



CATÓLICA
UNIVERSIDADE CATÓLICA PORTUGUESA | PORTO
Escola Superior de Biotecnologia

Epidemiología, Ecología y Transmisión de *Listeria monocytogenes*

Gonçalo N. Almeida

Jornadas sobre “Seguridad Alimentaria en Iberoamérica: desde la Epidemiología a la Bioquímica de los Procesos Involucrados en las Enfermedades Transmitidas por Alimentos”

Florianópolis-Brasil del 7 de diciembre al 11 de diciembre de 2009



Programa

Características de *Listeria monocytogenes*

Bioquímicas

Serología

Fuentes de contaminación

Brotos de listeriosis

Listeriosis

Métodos de detección en alimentos

Control de *Listeria* en la industria

Tipificación de cepas

Criterios microbiológicos

Vigilancia epidemiológica

Prevención



CATÓLICA
UNIVERSIDADE CATÓLICA PORTUGUESA - PORTO
Escola Superior de Biotecnologia

Características

Bacilo de Gram positivo

Catalasa positiva

Oxidasa positiva

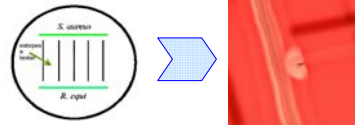
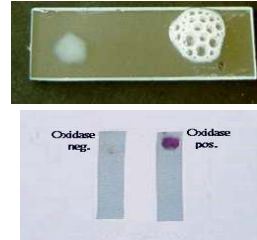
Fermenta varios azucres

MR+

VP+

Movimiento por flagelos – “tumbling”

β - Hemólisis



Fuentes de contaminación

Property	<i>L. monocytogenes</i>	<i>L. ivanovii</i>	<i>L. innocua</i>	<i>L. welshimeri</i>	<i>L. seeligeri</i>	<i>L. grayi</i>
Tumbling motility	+	+	+	+	+	+
Catalase	+	+	+	+	+	+
Oxidase	-	-	-	-	-	-
Urea	-	-	-	-	-	-
No ₂	-	-	-	-	-	-
β-haemolysis	+	+	-	-	+	-
CAMP test (<i>S. aureus</i>)	+	-	-	-	+	-
CAMP test (<i>R. equi</i>)	-	+	-	-	-	-
Acid production from:						
L-rhamnose	+	-	d	d	-	-
D-xylose	-	+	-	+	+	-
α-methyl-D-mannoside	+	-	+	+	-	+
Mannitol	-	-	-	-	-	+
Hydrolysis of Hippurate	+	+	+	+	+	-
Hydrolysis of Esculin	+	+	+	+	+	+
Pathogenicity for mice	+	+	-	-	-	-



Característica

Resistente a elevados % de sal



Crece a pH entre 6 y 9

Crece entre 0 °C y 45 °C (óptima: 30 °C – 37 °C)



CATÓLICA
UNIVERSIDADE CATÓLICA PORTUGUESA | PORTO
Escola Superior de Biotecnologia

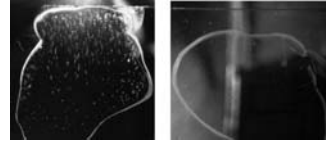
1/2a, 1/2b y 4b són responsables por el 90% de casos de listeriosis humana (Farber and Peterkin, 1991)

C-	Antigénios Somáticos						Antigénios Flagelares					Serovar
	O I	O IV	O VI	O VII	O VIII	O IX	C	A	AB	C	D	
-	+	-					-	+	+	-	-	1/2a
-	+	-					-	+	+	+	-	1/2b
-	+	-					-	-	+	-	+	1/2c
-	-	+					-	+	+	-	-	3a
-	-	+					-	+	+	+	-	3b
-	-	+					-	-	+	-	+	3c
-			-	+	-	+	-	+	+	+	-	4a
-			+	+	-	+	-	+	+	+	-	4ab
-			+	-	-	-	-	+	+	+	-	4b
-			-	+	-	-	-	+	+	+	-	4c
-			+	-	+	-	-	+	+	+	-	4d
-			+	-	(+)	(+)	-	+	+	+	-	4e
-			-	-	-	-	-	+	+	+	-	7

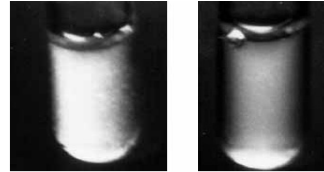
(+) Antígeno não fortemente exprimido

Características

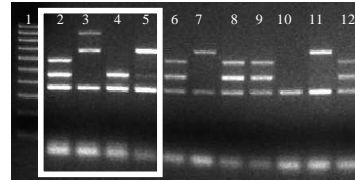
Serogrupo (1 ou 4) antisueros O (somáticos)
Tipo 1 y Tipo 4 (Difco)



antisueros O “*Listeria antisera SEIKEN*”
antisueros H (flagelares) A, AB, C y D
“*Listeria antisera SEIKEN*”



