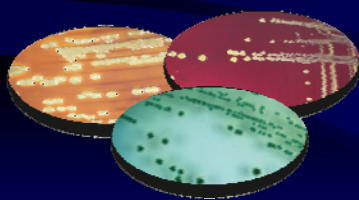


Revisión de Metodologías aplicadas en Microbiología de Alimentos



Luis López V.
Universidad de Chile

Santiago, mayo 7 de 2012

llv2012

Resumen

- Generalidades de la selección del método
- Métodos desarrollados por el laboratorio
- Validación del método
- Métodos rápidos
- Consideraciones finales

llv2012

Generalidades

- Los resultados del análisis microbiológico deben ser confiables y válidos.
- La elección adecuada del método de ensayo a aplicar es de fundamental importancia.
- Usar la última versión de métodos oficiales, métodos normalizados nacionales e internacionales, o métodos internos desarrollados por el laboratorio.
- Para evaluar si un método es apropiado se debe tener en cuenta:
 - si es aplicable al alimento,
 - la cantidad de muestra que se analiza,
 - el límite de detección del método (en el caso de ser cuantitativo) y
 - si éste se relaciona con las exigencias requeridas para el alimento.



Ilv2012

Codex Alimentarius

- En la medida de lo posible, deberán aplicarse solamente métodos cuya fiabilidad (precisión, reproducibilidad, variación entre laboratorios y dentro de ellos) se haya establecido estadísticamente en base a estudios comparativos o realizados en colaboración entre varios laboratorios. Además, deberá darse preferencia a los métodos que se hayan validado para el producto en cuestión, preferentemente con relación a los métodos de referencia elaborados por organismos internacionales.
- Los métodos que se aplican para determinar la idoneidad para el consumo de alimentos altamente perecederos, o de alimentos con una breve duración en almacén, deberán elegirse, en lo posible, de tal forma que los resultados de los exámenes microbiológicos puedan obtenerse antes de que los alimentos se consuman o lleguen a superar su duración en almacén.
- Los métodos microbiológicos especificados deberán ser razonables en lo que atañe a la complejidad, disponibilidad de medios, equipo, etc., facilidad de interpretación, tiempo requerido y costos.



Ilv2012

Métodos microbiológicos

- La mayoría de los métodos microbiológicos para alimentos se encuentran o están basados en:
 - **AOAC**: International Official Methods of Analysis.
 - **ISO**: International Standard Organization.
 - **ICMSF**: International Commission for Microbiological Specification of Foods.
 - **FDA -BAM**: Food and Drug Administration-Bacteriological Analytical Manual.
 - **USDA-FSIS**: United States Department of Agriculture-Food Safety and Inspection Service.
 - **APHA-SMEWW**: American Public Health Administration-Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater.
 - **APHA-SMEDP**: American Public Health Administration-Standard Methods for the Examination of Dairy Products.
 - **APHA**: American Public Health Administration-Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods.
 - **FIL-IDF**: International Dairy Federation.
 - **INN**: Instituto Nacional de Normalización, entre otros

Ilv2012

Ejemplo de métodos normalizados

- ISO 6222 Total Plate Count for drinking water
- ISO 9308-1 Total coliforms, thermotolerant coliforms & *E. coli* in water
- ISO 26461 -2 1993 Sulphite reducing bacteria in water
- ISO 12780, 2005 *Pseudomonas aeruginosa* in water
- ISO 7899 Enterococci in water
- ISO 1925 *Salmonella* in water
- ISO 4833 Total Plate Count for foods
- ISO 4832 Coliforms and thermotolerant bacteria in foods
- ISO 6579 *Salmonella* identification in food
- ISO 7973 *Clostridium perfringens* in food
- ISO 6888-2 *Staphylococcus aureus* identification in foods
- ISO 11290-1 *Listeria monocytogenes* detection in foods
- ISO 11290-2 *Listeria monocytogenes* enumeration in food
- ISO 16649-1 *Escherichia coli* in foods
- ISO 8523 Enterobacteria in foods
- ISO 7932 *Bacillus cereus* in foods



