Validación UNE EN ISO 16140 para métodos rápidos de microbiología

Pablo de Vicente López, director de AENOR Laboratorio

El campo de los análisis microbiológicos ha experimentado un gran desarrollo en las últimas décadas, los avances en biotecnología, la automatización y la microelectrónica han conllevado el desarrollo de un gran número de método de análisis, proponiendo enfoques diferentes para la detección y cuantificación de microorganismos en alimentos. Estos métodos son rápidos y más sencillos de realizar que los tradicionales descritos en las diferentes Normas, tal como se detalla en este artículo, basado en la ponencia ofrecida en el XVII Workshop MRAMA

UNE EN ISO 16140 validation for rapid microbiological methods

The field of microbiological analysis has experienced great development in recent decades, advances in biotechnology, automation and micro-electronics having involved the development of a large number of analysis methods, suggesting different focal perspectives for the detection and quantification of microorganisms in food. These methods are quick and simpler to carry out than the traditional ones described in the different Regulations, as detailed in this article, based on the report given at the XVII MRAMA Workshop

Los nuevos métodos de ensayos, denominados métodos alternativos, presentan, como su propio nombre indica, una alternativa a los tradicionales o de referencia (normativos) que se vienen empleando desde hace muchos años en los laboratorios de microbiología. Tanto la administración como las entidades de acreditación reconocen y permiten el uso de los métodos alternativos, pero en ambos casos exigen que estos cuenten con una validación y certificación basada en la norma UNE EN ISO 16140, "Microbiología de la Cadena Alimentaria. Validación de métodos" u otra similar reconocida internacionalmente. La validación surge por la necesidad de verificar que, con el empleo de métodos alternativos, obtenemos resultados equivalentes a los obtenidos por los métodos de referencia o normativos.

Esquema de validación

El proceso de validación de métodos alternativos se estructura en dos fases:

-Estudio comparativo.- En esta fase en laboratorio se comparan el método alternativo frente al de referencia. El estudio comparativo lo lleva a cabo el laboratorio responsable de realizar y planificar toda la validación, denominado en la norma laboratorio organizador. El número y tipo de muestras a analizar va a depender del alcance de la validación.

-Estudio interlaboratorio.- Una vez verificado que el método alternativo es equivalente al de referencia, de acuerdo con los resultados obtenidos en el estudio comparativo, es necesario comprobar que estos resultados se pueden replicar en otros laboratorios.

Existe una tercera fase, no recogida en la norma como tal, sería la certificación del método. En esta fase, una entidad de certificación evalúa los resultados obtenidos en la validación y audita al fabricante del méto-

do alternativo, concediendo el certificado correspondiente si procede.

Definición del alcance

Previamente a comenzar con el proceso de validación, es necesario definir el alcance de la misma, ya que va a determinar los estudios a realizar, así como el tipo y número de muestras analizar. Los aspectos a definir son:

a) Tipo de método: cualitativo o cuantitativo.

b) Método de referencia frente al cual se va a comparar el alternativo. El de referencia debe ser un método normativo reconocido a nivel internacional que haya sido ampliamente validado.

c) Alcance de la validación: la norma UNE EN ISO 16140 recoge las diferentes categorías de alimentos que se deben analizar para cada microorganismo. En el caso de que el alcance de la validación incluya determinados alimentos solo se evaluarán las categorías a las que pertenezcan. Si es para alimentos en general deberán evaluarse al menos cinco categorías de alimentos.

La norma también determina la variedad de alimentos que deben ensayarse en cada una de las categorías, así en el Anexo A de la norma se divide cada categoría en diferentes tipos de alimentos, siendo necesario testar los distintos tipos dentro del estudio.

d) Tipo de estudio: en el caso de los métodos cualitativos se deberá determinar si los estudios son pareados o no.

-Pareado: los métodos de referencia y alternativo comparten la misma porción de muestra.

-No pareado: los métodos de referencia y alternativo se inician con diferentes porciones de muestra.

El tipo de estudio vendrá determinado por los pasos iniciales del método alternativo, y va a influir en la realización de los estudios de validación así como en los cálculos de los Límites de Aceptación (AL).

Métodos cualitativos. Estudio comparativo

1) Estudio de sensibilidad:

La sensibilidad es la capacidad de un método para detectar el analito objeto de la validación. El propósito del estudio es determinar la diferencia de sensibilidad entre el método de referencia y el alternativo.

El estudio se realizará en las categorías de alimentos determinadas en función del alcance previsto de la validación. Para cada una de las categorías de alimentos se analizarán al menos 60 muestras por ambos métodos, presentando al menos 30 de ellas un resultado positivo por uno de los dos métodos.

Los resultados obtenidos se evaluarán de la siguiente forma:

PA: Concordancia positiva, el resultado en los dos métodos ha sido positivo.

NA: Concordancia negativa, el resultado en los dos métodos ha sido negativo.

PD: Desviación positiva, el resultado por el método de referencia ha sido negativo, y positivo por el método alternativo.

ND: Desviación negativa, el resultado por el método de referencia ha sido positivo, y negativo por el método alternativo.

Los datos se presentarán de acuerdo con la tabla cruzada (Tabla 1) para cada categoría. Con los datos obtenidos se calcularán los siguientes valores:

- Sensibilidad del método de referencia.
- Sensibilidad del método alternativo.
- Veracidad relativa, es el grado de equivalencia entre los resultados obtenidos por el método alternativo y el método de referencia.
- Proporción de falsos positivos del método alternativo.
- Valor para determinar el cumplimiento del AL (Límite de aceptabilidad), en caso de que el valor calculado supere el AL establecido en la norma se considerará que ambos métodos no son equivalentes.

2) Estudio del nivel de detección relativa (RLOD):

La finalidad del estudio es evaluar el nivel de detección relativa a P=0,50 (LOD50) del método alternativo frente al nivel de detección a P=0,50 (LOD50) del método de referencia.

El LOD50 es la capacidad de un método para detectar determinada concentración de analito el 50% de las veces.

El estudio se llevará a cabo en cada una de las categorías de alimentos incluidas en el estudio de sensibilidad, utilizando una sola matriz que represente a toda la categoría.

El estudio comparativo lo lleva a cabo el laboratorio responsable de realizar y planificar toda la validación. El número y tipo de muestras a analizar depender del alcance de la validación

Las muestras se inocularán artificialmente, preparándose al menos tres niveles de contaminación para cada categoría:

- Nivel de control negativo, en el caso de obtener un resultado positivo por alguno de los dos métodos en este nivel se deberá repetir el estudio.
- Nivel bajo: corresponderá al nivel de detección teórico, y deberá devolver entre un 25% y un 75% de resultados positivos.
- Nivel alto: será justo por encima del nivel de detección teórico.

El RLOD vendrá determinado por la siguiente fórmula:

RLOD=(LOD alt)/(LOD ref)

Dentro de cada categoría se estimarán además los RLODs mediante un modelo de ajuste complementario log-log.

3) Inclusividad y exclusividad:

-Inclusividad: estudio que supone la detección o recuento de cepas objeto del estudio puras mediante el método alternativo.

-Exclusividad: estudio que implica a cepas no objeto de estudio puras que pueden presentar potencialmente una reacción cruzada pero que no se espera detectar mediante el método alternativo.

Las cepas en ambos casos deberán seleccionarse siguiendo las pautas del Anexo E de la norma. En el caso de los ensayos de inclusividad se analizarán al menos 50 cultivos puros diferentes, salvo en el caso de *Salmonella*, en el que se analizarán un mínimo de 100. Para evaluar la exclusividad se analizarán al menos 30 cultivos puros de posibles microorganismos interferentes.

TABLA 1

CATEGORIA A	Metodo Ref (R+)		Metodo Ref (R-)	
Metodo alter. positivo (A+)	Nº muestras	PA	Nº muestras	PD
Metodo alter. negativo (A-)	Nº muestras	ND	Nº muestras	NA

Métodos cualitativos. Estudio interlaboratorio

El objetivo del estudio interlaboratorio es determinar la variabilidad de los resul-

tados obtenidos en diferentes laboratorios analizando muestras idénticas y comparar dichos resultados con el global del estudio comparativo realizado.

De acuerdo con la norma UNE EN ISO 16140-2:2006 el estudio interlaboratorio debe producir un mínimo de 10 laboratorios colaboradores con resultados no discrepantes.

Para llevar a cabo el interlaboratorio se seleccionará un solo tipo de alimento entre todas las categorías que se han evaluado en el estudio comparativo.

Se prepararán las muestras con tres niveles de contaminación:

- Control negativo.
- Nivel bajo, este nivel debe producir resultados positivos y negativos. Para determinar este nivel se tendrán en cuenta los resultados obtenidos en el estudio del RLOD.
- Nivel alto, un tercer nivel que sea superior al LOD teórico.

Cada laboratorio colaborador deberá analizar al menos 8 réplicas de cada nivel de contaminación.

Con los resultados obtenidos se determinarán los siguientes valores:

- Especificidad para el método de referencia.
- Especificidad para el método alternativo.
- Sensibilidad del método de referencia.
- Sensibilidad del método alternativo.
- Veracidad relativa.
- Proporción de falsos positivos del método alternativo.
- Valor para determinar el cumplimiento del AL (Límite de aceptabilidad), en caso de que el valor calculado supere el AL establecido en la norma se considerará que ambos métodos no son equivalentes.

Los datos obtenidos tras la realización del estudio interlaboratorio se compararán con los que se obtuvieron en el estudio comparativo.

Métodos cuantitativos. Estudio comparativo

1) Estudio de veracidad relativa (RT)

Para determinar la veracidad relativa de los métodos cuantitativos se realiza una comparación de resultados obtenidos por el método de referencia y alternativo en muestras idénticas.

Se analizarán al menos 15 muestras de cada categoría seleccionada en el alcance de la validación, tratando de emplear al menos 3 tipos de alimentos para cada una de las categorías. Las muestras deberán estar contaminadas en diferentes niveles de forma que cubran el rango de concentración en el que se encuentra de forma natural el microorganismo diana.

Los resultados se analizan mediante el método de Bland-Altman.

2) Estudio del perfil de exactitud

El objeto del perfil de exactitud es determinar que los resultados obtenidos por el método alternativo no difieren de forma significativa (por encima del criterio de aceptabilidad) con respecto a los obtenidos en el método de referencia en muestras idénticas.

Para el alcance de la validación, la norma UNE EN ISO 16140 recoge las diferentes categorías de alimentos que se deben analizar para cada microorganismo

El estudio del perfil de exactitud se lleva a cabo en cada una de las categorías del alcance, empleando al menos 1 tipo de alimento. Se analizarán 6 muestras de cada tipo, contaminadas de forma artificial, a diferentes niveles de contaminación, de forma que se cubra el rango completo de contaminación del tipo seleccionado.

De cada muestra se realizarán 5 réplicas.

Los resultados obtenidos nos van a permitir obtener, entre otros datos, el intervalo de tolerancia esperado o β-ETI, este valor indica el rango donde se van a encontrar los resultados de cada una de las concentraciones analizadas. Este valor se va a comparar con el criterio de aceptación (AL) que va determinar si ambos métodos son equivalentes.

3) Estudio del límite de cuantificación (LOQ)

Este solo se debe llevar a cabo en aquellos métodos en los que el resultado final no se obtenga mediante el recuento de colonias. El LOQ se realizará en cada una de las categorías en las que se ha realizado el perfil de exactitud. Se analizan 10 muestras blancas para cada categoría. A partir de los resultados obtenidos se calcula la desviación estándar, siendo el LOQ 10 veces la desviación estándar.

