



Métodos Rápidos para el control Microbiológico de Alimentos

Vigo, 8 de septiembre del 2011



Necesidades en el análisis de alimentos

- Contaminación microbiana: principales problemas asociados al consumo
- Las toxiinfecciones alimentarias conllevan un elevado impacto económico (patógenos)
- Las alteraciones de alimentos también preocupan a las industrias alimentaria (indicadores de calidad)
- Sistemas APPCC es la herramienta de seguridad alimentaria más reconocida
- Requiere de **un gran número de análisis y obtención rápida de resultados**

Necesidades en el análisis de alimentos

- Métodos cada vez más rápidos (industrias, laboratorios)
- Métodos sencillos
- Métodos fiables
- Métodos reconocidos
- Métodos trazables
- Métodos sensibles
- Métodos económicos

Métodos tradicionales/oficiales:



Surgen los métodos
alternativos (rápidos y/o
automatizados)



Métodos rápidos:

- Disminuyen uno o varios días frente a los protocolos tradicionales

Métodos automatizados:

- Utilización de un equipo que realiza una o varias tareas que habitualmente realiza un técnico

Métodos Rápidos: Consideraciones generales

B I O M E D I C A
I N D U S T R Y

CARACTERÍSTICAS DE UN MÉTODO RÁPIDO/AUTOMATIZADO IDEAL

- Preciso
- Rápido y productivo
- Económico
- Aceptable
- Realización simple
- Entrenamiento
- Reactivos comunes
- Reputación de la compañía
- Buen servicio técnico
- Requerimientos de espacio y utilidad óptimos

Métodos Rápidos

Clasificación en áreas de acuerdo a lo que se busca:

- Sistemas para facilitar la toma de muestras
- Métodos para ayudar al procesamiento de las muestras
- Sistemas de cuantificación microbiológica
- Métodos para identificación y cuantificación de microorganismos
- Sistemas especiales para análisis de muestras de aguas, ambientales y superficies
- Sistemas de identificación mediante métodos moleculares
- Métodos inmunológicos para detección y/o cuantificación de microorganismos
- Otros métodos misceláneos

Métodos rápidos para ayudar a la toma de muestras

BIOMÉRIEUX
INDUSTRY

MUESTREADORES, APLICADORES

Muestreo dinámico

Estandarización

Concepto de trazabilidad



Métodos rápidos para ayudar al procesamiento de la muestra

BIOMÉRIEUX
INDUSTRY

DILUIDORES

Estandarización

Aumentan productividad

Trazabilidad



PREPARADORES y DISPENSADORES DE MEDIOS DE CULTIVO





Métodos rápidos aplicados a Indicadores microbiológicos



FILM HIDRATABLE: PETRIFILM: 3M

- Optimizan el espacio de incubación
- Manual
- Algunos protocolos Express
- Posibilidad de lector automático
- Validaciones internacionales



Láminas deshidratadas que se rehidratan al inocular la muestra

Recuento total
Enterobacterias
E.coli/Coliformes
Mohos y levaduras
Staph. Aureus
Listeria ambiental



Métodos rápidos aplicados a Indicadores microbiológicos



SISTEMA TEMPO: bioMerieux

- Fácil preparación de muestra
- Trazabilidad
- Mismo protocolo para diferentes parámetros
- Validaciones internacionales

Sistema totalmente automatizado

NMP miniaturizado

Lectura por fluorescencia

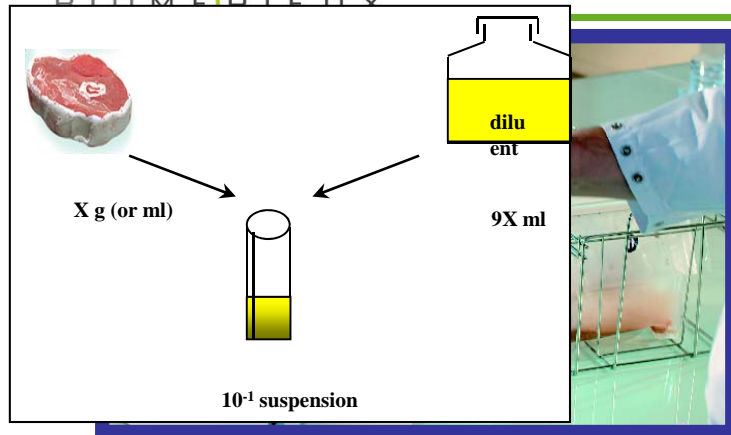
- Recuento Total
- Enterobacterias
- Coliformes
- E.coli
- S. Aureus
- Mohos y levaduras
- Bacterias Lácticas



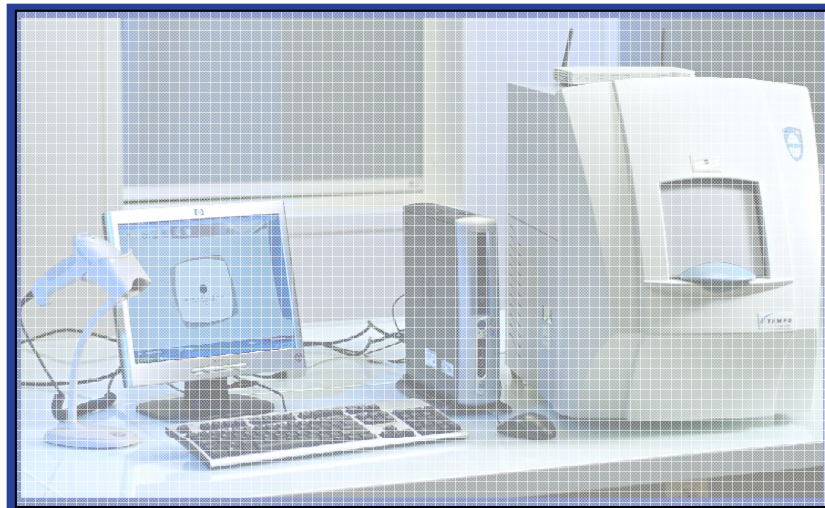


tempoTM

Protocolo de trabajo



Sample preparation

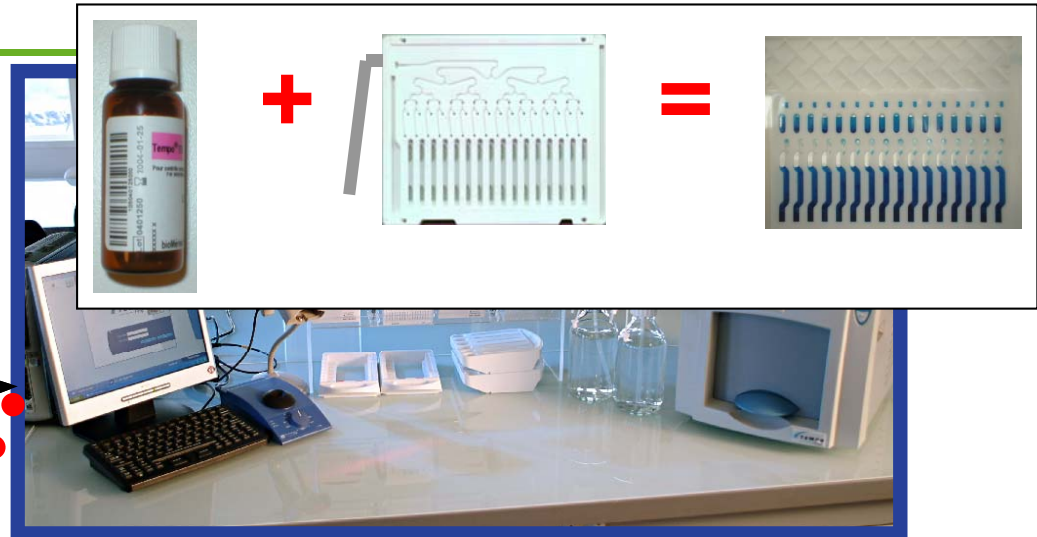
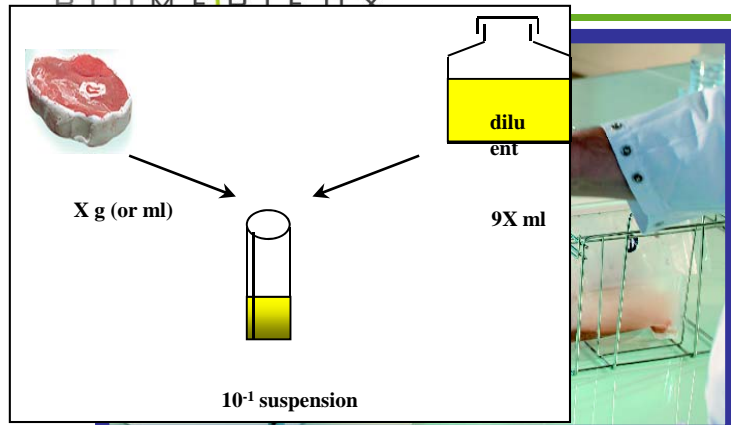


