

VALIDACIÓN DE LOS PROTOCOLOS MICROKIT PARA ANÁLISIS MICROBIOLÓGICOS DE ALIMENTOS MEDIANTE LOS ENSAYOS INTERCOMPARATIVOS SEILALIMENTOS

Sanchis J.¹, Sanchez E.¹, Rook N.¹, Ajates, S.¹ y de la LLana A.¹

¹Laboratorios MICROKIT, S.L, Apdo. de correos 44, 28210-Valdemorillo (Madrid)
microkit@laboratoriosmicrokit.com

- Introducción y Objetivos

Mediante la coordinación de los servicios intercomparativos SEILALIMENTOS de microbiología alimentaria, hemos tenido el privilegio de estudiar y conocer la mayor o menor efectividad de los distintos métodos analíticos oficiales implantados en los laboratorios participantes.

El objetivo de este artículo es mostrar a todos los interesados cuales son los puntos que se demuestran más críticos en la realidad del laboratorio de control, y cuyas optimizaciones se han plasmado en su totalidad en los Protocolos MICROKIT de análisis microbiológicos de alimentos.

- Material y Métodos

Comparamos los resultados de los 100 laboratorios participantes en SEILALIMENTOS en función de los métodos y medios de cultivo que utilizaban, durante 10 años (35 servicios), 730 muestras de todo tipo (35 clases) de matrices alimentarias, para los 14 parámetros microbiológicos incluidos.

- Resultados y Discusión

En la exactitud y precisión de los parámetros cuantitativos (*Bacillus cereus*, *E.coli*, Coliformes, *Listeria monocytogenes*, *Clostridium perfringens*, *Staphylococcus aureus* coagulasa positivos, Hongos -levaduras y mohos-, Aerobios mesófilos y Enterobacterias) no se observan diferencias significativas mediante la herramienta z-scores, que se demuestra ineficaz para este tipo de estudios, al haberse observado que los recuentos de *Cl. perfringens*, Hongos y Enterobacterias son realmente conflictivos.

Sin embargo en las investigaciones cualitativas, la sensibilidad, especificidad y eficiencia demostradas en todos los parámetros comparados (*Salmonella spp.*, *Shigella spp.*, *Bacillus cereus*, *E.coli*, *E.coli* O157, *Pseudomonas aeruginosa*, *Listeria monocytogenes*, *Clostridium perfringens*, *Staphylococcus aureus* coagulasa positivos, *Staphylococcus spp.* coagulasa negativos, *Vibrio parahaemolyticus*, *Campylobacter jejuni*, Hongos -levaduras y mohos- y Enterobacterias) para el protocolo optimizado por MICROKIT es prácticamente de un 100%, mientras que en la implementación de los protocolos oficiales por parte de los laboratorios participantes se detecta una eficiencia media de un 70,90% (casi 1 falso positivo o falso negativo cada 3 análisis). Los límites de detección son a menudo inadecuados en los métodos oficiales implantados (ej.70 ufc/25 g) y se acercan mucho más a lo que resulta necesario (ej. 5 ufc/25 g), en los protocolos bien implantados y optimizados por MICROKIT.

Los alimentos demuestran así ser la matriz más complicada de cuantas conocemos, ya que en los estudios paralelos de intercomparación que ya hemos publicado de microbiología de aguas, la eficiencia se demuestra de un 80% y en los de productos cosméticos, de un 78% (casi 1 falso positivo o falso negativo de cada 5 análisis).

Achacamos la base principal de este problema a la no inactivación de los conservantes/inhibidores que contienen (añadidos, naturales o incluso desconocidos) muchos alimentos, ya que queda radicalmente optimizado en los laboratorios que, siguiendo nuestro consejo (1), han sustituido el Agua de Peptona Tamponada de la solución madre, por el caldo LPT Neutralizing Broth de MICROKIT, el mismo que se utiliza en microbiología cosmética con excelentes resultados por parte de los laboratorios que lo han implementado en sustitución del clásico Lethen Broth.

Por todo ello, los protocolos MICROKIT quedan validados como referente fundamental en microbiología de alimentos.

- Conclusiones

1-La proporción de resultados incorrectos (falsos positivos + falsos negativos) utilizando los métodos oficiales es muy elevada (29,1%), probablemente a causa de la falta de inactivación los de conservantes (conocidos o no) que hay en la mayoría de alimentos.