4) Estudio de inclusividad y exclusividad

La inclusividad y exclusividad sólo se ejecutará en aquellos métodos de recuento dirigidos a microorganismos específicos.

Se seleccionarán 50 cepas para el estudio de inclusividad y 30 para el estudio de exclusividad.

A diferencia de este estudio en la validación de métodos cualitativos, los cultivos puros se ensayarán por los métodos alternativo y de referencia y en el caso de la inclusividad se empleará un agar no selectivo.

Métodos cuantitativos. Ejercicio interlaboratorio

De acuerdo con la norma UNE EN ISO 16140-2:2006 el estudio interlaboratorio debe producir un mínimo de 8 laboratorios colaboradores con resultados válidos

Para llevar a cabo el interlaboratorio se seleccionará un solo tipo de alimento seleccionado entre todas las categorías que se han evaluado en el estudio comparativo. Se prepararán las muestras con tres niveles de contaminación, nivel bajo, medio y alto, de forma que los tres niveles cubran el rango completo del método alternativo. Cada laboratorio recibirá una muestra por cada nivel de contaminación que deberá analizar por duplicado mediante el método de referencia y el método alternativo.

Con los resultados obtenidos se determinarán el perfil de exactitud, estableciendo los valores de β-ETI para establecer si ambos métodos son equivalentes.

Los datos obtenidos tras la realización del estudio interlaboratorio se compararán con los que se obtuvieron en el estudio comparativo.

Certificación

Una vez realizada la validación, el método puede ser certificado. Para ello una entidad de certificación deberá evaluar los resultados obtenidos en la validación y realizar una auditoría para verificar el proceso de fabricación del método alternativo, y de forma específica los controles de calidad que se han implementado en dicho proceso.

La entidad de certificación emitirá su dictamen en base a todos los datos evaluados.

La certificación tiene un periodo de validez determinado, durante el cual se realizan auditorías de seguimiento anual, se verifican y evalúan posibles cambios en el método y se estudian las posibles reclamaciones o incidencias con respecto al funcionamiento del método que se hayan presentado.❑

Virus de transmisión alimentaria: relevancia y métodos de detección

Gloria Sánchez. Instituto de Agroquímica y Tecnología de Alimentos (IATA-CSIC)

Las enfermedades de transmisión alimentaria causan anualmente más de 400.000 muertes cada año, cifra que hace patente la necesidad de conocer el riesgo real que implica la presencia de los virus entéricos en los alimentos. Para ello, en este artículo, basado en la ponencia ofrecida en el XVII Workshop sobre Métodos Rápidos y Automatización en Microbiología Alimentaria (MRAMA), se citan algunos de los avances en metodología para la detección de estos patógenos

Foodborne viruses: relevance and detection methods

Foodborne illnesses cause more than 400,000 deaths each year, a figure which makes clear the need to understand the current risk that the presence of intestinal viruses in food involves. Because of this, this article cites, based on the report provided in the XII Workshop on Métodos Rápidos y Automatización en Microbiología Alimentaria (MRAMA, Rapid Methods and Automation in Food Microbiology), some of the methodological advances for the detection of these pathogens

Los microorganismos patógenos se encuentran entre los principales riesgos sanitarios asociados al consumo de alimentos y, por ende, repercuten en la seguridad alimentaria. Recientemente, la organización mundial de la salud ha elaborado un informe según el cual se estima que los microorganismos patógenos son responsables de 600 millones de casos de enfermedades de transmisión alimentaria y de 420.000 muertes anuales. Según este informe, la enfermedad más común es la gastroenteritis (550 millones de casos), causada principalmente por los norovirus humanos (120 millones) y *Campylobacter spp.* (96 millones) (WHO, 2015).

Los virus de transmisión alimentaria, o virus entéricos, son responsables de diversas patologías desde gastroenteritis, normalmente leves, hasta patologías más graves como hepatitis agudas, miocarditis o incluso meningitis o encefalitis aséptica. En los últimos años, se ha producido un aumento en el número de brotes de transmisión alimentaria causados por estos patógenos. Esto supone un importante problema de salud pública, ocasionando graves incidencias sanitarias en algunos grupos de población, como personas inmunodeprimidas o ancianos además de tener importantes repercusiones económicas.

Unos de los virus de transmisión que más preocupan hoy en día en seguridad alimentaria son los norovirus humanos (NoV), causantes de gastroenteritis, el virus de la hepatitis A (HAV), y más recientemente el virus de la hepatitis E (HEV) que causan cuadros de hepatitis agudas. Según

los últimos datos publicados en Estados Unidos y Europa, los NoV son el primer agente causal de enfermedades de transmisión alimentaria (responsables etiológicos del 36% y 9,8% de los brotes, respectivamente), y se sitúan entre los cinco patógenos responsables de las enfermedades de transmisión alimentaria que suponen un mayor coste económico.

Los virus entéricos son transmitidos principalmente por la vía fecal-oral y, por tanto, pueden estar potencialmente presentes en alimentos que hayan sufrido contaminación directa con materia fecal, o a través de aguas contaminadas. Los principales alimentos involucrados en infecciones víricas transmitidas por alimentos son los moluscos bivalvos, las verduras y ensaladas, las frutas tipo baya, así como también los alimentos preparados y listos para su consumo que hayan sido contaminados por manipulación incorrecta después de su preparación o cocinado. Por otra parte, recientemente se ha demostrado un aumento de la incidencia de casos de hepatitis E asociado al consumo de productos cárnicos y sus derivados (Kupferschmidt, 2016).

La importancia de los virus entéricos en el campo de la seguridad alimentaria se pone de manifiesto por el interés mostrado por distintos organismos internacionales. Entre ellos destaca la comisión del *Codex Alimentarius*, que publicó un documento sobre la importancia de los virus de transmisión alimentaria. En dicho documento se pone de manifiesto la relevancia de desarrollar ciertos aspectos científicos y técnicos con la finalidad de reducir las infecciones víricas transmitidas por los alimentos. El plan estratégico a seguir menciona la necesidad de desarrollar métodos rápidos de diagnóstico, estudios para establecer la correlación entre infectividad y detección molecular y, finalmente, estudios sobre la efectividad de los procesados alimentarios para la inactivación de virus entéricos (CX/FH 08/40/9).

En este sentido, la Agencia Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA) también ha publicado diversas directrices sobre la relevancia y el control de virus en alimentos; en línea con las directrices sobre principios generales de higiene para el control de virus en alimentos (CX/FH 10/42/5) elaboradas por la comisión Codex. En estos documentos se subraya que el control de los riesgos en alimentos debe empezar durante la producción agrícola o animal y continuar durante toda la cadena alimentaria ("de la granja a la mesa"). En este aspecto, los virus de transmisión alimentaria requieren especial atención debido a que se comportan de manera diferente a los patógenos bacterianos, y las medidas de control implementadas actualmente en la industria alimentaria no han sido evaluadas o no son efectivas para la inactivación de virus entéricos. En el campo de la seguridad microbiológica de los alimentos es necesario, por tanto, conocer el riesgo real que supone la presencia de los virus entéricos en los alimentos, así como aquellas condiciones que garanticen la seguridad microbiológica del alimento.

La localización de virus en alimentos se ha visto incrementada exponencialmente en los últimos años, estableciéndose métodos de detección basados en técnicas moleculares

Métodos para la detección de virus en alimentos

La detección de virus entéricos es especialmente compleja ya que la mayoría de estos patógenos no replican fácilmente en cultivos celulares, en general se encuentran en concentraciones muy bajas, la contaminación vírica puede no ser uniforme y los virus entéricos pueden encontrarse internalizados en los alimentos.

La localización de virus en alimentos se ha visto incrementada exponencialmente en los últimos años, estableciéndose métodos de detección basados en técnicas moleculares, principalmente RT-qPCR cuya normalización (ISO 15216-1:2017 y ISO/TS 15216-2:2013) y validación (Lowther

TABLA 1. APLICACIÓN DE LA PCR DE VIABILIDAD PARA LA DETECCIÓN DE VIRUS POTENCIALMENTE INFECCIOSOS

VIRUS	TRATAMIENTO	REACTIVO / SURFACTANTE	MATRIZ	VALIDEZ	REFERENCIAS
NoV	72°C, 5 min	PMA		Sí por RT-PCR pero no por RT-qPCR	
	90°C, 5 min	PMA	Heces	Sí (SYBR Green RT-qPCR)	
	Calor	PMA		Por RT-PCR	
	Cloro			Revisado por Randazzo et al., 2018a	
	Cloro	PMA/INCI		Sí	
	65–85°C, 2 min	PMA	Heces, espinacas	Sí	
	99°C, 5 min	PMAxx/Tritón	Heces, espinacas, lechuga	Sí	
			Moluscos bivalvos	Parcial	
HAV	99°C, 5 min7	PMA	Suspensión cultivo celular	Sí	Sánchez et al., 2012
	500 MPa,15 min			Parcial	
	Calor	EMA/IGEPAL	Suspensión cultivo celular	Sí	Coudray-Meunier et al., 2013
	5 min 99°C	PMA/Tritón	Agua de lavado	Sí	Moreno et al., 2015
			Vegetables	Parcial	
	Calor	PMAxx/Tritón	Suspensión cultivo celular	Sí	Fuster et al., 2016
	Calor	PMAxx/Tritón	Moluscos bivalvos y vegetales	Sí	Randazzo et al., 2018b
HEV	95°C, 15 min	PICl4	Heces	Sí	Randazzo et al., 2018c
	500 MPa,15 min				

et al., en prensa) en determinadas matrices (agua embotellada, superficie de alimentos, moluscos bivalvos, frutos rojos y hortalizas de hoja) han sido recientemente publicadas para NoV genogrupo I y II, y HAV. Desafortunadamente, hasta la fecha, no existen métodos estandarizados para la detección y cuantificación del HEV en muestras de alimentos, a pesar de ser una de las prioridades establecidas recientemente por la agencia europea de seguridad alimentaria (EFSA, 2017).

El análisis de virus en alimentos consiste en una etapa inicial de separación de los virus de la matriz alimentaria, seguido de la concentración de virus y purificación, diseñada para reducir el volumen de muestra y eliminar algunos de los compuestos de la matriz mientras que simultáneamente se recupera la mayor parte de los virus contaminantes. Posteriormente, se realiza la extracción de ácidos nucleicos, y detección y cuantificación mediante RT-qPCR.

La metodología descrita en las ISO 15216-1:2017 y ISO/TS 15216-2:2013 incluyen diversos controles para evaluar la presencia de inhibidores y determinar la eficacia del proceso de extracción mediante el uso de un control de proceso, generalmente el mengovirus. Todo ello hace que el análisis de virus en alimentos tenga un coste económico elevado. A pesar de esto, el método ISO se está utilizando en laboratorios de control de aguas y alimentos; y, actualmente, diversos laboratorios nacionales han acreditado estos procedimientos por ENAC. Además, estos procedimientos están siendo utilizados a nivel fronterizo para la inspección de alimentos de riesgo por contaminación vírica, y durante el periodo 2017-2018 se ha informado de 81 alertas de contaminación por virus entéricos en el sistema de alerta rápida para alimentos y piensos (RASFF, https://webgate.ec.europa.eu/rasff-window/portal/?event=SearchForm&cleanSearch=1), 94 de ellas causadas por NoV y 6% por HAV. Los moluscos bivalvos han protagonizado la mayoría de las alertas publicadas (73%); mientras que los frutos rojos han originado un 23% de las alertas y las hortalizas (4%).

