

Condaene®

**Condagene® *Listeria monocytogenes*  
(CAT. 6516)**

# Alcance

El objetivo de este kit es detectar el patógeno *Listeria monocytogenes* en porciones de muestras de alimentos después de un enriquecimiento previo de acuerdo con los procedimientos estándar de microbiología como la **ISO 11290-1**, por lo tanto, también de acuerdo con la **ISO 20837**.

Además, se puede utilizar para confirmar colonias sospechosas aisladas en medios de cultivo selectivos.

Este kit de PCR ha sido fabricado de acuerdo con las especificaciones técnicas del método **FDA, BAM Protocol Simultaneous Confirmation of Listeria species and L. monocytogenes isolated by real-time PCR (26/03/18)**.

## Instrumento

**Termociclador:** Thermo Scientific PikoReal Real-Time PCR System.

**Software:** Thermo Scientific SureTec™ Software Versión 2.2.

## Referencias

Este informe de rendimiento se basa en la norma **ISO 22118:2011** (*Microbiología de alimentos y piensos para animales — Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para la detección y cuantificación de patógenos transmitidos por los alimentos — Características de rendimiento*). Adicionalmente, se han realizado evaluaciones complementarias para actualizar y mejorar la evaluación del método:

- Los aspectos de la PCR cuantitativa se evalúan de acuerdo con la cláusula 9 de la **ISO/TS 12869** actual. Aunque esta norma pertenece al campo de la microbiología ambiental, la evaluación del rendimiento de la qPCR contiene criterios técnicos explícitos que también se pueden aplicar a un método PCR de microbiología alimentaria.
- El LOD y RLOD de todo el flujo de trabajo se calcularon de acuerdo con **ISO 16140-2** (cláusula 5.1.4).

## TESTS

### 1. Pruebas de inclusividad y exclusividad

A la fecha de emisión de este informe, su especificidad sigue siendo válida según las secuencias contenidas en el NCBI GenBank.

#### a) Prueba de inclusión

Esta prueba corresponde al análisis de cepas pertenecientes a la especie *Listeria monocytogenes*, realizado directamente por Condalab.

NOMBRE	REFERENCIA	NOMBRE	REFERENCIA
<i>Listeria monocytogenes</i>	ATCC® 35152	<i>Listeria monocytogenes</i>	ATCC® 19113
<i>Listeria monocytogenes</i>	ATCC® 19112	<i>Listeria monocytogenes</i>	ATCC® 19117
<i>Listeria monocytogenes</i>	ATCC® 13932	<i>Listeria monocytogenes</i>	ATCC® 15675

NOMBRE	REFERENCIA	NOMBRE	REFERENCIA
<i>Listeria monocytogenes</i>	ATCC® 19114	<i>Listeria monocytogenes</i>	ATCC® 15313
<i>Listeria monocytogenes</i>	ATCC® BAA 751	<i>Listeria monocytogenes</i>	ATCC® 19115
<i>Listeria monocytogenes</i>	ATCC® 43256	<i>Listeria monocytogenes</i>	ATCC® 19111
<i>Listeria monocytogenes</i>	ATCC® 7644	<i>Listeria monocytogenes</i>	ATCC® 19116

En todos los casos los resultados fueron positivos.

### a) Prueba de exclusividad

Esta prueba corresponde al análisis de cepas distintas de *Listeria monocytogenes*, que pueden causar interferencia o pueden estar naturalmente presentes en cada uno de los materiales de prueba. Pruebas realizadas directamente por Condalab.

