

Influencia de las matrices alimentarias y de la población de microorganismos interferentes en la determinación de *Listeria monocytogenes* mediante métodos convencionales y VIDAS

INTRODUCCIÓN Y OBJETIVO

L. monocytogenes es un microorganismo de gran relevancia en los análisis de los controles de los criterios de seguridad alimentaria [1]. Desde el año 2000, se ha observado un aumento del número de casos de listeriosis en diferentes países europeos, pero las razones de este fenómeno siguen sin estar claras [2,3]. La detección de *L. monocytogenes* en los alimentos tiene consecuencias sanitarias y económicas muy importantes, así como costes reputacionales [4]. El objetivo del estudio fue determinar la posible influencia de la matriz alimentaria y de la población de microorganismos interferentes en la detección y recuento de *Listeria monocytogenes* en tres alimentos habituales de la dieta española (tortilla de patatas, queso fresco y ensalada de verduras envasada en atmósfera modificada –EAM-).

Resultados^a de la determinación de *Listeria monocytogenes* en diferentes alimentos por métodos tradicionales (n = 4 para cada grupo de alimentos).

Medio	Grupo A			Grupo B			Grupo C			Grupo D		
	SO	FC	VS	SO	FC	VS	SO	FC	VS	SO	FC	VS
PALCAM	<10	<10	<10	6.30	6.30	6.95	8.11	7.95	8.53	6.30	6.26	6.95
Oxford	<10	<10	<10	5.08	5.08	5.08	6.71	6.79	6.69	5.18	5.34	5.18
ALOA	<10	<10	<10	7.40	7.48	8.38	8.11	8.27	8.65	7.30	7.48	8.45

^a log cfu/g SO: tortilla española FC: queso fresco VS: ensalada de verduras

Grupo A: control

Grupo B: inoculado con *L. monocytogenes* (2 log ufc/g), *S. Enteritidis*, *S. aureus* y *P. mirabilis* (3 log ufc/g);

Grupo C: inoculado con *L. monocytogenes* (3 log ufc/g), *S. Enteritidis*, *S. aureus* y *P. mirabilis* (3 log ufc/g);

Grupo D: inoculado con *L. monocytogenes* (2 log ufc/g)

Resultados de la determinación de *Listeria monocytogenes* con el sistema VIDAS (n = 4 para cada grupo de alimentos)

Dilución	Grupo A			Grupo B			Grupo C			Grupo D		
	SO	FC	VS	SO	FC	VS	SO	FC	VS	SO	FC	VS
10 ⁻¹	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
10 ⁻²	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
10 ⁻³	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
10 ⁻⁴	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
10 ⁻⁵	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
10 ⁻⁶	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
10 ⁻⁷	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+

+ Presencia

- Ausencia

SO: tortilla española FC: queso fresco VS: ensalada de verduras

Grupo A: control

Grupo B: inoculado con *L. monocytogenes* (2 log ufc/g), *S. Enteritidis*, *S. aureus* y *P. mirabilis* (3 log ufc/g);

Grupo C: inoculado con *L. monocytogenes* (3 log ufc/g), *S. Enteritidis*, *S. aureus* y *P. mirabilis* (3 log ufc/g);

Grupo D: inoculado con *L. monocytogenes* (2 log ufc/g)

RESULTADOS Y CONCLUSIONES

Nuestra experiencia previa y los presentes resultados muestran una coincidencia general entre la metodología convencional y diversos métodos alternativos, como el Sistema VIDAS. La presencia de microorganismos interferentes no parecía influir en la determinación de *L. monocytogenes*. Además, el tipo de alimento no se demostró tampoco influyente, pero los medios de cultivo utilizados mostraron diferencias. De hecho, independientemente del tipo de alimento, el medio ALOA mostró una mayor sensibilidad que los demás medios, con una mayor recuperación en el 100% de las muestras (sólo en el caso de la tortilla de patatas del grupo B el resultado fue igual al de la PALCAM, -8,11 log ufc/g-). Los resultados obtenidos con el VIDAS no se vieron influidos por ninguno de los factores o condiciones utilizados y muestran una eficacia del 100%.