Por otro lado, estos métodos son rápidos, sensibles y altamente específicos, pero al detectar genomas no son capaces de diferenciar entre virus infecciosos y no infecciosos, y ello dificulta enormemente la interpretación de un resultado positivo en términos de análisis de riesgo. Con el fin de obtener una mejor correlación entre la detección por RT-qPCR y la infectividad de la muestra se han investigado distintas aproximaciones:

1.- Recuperación de NoV potencialmente infecciosos unidos selectivamente a mucina gástrica porcina;

2.- Tratamientos con nucleasas y / o enzimas proteolíticas antes de la extracción para eliminar cualquier señal de cápsides dañadas;

3.- PCR de fragmentos largos;

4.- Tratamientos con reactivos de viabilidad, ya sea con un paso de fotoactivación (por ejemplo, propidio y etidio de monoazida; PMA o EMA) o sin fotoactivación (por ejemplo, compuestos de platino y paladio).

El plan estratégico documentado por la Comisión del Codex menciona la necesidad de desarrollar métodos rápidos de diagnóstico, estudios de correlación entre infectividad y detección molecular y estudios sobre la efectividad de los procesos alimentarios para la inactivación de virus

Esta última aproximación, la PCR de viabilidad, se ha descrito para distintos virus entéricos inactivados por calor, tratamiento con cloro, luz ultravioleta o altas presiones (Tabla 1), y en los últimos años se han utilizado para la detección de estos patógenos en muestras de contaminación natural, principalmente muestras de agua. Además, distintos estudios han demostrado el potencial de estos procedimientos en muestras de vegetales y marisco.

A pesar de las mejoras incorporadas en los protocolos de PCR de viabilidad, la correlación con infectividad sigue sin ser absoluta dependiendo del virus o del tratamiento de inactivación aplicado. A pesar de ello, incorporar estos procedimientos en los análisis de rutina permitirá una cuantificación más precisa de los virus infecciosos presentes en los alimentos, que constituye una herramienta muy útil para la evaluación de riesgos. Por otro lado, el uso de las técnicas de secuenciación masiva en muestras de aguas y alimentos presenta un gran potencial tanto para la detección como para la identificación de secuencias víricas en aguas y alimentos.❑

Referencias:

-CroCoudray-Meunier, C., Fraisse, A., Martin-Latil, S., Guiller, L., Perelle, S. 2013. Discrimination of infectious hepatitis A virus and rotavirus by combining dyes and surfactants with RT-qPCR. BMC Microbiology 13, 216–231.

-Fuster, N., Pinto, R.M., Fuentes, C., Beguiristain, N., Bosch, A., Guix, S. 2016. Propidium monoazide RTqPCR assays for the assessment of hepatitis a inactivation and for a better estimation of the health risk of contaminated waters. Water Research 101, 226–232.

-Kupferschmidt, K. 2016. Europe's New Hepatitis Problem. Science 353, 862-863.

-Lowther, J.A., Bosch, A., Butot, S., Ollivier, J., Made, D., Rutjes, S.A., Hardouin, G., Lombard, B., In't Veld, P., Leclercq, A. Validation of ISO method 15216 part 1 - Quantification of hepatitis A virus and norovirus in food matrices. International Journal of Food Microbiology doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2017.11.014

-Moreno, L., Aznar, R., Sánchez, G. 2015. Application of viability PCR to discriminate the infectivity of hepatitis A virus in food samples. International Journal of Food Microbiology 201, 1–6.

-Randazzo, W., D'Souza, D.H., Sánchez, G. 2018a. Norovirus: the burden of the unknown. En "Emerging Risks in Food Safety" (ISSN: 978-0-12-813977-6) pp. 13-54.

-Randazzo, W., Piqueras, J., Rodríguez-Díaz, J., Aznar, R., Sánchez, G. 2018b. Improving efficiency of viability-PCR for selective detection of infectious HAV in food and water samples. Journal of Applied Microbiology 124, 958-964.

-Randazzo, W., Vasquez, A., Aznar, R., Sánchez, G. 2018c. Viability RT-qPCR to distinguish between HEV and HAV with intact and altered capsids. Frontiers in Microbiology 9:1973. doi: 10.3389/fmicb.2018.01973

-Sánchez, G., Elizaquível, P., Aznar, R. 2012. Discrimination of infectious hepatitis A viruses by propidium monoazide real-time RT-PCR. Food and Environmental Virology 4, 21–25.

-World Health Organization. (2015). WHO estimates of the global burden of foodborne Diseases: Foodborne disease burden epidemiology reference group 2007-2015.

Contaminación cruzada en las industrias alimentarias. Aptitud microbiana para sobrevivir

La contaminación cruzada que se produce en la fase de postproducción es la principal causa de deterioro de la calidad microbiológica de los alimentos. Para poner en el mercado productos inocuos hay que tenerla muy en cuenta, así como la aptitud microbiana para sobrevivir a los procesos industriales.

Dr. Julio César Lamela Pérez
Especialista en Microbiología,
Especialista UNIT en Seguridad Alimentaria.
Asesor Consultor en Microbiología aplicada a la industria y riesgos biológicos en HACCP.
jlamela005@gmail.com
Tel.: +598 98 300 386
www.linkedin.com/in/julio-lamela-94743647

Introducción

La inocuidad de alimentos: según el *Codex Alimentarius* es la garantía de que un alimento no causará daño al consumidor cuando el mismo sea preparado o ingerido de acuerdo con el uso a que se destine. Los alimentos son la fuente principal de exposición a agentes patógenos, tanto químicos como biológicos y alergénicos. La pérdida de la inocuidad conlleva riesgos sustanciales para la salud de los consumidores y representa grandes cargas económicas para las diversas comunidades y naciones.

Es una de las principales preocupaciones de quienes tenemos la responsabilidad, pública o privada, de cuidar y mantener mediante vigilancia constante, la producción de alimentos sin riesgos para la salud del

consumidor, tarea compartida con todas las organizaciones mundiales dedicadas al tema (FDA, USDA, EFSA, PAHO, OMS, CODEX ALIMENTARIUS, etc.).

Para ello se ha trabajado a lo largo de décadas en la creación de sistemas de producción y control de alimentos que permitan un status de higiene óptimo para el consumo seguro.

"Ningún plan de muestreo puede asegurar que todos los elementos de un lote sean conformes. A pesar de ello, estos planes de muestreo son útiles para lograr una calidad aceptable" (Codex Alimentarius CAC/GL 50/2004)

Se estima que cada año enferman por ingerir alimentos contaminados 600 millones de personas en el mundo, causando 420.000 muertes. Los niños menores de 5 años soportan un 40% de la carga atribuible a las enfermedades de transmisión alimentaria, que provocan cada año 125.000 defunciones en este grupo de edad (PAHO/OMS, 2018).

Qué controles usamos para ofrecer al consumidor alimentos "seguros"

Programa de Prerrequisitos y Sistema APPCC

A nivel mundial los responsables de la seguridad alimentaria han creado a través de organizaciones gubernamentales y privadas, diferentes sistemas de control de los riesgos vinculados a la producción, tales como el Programa de Prerrequisitos y el Análisis de Peligros y Puntos Críticos de Control (APPCC), que permiten analizar riesgos considerados significativos y aplicar las medidas correctivas específicas con un concepto preventivo y sistemático dirigido a la prevención y control de peligros biológicos, químicos y físicos, por medio de anticipación y prevención, en lugar de inspección y pruebas en productos finales.

Complementando esta actividad preventiva, se han desarrollado otros controles como son los planes de muestreo de producto terminado.

Planes de muestreo de producto terminado para la toma de decisiones

Herramienta importante de verificación de las buenas prácticas en general, son los planes de muestreo para liberación de producto final, cuyo objetivo principal es minimizar el riesgo de liberar al mercado productos que puedan haber tenido un desvío en las etapas anteriores de aseguramiento.

Considerando la calidad microbiológica, los muestreos de producto terminado constatan en gran medida el proceso productivo posterior a los PCC, en especial la contaminación cruzada o recontaminación llevada a cabo en las líneas de almacenamiento y envasado posterior al PCC letal o cuando el producto queda expuesto al ambiente previo a su envasado primario.

Dentro de las recomendaciones internacionales para llevar a cabo planes de muestreo estadístico de alimentos, la adoptada por la mayoría de clientes y productores en el mundo es I.C.M.S.F. *(International Commission on microbiological specifications for foods).*

Estos planes de muestreo ofician principalmente como forma de verificar el cumplimiento de los sistemas de control preventivos de producción mediante detección y/o cuantificación de indicadores de higiene o indicadores patógenos.

Certezas y debilidades

A pesar de este elaborado sistema de vigilancia, vemos casos en los que resultan insuficientes para determinar si un producto está 100% apto para su consumo, debido a 4 variables:

1. Debilidades del plan de muestreo:
   - Desvío en la probabilidad de muestreo.
   - Variabilidad por condición física de la matriz.
2. Recontaminación.
3. Adaptabilidad microbiológica - Aptitud para sobrevivir a los procesos de control industrial.
4. Personal.

¿Qué debilidades puede tener un plan de muestreo?

Variabilidad en la probabilidad de muestreo

Las recomendaciones de muestreo de dos y tres clases (ejemplos clase 2: n=5 c=0, o clase 3: n=5

c=2 m=100 M=1000) se basan en los lineamientos dados por ICMSF basado en el riesgo biológico y su severidad así como en la probabilidad de desarrollo o no en la matriz.

De acuerdo a ello, se hace muy difícil, hoy en día, liberar un producto con la certeza de que el plan de muestreo, por amplio que sea, va a definir la aptitud basado solo en la sensibilidad del método de muestreo, del análisis, de la probabilidad estadística de detección de un indicador o microorganismo patógeno.

Variabilidad por la condición física de la matriz

Esta es otra variable que debemos tener presente a la hora de la toma de muestras ya que en matrices líquidas la distribución microbiana siempre es homogénea si se respetan factores como la agitación recomendada y la toma de la/las alícuotas de muestras sean representativas.

A diferencia de esto, las matrices sólidas, pueden contener, más allá de la agitación y la mezcla, una distribución no homogénea, pudiendo presentar zonas de mayor concentración del peligro buscado, llamados puntos calientes o *hot spots*, concentrando de forma muy desigual los microorganismos, respecto a otros muchos puntos (de muestreo) libres de ellos.

De esta manera, un plan de muestreo exigente puede aumentar la sensibilidad del método analítico y la probabilidad de detección, pero no será muy significativo en la medida que no logre captar adecuadamente la o las porciones de ensayo que tengan presente el patógeno.

Es claro que el muestreo, si bien es un elemento más de seguridad, necesita la certeza de una producción controlada desde el punto de vista de la higiene, ya que solo con muestreo de producto terminado, no es suficiente forma de asegurar un alimento innocuo.

Analizando la recomendación de muestreo donde se incrementa el n muestras según el riesgo de las dos variables más importantes, el riesgo en aumento de contaminación a partir del producto o el medioambiente, junto al incremento del riesgo basado en los microorganismos o sus toxinas, tenemos los planes de muestreo divididos en 15 casos diferentes según su evaluación y criticidad (**tabla 1**).