Ilv2012

Definición de tipos de métodos

- **Métodos para controles oficiales:** usados para demostrar cumplimiento con legislación.
- **Método de referencia:** métodos reconocidos internacionalmente y ampliamente aceptados. Describe condiciones de operación y procedimientos. Generalmente es un método estándar que se toma como referencia.
- **Método alternativo:** para detección o estimación del mismo analito que generalmente es medido con el correspondiente método de referencia, para un determinado tipo de producto. Puede ser propio de una firma comercial o no comercial y presenta atributos como: rapidez del análisis, fácil ejecución, propiedades analíticas (precisión, exactitud, límite de detección, etc.), miniaturización y reducción de costos.
- **Método de propiedad:** método con marca registrada, propiedad de una firma comercial.
- **Método cualitativo:** detecta la presencia/ausencia de una analito, directa o indirectamente, en una determinada cantidad de muestra.
- **Método cuantitativo:** determina la cantidad del analito determinado directamente (enumeración en una masa o volumen) o indirectamente (absorbancia, impedancia, etc.) en una cierta cantidad de muestra.

Fuente: ISO 16140(2009)

Ilv2012

Tipos de métodos

Enumeración en matrices alimentarias

1. Clásicos
2. Automatizados
3. Cromogénicos y fluorogénicos
4. Modificados
 - 4.1. Placas de film rehidratable
 - 4.2. Placas desechables con medio rehidratable
 - 4.3. Placas con pocillos múltiples
 - 4.4. NMP automatizado
 - 4.5. Recuento en pocillos o tubos (NMP agua)
 - 4.6. Monitoreo de cambios de pH y otros por tecnología óptica
5. Bioquímicos
 - 5.1. Impedancia
 - 5.2. ATP bioluminescencia
6. Microscópicos
 - 6.1. Citometría de flujo
 - 6.2. Epifluorescencia directa por filtración (DEFT)
7. Moleculares
 - 7.1. PCR tiempo real cuantitativo (Q-PCR)

Ilv2012

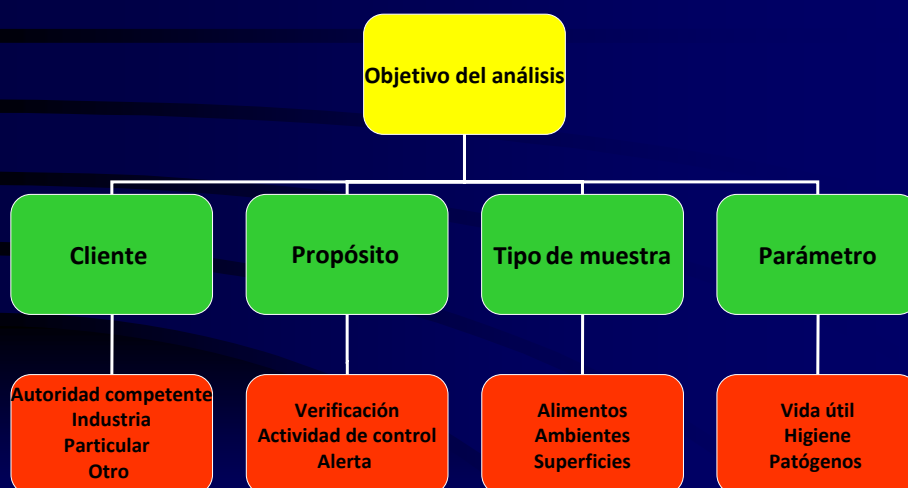
Tipos de métodos

Detección en matrices alimentarias

1. Clásicos
2. Modificados
3. Inmunoensayo
 - 3.1. Dispositivos de flujo lateral (Lateral flow devices, LFD)
 - 3.2. Enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) & enzyme linked fluorescent assays (ELFA)
 - 3.3. Separación y concentración inmunomagnética
4. Bacteriófagos
5. Microscópicos
6. Moleculares
 - 6.1. Hibridización fluorescente *in situ* (FISH)
 - 6.2. PCR convencional, tiempo real y multiplex
 - 6.3. Amplificación isotérmica y detección por bioluminiscencia
 - 6.4. Chips de DNA (Micromatrices o Microarrays)
 - 6.5. Biosensores

