Distribuciones Biotecnológicas S.A de C.V.

3M

La Importancia de los Indicadores para el Monitoreo Ambiental Microbiano y para la Producción de Alimentos

Dr. Francisco Díez González

Profesor de Microbiología de Alimentos
y Director del Departamento de Ciencia de los Alimentos y Nutrición

Mayo 11, 2015

DEPARTMENT OF
Food Science and Nutrition

UNIVERSITY OF MINNESOTA

Distribuciones Biotecnológicas S.A de C.V.

3M

Temario

1. Definiciones
2. Tipos de indicadores
3. Criterios para el uso de indicadores
4. Métodos
5. Aplicaciones de indicadores
6. Discusión y preguntas

Distribuciones Biotecnológicas S.A de C.V.

3M

¿Qué es un indicador?

Es un microorganismo (o grupo de microorganismos) o un parametro bioquímico que ocurre en forma natural en alimentos o en el ambiente de producción de alimentos y que su presencia se usa como una medida de la calidad del alimento o de la posible presencia de otro microorganismo

Distribuciones Biotecnológicas S.A de C.V.

3M

¿Por qué se usan los indicadores?

- Metodología simple y rápida
- Dificultad para determinar microorganismos especificos
- Dificultad para cuantificar patógenos
- Relacionados con deterioración o baja calidad
- Asociados con contaminaciones en el proceso
- Norma oficial

¿Qué es un microorganismos sustituto (surrogate)?

¿Qué es un microorganismos sustituto (surrogate)?

Un microorganismo sustituto es el que se añade al alimento a propósito para estudiar sus características de crecimiento o sobrevivencia.

En contraste, los organismos indicadores ocurren naturalmente

Distribuciones Biotecnológicas S.A de C.V.

3M

Microorganismos Indicadores Relacionados on la Calidad, Vida de Anaquel

1. Cuenta aeróbica de placa (CAP), cuenta total de placa (CTP), cuenta viable total (CVT) o cuenta estándar de placa (CEP)
2. Hongos y levaduras
3. Bacterias esporuladas
4. *Pseudomonas*
5. Bacterias lácticas
6. Coliformes
7. Microorganismos psicrotróficos
8. Bacterias termodúricas
9. Bacterias anaeróbicas
10. Bacterias tolerantes a ácidos

Distribuciones Biotecnológicas S.A de C.V.

3M

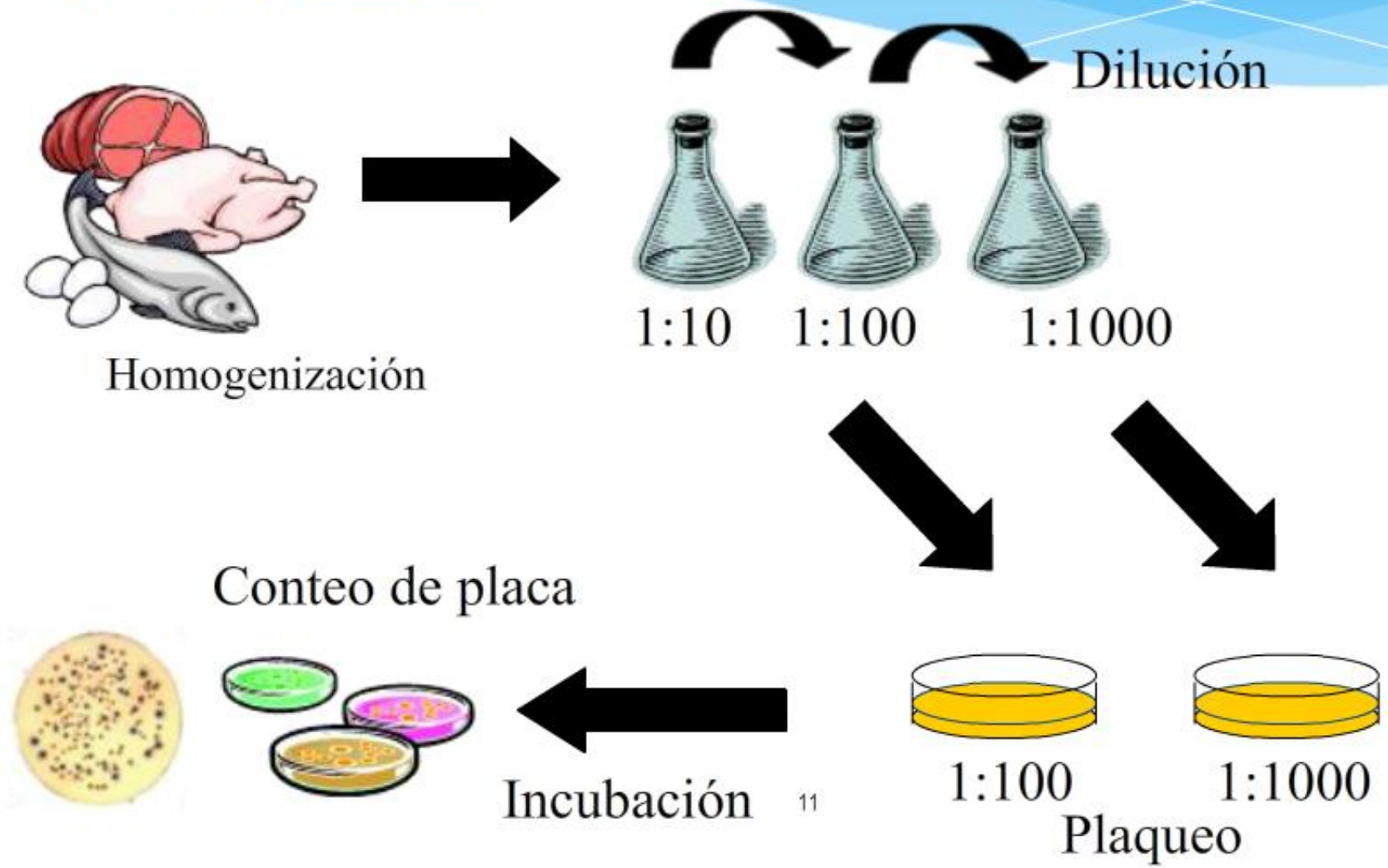
Microorganismos Indicadores Relacionados on la Calidad, Vida de Anaquel