NOMBRE	REFERENCIA	NOMBRE	REFERENCIA
<i>Aeromonas hydrophila</i>	ATCC® 7966	<i>Listeria grayi</i>	ATCC® 25401
<i>Acinetobacter baumani</i>	ATCC® 19606	<i>Listeria innocua</i>	ATCC® 33090
<i>Acinetobacter spp.</i>	ATCC® BAA-1605	<i>Listeria ivanovii subs ivanovii</i>	ATCC® 19119
<i>Alcaligenes faecalis</i>	ATCC® 8750	<i>Listeria ivanovii subs ivanovii</i>	CECT® 5373
<i>Bacillus cereus</i>	ATCC® 11778	<i>Listeria ivanovii subs lond.</i>	ATCC® 49954
<i>Bacillus subtilis</i>	ATCC® 6051	<i>Listeria marthii</i>	ATCC® BAA 1595
<i>Burkholderia cepacia</i>	ATCC® 25608	<i>Listeria rocourtiae</i>	DSMZ® 22097
<i>Campylobacter jejuni</i>	ATCC® 43478	<i>Listeria seeligeri</i>	ATCC® 35967
<i>Campylobacter coli</i>	ATCC® 33291	<i>Listeria welshimeri</i>	ATCC® 35897
<i>Citrobacter freundii</i>	ATCC® 8090	<i>Listeria weihenstephanensis</i>	DSMZ® 24698
<i>Citrobacter freundii</i>	ATCC® 43864	<i>Proteus mirabilis</i>	ATCC® 12453
<i>Clostridium perfringens</i>	ATCC® 10543	<i>Proteus vulgaris</i>	ATCC® 6380
	ATCC® 13124	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC® 9027
	ATCC® 13048		ATCC® 27853
<i>Enterobacter faecalis</i>	ATCC® 19433		ATCC® 10145
	ATCC® 29212	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	ATCC® 13525
<i>Enterobacter cloacae</i>	ATCC® 13047	<i>Pseudomonas putida</i>	ATCC® 31483
<i>Enterococcus faecium</i>	ATCC® 6057		
<i>Enterococcus faecalis</i>	ATCC® 19433	<i>Serratia marcescens</i>	ATCC®13880
<i>Flavobacterium cети</i>	CECT® 7184	<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC® 25923
<i>Escherichia coli</i>	ATCC® 11775		ATCC® 6538
	WDCM00179	<i>Stenotrophomonas maltophila</i>	CECT® 7853
	ATCC® 8739	<i>Yersinia enterocolitica</i>	ATCC® 9610
	ATCC® 25922	<i>Legionella pneumophila</i>	ATCC® 33152
<i>Klebsiella oxytoca</i>	ATCC® 13182		

<i>Salmonella spp</i> Nombre (Le Minor y Popoff, 1987) <sup>1</sup>	Referencia
<i>S. enterica</i> subsp. <i>arizonae</i>	ATCC® 13314
<i>S. enterica</i> subsp. <i>bongori</i>	ATCC® 43975
<i>S. enterica</i> subsp. <i>diarizonae</i>	ATCC® 12325
<i>S. enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar <i>Abony</i>	NCTC® 6017
<i>S. enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar <i>Anatum</i>	ATCC® 9720
<i>S. enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar <i>Enteritidis</i>	ATCC® 13076
<i>S. enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar <i>Gallinarum</i>	ATCC® 9184
<i>S. enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar <i>Typhi</i>	ATCC® 6539
<i>S. enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar <i>Typhimurium</i>	ATCC® 13311
<i>S. enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar <i>Typhimurium</i>	ATCC® 14028
<i>S. enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar <i>Paratyphi</i>	ATCC® 9150
<i>S. enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar <i>Poona</i>	NCTC® 4840
<i>S. enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar <i>Pullorum</i>	ATCC® 13036

En todos los casos los resultados fueron negativos.

### c) Inclusividad / Exclusividad con cepas de aislamientos naturales

En el contexto de un ensayo ciego, se examinaron 42 extractos de ADN de *L. monocytogenes* y *Listeria spp* no *monocytogenes* aisladas de muestras de alimentos. Del total ensayado, 39 muestras provenían de un instituto público de investigación y 3 se recibieron de un laboratorio de control externo.

qPCR Kit Cat. 6516

		+	-
ISO 11290-1	+	22	0
	-	0	20

En todos los casos las identificaciones fueron correctas.