Métodos rápidos para el control microbiológico de alimentos



tempo™

Protocolo de trabajo

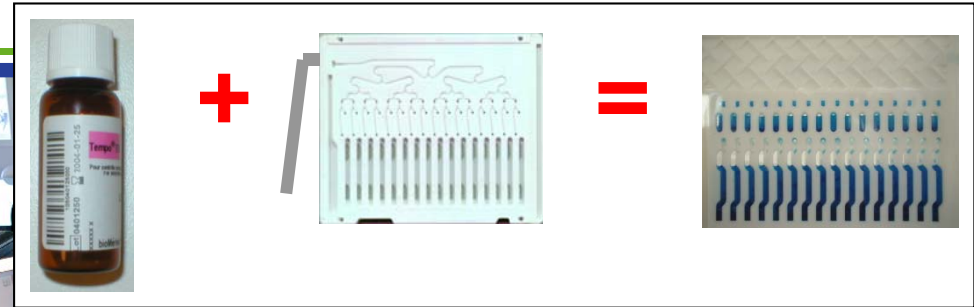
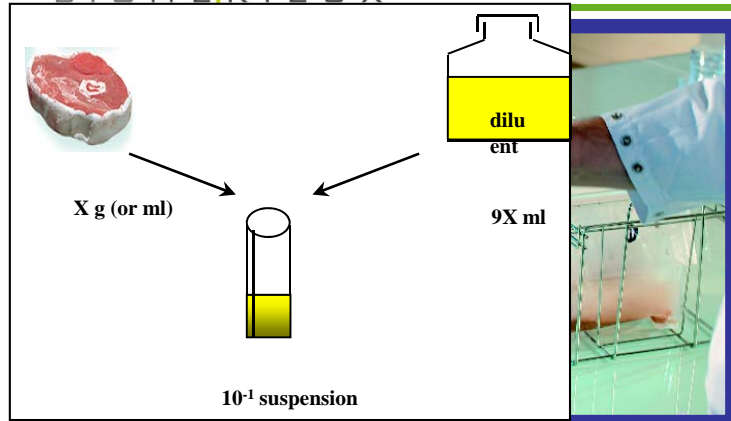


WIFI

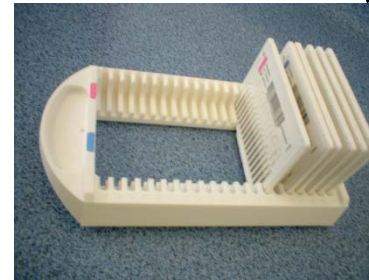
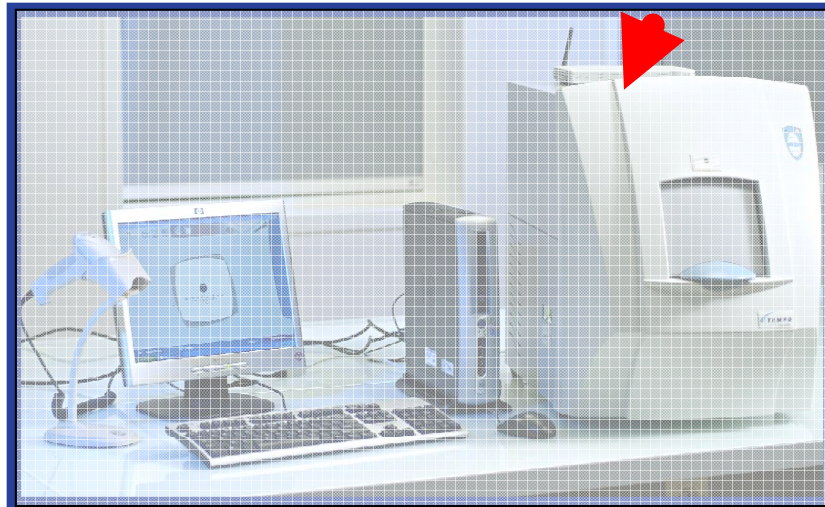
Inoculation



Protocolo de trabajo



WIFI



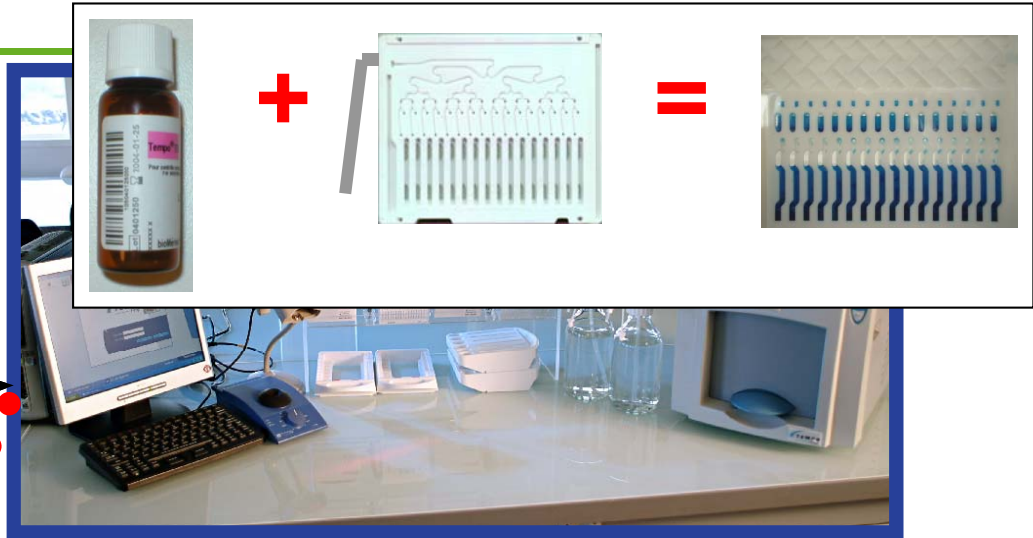
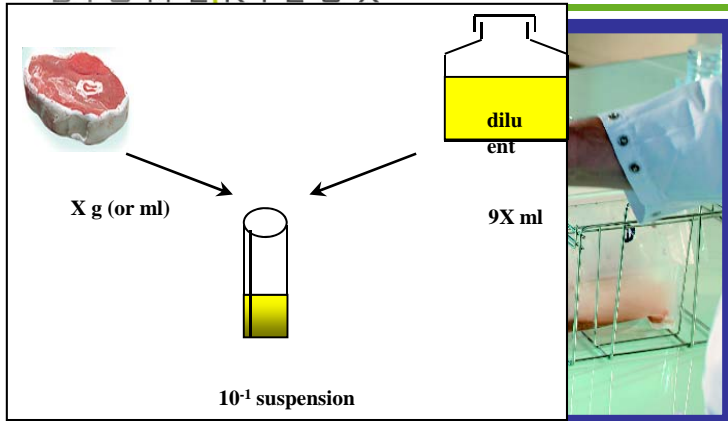
Métodos rápidos para el control microbiológico de alimentos



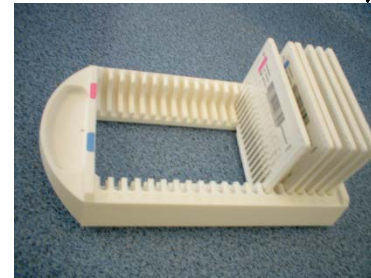
BIOMÉRIEUX

tempoTM

Protocolo de trabajo



WIFI



Reading & interpretation

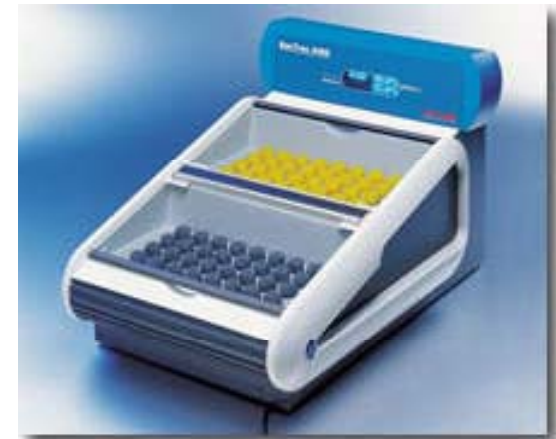
Métodos rápidos para el control microbiológico de alimentos

Métodos rápidos aplicados a Indicadores microbiológicos

B
INDUSTRY

SISTEMAS BASADOS EN IMPEDANCIA: BACTRAC

- Fácil preparación de muestra
- Lectura automática
- Más sencillo cuando es “mono-producto”
- Necesaria calibración para recuento
- Esterilidad comercial (pasa/no pasa)



Recuento total

Enterobacterias

E.coli/Coliformes

Hongos y levaduras

Staph. Aureus

Ácido Lácticas

Mide los cambios que producen los microorganismos de un cultivo que alteran las substratos cambiando su conductividad eléctrica y esto varía la impedancia

Métodos rápidos aplicados a Indicadores microbiológicos



SISTEMAS BASADOS EN CITOMETRIA DE FLUJO

- Fácil preparación de muestra
- Lectura automática
- Rápido
- Utilidad: yogures, champús, cremas, refrescos, zumos de frutas



AES: Bactiflow

Marcaje de las células,
detección una una y contaje

Recuento total
Enterobacterias
Hongos y levaduras
Salmonella



Take advantage
of ultra-rapid
microbial testing!