1. Cuenta aeróbica de placa (CAP), cuenta total de placa (CTP), cuenta viable total (CVT) o o cuenta estándar de placa (CEP)

- Cuantificación de los microorganismos capaces de crecer en un medio sólido rico en nutrientes incubado en condiciones aeróbicas de 30 a 35°C por 48 horas

Cuenta aeróbica de placa

1. Procedimiento



Microorganismos Indicadores Relacionados on la Calidad, Vida de Anaquel

2. Hongos y levaduras

- Cuantificación de los microorganismos capaces de crecer en un medio sólido rico en nutrientes suplementado con cloranfenicol como ingrediente selectivo después de incubación en condiciones aeróbicas a 25°C por 5 días

Géneros representativos de microorganismos psicrotróficos

Alimento	Microorganismos
Leche pasteurizada	*Micrococcus, Enterococcus, Lactobacillus, Streptococcus, Corynebacterium, Bacillus, Pseudomonas, Alcaligenes, Flavobacterium*
Carne cruda	*Pseudomonas, Acinetobacter, Moraxella, Shewanella, Alcaligenes, Aeromonas, Escherichia, Enterobacter, Serratia, Hafnia, Proteus, Brocyhothrix, Micrococcus, Enterococcus, Listeria, Lactobacillus, Carnobacterium, Leuconostoc, Clostridium*
Eggs	*Pseudomonas, Proteus, Alcaligenes, Aeromonas*
Pescado	*Pseudomonas, Acinetobacter, Moraxella, Shewanella, Alcaligenes, Vibrio, Alteromonas, Photobacterium*
Vegetales	*Bacillus, Clostridium, Enterobacter, Erwinia, Flavobacterium, Pseudomonas, Yersinia*

Indicadores de Inocuidad Alimentaria

1. Indicadores de contaminación fecal

2. Indicadores de patógenos

Distribuciones Biotecnológicas S.A de C.V.

3M

Indicadores de Inocuidad Alimentaria

1. **Indicadores de contaminación fecal**
   a. Enterobacteria
   b. Coliformes
   c. Coliformes fecales (o termotolerantes)
   d. *Escherichia coli*
   e. *Enterococcus*
   f. Colifagos
   g. Bifidobacteria
   h. *Bacteroides*

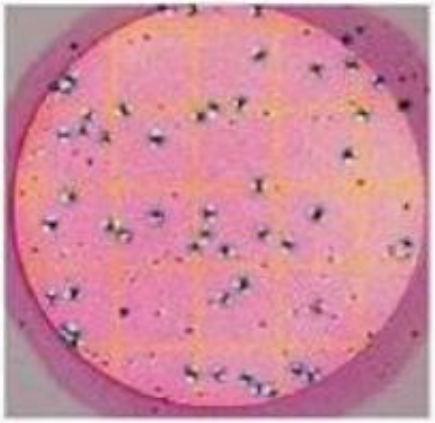
Distribuciones Biotecnológicas S.A de C.V.

