

NORMALIZACIÓN EN MICROBIOLOGÍA DE ALIMENTOS: ACTUALIZACIÓN Y PRÓXIMAS NORMAS ISO

David Tomás Fornés (dtomas@ainia.es). Ainia Centro Tecnológico.
Coordinador del Grupo de Trabajo en Normalización de Microbiología de alimentos
AEN/CTN34/WG4/GT6

1.- Introducción

El desarrollo e implantación de métodos normalizados en los laboratorios de microbiología de alimentos permite disponer de métodos de ensayo reconocidos internacionalmente, así como la garantía de que los resultados obtenidos sean comparables y fiables, siendo el objetivo último garantizar la calidad y sobre todo la seguridad de los alimentos sometidos a control, jugando por tanto un importante papel tanto en el sector económico como social.

Este papel se ve reconocido al ser contemplados como métodos de referencia tanto en la actual legislación europea, según se indica en el Reglamento UE 2073/2005 (y sus posteriores modificaciones) relativo a los criterios microbiológicos aplicables a los productos alimenticios, como por los organismos de acreditación responsables de garantizar la competencia técnica de los laboratorios como en el caso de Nota Técnica 32 sobre análisis microbiológico publicada por la Entidad Nacional de Acreditación (ENAC)

Este trabajo de normalización lleva asociado un largo proceso de investigación y desarrollo de nuevos métodos, así como su posterior evaluación, armonización, adaptación y aprobación que no se podría llevar a cabo sin la voluntad y esfuerzo de un gran número de personas e instituciones que colaboran, en muchas ocasiones sin ningún ánimo de lucro, en diferentes grupos de trabajo y comités que, coordinados por los respectivos organismos de normalización nacionales e internacionales, contempla la elaboración de borradores de trabajo, consulta de documentos científicos, obtención de resultados experimentales en laboratorios, etc... todo ello uniendo el trabajo de expertos técnicos que desarrollan sus carreras profesionales en el ámbito de las agencias de seguridad alimentaria así como en la salud pública, laboratorios de referencia, universidades, centros tecnológicos, laboratorios públicos y privados, compañías de diagnóstico, de equipamiento, de medios de cultivo, etc...

En los últimos años, un aspecto clave en el desarrollo de normas es que éstas deben mostrar un equilibrio entre el rigor científico de las mismas y su practicabilidad o uso por parte de los laboratorios de control, de forma que se potenciara su uso en análisis de rutina, tendiendo a la máxima simplicidad y economía de medios así como evitando el empleo de conocimientos cuya propiedad intelectual esté protegida, al objeto de facilitar su empleo a nivel mundial, incluyendo áreas geográficas donde puede existir un escaso desarrollo tecnológico.

A pesar de lo indicado anteriormente, la normalización no da la espalda a las nuevas tecnologías, siendo un ejemplo las guías para la correcta aplicación de métodos basados en la PCR, así como las normas recientemente publicadas para la detección de algunos patógenos emergentes mediante métodos moleculares. También es importante considerar que el desarrollo de métodos rápidos supone de forma implícita en muchos casos la necesidad de disponer de un método normalizado frente al que comparar el método alternativo para garantizar la equivalencia entre ambos, convirtiéndose pues el método normalizado en un "gold standard" o método de referencia frente al cual las distintas empresas de diagnóstico y los organismos de certificación de métodos alternativos (AFNOR, Microval, Nordval, AOAC) deben comparar los resultados para garantizar a los usuarios finales la validez de los mismos y su posible uso en el ámbito del control de alimentos.

No debemos olvidar que en lo referente a los métodos normalizados "son todos los que están, pero no están todos los que son" dado que los propios avances técnicos unidos a la aparición de nuevos riesgos y a la experiencia acumulada en la implantación de las normas en vigor, implican el desarrollo de nuevas normas y la continua revisión y actualización de las existentes, tarea que sigue realizándose sistemáticamente y que permite garantizar la vigencia y adecuación de las mismas.

En la actualidad, los métodos más ampliamente desarrollados en Europa son los métodos propuestos por el Comité Europeo de Normalización (CEN) en estrecha colaboración con la Organización Internacional de Normalización (ISO) donde existen más de 30 grupos de trabajo para el desarrollo de normas y participan activamente más de 20 países y

organismos internacionales. Fruto de el trabajo de estos grupos, podemos disponer de más de 75 normas reconocidas internacionalmente, incluyendo las actualizaciones y nuevos proyectos de normas, que pueden consultarse en la página web de ISO (http://www.iso.org/iso/home/standards_development/list_of_iso_technical_committees/iso_technical_committee.htm?commid=47920)

A continuación se refleja a modo de resumen un repaso sobre los principales aspectos técnicos que se están debatiendo y modificando en el seno de los Grupos de Trabajo de los Comites ISO y CEN.

