

Listeria monocytogenes

Persistencia y relación con la resistencia a desinfectantes

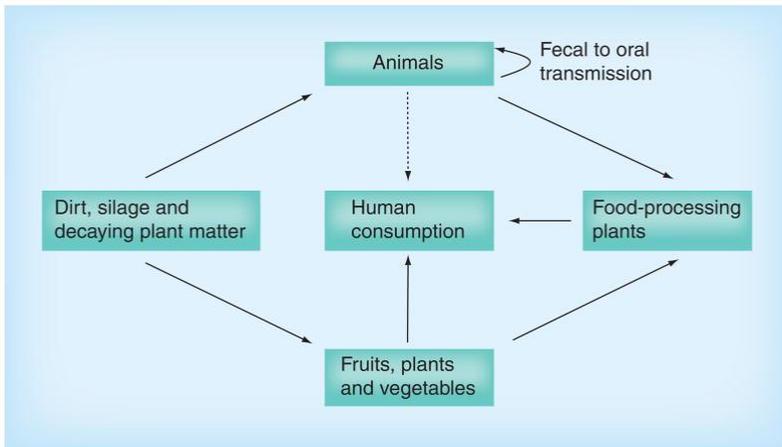
Joaquín V. Martínez-Suárez, Sagrario Ortiz y Victoria López-Alonso

The Connection between Persistent, Disinfectant-Resistant *Listeria monocytogenes* Strains from Two Geographically Separate Iberian Pork Processing Plants: Evidence from Comparative Genome Analysis

Sagrario Ortiz,^a Victoria López-Alonso,^b Pablo Rodríguez,^c  Joaquín V. Martínez-Suárez^a

Departamento de Tecnología de Alimentos, Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria (INIA), Madrid, Spain^a; Unidad de Biología Computacional, UFIEC, Instituto de Salud Carlos III, Majadahonda, Madrid, Spain^b; Embutidos Fermín, S.L., La Alberca, Salamanca, Spain^c

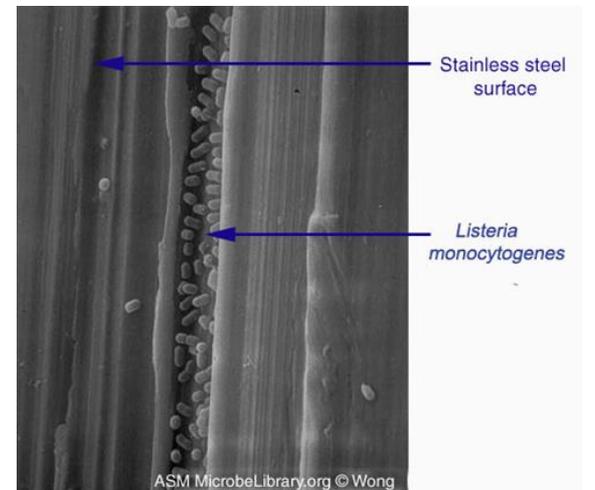
Listeria monocytogenes UBICUIDAD



Supervivencia

Listeriosis DIVERSIDAD GENÉTICA

- ❑ Serotipos 1/2a, 1/2b y 4b
- ❑ Alimentos RTE (*ready-to-eat*)
- ❑ Cepas del ambiente del procesamiento de alimentos



Incidencia de *L. monocytogenes* en el ambiente y productos cárnicos



- ❑ Ambiente/equipos, canales y productos del despiece < 10%
- ❑ Productos crudos o materias primas: 10-30%
- ❑ Productos procesados (carne picada) hasta 70%
- ❑ Productos RTE (embutidos cocidos/curados, jamones) hasta 10%

Supervivencia de *L. monocytogenes* en productos curados

- ❑ Origen y grado de contaminación
- ❑ Elaboración sin cultivos iniciadores
- ❑ Condiciones de maduración (tiempo, temperatura)
- ❑ Origen y/o características (serotipo) de las cepas:
 - reducido número de subtipos aislados
 - persistentemente en los productos y el ambiente