Métodos rápidos aplicados a Indicadores microbiológicos

BIOMÉRIEUX
INDUSTRY

Sembradores en espiral y lectores automáticos de colonias



Deposición automática de la muestra líquida de un placa

- Estandarización
- Eliminación de diluciones
- Lectura automática
- Ahorro de tiempo
- Trazabilidad



Lectores automáticos de colonias



Métodos rápidos aplicados a Indicadores microbiológicos

BIOMÉRIEUX
INDUSTRY

SISTEMA SimPlate: Biocontrol

- Fácil de leer
- Consistente y reproducible
- Rápido
- Fácil de preparar
- Menos interferencia
- Amplio rango de conteo
- Tecnología innovadora

Placa de plástico circular de 84 pocillos

Lectura por fluorescencia

El número de positivos se convierten en valores NMP



Recuento total

Coliformes/E.coli

Mohos y levaduras

Campylobacter



Métodos rápidos aplicados a Indicadores microbiológicos

SISTEMAS BASADOS EN ATP

- Económico
- Rápido
- Utilización en el entorno lácteo: esterilidad comercial
- Más utilizado en control de limpieza y desinfección

Mide niveles de ATP

Lo relaciona con niveles de contaminación





Métodos rápidos aplicados a la detección de Patógenos

PROTOCOLOS CORTOS

Salmonella:

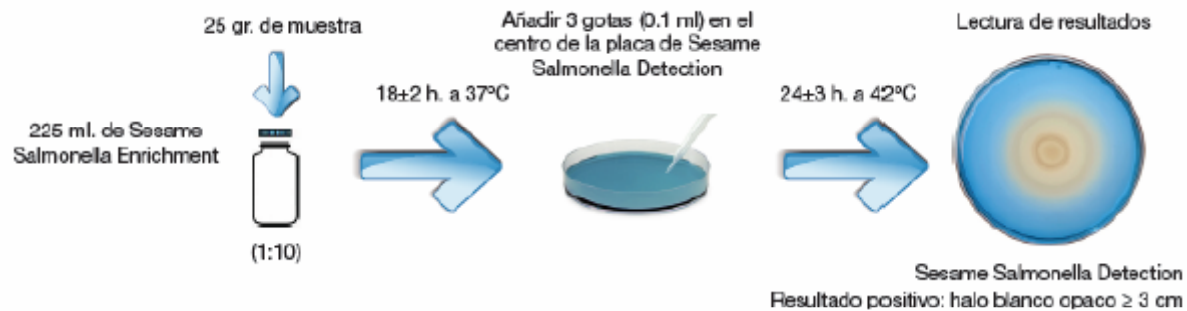
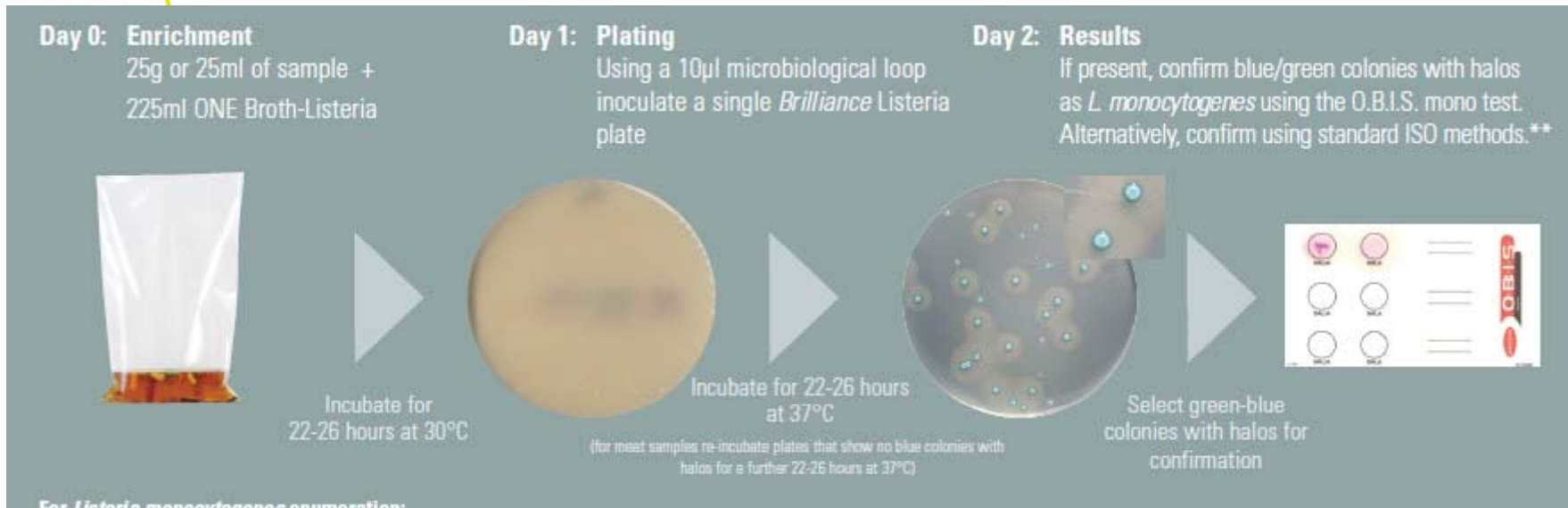
- SESAME (BIOSER)
- IBISA (AES)
- SMS (AES)
- SALMONELLA PRECIS (OXOID)
- RAPID SALMONELLA (BIORAD)

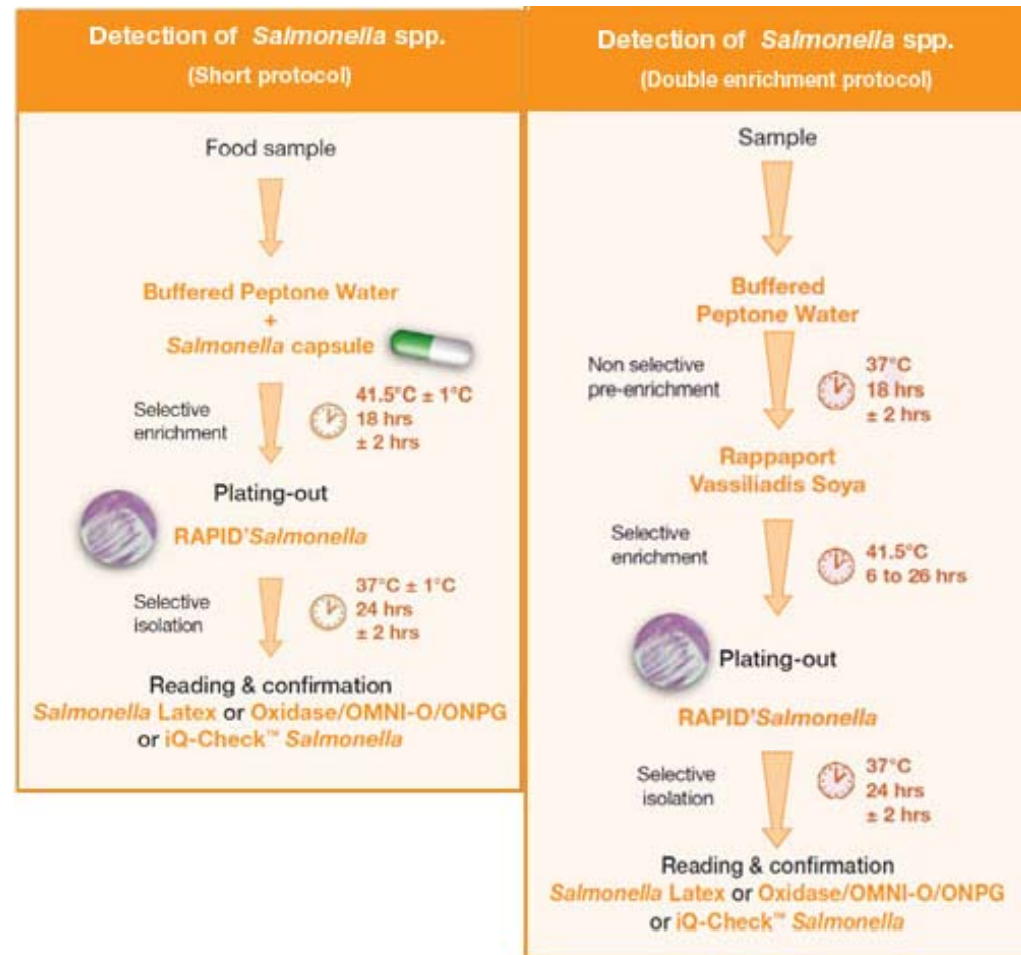
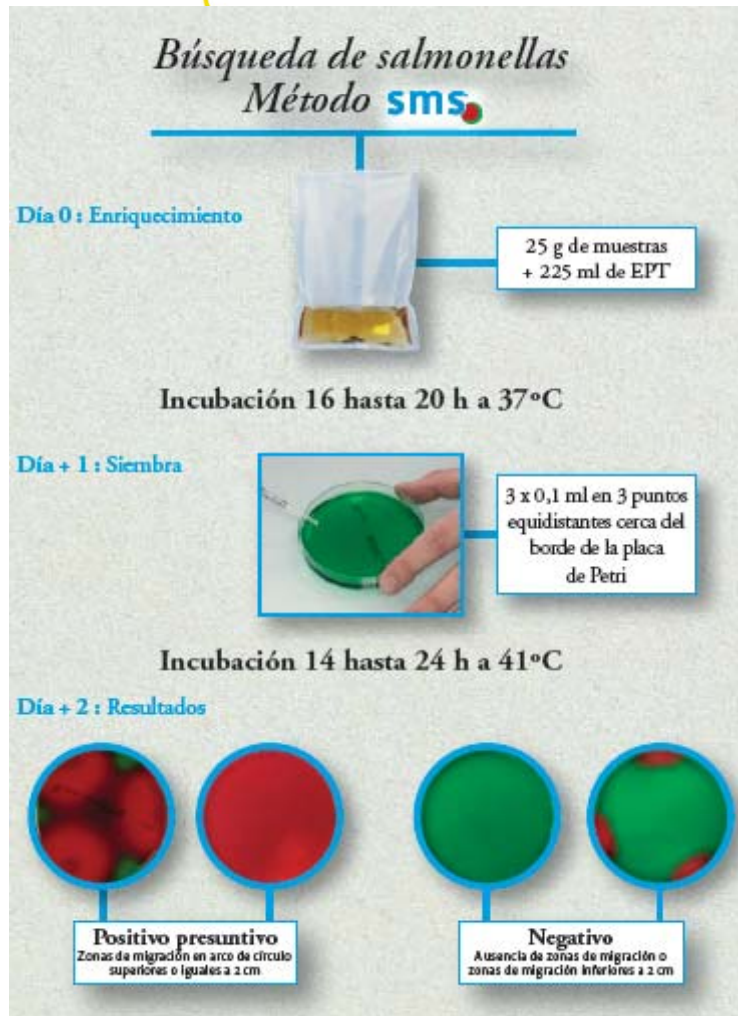
Listeria Monocytogenes:

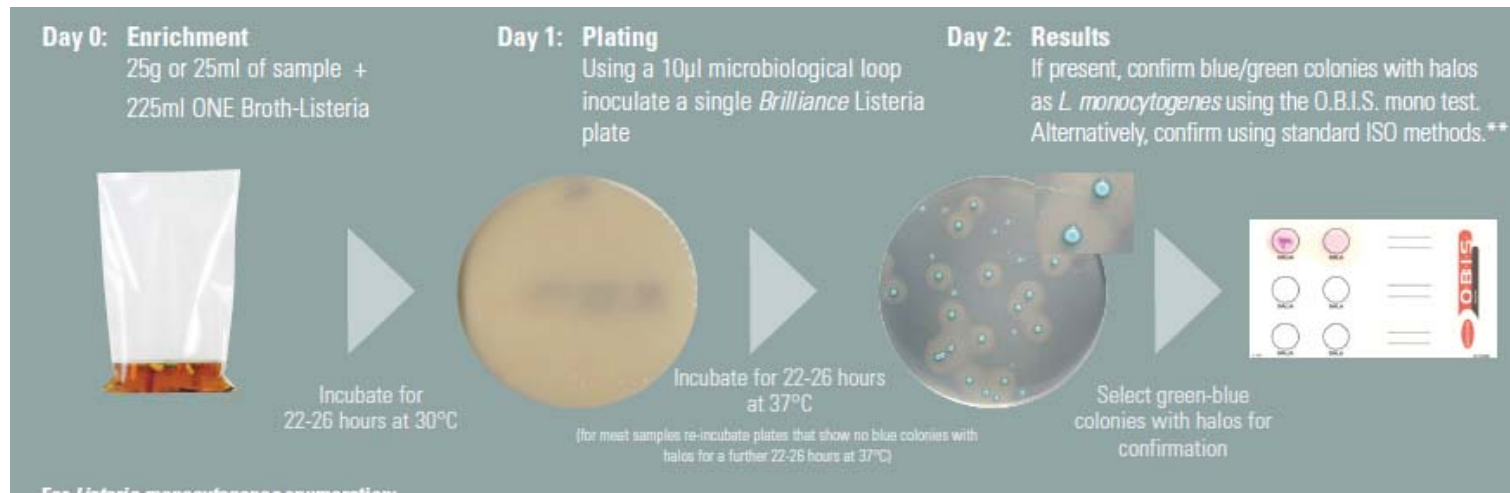
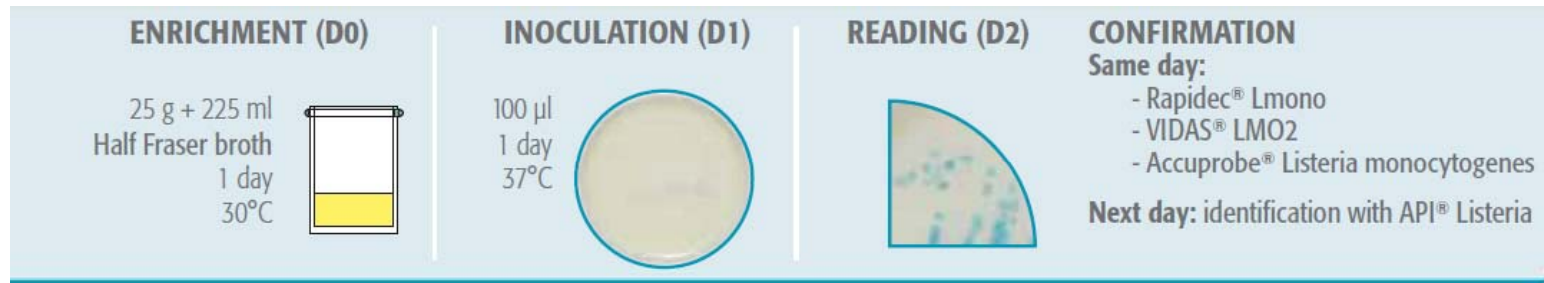
- ALOA ONE DAY (AES)
- LISTERIA PRECIS (OXOID)
- RAPID LMONO (BIORAD)
- COMPASS LISTERIA (BIORAD)
- CHROMOID LMONO (BIOMEREIUX)

- Pre-enriquecimiento y placa
- Manuales
- Medios cromogénicos o semisólidos
- Validaciones internacionales
- Económicos

- Salmonella
- Listeria spp
- Listeria monocytogenes



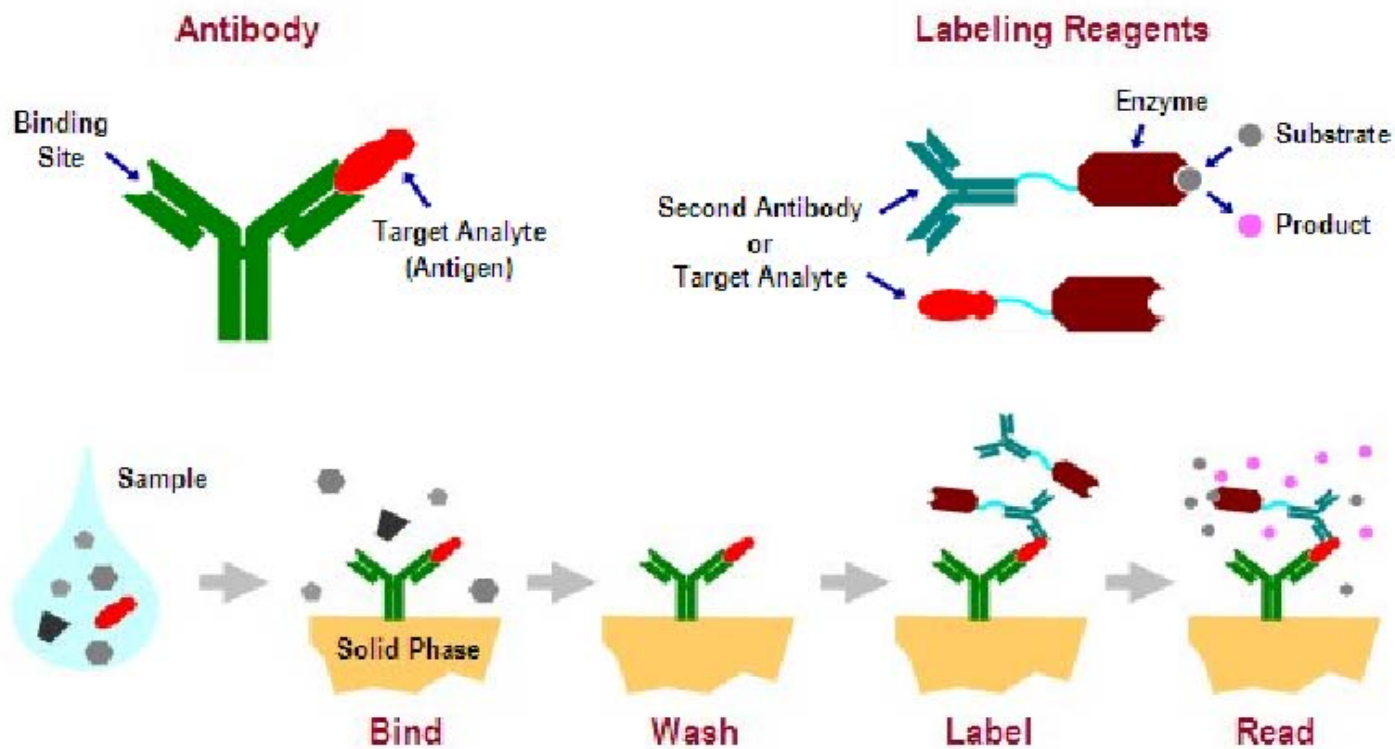




Métodos rápidos aplicados a la detección de Patógenos

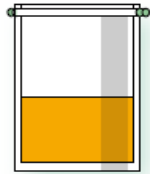
SISTEMAS BASADOS EN PRUEBAS ELISA:

ELISA



Métodos rápidos aplicados a la detección de Patógenos

SISTEMAS BASADOS EN PRUEBAS ELISA



225 ml
de bouillon LMX
+ 0,5 ml de supplément LMX

26-30 h / 37°C ± 1°C

250 µl



VIDAS Heat & Go / 5 ± 1 min*

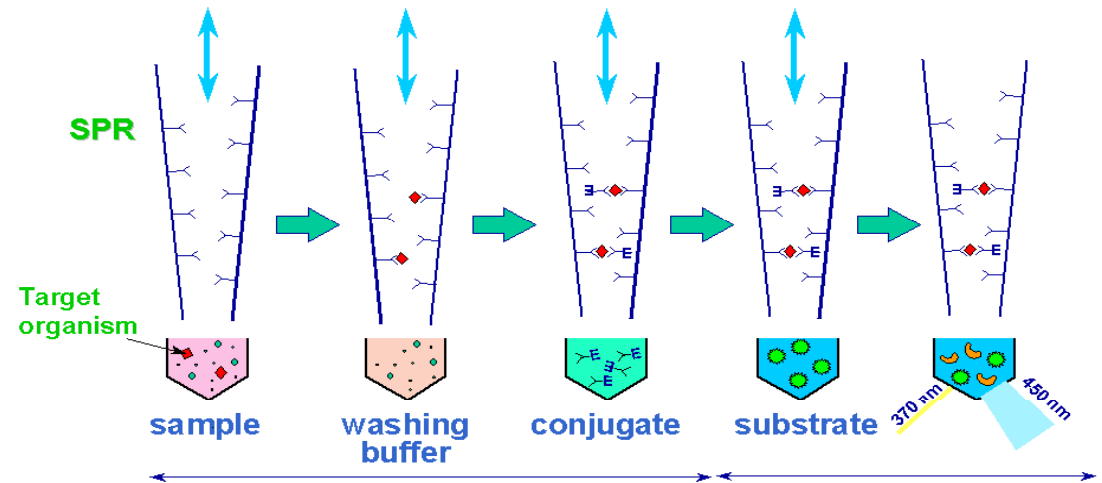
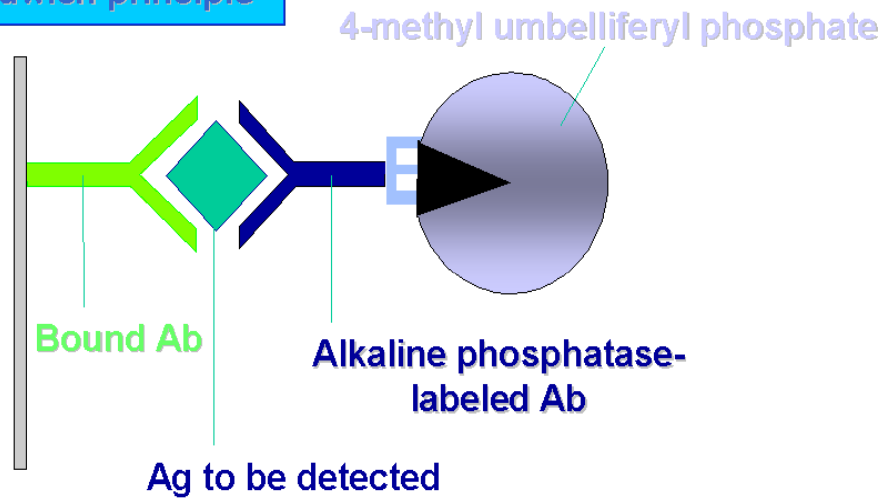
Retirer la barrette et laisser refroidir 10 min



- **Equipo automatizado**
- **Tecnología ELFA (elisa+fluorescencia) e inmunocentración**
- **Resultados en 16-24 horas**
- **Validaciones internacionales**
- **Lectura automática, no calibración, no interpretación**
- **Procesado de muestras: 12-30 simultáneamente cada 45 minutos**

Métodos rápidos aplicados a la detección de Patógenos

sandwich principle



Métodos rápidos aplicados a la detección de Patógenos

SISTEMAS BASADOS EN ELISA

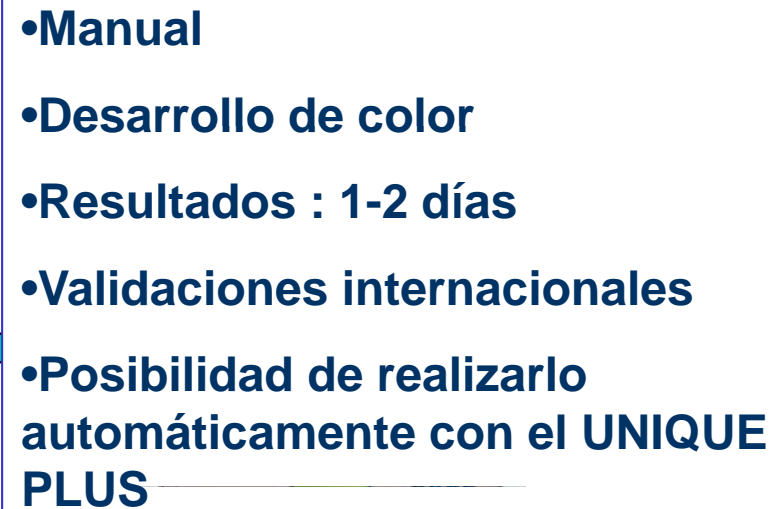
Sistema TECRA (Biotrace)

Salmonella

Listeria spp

Campylobacter spp



- 
- **Manual**
 - **Desarrollo de color**
 - **Resultados : 1-2 días**
 - **Validaciones internacionales**
 - **Posibilidad de realizarlo automáticamente con el UNIQUE PLUS**

Métodos rápidos aplicados a la detección de Patógenos

SISTEMAS BASADOS EN ELISA

Sistema TRANSIA
(Biocontrol)

Salmonella

Listeria Monocytogenes

Listeria spp



- Automático
- Manejo de elevados volúmenes
- Procesado de muestras: 93 muestras simultáneamente
- Resultados rápidos: 1-2 días
- Validaciones internacionales

Métodos rápidos aplicados a la detección de Patógenos

BIOMÉRIEUX
INDUSTRY

SISTEMAS BASADOS EN ELISA

Lateral flow

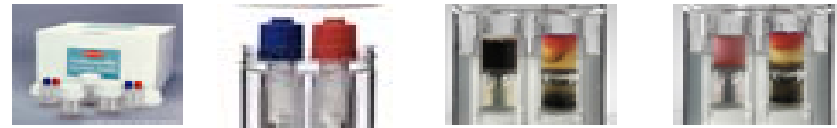
Rapid test (Oxoid)

VIP (BioControl)

RayAI (Rayal Ltd)

REVEAL (Neogen)

Rapidcheck (Bioser)



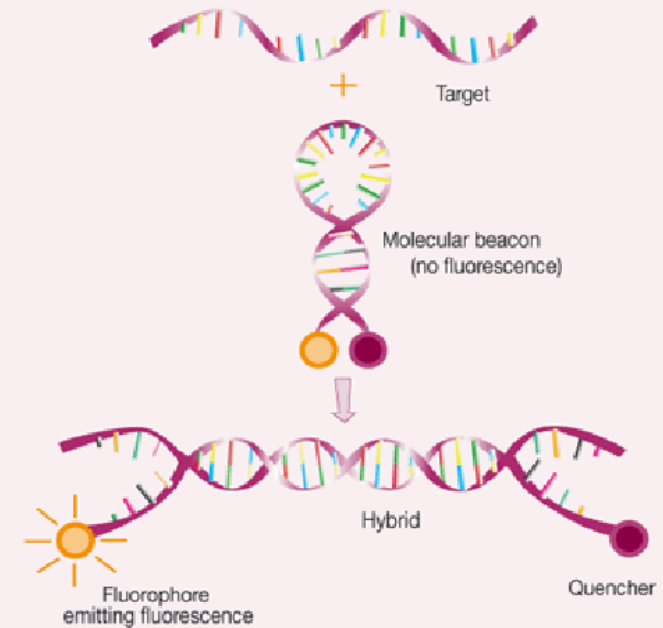
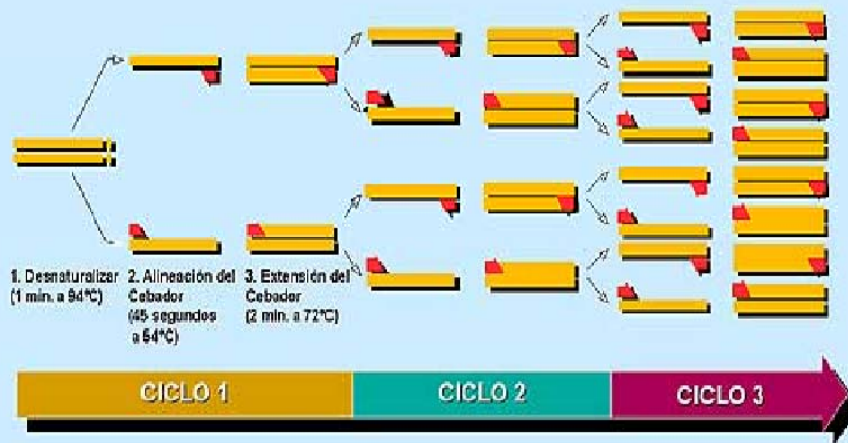
- Manual
- La muestra difunde por capilaridad hacia la zona de Ac
- Lectura habitual por una línea de color
- Validaciones internacionales



