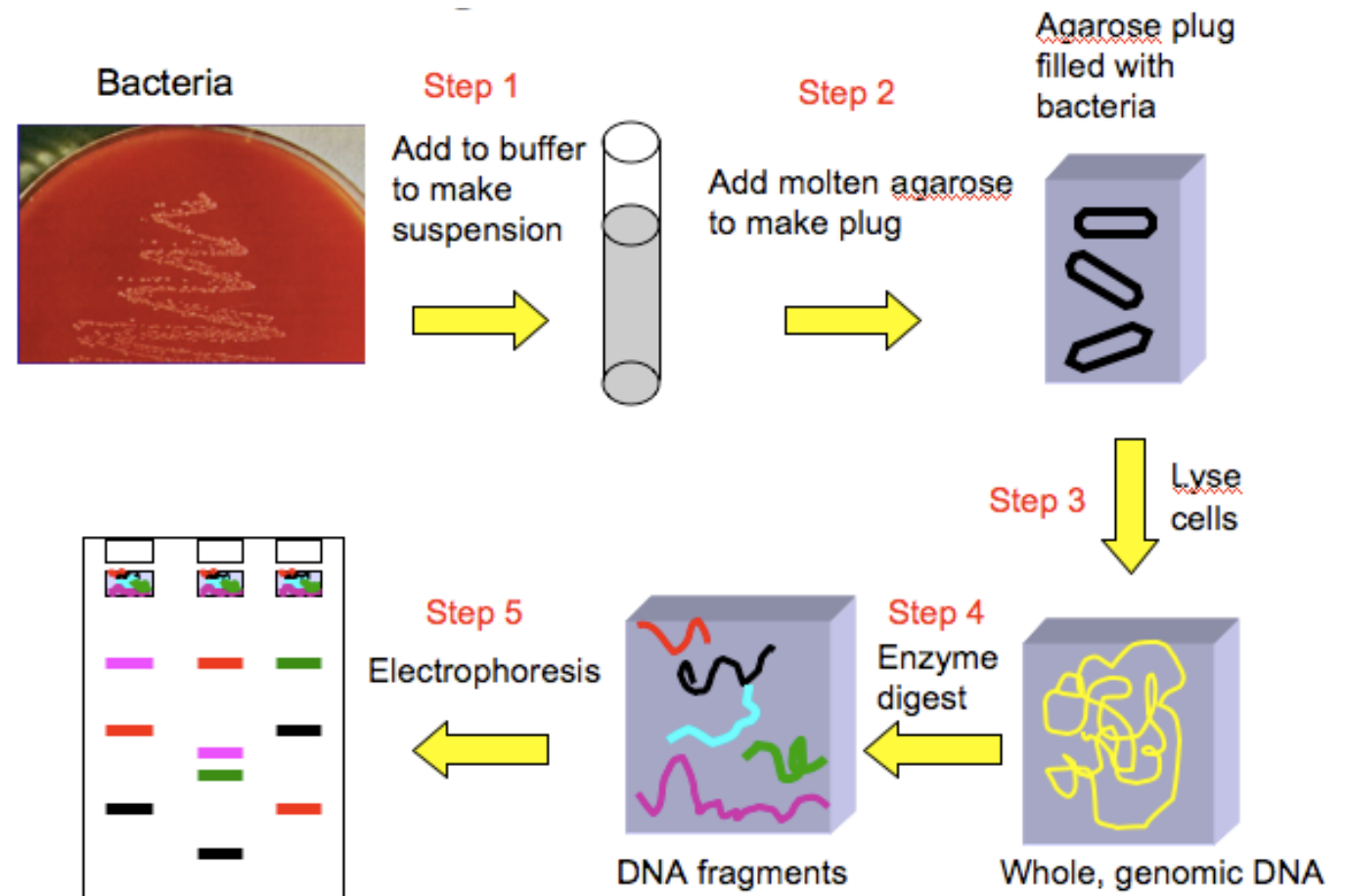
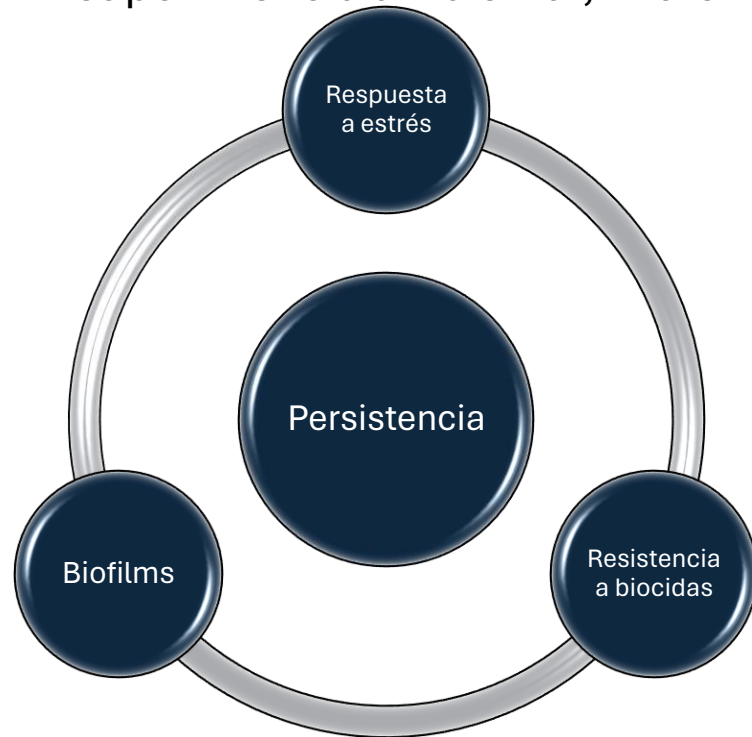
Dara Leong ^{a,1}, Kerrie NicAogáin ^{b,1}, Laura Luque-Sastre ^{c,1}, Oisín McManamon ^d, Karen Hunt ^a, Avelino Álvarez-Ordóñez ^{a,2}, Johann Scollard ^{a,d}, Achim Schmalenberger ^d, Séamus Fanning ^c, Conor O'Byrne ^b, Kieran Jordan ^{a,*}

¿QUÉ ES LA PERSISTENCIA?