Identificación de subtipos

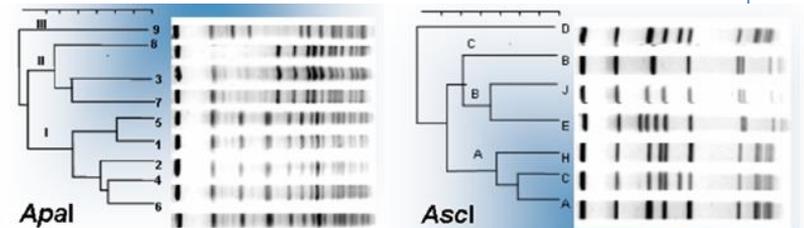
- Identificación de subtipos

Rutas de transmisión en plantas de procesado

Posibles patrones de persistencia

- Técnicas genóticas de identificación de subtipos

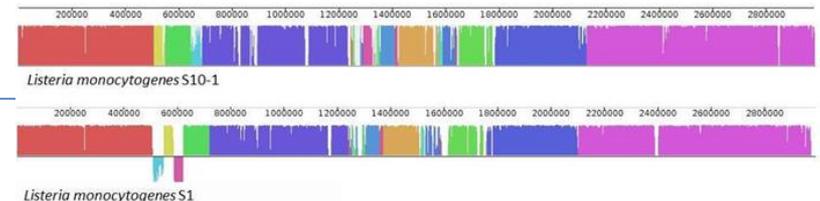
- PCR multiplex para identificación del grupo de serotipo
- Electroforesis en gel en campo pulsante (PFGE)
- Secuenciación de múltiples genes (MLST)



Secuenciación del genoma completo

- Organización del genoma altamente conservada

- Rasgos específicos (virulencia, persistencia o resistencia a desinfectantes)



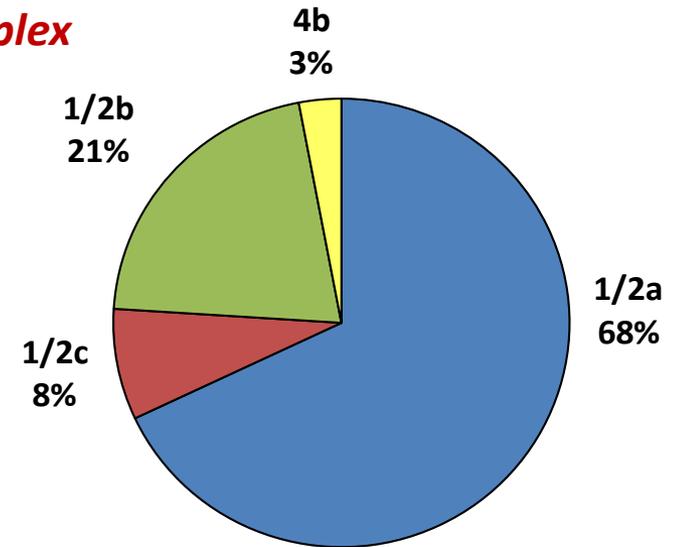
RESULTADOS

Rutas de contaminación y patrones de
persistencia de *L. monocytogenes* en la Planta A

Identificación de subtipos de *L. monocytogenes*

Identificación del serotipo molecular mediante PCR multiplex

- Detección de los cuatro serotipos moleculares
- Serotipos mayoritarios 1/2a y 1/2b
- Predominancia de 1/2a en el área de elaboración



Identificación de subtipos mediante PFGE (protocolo PulseNet)

- 21 perfiles de restricción *Ascl*
- 29 perfiles de restricción *Apal*



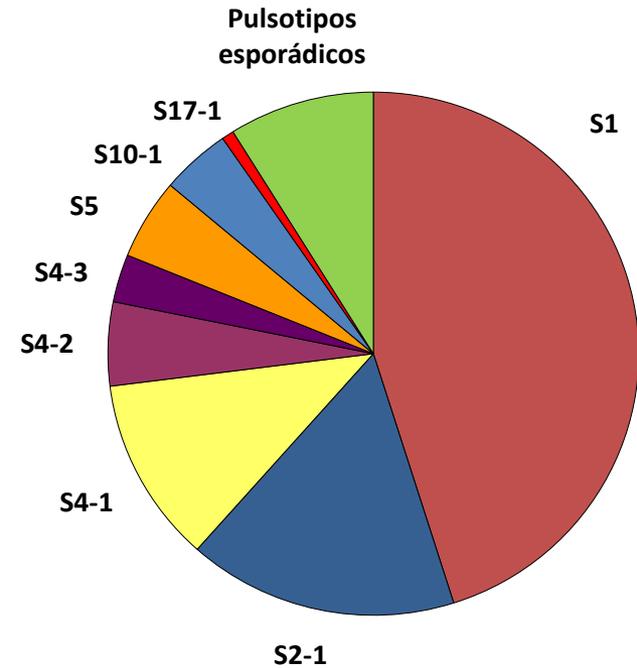
29 pulsotipos

**Índice de diversidad de Simpson 0,7
(*L. monocytogenes* 0,99)**

Patrones de contaminación

Pulsotipos persistentes

- Detectados ≥ 3 veces en un periodo ≥ 3 meses
- 8 pulsotipos persistentes (91% aislados)