!!!NOTA IMPORTANTE: LOS ASPECTOS DESCRITOS A CONTINUACIÓN SON UN EXTRACTO DE REUNIONES Y DOCUMENTOS DE TRABAJO SOMETIDOS A DEBATE Y POR TANTO SIN VALIDEZ NORMATIVA Y SUJETOS A CAMBIOS EN EL PROCESO DE NORMALIZACIÓN!!!

2.- Guías y Normas de carácter horizontal

Entre las guías y normas de carácter horizontal (que aplican en general a los diferentes métodos de análisis de determinados microorganismos), podemos citar las siguientes normas en desarrollo o actualizaciones:

Guía general para análisis microbiológicos (ISO 7218): Se trata de una norma de mucha extensión que cubre prácticamente todos los aspectos relacionados con la realización de análisis microbiológicos, incluyendo requisitos de instalaciones, personal, equipos, preparación de material, análisis cualitativos y cuantitativos, pruebas de confirmación, expresión de resultados, así como varios anexos.

La norma en su edición en vigor se publicó en 2007 y en el mes de agosto de 2013 se ha publicado una completa corrección de la misma que afecta a casi la mitad de sus contenidos en los siguientes términos:

- **Equipos:** Se amplía la tolerancia en las balanzas hasta un 5% de la pesada de muestra. En autoclaves, se indica que en caso de no disponer de un registro de temperaturas, al menos en cada ciclo se debe incluir un indicador de esterilidad en el centro de la carga para garantizar el proceso de calentamiento. Se incluye el empleo de diferentes sistemas de siembra en espiral. En lo concierne a los termómetros, se reemplaza la incertidumbre por la resolución del termómetro cuando se habla de que esta debe ser de ¼ del error máximo permisible del equipo que va a controlar.
- **Expresión de resultados:** Se amplía y clarifica el modo de expresión de resultados tanto en el caso de recuento de colonias como en las técnicas de NMP,. Se corrige los errores de la fórmula de recuento en el caso de la siembra de una única dilución, así como en el caso de siembra de 2 placas por dilución. Se incluye una nota acerca de la posible dispersión para el control de un adecuado factor de dilución.
- **Anexos:** Se incluyen anexos para estimar los intervalos de confianza de los recuentos, tablas para estimación del NMP incluyendo una acceso a una página Excel para su estimación (<http://www.fda.gov/food/foodscienceresearch/laboratorymethods/ucm109656.htm>) y recuento de 2 placas por dilución.

Preparación de muestras: Se está revisando la serie de normas ISO 6887, principalmente las partes 1 a 4 que incluyen diferentes partes de la Norma, como son:

ISO 6887-1	Reglas Generales para la preparación de la dilución madre y diluciones decimales	ISO 6887-4	Reglas específicas para la preparación de productos diferentes a la leche y productos lácteos, carne y productos cárnicos y pescado y productos de la pesca
ISO 6887-2	Reglas específicas para preparación de carne y productos cárnicos	ISO 6887-5	Reglas específicas para leche y productos lácteos

ISO 6887-3	Reglas específicas para preparación de pescado y productos de la pesca	ISO 6887-6	Reglas específicas para preparación de muestras procedentes de producción primaria.
-------------------	--	-------------------	---

Una de las modificaciones a mi juicio más importante de esta sería de normas y que afectará a todos los métodos de ensayo, es el **tamaño de muestra** objeto de análisis, dado que aunque en la mayoría de los métodos de ensayo no se establece un tamaño de muestra, en los casos de técnicas de investigación, los métodos están diseñados y validados para el análisis de muestras de 25g (que son las que habitualmente indica la legislación). En este sentido, es necesario pues que los laboratorios que deseen analizar otro tamaño de muestra verifiquen internamente el funcionamiento del método. También se va a avanzar en el estudio de la influencia de la cantidad de muestra que se debe tomar de un alimento (por ejemplo en función de su homogeneidad, número de unidades, etc...) para realizar un recuento, de forma que dicha cantidad de muestra sea representativa de la microflora presente en el mismo y por tanto refleje un resultado lo más ajustado a la realidad de la muestra recibida por el laboratorio. En la próxima ISO 6887-1 de preparación de muestras se incluirá un comentario relativo a este aspecto.