Ciencia y Experiencia
a su servicio

ENAC
ENSAYOS
Nº 229/LE519, 229/LE1409, 229/LE1296
entidad colaboradora de la administración hidráulica
ALKEMI

LABORATORIO DE ANÁLISIS Y ASESORAMIENTO TÉCNICO
QUÍMICA, MICROBIOLOGÍA Y GENÉTICA

Laboratorio Autorizado por el Ministerio de Sanidad y MARM
Empresa Colaboradora del Ministerio de Medio Ambiente
Acreditado para el control de Antibióticos y Residuos en Carnes

ANÁLISIS PARA
- Industria Alimentaria
- Residuos de Acción Farmacológica
- Patología Animal
- Aguas potables
- Vertidos industriales

ASESORÍA EN
- Proyectos de Calidad (ISO 9000)
- A.P.P.C.C.
- Normativa
- Control de Procesos

ALKEMI
Análisis y Consultoría

Central
E-mail: alkemi@alkemi.es
C/ Tierra de Barros, 2
28820 COSLADA (Madrid)
Tel: 91 673 91 49 • Fax: 91 673 91 48

Delegación Noroeste
Lugar Montemogos, 151. Beluso
36937 BUEU (Pontevedra)
Tel/Fax: 986 415 279

Delegación Castilla y León
C/Miriam Blasco P 147, 2ºB
47014 VALLADOLID
Tel/Fax: 983 34 59 74

www.alkemi.es

TABLA 1

Evaluación del riesgo: incremento de exigencias en plan de muestreo según variables del producto, ambientales o biológicas

Incremento del riesgo del producto o del medio ambiente

Incremento del riesgo microbiano o tóxico

Agente	Condiciones que disminuyen el riesgo	Condiciones que no modifican el riesgo	Condiciones que incrementan el riesgo
Deterioro ***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
Moderada	Caso 7 *n* = 5, c = 2	Caso 8 *n* = 5, c = 1	Caso 9 *n* = 10, c = 1
Seria **c = 0**	Caso 10 *n* = 5	Caso 11 *n* = 10	Caso 12 *n* = 20
Severa **c = 0**	Caso 13 *n* = 15	Caso 14 *n* = 30	Caso 15 *n* = 60

n = número de muestras por lote; c = número máximo de muestras permitidas entre m y M.

Fuente: ICMSF 2002

Tiene una característica, es finito, presenta como muestreo más exigente, n = 60 de, por ejemplo, 25 grs = 1.500 grs, en muchos casos, debe ser representativo de un lote conformado por toneladas de producto.

Esto reafirma la necesidad, al igual que el Sistema APPCC, de requerir el aseguramiento de los Prerrequisitos eficientemente instrumentados.

"Ningún plan de muestreo puede asegurar que todos los elementos de un lote sean conformes. A pesar de ello, estos planes de muestreo son útiles para lograr una calidad aceptable" *(Codex Alimentarius CAC/GL 50/2004)*.

Si bien se han tomado y se toman todos los recaudos para una producción de alimentos segura, (prerrequisitos, planes de muestreo exigentes, etc) no se ha logrado minimizar el crecimiento de brotes alimentarios en el mundo, con las repercusiones sanitarias y económicas que ello tiene.

Recontaminación

Existen debilidades que involucran el binomio "contaminación ambiental / adaptabilidad microbiana. podemos actuar sobre ellos mediante:

– Control eficiente de la contaminación ambiental e incorporando en las evaluaciones del riesgo la probabilidad de ocurrencia de la recontaminación post procesos biocida de forma más exhaustiva.

– Desarrollar e incorporar aún más la investigación científica de todas las variables microbiológicas, funcionales, metabólicas, estructurales y moleculares, que posibiliten una mejor evaluación del riesgo en los equipos APPCC, debido al constante cambio del comportamiento adaptativo microbiano.

En el 2005, la I.A.F.P. *(International Association for Food Protection)* organizó el Simposio Europeo de Seguridad Alimentaria en Praga, encuentro de importantes microbiólogos y especialistas en seguridad alimentaria, donde el tema insignia del encuentro fue: "Problemas de Recontaminación en las Industrias Alimentarias".

En este encuentro, se destacó la importancia de la inclusión de la recontaminación ambiental en la discusión de los nuevos lineamientos de control.

Existe una clara evidencia de que dos de los más importantes microorganismos causantes de ETAs (enfermedades transmitidas por alimentos) en la casuística mundial, tales como *Salmonella* spp. y *Listeria monocytogenes*, en los procesos Industriales donde el PCC se basa en tratamiento térmico, se deben en su gran mayoría, a recontaminación ambiental. Esto abarca desde un biofilm en las líneas de envasado, hasta la contaminación a partir de superficies de contacto en dosificadores o a partir de zonas contiguas.

Información de la OMS, en un estudio europeo de brotes realizado, indica que el 25% de los mismos fueron trazados a eventos de recontaminación.

Es evidente que en las producciones donde predomina la manufactura, fraccionado, exposición mayor al ambiente de los productos, recontaminación a partir de utensilios, mesadas y manos de operarios, tienen el mayor porcentaje; no así las grandes industrias, donde el principal elemento de riesgo es el biofilm generado por deficiente GHP.

Existen 3 variables importantes como rutas u orígenes de recontaminación en procesos de manufactura:

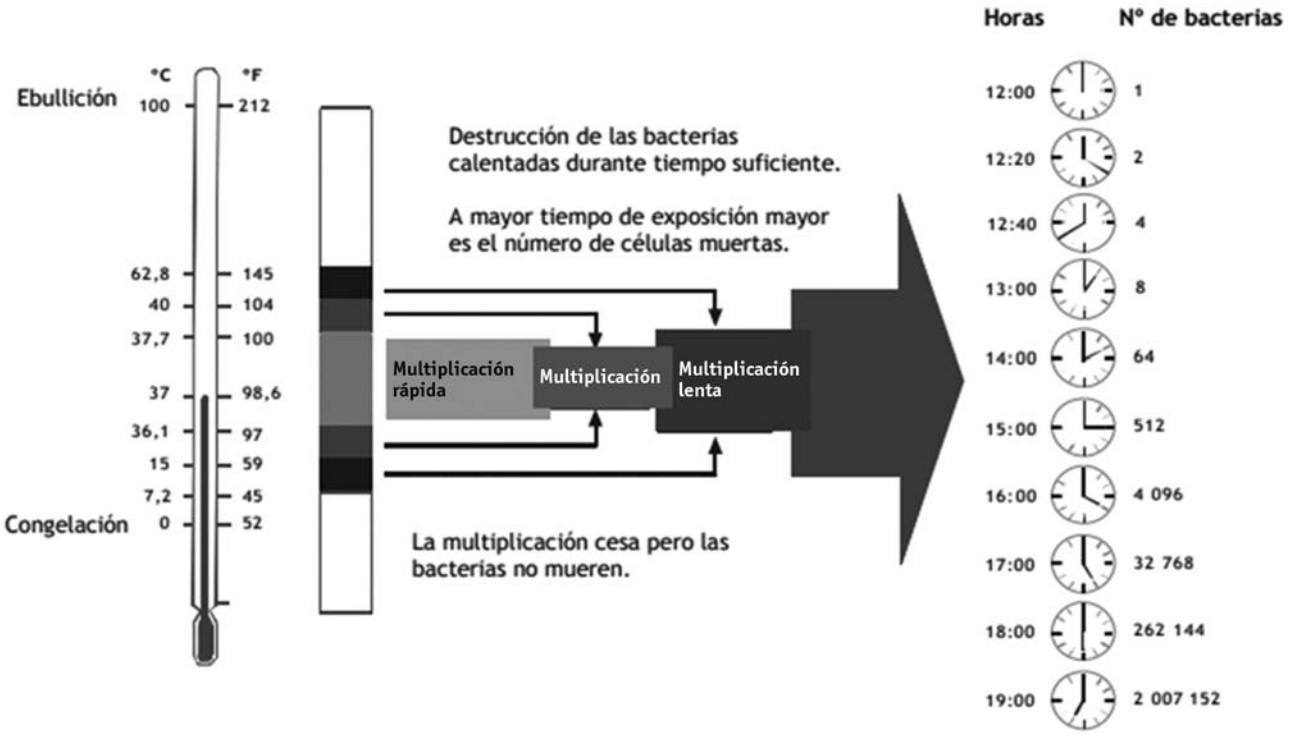
a.- Materia prima no procesada incorporada post proceso biocida (PCC).

b.- Mala higiene de superficies de contacto con alimentos.

c.- Personal de manufactura, prácticas no higiénicas.

FIGURA 1

Representación esquemática del efecto de las temperaturas y el tiempo en el crecimiento microbiano. Temperaturas de seguridad y de peligro para los productos alimenticios



Adaptado de: Jay, J., 1996.

Adaptabilidad microbiológica - aptitud para sobrevivir a los procesos de control industrial

Microbiología industrial

Las bacterias son los microorganismos más frecuentemente aislados en eventos relacionados a enfermedades transmitidas por alimentos, y esto lo logran sorteando todos los mecanismos de su control. Lo logran mediante un gran poder de adaptabilidad basado en varios mecanismos metabólicos, estructurales y moleculares, los cuales, no todos se tienen en cuenta a nivel de los procesos industriales y en los análisis de riesgo.

Estos se utilizan y/o expresan ante la adversidad medioambiental, permitiéndoles la sobrevida en el ambiente productivo y/o en la matriz alimentaria.

Ciertas condiciones ambientales adversas para las bacterias, intrínsecas de la matriz o extrínsecas del medio ambiente, tales como disponibilidad de agua libre (a_w) concentración de hidrogeniones, pH, concentración de oxígeno, potencial Redox, osmolaridad, temperatura, concentración de ácidos y álcalis, desinfectantes y otros, nos han servido durante muchos años como fundamento para definir en cada uno de los rangos de desarrollo óptimo para cada grupo microbiano, los llamados “parámetros de seguridad”.

En temas de inocuidad y salud pública, los *outliers,* los percentiles 5 y 95, importan, sobre todo hablando de morbimortalidad de seres humanos.

Con el desarrollo de la biología molecular, y la inclusión en aumento de herramientas diagnósticas, junto a la interacción con el conocimiento académico y de investigación, se han detectado infinidad de mecanismos por el cual las bacterias, ante una presión de selección impuesta por diferentes noxas externas, desarrolla defensas y escudos adaptativos a través de: cambios estructurales, cambios metabólicos y cambios moleculares, ya sean mutaciones propias o defensas adquiridas mediante transferencia genética entre cepas de la misma clona o clonas re-

TABLA 2

Ejemplos de evasinas y agresinas

Evasinas	Agresinas
• Enzimas/proteínas promotoras de formación de fibrina: clumping factor, proteína, coagulasa libre • Polisacáridos capsulares • Cambios en la pared (PBP) • Flagelos • Esporas	• Fosfolipasas • Proteasas • Hialuronidasas • Hemolisinas • DNAasas • Adhesinas • Fimbrias • Exotoxinas

TABLA 3

Principales adhesinas de diversos microorganismos

Microorganismo	Adhesina
Staphylococcus aureus	Ácido teicoico MSCRAMM* FnBPA Cna ClfA Ebps Proteína adherencia extracelular Bap
Staphylococcus epidermidis	AtlE Ácido teicoico MSCRAMM* Fbe (SdrG) Embp SSP-1 y SSP-2
Pseudomonas aeruginosa	Pili tipo IV CupA, B y C Flagelo
Escherichia coli	Fimbria tipo 1 Curli Flagelo

* MSCRAMM: Microbial surface components recognizing adhesive matriz molecules.

lacionadas filogenéticamente.