## 2. Verificación de la función de calibración de la fase cuantitativa de la PCR

La detección de *L. monocytogenes* no es una técnica cuantitativa; sin embargo, para una mejor caracterización de la reacción de PCR, se proporciona información sobre su desempeño siguiendo la norma **ISO/TS 12869** (Cláusula 9).

PARÁMETRO	VALOR REFERENCIA	VALOR OBTENIDO	EVALUACIÓN
Eficiencia	75% - 125%	89,5%	ok
Recta de regresión, pendiente ( $y=ax+b$ )	$-4,115 < a < -2,839$	- 3,6032	ok
Desempeño de la regresión lineal ( $E_{lin}$ ), en todos los niveles evaluados	$E_{lin} \leq 0,15$	Todos < 0,15	ok

<sup>1</sup>Le Minor, L., and M. Y. Popoff. 1987. Request for an opinion. Designation of *Salmonella enterica* sp. nov., nom. rev., as the type and only species of the genus *Salmonella*. Int. J. Syst. Bacteriol. 37:465-468

PARÁMETRO	VALOR REFERENCIA	VALOR OBTENIDO	EVALUACIÓN
Verificación del límite de cuantificación, (25 UG) $E_{LQ}$	$E_{LQ} \leq 0,15$	0,067	ok
Verificación del límite de detección de PCR LDqPCR $\leq 13$ UG (10 repeticiones)	LDqPCR > 90%	100%	ok
Verificación del límite de detección de PCR LDqPCR $\leq 7$ UG (10 repeticiones)	LDqPCR > 90%	90%	ok

### 3. Sensibilidad del método

Se compararon el aislamiento de colonias en Agar ALOA con la detección por PCR después del enriquecimiento primario (a) y secundario (b) conforme a [ISO 11290-1](#):

**Selección de muestras:** 10 porciones de diferentes categorías de alimentos inoculadas en dos niveles diferentes. Nivel 1: 1-10 ufc/25gr, Nivel 2: 10-40 ufc/25 gr *Listeria monocytogenes* spp cfu (ATCC® 35152).

**Flora acompañante complementaria:** 100-1000 ufc *E.coli* ATCC® 11775, 100-1000 ufc *Staphylococcus aureus* ATCC® 25923.

**Enriquecimiento primario (a):** Incubación de la porción de muestra (25 g or 25 mL) en Half Fraser, 225 mL,  $30 \pm 1^\circ\text{C}$ , 26-28 h. Muestra preparada conforme al correspondiente ISO 6887 estándar. Aislamiento en placa en Agar ALOA  $37 \pm 1^\circ\text{C}$ ,  $24 \pm 2\text{h}$  y si fuera necesario añadir  $24 \pm 2\text{h}$ .

**Enriquecimiento secundario (b):** 0,1 mL del caldo primario en 10 ml de caldo Fraser precalentado e incubado a  $37 \pm 1^\circ\text{C}$ ,  $24 \pm 2\text{h}$ . Aislamiento en placa en Agar ALOA  $37 \pm 1^\circ\text{C}$ ,  $24 \pm 2\text{h}$  y si fuera necesario añadir  $24 \pm 2\text{h}$ .

**Purificación de ADN:** 1 mL of Half Fraser (a) o Fraser (b), Cat. 6500 Kit de Extracción Condagene® Complex.

**qPCR:** 5µL of ADN conforme al Cat. 6516 Kit Condagene® *Listeria monocytogenes*.

**Controles:** Se utilizó una muestra no inoculada como proceso de control negativo para cada categoría de alimentos y lote analítico. Cada serie de PCR incluye controles positivos y negativos. Cada tubo de PCR incluye un control de PCR interno.

Resumen de los niveles de inóculo de *Listeria monocytogenes*.