ISO 18593. Toma de muestras en superficies por placas de contacto e hisopos. Se va a proceder a describir con más detalle el equipamiento necesario, los neutralizantes que se deben emplear para la toma de superficies en la industria alimentaria y la forma de expresar los resultados.

ISO 11133: Medios de cultivo. Se van a juntar las dos partes actuales en una única norma que cubra todos los aspectos relacionados con la preparación, producción almacenamiento y coprobación del funcionamiento de medios de cultivo. La norma será aplicable tanto a alimentos como a aguas.

Homogeneización de criterios: Se reconoce la necesidad de homogeneizar tiempos de incubación, temperaturas y tolerancias, pH, así como otros aspectos horizontales que se afectan a varios métodos, incluyendo los métodos empleados en análisis de aguas. Por ejemplo, en el caso de la temperatura de pre-enriquecimiento, se va a aceptar la incubación en un rango de entre 34 y 38°C.

Aspectos generales: De forma general, existen algunas propuestas como la de modificar el título genérico de las normas "*Microbiología de los alimentos para consumo humano y alimentación animal*", por un título más amplio como "*Microbiología de la cadena alimentaria*", así como homogeneizar la nomenclatura de los microorganismos acorde a lo descrito en el documento (<http://www.bacterio.cict.fr/code.html>.)

Expresión de resultados: En los futuros métodos de ensayo, se modificará la expresión "presencia/ausencia en Xg de muestra" por la expresión "Detectado/no detectado en Xg de muestra". Este cambio en las normas será comunicado a los organismos responsables de la gestión de riesgos para que se tenga en cuenta (Ejm. a la hora de publicar criterios microbiológicos)

Validación de métodos analíticos: La ISO 16140 para la validación de métodos alternativos se va a dividir en al menos 4 partes y una nueva norma:

- **ISO 16140-1: Definiciones.**
- **ISO 16140-2: Validación de métodos alternativos,** que es la norma que emplean los organismos de certificación para garantizar equivalencia entre los métodos alternativos y los métodos de referencia.
- **ISO 16140-3: Validación interna,** en la que se está desarrollando un protocolo para poder validar un método cuando no se dispone de un método de referencia con el que realizar la equivalencia.
- **ISO 16140-4: Verificación de métodos.** Norma de gran utilidad para los laboratorios de control de calidad, dado que permitirá disponer de un procedimiento con el que los laboratorios que empleen un método de referencia o alternativo puedan demostrar que han implantado adecuadamente el método y pueden obtener resultados válidos sin necesidad de realizar una validación completa del método (acorde a lo que establecen la ISO 17025 o la NT-32 de ENAC)

También y de modo adicional, se ha está desarrollando una Norma específica (ISO 17468) donde se describen los Requisitos técnicos para el desarrollo y revisión de métodos normalizados.

Por último y en lo relativo a validación de métodos alternativos, se está estudiando la posibilidad de desarrollar una parte específica para la validación de las pruebas de confirmación mediante métodos alternativos y posteriormente contemplar la validación de nuevas técnicas de identificación de microorganismos.

3.- Revisión de Normas en vigor

Como se ha indicado anteriormente, los métodos publicados están sometidos a una continua revisión, bien debido a que se han detectado limitaciones o carencias en los mismos, bien para proceder a la incorporación de avances técnicos. Esta revisión se realiza como máximo cada 4 años y en la actualidad, las nuevas normas o modificaciones más importantes son las que afectan a los siguientes métodos:

La principales modificaciones y revisiones de los métodos en vigor son las siguientes:

ISO 4833 Recuento de aerobios mesófilos se han publicado en agosto de 2013 dividiendo la norma en dos partes:

- ISO 4833-1 recuento en profundidad, aplicable a bajos recuentos o alimentos que pueden contener colonias invasivas.
- ISO 4833-2, de recuento en superficie, aplicable a productos que contienen microorganismos sensibles al choque térmico (deshidratados, congelados...) microorganismos estrictamente aerobicos (ejm *Pseudomonas*), donde se pueden producir pequeñas partículas o el color puede interferir en el recuento o donde se requieran identificar las distintas morfologías de colonias.