Multiplex PCR – agrupa 4b-4d-4e; 1/2 c –
3c; 1/2b-3b-7; 1/2a-3a
(Doumith *et al.* 2004)



CATÓLICA
UNIVERSIDADE CATÓLICA PORTUGUESA - PORTO
Escola Superior de Biotecnologia

Fuentes de contaminación

Listeria spp. es un microorganismo ubicuo:

- tierra
- agua
- aguas residuales
- excrementos humanos y de animales

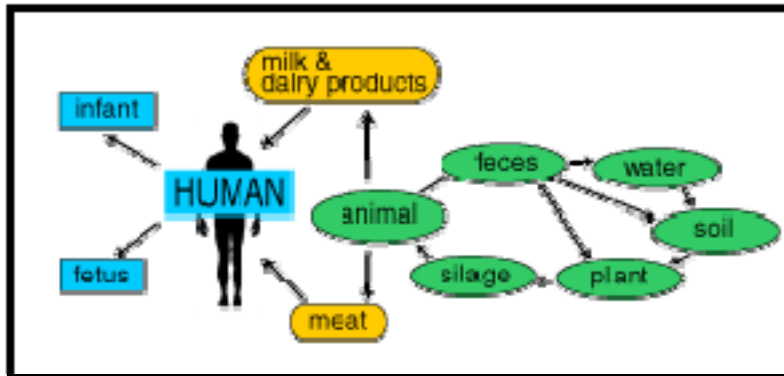
Hábitat natural material en descomposición donde viven como saprofitas.

(Vazquez-Boland *et al.*, 2001)



CATÓLICA
UNIVERSIDADE CATÓLICA PORTUGUESA - PORTO
Escola Superior de Biotecnologia

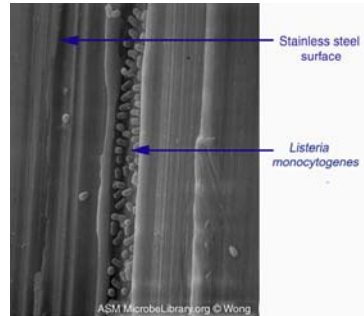
Fuentes de contaminación



www.genomenewsnetwork.org/.../listeria_opt1.gif

Fuentes de contaminación

Puede establecerse en la industria alimentaria formando biofilms



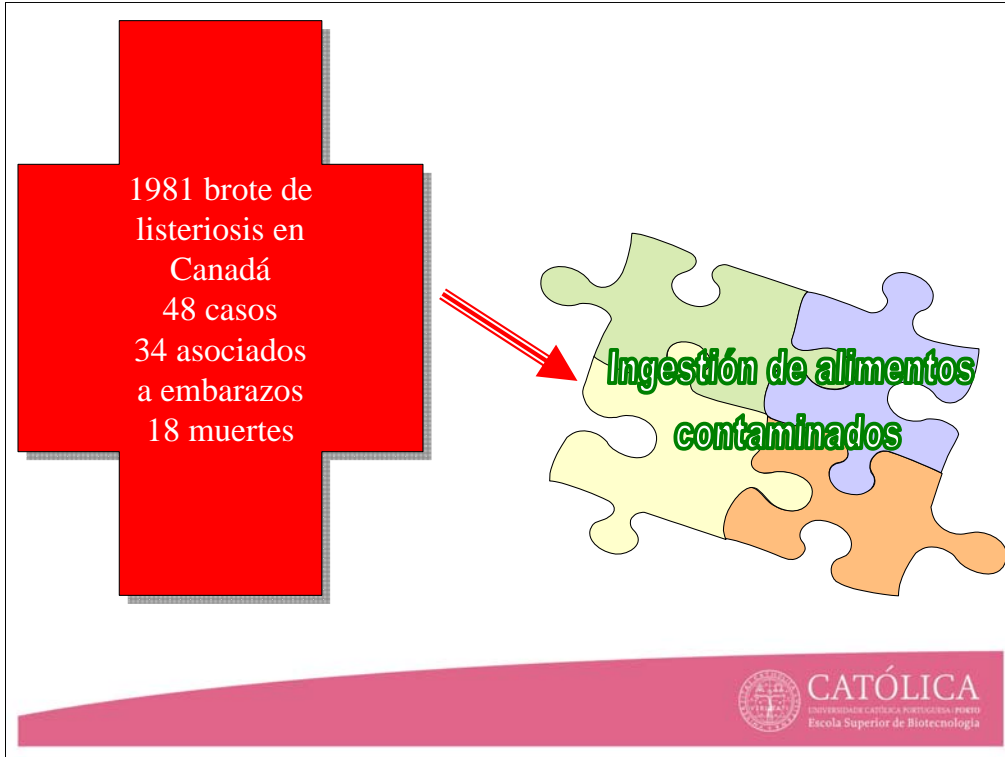
CATÓLICA
UNIVERSIDADE CATÓLICA PORTUGUESA | PORTO
Escola Superior de Biotecnologia