- Microbial 'persistence' can be defined as the ability of a given organism to be established in niches (or harbourage sites) within the processing environment for a long term, despite the frequent application of cleaning and disinfection.
 - It requires prolonged existence usually with multiplication of the microorganism in the specific niche. It is a phenomenon which may lead to recurrent food contamination events and is normally detected through the repeated isolation from the same premises or equipment on different dates (spanning months or years) of strains that are subsequently identified as highly related subtypes.
 - Persistence does not include continuous reintroduction in the facility of the same organism, although in practice it is often not possible to distinguish between both phenomena.
 - **LA IDENTIFICACIÓN DE UN EVENTO DE PERSISTENCIA REQUIERE LA UTILIZACIÓN DE UN MÉTODO DE TIPIFICACIÓN CON ALTO PODER DISCRIMINANTE**
-

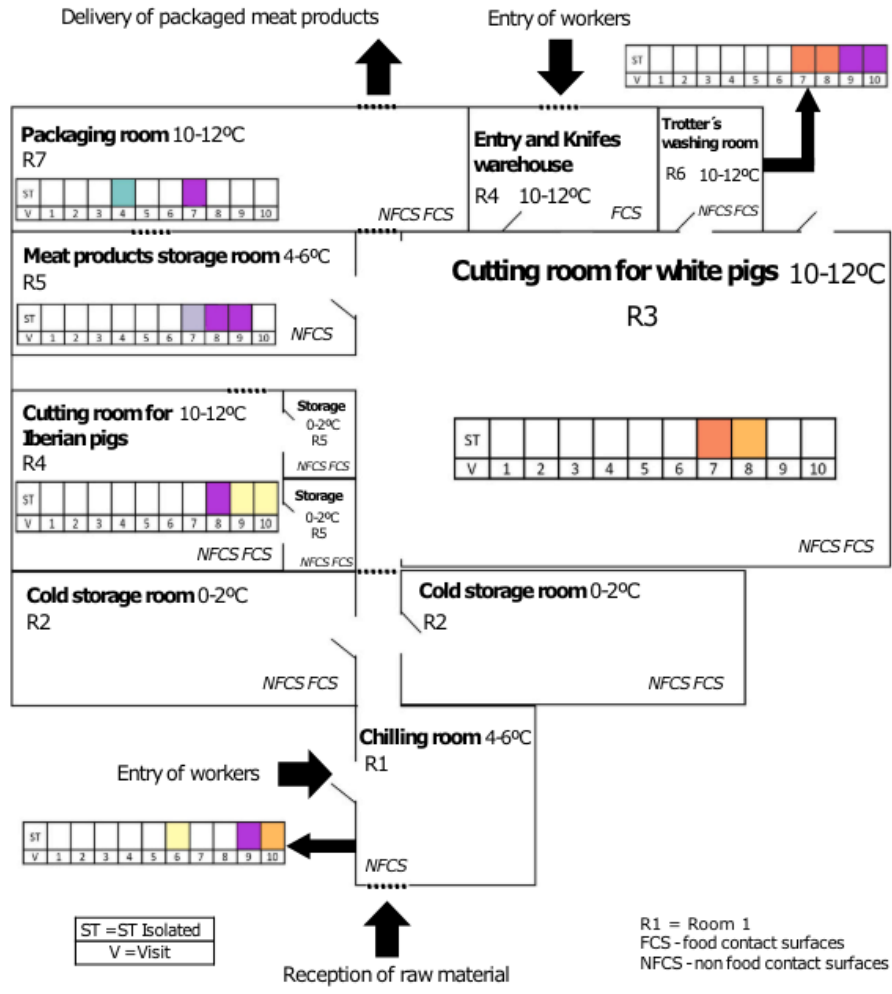
¿CÓMO SE CONFIRMA LA PERSISTENCIA?

- Los métodos clásicos de tipificación molecular tienen ciertas limitaciones:
 - Poder discriminante a veces limitado
 - Técnicas tediosas
 - No aportan información sobre determinantes genéticos asociados a supervivencia ambiental, virulencia, etc