2-Los parámetros más conflictivos en microbiología alimentaria resultan ser:

PARÁMETRO	EFICIENCIA
1º <i>Staphylococcus aureus</i>	65 %
2º <i>Listeria monocytogenes</i>	66 %
3º Hongos (<i>levaduras y mohos</i>)	70 %
4º <i>Staphylococcus coagulasa</i> negativos	71 %
5º <i>Clostridium perfringens</i> y sus esporas	72 %
6º <i>Bacillus cereus</i>	75 %
7º <i>E.coli</i> , <i>Salmonella spp.</i> , y <i>Shigella spp.</i>	77 %
8º <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	82 %
9º <i>E.coli</i> O157	90 %

Achacamos la ineficiencia de los estafilococos a la interpretación inadecuada de la coagulasa por buena parte de los laboratorios, sobre todo los que usan RPF y prescindan de los látex.

La ineficiencia en *Listeria monocytogenes* se ha visto muy minimizada en los últimos años gracias a la implantación de la addenda 2004 de la ISO 11290, en la que se promueve el uso del medio de aislamiento diferencial Ottaviani & Agosti (en concreto, los laboratorios que usan el Agar CHROMOCYTOGENES) y la sustitución del agar-sangre.

El problema de los hongos es que la mayoría de laboratorios desatienden nuestra recomendación de agitar inmediatamente antes de cada dilución o siembra, ya que sus esporas flotan en cuestión de segundos, por lo que las alícuotas de la mitad del tubo recuperan muy poco o nada si no está recién agitado. Se ve que los recuentos son más claros y sensibles en Rosa Bengala Caf. Agar (2).

Los Clostridios, sin ser tan problemáticos como en aguas (29% de eficiencia), demuestran que la siembra en profundidad con doble capa y sin agitación/oxigenación, es imprescindible aunque se utilicen atmósferas anaeróbicas bien controladas.

Un resultado tan mediocre en el microorganismo más buscado en el mundo (*E.coli*) y en dos de los más peligrosos (*Salmonella spp.* y *Shigella spp.*) nos alerta de que los medios clásicos han sido muy mejorados por algunos de los modernos medios, sean cromogénicos (en concreto el MUGPLUS Agar (3), el Chromocult-Coliform Agar y el CHROMOSALM Agar (4)) o no (SS Broth).

3-Las matrices más conflictivas son, por orden decreciente: soja, salchichas, carne en polvo, azúcar, sal, pimentón, huevo, leche en polvo, malta, harina de pescado, leche, harina de trigo, queso, mayonesa, arroz-judías, crema de cacao, levadura, mejillones, lactosa, hamburguesas, pollo, pescado y zumos. Vemos que no es un problema específico, sino general (23 de 35, 66% de las matrices).

4-Los medios cromogénicos para recuento de aerobios en placa, en concreto PCA-cromogénico de MICROKIT y Compact-Dry-Plates®-TC de Nissui pharma, obtienen resultados más cercanos a la realidad que el clásico PCA, a causa de que las colonias, rojas, destacan sobre el color del medio y sobre las partículas de muestra, de modo que el ojo es capaz de observar más colonias de tamaño pequeño y sin cansarse. También queda validada la adición a 45°C de TTC en el PCA.

5-Se observa que la siembra en masa por inclusión en agar caliente para el recuento de aerobios es un punto crítico más importante de lo que imaginábamos, ya que numerosos laboratorios confían en su tacto y no esperan a que el medio esté suficientemente frío, impidiendo así muy a menudo el crecimiento de parte de los microorganismos presentes. Estos falsos negativos (o recuentos bajos) se demuestran, también gracias a SEILALIMENTOS, que quedan totalmente descartados con métodos más modernos de siembra en masa sin calentamiento, como las Compact-Dry-Plates®.

- Referencias Bibliográficas

- (1)- 05/1998 Sanchis, J. XI Congreso Nacional de Microbiología de los Alimentos. Pamplona Estudio Intercolaborativo entre los distintos caldos de cultivo generales.
- (2)- 05/1996 Sanchis, J. Técnicas de Laboratorio, Nº 211. Comparación entre los diversos medios comerciales para aislamiento de hongos (levaduras y mohos).
- (3)- 09/1999 Santos, C.J., Araujo, M., Gómez, M.J., Garrido, M.J. XVII Congreso de la S.E.M. Granada. Evaluación de medios de cultivo para la detección de *Escherichia coli* en aguas.
- (4)- 11/2002 Sanchis, J. Validación del medio cromogénico CHROMOSALM de MICROKIT para *Salmonella* mediante un estudio intercolaborativo. Técnicas de Laboratorio, Tomo XXV, Nº 281.