Pulsotipos predominantes ($\geq 10\%$ aislados)

- S1, con 244 aislados (45%)
- S2-1, con 89 aislados (16%)
- S4-1, con 62 aislados (12%)



73% del total de aislados



Review

Review – Persistence of *Listeria monocytogenes* in food industry equipment and premises

Brigitte Carpentier^{a,*}, Olivier Cerf^b

^a Laboratory of Food Safety, French Agency for Food, Environmental and Occupational Health Safety (ANSES), Maisons-Alfort, France

^b Alfort Veterinary School, Maisons-Alfort, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 3 September 2010

Received in revised form 17 November 2010

Accepted 2 January 2011

Keywords:

Listeria monocytogenes

Persistence

Food industry

ABSTRACT

To understand why *Listeria monocytogenes* may persist in food industry equipment and premises, notably at low temperature, scientific studies have so far focused on adhesion potential, biofilm forming ability, resistance to desiccation, acid and heat, tolerance to increased sublethal concentration of disinfectants or resistance to lethal concentrations. Evidence from studies in processing plants shows that the factors associated with the presence of *L. monocytogenes* are those that favor growth. Interestingly, most conditions promoting bacterial growth were shown, in laboratory assays, to decrease adhesion of *L. monocytogenes* cells. Good growth conditions can be found in so-called harborage sites, i.e. shelters due to unhygienic design of equipment and premises or unhygienic or damaged materials. These sites are hard to eliminate. A conceptual model of persistence/no persistence based on the relative weight of growth vs. outcome of cleaning and disinfection is suggested. It shows that a minimum initial bacterial load is necessary for bacteria to persist in a harborage site and that when a low initial bacterial charge is applied, early cleaning and disinfection is the only way to avoid persistence. We conclude by proposing that there are no strains of *L. monocytogenes* with unique properties that lead to persistence, but harborage sites in food industry premises and equipment where *L. monocytogenes* can persist.

Persistencia de *L. monocytogenes* en el ambiente de las plantas de procesado

❑ Zonas de difícil acceso → nichos o reservorios

❑ *Biofilms*

❑ Resistencia a antimicrobianos

❑ Resistencia al estrés



Biofilms

❑ Mayor resistencia a estrés, limpieza y desinfección

❑ Propiedades específicas de las cepas

Movilidad

Serotipo (1/2a)

Interacción con otros organismos



Resistencia de *L. monocytogenes* a los desinfectantes

Biofilms

Limpieza insuficiente previa a la desinfección

Humedad excesiva de las superficies

Aclarado insuficiente tras la desinfección

Dosis inadecuadas de desinfectantes



Exposición a concentraciones subletales de desinfectantes



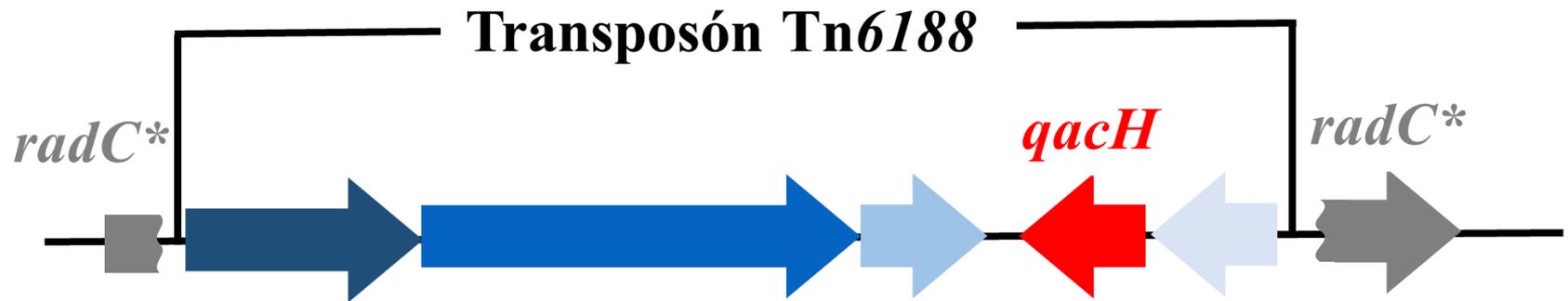
Adquisición de mecanismos de resistencia