ISO 16649. *E. coli* β -glucuronidasa positivo: Se revisan la parte 1 y 2, contemplando la actualización de tipos de membranas, cepas de referencia, así como se estudia la posibilidad de emplear una etapa de resucitación, puesto que el carácter tan selectivo del medio de cultivo empleado (TBX) puede provocar bajas recuperaciones en alimentos en los que las células hayan sufrido un estrés, así como también la posibilidad de realizar opcionalmente una siembra en superficie en lugar de únicamente en profundidad. En la parte 3 se incluye la posibilidad de realizar un recuento por NMP o bien la detección.

ISO 6579. *Salmonella* spp. Se ha dividido la Norma en 3 partes:

- **ISO 6579-1: Investigación de *Salmonella* spp.,** incluyendo en la nueva norma la parte destinada al análisis de heces y muestras de producción primaria mediante RVSSM, incluyendo las limitaciones del mismo, ligadas a la recuperación únicamente de cepas con movilidad positiva, así como mantener el valor de pH del MKTTn en 8,0 y adecuar y simplificar las pruebas bioquímicas y serológicas de confirmación vigentes.
- **ISO 6579-2: Recuento de *Salmonella* spp.** Técnica que si bien es escasamente empleada determinadas zonas del mundo como Europa o EEUU, está siendo aplicada en países con una lata incidencia de *Salmonella* para poder garantizar necesidades básicas de alimentación. Se basa en el empleo de una técnica de NMP donde el enriquecimiento se realiza en agar RVSSM.
- **ISO 6579-3: Serotipado de *Salmonella* spp.** basada en el White-Kauffman-Le Minor. Al respecto de esta norma que se publicará en 2013, es posible que en un futuro se realice una modificación incluyendo un anexo para la identificación por PCR de las cepas de *S. Typhimurium* monofásicas.

ISO 21527. Recuento de mohos y levaduras: Se va a intentar refundir de nuevo el método en una única parte, armonizando su contenido con el actual método de la IDF y el publicado por la FDA en el Bacteriological Analytical Manual.

ISO 7932. Recuento de *B. cereus*. El método en esencia no va a cambiar, pero dados los problemas detectados por la posibilidad de dar falsos positivos en determinados alimentos (generalmente de origen vegetal tratados con bacterias o toxinas bacterianas de este grupo) se va a estudiar la posibilidad de incluir pruebas de confirmación adicionales.

ISO 22964. Investigación de *E. sakazakii*. Se va a modificar el título por el de Investigación de *Cronobacter* spp. La nueva edición contempla el empleo de nuevo caldo de enriquecimiento y medio cromogénico de aislamiento, así como pruebas de confirmación más extensas. El método tiene como objetivo detectar todas las especies que se han clasificado dentro de este nuevo género.

ISO 11290. *Listeria monocytogenes*: En el caso de la técnica de investigación, se reduce el tiempo de incubación en la fase de enriquecimiento (Fraser) de 48 h a 24 h, mientras que en el caso de recuento, se elimina la necesidad de realizar una hora de resucitación antes de la siembra. En ambas partes de la norma se incluye la posibilidad adicional de realizar el análisis de *Listeria* spp. y se reducen las pruebas de confirmación a la realización de la fermentación de la Xilosa, Rhamnosa y hemólisis. Para el caso de *Listeria* spp. se contempla adicionalmente la realización de la prueba de Voges-Proskauer.

ISO 21528. *Enterobacteriaceae*: Dado el escaso uso que se hace por parte de los laboratorios en general, se va a eliminar de la parte normativa el recuento por NMP incluido en la parte 1, quedando como un anexo informativo en esta norma. En esta parte, también se elimina la etapa de enriquecimiento empleando el caldo EE así como en ambas partes se sustituye la confirmación mediante agar glucosa por la del agar O/F.

ISO 10272-3. Recuento semicuantitativo de *Campylobacter* spp. Se va a anular esta parte de la norma debido a sus limitaciones y el escaso uso práctico que supone para los laboratorios y autoridades.

4.- Normas y proyectos basados en técnicas alternativas

Cuando el empleo de nuevas tecnologías se convierte en un requisito para garantizar la validez del método, los métodos de referencia normalizados se basan en este tipo de técnicas, bien de integro o complementario a otras técnicas convencionales. También es importante remarcar, que para el empleo de métodos alternativos basados en PCR existen toda una serie de Guías específicas que se describen a continuación:

Guías para aplicación de métodos de PCR:

- ISO 22174: PCR: Requisitos generales y definiciones.
- ISO 20836: Evaluación del funcionamiento de termocicladores.
- ISO 20837: Requisitos para la preparación de muestras para detección cualitativa.
- ISO 20838: Requisitos para la amplificación y detección en métodos cualitativos.
- ISO 22118: Detección y cuantificación de patógenos alimentarios. Características de rendimiento.
- ISO 22119: PCR a Tiempo Real. Requisitos generales y definiciones.