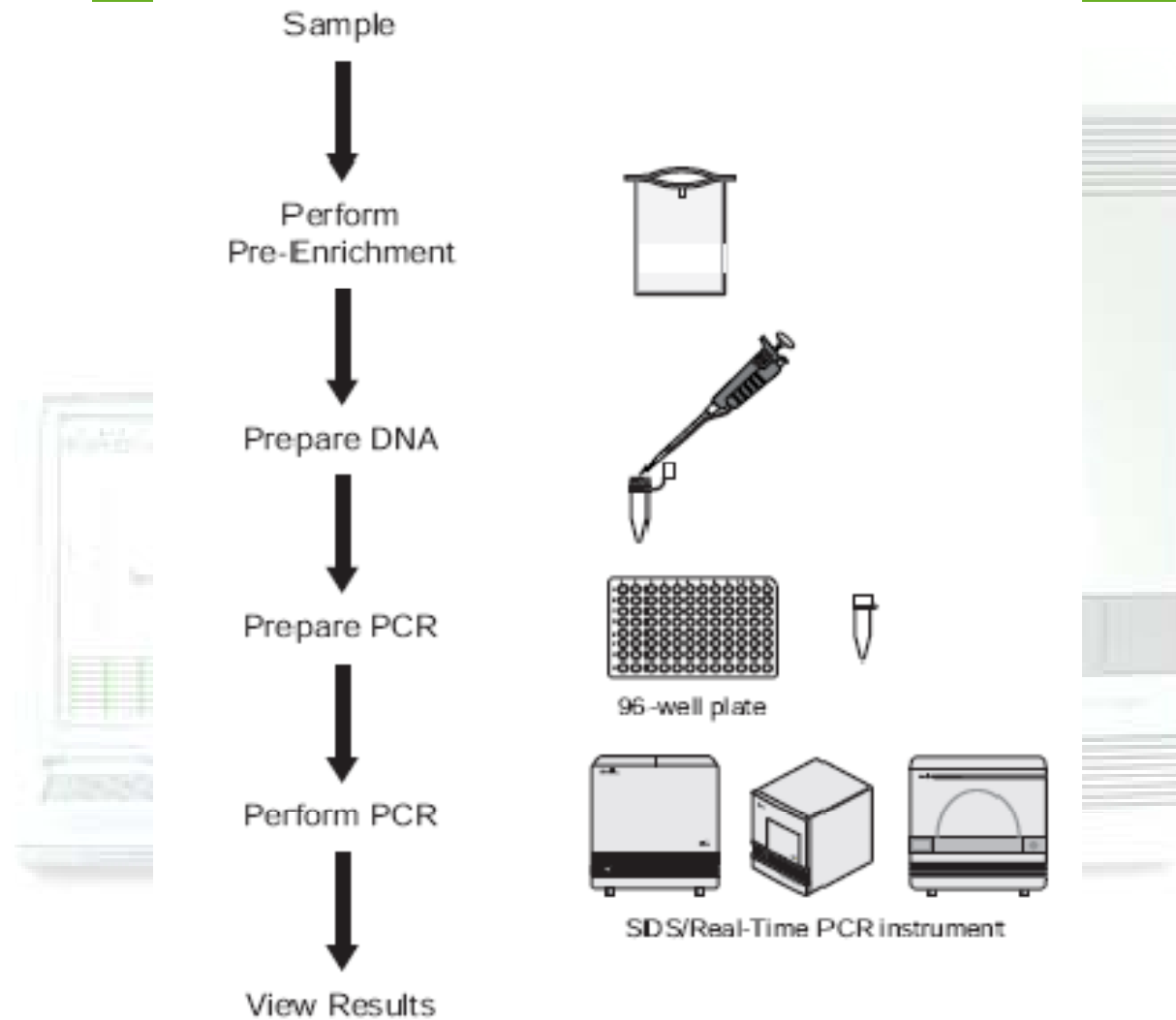
Métodos rápidos aplicados a la detección de Patógenos

SISTEMAS BASADOS EN PCR

Reacción en cadena de la polimerasa



Métodos rápidos aplicados a la detección de Patógenos



Métodos rápidos aplicados a la detección de Patógenos



SISTEMAS BASADOS EN Real Time PCR (BAX System: Oxoid)

Salmonella spp

Listeria spp

Listeria Monocytogenes

Campylobacter

E.coli O157:H7

Enterobacter sakazakii

Mohos y levaduras

S.aureus

- **Procedimientos diferentes según matriz**
- **Validaciones internacionales**
- **Resultados en 24-33 horas**
- **Sonda Sybr Green**



Métodos rápidos aplicados a la detección de Patógenos

SISTEMAS BASADOS EN REAL TIME PCR (Applied Biosystem):

- 2 tipos de kits: Taqman y Microseq
- Validaciones internacionales
- Resultados en 20-28 horas



- Salmonella spp
- Salmonella entérica
- Listeria spp
- Listeria Monocytogenes
- E.coli O157:H7
- Campylobacter jejuni
- Cronobacter sakazakii
- E. coli O157:H7
- Listeria monocytogenes
- Pseudomonas aeruginosa
- Staphylococcus aureus

Métodos rápidos aplicados a la detección de Patógenos

SISTEMAS BASADOS EN PCR (Adia food: AES)

- **Termociclador: Stratagen**
- **Resultados en 19-21 horas**

Salmonella spp

Listeria spp

Listeria Monocytogenes

E.coli O157:H7

E. coli O157:H7 y Salmonella



Métodos rápidos aplicados a la detección de Patógenos

SISTEMAS BASADOS EN REAL TIME PCR (iQ-CHECK: Biorad)

- **Sondas: Molecular Beacons**
- **Varios termocicladores: iCycler iQ, chrom 4, iQ 5 y miniOpticon.**
- **En algunos software de interpretación de resultados**
- **Validación 16140**



Salmonella spp
Listeria Monocytogenes
Listeria spp
Campylobacter
E.coli 0157:H7

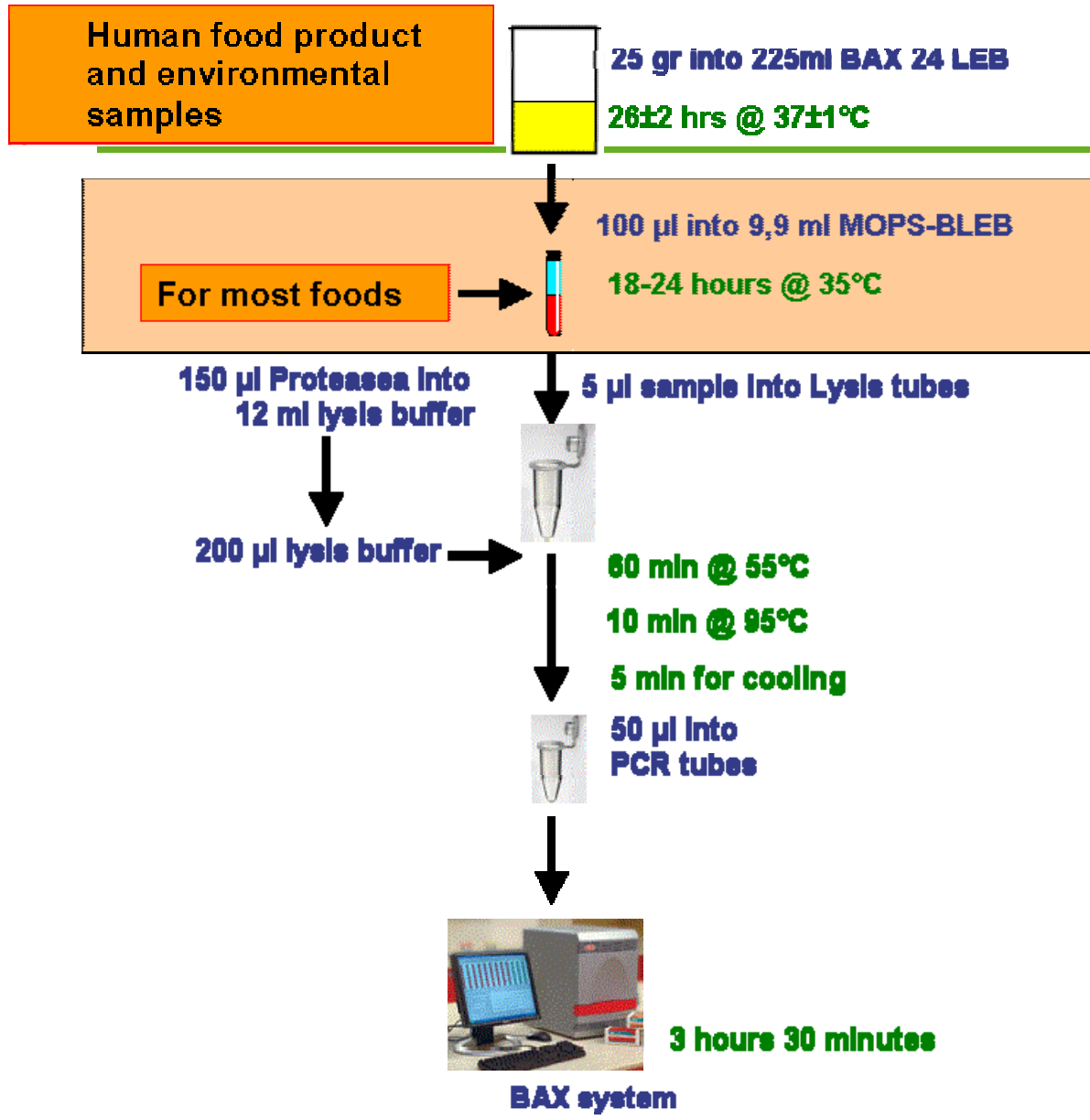
Métodos rápidos aplicados a la detección de Patógenos