3M

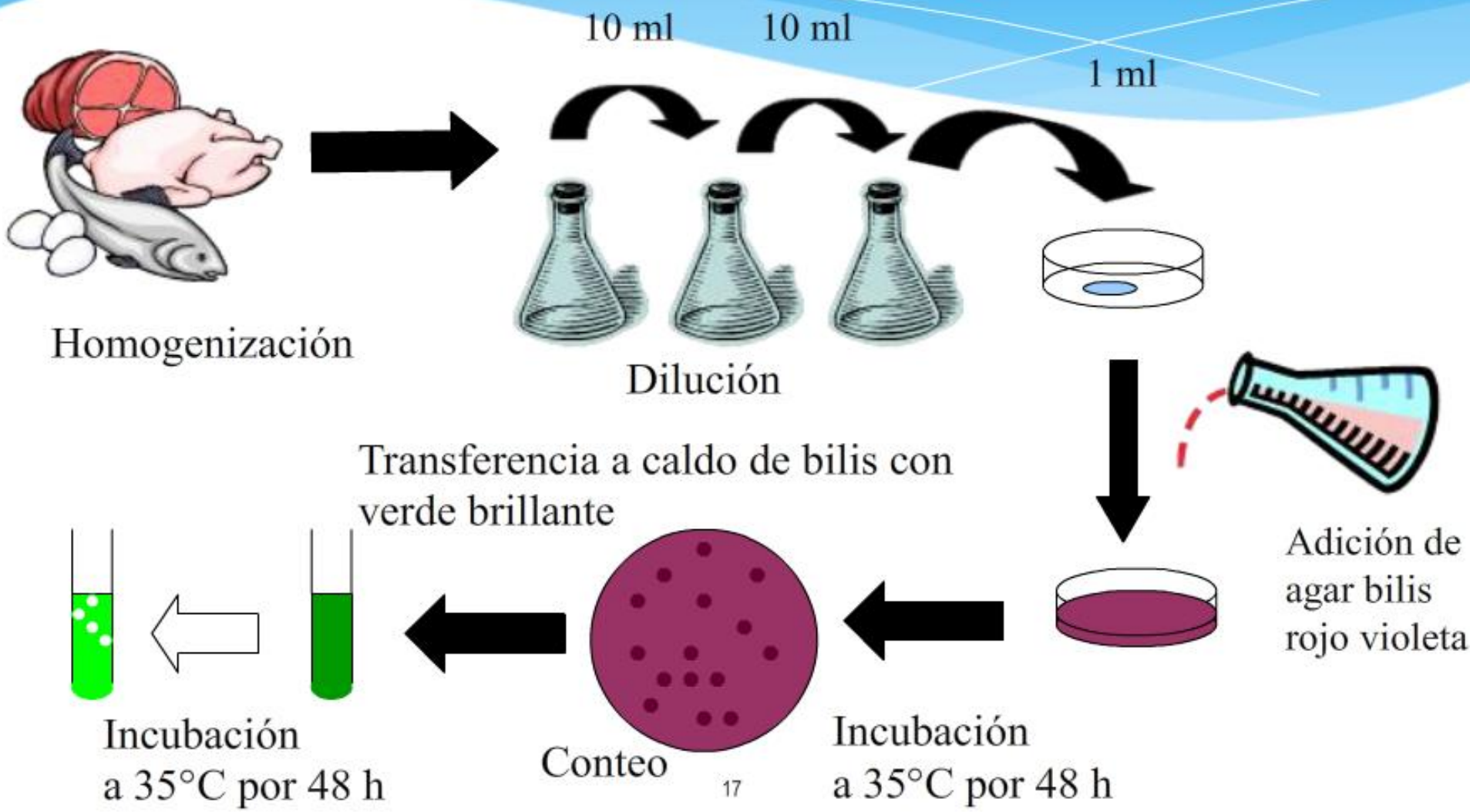
Indicadores de Inocuidad Alimentaria

1. Indicadores de contaminación fecal

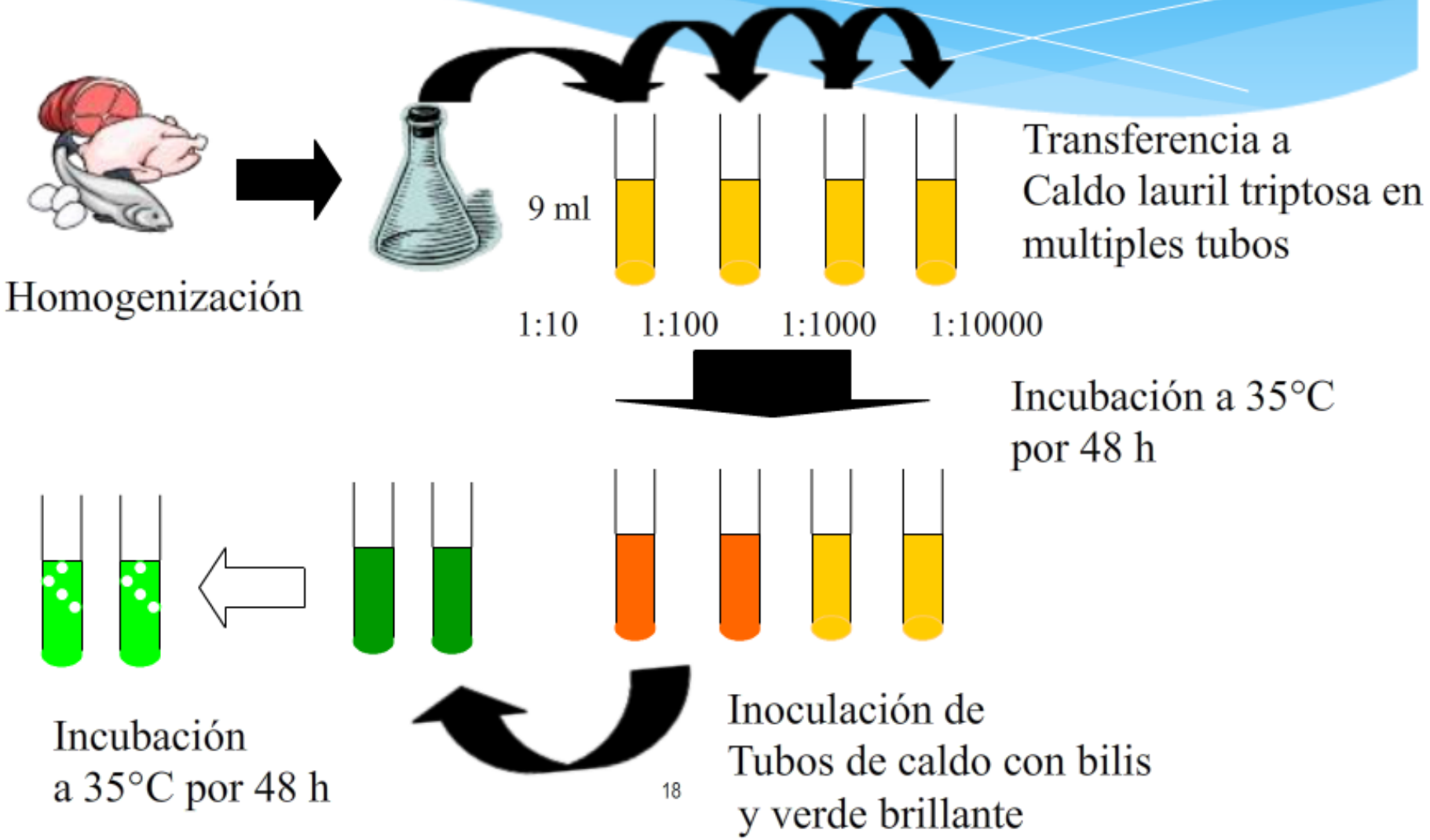
Enterobacteria
- Coliformes
  - Coliformes fecales
    - *Escherichia coli*