Se pueden establecer estadísticamente los rangos de crecimiento y desarrollo óptimo de grupos bacterianos. Lo que no se puede, es subestimar la capacidad de adaptación de los microorganismos, resultando en brotes alimentarios que ocurren en matrices consideradas "seguras" o imposibles de desarrollar o transportar microorganismos patógenos.

Es así como se han detectado brotes alimentarios ocasionados por *Escherichia coli* O157 H7, causante de síndrome urémico hemolítico con sidra en el año 2003, con pH de 2,8 a 3,0; casos de salmonelosis ocasionados por productos desecados con 0,2% de a_w y casos de listeriosis en cremas heladas congeladas entre otros.

Si bien en estos dos últimos casos no hay generación ni duplicación bacteriana, encontramos una permanencia por meses o años en estado de dormancia hasta que se produce la rehidratación de la matriz contaminada, o el cambio de condición atmosférica, como la temperatura, o nutricional. Con ello bastó con su hidratación y salida de situación de estrés y para el despliegue de todo su arsenal patogénico y virulento en poco tiempo.

Por estas razones, es esencial conocer los mecanismos y atributos microbianos implicados, así como conocer su poder patogénico, su dosis infectiva. Debemos "prevenir" y manejar mucho más eficientemente todas las prácticas y procedimientos que eviten la permanencia de microorganismos patógenos en el entorno de producción.

Otros elementos a tener en cuenta a la hora de un análisis de riesgo son las dosis infectivas y si se trata de un patógeno primario o secundario. El patógenos primario posee todo el arsenal de virulencia y es capaz de ocasionar enfermedad en pacientes incluso inmuno competentes a muy bajas dosis, 10 a 100 ufc/g (*Salmonella spp. E. coli* verotoxigenicas, *Shigella dysenteriae,* etc), los patógenos secundarios, necesitan una concentración en la matriz, en algunos casos mayor a 1.000.000 ufc/g para generar 1 a 3 µg de enterotoxina en el alimento y así producir enfermedades (*Staphylococcus aureus* fagotipo II o *Bacillus cereus,* por ejemplo).

Estos últimos, poseen un riesgo extra, poder formar toxinas en procesos intermedios de la cadena (almacenamiento de producto y/o formación de biofilm) y por ser éstas termoresistentes, sortear el PCC y generar contaminación de los alimentos y brotes alimentarios, sin haber contado una sola colonia en el producto final de esos microorganismos.

Microorganismos y ambiente

Las bacterias, microscópicas, pueden y seguro están, en aquellos lugares del ambiente de menor tránsito y de mayor contenido de nutrientes para la sobrevida: Agua y materia orgánica fuente de C, N, y P, y otros.

El diseño, el *layout,* los equipos, todo debe tener, fácil acceso a la limpieza y remoción, para establecer un buen sistema de saneamiento e higiene.

"If you can't see it and you can't reach it, you can't clean, inspect or sample it".

Esto requiere equipos multidisciplinarios, por ejemplo a la hora de la compra de equipamientos o de diseño de salas de proceso, incluyendo el conocimiento microbiológico junto a los ingenieros y personal responsable de la seguridad alimentaria.

En un ambiente de producción con indicadores de microorganismos patógenos presentes de forma crónica, tales como *Salmonella spp* L y/o *Listeria spp.*, es muy probable que se detecten resultados positivos, pero también es muy probable se estén liberando falsos negativos al mercado, los cuales no fueron detectados por los *screening* analíticos debido entre otras cosas a la probabilidad de muestreo que señalábamos con anterioridad, no detectando los patógenos en la porción de ensayo estudiada.

Atributos microbianos que se deben tener en cuenta en los análisis de riesgo de producto y ambientales

Estructuras con implicación en la sobrevida y/o colonización ambiental

Las bacterias, presentan dos grandes grupos de elementos de patogenicidad, estudiados muy bien en medicina humana, que tienen que ver con aquellos atributos que le confieren la posibilidad de evadir la respuesta inmunitaria del huésped, agrupadas bajo el término evasinas, y aquellas que le permiten internalizarse y generar enfermedad en el huésped, llamadas agresinas (**tabla 2**).

Muchas de éstas, las utilizamos en microbiología industrial, tanto para realizar diagnóstico de laboratorio, como para realizar un correcto análisis del riesgo (**tabla 3**).

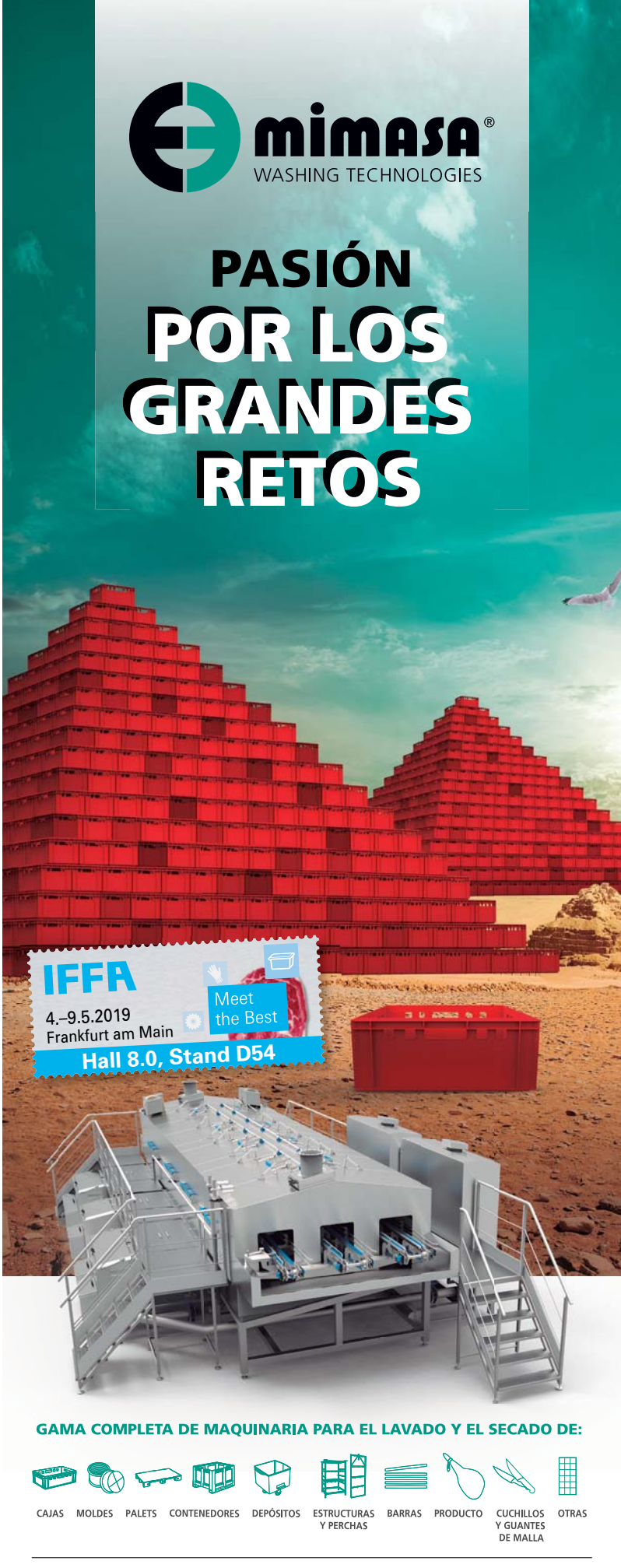


FIGURA 2

Ultra-estructura de la célula bacteriana

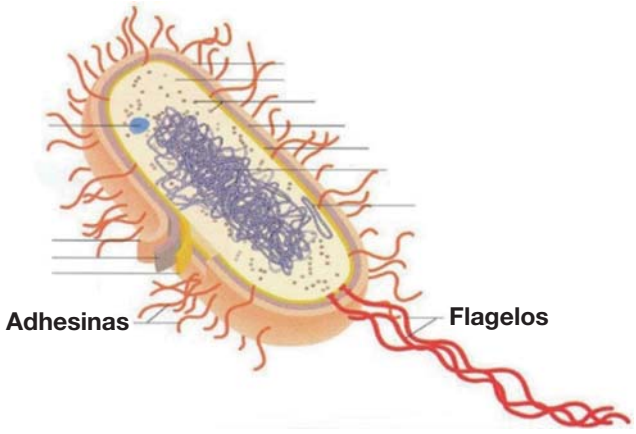
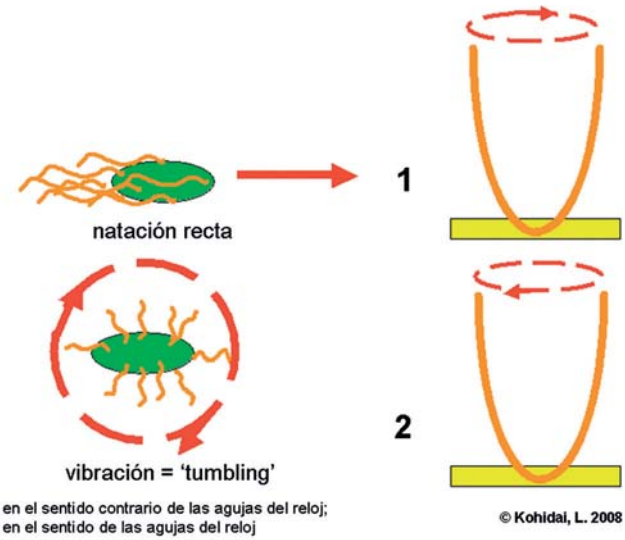
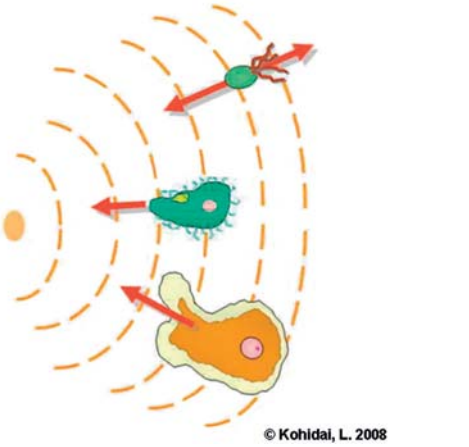


FIGURA 3

Correlación de la natación y el comportamiento de rotación flagelar





Atributos que favorecen la contaminación ambiental

Apéndices superficiales: flagelos y fimbrias (adhesinas).

Flagelos: Estructuras proteínicas helicoidales que se extienden a la superficie externa que poseen algunos grupos bacterianos, confiriendo movilidad a las mismas, provocando su dispersión en el ambiente, a través de un movimiento Browniano, en ambientes con grandes colecciones de agua en las superficies de piso y equipos favoreciendo la difusión de las mismas (**figura 2**).

Fimbrias, adhesinas y pilis: también de estructura proteínica, más delgadas y cubren toda la superficie de las bacterias, no confieren movilidad, sino participan en los mecanismos de adherencia, tan importantes en la conformación de los biofilms como en superficies de contacto a material inerte con restos orgánicos, sobre todo glucídicos, tal como ralladuras o soldaduras de acero inoxidable sin terminación sanitaria, de superficie rugosa.

Esta unión, si se da en material 100% inerte, se produce por factores tales como: fuerzas de van der Vaals, reacciones hidrofóbicas, etc.

La adherencia microbiana, de muchos Gram negativos como Gram positivos que cuentan con este atributo, son los responsables de los fracasos en la higiene y sanitizado de equipos y líneas de producción. Es usual ver lavados por arrastre de agua, cuando la contaminación microbiana ocurrida en la etapa de producción requiere una verdadera limpieza por remoción mecánica, enjuague y desinfección.