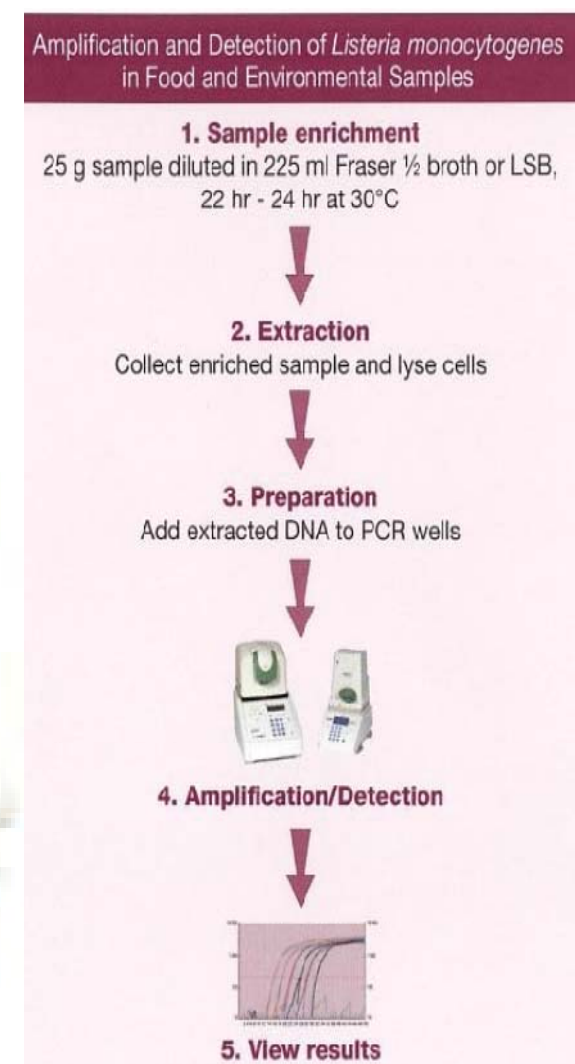
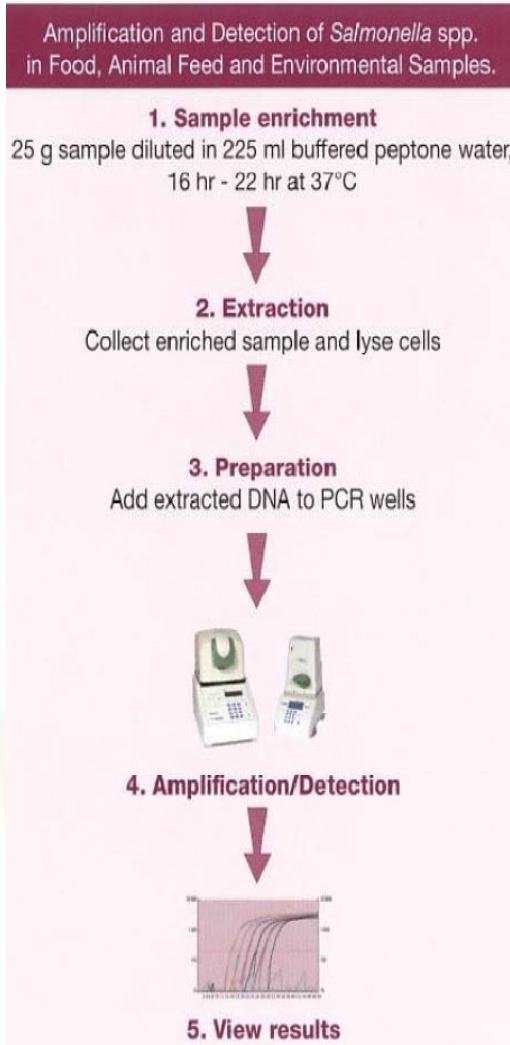
SISTEMAS BASADOS EN REAL TIME PCR (Assurance GDS: Biocontrol)

- Salmonella
- Listeria spp
- Listeria monocytogenes
- E.coli O157:h7
- Shiga Toxin

- Combina concentración de muestra y detección de DNA
- Termociclador: Assurance GDS Rotor-Gene™.

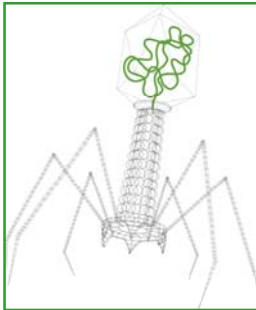






Métodos rápidos aplicados a la detección de Patógenos

SISTEMAS DE DETECCIÓN CON FAGOS



Salmonella

E.coli 0157:H7

• **Detección rápida y automática de patógenos mediante FAGOS ligada a fluorescencia.**



Salmonella

• **Detección rápida y manual de patógenos mediante FAGOS (lateral flow)**

Food & envt.



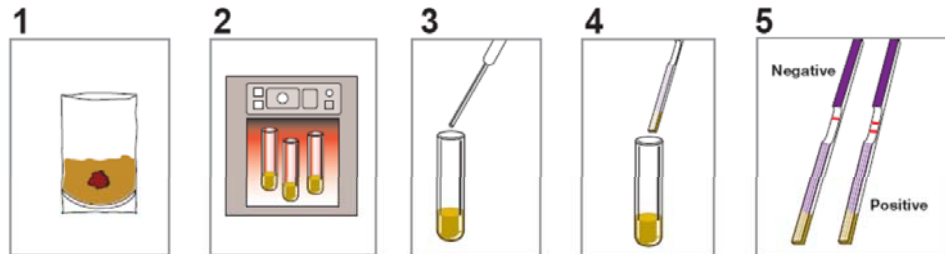
225 ml of BPW +
supplement (green)

41.5 +/- 1 °C
18-24 h



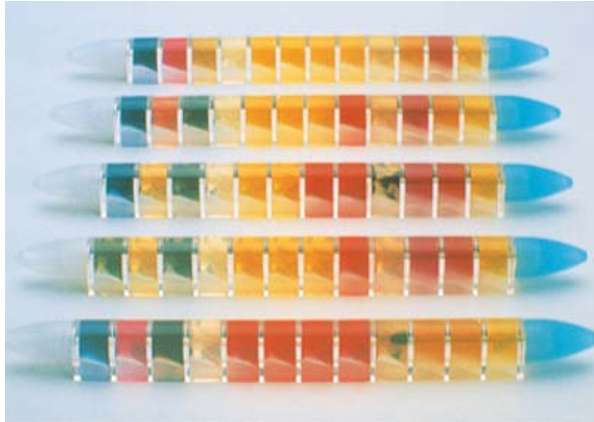
Heat & Go 5 min*

*Except for poultry & egg products

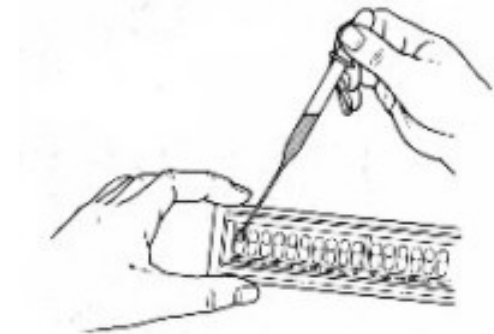


VIDAS UP Salmonella

48 min



Identificación

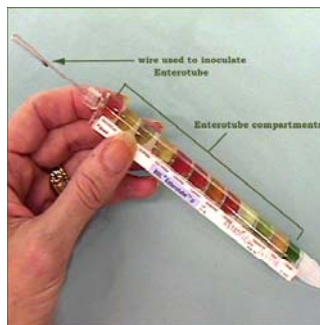


Métodos rápidos aplicados a la identificación de microorganismos



IDENTIFICACIÓN CON SISTEMAS MINIATURIZADOS

- Manual
- Miniaturización de pruebas bioquímicas
- Diferentes formatos: galerías, tubos de plástico,



- API: bioMérieux
- BBL Enterotube: BD
- BBL Crystal: BD
- RapID™ System: REMEL



Métodos rápidos aplicados a la identificación de microorganismos



SISTEMAS AUTOMÁTICOS DE IDENTIFICACIÓN

Fenotípica:

VITEK: bioMerieux

• BIOLOG: AES

• PHOENIX: BD



BIOLOG



- Resultados a partir de 4 horas
- Combinan reacciones enzimáticas y bioquímicas

Genotípica:

• MICROSEQ: ABI

• Secuenciación del
ARN 16 S



Métodos rápidos aplicados a la identificación de microorganismos



CLASIFICACIÓN FILOGENÉTICA

VITEK, API, BIOLOG, PHOENIX

	Family	Genus	Species	Subspecies	Strain
	DNA sequencing				
MicroSeq	16S rDNA sequencing				
	ARDRA				
Riboprinter	Riboprinting				
	tRNA-PCR				
	ITS-PCR				
BioRad	PFGE, LFRFA, RLFP				
	Multilocus Isozyme				
	Whole cell protein profiling				
ABI	AFLP				
	RAPD APPCR				
Diversilab	rep-PCR				

Genetic Differences: More \longrightarrow Fewer

Technique Discrimination: Low \longrightarrow High

Métodos rápidos aplicados a la identificación de microorganismos

- Genera huellas genéticas únicas y reproducibles para cada una de las muestras
- 13 muestras en 4 horas



1. **Extracción de ADN:** Extracción de ADN a partir de cultivos aislados.
2. **Amplificación mediante rep-PCR:** Amplificación de muestras con la técnica rep-PCR y los correspondientes kits de identificación genética DiversiLab (DiversiLab DNA Fingerprinting kits).
3. **Detección:** Separación de fragmentos mediante electroforesis de microfluidos en chip (DNA LabChip Kits).
4. **Análisis de datos:** Análisis de los datos en tiempo real, con informes a los que se puede acceder a través de un sitio web individual y seguro.