Coliformes – Método solido



Coliformes – Método líquido



Distribuciones Biotecnológicas S.A de C.V.

3M

Indicadores de Inocuidad Alimentaria

1. Indicadores de contaminación fecal

Coliformes fecales

Tabla 4. Distribución de coliformes fecales por medio de tres diferentes métodos.

Especies	% de todas las especies identificadas		
		Placas m-FC	
	Caldo EC	Azul pálido	Azul oscuro
Escherichia coli	81	64	79
Klebsiella pneumoniae	9	13	10
Klebsiella oxytoca	8	18	9
Enterobacter cloacae	1	3	1
Citrobacter diversus	1	2	1

Tomado de Edberg y col. (2000)

Distribuciones Biotecnológicas S.A de C.V.

3M

Indicadores de Inocuidad Alimentaria

2. Indicadores de patógenos

a. *Escherichia coli*

b. *Listeria spp.*

c. *Staphylococcus spp.*

Consideraciones generales del indicador ideal

a. El indicador microbiano debe de encontrarse y detectarse en todos los alimentos en los que la calidad se va a verificar.
b. Su presencia indica el potencial de deterioración o fallas en el proceso.
c. Fácilmente detectable y cuantificable
d. Fácil de distinguir de otros organismos presentes en el mismo alimento.
e. Su cuantificación debe de lograrse relativamente rápido, en no más de un día

Distribuciones Biotecnológicas S.A de C.V.

3M

Consideraciones generales del indicador ideal

f. Su crecimiento no debe de ser inhibido por componentes del alimento
g. Su capacidad de sobrevivir es similar al organismo responsable de la deterioración
h. Su velocidad de crecimiento es igual o más rápida que el microorganismo que afecta la calidad directamente
i. Sus características son estables
j. Los resultados se pueden aplicar al control de procesos
k. Existe una correlación entre los resultados cuantitativos del indicador microbiano y los del microorganismo objeto de control

Consideraciones adicionales para indicadores de patógenos

a. Debe de estar presente en el alimento cuando el patógeno esté presente
b. Ser un organismo que su cuenta esté directamente relacionada con la población del patógeno
c. Tener características de crecimiento similares a las del patógeno
d. Tener una supervivencia similar o ligeramente superior a la del patógeno
e. No encontrarse en los alimentos en los que no se encuentre el patógeno normalmente

Distribuciones Biotecnológicas S.A de C.V.

3M

Tipos de análisis

a. Bioquímicos

b. Cultivos microbiológicos
   a. Tradicionales
      a. Agar
      b. Medio liquido
   b. Medios sólido alternativos de uso fácil
   c. Automatizados

c. Cultivos combinados con pruebas bioquímicas

Distribuciones Biotecnológicas S.A de C.V.

3M

Criterios para la Selección de Métodos Microbiológicos

1. Exactitud
2. Sensibilidad y limite de detección
3. Confiable
4. Precisión: repetitividad y reproducibilidad
5. Fácil de implementarse
6. Costo
    1. Inversión en equipo
    2. Materiales y mano de obra de operación
7. Rapidez
8. Método oficial o validado
9. Ecológico o sustentable

Distribuciones Biotecnológicas S.A de C.V.

3M

Criterios para seleccionar los métodos microbiológicos

- Métodos estándar
  - AOACI
  - AALA
  - GFSI
  - ISO22000
  - BRC
- Métodos basados en datos científicos - ICMSF
- Métodos aceptados por la industria
- Métodos internos

Distribuciones Biotecnológicas S.A de C.V.

