

## Métodos de referencia ISO. ¿Qué hay de nuevo?

David Tomás Fornés ([davidtomasfornes@gmail.com](mailto:davidtomasfornes@gmail.com))

Coordinador del Grupo Nacional de Normalización en Microbiología de Alimentos de UNE y delegado en los comités internacionales ISO y CEN.

### Introducción

Los métodos de referencia en España para el análisis microbiológico de alimentos se encuentran completamente harmonizados con los métodos internacionales desarrollados por ISO así como con los métodos Europeos adoptados por CEN. Esta normalización nos permite asegurar que los métodos incorporados son aceptables a nivel nacional e internacional sin requerir cambios o adaptaciones adicionales. Así mismo el empleo de métodos normalizados, permite el cumplimiento de la legislación en vigor en lo relacionado con los criterios microbiológicos aplicados a alimentos (Reglamento 2073/2005 y sus modificaciones).

Las normas publicadas cubren un amplio rango de microorganismos, tanto patógenos como indicadores de higiene y calidad. También se encuentran incluidas normas para el análisis de parásitos en alimentos, así como de las toxinas producidas por bacterias (enterotoxina estafilocócica y cereulida). De modo adicional, existen normas que incluyen requisitos generales o guías para la ejecución de los análisis, control de medios de cultivo, validación, incertidumbre, técnicas de PCR, etc...

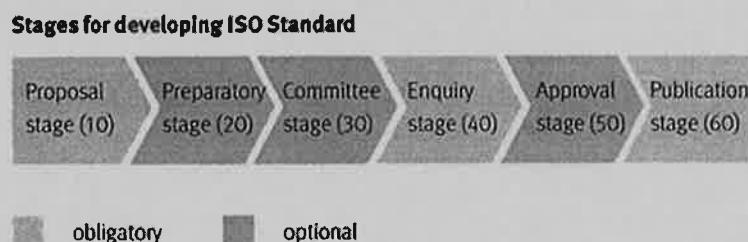
Es por tanto clave para las industrias alimentarias y los laboratorios de control garantizar la correcta aplicabilidad de los métodos de referencia o en su caso, de los métodos alternativos equivalentes, así como conocer cuales son las versiones en vigor, sus modificaciones y correcciones así como las nuevas publicaciones de normas a incorporar en caso necesario.

### Desarrollo y revisión de métodos normalizados

Como se ha indicado anteriormente, todas las normas microbiológicas publicadas en España a través de UNE, están alineadas con las normas ISO y CEN.

Todas las normas de referencia son desarrolladas y revisadas por comités ISO/TC34/SC9 y CEN/TC463. En particular el comité ISO gestiona un total de 90 normas publicadas en vigor y 25 normas en revisión o desarrollo. En este comité participan un total de 40 países.

El proceso de desarrollo y revisión de una norma incluye diferentes etapas:



Los plazos de desarrollo o revisión de la norma, desde su aprobación formal hasta su publicación puede ser de entre 18 y 36 meses. La fase en la que se encuentra una determinada norma pueden consultarse en la página web de ISO ([www.iso.com](http://www.iso.com)).

A modo de resumen, las fases más importantes son:

- **Propuesta de norma (10):** Consiste en la redacción del proyecto de norma acorde a los requisitos de ISO, así como a la votación por parte de los miembros del comité técnico para que se inicie la etapa de normalización.
- **Fase de consulta (40):** En esta fase se elabora un documento técnico o borrador (DIS) que contiene todos los requisitos técnicos que va a contempla la norma. Este documento es enviado para su evaluación y aprobación a todos los miembros del comité. Si es aprobado por más de 2/3 de los votos, la norma pasa a la etapa de publicación. Es posible, y muy frecuente en el caso de las normas microbiológicas, que la norma se vuelva a votar en su formato de como borrador final (FDIS), incluyendo todas las correcciones y modificaciones recibidas durante la fase de consulta. Durante esta segunda fase de consulta (50) no se puede realizar ninguna modificación técnica sino solo modificaciones editoriales
- **Fase de publicación (60):** En esta etapa se incorporan los cambios editoriales respectivos y se pone a disposición del usuario la norma definitiva. Las normas ISO se publican en primer lugar en inglés, francés y alemán y todas aquellas que son adoptadas por el CEN e identificadas como EN, son posteriormente traducidas a los diferentes idiomas incluyendo el español.

Las normas sufren un proceso de revisión periódica cada 5 años en el que se decide si la norma se renueva por otro período de 5 años, se retira al considerarse que no es aplicable o está obsoleta, o bien se solicita su revisión o modificación (identificado con el código 90), para lo cual se crea un grupo de trabajo específico con expertos internacionales.

