

## VALIDACIÓN DE MICROSTICK-SALMONELLA Y MICROSTICK-LISTERIA CON CEPAS DE REFERENCIA Y EN MUESTRAS NATURALES

Jorge SANCHIS SOLERA, Lab.MICROKIT, S.L.

Se realizó una **validación inicial** del mejor protocolo encontrado para el uso de los MICROSTICK inmunocromatográficos "sticks" de MICROKIT, que es el protocolo que consta en sus folletos de instrucciones: pre-enriquecimiento en Buffered Peptone Neutralizing de MICROKIT + post-enriquecimiento en SS Broth de MICROKIT para Salmonella y pre-enriquecimiento en LEB de MICROKIT + post-enriquecimiento en LEB de MICROKIT para Listeria, seguidos del uso directo del caldo post-enriquecido en el stick y lectura visual en 5 minutos de bandas roja y verde (+) o sólo verde (-). Esta validación se realizó tras vernos obligados a invalidar los protocolos de enriquecimiento ISO 6579 e ISO 11290 con el stick, ya que en éstos los microorganismos diana no flagelaban bien y se obtenían falsos negativos (porque el mismo detecta los antígenos flagelares y por eso mismo tampoco es útil para confirmar colonias). Se emplearon junto con las cepas diana cuantitativas (*Salmonella nottingham*, *Listeria monocytogenes*) concentraciones al menos 100-1000 veces mayores de diversas mezclas de cepas interferentes y acompañantes de colección (*Proteus mirabilis*, *Citrobacter freundii*, *E.coli*, *Enterococcus faecalis*, *Micrococcus luteus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Listeria grayii*, *Listeria ivanovii*, *Listeria welshimeri*, *Listeria innocua* –estas Listeria también se consideraron diana para el stick de Listeria-). La validación se realizó en 20 tipos diferentes de matrices alimentarias (Hamburguesa cruda ternera, Leche pasteurizada, Pescado crudo, Ensalada vegetal con lechuga, tomate y zanahorias, Huevos crudos, Patatas fritas al ajo-pimienta-alioli, Harina de trigo, Pollo crudo, Papilla de frutas, Barritas dietéticas de chocolate, Salsa rosa, Crema catalana, Pasteles variados, Helado de vainilla, Chorizo loncheado, Queso curado, Mix de mariscos, Galletas de perro, Paella de marisco, Spaguetis carbonara). Los resultados concretos fueron:

**1-Salmonella:** 1 falso positivo de *E.coli* (inoculado junto con *Staphylococcus epidermidis* y *Listeria monocytogenes*) en pollo crudo (al confirmar se obtienen colonias negras en Cromosalm e incoloras con viraje del medio a amarillo en XLD) y 1 falso positivo de *E.coli* (inoculado junto con *Micrococcus luteus* y *Listeria welshimeri*) en pescado crudo (al confirmar se obtienen colonias negras en Cromosalm e incoloras con viraje del medio a amarillo en XLD). Sensibilidad: 100%. Especificidad: 90%. Límite de detección: desde 10-16 ufc/25 g (o incluso inferior si hubiéramos conseguido cepas a menor concentración, pero en esos niveles tan bajos la incertidumbre se dispara y es mejor no arriesgarse a sembrar un inóculo de 0 ufc que creamos positivo). Otras conclusiones de todos estos estudios:

-No se aprecia diferencia entre post-enriquecer 1 ml ó 0,1 ml, por lo que no defendemos lo que otros autores sobre añadir 0,1 ml de pre-enriquecimiento al post-enriquecimiento por ser supuestamente mejor que añadir 1 ml, ya que 1 ml es mucho más representativo si la muestra inicialmente tenía muy baja contaminación por Salmonella; además, tras resembrar en los agares Cromosalm y XLD, crecen más colonias típicas con post-enriquecimiento de 1ml que con el de 0,1ml.