3M

Métodos bioquímicos

- Bioluminiscencia
  - Usada para monitoreo ambiental
  - Detecta el ATP de cualquier organismo vivo (residuo biológico) – amplio espectro
  - Resultado inmediato
  - Respuesta inmediata
  - Detecta ATP total no solo microbiano
  - No especifico

Distribuciones Biotecnológicas S.A de C.V.

3M

Métodos microbiologicos

a. Cultivos microbiológicos
   a. Tradicionales
      a. Agar
      b. Medio liquido
   b. Medios sólido alternativos de uso fácil
   c. Automatizados

b. Cultivos combinados con pruebas bioquímicas

Distribuciones Biotecnológicas S.A de C.V.

3M

Métodos de cultivo tradicionales

- Principio: detectar a microorganismos capaces de crecer en condiciones de laboratorio
- Detecta únicamente células viables
- Medios de cultivos líquidos y sólidos
- Determinado visualmente
- Requeridos legalmente

Métodos de cultivo tradicionales - Limitaciones

1. Toman mucho tiempo
2. Requieren preparación
3. Requieren mano de obra
4. Se asume que una célula forma una colonia
5. No detecta organismos no cultivables
6. Generan mucho desperdicio

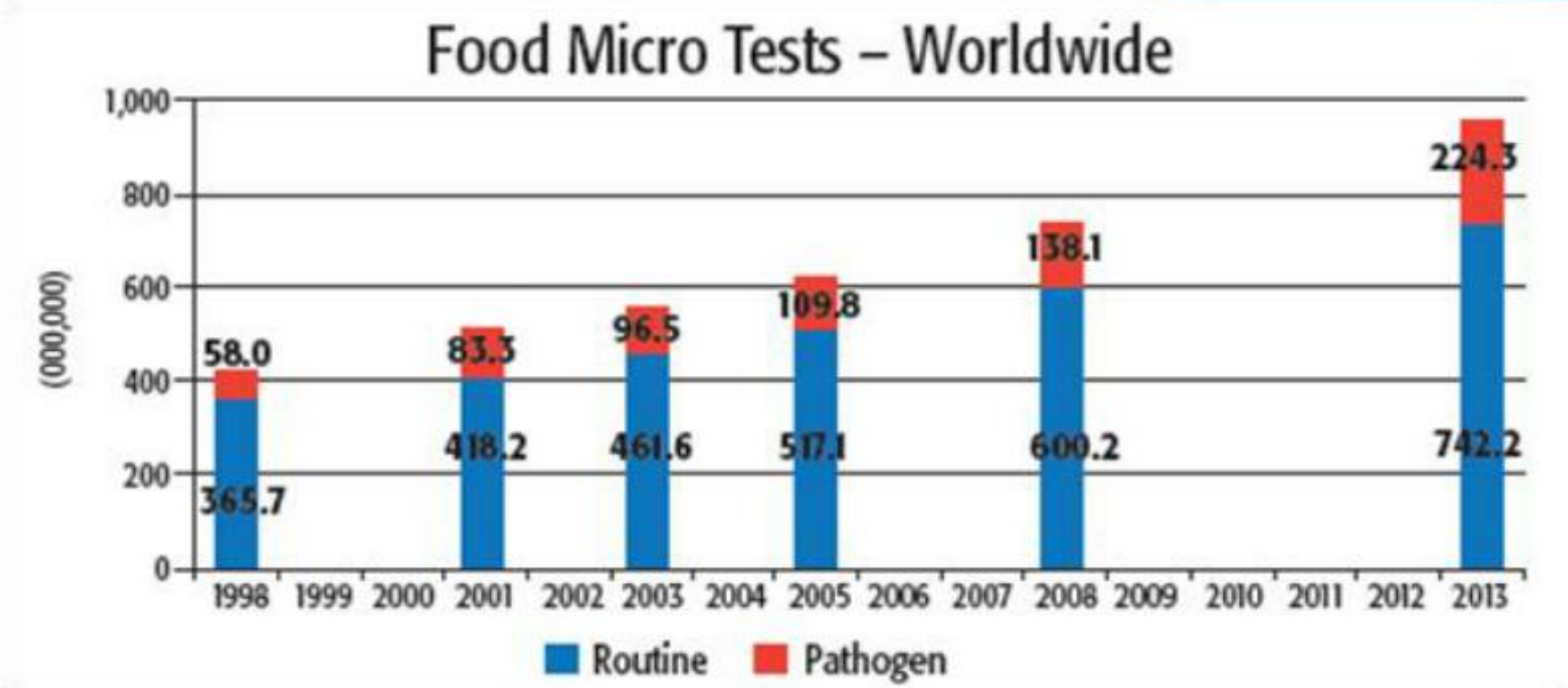
http://www.microbiol.unimelb.edu.au/images/Media08.JPG

