

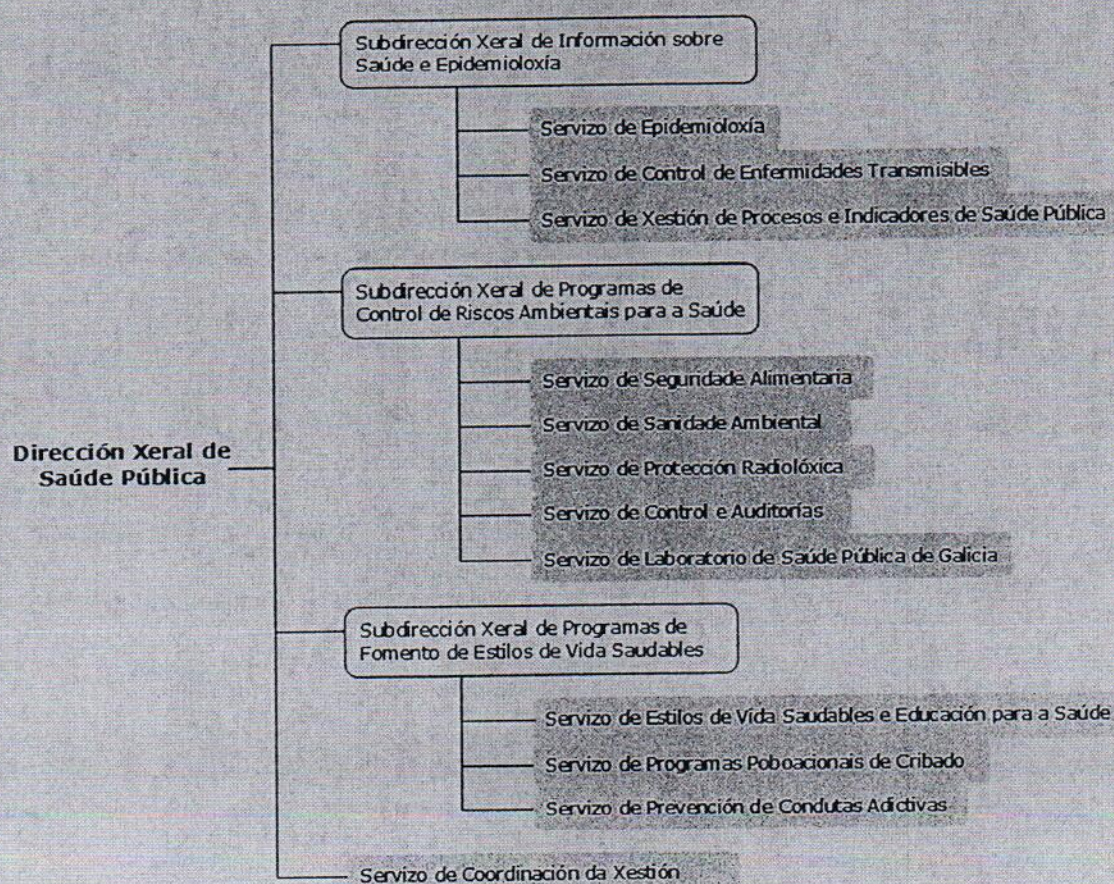
INCIDENCIA DE LA IMPLANTACIÓN DEL CRIBADO MOLECULAR O INMUNOLÓGICO PARA INVESTIGAR PATÓGENOS ALIMENTARIOS Y AMBIENTALES. CASOS PRÁCTICOS

Paloma Bellver Moreira (Laboratorio de Saúde Pública de Galicia, Lugo) paloma.bellver.moreira@sergas.es

PRESENTACIÓN DEL LABORATORIO

Dentro de la estructura orgánica de la Consellería de Sanidade de la Xunta de Galicia, el órgano encargado de la promoción y protección de la salud en esta comunidad es la Dirección General de Salud Pública (DXSP). El Laboratorio de Salud Pública de Galicia (LSPG) se encarga de realizar las determinaciones analíticas derivadas de los programas de vigilancia y control oficial en el ámbito de la protección de la salud. Cuenta con dos áreas técnicas (Química y Microbiología) y dos unidades de apoyo (Garantía de Calidad y Unidad de Administración, Gestión y Servicios).

EL LSPG EN EL ORGANIGRAMA DE LA DXSP



Nuestros "clientes" son principalmente los Servicios de Sanidad Ambiental y Seguridad Alimentaria. Cada Servicio cumple sus objetivos a través de planes, que desarrollan de acuerdo con una variedad de programas. En Sanidad Ambiental, dentro del Plan de vigilancia de factores ambientales, uno de los programas es "prevención y control de legionelosis". Al Servicio de Seguridad Alimentaria le corresponde el desarrollo de una parte de los programas del PNCOCA (plan nacional de control oficial de la cadena alimentaria). Anualmente se establece un plan de muestreo para verificar que los operadores comerciales cumplen la normativa.