Fuentes de contaminación

- Carnes frescas
- Carnes procesadas
- Pescado ahumado
- Marisco cozido
- Queso
- Helados
- Leche
- Vegetales
- Legumbres



CATÓLICA
UNIVERSIDADE CATÓLICA PORTUGUESA | PORTO
Escola Superior de Biotecnologia



2000 - home made cheese		13 casos, 5	
2002 - queijo leite cru		17 casos, 0	
2003 - queso blanco		12 casos, ?	
2003 - tomme cheese		10 casos, 3	
2006 - soft cheese		78 casos, 13	
2008 - queijo		119 casos, 5	

Listeriosis

Casos maternos/neonatales aquellos en que la infección se detecta en la mujer embarazada y/o en el recién-nacido, con edad inferior a 1 mes.

Aislamiento de *L. monocytogenes* en una localización normalmente estéril (como la sangre, el líquido cefalorraquídeo o, con menos frecuencia, líquido sinovial, exudado pleural o líquido pericárdico).



Listeriosis

Depende de varios factores:

el numero de bacterias ingeridas con el alimento

el potencial patogénico de la cepa

el status inmunológico del paciente.



Young

Old



Pregnant

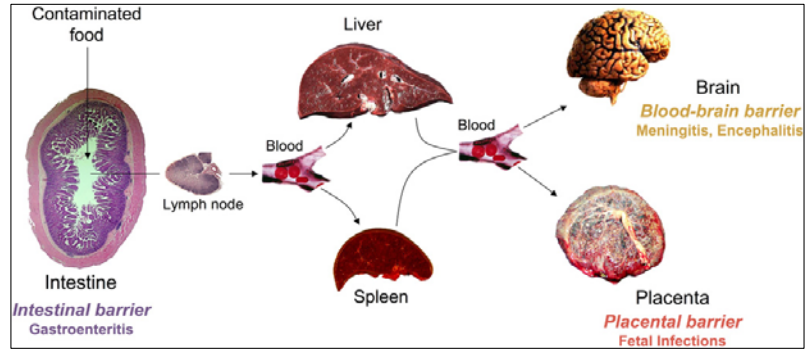
Immuno-compromised



CATÓLICA
UNIVERSIDADE CATÓLICA PORTUGUESA - PORTO
Escola Superior de Biotecnologia

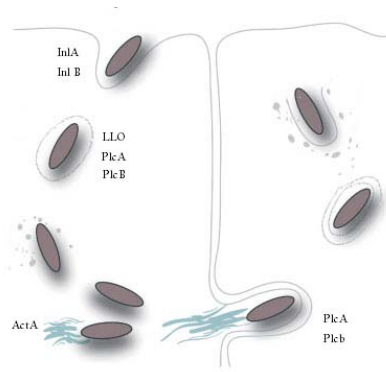
Listeriosis

Ocurre después de la ingestión de alimentos contaminados.



Lecuit, 2007

Listeriosis



adapted from Pizarro-Cerdá and Cossart, 2006

Listeriosis en la UE

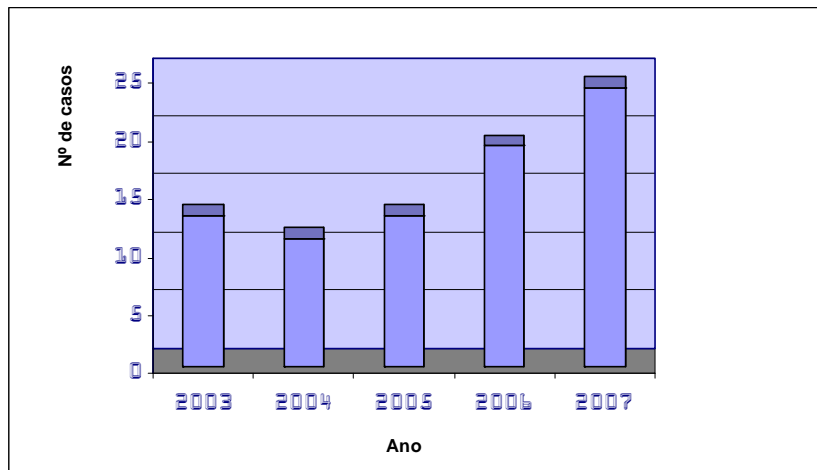
	2003	2004	2005	2006
França	220	236	221	290
Alemanha	256	296	510	508
Holanda	52	55	96	64
Espanha	52	100	68	78
Itália	0	25	51	51
Portugal	-	38	-	-

La incidencia varia entre 2 y 10 casos por millón de habitantes
EFSA/ECDC – Zoonoses 2006