Las revisiones de los métodos de ensayo, contemplan una evaluación de los cambios que ha sufrido la norma. Esta evaluación va a condicionar las acciones a realizar por parte de los laboratorios:

Si los cambios se consideran **mayores**, indica que se ha incluido cambios técnicos que afectan al funcionamiento del método, por lo que el laboratorio debe evaluarlos y considerar su impacto en aspectos como:

- Nueva verificación del método
- Medios de cultivo
- Adquisición de cepas
- Registros de datos
- Control de calidad interno y cualificación del personal.

Si los cambios se consideran **menores**, implica que los cambios pueden ser únicamente editoriales o que no tienen un impacto significativo en el funcionamiento del método. Estos cambios deben ser evaluados para incorporarlos al laboratorio pero no requieren una nueva verificación del método.

#### **Modificaciones, revisiones y nuevos métodos de ensayo recientemente publicados (2021-2022)**

[ISO 6888-1 & 2:2021 Microbiology of the food chain — Horizontal method for the enumeration of coagulase-positive staphylococci \(\*Staphylococcus aureus\* and other species\) — Part 1: Method using Baird-Parker agar medium; Part 2: Method using rabbit plasma fibrinogen agar medium.](#)

Los cambios se consideran **menores**, consistiendo principalmente en la ampliación del alcance, incluyendo muestras ambientales, el rango de incubación de las placas (34 °C a 38 °C), un control de pureza y ejemplos de interpretación de prueba de confirmación de la coagulasa (parte 1), así como la posibilidad de confirmar colonias aisladas en medio Baird Parker (parte 1) mediante el empleo del agar RPF (Rabbit Plasma Fibrinogen).

ISO 15216-1:2017/Amd 1:2021 Microbiology of the food chain — Horizontal method for determination of hepatitis A virus and norovirus using real-time RT-PCR — Part 1: Method for quantification — Amendment 1

Básicamente consiste en una corrección de errores sin impacto en la técnica o protocolo analítico. Se corren la composición y preparación de tampones y reactivos, se incluye la referencia del virus de control Mengo (ahora disponible en la Colección Española de Cultivos Tipo) y se incluyen modificaciones en el protocolo de extracción empleando el kit de extracción NucliSENS®.

ISO 23036-1&2:2021 Microbiology of the food chain — Methods for the detection of Anisakidae L3 larvae in fish and fishery products — Part 1: UV-press method; Part 2: Artificial digestion method

Nuevos métodos para la detección de parásitos en pescado, mediante método de visualización por lámpara ultravioleta después de congelación y presión (parte 1) o mediante digestión enzimática seguida de filtración y microscopía (parte 2).

ISO 4833-1 & 2:2013/Amd 1:2022 Microbiology of the food chain — Horizontal method for the enumeration of microorganisms — Part 1: Colony count at 30 °C by the pour plate technique; Part 2: Colony count at 30 °C by the surface plating technique — Amendment 1: Clarification of scope

Los cambios se consideran menores y consisten básicamente en indicar que ambas normas pueden emplearse para todo tipo de alimentos, con determinadas recomendaciones como:

- La parte 1 (siembra en profundidad) es particularmente adecuada para bajar el límite de detección de la técnica, en aquellos casos que se espere la presencia de colonias invasivas (ejm. leche o productos lácteos) o cuando se quiera bacterias sensibles al oxígeno (ejm. bacterias del ácido lácticas)
- La parte 2 (siembra en superficie) resulta particularmente adecuado para productos que contengan organismos sensibles al calor (ejm. psicrotrofos en alimentos refrigerados y congelados); bacterias aerobias (ejm. Pseudomonas); productos que contengan partículas pequeñas o con color intenso o bien cuando se desee una distinción entre distintos tipos de colonias.

Indicar que el Centro Nacional de Alimentación (CNA) publica documentos en los que se realiza un análisis pormenorizado de los cambios en las normas que pueden consultarse en:

[https://www.aesan.gob.es/AECOSAN/web/laboratorios/subseccion/metodos\\_normalizados.htm](https://www.aesan.gob.es/AECOSAN/web/laboratorios/subseccion/metodos_normalizados.htm)

**Nuevas normas incluyendo guías y documentos técnicos recientemente publicados (2021-2022)**

ISO 16140-3:2021 Microbiology of the food chain — Method validation — Part 3: Protocol for the verification of reference methods and validated alternative methods in a single laboratory.

Norma relevante para todos los laboratorios de microbiología, pues incluye el protocolo a seguir para demostrar que, en un determinado laboratorio, un método analítico funciona correctamente y es adecuado para el uso que se va a hacer de él. La norma incluye la verificación de métodos cualitativos y cuantitativos, el número y tipo de muestras a analizar, la evaluación estadística de resultados y criterios de aceptación y rechazo.