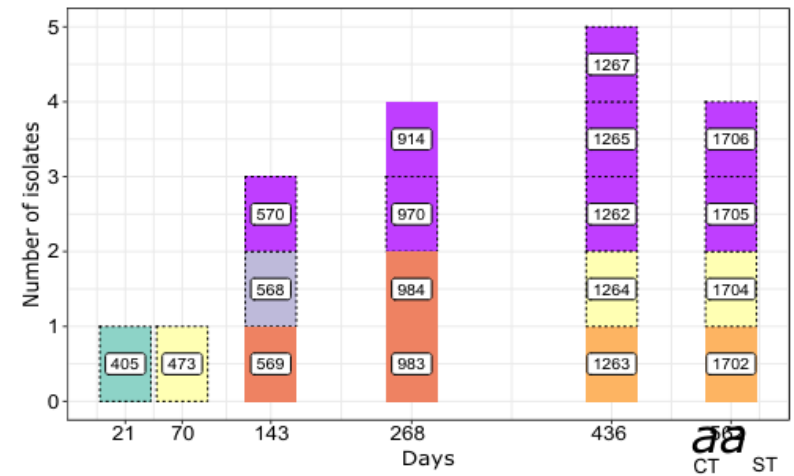


- Están siendo remplazados por análisis de genoma completo

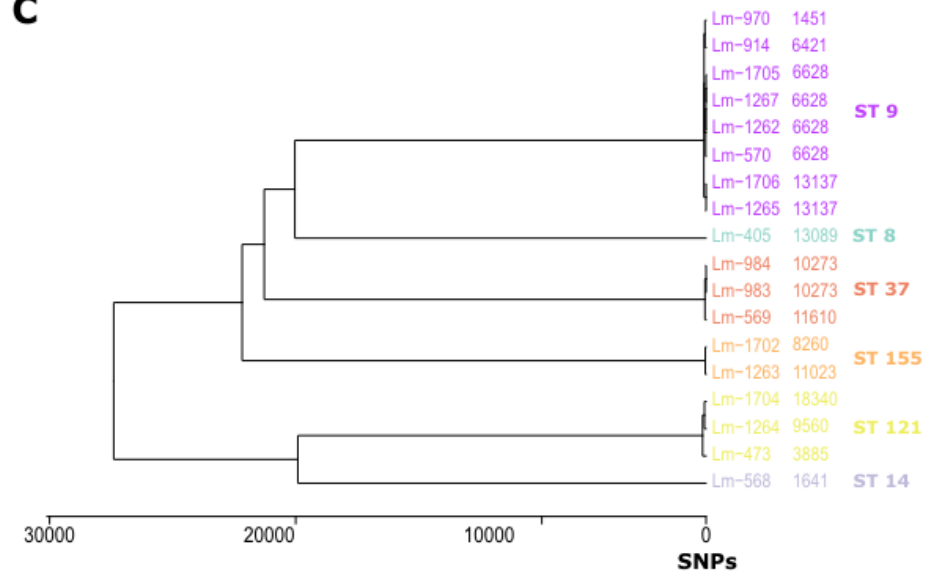
A



B

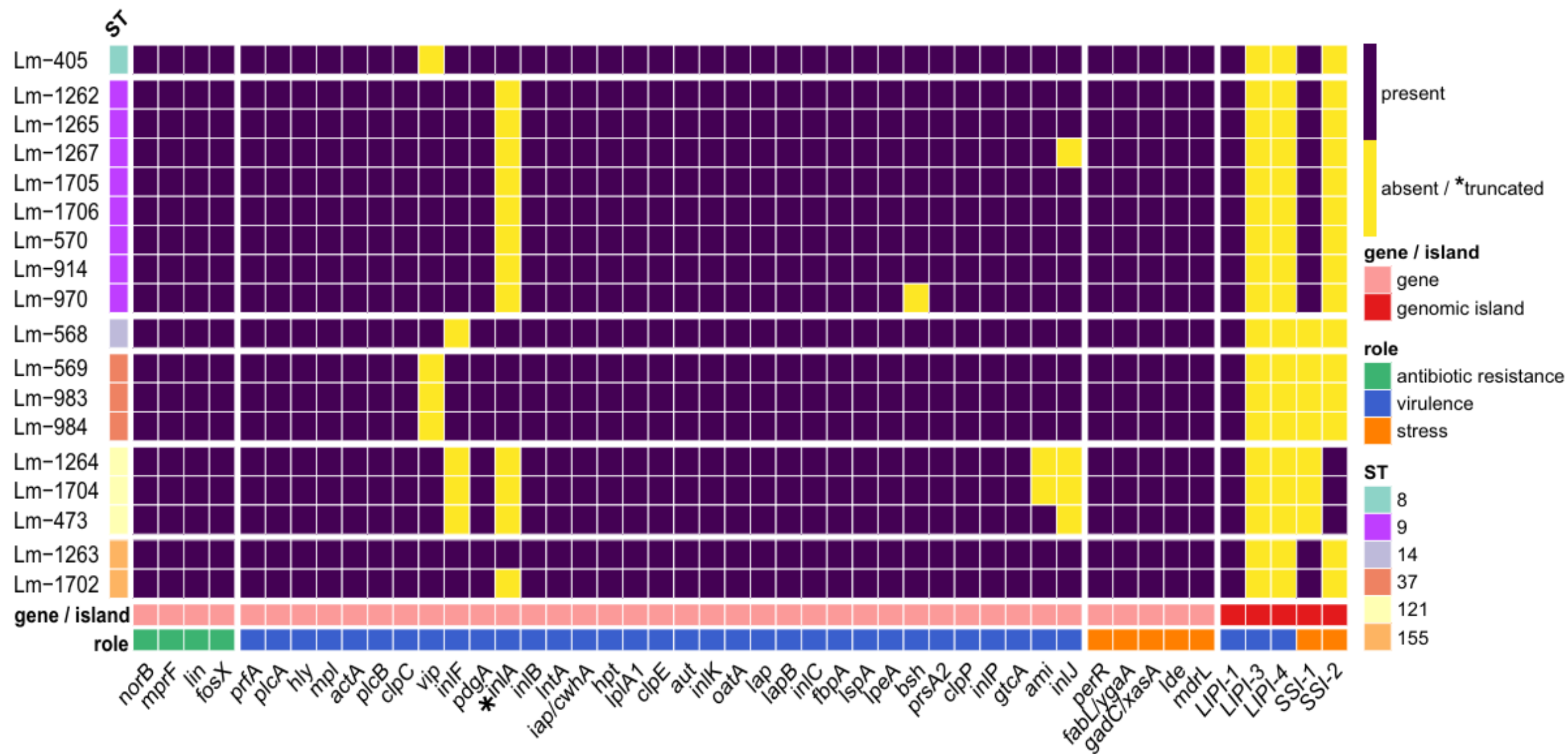


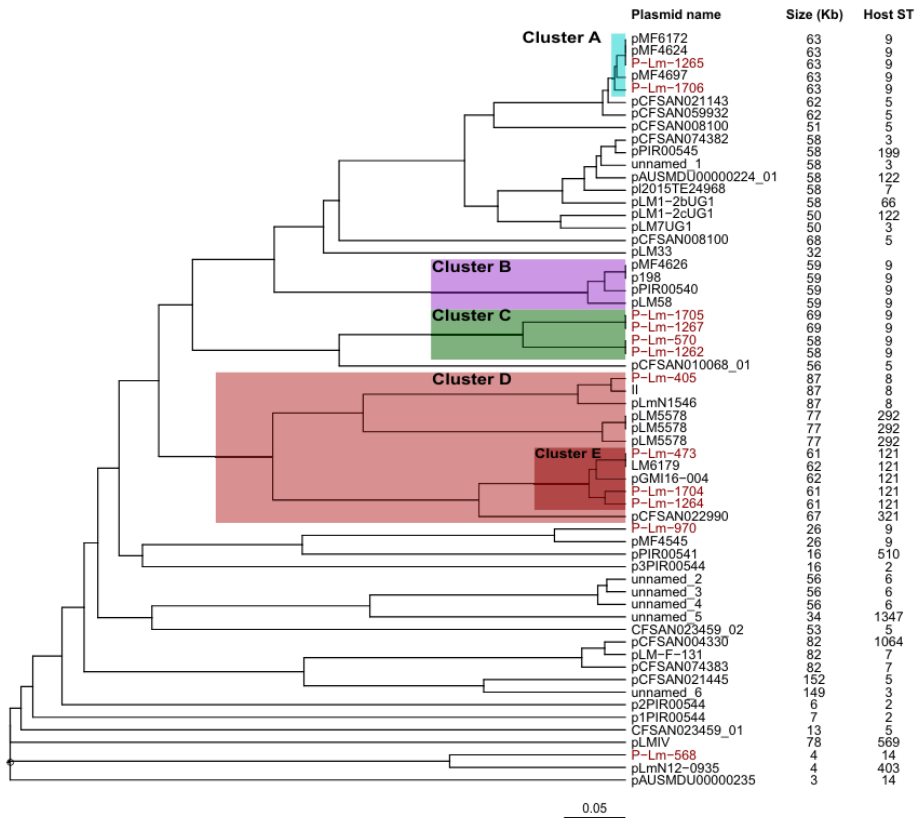
C



Unraveling the emergence and population diversity of *Listeria monocytogenes* in a newly built meat facility through whole genome sequencing

Adrián Álvarez-Molina^a, José F. Cobo-Díaz^a, Mercedes López^{a,b}, Miguel Prieto^{a,b}, María de Toro^{a,c}, Avelino Álvarez-Ordóñez^{a,b,c}

