

# Evaluación del rendimiento de diferentes métodos analíticos para la detección de *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* en leche tomando como referencia la norma ISO 16140-2:2016

 **frontiers**  
in Microbiology

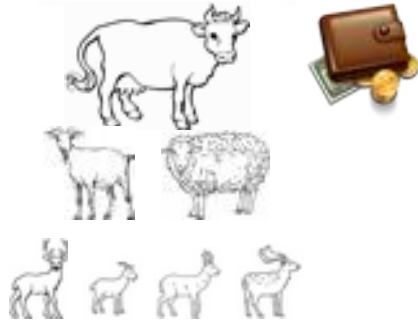
ORIGINAL RESEARCH  
published: 15 March 2019  
doi: 10.3389/fmicb.2019.00509

## Estimation of Performance Characteristics of Analytical Methods for *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* Detection in Dairy Products

Sophie Butot<sup>1\*</sup>, Matteo Ricchi<sup>2</sup>, Iker A. Sevilla<sup>3</sup>, Lise Michot<sup>1</sup>, Elena Molina<sup>3</sup>, Maitane Tello<sup>2</sup>, Simone Russo<sup>2</sup>, Norma Arrigoni<sup>2</sup>, Joseba M. Garrido<sup>2</sup> and David Tomas<sup>1</sup>

Nestlé, IZSLER, NEIKER

# Paratuberculosis



Expert Rev Gastroenterol Hepatol. 2015 ; 9(12): 1523–1534. doi:10.1586/17474124.2015.1093931.

## Mycobacterium paratuberculosis as a cause of Crohn's disease

Adrienne L. McNeese, Ph.D.<sup>1</sup>, Diane Markesich, Ph.D.<sup>2</sup>, Najah R. Zayyani, M.D.<sup>3</sup>, and David Y. Graham, M.D.<sup>4</sup>



Journal of Applied Microbiology

REVIEW ARTICLE  
**Contamination of food products with *Mycobacterium avium paratuberculosis*: a systematic review**  
 M.M. Eltholth, V.R. Marsh, S. Van Winden and F.J. Guitián

Authors	Country	Samples	Results (%-pos)	
			PCR	Culture
Gao et al. 2002	Canada	710 retail pasteurized milk samples	15%	0%
Grant et al. 2002	UK	567 commercially pasteurized milk samples	15.8%	1.8%
O'Reilly et al. 2004	Ireland	357 pasteurized milk samples	9.8%	0%
Apele et al. 2005	Czech Republic	244 commercially pasteurized milk samples	N/A	1.6%
		100 locally pasteurized milk samples derived from infected herds	N/A	2.0%

Contents lists available at ScienceDirect

**Preventive Veterinary Medicine**

Journal homepage: [www.elsevier.com/locate/prevetmed](http://www.elsevier.com/locate/prevetmed)

*Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* detection in animals, food, water and other sources or vehicles of human exposure: A scoping review of the existing evidence

Lisa Waddell<sup>1,2,\*</sup>, Andrijana Rajić<sup>3</sup>, Katharina Stärk<sup>4</sup>, Scott A. McEwen<sup>5</sup>

cultivo  
PCR

PMS-PA

Journal of Applied Microbiology

Original Article  
**Sensitive and specific detection of viable *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in raw milk by the peptide-mediated magnetic separation-phage assay**  
 A.C.G. Foddal, I.R. Grant

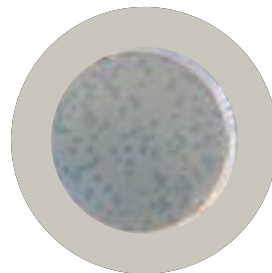
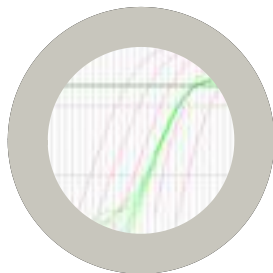
Nestlé  
(DUND-101721  
ParaTB)