CATEGORÍA / TIPO / ARTÍCULO	UFC/25GR
Leche y productos lácteos procesados térmicamente; pasteurizados; Queso Mozzarella	5
Leche y productos lácteos procesados térmicamente; pasteurizados; Queso rallado	34
Productos vegetales procesados; Hummus	12
Productos vegetales procesados; Guacamole	38
Listo para comer; Crema de Verduras	6
Listo para comer; Crema De Calabaza	12
Productos elaborados cárnicos: Trocitos de Jamón	6
Productos elaborados cárnicos: Trocitos de Jamón	24

Huevos líquidos pasteurizados	5
Huevos líquidos pasteurizados	11
Productos cárnicos procesados: Salchicha	3
Productos cárnicos procesados: Salchicha	24
Leche y productos lácteos con tratamiento térmico, Leche en polvo. Fórmula para bebé	6
Leche y productos lácteos con tratamiento térmico, Leche en polvo. Fórmula para bebé	38
Alimentos multicomponentes. Papilla de galletas, cereales y leche	5
Alimentos multicomponentes. Papilla de galletas, cereales y leche	34

De acuerdo con ISO 16140-2 (5.1.4), las siguientes tablas muestran los resultados del análisis de datos realizados de acuerdo con la hoja de cálculo pública. (<https://standards.iso.org/iso/16140/-2/>)

### a) Protocolo rápido (sólo enriquecimiento primario)

NOMBRE	RLOD	RLODL	RLODU	B=LN (RLOD)	SD(B)	PRUEBA Z	VALOR P
Leche y productos lácteos	1,000	0,379	2,637	0,000	0,485	0,000	1,000
Productos vegetales procesados	2,047*	0,840	4,986	0,716	0,445	1,609	0,108*
Listo para comer, crema vegetal	1,000	0,288	3,471	0,000	0,622	0,000	1,000
Productos elaborados cárnicos	0,472	0,178	1,256	-0,750	0,489	1,534	1,875
Huevos líquidos pasteurizados	1,000	0,440	2,274	0,000	0,411	0,000	1,000
Productos cárnicos procesados	0,880	0,354	2,189	-0,128	0,455	0,280	1,221
Leche en polvo	1,000	0,288	3,471	0,000	0,622	0,000	1,000
Alimentos multicomponentes	1,000	0,353	2,831	0,000	0,520	0,000	1,000
<b>Combinado</b>	<b>1,026</b>	<b>0,775</b>	<b>1,359</b>	<b>0,026</b>	<b>0,141</b>	<b>0,183</b>	<b>0,855</b>

En uno de los productos vegetales procesados (Guacamole) la proporción de resultados positivos fue menor para el método de PCR,  $p = 0,108$  ( $0,05 < \alpha \leq 0,1$ ).

### b) Protocolo completo (enriquecimiento secundario)

NOMBRE	RLOD	RLODL	RLODU	B=LN (RLOD)	SD(B)	PRUEBA Z	VALOR P
Leche y productos lácteos	1,000	0,379	2,637	0,000	0,485	0,000	1,000
Productos vegetales procesados	1,000	0,288	3,471	0,000	0,622	0,000	1,000
Listo para comer, crema vegetal	1,000	0,288	3,471	0,000	0,622	0,000	1,000
Productos elaborados cárnicos	1,000	0,288	3,471	0,000	0,622	0,000	1,000
Huevos líquidos pasteurizados	1,000	0,440	2,274	0,000	0,411	0,000	1,000
Productos cárnicos procesados	0,876	0,347	2,215	-0,132	0,464	0,284	1,224
Leche en polvo.	1,000	0,288	3,471	0,000	0,622	0,000	1,000
Alimentos multicomponentes	0,748	0,243	2,300	-0,290	0,562	0,517	1,395
<b>Combinado</b>	<b>0,940</b>	<b>0,696</b>	<b>1,270</b>	<b>-0,062</b>	<b>0,150</b>	<b>0,412</b>	<b>1,320</b>

RLOD: nivel de detección relativo estimado

RLODU: límite superior del intervalo de confianza del 95% para RLOD

RLODL: límite inferior del intervalo de confianza del 95% para RLOD

$b=\ln(\text{RLOD})$ : logaritmo del valor RLOD

Valor p: valor p de una prueba z

El RLOD es la relación entre el LOD del método 2 (método alternativo - PCR) y el LOD del método 1 (método de referencia - Placa de agar): si el valor RLOD obtenido es mayor que uno, entonces el LOD de un método alternativo es mayor que el LOD del método de referencia, por lo que el método alternativo es menos sensible que el método de referencia, y viceversa.