MÉTODOS ALTERNATIVOS Y ACREDITACIÓN

Son métodos de ensayo más rápidos y/o más sencillos de realizar que el método tradicional descrito en la Norma ISO de referencia a la que remite la legislación.

La entidad nacional de acreditación (ENAC) diferencia tres tipos de métodos: métodos normalizados, métodos basados en métodos normalizados y métodos internos de desarrollo propio. En todos los casos es

necesario demostrar que las características de funcionamiento son acordes con la normativa correspondiente. En los dos primeros casos es suficiente con verificar que se cumplen los requisitos del método de referencia. Sin embargo, los métodos internos, tienen que validarse de acuerdo con la Norma ISO 16140 y es necesario demostrar la equivalencia entre el método de referencia y el alternativo. A menudo, los recursos del laboratorio permiten como mucho realizar la primera fase de una validación, que sería comparar el método alternativo con el de referencia. Pero la fase siguiente, un estudio interlaboratorio,

requiere de una organización compleja. Por ello, los métodos alternativos que se implantan suelen ser métodos validados por la empresa que los desarrolla y pretende comercializarlos y certificados por una entidad de certificación que comprueba que el método nuevo y el normativo son equivalentes.

CRITERIOS DE SELECCIÓN DE UN MÉTODO ALTERNATIVO

¿Mejora la rapidez y/o sencillez del ensayo?

¿Se adapta mejor a la organización y recursos del laboratorio?

¿Requiere instalaciones y equipamiento nuevo?

¿Es aceptable la relación coste-beneficio?

¿Qué recursos extra se necesitan para verificar o validar el método? ¿Dispone de certificación AFNOR, VALNORD o similar?

OBJETIVO DE LA PONENCIA

Exponer los resultados del laboratorio entre 2008 y 2018 en relación a los siguientes parámetros en que está acreditada una técnica alternativa: *Salmonella* spp., *Listeria monocytogenes* (LMO) y *E.coli* O157:H7 en alimentos y *Legionella pneumophila* en aguas.

MARCO NORMATIVO

Marco general de acreditación de laboratorios agroalimentarios: ISO/IEC 17025:2017 Requisitos generales para la competencia de los laboratorios de ensayo y calibración. Esta norma anulará y sustituirá a las Normas: UNE-EN ISO/IEC 17025:2005 y UNE-EN ISO/IEC 17025:2005 Erratum 2006 antes del 21/01/2021.

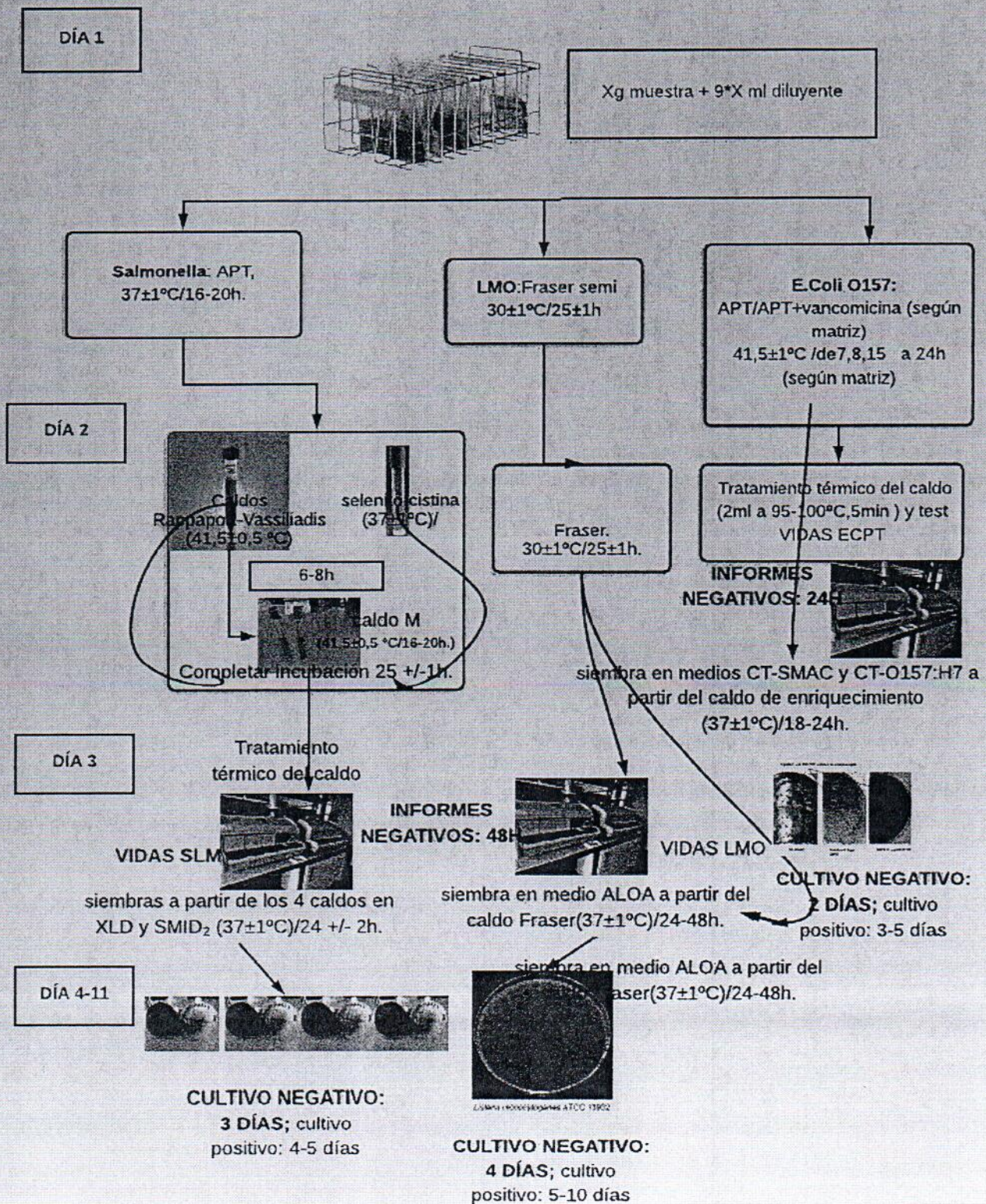
Marco particular de los parámetros evaluados:

Parámetro	Norma ISO de referencia en la legislación	Legislación
LMO (detección)	ISO 11290 -1:2017. Microbiología de la cadena alimentaria. Método horizontal para la detección y el recuento de <i>Listeria monocytogenes</i> y de <i>Listeria</i> spp. Parte 1: Método de detección	Reglamento (CE) 2073/2005, de 15 de Noviembre de 2005, relativo a los criterios microbiológicos aplicables a los productos alimenticios y modificaciones posteriores (Reglamentos 365/2010, 229 /20 19)
<i>Salmonella</i> spp	ISO 6579 -1: 2017. Microbiología de la cadena alimentaria. Método horizontal para la detección, enumeración y serotipado de <i>Salmonella</i> . Parte 1: Detección de <i>Salmonella</i> spp.	
<i>E.coli</i> O157:H7	ISO16654:2001. Microbiología de los alimentos para consumo humano y animal. Método horizontal para la detección de <i>E.coli</i> O157	No legislado en el reglamento 2073/2005
<i>Legionella</i> spp.	ISO 11731:2017. Calidad del agua. Recuento de <i>Legionella</i>	RD865/2003 de 4 de julio, por el que se establecen los criterios higiénico-sanitarios para la prevención y control de la legionelosis.

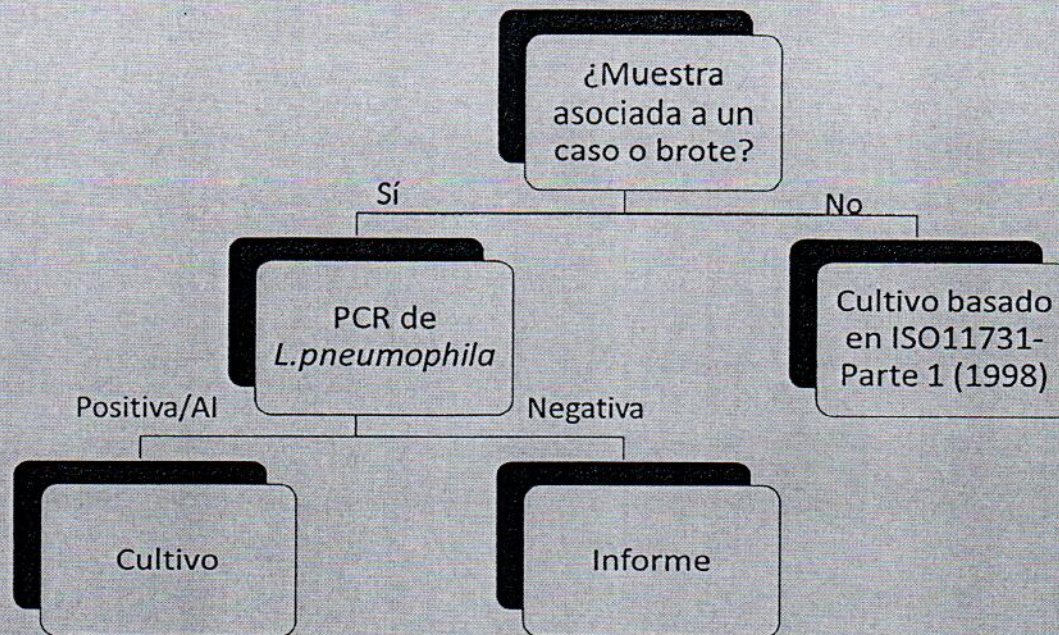
PROCEDIMIENTO DE TRABAJO EN EL LSPG