CATÓLICA
UNIVERSIDADE CATÓLICA PORTUGUESA - PORTO
Escola Superior de Biotecnologia

Listeriosis en Portugal

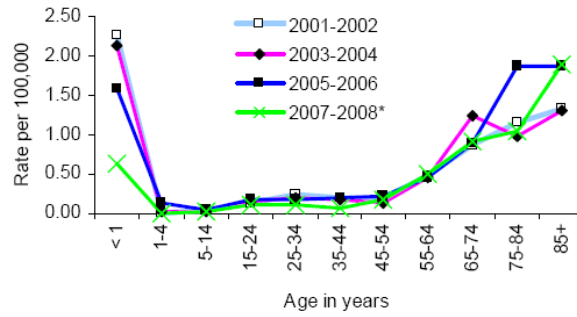


Total de casos: 80

Casos maternos: 13

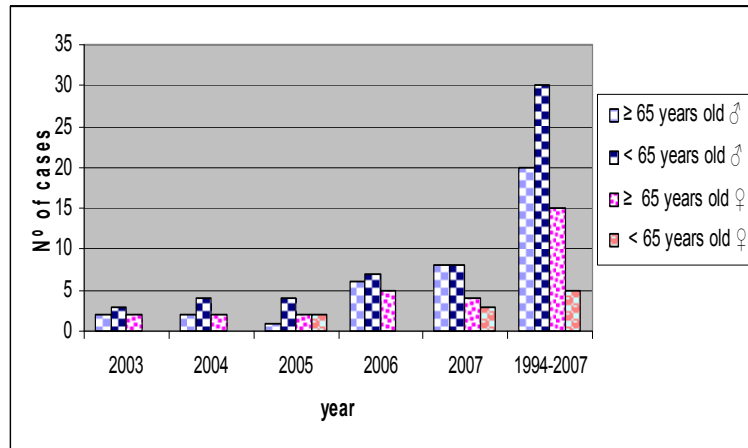
Casos no maternos: 67

Listeriosis en Califórnia



Epidemiologic Summary of Listeriosis in California, 2001 – 2008
Center for Infectious Diseases - Division of Communicable Disease Control
Infectious Diseases Branch - Surveillance and Statistics Section

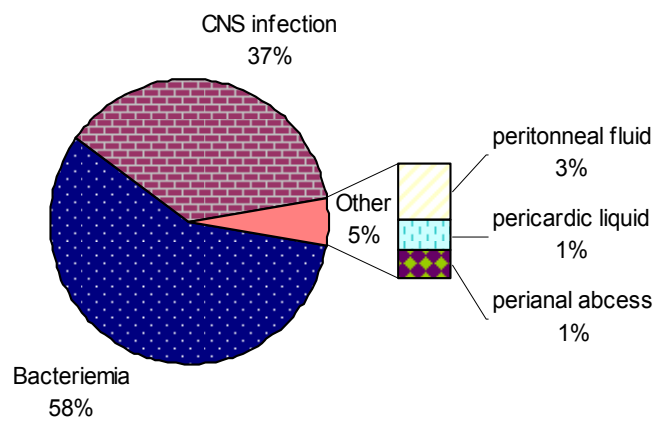
Listeriosis No Maternal



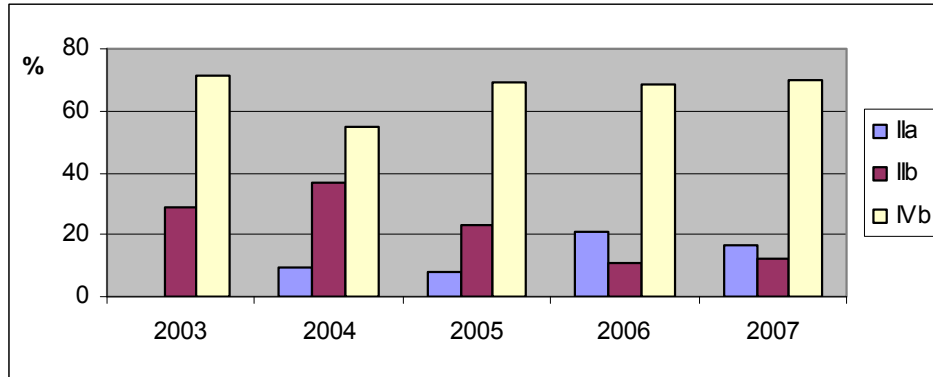
Incidência de listeriose

Año	Nº de casos	Incidência ⁽¹⁾	Mortalidad % ⁽²⁾	Mortalidad % ⁽³⁾
2003	13	1.4	15.4	22.2
2004	11	1.1	36.4	80.0
2005	13	1.3	7.7	12.5
2006	19	1.9	5.3	33.3
2007	24	2.3	12.5	42.9

(1) Número de casos/milhón de habitantes (2)Calculada con todos los casos (3) calculada con los casos en los que se conoció el desarrollo de la enfermedad.