Para datos de estudios pareados, el límite de aceptación de RLOD se establece en un valor de 1,5, lo que significa que el LOD del método alternativo no debe ser más de 1,5 veces el LOD del método de referencia. Siempre es aceptable un valor LOD del método alternativo inferior al valor LOD del método de referencia, ya que esto significa que es probable que el método alternativo detecte niveles más bajos de contaminación que el método de referencia.

Los resultados presentados generalmente muestran estimaciones ROLD equivalentes para los dos métodos, tanto para el protocolo a) como para el b). Hay que tener en cuenta que matrices específicas como el Guacamole pueden tener una recuperación menor que el cultivo. Para productos como este se recomienda el protocolo B.

## 4. Veracidad y precisión

De acuerdo con ISO 22118:2011 (cláusula 5.2.1.1), la veracidad y la precisión se pueden evaluar con el valor de las tasas de falsos positivos y falsos negativos.

**Productos:** Muestras reales analizadas por un laboratorio externo (acreditado ISO 17025) durante un flujo de trabajo de rutina según un protocolo rápido AFNOR alternativo (Fraser ½ 24h, 37°C y 100 µl de cultivo en agar cromogénico). Las PCR se realizaron del caldo de enriquecimiento primario, proporcionado por el laboratorio. Ensayo realizado en Condalab en modo ciego.

		qPCR		
		+	-	
Fraser ½ 37°C - 24h Chromogenic agar	+	36	1**	Falsos Positivos (%) = 10,7 % Falsos Negativos (%) = 0,5 %    n= 205
	-	22*	146	

Veracidad 89,3% / Precisión 99,5%.

\*21 muestras presentaron Ct>39

\*\*Muestra con inhibición de PCR (fruta fresca)

Un número significativo de muestras (21) fueron positivas por PCR, pero no por cultivo. Esta situación puede atribuirse a dos hechos. En primer lugar, la PCR es más sensible que el cultivo, especialmente con métodos rápidos que no consideran el enriquecimiento secundario. En segundo lugar, el ADN de células muertas puede existir en algunos productos y la PCR puede detectarlo. Los datos representados en la tabla son datos sin procesar. Algunos laboratorios no consideran resultados positivos aquellos que muestran valores de Ct superiores a 40 Ct, porque significa un nivel bajo de patógenos que a veces no tiene sentido después de un paso de enriquecimiento.

## 5. Conclusiones

El kit de PCR cuando se incluye en el flujo de trabajo ISO 11290-1 muestra resultados equivalentes a los del aislamiento de patógenos en placas de agar. En la mayoría de los casos, si no en todos, un protocolo rápido (solo enriquecimiento primario) es suficiente para obtener resultados equivalentes.

En el caso de inhibición de la PCR, se debe aplicar el procedimiento convencional basado en aislamiento de placas y/o enriquecimiento secundario. En caso de resultados positivos de PCR a un Ct elevado (nivel bajo de diana), es recomendable confirmar el resultado por métodos convencionales, principalmente si no se aplica una PCR de viabilidad.

Nota: Para demostrar competencia técnica a las agencias de acreditación, cada laboratorio debe evaluar los aspectos que dependen esencialmente de sus propios medios (ver ISO 16140-3).



[comercial@condalab.com](mailto:comercial@condalab.com) | [www.condalab.com](http://www.condalab.com)

**Si necesitas ampliar la información sobre los productos y técnicas qPCR para detección de patógenos, no dudes en contactar con nosotros.**