Los microorganismos Gram positivos también presentan filamentos que de una forma u otra colaboran en la adherencia microbiana.

Staphylococcus aureus por ejemplo, entre otros factores de unión, tienen unas adhesinas para formar el *slime* (biofilm más delgado y débil generado por la mayoría de los Gram positivos) conformando el complejo de adhesinas de proteínas llamado MSCRAMM.

Cuando hablamos de estos factores de adherencia, en general nos referimos a patógenos que hacen de este atributo su forma de resistir los efectos mecánicos de arrastre y se instalan, como es en el caso del huésped, para poder actuar con otros mecanismos patogénicos que poseen.

Salmonella spp. y *Eschericiha coli,* dentro de los Gram negativos, así como *Listeria monocytogenes,* dentro de los Gram positivos, han sido los más estudiados en la academia como actores importantes de contaminaciones industriales.

Investigaciones han confirmado la habilidad de *Salmonella* spp. para colonizar diferentes superficies de contacto inertes formando biofilms y constituyendo el principal reservorio o nicho desde donde se produce la principal fuente de contaminación de alimentos (Bonafonte *et al.,* 2000, Hood & Zottola 1997, Joseph, Otta & Karunasag 2001).

Quimiotaxis: la quimiotaxis es un fenómeno químico que presentan ciertas bacterias que cuentan con flagelos de movimiento, y por gradientes de concentración, se mueven hacia un lado u otro dependiendo si es en búsqueda de compuesto orgánico, como glucosa, o evadiendo desinfectantes u otros productos químicos como forma de sobrevida.

La movilidad requiere de una señal de transducción recibida por receptores de membrana que identifiquen gradientes químicos, llamados *"methyl accepting chemotaxis proteins"* (proteínas quimiotácticas que aceptan grupos metilo) (MCPs).

Nota: El atributo de la quimiotaxis hace que debamos tenerlo presente a la hora de los procesos de limpieza y enjuague, ya que ambientes con mucho depósito de agua en las superficies, permiten la difusión y extensión de los microorganismos móviles en el ambiente y/o equipos de envasado.

Polisacáridos capsulares: otro de los atributos microbianos es la formación de polímeros, polisacáridos conformando un verdadero escudo de protección, junto a otros componentes, como mureína y alginato.

Existen también cápsulas de polipéptidos y proteínas, además de carbohidratos que si bien forman parte de las llamadas "evasinas" precisamente para evadir el sistema inmunitario y celular del huésped, en el ambiente, colabora y mucho en la protección externa, junto con la mureína segregada por algunas especies, en la conformación de biofilm, evadiendo la acción de detergentes y desinfectantes.

El apoyo del laboratorio de alimentos cuando se dan contaminaciones en líneas de producto, puede predecir la existencia de un biofilm cuando observa en el material contaminado abundante desarrollo de colonias mucosas, elementos de adhesión y resistencia a desinfectantes.

FIGURA 4

Características fenotípicas macroscópicas y microscópicas de bacterias con cápsula

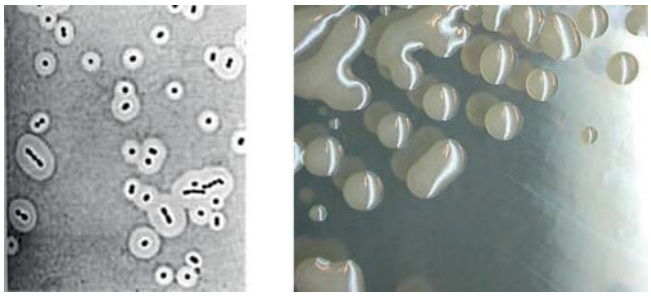
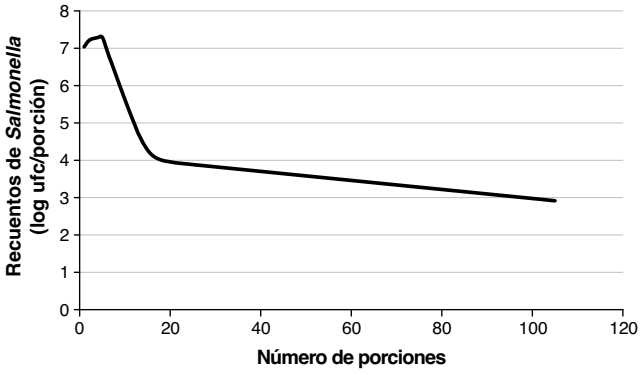


FIGURA 5

Modelo de transferencia (5 parametros) de *Salmonella Typhimurium* DT104 durante el picado de porciones de cerdo



El estudio de las contaminaciones de producto, en subprocesos mediante hisopados o a partir de producto terminado, es de gran ayuda haciendo diagnósticos fenotípicos y bioquímicos de flora predominante, determinando género o especie, el origen de la contaminación, si tiene la facultad de esporular o no, de formar cápsula o no, etc (**figura 4**).

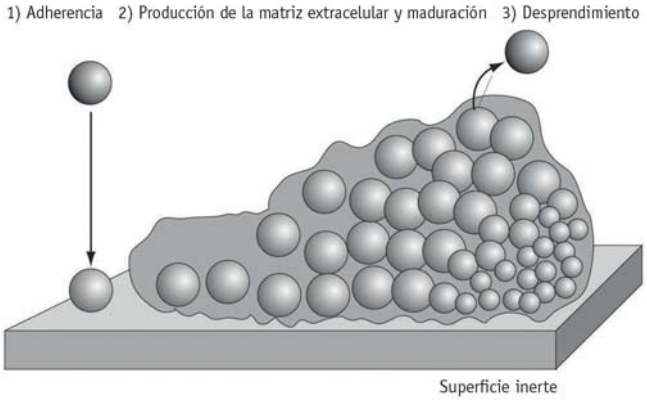
La adhesión y formación de polisacáridos, son dos de los atributos más importantes en la génesis de los biofilm, principal causa de contaminación en ambiente y líneas de producción industrial.

Biofilm: se ha demostrado formación de Biofilm en superficies inertes, en acero inoxidable (Kusumaningun *et al.,* 2003) y en gomas y poliuretano (Chia, Goulter, 2009).

Existen situaciones favorecedoras de formación de biofilm en las caras internas de líneas de producción tales como:

FIGURA 6

Esquema simplificado de los pasos de un biofilm para adherir, crecer y contaminar



Fuente: Jordi Vila, Alex Soriano y José Mens

a.- Superficies rugosas (juntas, soldaduras no pulidas, plásticos o ductos corroídos).
b.- Sistemas de lavado CIP.
c.- Importante un diseño en línea sin la generación de fondos de saco o zonas de estancamiento.
d.- Trayectos cortos de lavado, no lineales por muchos metros, ya que la velocidad de flujo del detergente o removedor de suciedad es 0 mt/s contra la pared, se debe lograr flujo turbulento en toda la línea, para genere una mayor eficiencia de remoción y penetren los detergentes y desinfectantes.

A partir de un nicho, se produce una constante transferencia de microorganismos de éste al ambiente (**figura 6**), se puede observar, en un estudio en playa de faena porcina, que si bien el primer desprendimiento de bacterias es importante cuando comienza la producción, existe un efecto dilución, aunque cada vez en menor cantidad, se mantiene la constante contaminación del patógeno al producto.

El biofilm es un complejo ecosistema microbiano, formado por una o varias especies de microorganismos inmersos en una matriz extracelular y productos orgánicos dentro de sus componentes básicos, dependiendo del ambiente y del tipo de proceso industrial que se desarrolle, así como de las colonias que lo colonicen.

Según la composición bacteriana, puede tener muchas especies involucradas, ventaja que promueve una fuerte adhesión a la superficie, o una débil adhesión, por microorganismos con una escasa o ausente presencia de fimbrias.

Los biofilms con mayor variedad de especies en su matriz, logran formas de resistencia mayor a ciertos desinfectantes, como a los amonios cuaternarios u otros biocidas (Meyer 2005).

La microbiota de cada biofilm y su desarrollo y permanencia, estará condicionada por aquellos microorganismos que tengan las características de resistencia, desarrollo nutricional y atmosférico donde se forme el mismo, dependiendo de sus necesidades atmosféricas (concentración de O_2, aerobiosis o anaerobiosis, temperaturas de desarrollo, donde predominarán microorganismos psicrotrofos, mesófilos, termófilos, etc, según las condiciones ambientales de la matriz.

Si bien hay estudios de cada uno de los microorganismos que preocupan a elaboradores por su alta incidencia en brotes alimentarios (*Listeria monocytogenes, Salmonella* spp, patotipos de *Escherichia coli* y *Staphylococcus* coagulasa positivo, entre otros), daremos el ejemplo de *Listeria monocytogenes,* por su importancia en morbimortalidad mundial.

Los biofilms fomados por *Listeria monocytogenes* están compuestos mayormente por acido teicoico sumado a polisacáridos extracelulares y proteínas. Posee un gran poder de adherencia mediado por fimbrias y flagelos, lo que le permite extenderse en las superficies, dada su movilidad.

Es un microorganismo psicrótrofo, con gran poder de duplicación en temperaturas de refrigeración. A 7° C puede llegar a multiplicarse por 5 generaciones, de acuerdo a modelos de simulación de desarrollo microbiológico, y debido a este poder, sumado a la adherencia, puede ser un importante colonizador en tanques de almacenamiento.

Además, una característica que lo hace perdurar por más tiempo en un biofilm, sobre todo en la matriz profunda, es ser un microorganismo microaerófilo, que se desarrolla con tensiones de oxígeno bajas.

El biofilm le confiere resistencia a tratamientos superiores a 60ºC, lo que lo hace más difícil erradicar con sistemas de lavado CIP.

Posee una batería de genes que codifican para la movilidad (fliQ, FliA, fli1, MotA) además de otros reguladores de éstos, y el movimiento desplegado por éste, es una condición que favorece la formación del biofilm, por la difusión en superficies de contacto y suelos. (Alonso *et al.,* 2014)

Esporulación

Existen géneros bacterianos, tales como *Bacillus* spp. y *Clostridium* spp. que poseen la facultad de formar esporas, formas metabólicamente inertes que posibilitan a este grupo de bacterias una forma de resistencia a condiciones adversas de vida.

Este mecanismo, puede generar contaminaciones de producto terminado por ser muchas de las esporas resistentes a las temperaturas de tratamiento que constituyen los PCC.

En este último caso, es importante conocer la calidad de las materias primas, así como realizar estudios de cinética bacteriana que contemplen la destrucción de dichas esporas.

Dentro de los patógenos conocidos, tenemos por parte de las bacterias aerobias mesófilas del género *Bacillus* spp., a *Bacillus cereus,* enterotoxigénico, y dentro de los bacilos Gram negativos anaerobios, del género *Clostridium: C. perfringens,* y *C. botulinum,* entre otros, como principales causantes de brotes en la casuística mundial.

Mecanismos moleculares de resistencia

Resistencia al ácido. *Listeria monocytogenes*

Listeria monocytogenes posee una serie de mecanismos que le permiten adaptarse y contrarrestar los tratamientos de ambiente con ácidos, así como la permanencia en alimentos ácidos con pH menores a 5. Un mecanismo empleado por *L. monocytogenes* para la supervivencia a pH bajo es la respuesta adaptativa de tolerancia al ácido (ATR) en la que un corto período de adaptación a un pH no letal induce cambios metabólicos que permiten al organismo sobrevivir a un pH bajo.