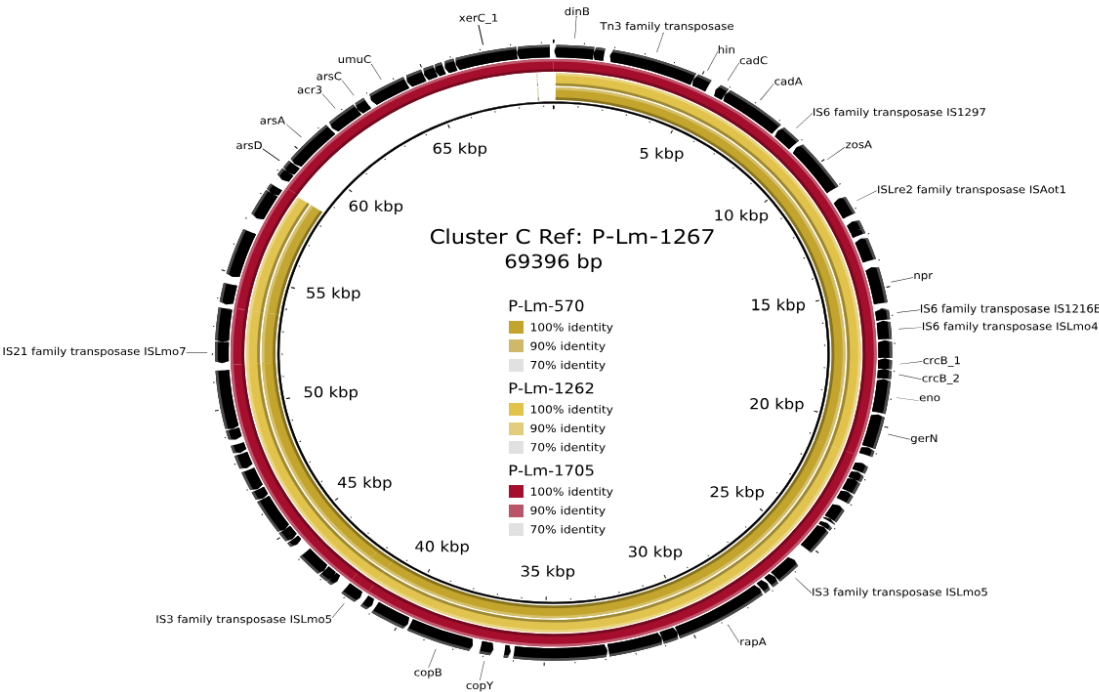




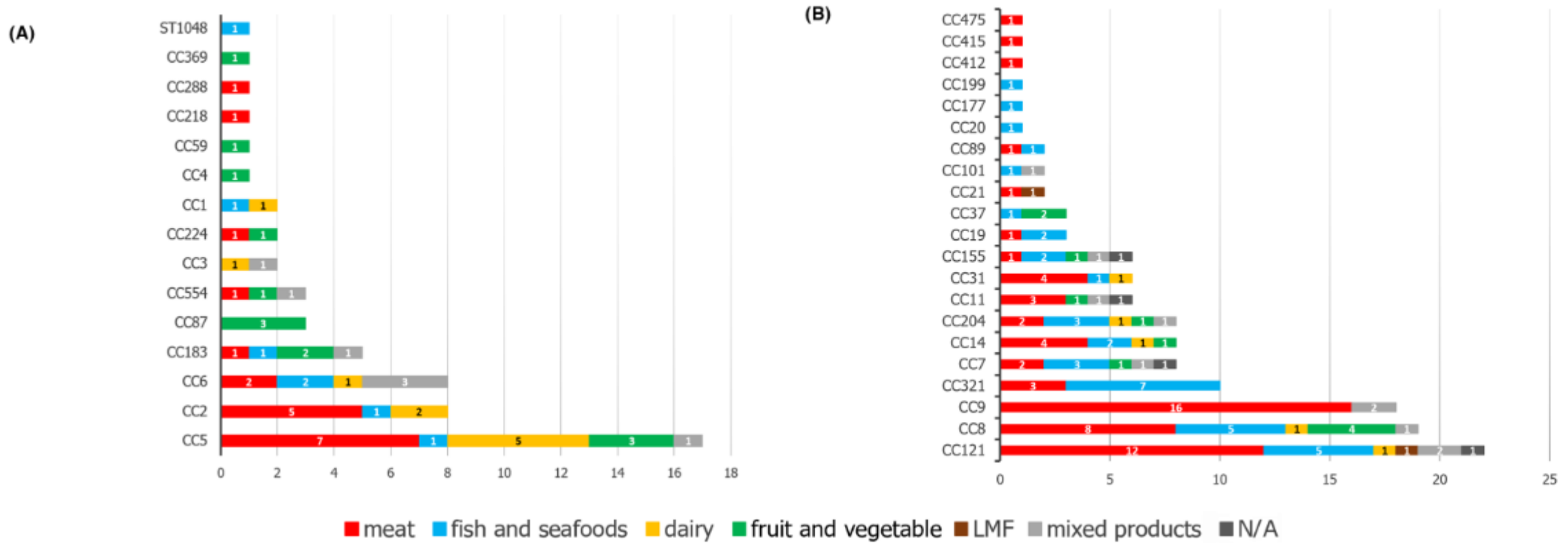
Relevant features for environmental persistence conveyed by plasmids of different clusters.

		Cluster A	Cluster B	Cluster C	Cluster E
Metal resistance	Arsenic			<i>arsA, arsC, arsD and acr3</i> *	
	Cadmium	<i>cadA, cadC</i>	<i>cadA, cadC</i>	<i>cadA, cadC</i>	<i>cadA, cadC</i>
	Copper		<i>copB, mco</i>	<i>copB, copY</i>	
	Zinc			<i>zsaA</i>	
Stress response	General		Heavy metal translocator		
	Bacteriocin				CPBP metalloprotease
	Cell wall		<i>yhdK</i>		
	Osmotic	Glycine ABC transporter			
	Oxidative	FAD oxidoreductase	FAD oxidoreductase, <i>fetB</i>		
	Saline			<i>rapA</i>	
	Temperature	Clp protease	Clp protease		Clp protease
	Ultraviolet light			<i>umuC</i> *	
Biocides resistance	Benzalkonium chloride	<i>bcrA, bcrB and bcrC</i> cassette			
	Fluorides			<i>crcB_1, crcB_2</i>	

This summary table has been extracted after comparison of BRIG output files, * genes present in a 9 Kb fragment that differentiates two kinds of plasmids in cluster C.