-El post-enriquecimiento es necesario, ya que incubando 18 (y también 36 h) el pre-enriquecimiento y haciendo directamente el stick en él, los restos de alimento impiden la migración correcta de los antígenos por el stick, obteniendo falsos negativos. El Rappaport no es bien absorbido por la membrana del kit, mientras el SS Broth sí lo es y a pesar de estar algunos de sus tubos negros,

no dejan residuo suficiente como para ocultar el resultado. De modo que el SS Broth detecta un 80% más positivos reales que el Rappaport Broth con este kit.

-Toda banda roja, por tenue que sea, debe considerarse positiva. Todo positivo debe confirmarse con los Agares Cromosalm y XLD.

-No se debe hervir el caldo como anuncian otros protocolos a fin de extraer los antígenos y poder trabajar con muestras libres de patógenos, ya que hirviendo, la banda roja de los positivos se aprecia mucho peor.

-Generalmente no hace falta esperar 15 minutos y en los primeros 2-5 minutos ya se ven los positivos, pero en caso contrario hay que esperar 15 minutos por si acaso se trata de un positivo lento.

-Una vez utilizado el kit y obtenido negativo, aunque se deje secar, no funciona adecuadamente aunque incluyamos altas concentraciones de Salmonella.

-Precaución: las bandas negras no cuentan: son acúmulo del precipitado negro del medio SS que se dan circunstancialmente (solo 1 vez en 60 tiras) y no representan un positivo, donde la banda es roja, ni un negativo, donde no hay banda roja, ya que no se puede apreciar: en tal caso, hay que repetir el test.

-En definitiva, hay que seguir al pie de la letra las instrucciones de enriquecimiento de MICROKIT, ya que otras combinaciones, otras temperaturas y otros medios han demostrado no ser válidos y disminuir drásticamente la efectividad del kit, donde la correcta flagelación es fundamental.

**2- Listeria:** 1 “falso negativo” de *L.ivanovi* en leche pasteurizada (lo marcamos entre comillas porque no es realmente nuestro microorganismo diana, que es *L.monocytogenes*) y 1 falso positivo de Proteus, Salmonella o Staphylococcus en harina de trigo. Sensibilidad 95-100%, según se mire. Especificidad: 95%. Límite de detección: desde 6-10 ufc/25 g (o inferior si hubiéramos conseguido cepas a menor concentración, pero en esos niveles tan bajos la incertidumbre se dispara y es mejor no arriesgarse a sembrar un inóculo de 0 ufc que creamos que es positivo).

Se obtienen idénticas conclusiones que en Salmonella en cuanto a: Post-enriquecer 1 ml en lugar de 0,1 ml. Todos los tubos LEB enturbian, sin que esto indique nada en cuanto a presencia o ausencia de Listeria. Es necesario el post-enriquecimiento porque el residuo de alimento del pre-enriquecimiento interfiere en la difusión de los antígenos en el stick. Debe considerarse positiva toda banda roja aunque sea tenue. A pesar de insistir la bibliografía en que incubar a 30°C permite una mejor flagelación en Listeria que incubando a 35-37°C, hemos comprobado que podemos incubar entre 30 y 39°C sin diferencias en la detección de Listeria con el stick. Todas las cepas de Listeria dan positivo con el stick (salvo el caso de *L.ivanovii* en leche pasteurizada). Los positivos se ven en 2-5 minutos pero hay que esperar 15 minutos si no aparece la banda roja, por prudencia de un posible positivo lento. Una vez usado el kit y habiendo obtenido resultado negativo, no se puede reutilizar, ya que ni siquiera con grandes concentraciones de Listeria, da positivo. Hay que seguir al pie de la letra las instrucciones de MICROKIT. Es impresionante observar que tras solo 18 h de enriquecimiento en LEB de 8 ufc con  $10^2$ - $10^3$  ufc de flora acompañante e interferente, la siembra directa en Agar Cromocytogenes no produce un solo falso negativo, lo que invita a promover un protocolo de detección en solo 36h con 18 h LEB + 18 h Cromocytogenes.

Se añade a esta validación inicial del fabricante, una **post-validación en muestras de campo** con flora natural, gracias a los resultados aportados por algunos de los laboratorios usuarios de este método, todos los cuales prefieren permanecer en el anonimato.