Métodos de cultivo tradicionales - Tendencias

1. Tiempo de respuesta menor
2. Reducción de mano de obra
3. Simplificación
4. Costo-efectivos
5. Instrumentación
6. Exactitud
7. Correlación con microorganismo de interés

http://www.microbiol.unimelb.edu.au/images/Media08.JPG

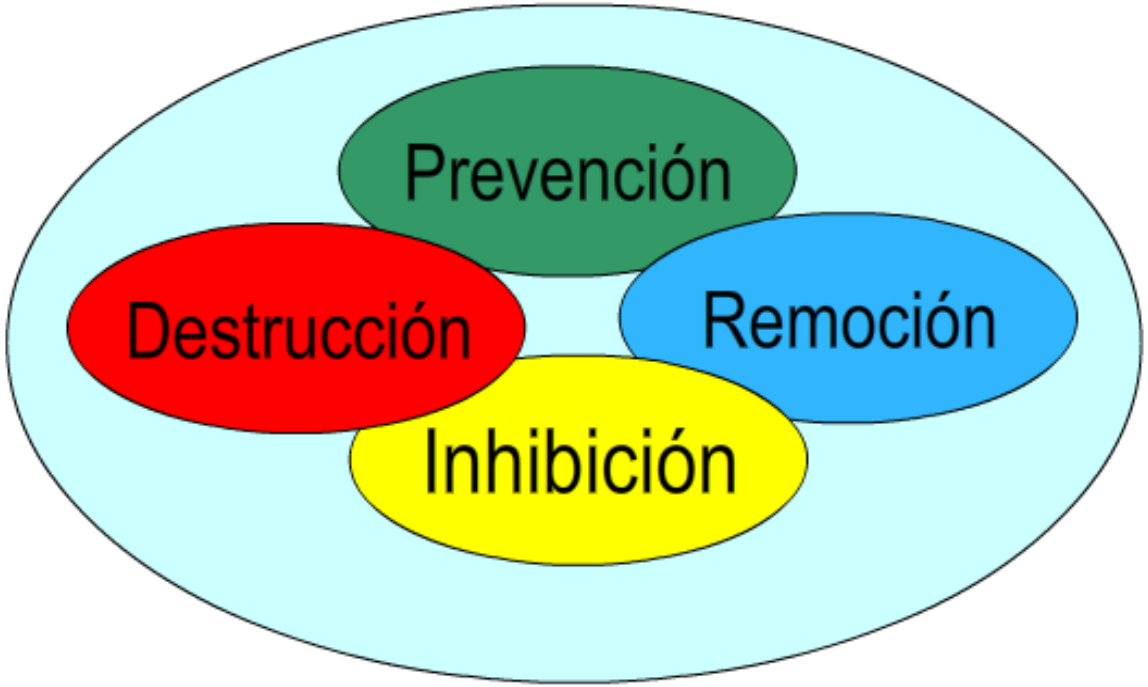
Incidencia del uso de indicadores microbiologicos en el mundo



Weschler, 2013

Estrategias Generales de Control

- Monitoreo microbiológico y ambiental como estrategia de verificación de control global



Distribuciones Biotecnológicas S.A de C.V.