Adaptación fenotípica a desinfectantes

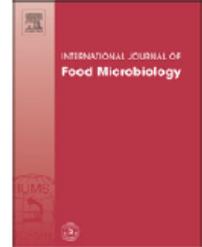


Reports of resistance to QACs in planktonic cells of *Listeria monocytogenes*
(adapted from Martínez-Suárez et al., 2016)

No. assayed isolates	No. resistant isolates (%)	Main origin of strains	Reference
132	12 (9%)	Poultry (France)	Lemaitre et al., 1998
200	20 (10%)	Fish (Norway)	Aase et al., 2000
97	7 (7%)	Food and others (France)	Mereghetti et al., 2000
19	5 (26%)	Meat, poultry (USA)	Romanova et al., 2002
4	1	Poultry (Finland)	Lundén et al., 2003
112	17 (15%)	Meat (Norway)	Heir et al., 2004
254	108 (42%)	Fish (France)	Soumet et al., 2005
114	9 (8%)	Retail food (Denmark)	Aarestrup et al., 2007
123	57 (46%)	Poultry (turkey) (USA)	Mullapudi et al., 2008
11	2	Cheese (Ireland)	Fox et al., 2011
138	19 (14%)	Different foods (USA)	Ratani et al., 2012
91	15 (16%)	Foods and others (Austria)	Müller et al., 2013
29	3 (10%)	Pork (Spain)	Ortiz et al., 2014
71	19 (27%)	Retail foods (China)	Xu et al., 2014
59	13 (22%)	Retail foods (China)	Jiang et al., 2015
142	25 (18%)	Different foods (Switzerland)	Ebner et al., 2015
20	3 (15%)	Different foods (China)	Zhang et al., 2015
14	11 (79%)	Pork (Spain)	Ortiz et al., 2016



Müller et al. (2013). Tn6188 - a novel transposon in *Listeria monocytogenes* responsible for tolerance to benzalkonium chloride. PLoS One 8, e76835.



Short communication

Industrial disinfectants do not select for resistance in *Listeria monocytogenes* following long term exposure

Vicky G. Kastbjerg, Lone Gram *

National Food Institute, Technical University of Denmark, Søtofts Plads bldg. 221, DK-2800 Kgs. Lyngby, Denmark

ARTICLE INFO

Article history:

Received 12 April 2012

Received in revised form 13 August 2012

Accepted 14 September 2012

Available online 23 September 2012

Keywords:

Listeria monocytogenes

Biocides

Disinfectants

Adaptive resistance

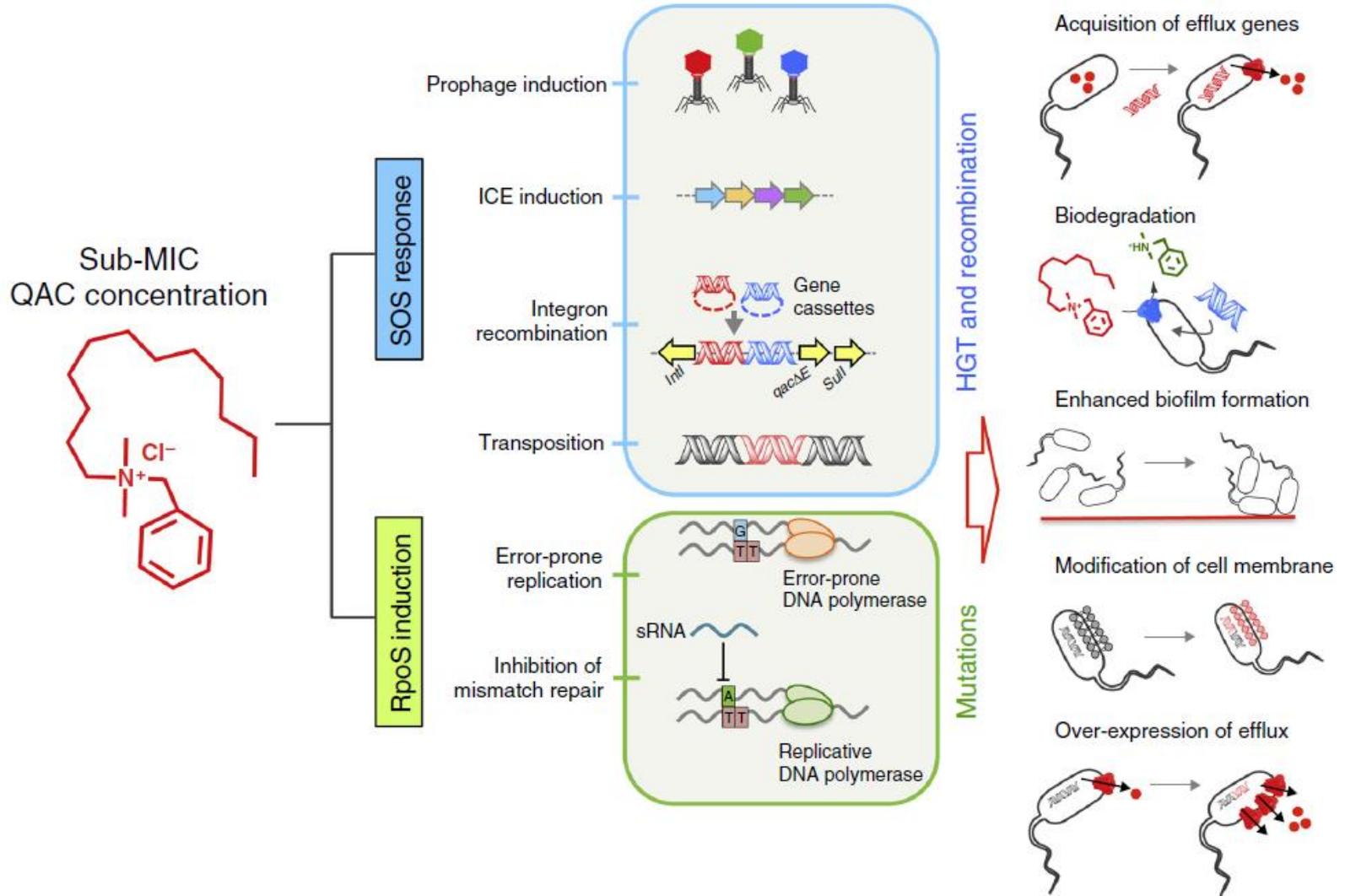
Tolerance

ABSTRACT

Listeria monocytogenes is a food-borne pathogen that can persist for years in food processing plants. It has been hypothesized that this could be due to the development of tolerance or resistance to the disinfectants used. The purpose of the present study was to determine whether biocide resistance or tolerance would evolve in *L. monocytogenes* under continued selection in three industrial disinfectants. *L. monocytogenes* EGD was exposed to Desinfect CL (hypochlorite) and Incimaxx DES (peracetic acid and hydrogen peroxide) for several hundred generations. This caused no increase in the minimal inhibitory concentration (MIC) to the disinfectants, whereas exposure to Triquart SUPER (quaternary ammonium compounds) caused a two- to four-fold increase in MIC. Exposure to gentamicin, which was used as a positive control, caused an 8 to 256-fold increase in MIC for several aminoglycosides. Despite the low level of tolerance, the populations adapted to Triquart SUPER were still sensitive to killing with this disinfectant at 0.0125%, which is much lower than in-use concentrations (1–5%). Our data are in agreement with the fact that finding strains with high acquired resistance to disinfectants is rare, and that the disinfectants are still efficient for controlling microorganisms such as *L. monocytogenes*.