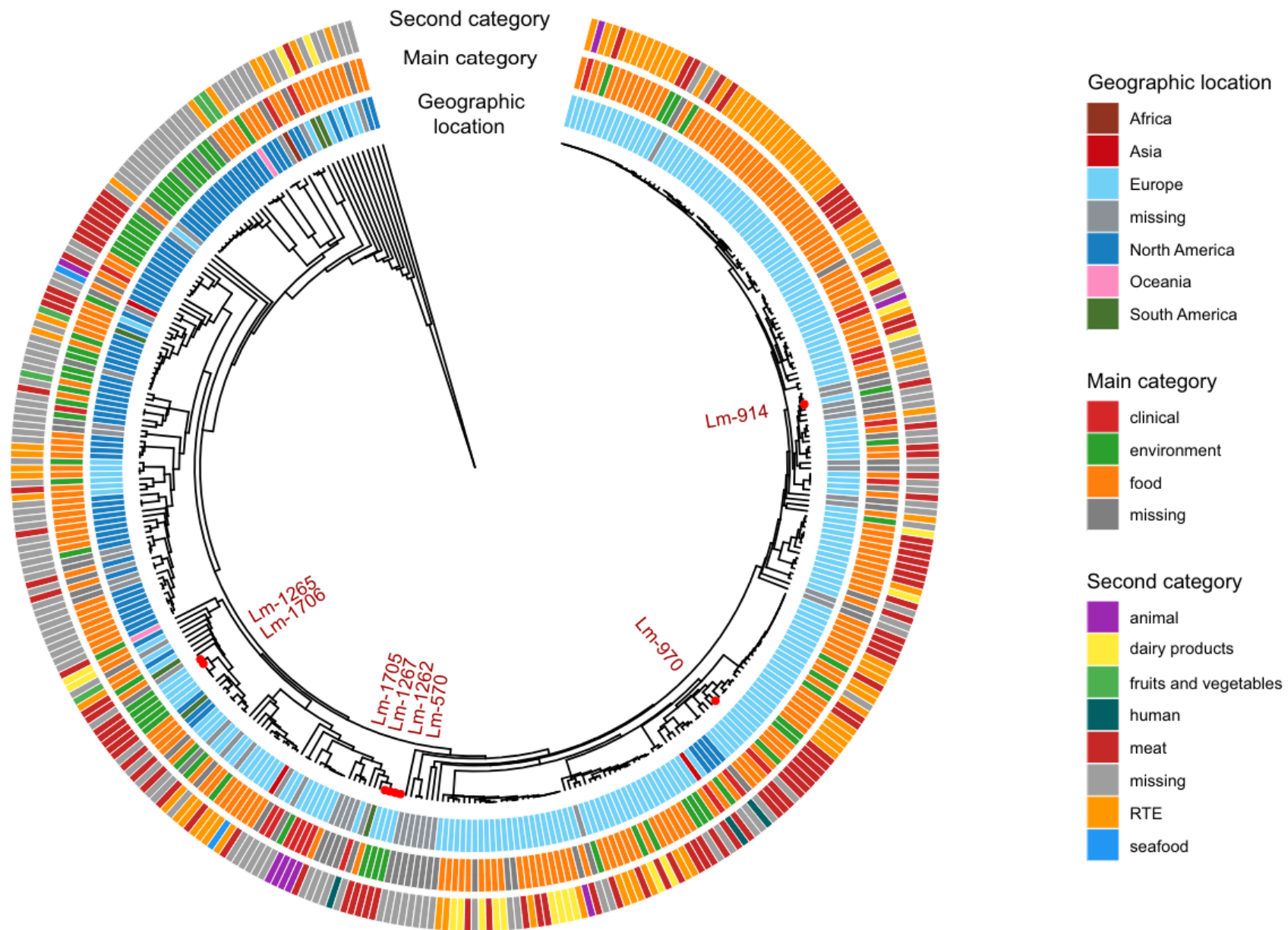


PRINCIPALES SUBTIPOS ASOCIADOS A PERSISTENCIA



Persistencia más frecuente en el linaje II (CC121, CC8, CC9) seguido por el linaje I (CC5, CC6, CC2)

Estos CC que persisten con mayor frecuencia se encuentran en muchos sectores, con algunas excepciones (por ejemplo, CC9 vinculado principalmente al sector cárnico).



DETERMINANTES DE PERSISTENCIA

Los marcadores que se han identificado como posiblemente asociados a persistencia son:

- Islas de supervivencia a estrés SSI-1 y SSI-2
- Islas genómicas LGI1 y LGI2

- Genes de resistencia a metales pesados (cadmio y arsénico) y biocidas (*bcrABC*, *gacC*, *qacH*, *emrE* y *emrC*), a menudo ubicados en elementos genéticos móviles (incluidas islas genómicas como es el caso de *emrE*, transposones como es el caso de *qacH* o plásmidos)

Son marcadores globalmente vinculados a una mayor robustez ambiental, tolerancia a la desinfección y/o formación de biopelículas.

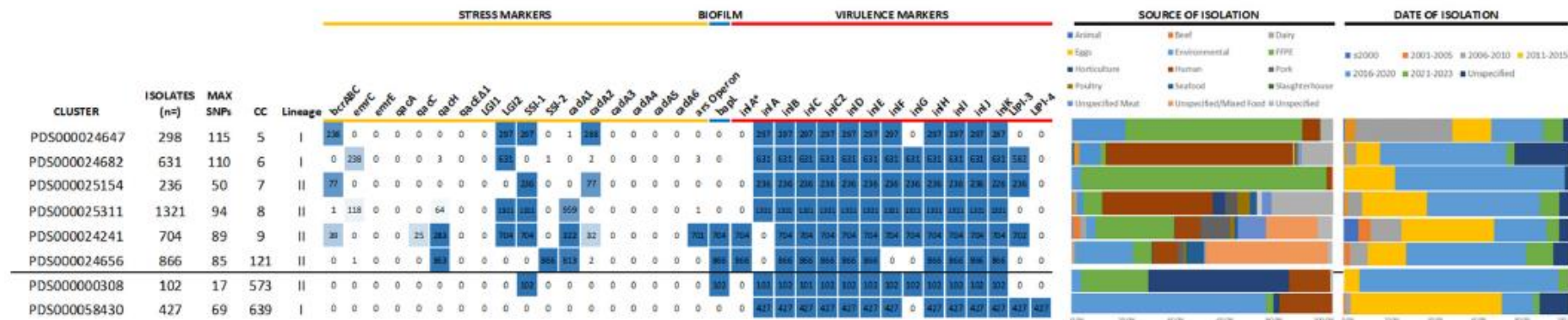
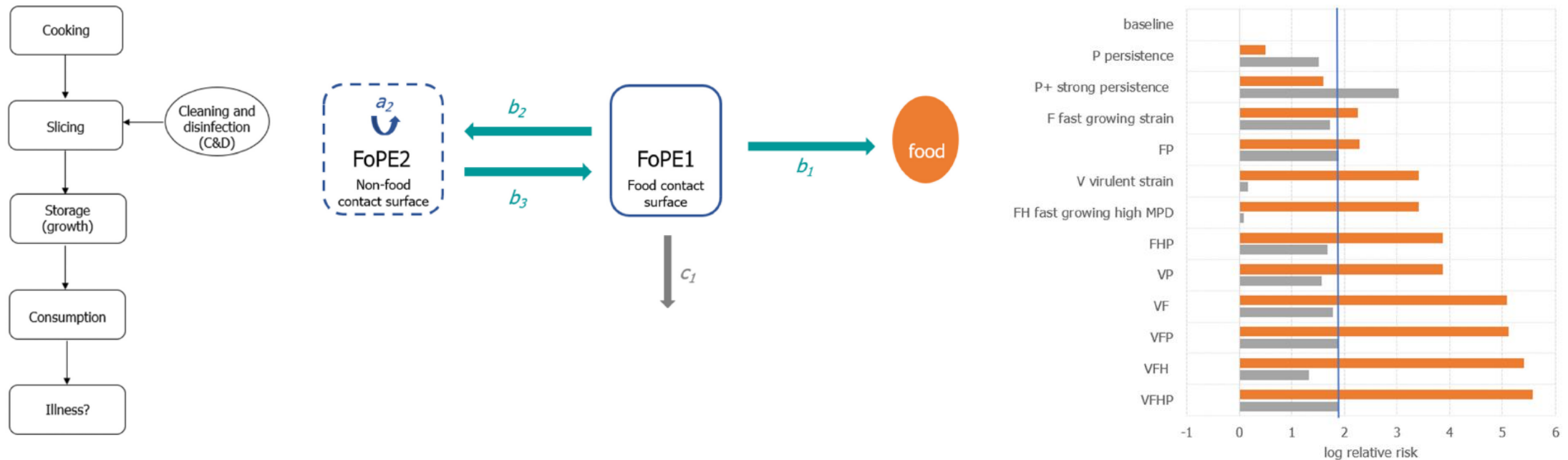