INVESTIGACIÓN DE PATÓGENOS EN ALIMENTOS: cribado mediante inmunoensayo automatizado VIDAS. Se emite el informe si el resultado es negativo y se confirma por cultivo si es positivo. La preparación de las muestras previa al test y la confirmación de resultados positivos se basa en la Norma ISO de referencia.

Fundamento del sistema VIDAS: Inmunoensayo automatizado en sándwich en fase sólida. Permite detectar antígenos del parámetro que se analiza usando el método ELFA (enzyme-linked fluorescent assay). La fase sólida es un cono recubierto de anticuerpos anti-antígeno diana (proteína recombinante de fibra de cola de fagos en el caso de VIDAS) y los distintos reactivos del inmunoensayo (tampones de lavado, conjugado anticuerpo-enzima y sustrato) están predispensados en pocillos de cartuchos listos para usar. La detección es por fluorescencia emitida a 450nm y la lectura e interpretación de resultados están automatizados. Tiempo del ensayo: 40-70min. La especificidad y sensibilidad se aproximan al 100% y los límites de detección son iguales o menores a los del cultivo

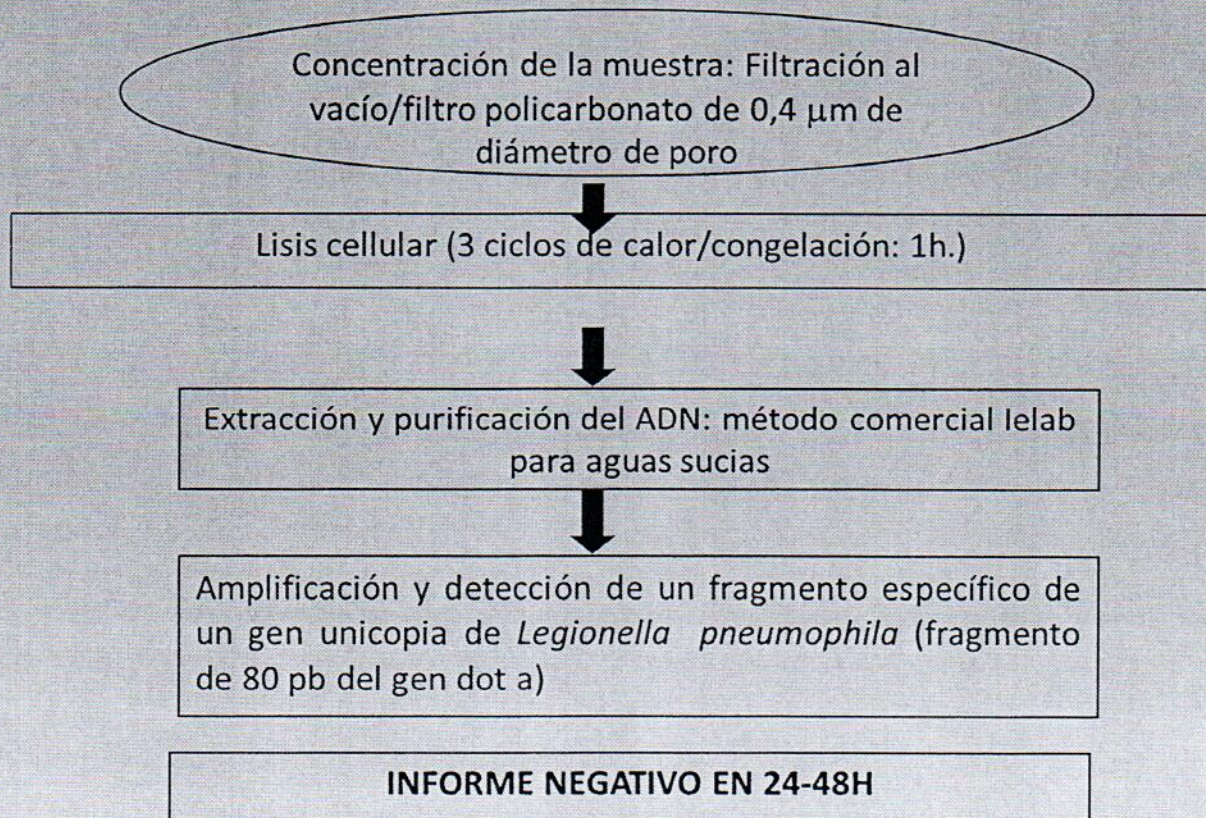


DETERMINACIÓN DE *Legionella* EN AGUAS: Estrategia de investigación:

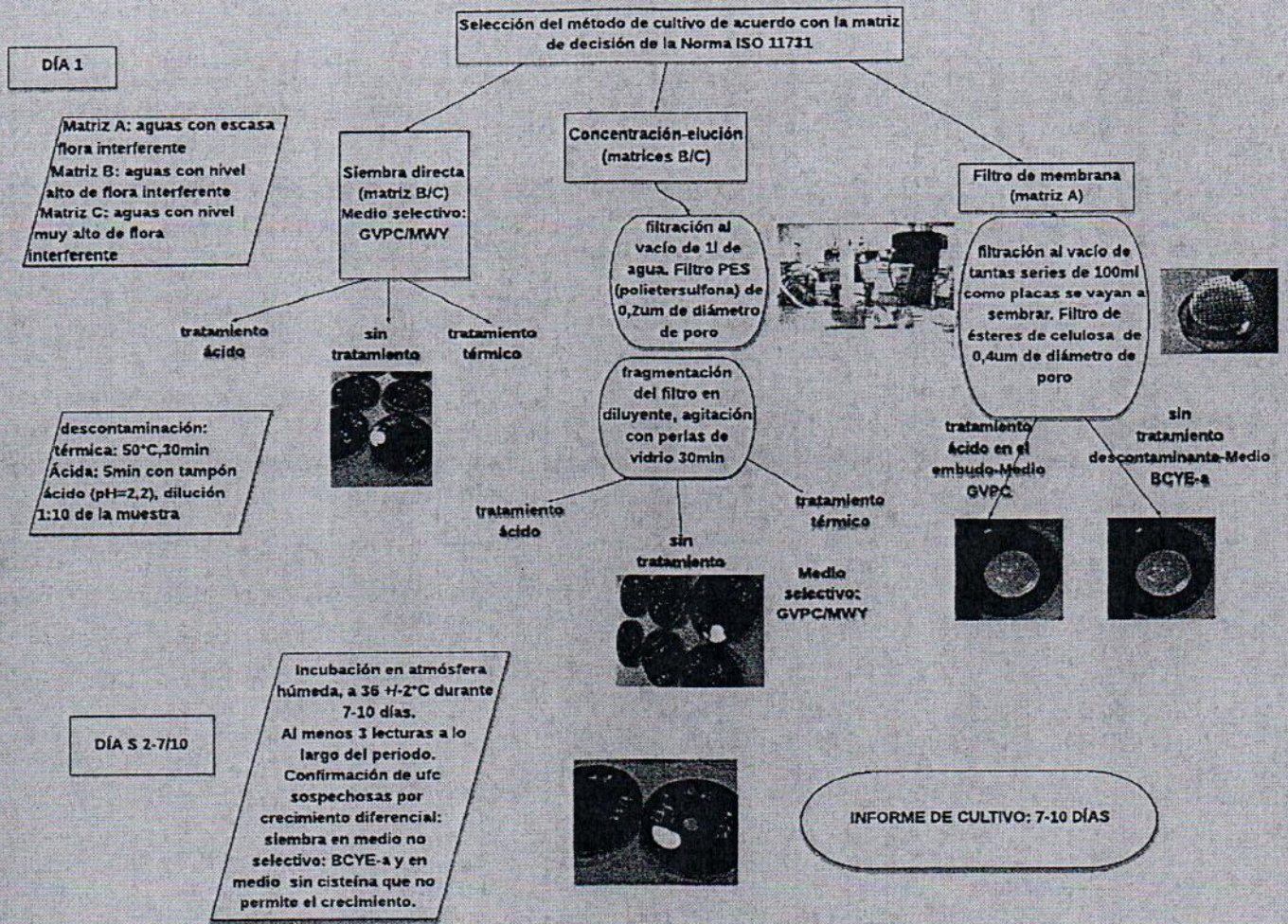


PROCEDIMIENTO:

Cribado de *L. pneumophila* por RT-PC

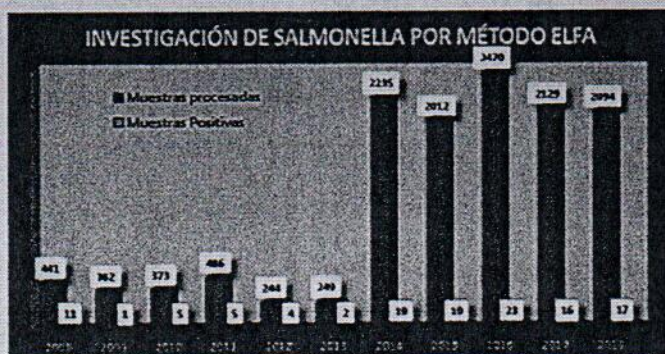


Confirmación por cultivo:



RESUMEN DE RESULTADOS DE LOS MÉTODOS ALTERNATIVOS 2008-2018

VIDAS:



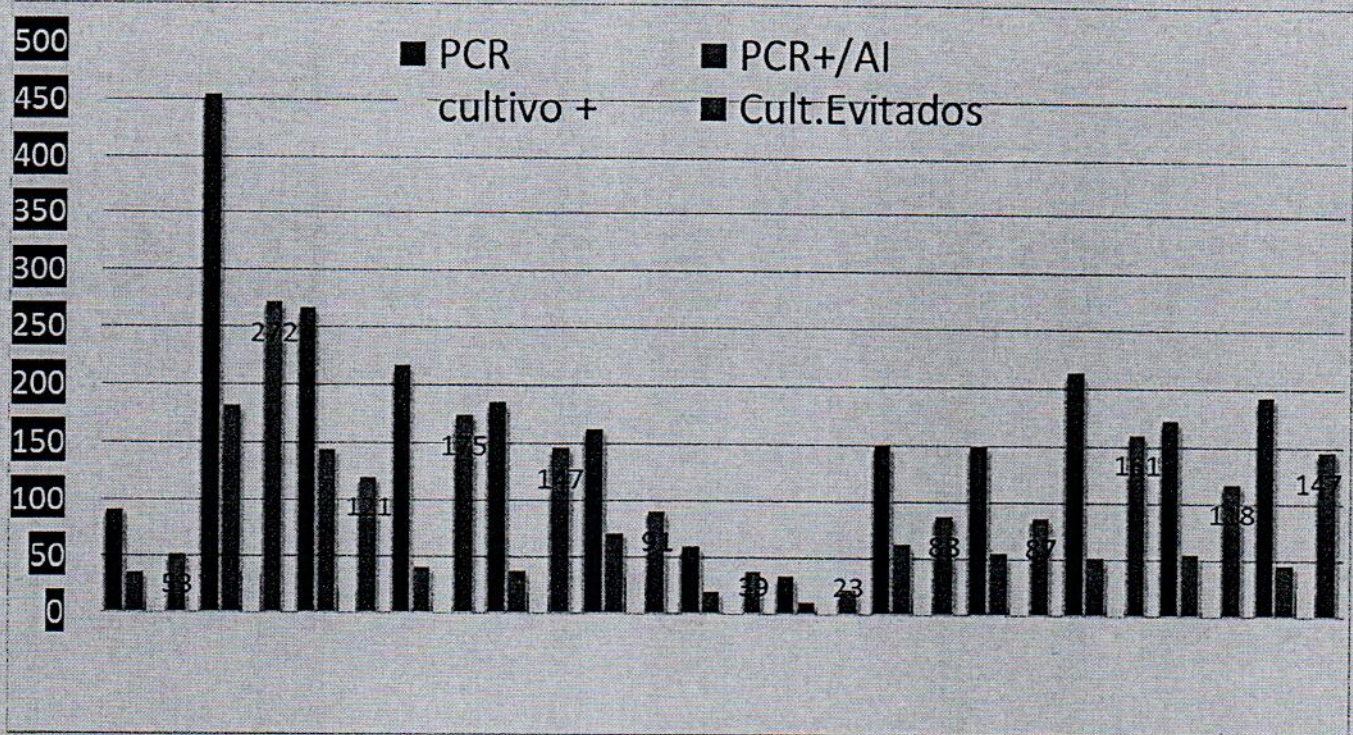
Porcentaje de muestras positivas

Salmonella: 0,90%
LMO: 1,80%
E.coli O157: 1,00%

OBSERVACIONES:

Como la investigación de estos parámetros se hace sobre alimentos procedentes de muestreos aleatorios, la frecuencia de resultados positivos es baja, lo que mejora la eficiencia del uso del cribado para descartar resultados negativos.