Pathways and mechanisms of QAC resistance

(adapted from Tezel and Pavlostathis, 2015)



Reports of resistance to QACs in planktonic cells of *Listeria monocytogenes*

(adapted from Martínez-Suárez et al., 2016)

No. assayed isolates	No. resistant isolates (%)	Main origin of strains	Persistence	Reference
132	12 (9%)	Poultry (France)		Lemaitre et al., 1998
200	20 (10%)	Fish (Norway)	+	Aase et al., 2000
97	7 (7%)	Food and others (France)		Mereghetti et al., 2000
19	5 (26%)	Meat, poultry (USA)		Romanova et al., 2002
4	1	Poultry (Finland)	+	Lundén et al., 2003
112	17 (15%)	Meat (Norway)		Heir et al., 2004
254	108 (42%)	Fish (France)		Soumet et al., 2005
114	9 (8%)	Retail food (Denmark)		Aarestrup et al., 2007
123	57 (46%)	Poultry (turkey) (USA)		Mullapudi et al., 2008
11	2	Cheese (Ireland)	+	Fox et al., 2011
138	19 (14%)	Different foods (USA)		Ratani et al., 2012
91	15 (16%)	Foods and others (Austria)		Müller et al., 2013
29	3 (10%)	Pork (Spain)	+	Ortiz et al., 2014
71	19 (27%)	Retail foods (China)		Xu et al., 2014
59	13 (22%)	Retail foods (China)		Jiang et al., 2015
142	25 (18%)	Different foods (Switzerland)		Ebner et al., 2015
20	3 (15%)	Different foods (China)		Zhang et al., 2015
14	11 (79%)	Pork (Spain)	+	Ortiz et al., 2016

RESULTADOS

Relación entre características específicas de los
pulsotipos de *L. monocytogenes* y su
supervivencia a la desinfección en la Planta A

Características asociadas a la supervivencia

- S1, S6 y S10-1 BAC^R
- Asociación BAC^R y supervivencia
- Selección de cepas BAC^R de serotipo 1/2a

Pulsotipo	Nº de aislados
S1	13
S4-1	2
S6	1
S10-1	8

Patrones de resistencia y susceptibilidad

Cepa	MIC (mg/l)						
	BAC	BAC con reserpina	CTAB	Clorhexidina	Bromuro de etidio	Ciprofloxacino	Gentamicina
S1	10	5	10	5	160	5	0.6
S6 BAC ^R	10	5	10	5	160	5	0.6
S10-1	20	20	20	2.5	40	1.25	0.3
EGD-e	1.25	0.6	5	2.5	20	1.25	0.3

- Fenotipo MDR de S1 y S6 BAC^R
- Genotipo de resistencia a BAC de S10-1: Tn6188 (*qacH*)

RESULTADOS

**Persistencia ambiental de *L. monocytogenes* en
la Planta B. Relación con la resistencia a la
desinfección**

Detección de *L. monocytogenes*



Mes	Pulsotipo	Nº de aislados
13,14, 23	S1	4
19	S10-1	1
22, 23, 24, 26, 27	S2-2	8
22	S2-3	1
26	S10-3	1

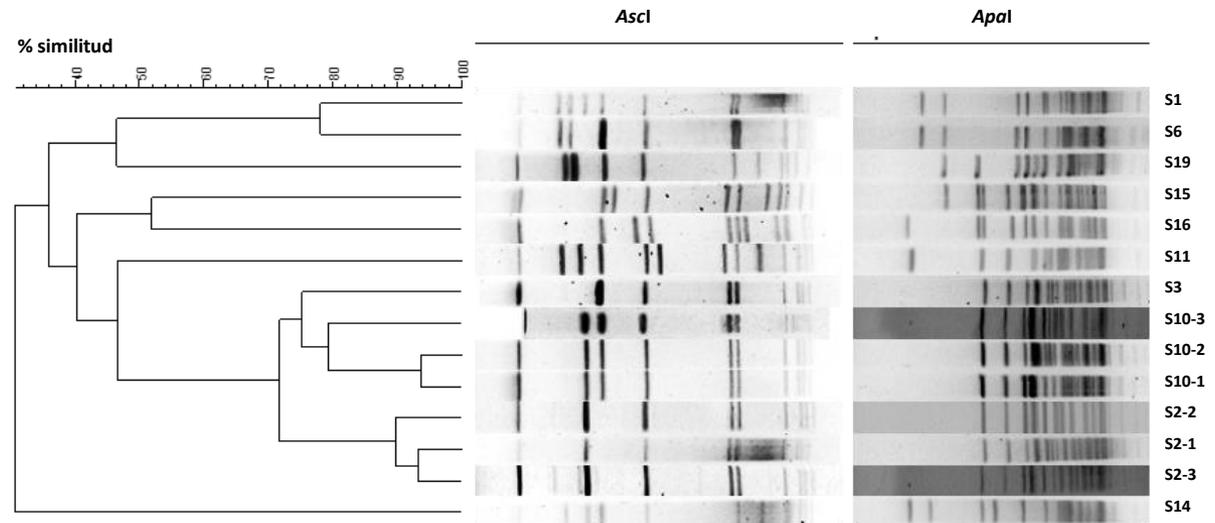
Identificación de subtipos

- S1 y S10-1 (BAC^R, Planta A y Planta B), S2-2, S2-3 y S10-3 (BAC^R, exclusivos Planta B)