Serotipagem de isolados de *L. monocytogenes* envolvidos em casos de listeriose humana



Métodos de ensayo

Varios metodos de ensayo están descritos:

1. Fase de pré enriquecimiento (1/2 fraser, BLEB, UVMII)
Como agentes inhibitorios -> acriflavina y acido nalidixico
2. Enriquecimiento (Fraser, UVMII)
3. Medio de cultivo selectivo

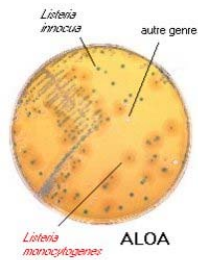
Métodos de ensayo

ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO

PRÉ – ENRIQUECIMENTO 24-48h

ENRIQUECIMENTO 24 – 48h

ISOLAMENTO PALCAM, ALOA



ISO 11290-1:1996
Amended 2004



CATÓLICA
UNIVERSIDADE CATÓLICA PORTUGUESA - PORTO
Escola Superior de Biotecnologia

Pesquisa de *Listeria monocytogenes*

Método de referência ISO 11290-1

Pré-enriquecimento 1:10 em
Fraser 1/2. Incubação a 30°C /
24h

Enriquecimento 1 mL em Fraser
Incubar a 30°C / 24+24h

Isolamento à superfície às 48h

Das colónias típicas fazer os testes da catalase e
oxidase. Repicar para TSA. Incubar o TSA a 30°C/2

Confirmar com o teste de CAMP e açúcares:
Manitol, Rannose e Xilose

Resultado Negativo

Alternativo 3

Isolamento à superfície às 24 em
Palcam

Resultados equivalentes ?



CATÓLICA
UNIVERSIDADE CATÓLICA PORTUGUESA - PORTO
Escola Superior de Biotecnologia



Listeria monocytogenes...

La tipificación permite

Determinar vías de contaminación

Estudiar la relación entre cepas

Aclarar sobre a epidemiología de listeriosis

Seguir a transmisión de *L. monocytogenes* en fábricas de procesamiento alimentario.



Listeria monocytogenes...

“ISOLATION AND
CHARACTERIZATION
OF *Listeria monocytogenes* FROM
A BAKERY PRODUCTION PLANT”

Identificar a via de contaminação de
produtos de panificação congelados
com *L. monocytogenes*



Listeria monocytogenes...

Pesquisa de *L. monocytogenes* em
Matérias primas (21 amostras)
Produto final (87 amostras)
Ambiente (357 amostras)



Três períodos de amostragem:
Julho 2002 - Outubro 2002
Abril - Maio 2003
Junho - Agosto 2003



Resultados *Listeria monocytogenes*...

Incidência de *L. monocytogenes* em diferentes amostras

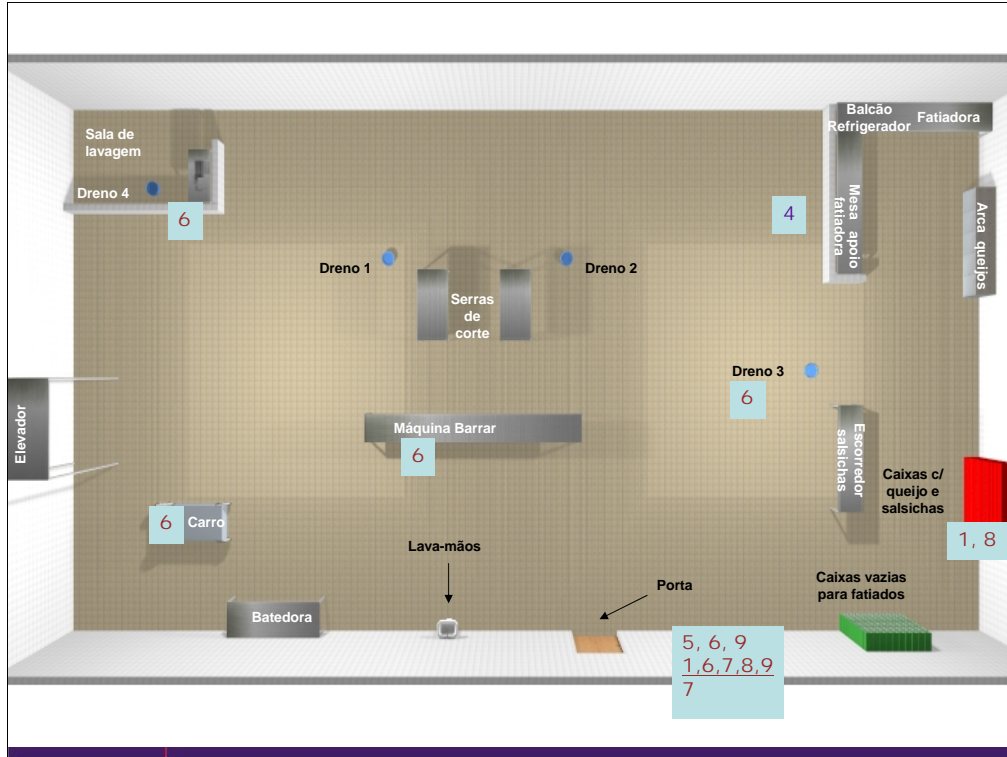
Amostra	Nº Amostras	Amostras positivas	Incidência (%)
Matéria Prima	7/11/3	0/0/1	0/0/33.3
Produto final	41/25/21	5/10/2	12.2/40/9.5
Ambiente	88/59/210	8/7/10	9.1/11.9/4.8
Total	136/95/234	13/17/13	9.6/17.9/5.6