1-En **Salmonella** se encuentra 1 falso positivo recurrente, en concreto una cepa de la colección CECT de *E.coli*.

La **especificidad** general del stick en un total de 290 muestras naturales de todo tipo de alimentos analizados con el stick desde Diciembre de 2011 hasta Marzo de 2013 por los laboratorios que nos aportan sus datos (1 falso+/290), es del 99,65 %.

No se nos informa de ningún falso negativo del método, lo cual concuerda con el 100% de **sensibilidad** encontrada por el fabricante en la validación inicial.

2-En **Listeria** hay una Identificación falsamente positiva con el stick, con factor de confianza de 0.8952 en galerías Crystal G+ para *Enterococcus faecium*, y otro posible falso positivo de *Enterococcus avium*: se trata de un cocobacilo oxidasa - catalasa - (por esto sería Streptococo/Enterococo, no Listeria), negativo para látex de Listeria, sin embargo la galería Microbact-12L da como resultado con probabilidad de más de 98 % siempre la especie *Listeria grayi*: Esculina + , Arabitól - , Trehalosa + , Methyl-D-Glucoside- , Mannitol + , Ribosa + , Tagatosa + , Methyl-D-Mannoside + , Xylosa + , Rhamnosa - , Glucosa-1-Phosphate - , Haemolisis + / -. De este modo, caso de ser realmente esta segunda cepa *E. avium* en vez de *L. grayi*, se confirmaría un falso positivo para el stick en dos ocasiones de 10 para cocos pertenecientes al género *Enterococcus* (*E. faecium* y *E. avium*) en muestras que proceden de productos para dietas hipernutritivas para usos médicos especiales para nutrición enteral, donde las materias predominantes son proteína láctea. Así, la especificidad del stick en este tipo de muestras concreta se reduciría al 80-90%. Recordemos que si el stick da positivo en *L.grayi*, no se trata de un falso +, ya que es un stick para *Listeria spp.*, que sirve de screening negativo, ya que si no hay *Listeria spp.* tampoco hay *L.monocytogenes*, que es la que nos preocupa; pero en los casos en que el stick detecte que sí hay *Listeria spp.*, debemos confirmar a ver si se trata o no de *L.monocytogenes*.

La **especificidad** general del stick en un total de 540 muestras naturales de todo tipo de alimentos analizadas con el stick desde Diciembre de 2011 hasta Marzo de 2013 por los laboratorios que nos aportan sus datos (1-2 falsos positivos/540), es de al menos el 99,63%.

No se nos informa de ningún falso negativo del método, lo cual concuerda con el 100% de **sensibilidad** encontrada por el fabricante en la validación inicial.

Por todo ello, se vuelve a demostrar, también en muestras de campo analizadas por sus diferentes usuarios, que el MICROSTICK-Salmonella y el MICROSTICK-Listeria, empleados estrictamente con el protocolo validado por MICROKIT, son dos excelentes métodos de screening negativo de muestras sin necesidad de aparataje alguno, ya que su sensibilidad (ausencia de falsos negativos) es del 100%, de modo que hasta la fecha no se ha escapado ni una sola muestra que tuviera *Listeria monocytogenes* o *Salmonella spp.* y no fuese detectada por el respectivo stick. Y su especificidad (escasez de falsos positivos) es suficientemente elevada como para ahorrarnos posteriores confirmaciones y trabajo extra en el 99,6% de las muestras, donde el stick no da resultado positivo. Eso sí, en todos los (escasísimos 0,4%) resultados positivos de los sticks en muestras naturales hay que confirmar no se traten de falsos positivos, estriando el mismo caldo de post-enriquecimiento donde acabamos de realizar el análisis inmunocromatográfico, en agares adecuados (Cromosalm y XLD para Salmonella y Cromocytogenes para Listeria) e identificando las colonias sospechosas que crezcan en los mismos. De este modo, el ahorro de trabajo y de tiempo de análisis es impresionante para la mayoría de muestras que, de entrada, resultan negativas con los sticks.

VII Congreso Ciencia y Tecnología de los Alimentos, Córdoba, Junio de 2013