- S1 y S2-2 persistentes

- 2 clusters PFGE

- 2 subtipos *inIA*



Secuenciación (WGS) de 5 aislados BAC^R

- Contenido G+C y tamaño habituales de *L. monocytogenes*
- Tamaño y número CDS S1 y S10-1 < S2-2, S2-3 y S10-3

Característica	Pulsotipo de la cepa utilizada				
	S1	S10-1	S10-3	S2-2	S2-3
Planta de procesado	A	A	B	B	B
Año de aislamiento	2008	2008	2010	2010	2010
Nº de secuencias <i>contigs</i>	51	70	73	52	71
Longitud total de todos los <i>contigs</i> (kb)	2997	3009	3114	3112	3086
Nº de secuencias codificantes (CDS)	3044	2972	3108	3115	3069

Identificación *in silico* de subtipos MLST

- **S1: ST31** (*abcZ-7, bglA-14, cat-10, dapE-19, dat-9, ldh-8* y *lhkA-1*)
- **S10-1, S10-3, S2-2 y S2-3: ST121** (*abcZ-7, bglA-6, cat-8, dapE-8, dat-6, ldh-37* y *lhkA-1*)

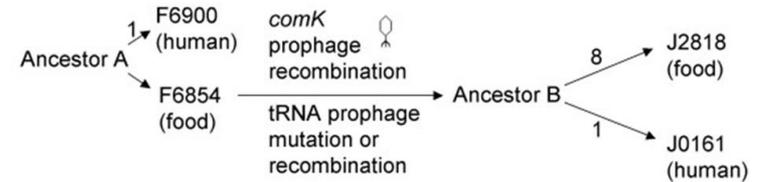
Fagos, elementos transponibles y plásmidos

Cepa ST31

- Profago en *comK*
- Tn5422
- Isleta de supervivencia al estrés (SSI-1)

IMPORTANCIA DE LOS FAGOS EN LA EVOLUCIÓN BACTERIANA

Orsi et al. BMC Genomics. 2008. 9:539.



Cepas ST121

- Diferente contenido en profagos
- Tn6188 (*qacH*)
- Plásmido ST121 (Tn5422, *clpL*)