NEIKER  
&  
IZSLER

# Objetivo

Evaluar el rendimiento de 3 métodos para la detección de *M. avium* subsp. *paratuberculosis* (MAP) en leche



# Abordaje

Evaluación ciega por dos laboratorios independientes siguiendo el protocolo internacional ISO 16140-2:2016 (Microbiología de la cadena alimentaria. Validación de métodos)

- Parámetros: • Sensibilidad (SE) y Veracidad (Trueness; T)

	Reference value positive	Reference value negative
Method positive (detected)	+/+ Positive Agreement (PA)	-/+ Positive Deviation (PD)
Method negative (not detected)	+/- Negative Deviation (ND)	-/- Negative Agreement (NA)

$$SE = \frac{(PA + PD)}{(PA + ND + PD)} \times 100$$

$$T = \frac{(PA + NA)}{(PA + ND + PD + NA)} \times 100$$

- Límite de Detección (LOD<sub>95</sub>). Compl. log-log model (Wilrich *et al.* 2009)

Nestlé



## ESTUDIO 1

SE y T (360 muestras/lab)

Nº muestras  
por método

Nivel de inoculación	L0	L1	L2
Leche tratada térmicamente	32	16	32
Leche en polvo	32	16	32
Leche cruda	32	16	32

## ESTUDIO 2

LOD (450 muestras/lab)

Nº muestras  
por método

Nivel de inoculación	L0	L1	L2	L3
Leche tratada térmicamente	10	40	40	10
Leche en polvo	10	40	40	10
Leche cruda	10	40	40	10

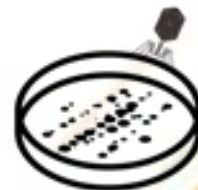
NEIKER & IZSLER



Cultivo



PCR



PMS-PA



HEYM comercial y casero  
descontaminación (leche cruda)  
(Grant *et al.* 2002)

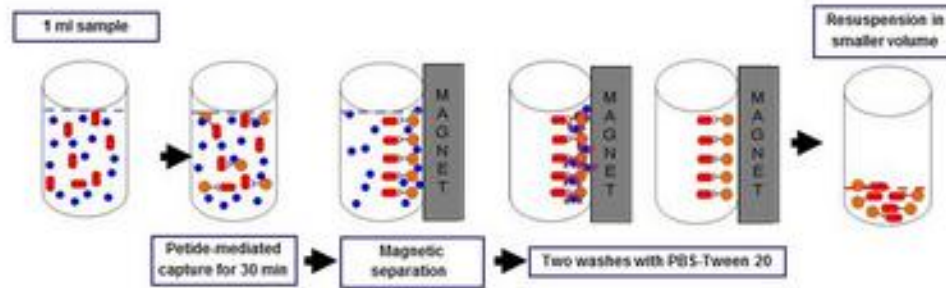


DNA: Adiapure  
real-time PCR IS900 y F57  
(Donaghy *et al.* 2011, Ricchi *et al.* 2014)



peptide-mediated magnetic separation & phage-assay  
confirmación calvas: real-time PCR IS900  
(Donaghy *et al.* 2011, Ricchi *et al.* 2014, Foddai *et al.* 2017)