ISO 20836:2021 Microbiology of the food chain — Polymerase chain reaction (PCR) for the detection of microorganisms — Thermal performance testing of thermal cyclers.

Incluye los requisitos para la instalación, mantenimiento y calibración de temperaturas de termocicladores convencionales y a Tiempo Real. En mi opinión, es una norma compleja y difícil de implementar en los laboratorios de análisis de alimentos, siendo necesario su aplicación por parte de un laboratorio de calibración especializado.

ISO 23418:2022 Microbiology of the food chain — Whole genome sequencing for typing and genomic characterization of bacteria — General requirements and guidance

La guía incluye los requisitos mínimos para generar y analizar la información generada por secuenciación genómica de bacterias, incluyendo el manejo de bacterias y el aislamiento de ADN; la preparación de muestras, secuenciación y verificación de la calidad de las secuencias de ADN; el proceso de análisis bioinformático y su validación; el almacenamiento de datos y la validación de todo el flujo de trabajo.

ISO 20976-2:2022 Microbiology of the food chain — Requirements and guidelines for conducting challenge tests of food and feed products — Part 2: Challenge tests to study inactivation potential and kinetic parameters

Guía para la realización de estudios de desafío microbiano, herramienta que permite validar las medidas de control establecidas en el plan de APPCC, incluyendo el diseño experimental y la selección de condiciones para la realización de estudios de inactivación de microorganismos tanto en forma vegetativa como esporulada (ejm. para evaluar eficacia de tratamientos térmicos de pasteurización, esterilización, etc...)

Indicar que la primera parte de esta norma se publicó en 2019, dedicada a los estudios de potencial de crecimiento, fase de latencia y tasa máxima de crecimiento, principalmente dedicada a estudios de vida útil y al cumplimiento de los requisitos para *Listeria monocytogenes* del Reglamento 2073/2005 de criterios microbiológicos.

#### **Métodos de ensayo en fase final de revisión**

En complemento a los métodos ya publicados, es conveniente realizar un resumen de aquellos métodos de ensayo que se encuentran en la fase final de revisión y que serán publicados en breve (previsiblemente 2022-2023).

ISO 10272-1&2:2017/FDAmd 1 Microbiology of the food chain — Horizontal method for detection and enumeration of *Campylobacter* spp. — Part 1: Detection method; Part 2: Colony-count technique— Amendment 1: Inclusion of methods for molecular confirmation and identification of thermotolerant *Campylobacter* spp., the use of growth supplement in Preston broth and changes in the performance testing of culture media

Los cambios propuestos son considerados menores. En el caso del caldo Preston, empleado para muestras con bajos niveles de *Campylobacter* y altos niveles de microbiota acompañante, se incluye un suplemento de crecimiento para favorecer el crecimiento de *Campylobacter* spp, pues el caldo actual puede ser demasiado selectivo para la recuperación de algunas cepas de *C. coli*. También se incluyen ensayos de PCR para la confirmación de colonias.

ISO/FDIS 15213-1 Microbiology of the food chain — Horizontal method for the detection and enumeration of *Clostridium* spp. — Part 1: Enumeration of sulfite-reducing *Clostridium* spp. by colony-count technique

Este nuevo método reemplazará la actual Norma ISO 15213:2003 para el recuento de bacterias anaerobias sulfito-reductoras. El nuevo método se basa en el método actual, con cambios **mayores** relacionados con la nueva formulación del agar de aislamiento (Iron Sulfite Agar) reduciendo la concentración de sulfito de 1,0 g/L actual a 0,5 g/L; la extensión del alcance a muestras de producción primaria, incluyendo un diluyente especial y diferentes factores de dilución; la necesidad de confirmar las colonias mediante cultivo en aerobiosis y anaerobiosis, así como se elimina la posibilidad de hacer el recuento en tubo.

Indicar también que están en fase de preparación la Norma ISO 15213-2, que reemplazará la Norma ISO 7937:2004 para recuento de *Clostridium perfringens*, así como la Norma ISO 15213-3 para la detección de *Clostridium perfringens*.

ISO 16654:2001/FDAmD 2 Microbiology of food and animal feeding stuffs — Horizontal method for the detection of *Escherichia coli* O157 — Amendment 2: Inclusion of performance testing of all culture media and reagents

Básicamente cambios **menores** para incluir las pruebas de control de calidad de medios de cultivo (cepas a emplear, criterios, etc...).