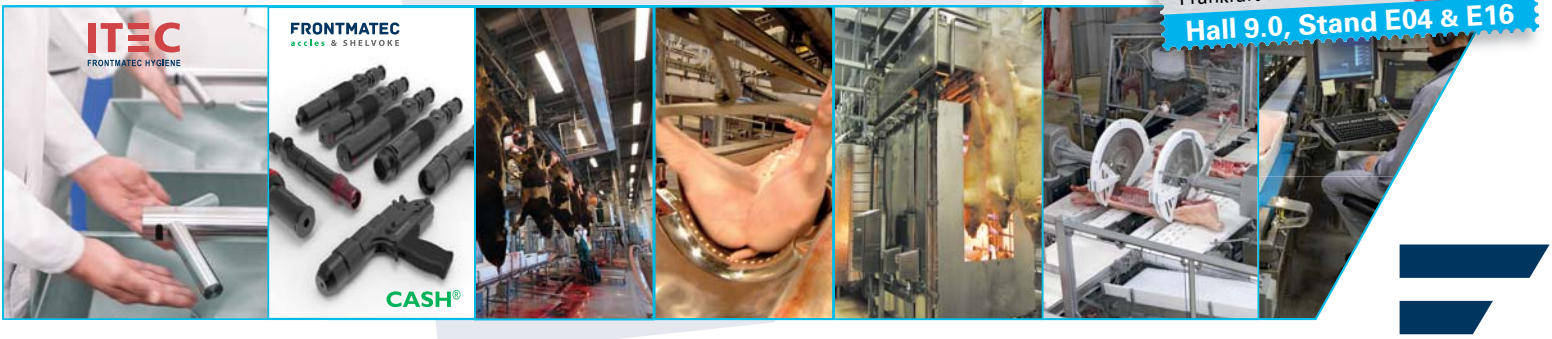
La superación de las condiciones ácidas por *L. monocytogenes* implica una variedad de respuestas regulatorias, como por ejemplo los componentes del regulón σ (sigma B), los cambios en la fluidez de la membrana, la bomba de protones F0F1-ATPasa y al menos 2 sistemas enzimáticos que regulan la concentración interna de iones de hidrógeno (glutamato decarboxilasa y arginina deaminasa).

No está claro si estos mecanismos ejercen sus efectos protectores por separado o en conjunto, pero es probable que estos mecanismos se complementen.

Existen estudios que indican que el sistema glutamato decarboxilasa puede proteger a *L. monocytogenes* cuando el organismo está presente en jugos ácidos, yogurt, aderezos para ensaladas, mayonesa y atmósferas de CO_2 modificadas. El sistema glutamato descarboxilasa también tiene un papel en la protección de *L. monocytogenes* contra el ambiente

FRONTMATEC

Frontmatec desarrolla soluciones personalizadas líderes
para la higiene, sistemas de control y automatización para la industria alimentaria



- Soluciones completas e integrales para máquinas autónomas.
- Sistemas de higiene, ayudas ergonómicas al trabajo, sistemas automáticos, sistemas de subproductos y soluciones logísticas.
- El fabricante líder mundial de herramientas aturdidoras.
- Sistemas de medición online para clasificación de canales.
- Innovadoras líneas de sacrificio para porcino, vacuno y ovino.
- Automatización del corte y de deshuese de la carne roja, incluida la logística y la gestión del almacén.
- Soluciones completas de control y automatización.

Para más información, contacte con nosotros en el 938 380 835
o por email a sallent@frontmatec.com

frontmatec.com

IMAGEN 1

Listeria monocytogenes adherida a rayadura en superficie de acero inoxidable

ácido del estómago. (Smith JL. Liu Y, Paolo GC. Can. J. Microbiol. Mar 2013).

El sistema Sigma B, en *Listeria monocytogenes,* está formado por subunidades de ARN polimerasa responsables de promover sitios de secuencias particulares de DNA.

Este promotor reconocido por la polimerasa se activa en situaciones que se pierde la homeostasis intracelular basal, generando mecanismos adaptativos como respuesta, ya sea a estrés oxidativo, ambiente ácido o carencia de fuente de carbono. (Nurcay Kocaman *et al.,* 2016).

Este es un tema no menor y preocupante, porque la presión de selección que determina un tratamiento con ácido (cítrico, aspártico, etc) a concentraciones subletales (provocado por uso a menor concentración a la indicada, o ambientes con grandes acúmulos de agua en las superficies), tiene un efecto doblemente negativo, ya que *Listeria monocytogenes* generará los mecanismos de sobrevida, perdurará más en el tiempo en ambientes de producción con el riesgo potencial de contaminación cruzada. De ocurrir un brote, algunas de estas cepas, poseerán un nuevo mecanismo de virulencia, la resistencia al ácido; ésta clona será ácido resistente y sorteará uno de los principales mecanismos de defensa que tiene el organismo de los seres humanos para evitar la colonización de bacterias patógenas, que es, después de la lisozima salival, el jugo gástrico con bajo pH.

Generando sentimiento de pertenencia, capacitando al personal, motivando e involucrando en las acciones de mejora, se puede generar un producto de calidad excelente e innocuo

Osmotolerancia (bajo a_w)

Existen en algunas especies diferentes mecanismos genéticos, en general transferibles a través de plásmidos, que regulan la osmolaridad interna de los microorganismos para poder resistir condiciones adversas medioambientales o propias de la matriz, como es el bajo tenor de agua disponible para el desarrollo y/o la sobrevida microbiana.

Algunas clonas bacterianas responden a la osmolalidad elevada mediante la acumulación de moléculas de bajo peso molecular, conocidas como solutos compatibles u osmolitos (debido a su compatibilidad con la fisiología normal de las células a altas concentraciones internas).

Un ejemplo es el patógeno neonatal *Cronobacter sakazakii,* que es osmotolerante y sobrevive en ambientes y productos desecados como por ejemplo las fórmulas infantiles para lactantes, cuya actividad de agua (a_w) es de 0,2 - inhóspita para la mayoría de los microorganismos.

Existen varios trabajos publicados de *Conobacter* spp. que estudian estos aspectos, como por ejemplo el publicado por A. Feeney, C. Johnston, R. Govender, J.O'Mahony, A. Coffey, y R.D Sleator, analizando el genoma de *C. sakazakii* BAA-894 que reveló siete copias del sistema de captación de osmolitos ProP. cuyo componente principal es la prolina.

Este uso de moléculas pequeñas para imitar estructuralmente solutos compatibles, podría ser una alternativa viable a los antibióticos para el control de este patógeno en alimentos de alto riesgo como la fórmula infantil en polvo.

Otros trabajos realizados, en este caso con *Listeria monocytogenes,* demuestran su capacidad para sobrevivir e incluso proliferar bajo una variedad de condiciones ambientales hostiles, particularmente osmolaridad elevada (10% de NaCl) y temperatura reducida (-0,1 °C). Según los autores del trabajo, esta adaptación resulta, al menos en parte, de la acumulación de similares moléculas de bajo peso o solutos compatibles, debido a su compatibilidad con procesos celulares vitales a altas concentraciones internas, tales como betaína, carnitina y prolina.

Otro trabajo demostró bajo el efecto del proceso de salmuera en productos lácteos con *Listeria monocytogenes* la presencia de proteínas de adaptación al estrés osmótico, (Nurcay Kocaman, 2016).

También existen otras estrategias de *Listeria monocytogenes,* desarrollando sistemas de transporte trans membrana, para incorporar en su citoplasma glicina, betaina y cisteina, incorporación importante en el desarrollo de *Listeria monocytogenes* bajo el estrés osmótico.

Estos sistemas actúan mediante bombas de eflujo transmembrana.

Personal operativo de primera línea

El primer día de clase en el Instituto de Normas Técnicas, hace 20 años me dijeron:

"La calidad la hace la gente".

Si bien existen protocolos, sistemas de operaciones, manuales, Normas, registros de las evidencias de todas las acciones tomadas por los funcionarios, depende de ellos su ejecución.

No es un tema menor, considero es "el tema" que debe preocupar a las Organizaciones, y se debe trabajar todos los días en el involucramiento del personal, solamente generando sentimiento de pertenencia, capacitando al personal, motivando e involucrando en las acciones de mejora, se puede generar un producto de calidad excelente e innocuo.

Referencias

- All over the Map. A 10-years Revew of State Outbreaks reporting. Center for science in the public Interest USA (1998 al 2007).
- **American Public Health Associations.** Compendium of methods for the Microbiological Examinations of Foods- Fourth edition.
- **Block, Seymour S.** Desinfections, sterilizations and preservations.
- **Carrasco, Elena; Morales-Rueda, Andrés; García-Gimeno, Rosa María.** Cross-contamination and recontamination by *Salmonella* in foods: A review. Department of Food Science and Technology, University of Cordoba, Spain.

- **CODEX ALIMENTARIUS.** Principios generales de la higiene de los alimentos CAC/RCP 1-1969
- **Cole, M.** 2005. Principles of microbiological testing: Statistical basis of testing: Statistical basis of sampling.
- Control of *Listeria monocytogenes* in Ready-to-Eat Food. Guidance for Industry – Draft Guidance. US Department of Health and Human services. Food and Drug Administration, Center for Food Safety and Applied Nutrition. January 2017.
- **Cordier, Jean Louis** (2005). The importance of recontamination as a cause of incidents – Status *vs* affairs. *Quality & Safety Nestlé Nutrition Operations.* Vevey, Switzerland IAFP.
- **Dahms, S.** Microbiological sampling plans – Statistical aspects, Berlin, Germany.
- **Feeney, Audrey; Johnston, Christopher D.; Govender, Rodney; O'Mahony, Jim; Coffey, Aidan and Sleator, Roy D.** Analysis of the role of the *Cronobacter sakazakii* ProP homologues in osmotolerance PUBMED.
- **Ferreira A, Sue D, O`Byme, Boor KJ.** Role of *Listeria monocytogenes* sigma (B) in survival of lethal acidic conditions and in the acquired acid tolerance response.
- **Gallé, Serena; García Gutierrez, Coral; Miguelez, Elisa; Villar, Claudio y Lombó, Felipe.** Mayo 2018. Biofilms in the food industry: Health aspects and control methods. Research Group BIONUC (Biotechnology of Nutraceuticals and Bioactive Compounds).
- **Holand, John and Smith, Debra** (2005). Risk ranking across recontaminations vectors in RTE food factories. Food Hygiene Department, Campben & Choleywood Food Research Association. UK- IAFP.
- **International Association for Food Production** – "Recontamination issues in food industries" – European Simposium on Food Safety – Prague. Czech Republic 2005
- **International Commission on Microbiological Specification for Foods.** Microbial ecology of foods. Factors affecting life and death of microorganism.
- **International Commission on Microbiological Specifications for foods.** Microorganisms in foods 8.
- **Kaneko, Ken Ichi, Hsayashidani, Hideki, Takahashi, Koki, Shiraki, Yasuo.** Bacterial contamination in the environmental of food factories processing Ready-to-Eat fresh vegetables. Department of Veterinay Medicine, Faculty of Agriculture. Tokyo. Japan.
- **Karatzas, F., Matlawska, K., Boyd, A., Wiedmann, M., Boor, J., and O'Byne, P.** Identification of components of the Sigma B Regulon in *Listeria monocytogenes* that contribute to acid and salt tolerance.
- **Kocaman, Nurcay** (2016). Review "Stress responses of *Listeria monocytogenes*". Department of food hygiene and technology. Ankara. Turkey.
- **Koneman, E., Allen, S., Janda, W., Schreckenberger, Paul C.** Diagnostic Microbiology. Fifth Edition.
- **Lelieved, H.L. M., Mostert, M. A., and Holah, J.** Handbook of hygiene control in the food industries. CRC New York. USA / Woodhead Publishing Limited, Cambridge. England.
- Microbial Technology. Microbial Process. Pepper & Prlman – Academic Press.
- **Reij, M.W., Aantrekker, ED Den** (mayo 2003). Review: Recontamination as a source of pathogens in processed foods - ILSI Europe Risk Analysis in Microbiology Task Force. Netherlands.
- **Salyers, Abigail A. and Whitt, Dixie D.** (2001). Bacterial pathogenesis: a molecular approach, Second Edition. Washington, DC: American Society for Microbiology Press.
- **Scott, Jenny,** Vice President, 2005. Overview: Recontamination events in the food industry – Food Safety Program – Food Products Association, Washington, DC - IAFP.
- **Sleator, Roy D., Gahan, Cormac G. M., Hill, Colin.** (2003). A postgenomic appraisal of osmotolerance in *Listeria monocytogenes.* Applied and Environmental Microbiology.
- **Smith JL., Liu Y, Paoli GC.** (Mar 2013). How does *Listeria monocytogenes* combat acid conditions? Can. J. Microbiol.
- The importance of hygienic zoning to prevent product contamination. 1. Grocery Manufacturers Association. 2010. Facility Design Checklist. 2. European Hygienic Engineering & Design Group. Hygienic Design Principles for Food Factories (VDMA Verlag, 2014)
- **Tompkin, R. B. and Gram, L.** (2005). Routes and sources of recontamination in operational practice. IAFP.
- **Wehr, Michael PHD. Frank, Joseph F. PHD.** Standard methods for the examinations of dairy products. 17th Ed. - Microorganisms in Food – Chapter 3 - Verifications of Process Control. Chapter 4: Verifications of Environmental Control. Chapter 5: Corrective Actions to Restablish Control. HACCP. GHP. *International Commission on Microbiological Specifications for Foods (ICMSF)* Volumen 8. e