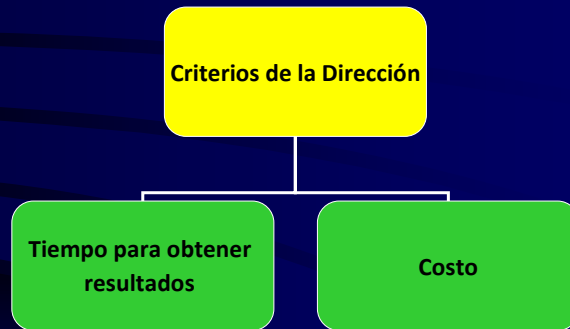
Ilv2012

Criterios de selección



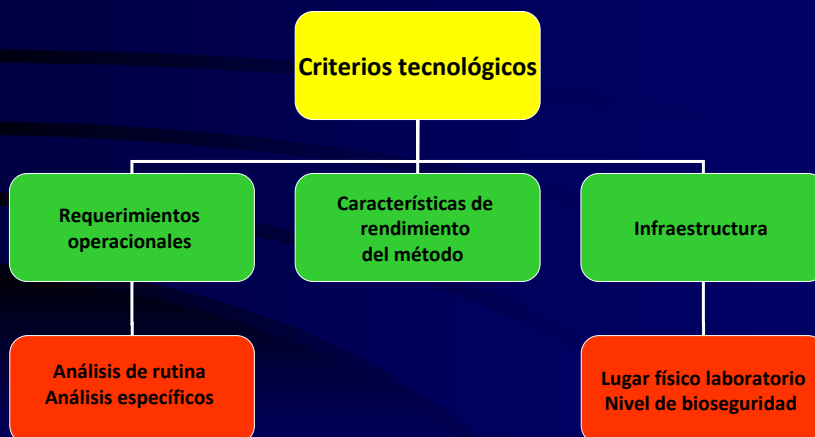
Ilv2012

Criterios de selección



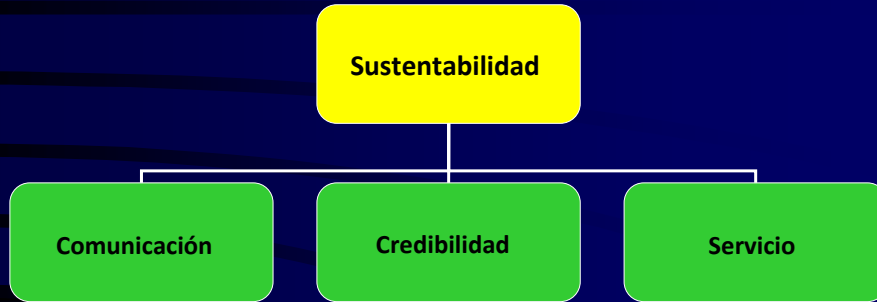
Ilv2012

Criterios de selección



Ilv2012

Criterios de selección



Ilv2012

Métodos Desarrollados por el Laboratorio

Ilv2012

Métodos Desarrollados por el Laboratorio

- Se pueden utilizar cuando:
 - se cuente con personal calificado para desarrollarlos y aplicarlos,
 - permitan obtener resultados equivalentes a los de métodos tradicionales, y
 - presenten un grado de validación adecuada.
- Los métodos de rutina desarrollados en el laboratorio deben ser claros y deben contener el detalle de los puntos críticos de la operación, para que puedan ser fácilmente interpretados por los analistas menos experimentados. Suele ser de utilidad indicar estos puntos críticos en el diagrama de flujo del ensayo.
- Si se incurre en alguna desviación del método, esto es aceptable únicamente si dicha situación ha sido documentada, justificada técnicamente, autorizada y aceptada por el cliente.
- En general, los métodos normalizados o no, así como los desarrollados en el laboratorio, deben ser revisados y actualizados por lo menos una vez al año.