# Peptide-mediated magnetic separation (PMS)






-  Peptide-coated magnetic beads
-  MAP cells
-  Non-target bacteria

Imagen cedida por Prof. I. Grant



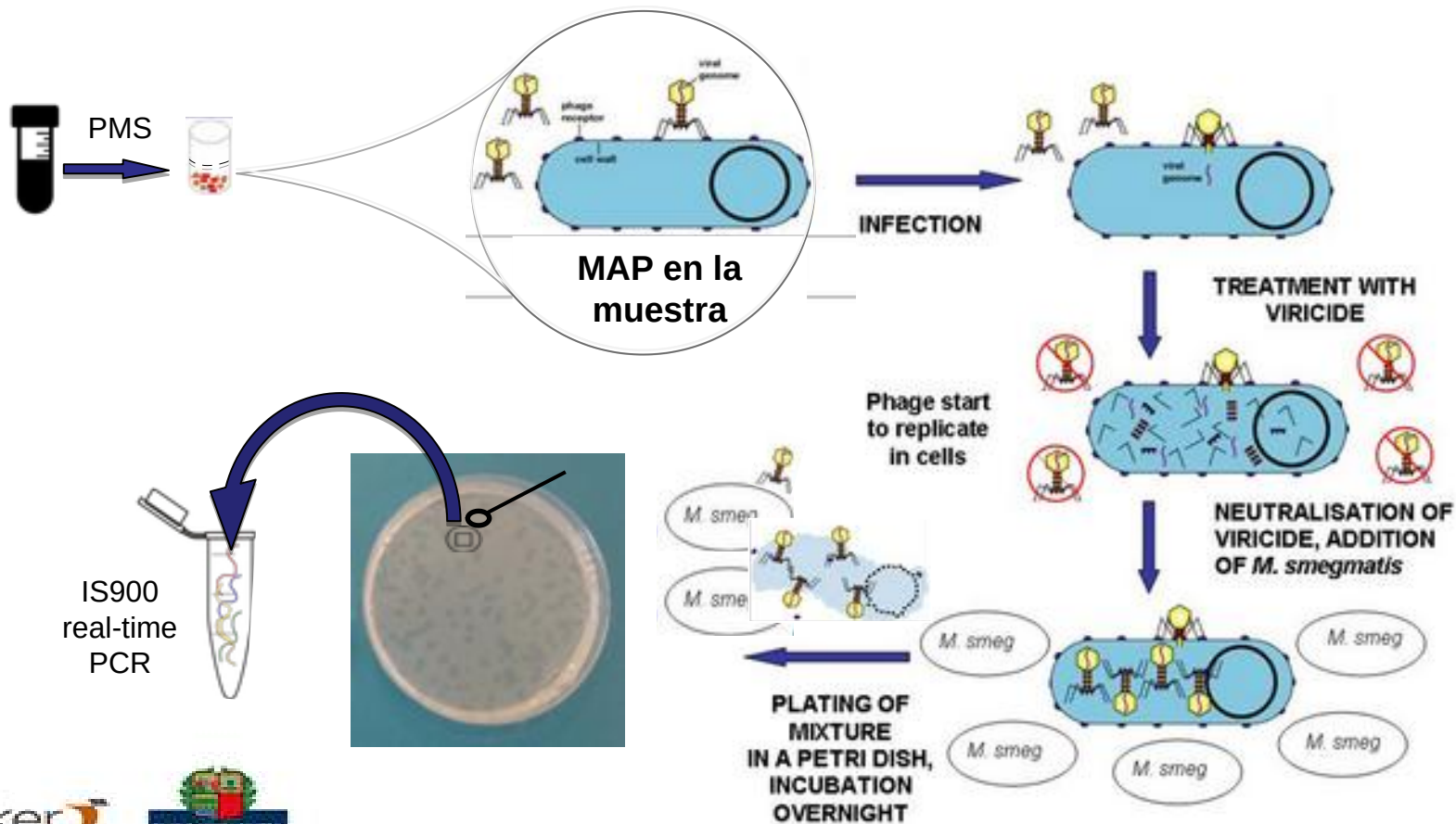
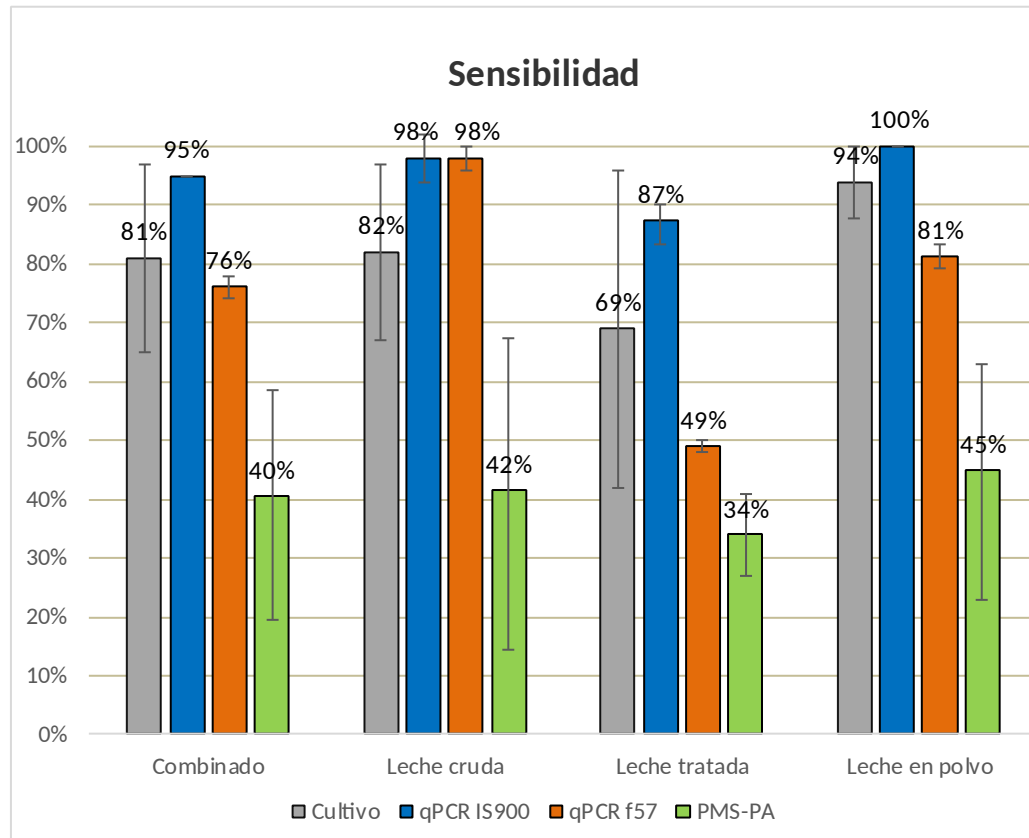