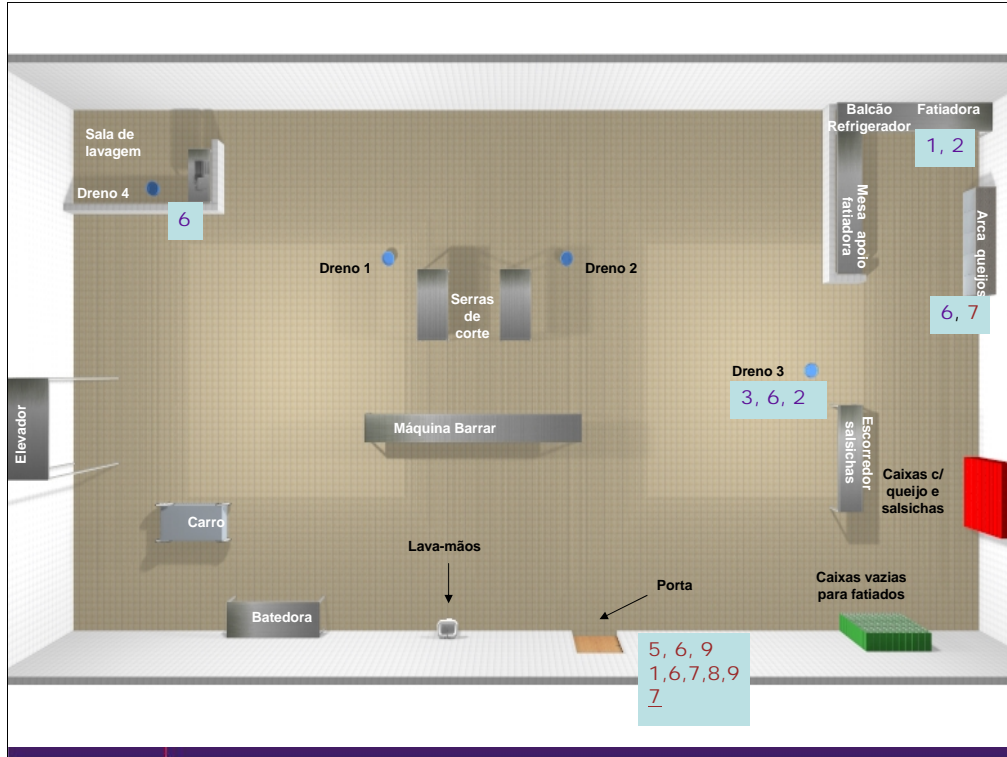


Listeria monocytogenes...

Tipo	Serogrupo; serovar	Biotipo
1	1; 1/2b	6
2	1; 1/2b	8
3	1; 1/2c	4
4	1; 1/2c	6
5	4; 4b	4
6	4; 4b	6
7	4; 4b	8
8	4; não 4b	2
9	4; não 4b	6
10	4; não 4b	8

Biotipo: 2-sens. T; 4-sens. C/T; 6-sens. A/T; 8-sens. A/C/T







Listeria monocytogenes...

O ambiente de processamento parece ser a fonte de contaminação do produto final

- Contaminação das matérias primas pouco frequente, e de Tipo diferente, da observada no produto final
- Algumas estirpes são sistematicamente isoladas do ambiente (residentes?) e de produto final



Listeria monocytogenes...