Ilv2012

Métodos Desarrollados por el Laboratorio

Se debe documentar:

- 1. Objetivo y Alcance:** en el objetivo se define el propósito del ensayo. El alcance define sobre qué alimentos se puede aplicar este método.
- 2. Referencias:** se listan todos los documentos que se hayan utilizado para desarrollar el método.
- 3. Definiciones, Abreviaturas y Símbolos empleados:** en cuanto a las abreviaturas y símbolos no se necesita detallar aquellas que sean de uso internacional. (Opcional)
- 4. Diagrama de Flujo del Ensayo:** se detalla el orden cronológico de las etapas del ensayo.
- 5. Manipulación de Muestras:** se describe todo lo concerniente al tamaño, transporte y almacenamiento de las muestras antes y después del ensayo, la identificación de las mismas, disposición final y, en caso de requerirlo, el procedimiento de muestreo.
- 6. Realización del Ensayo:** se describe el método propiamente tal, forma de expresar los resultados y límite de detección del mismo.

Ilv2012

Métodos Desarrollados por el Laboratorio

Se debe documentar:

7. Locales y Medio Ambiente: se detallan las condiciones ambientales y las condiciones particulares de los locales para la realización del ensayo.

8. Equipamientos y Materiales: se listan los equipos, reactivos, medios de cultivo, materiales y utensilios que se utilizan en el ensayo. El listado debe incluir las especificaciones para cada ítem.

9. Registro de los Ensayos: se deben citar todos aquellos que se utilicen para el ensayo (recepción de muestra, resultados, controles y otros).

10. Trazabilidad: Se detallan paso a paso los registros involucrados de manera de permitir el correcto seguimiento del ensayo, desde el inicio hasta la entrega y archivo del informe.

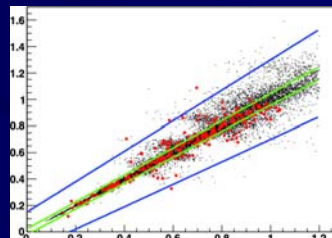
11. Ensayos de Aptitud y Control de la Calidad: se describen los controles del método, por ejemplo, control positivo, negativo, blancos y los ensayos interlaboratorios e intralaboratorios. Incertidumbre (S/A).

12. Criterios o requisitos para la aprobación o rechazo



Ilv2012

Validación del método



Ilv2012

Validación del Método

- Se deben validar:
 - los métodos no normalizados,
 - los métodos estándar modificados, y
 - los métodos desarrollados en el propio laboratorio
- El procedimiento de validación aplicado dependerá de si:
 - el resultado final será expresado como un valor cuantitativo o como presencia / ausencia,
 - el método es un nuevo procedimiento o una modificación de un método existente.
- La validación debería incluir:
 - Exactitud,
 - Precisión,
 - Especificidad,
 - Repetibilidad
 - Reproducibilidad
 - Limite de detección,
 - Limite de cuantificación,
 - Linealidad,
 - Rango, y
 - Robustez