FIGURE 4 Overview of genetic features of selected SNP clusters from the NCBI Pathogen Detection database. This includes six SNP clusters related to CC more commonly associated with persistence in food processing environments (above the black line), and the two SNP clusters present in the database containing at least 100 isolates from CC which have not been identified as persistent in the literature screened for this scientific opinion (below the black line). 'inlA*' indicates isolates harbouring an *inlA* gene with a premature stop codon, associated with a truncated InlA protein. Presence/absence is indicated by the heatmap, with numbers relating to the number of isolates in that cluster carrying a given marker. 'Max SNPs' refers to the largest SNP difference among isolates within that cluster in the NCBI Pathogen Detection database.

DETERMINANTES DE PERSISTENCIA

Ciertos subtipos del linaje II (CC121, CC9 y CC31), a menudo se asocian con hipovirulencia (gen *inlA* truncado, ausencia de otros factores de virulencia específicos) y son más comunes entre los aislados alimentarios y en episodios de persistencia.

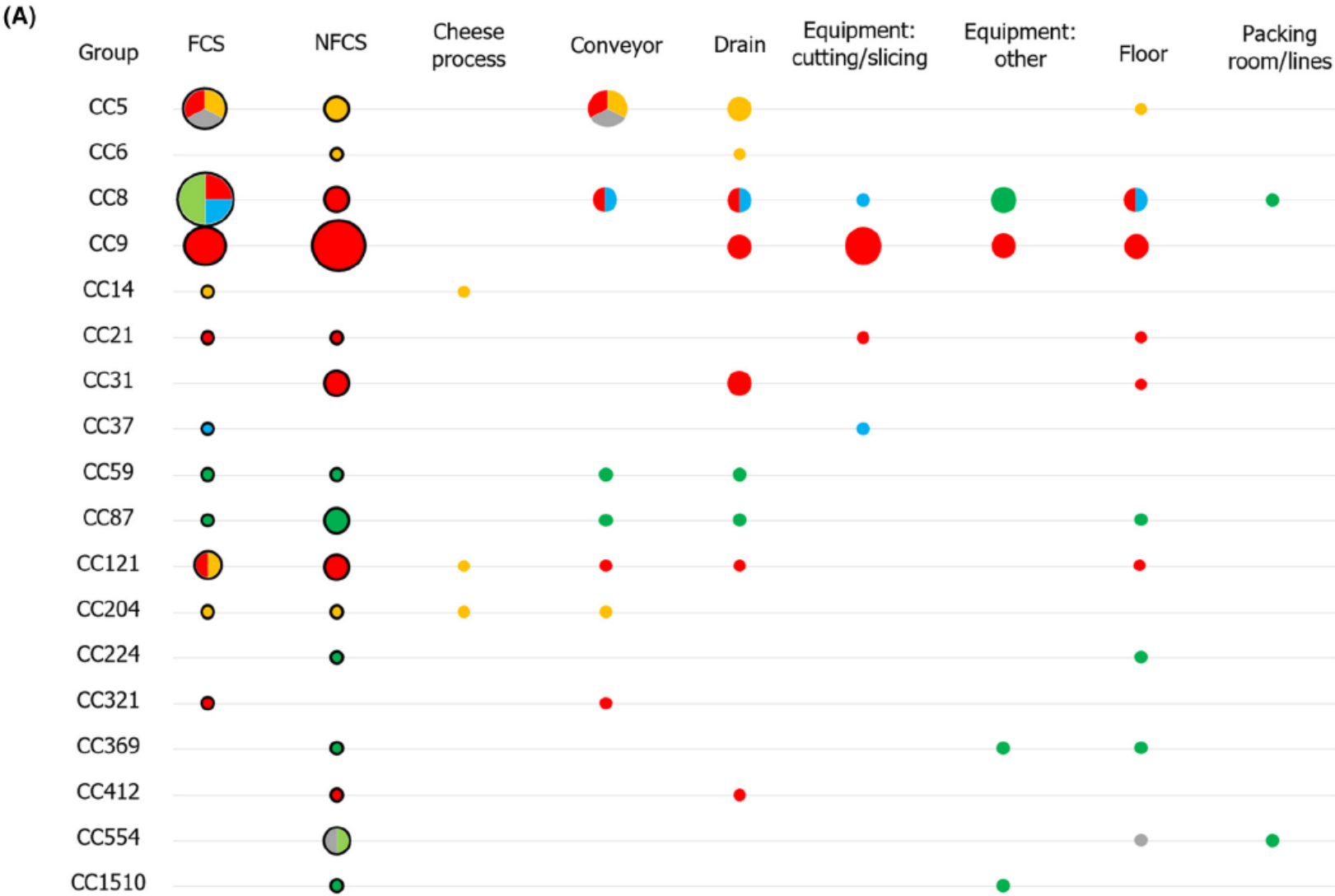
Sin embargo, la infección por *L. monocytogenes* no se basa únicamente en los requisitos genéticos de las cepas (p. ej., la presencia de una *InlA* funcional), sino que también implica la interacción con el sistema inmunológico. Como resultado, incluso las cepas hipovirulentas pueden causar infección en personas inmunodeprimidas.



NICHOS DE PERSISTENCIA

Los sitios más comunes donde se aísla *L. monocytogenes* persistente son equipos (FCS), desagües (NFCS), suelos (NFCS) y cintas transportadoras (FCS). El aislamiento repetido de *L. monocytogenes* de desagües y suelos a veces puede indicar persistencia en otras partes de la fábrica, ya que pueden actuar como sitios colectores.