Profago en *comK*: S2-2, S2-3 y S10-3

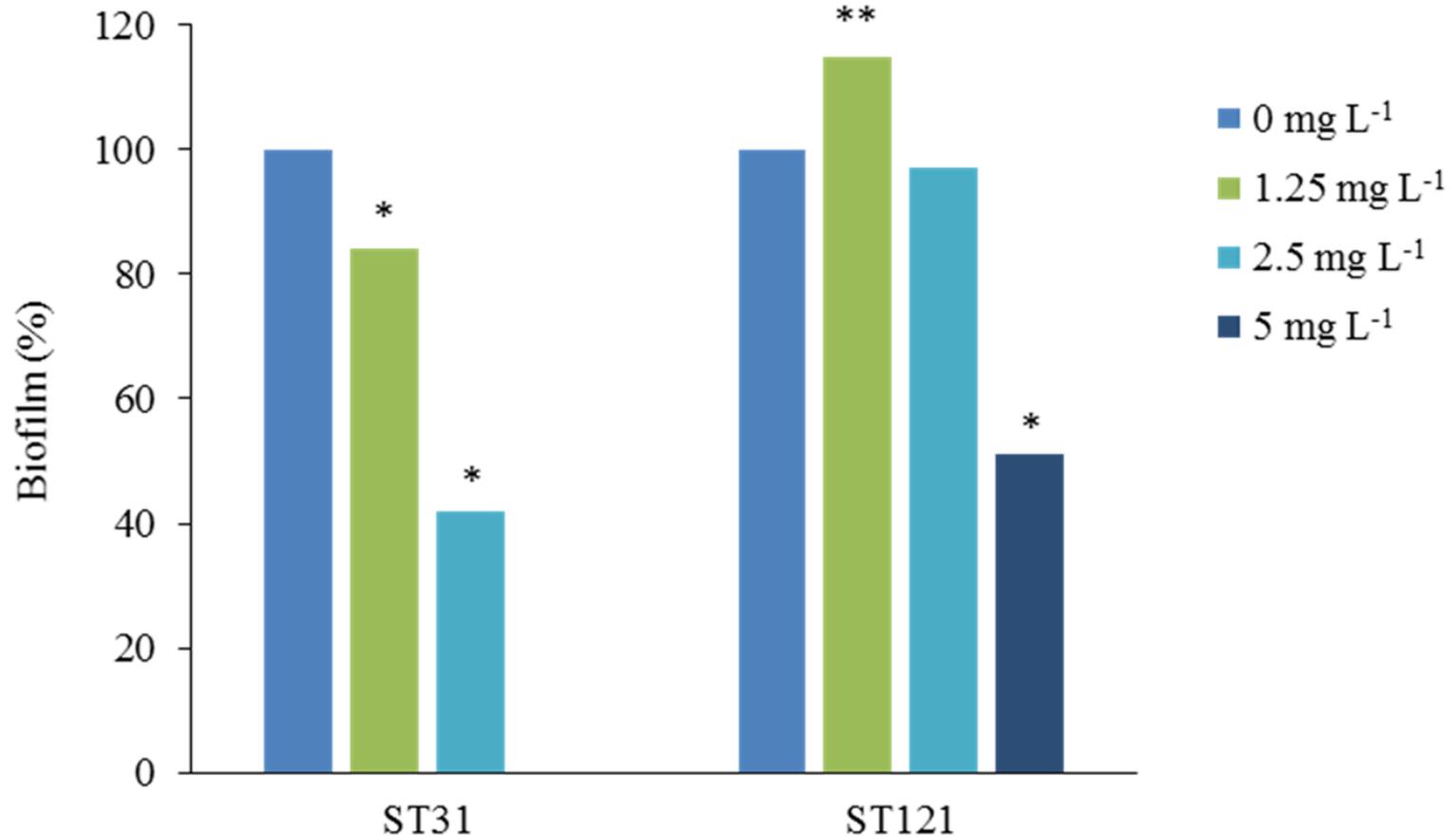
Profago tRNA-Arg-CCG: S10-1, S2-2, S2-3 y S10-3

Profago tRNA-Arg-TCT: S2-2, S2-3 y S10-3

RESULTADOS

Influencia de la presencia de cloruro de
benzalconio sobre la formación de *biofilm*

Subtipos persistentes y resistentes ST31 y ST121



CONCLUSIONES

AMBIENTE		GENÉTICA
Persistencia		Cepas persistentes

Persistencia: supervivencia en el ambiente
(cualquier cepa puede sobrevivir en un “nicho”)

Cepas persistentes: determinadas cepas
especialmente “resistentes”
pueden contribuir a la persistencia

Importancia de la persistencia en los brotes de listeriosis
(ej., EE. UU. 1988-2000)

Necesidad de identificar y controlar la persistencia ...

CONCLUSIONES

IDENTIFICACIÓN DE LA PERSISTENCIA

Investigación

CONTROL DE LA PERSISTENCIA

1. NICHOS
Localizar y corregir
2. BIOFILMS
Limpieza y materiales “anti-biofilm”
3. RESISTENCIA
¿Rotación?

FSIS Listeria Guideline January 2014:

*... rotating sanitizers will help prevent the development of microorganisms **resistant to a particular sanitizer** ...*

CONCLUSIONES



Potential Impact of the Resistance to Quaternary Ammonium Disinfectants on the Persistence of *Listeria monocytogenes* in Food Processing Environments

Joaquín V. Martínez-Suárez^{1*}, Sagrario Ortiz¹ and Victoria López-Alonso²

¹ Departamento de Tecnología de Alimentos, Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria, Madrid, Spain, ² Unidad de Biología Computacional, Unidad Funcional de Investigación de Enfermedades Crónicas, Instituto de Salud Carlos III, Madrid, Spain

Listeria monocytogenes. Persistencia y relación con la resistencia a desinfectantes.

MUCHAS GRACIAS POR SU ATENCIÓN