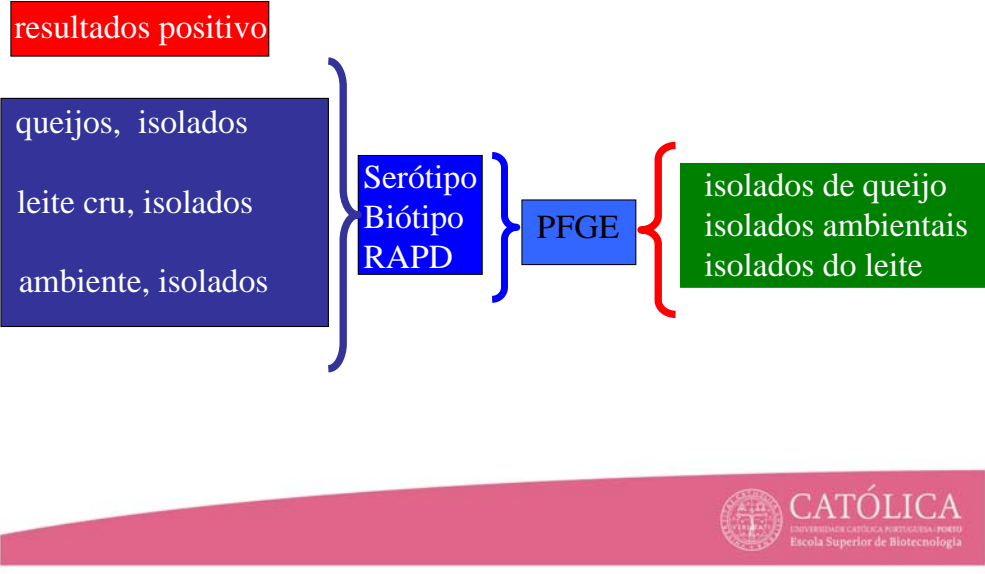
Alteração dos planos de higiene na fábrica

Alteração do lay-out

Recolha de novas amostras

Tipagem das cepas

Caracterização de isolados de *L. monocytogenes*



Fontes de contaminação *L. monocytogenes*

Amostragem: 2004 - 2007

	Queijaria Artesanal	Pequena Indústria	Grande Indústria
Ambientais	130	416	2520
Queijo	81	208	2727
Leite cru	90	70	19

Fontes de contaminação *L. monocytogenes* Queijaria artesanal

resultados positivo

11 queijos, 85 isolados

1 leite cru, 2 isolados

11 pontos, 44 isolados

1 lactosoro, 8 isolados

Serótipo
Biótipo
RAPD

PFGE

18 isolados de queijo
20 isolados ambientais
1 isolado do lactosoro
1 isolado do leite



CATÓLICA
UNIVERSIDADE CATÓLICA PORTUGUESA - PORTO
Escola Superior de Biotecnologia

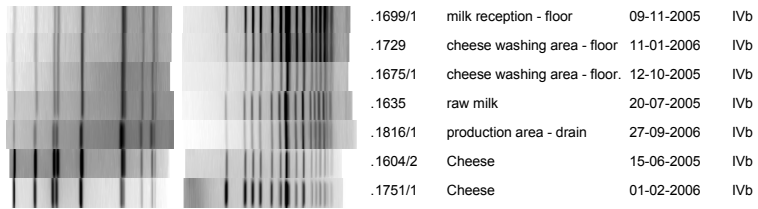
Fontes de contaminação *L. monocytogenes* PERFIS OBTIDOS

Dice (Opt:1.50%) (Tol 1.5%-1.5%) (H>0.0% S>0.0%) [0.0%-100.0%]

PFGE-Apal

PFGE-Ascl

PFGE-Apal



CATÓLICA
UNIVERSIDADE CATÓLICA PORTUGUESA - PORTO
Escola Superior de Biotecnologia



'Sellan' Texas contra quesos mexicanos sin pasteurizar

GASTÓN MONGE
El Universal
Domingo 01 de julio de 2007



NUEVO LAREDO, Tam.— Autoridades sanitarias de Estados Unidos iniciaron en su frontera de Laredo, Texas, un operativo de revisión y decomiso de queso mexicano sin pasteurizar, debido a que muestreos de laboratorio comprobaron la presencia de bacterias que pueden provocar enfermedades en los consumidores.



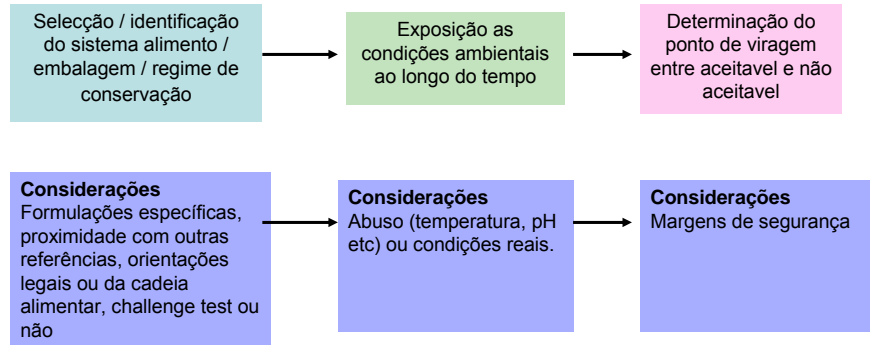
Para a *Listeria monocytogenes*:

- Alimentos prontos para consumo destinados a lactentes e alimentos prontos para consumo destinados a fins medicinais específicos
- Alimentos prontos para consumo susceptíveis de permitir o crescimento de *L. monocytogenes*, excepto os destinados a lactentes e a fins medicinais específicos
- Alimentos prontos para consumo não susceptíveis de permitir o crescimento de *L. monocytogenes*, excepto os destinados a lactentes e a fins medicinais específicos



Categoria de alimento	n	c	m=M	Método de referência	Fase em que o critério se aplica
Alimentos prontos para consumo destinados a lactentes e alimentos prontos para consumo destinados a fins medicinais específicos	10	0	Ausência em 25 g	EN/ISO 11290-1	Produtos colocados no mercado, durante o seu período de vida útil
Alimentos prontos para consumo susceptíveis de permitir o crescimento de <i>L. monocytogenes</i> , excepto os destinados a lactentes e a fins medicinais específicos	5	0	100 ufc/g	EN/ISO 11290-2	Produtos colocados no mercado, durante o seu período de vida útil
	5	0	Ausência em 25 g	EN/ISO 11290-1	Antes de o alimento deixar de estar sob o controlo imediato do operador da empresa do sector alimentar que o produziu
Alimentos prontos para consumo não susceptíveis de permitir o crescimento de <i>L. monocytogenes</i> , excepto os destinados a lactentes e a fins medicinais específicos	5	0	100 ufc/g	EN/ISO 11290-2	Produtos colocados no mercado, durante o seu período de vida útil

Shelf-life



Vigilancia epidemiológica

Acompañar la evolución de listeriosis

Creación de bases de datos con perfiles de macro restricción
PulseNet USA, Europa, Asia Pacific, America Latina



CATÓLICA
UNIVERSIDADE CATÓLICA PORTUGUESA | PORTO
Escola Superior de Biotecnologia

Vigilancia epidemiologica

Outbreaks of *L. monocytogenes* occurred in different parts of the world, where ECI, ECII, ECIII and ECIV were involved.

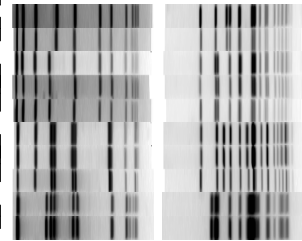
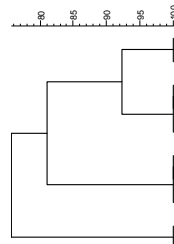
Epidemic clone	Location, implicated food, year	Serotype
ECI	Canada, coleslaw, 1981 USA, Mexican-style cheese, 1985 Switzerland, soft cheese, 1983-87 Denmark, cheese, 1989-90 France, jellied pork tongue, 1992	4b
ECII	USA, hot dogs, 1998-99 USA, turkey deli meats, 2002	4b
ECIII	USA, turkey deli meats, 2000	1/2a
ECIV	USA, milk, 1983 UK, pâté, 1989	4b

PFGE

PFGE-ApaI+PFGE-AscI
apa_asc

PFGE-AscI

PFGE-ApaI



Isolate code	MPCR	Local	Date
2097	IVb	Coimbra	10/2006
2253	IVb	Porto	12/2007
2125	IVb	Funchal	10/2007
2074	IVb	Porto	04/2007
2255	IVb	Porto	10/2007
2104	IVb	Coimbra	09/2006
2105	IVb	Coimbra	03/2007
1549	IVb	Coimbra	3/1999
1240	IIb	Almada	10/2004
1242	IIb	Lisboa	08/2004

Geográficamente o **temporalmente** relacionadas.



CATÓLICA
UNIVERSIDADE CATÓLICA PORTUGUESA - PORTO
Escola Superior de Biotecnologia

Prevención

Cocinar cuidadosamente los alimentos de origen animal.

Lavar las verduras, legumbres, hierbas aromáticas crudas etc. antes de consumirlas.

Evitar el consumo de leche cruda o derivados lácteos elaborados con leche cruda.

Calentar las sobras alimentarias o platos precocinados antes de Consumirlos.

Conservar la carne cruda separada del resto de alimentos listos para consumir.

Prevención

Lavado cuidadoso de las manos, utensilios de cocina etc. después de haber manipulado alimentos crudos.

Personas con especial riesgo deben evitar consumir quesos de pasta blanda como Brie, Camembert, Feta etc.

En general tomar las mismas precauciones que se tomarían para prevenir otras toxiinfecciones



OBRIGADO PELA ATENÇÃO

Gonçalo N. Almeida
gnalmeida@esb.ucp.pt



CATÓLICA
UNIVERSIDADE CATÓLICA PORTUGUESA - PORTO
Escola Superior de Biotecnologia

ISOPOL XVII

International Symposium on Problems of Listeriosis



May 5 - 8th, 2010
Alfândega Congress Centre, Porto, Portugal

www.esb.ucp.pt/isopol2010



CATÓLICA
UNIVERSIDADE CATÓLICA DO PORTO
Escola Superior de Biotecnologia