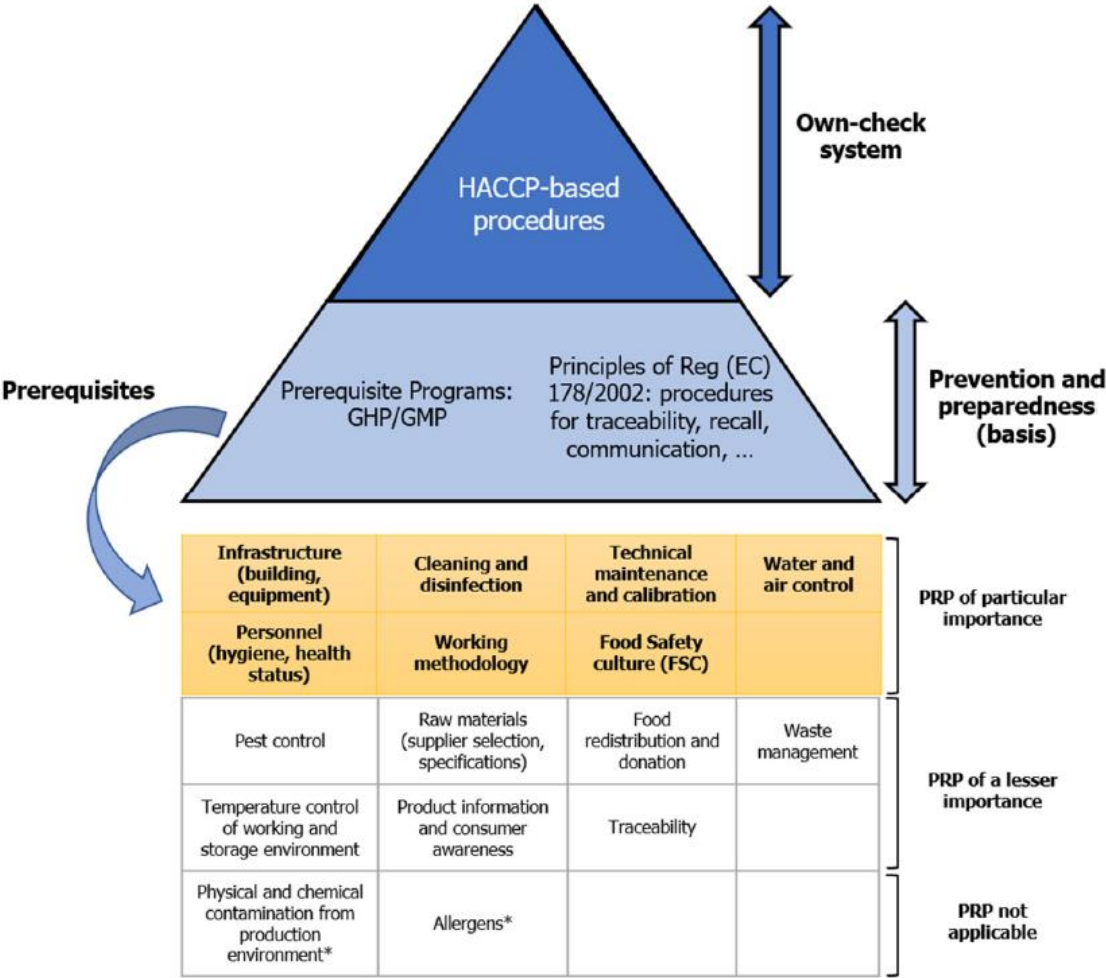
El principal factor de riesgo es el diseño higiénico deficiente de los equipos. Este conduce a nichos que son difíciles de limpiar y desinfectar y donde se pueden acumular restos y humedad. Una limpieza y desinfección, o zonificación, inadecuadas también puede conducir a la introducción y propagación de clones persistentes. La humedad favorece la persistencia de *L. monocytogenes*.



SECUENCIACIÓN GENÓMICA EN PROGRAMAS DE MONITORIZACIÓN AMBIENTAL

Seek and destroy: una forma sistemática de encontrar nichos de cepas persistentes en plantas de producción, con el objetivo de erradicarlas o mitigar su efecto. Incluye muestreos intensificados, la introducción de medidas de control y la continuación del programa de seguimiento intensificado.

Root cause analysis: análisis sistemático para identificar los factores/sitios más probables dentro de las instalaciones que contribuyen al problema y definir las intervenciones más apropiadas para eliminar el patógeno de las instalaciones



CONCLUSIONES

- Un programa de monitorización ambiental bien diseñado, que siga un enfoque basado en el riesgo, es la estrategia más eficaz para identificar posibles fuentes de contaminación y detectar cepas potencialmente persistentes.
 - La confirmación de la presencia de una cepa persistente y la identificación de su nicho dentro de la instalación requieren la caracterización detallada de los aislados recuperados de muestras positivas utilizando métodos de tipificación con suficiente resolución, siendo la secuenciación de genoma completo la opción más ventajosa.
 - No se han identificado marcadores o características universales responsables de la persistencia. Aunque ser portador de diferentes combinaciones de determinantes genéticos vinculados a una mayor robustez ambiental posiblemente confiera la capacidad de persistir en subtipos particulares, la persistencia es un proceso multifactorial que también depende de condiciones ambientales específicas y factores de riesgo en la planta de producción.
-

AGRADECIMIENTOS

Prof. M. Prieto
Prof. M. López
Prof. M. González-Raurich
Dr. J.F. Cobo-Díaz
Dr. E.A. Alexa
Dr. M. Oliveira
Dr. A. Alvarez-Molina
Dr. P. Fernández-Gómez
C. Barcenilla
A. Puente
E. Fernandez-Trapote
A. Francés
V. Crespo
P. Puente-Gómez
R. Cordero
L. Rojas
R. Bodelón