RT-PCR:



OBSERVACIONES:

No es raro que resultados positivos por PCR no se confirmen por cultivo. La sensibilidad de la técnica es de 0,99, pero si se calcula la especificidad en relación al cultivo no supera el 25-35%.

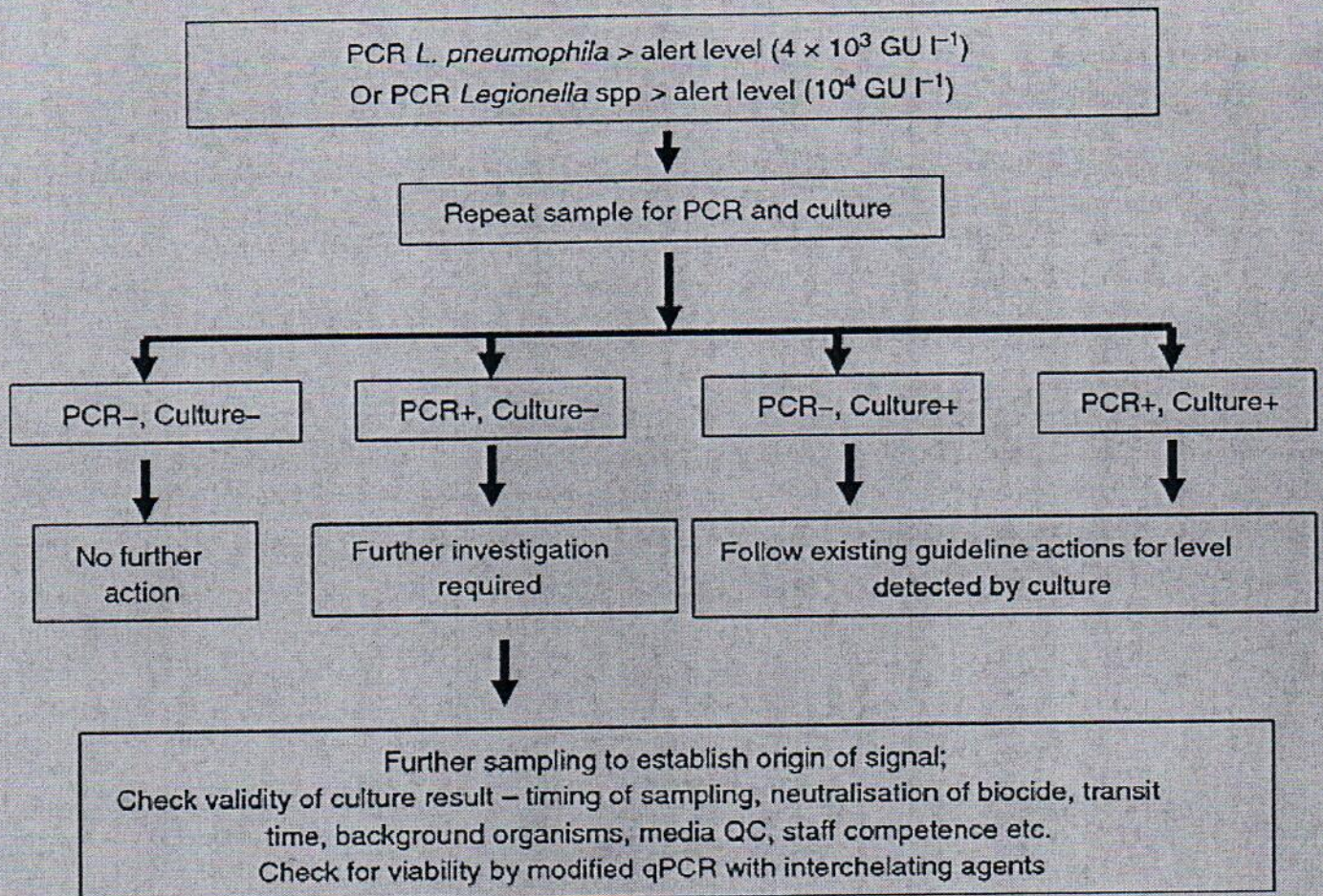
Por PCR pueden detectarse fragmentos de ADN procedentes de células no viables y de células viables no cultivables. El caso más característico de PCR "falso positivo" sería el de determinaciones realizadas en aguas de instalaciones sometidas a procedimientos de limpieza y desinfección en los días previos. La solución propuesta es la PCR de viabilidad⁽¹⁾.

Las características del agua, como temperaturas fuera del rango de multiplicación de la bacteria (<de 20°C y >45°C) pueden impedir el aislamiento en cultivo aunque exista una población viable; sería "falso negativo" por cultivo. La bacteria puede sobrevivir hasta 60°C, inactivándose por encima de 70°C. Es parásito intracelular de amebas, otros protozoos e incluso de otras bacterias.