Métodos rápidos aplicados a la identificación de microorganismos

ESPECTROMETRÍA DE MASAS

- Técnica analítica para determinar la composición elemental de una muestra
- El principio de MS consiste en la ionización de compuestos químicos para generar moléculas cargadas y medir su relación masa/carga (m/r)
- MALDI-TOF (Matrix Assisted Laser Desorption / Ionisation - Time of Flight), es un tipo de espectrometría de masas que permite el screening de proteínas directamente a partir de bacterias intactas

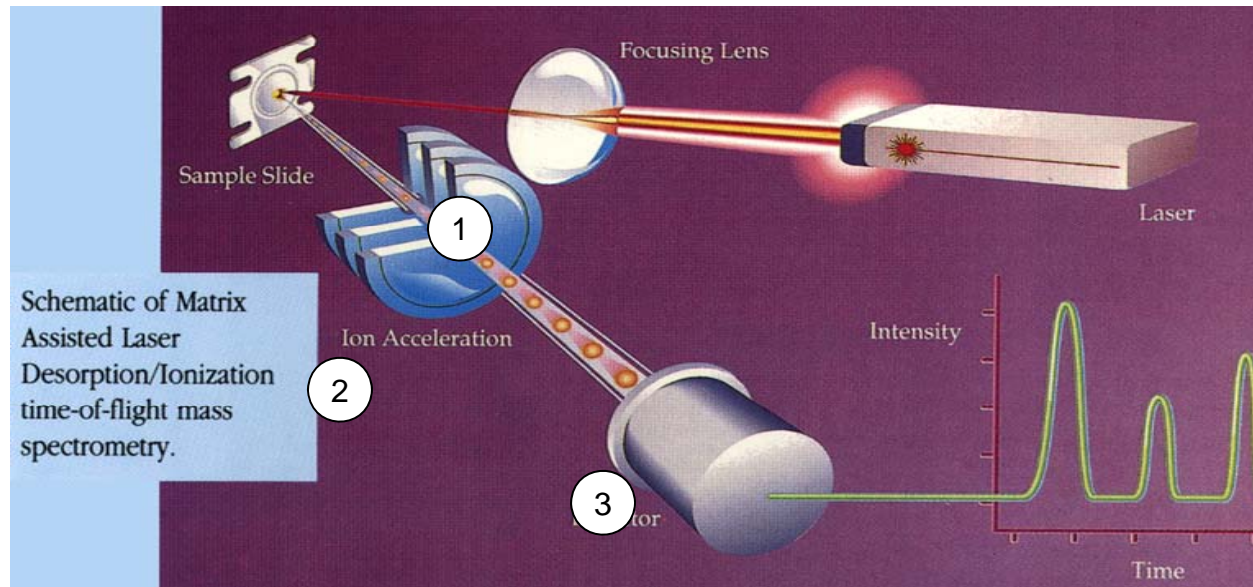
Sample →

Under Vacuum

Data
Analysis
System

- **Matrix Assisted Laser Desorption Ionization-Time Of Flight.** MALDI is the Ionization System-TOF is the Mass Analyzer system.

B I O

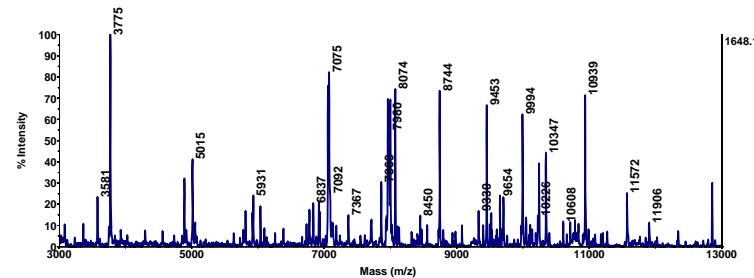
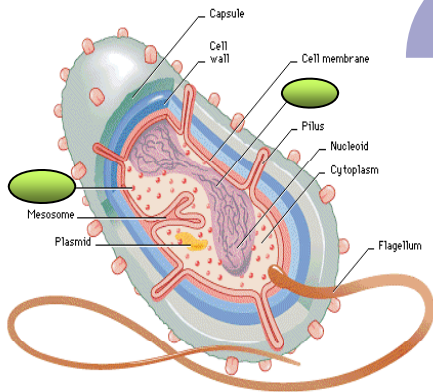
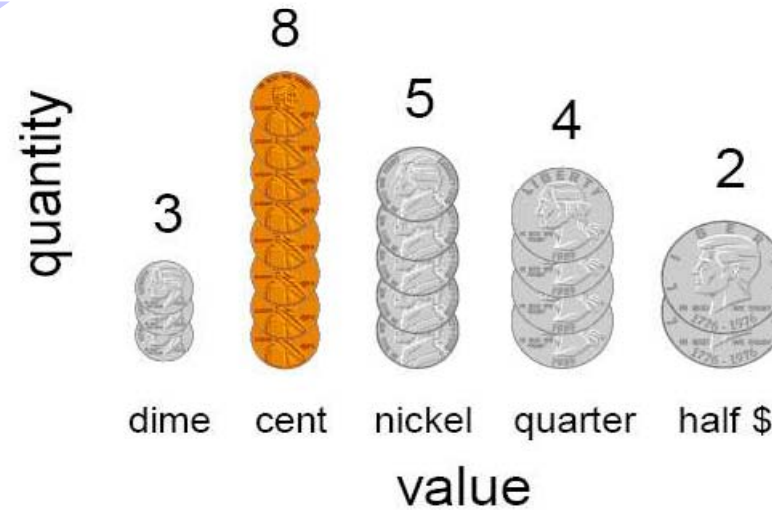


- ① Una muestra en una solución matriz absorbe energía de un haz láser. El resultado es una ionización de la muestra.
- ② Todos los iones son acelerados a la misma energía cinética, entran en el tubo y son separados de acuerdo con su masa
- ③ Detección al final del tubo



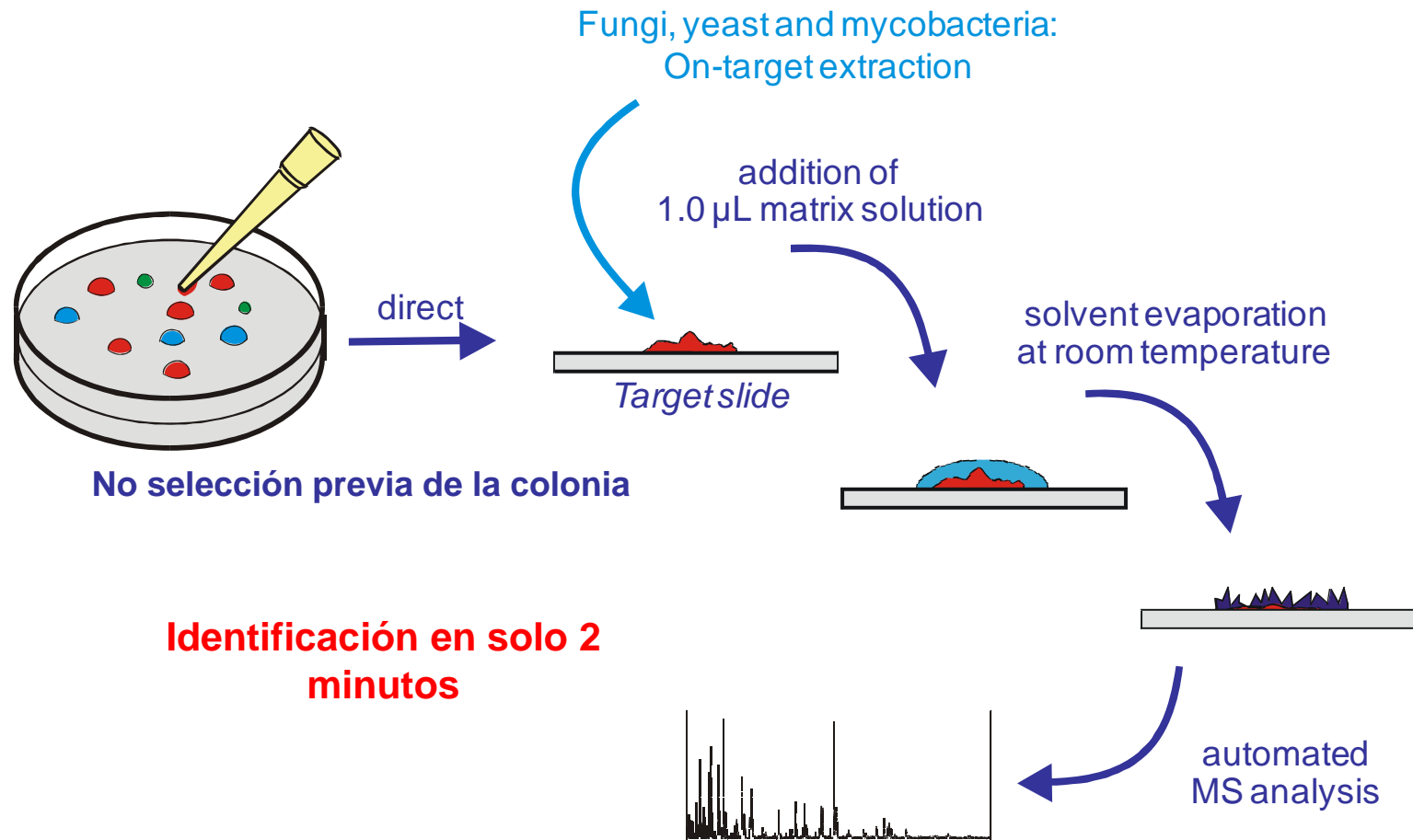
Métodos rápidos aplicados a la identificación de microorganismos

ESPECTROMETRÍA DE MASAS



Métodos rápidos aplicados a la identificación de microorganismos

ESPECTROMETRÍA DE MASAS



Métodos rápidos aplicados a la identificación de microorganismos

- VITEK MS RUO:
bioMerieux
- Maldi Biotyper: Bruker



**MUCHAS
GRACIAS POR
SU ATENCIÓN**



Ana María Fuertes Barrio
ana-maria.fuertes@biomerieux.com