Imagen cedida por Prof. I. Grant

# Resultados Estudio 1: Sensibilidad y Veracidad

## Sensibilidad



■ Cultivo (69-94%; global 81%)

■ IS900 qPCR (87-100%; global 95%)

■ F57 qPCR (49-98%; global 76%)

■ PMS-PA (34-45%; global 40%)



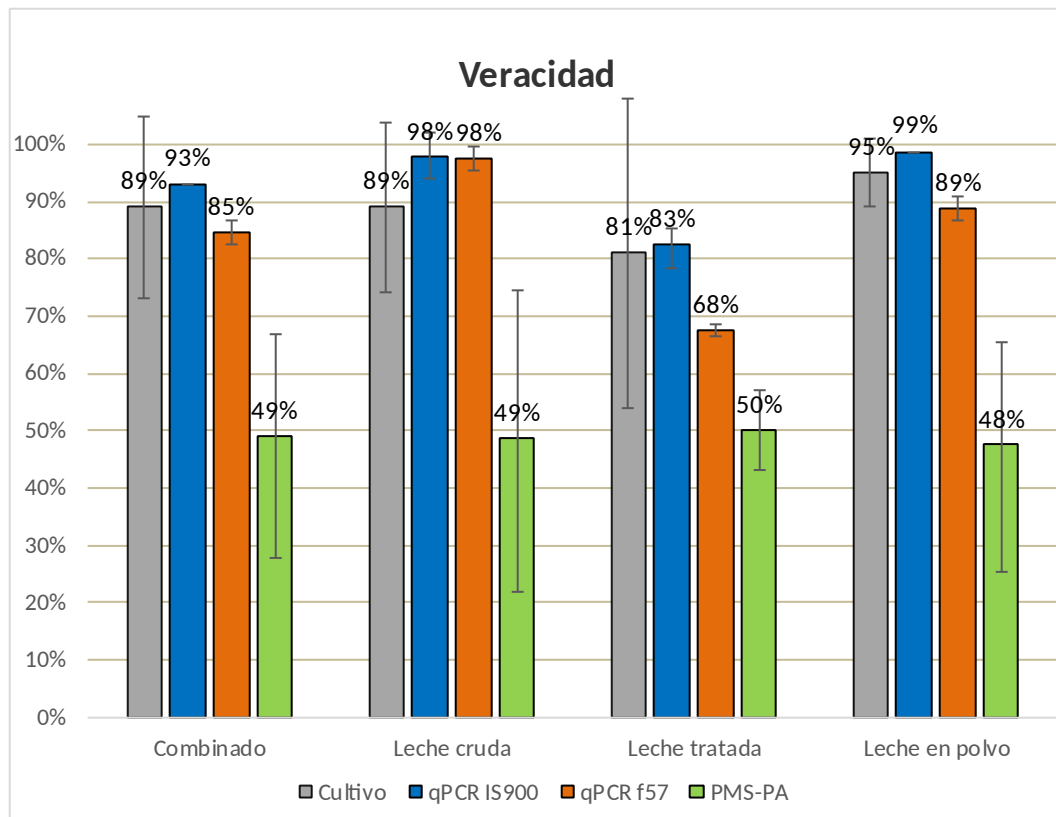
# Resultados Estudio 1: Sensibilidad y Veracidad

■ Cultivo (81-95%; global 89%)

■ IS900 qPCR (83-99%; global 93%)

■ F57 qPCR (68-98%; global 85%)

■ PMS-PA (48-50%; global 49%)



## Resultados Estudio 2: LOD<sub>95%</sub>

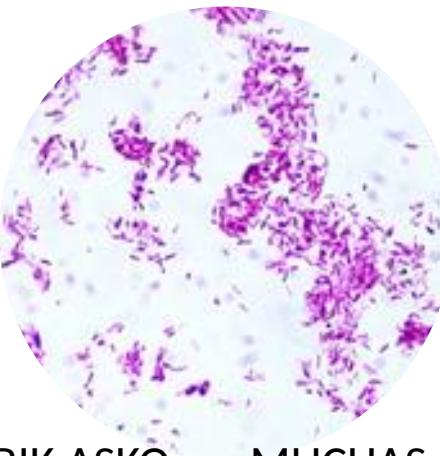
	MÉTODO	Log CFU/50 ml (CI 95%)	CFU/ml
Leche tratada térmicamente	cultivo	2,44 (2,26;2,61)	5
	IS900 qPCR	3,62 (3,44;3,80)	83
	F57 qPCR	4,26 (3,97;4,54)	364
	PMS-PA	4,30 (3,99;4,62)	399
Leche en polvo	cultivo	2,86 (2,57;3,15)	14
	IS900 qPCR	3,34 (3,11;3,58)	44
	F57 qPCR	3,78 (3,58;3,98)	121
	PMS-PA	3,80 (3,59;4,00)	126
Leche cruda	cultivo	4,83 (4,53;5,15)	1.352
	IS900 qPCR	3,37 (3,13;3,62)	47
	F57 qPCR	4,34 (4,11;4,57)	438
	PMS-PA	4,30 (4,08;4,51)	399

## Conclusiones

El rendimiento de PMS-PA fue inferior al de los otros dos métodos según la metodología ISO aplicada, por lo que no se recomienda su uso como método único en programas de vigilancia de MAP en leche

El cultivo y la real-time IS900 PCR son los métodos más apropiados para la detección de MAP en leche (ISO 16140-2:2016)

La real-time IS900 PCR representa una alternativa al cultivo apropiada y recomendable para el cribado de muestras, siempre que no sea necesario evaluar la viabilidad de MAP



ESKERRIK ASKO — MUCHAS GRACIAS