La *Legionella* es una bacteria de crecimiento lento (tras la siembra en placa pueden no observarse ufc visibles hasta el día 4-9/10). Por ello en el resultado del cultivo la interferencia de la flora acompañante de crecimiento rápido es un factor que dificulta el aislamiento. Esta flora puede influir no sólo por la cantidad, sino también por inhibir (en ocasiones estimular) el crecimiento de *Legionella*.

Los resultados del laboratorio son cualitativos, con un límite de detección muy conservador, que asegura una elevada sensibilidad en relación al cultivo, pero hace menos efectiva la técnica (valor predictivo negativo muy alto, pero valor predictivo positivo bajo). Se va acumulando evidencia de que establecer un criterio cuantitativo como umbral para confirmar por cultivo mejora la eficiencia. Aunque faltan estudios para establecer niveles de alerta y acción basados en monitorización por PCR compatibles con guías técnicas y legislación, existen propuestas de algoritmos sobre este tema, como el propuesto por Lee et al⁽²⁾.

Algoritmo (Lee et al) propuesto para interpretar resultados de qPCR en investigación de brotes y monitorización de instalaciones



La RT-PCR y el cultivo son técnicas complementarias. La combinación de las dos proporciona una visión más completa de la colonización de instalaciones por *Legionella*

CONCLUSIONES SOBRE LA IMPLANTACIÓN DE LOS MÉTODOS ALTERNATIVOS

- El adelanto en el tiempo de los resultados mejora la capacidad de toma de decisiones. En el caso de brotes de legionelosis permite acelerar mucho la investigación epidemiológica, pues se descartan instalaciones como negativas en 1-2 días en lugar de 7-10 y los resultados positivos (aunque la legislación exige la confirmación por cultivo) ayudan a clasificar provisionalmente en categorías de mayor o menor riesgo de propagar legionelosis esas instalaciones
- Validación/acreditación: Cuando se implantó en el laboratorio el método VIDAS ya estaba certificado por AFNOR, por lo que sólo fue necesario un procedimiento sencillo de verificación. Sin embargo, la RT-PCR empezó a usarse en 2006 y se validó y acreditó en 2009-2010 usando kits comerciales validados, pero sin certificación; por lo que el proceso fue más complejo y largo que en el caso de los ensayos VIDAS. Actualmente ya disponen de certificación algunos ensayos de RT-PCR para *Legionella*.
- Gestión de residuos: el cultivo de *Legionella* puede generar más de 30 placas a partir de una sola muestra. Se emplean sobre todo medios de cultivo selectivos, con antibióticos, por lo que al evitar cultivos se reduce el volumen y la toxicidad de los residuos generados. (los fluoróforos con que se marcan las sondas de hibridación también son agentes tóxicos, pero se encuentran en concentración muy baja y se manejan volúmenes muy pequeños)
- Automatización: En el laboratorio todas las fases del ensayo de RT-PCR son manuales, pero existen diferentes alternativas para automatizar la extracción de ADN. La empresa Pall systems comercializa una línea de trabajo certificada que comprende desde la extracción de ADN hasta RT-PCR con lectura automatizada. Suministran discos de reactivos listos, de forma que no es necesario preparar las placas o microtubos de amplificación; es suficiente con inocular la muestra en el disco. Un mayor grado de



automatización siempre conlleva trabajar con sistemas más cerrados, exclusivos de una casa comercial, igual que ocurre con el método VIDAS.

- Flexibilidad en la organización del trabajo:
 - El procedimiento VIDAS permite cierta flexibilidad en cuanto a tiempos de incubación, posibilidad de conservar refrigerados caldos de enriquecimiento 24-48h...; por lo que es fácil para una organización adaptar la técnica a los horarios de trabajo
 - En el caso del ensayo de RT-PCR la flexibilidad es aún mayor, puesto que se puede detener el ensayo en varios puntos de la fase de extracción y una vez extraído el ADN congelar el extracto a -70°C durante meses. Sin embargo, la urgencia no sólo en obtener un resultado, sino también en cultivar las muestras positivas (la normativa aconseja no exceder 48h entre recogida de muestra e inicio del ensayo) limita mucho esta flexibilidad

REFERENCIAS

1- Lizana, X., López, A., Benito S. et al (2017). Viability qPCR, a new tool for Legionella risk management. Int. J. Hyg. Environ. Health. 220, 1318-1324

2- Lee, J.V., Lai, S., Exner, M. et al (2011). An international trial of quantitative PCR for monitoring *Legionella* in artificial water systems. J. Appl. Microbiol. 110 (4), 1032-1044