Ilv2012

Validación del Método

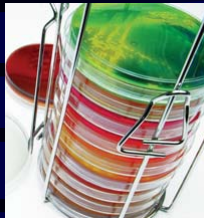
- Para la validación de un método se debe efectuar el análisis en paralelo del nuevo método propuesto y el método validado existente para el mismo analito.
- La organización o la participación en ensayos colaborativos o interlaboratorios, formales o informales, es otra manera de comprobar la validez del método.
- También pueden ser usados Materiales de Referencia (sustratos conocidos, inoculados con los organismos deseados en cantidades conocidas), tanto para los análisis cuantitativos como para los cualitativos.
- Aún en el caso de que se haya realizado una correcta y adecuada validación, el laboratorio tendrá que verificar periódicamente que se cumplen los parámetros documentados, utilizando, por ejemplo, muestras inoculadas ex-profeso.
- Toda la información referida a la validación debe documentarse y archiversse.

Ilv2012

Validación del Método

- Se deberán definir los límites de control aceptables y especificar las acciones correctivas a considerar cuando los resultados estén fuera de esos límites.
- En el caso en que se utilicen métodos oficiales, métodos normalizados o métodos de organismos nacionales o internacionales reconocidos, o basados en ellos, antes de analizar cualquier muestra, los laboratorios deberán verificar su capacidad para cumplir de forma satisfactoria todos los requisitos establecidos en dichos métodos.
- International Standards Organization. ISO 16140. Microbiology of food and animal feeding stuff - protocol for the validation of alternative methods. 16140:2003.
- NCh3128.Of2008. Microbiología de alimentos de consumo humano y animal - Procedimiento para la validación de métodos alternativos.

Ilv2012



Métodos rápidos



Ilv2012

Métodos rápidos

- En las últimas décadas surgió el interés de desarrollar métodos que disminuyeran el tiempo de ejecución del ensayo, basados en los "golden standards".
- El término "rápido" debe ser interpretado no sólo como un menor tiempo de ejecución, sino que también como un mayor flujo de múltiples muestras debido a una automatización del trabajo en el laboratorio. Se los denomina también métodos alternativos.
- Son una nueva posibilidad para que la industria obtenga resultados confiables para asegurar la inocuidad de sus productos, permitiendo además tomar acciones correctivas rápidas al detectar una no conformidad.
- Existe en el mercado una gran variedad de ellos, ofrecidos por firmas comerciales. Sin embargo no todos los entes reguladores aceptan su uso, hecho que a futuro debería cambiar.



Ilv2012

Métodos rápidos

- Requisitos a cumplir en los análisis microbiológicos de alimentos:
 - **Exactitud en la obtención de resultados de acuerdo a los requerimientos establecidos:** sensibilidad, límites de detección, especificidad, aplicación potencial y comparación con métodos de referencia.
 - **Rapidez:** tiempo mínimo requerido para la obtención de resultados, número de muestras procesadas en cada ensayo, por hora y por día.
 - **Costo mínimo:** inicial, por análisis, reactivos, trabajo.
 - **Aceptabilidad:** por parte de la comunidad científica y de las agencias reguladoras de los sistemas analíticos.
 - **Sencillez de manejo:** preparación de la muestra, funcionamiento del equipo analítico y procesamiento informático de los datos.
 - **Calificación y formación del personal adecuada para la técnica a realizar.**
 - **Reactivos:** facilidad de preparación, estabilidad, disponibilidad.
 - **Fiabilidad del método:** avalada por la compañía u organismo responsable de la técnica analítica.
 - **Soporte técnico adecuado:** rapidez, disponibilidad y costo.
 - **Mínimo espacio útil requerido.**