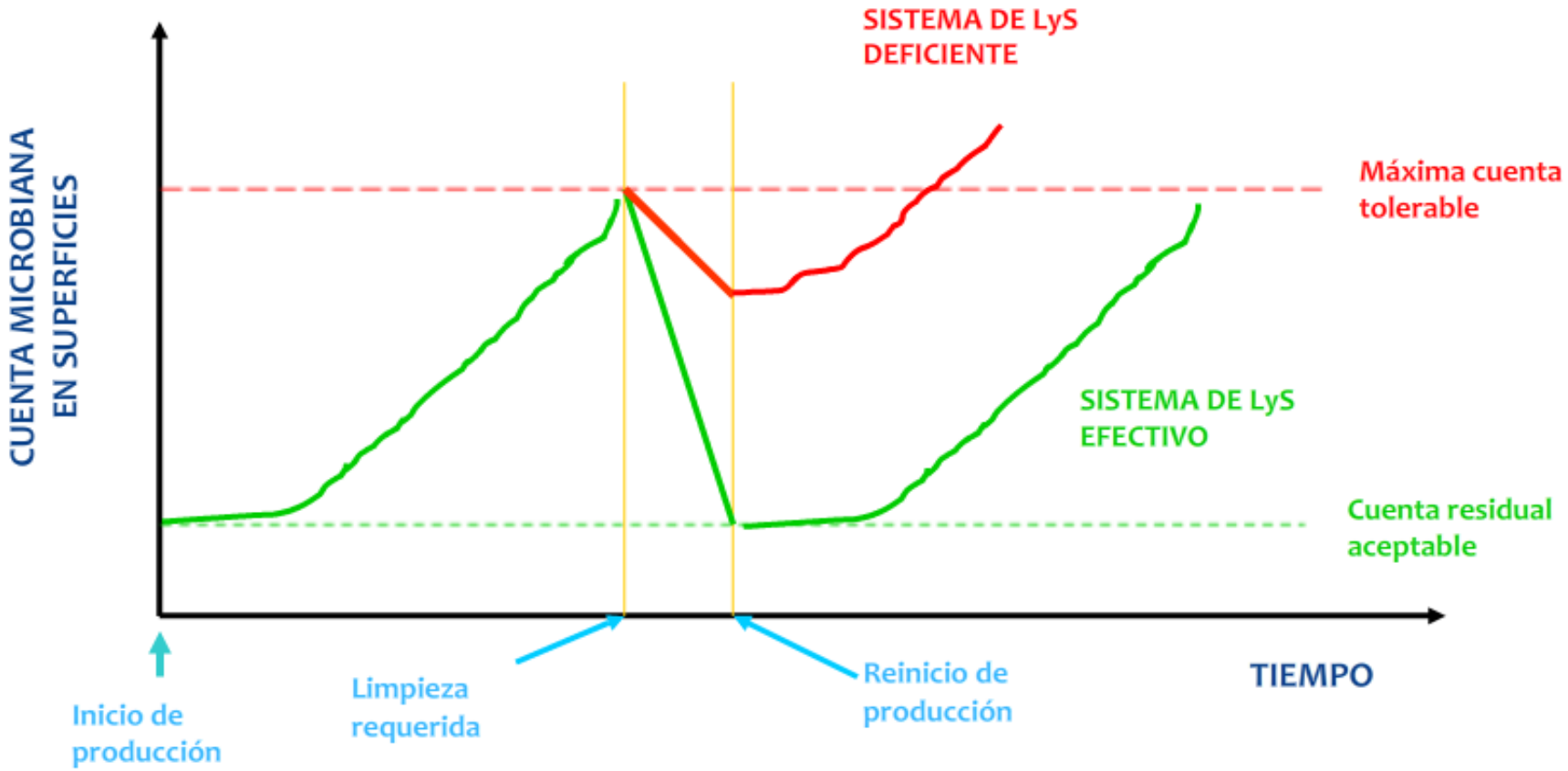
3M

Puntos críticos de la aplicación de determinación de indicadores

1. Materias primas
   * Verificación de certificados de análisis
2. Medio ambiente de la planta
   * Áreas en contacto con el alimento
   * Zonas de planta sin contacto con el alimento
3. Producto terminado

Monitoreo Ambiental

Importancia del monitoreo



Zonas de Monitoreo Ambiental

Zona 1 –
En contacto con el alimento

Zona 2 –
Cercanas al producto

Zona 3 –
Superficies alejadas del producto pero en el área de producción

Zona 4 –
Superficies fuera dell área de producción

Criterios Fundamentales para Selección de Plan de Muestreo (ICMSF)

	Condiciones típicas de manejo del alimento después de muestrear		
Agente	Se reduce	No cambia	Se aumenta
Deterioración (n=5)	Caso 1 (c=3)	Caso 2 (c=2)	Caso 3 (c=1)
Indicador (n=5)	Caso 4 (c=3)	Caso 5 (c=2)	Caso 6 (c=1)
Riesgo moderado	Caso 7 (n= 5, c=2)	Caso 8 (n=5, c=1)	Caso 9 (n=10, c=1)
Riesgo serio (c=0)	Caso 10 (n=5)	Caso 11 (n=10)	Caso 12 (n=20)
Riesgo severo (c=0)	Caso 13 (n=15)	Caso 14 (n=30)	Caso 15 (n=60)

Distribuciones Biotecnológicas S.A de C.V.

3M

Tipos de Datos de Indicadores

- Cuantitativo
  - Limites cuantitativos
    - Microorganismos indicadores
    - Bioluminiscencia
- Cualitativo
  - La mayoría para patógenos
  - Limites de detección
    - Presencia/ausencia
    - Positivo/negativo

Distribuciones Biotecnológicas S.A de C.V.

3M

Bioluminiscencia

* Límites de unidades de luz relativas de aceptación/rechazo

1. Aceptación: no se requiere ninguna acción
2. Precaución
   * Área de bajo riesgo – aumente la frecuencia de muestreo
   * Área de alto riesgo - repetir limpieza, sanitización y muestreo
3. Rechazo: tomar acción y repetir muestreo

Bioluminiscencia

* Opciones para establecer límites de ULR de aceptación/rechazo

1. Uso de tablas de referencia

Ejemplo	Límite de aceptación	Rango de precaución	Límite de rechazo
1	100	101-199	200
2	150	151-299	300
3	200	201-399	400
4	250	251-499	500
5	300	301-599	600
6	400	401-799	800

Distribuciones Biotecnológicas S.A de C.V.

3M

Datos Microbiológicos

- Cuantitativo
  - Unidades formadoras de colonias (UFC)
    - UFC por gramo
    - UFC por esponja
    - UFC por cm2
    - UFC por hisopo
- Cualitativo
  - Negativo por 25 g
  - Negativo por gramo
  - Negativo por 325 g

Distribuciones Biotecnológicas S.A de C.V.

3M

Ejemplo de Limites Microbiológicos

Microorganismo	Criterio	Limites antes de sanitización (UFC/hisopo)	Limites después de sanitización (UFC/hisopo)
Cuenta aeróbica de placa	Ideal	< 100	< 10
	Aceptación	< 500	< 100
	Rechazo	> 500	> 100
Coliformes	Ideal	< 10	< 10
	Aceptación	< 100	< 50
	Rechazo	> 100	> 50

Ejemplo de Criterios Microbiologicos: Mariscos congelados crudos

Microorganismo	Método	n	c	Limite por g m	Limite por g M
CAP	ISO 4833	5	2	5×10^5	10^7
Escherichia coli	ISO 11866	5	2	11	500