REFERENCIAS

- [1] Anonymous. Commission regulation (EC) No 1441/2007 of 5 December 2007. Amending regulation (EC) No 2073/2005 on microbiological criteria for foodstuffs. 2007. Off. J. Eur. Union; 322: 12-29/EN
- [2] Anonymous. European Food Safety Authority and European Centre for Disease Prevention and Control, 2015. The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and foodborne outbreaks in 2014. 2015. EFSA J; 13: 4329.
- [3] Gnanou Besse NG, Lombard B, Guillier L, François D, Romero K, Pierru S, Bouhier L, Rollier P. Validation of standard method EN ISO 11290-Part 1—Detection of *Listeria monocytogenes* in food. 2019. Int. J. Food Microbiol; 288: 13–21.
- [4] Estévez M, García-Viejo F, López C, Jordano R, Medina LM. Influence of Food matrices and the population of interfering microorganisms on the determination of *Listeria monocytogenes* by conventional methods and VIDAS system. 2021. Foods; 10: 3021.
- [5] ISO 11290-1 & 2. Horizontal method for the detection and enumeration of *Listeria monocytogenes*. Part 1: Detection method. Part 2: Enumeration method. Int. J. Food Microbiol. 1998, 40, 77–85.
- [6] Anonymous. EN ISO 11290-1, Microbiology of the Food Chain—Horizontal Method for the Detection and Enumeration of *Listeria monocytogenes* and of *Listeria* spp.—Part 1: Detection Method; IOS: Geneva. Switzerland, 2017..

DISEÑO EXPERIMENTAL Y METODOLOGÍA



Tortilla española



Queso fresco



Ensalada de verduras en atmósfera modificada (EAM)

Se prepararon cuatro grupos (A, B, C y D) de estos alimentos (25g) con dos niveles de contaminación con *Listeria monocytogenes* CECT 5873. De cada grupo se obtuvieron 4 muestras (48 muestras). La composición de cada grupo de alimentos se especifica al pie de las tablas. El nivel de contaminación para los microorganismos interferentes fue de 10³ ufc/g, y el tiempo de adherencia utilizado fue de 4 h.

Cepas de microorganismos interferentes utilizadas:

Salmonella enterica ssp. *enterica* serovar Enteritidis CECT 4300,

Staphylococcus aureus ssp. *aureus* CECT 976

Proteus mirabilis CECT 5350

Recuento de *Listeria monocytogenes*

Se prepararon diferentes diluciones de cada muestra para determinar los recuentos de *Listeria monocytogenes* por un método convencional [5], utilizando el medio PALCAM, y el método normalizado actual (UNE-EN ISO 11290-2:2018) [6]. Los recuentos se expresaron en log ufc/g.

Detección por sistema VIDAS

Se depositaron 25 gramos de muestra en 225 mL de caldo Fraser (bioMérieux), se homogeneizaron (Stomacher) durante 2 min y se incubaron a 30°C durante 24 h. Se transfirieron alícuotas de un mililitro de estos enriquecimientos primarios a 1 mL de caldo Fraser de enriquecimiento secundario (bioMérieux) y se incubaron a 30°C durante 24h. Por último, se inocularon 0,5 mL en los cartuchos VIDAS-LMO II. Un RFV de ≥0,05 para una muestra se consideró como un resultado positivo. Los resultados se obtuvieron después de 70 minutos y se expresaron como presencia o ausencia de *L. monocytogenes*.

Análisis estadístico

Se llevó a cabo mediante el paquete de software SPSS 15.0 (IBM Company, Armonk, NY, EE.UU.). La eficacia de las medidas ensayadas se determinó comparando los resultados según los diferentes parámetros estudiados. Para ello, se realizó una prueba no paramétrica de chi-cuadrado (X²) con un nivel de significación del 5% (p<0,05).