Ilv2012

Métodos rápidos

- Conviene considerar que, en la mayoría de los casos, el empleo de métodos rápidos en el análisis microbiológico de los alimentos no excluye la etapa previa de enriquecimiento del microorganismo resultando, en ocasiones, también es necesario que los resultados positivos obtenidos sean confirmados con los métodos de referencia establecidos.
- Asimismo, es de suma importancia al igual que en el caso de los métodos tradicionales, la realización de una adecuada toma y preparación de las muestras a analizar. Para ello se destacan avances tales como:
 - **Para muestras sólidas:** instrumentos gravimétricos que realizan automáticamente las diluciones de muestras de alimentos, homogeneizadores que funcionan mediante ondas de choque y agitación intensa que permite una mejor transferencia de los microorganismos del alimento al diluyente, produciendo una mínima destrucción de la muestra.
 - **Para muestras líquidas:** equipos que realizan de forma automatizada diluciones seriadas de una muestra problema.
 - **Para muestras de superficie:** esponjas prehidratadas con diferentes diluyentes/neutralizantes.
 - **Para muestras de aire:** instrumentos portátiles que aspiran volúmenes determinados de aire y recogen los microorganismos en la superficie del agar de placas de contacto.

Ilv2012

Métodos convencionales vs. Métodos rápidos

Characteristic	Molecular techniques	Immunological techniques	Microscopic techniques	Conventional methods
Specificity based upon	DNA or RNA sequences ☺	Antibody-antigen binding, recently also phage ligands ☺☺	Staining using physiological or taxonomic probes ☺☺	Phenotypical tests (morphology, biochemical reactions, etc.) ☺☺
Expression of sensitivity	1 genome/PCR reaction → 10 ² -10 ³ CFU/ml ☺	10 ⁴ -10 ⁵ CFU/ml ☺	1 cell/visual field → ± 10 ⁴ CFU/ml ☺☺	1 CFU/25 g ☺☺
Time to result	1-3 h ☺	10 min - 1 h ☺	5-30 min ☺	From 3-7 days ☺
Differentiation of dead/viable cells	☺☺	☺	☺☺	☺
Interference of food sample	☺	☺	☺	☺
Simultaneous multiparameter testing	☺	☺	☺	☺
Reproducibility	☺	☺	☺	☺
Potential for automation	☺	☺	☺	☺
Labour-intensity	☺	☺	☺	☺
Cost of materials	☺	☺	☺	☺
Investment of equipment/infrastructure	☺	☺	☺	☺

☺ overall perceived as a negative intrinsic characteristic/disadvantage for the user.
 ☺ overall perceived as a neutral intrinsic characteristic/no explicit disadvantage or advantage for the user.
 ☺ overall perceived as a positive intrinsic characteristics/advantage for the user.

Fuente: V. Jasson et al. / Food Microbiology 27 (2010) 710-730

Ilv2012

Consideraciones finales

Ilv2012

Tener presente

- Metodologías documentadas en forma clara
- Formularios para registro de datos del ensayo
- Cálculo de resultados
- Mantenimiento de equipos
- Control de medios de cultivo
- Calibración
- Mantenimiento y control de cepas patrones
- Control ambiental
- Supervisión y necesidades de capacitación
- Precisión del analista y del método
- Cálculo de incertidumbre
- Revisión de actualizaciones de las metodologías

Ilv2012

Conclusión

- En general **es difícil juzgar** un método, considerando su evolución en el tiempo y su dependencia de factores como el tipo de alimento, ecología microbiana asociada y condiciones de estrés del microorganismo.
- A pesar de que un **método esté validado**, al ser implementado en un laboratorio es recomendable que sea sometido a una **segunda validación (verificación)** para demostrar que el método da resultados similares al ser aplicado a un alimento por los analistas del laboratorio.
- Considerar que **no hay un método** 100% sensible, 100% específico, y que posea una relación tiempo/costo como el que desea el laboratorio. Todos tienen **ventajas y desventajas**.
- Actualmente los **métodos tradicionales siguen siendo la base**, pero evolucionan considerando nuevos medios diferenciales y otros para aumentar la recuperación de células dañadas.
- Los **métodos rápidos son adecuados** para el análisis de gran número de muestras, comprobar indicadores de higiene y calidad, y para el diagnóstico rápido *in situ* en empresas de alimentos por su disponibilidad, rapidez, y fácil interpretación de los resultados obtenidos.