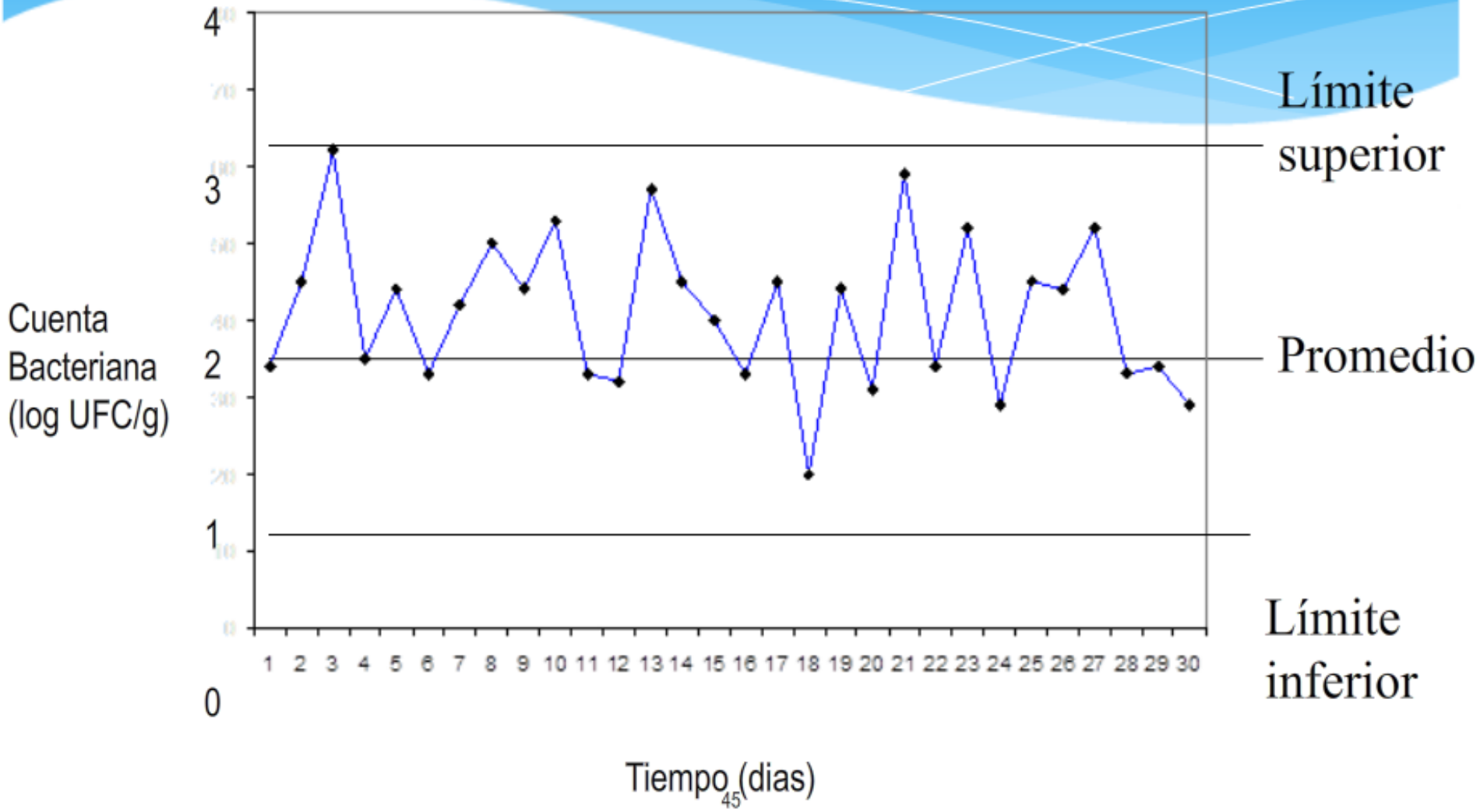
ICMSF 2002. Microorganisms in Foods 7. Microbiological Testing in Food Safety Management. Kluwer Academic, New York

Ejemplo de Criterios Microbiologicos: Productos de huevo pasteurizado, liquido, congelado o seco

Microorganismo	Método	n	c	Limite por g m	Limite por g M
CAP	ISO 4833	5	2	5×10^4	10^6
Coliformes	ISO 4831	5	2	10^1	10^3

ICMSF, 2002

Ejemplo de Limites Microbiológicos



Optimizacion de numero de muestras en monitoreo con indicadores

- Datos históricos
- Tendencias observadas
- Introducción de nuevos procesos
- Incorporación de nuevos ingredientes

Distribuciones Biotecnológicas S.A de C.V.

3M

Resumen

1. Uso de indicadores es de alta utilidad

2. Indicadores pueden usarse para control de la calidad y para la inocuidad alimentaria

3. Es importante considerar los múltiples factores para seleccionar los indicadores adecuados

Distribuciones Biotecnológicas S.A de C.V.

3M

Resumen

4. La selección de los métodos de detección es critico para otros programas de la calidad y de control de inocuidad

5. Métodos mas rápidos y de bajo costo de operación son posiblemente las tendencias de nuevos métodos de determinación de indicadores

6. Indicadores proporcionan información para decidir acciones correctivas

Preguntas

¡Muchisímas gracias por su atención!

Distribuciones Biotecnológicas S.A de C.V.

3M