ISO 21872-1:2017/FDAmD 1 Microbiology of the food chain — Horizontal method for the determination of *Vibrio* spp. — Part 1: Detection of potentially enteropathogenic *Vibrio parahaemolyticus*, *Vibrio cholerae* and *Vibrio vulnificus* — Amendment 1: Performance testing of culture media

Básicamente cambios **menores** para incluir las pruebas de control de calidad de medios de cultivo (cepas a emplear, criterios, etc...).

#### Otros proyectos en curso

Indicar que todas las revisiones de normas y proyectos de nuevas normas que se incluyen a continuación están en fase de desarrollo y por tanto pueden sufrir cambios técnicos importantes. En la mayoría de los casos, aún es posible contribuir con la participación de expertos técnicos en el desarrollo de las futuras normas. Algunas de las diferentes actividades en curso que probablemente no verán su publicación hasta al menos 2024-2025 son:

ISO/DIS 22174 Microbiology of the food chain — Polymerase chain reaction (PCR) for the detection and quantification of microorganisms — General requirements and definitions

La norma en vigor desde 2005 está siendo revisada para integrar las normas ISO 20837:2006; ISO 20838:2006 y 22119, todas ellas incluyendo requisitos generales para el análisis mediante PCR. Además contempla nuevas tecnologías como la PCR digital y cuantificación, así como requisitos de instalaciones, distribución de actividades y controles ambientales en laboratorios que realizan análisis mediante PCR.

ISO/DIS 7218 Microbiology of the food chain — General requirements and guidance for microbiological examinations

También la norma de requisitos generales para análisis microbiológicos originada en 2007 está siendo objeto de revisión con el objetivo de simplificar la expresión de resultados, incluir información general relacionada con el control de calidad en el laboratorio, así como la caracterización de cepas de control y reestructurando el apartado

de equipos. También se incluyen múltiples referencias a otras normas microbiológicas donde se desarrollan aspectos como validación y verificación (ISO 16140), control de calidad de medios de cultivo (ISO 11133), estimación de incertidumbre (ISO 19036), etc...

[ISO 16140-4:2020/CD Amd 1 Microbiology of the food chain — Method validation — Part 4: Protocol for method validation in a single laboratory — Amendment 1: Annex H - Validation of larger test portion size for qualitative methods](#)

Con la modificación de esta norma, se incluirá el protocolo para validar el análisis de muestras con un tamaño superior al validado en el método de referencia. Por ejemplo, cuando el laboratorio quiere analizar muestras de 125 g o 375 g (ejm. muestras combinadas) en lugar del tamaño validado que suele encontrarse entre 10 g y 25 g.

[ISO/AWI 13136-1& 2. Microbiology of the food chain — Detection, isolation and characterization of Shiga toxin-producing \*Escherichia coli\* \(STEC\) — Part 1: Horizontal method for the detection and isolation of Shiga toxin-producing \*Escherichia coli\* \(STEC\); Part 2: Horizontal method for the characterization of Shiga toxin-producing \*Escherichia coli\* \(STEC\) isolates](#)

Actualmente para la detección de STEC se emplea una norma técnica de 2012. La nueva norma se divide en dos partes, contemplado la primera el cribado de STEC mediante detección de genes stx por PCR y su aislamiento y confirmación en medios de cultivo. La segunda parte estará destinada a la caracterización de serogrupos de STEC mediante métodos de PCR.

[ISO/AWI 21527 Microbiology of the food chain — Horizontal method for the enumeration of yeasts and moulds](#)

En estos momentos, se dispone de dos partes de la norma 21527 para el análisis de mohos y levaduras en función de la actividad del agua del alimento (Aw superior a 0.95 o inferior o igual que 0.95). La nueva norma tiene como objetivo integrar estas dos partes y facilitar las opciones de los laboratorios en función de los objetivos del ensayo.

[ISO 11290:2017 Microbiology of the food chain — Horizontal method for the detection and enumeration of \*Listeria monocytogenes\* and of \*Listeria\* spp.](#)

Por último y aunque no se ha materializado aún en una modificación de la norma, en relación con *Listeria monocytogenes* se ha detectado un comportamiento heterogéneo de la cepa *L. monocytogenes* WDCM 00109 por la que se pretende reemplazar por la cepa *L. monocytogenes* DSM 112143.

En relación con la fase de primaria de enriquecimiento, hay un grupo de trabajo evaluando condiciones alternativas para optimizar el crecimiento de Listeria, incluyendo el uso de caldos de enriquecimiento alternativos al Fraser semiconcentrado.

Para finalizar, indicar que la página web de la Organización Internacional de Normalización (ISO) dispone de una página web donde está disponible novedades y material adicional relacionado con la microbiología de alimentos: <https://www.iso.org/committee/47920.html>