New ISO reference and alternative methods Impact on food microbiology laboratories

David Tomás*
Nestlé Institute Food Safety & Analytical Sciences
Nestlé Research. Vers-chez-les-Blanc. Lausanne. Switzerland

Introduction

According to European Regulation EC 2073/2005 on microbiological criteria for foodstuffs, food business operators shall perform testing against the microbiological criteria when validating or verifying the correct functioning of the procedures based on HACCP and Good hygiene practice.

The EN/ISO analytical methods included in the regulation shall be applied as the reference methods. However, food business operators should have the possibility to use alternative analytical methods other than the reference methods, if the alternative methods are validated against the reference method in accordance with the protocol set out in EN ISO 16140.

The new ISO/EN reference methods, developed and validated by a multiple stakeholder collaboration and consensus, have been optimized and, in some cases simplified allowing a reduction of workload, costs and time to results compared with previous versions, without compromising the validity of the results.

Performance criteria included in the new standards brings also valuable information. Reference values (e.g. LOD, repeatability, reproducibility) are now available to compare against when the method is implemented in a quality control laboratory.

Last but not least, new methods have a direct impact on alterative methods validated against these standards. When changes in the standard are considered major with significant effect on method performance, re-validation and new verification should be conducted to guarantee results from the samples analysed are still valid.

Development and benefits from reference methods

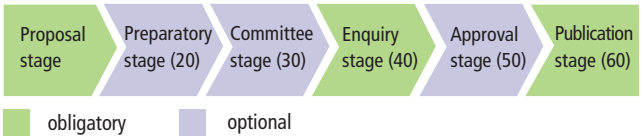
ISO/TC34/SC9 and CEN/TC275/WG6 are the groups responsible to propose the development, update or withdraw of reference standard methods in food microbiology.

ISO/TC34/SC9 manages 78 published standards and 20 standards under development. It includes 32 participant members and 32 observing members worldwide. Subcommittee includes 29 working groups.

CEN/TC275/WG6 includes 33 European countries.

The development of ISO methods is a long journey requiring several steps for approval:

Stages for developing ISO Standard



The use of ISO methods as a reference is preferred because they are:

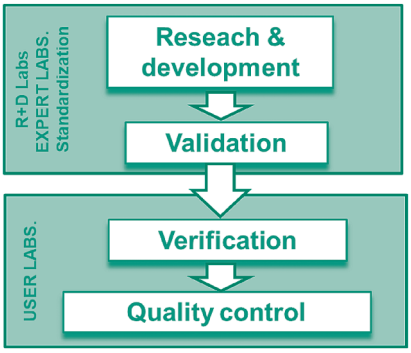
- Internationally recognized
- Included in regulations (less disputes)
- Easy to be accredited
- Worldwide use (accessible)
- Using non-proprietary technology
- Based on consensus and global expert opinion
- Developed through a multi-stakeholder process.

*david.tomasfornes@rdls.nestle.com

Implementation reference methods

In general, two stages are needed before a method can be used in a laboratory (ISO/DIS 16140-3:2017).

- *The first stage is the **validation** of the method; this is either conducted in several laboratories or in one laboratory*
- *The second stage is method **verification**, where a laboratory demonstrates that it can satisfactorily perform a validated method.*



Validation data included in reference methods provide performance characteristics to demonstrate the method is fit for purpose, but also to guarantee a good implementation when it is going to be verified by the user laboratory.

Some examples of the different performance characteristics available in the new published methods for both detection and enumeration methods are:

Example of enumeration methods from ISO 11290-2:2017: Enumeration Listeria monocytogenes *(see Table E.1)*

Example for detection methods from ISO 22964:2017: Detection of Cronobacter *spp (see Table D.1)*

It is important to consider the ISO detection methods have been validated for a maximum test portion (e.g. 10 g, 25 g). A smaller test portion may be used without the need for additional validation/verification provided that the same ratio between (pre) enrichment broth and test portion is maintained. A larger test portion than that initially validated may be used if a validation/verification study has shown that there are no negative effects on the detection of Salmonella *spp. Validation can be conducted according to the appropriate parts of ISO 16140. Verification for pooling samples can be conducted according to the protocol described in ISO 6887-1:2017, Annex D.*

In order to evaluate the impact of the new reference methods compared with previous versions, changes are classified in the introduction of each respective standard as:

Table E.1 - Results of data analysis obtained with cold-smoked salmon (from ISO 11290-2:2017)

Parameter	Cold-smoked salmon (contamination level of *Listeria monocytogenes*)		
	110 cfu/g (low level)	1 300 cfu/g (medium level)	13 000 cfu/g (high level)
Number of participating collaborators	15	15	15
Number of collaborators retained after evaluation of the data	15	14	15
Number of samples tested	30	30	30
Number of samples retained after evaluation of the data	30	28	30
Mean value Σa ($\log_{10}$ cfu/g)	1,85	3,04	3,95
Repeatability standard deviation s_r ($\log_{10}$ cfu/g)	0,13	0,10	0,12
Repeatability limit r:	—	—	—
as difference on $\log_{10}$ scale ($\log_{10}$ cfu/g)	0,37	0,28	0,32
as ratio on normal scale (cfu/g)	2,33	1,92	2,10
Reproducibility standard deviation s_R ($\log_{10}$ cfu/g)	0,18	0,19	0,19
Reproducibility limit R:	—	—	—
as difference on $\log_{10}$ scale ($\log_{10}$ cfu/g)	0,51	0,53	0,54
as ratio on normal scale (cfu/g)	3,26	3,37	3,44

Table D.1 - Results of data analysis obtained with milk based powdered infant food formula (from ISO 22964:2017)

Performance characteristic	Blank	Low inoculation level[a] 4 cfu/10 g	High inoculation level[a] 55 cfu/10 g
Number of participating collaborators	17	17	17
Number of collaborators retained after evaluation of the data	15	15	15
Number of samples per lab	8	8	8
Number of samples retained after evaluation of the data	120	88	120
Sample size (g/ml/cm²/item)	10	10	10
Sensitivity %	–	–	100
Specificity %	99	–	–
LOD_{50}, (95 % confidence interval) cfu/test portion	–	1,1 (0,8 to 1,4)	

[a] Milk based powdered infant formula (commercially available), containing bifidobacteria at a level between 1,0 E+6 cfu/g and 1,0 E+7 cfu/g, was inoculated with *Cronobacter sakazakii*.

***Major change** = technical change in the method that is expected to produce a different result.*

From the implementation in routine laboratories point of view, the activities to implement a method with major changes can include:

- *Evaluation of new media/supplier (ISO 11133)*
- *Acquisition of new strains*
- *Re-validation against new standard (only for alternative methods)*
- *Implementation new method version*
- *Beta-test*
- *Lab accreditation: new assessment may be required*
- *Verification*
- *Adapt templates*
- *Internal quality control/Method monitoring.*

***Minor change** = editorial change or a minor technical change in the method that is not expected to affect the result obtained with the method.*

From the implementation in routine laboratories point of view, the activities to consider could be:

- *Implementation of new method version*
- *Adapt templates*
- *Internal quality control/Method monitoring.*

Despite the previous classification, a change considered as major in the technical content of the method can be considered to be minor because no significant effect on the method performance characteristics or test results was observed.

Summary of reference methods on food microbiology published in 2017:

ISO Number	Microorganism/ toxin. Method description	Classification of the technical changes
10272-1; 10272-2	***Campylobacter* spp.** Part 1: Detection by enrichment or direct isolation Part 2: Plate enumeration	Minor changes
18465	**Cereulide** (*B. cereus* emetic toxin) Quantitative analysis using HPLC or UHPLC connected to LC-MS/MS	New method
22964	***Cronobacter* spp.** Detection by enrichment and isolation	Major changes: enrichment improved, scope enlarged
16654/ Amd.1	***E. coli* O157** Detection by enrichment and isolation	Minor changes: only inter-laboratory results included
21528-1; 21528-2	***Enterobacteriaceae*** Part 1: Detection by enrichment and isolation. Enumeration by MPN (informative annex) Part 2: Plate enumeration	Major changes: Enrichment reduced from 2 to 1 day New confirmatory tests Part 2: Minor changes
11290-1; 11290-2	***Listeria monocytogenes* and *Listeria* spp.** Part 1: Detection by enrichment and isolation Part 2: Plate enumeration	Minor changes: Enrichment reduced from 48 to 24 hours, simplification for confirmatory steps
6579-1	***Salmonella* spp.** Detection by enrichment and isolation	Minor changes
19020	**Staphylococcal enterotoxins** (SEA to SEE) Detection by extraction and dialysis + ELISA using commercially available detection kits	New method
21872	***Enteropathogenic Vibrio*** (*V. parahaemolyticus, V. cholerae* and *V. vulnificus)* Detection by enrichment and isolation	Major changes: Target *V. vulnificus.* Optional molecular identification methods
15216	**Enteric viruses** (HAV and norovirus GI and GII) Quantification on soft fruit, leaf, stem and bulb vegetables and food surfaces by RNA extraction and amplification real-time RT-PCR	Minor changes
10273	***Yersinia enterocolitica.*** Detection by enrichment and isolation	Major changes: Confirmation of pathogenic *Y. enterocolitica*, tests added. Changes in inoculation, isolation, incubation times