

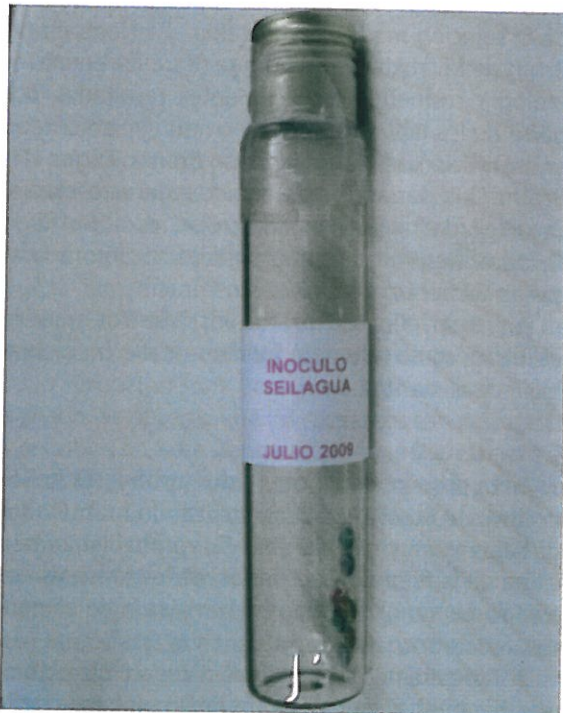


Protocolos Microkit para análisis microbiológicos de alimentos

Mediante los ensayos intercomparativos seialimentos

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

Laboratorios Microkit, S.L.



Mediante la coordinación de los servicios intercomparativos seialimentos de microbiología alimentaria, hemos tenido el privilegio de estudiar y conocer la mayor o menor efectividad de los distintos métodos analíticos, oficiales o no, implantados en los laboratorios participantes.

El objetivo de este artículo es mostrar a todos los interesados cuáles 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 y en el certificado de validación de los mismos que está disponible para todos los usuarios

Los materiales y métodos utilizados en este artículo se han realizado en base a una comparación de los resultados de los 100 laboratorios participantes en seialimentos 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 claramente que los recuentos de *Cl. perfringens*, (por su necesidad de anaerobiosis estricta), de Hongos (porque sus esporas flotan de inmediato en los caldos diluyentes) y de Enterobacterias (que a menudo obtienen recuentos aberrantemente menores que los de coliformes) son realmente conflictivos.

PUNTOS CLAVE

Muestra cuáles son los puntos más críticos en la realidad de un laboratorio de control

Los alimentos demuestran ser la matriz más complicada frente a la microbiología de otros sectores como por ejemplo las aguas, los productos cosméticos, etc

La proporción de resultados incorrectos utilizando los métodos oficiales es muy elevada, de un 29,1%

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 se imaginaba

Sin embargo en las investigaciones cualitativas, la calidad del análisis (medida mediante sus parámetros principales: sensibilidad, especificidad y eficiencia), demostrada en todos los microorganismos 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 sólo un 70,90%: casi 1 resultado erróneo (casi todos falsos negativos, algunos falsos positivos) 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 y certificado sobre microbiología de aguas, la eficiencia se demuestra de un 80% (1 falso positivo o falso negativo de cada 5 análisis) y en los de productos cosméticos, de un 78% (casi 1 falso positivo o falso negativo de cada 4 análisis).

Achacamos la base principal de este problema en análisis microbiológico de alimentos 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 o Eugon LPT Broth. Una variante más cómoda de este medio, desarrollada también por Microkit, es el Buffered Peptone Neutralizing, que ya lleva incorporado el tween 80 dentro del polvo.

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 de los conservantes (conocidos o no) que hay en la mayoría de alimentos.

2- Los parámetros más conflictivos en microbiología alimentaria resultan ser los mostrados en la tabla 1 de la página siguiente.

Achacamos la ineficiencia de los estafilococos a la interpretación inadecuada de la coagulasa por buena parte de los laboratorios que usan Baird Parker Agar, y sobre todo de los que usan Agar RPF y prescinden de los látex. La mejor opción está resultando ser la Compact-Dry-Plate-X-Sta®, al incluir medio cromogénico que no necesita yema de huevo, ni telurito, ni factores de coagulasa.

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)

PARÁMETRO	EFICIENCIA	INEFICIENCIA
1º Staphylococcus aureus	65 %	35 %
2º Listeria monocytogenes	66 %	34 %
3º Hongos (levaduras y mohos)	70 %	* 30 %
4º Staphylococcus coagulasa negativos	71 %	29 %
5º Clostridium perfringens y sus esporas	72 %	28 %
6º Bacillus cereus	75 %	25 %
7º E.coli, Salmonella spp, y Shigella spp.	77 %	23 %
8º Pseudomonas aeruginosa	82 %	18 %
9º E.coli O157	90 %	10 %

Tabla 1.- Parametros más conflictivos en microbiología alimentaria

y la sustitución del Agar Sangre por la confirmación Xylosa/Rhamnosa.

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 observa que los recuentos son más claros y sensibles en Rosa Bengala Caf. Agar (2).

Los Clostridios, sin ser tan problemáticos como en aguas (donde sólo obtienen un 29% de eficiencia a causa de la filtración-estrés), 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 Microkit 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 alimentarias).

4- Los medios cromogénicos para recuento de

aerobios en placa, en concreto PCA-cromogénico de Microkit y Compact-Dry-Plates®-TC, 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 clásico.

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 demuestra, también gracias a seilalimentos, que quedan totalmente descartados con métodos más modernos de siembra en masa sin calentamiento, como es el caso muy concreto (y no extrapolable a métodos similares) de las Compact-Dry-Plates®.

* (Referencia bibliográfica de autores)
La bibliografía completa de este artículo
puede ser solicitada en alimentacion@rbi.es