Métodos que emplean técnicas alternativas:

ISO 13136 Detección de *E. coli* productor de toxina Shiga (STEC) y determinación de los serogrupos O 157, O111, O26, O103 y O145 mediante PCR a Tiempo Real. El método contiene una etapa de preenriquecimiento seguido de un cribado mediante PCR basado en la detección de los genes *stx1* y *stx2*, teniendo en caso de resultados positivos unas etapas posteriores de detección de genes específicos y aislamiento en placa para confirmación de la presencia de colonias viables.

ISO 15216: Detección de virus de Hepatitis A y Norovirus mediante RT-PCR a Tiempo real. El método incluye dos partes para la cuantificación y detección cualitativa de virus, contemplando el análisis de moluscos y vegetales. Incluye una etapa de extracción y purificación de ARN para realizar posteriormente la RT-PCR a Tiempo Real en un solo paso. La norma incluye un elevado número de patrones y controles internos necesarios para garantizar la validez de los resultados, incluyendo la estimación de la eficiencia de la extracción, de la PCR, ausencia de inhibidores en la muestra, etc...

ISO 17919 Detección de *Clostridium* productor de neurotoxina botulínica tipo A, B, E y F mediante PCR.

ISO 18867. Detección de *Yersinia enterocolitica* y pseudotuberculosis patogénica mediante PCR.

ISO 19020: Método para la detección de enterotoxinas estafilocócicas en alimentos mediante ELISA.

ISO 18465: Método para la cuantificación de toxina emética (cereleudina) de *Bacillus cereus* mediante HPLC-MS/MS.

5.- Nuevos proyectos de normas:

ISO 18744 Detección y recuento de *Cryptosporidium* y *Giardia* en vegetales de hoja y frutas del bosque. Método probablemente basado en detección por PCR. Se está trabajando también en la detección de otros parásitos, empezando por el análisis de *Taenia solium* según la prioridades de la FAO/OMS para parásitos alimentarios.

ISO 18743 Detección de larvas de *Trichinella* en carne por digestión enzimática. Método clásico basado en digestión y observación microscópica que está en fase de publicación. En estos momentos aún no se está considerando el empleo de un método serológico.

Detección de *Clostridium botulinum* por PCR

Detección de contaminantes en cultivos iniciadores y probióticos

Recuento de microorganismos psicrotróficos. Normalizando y aplicando en alimentos las actuales normas en vigor para productos lácteos: ISO 6730 (siembra en profundidad) e ISO 17410 (siembra en superficie)

Detección de Bacterias Termo-acidófilas (TAB) incluyendo *Alycyclobacillus acidoterrestris* y otras especies en zumos.

Detección de toxina de *Clostridium botulinum* toxin (A-G) en alimentos mediante ELISA.

Guía para la realización de "challenge test" para estimar crecimiento microbiano en alimentos y piensos.

Recuento de enterococos en alimentos como indicador de higiene.

Confirmación de especies de ***Campylobacter* por PCR**, que será incluido como un anexo en la ISO 10272 como alternativa a la confirmación fenotípica.

Cuantificación de bacteras acidolácticas mediante PCR.

Cribado de residuos de antibióticos en alimentos mediante métodos microbiológicos.

7.- Conclusión:

Tal y como se refleja en el presente documento, los métodos normalizados en microbiología de alimentos constituyen una herramienta imprescindible tanto para garantizar aspectos tecnológicos, comerciales como de salud pública. Estos métodos además, sirven como referencia para el establecimiento de criterios microbiológicos y para el desarrollo y validación de métodos alternativos.

Las nuevas tecnologías, se emplean on herramientas que cada vez se tienen más en cuenta para el desarrollo y actualización de las Normas de referencia. En microbiología de alimentos, el gran número de normas y proyectos en vigor suponen una potente herramienta para los laboratorios de control en su trabajo diario.

Por último, no debemos olvidar comose ha indicado en la introducción que gran parte de los datos aportados en esta comunicación se encuentran en fase de desarrollo y normalización, por lo que no queda más que invitar a todos los potenciales usuarios de las normas a participar activamente en el proceso de normalización, aportando sus comentarios, experiencia, e inquietudes, lo cual redundará sin duda en beneficio de todos.