



Citometría de Flujo: Método rápido para el control microbiológico

Headquarters: Japón, Kobe (fundada 1968)

Central Europea: Alemania, Hamburgo

Central España: Barcelona, Sant Just

68 Filiales de Sysmex (EMEA: 28)

Número de empleados: 8,715 (EMEA: 1,888)

Línea de Negocio: Desarrollo, fabricación, venta, importación y exportación de equipos de diagnóstico, reactivos y software



Marta Masegosa
Masegosa.marta@sysmex.es

Together for a better
healthcare journey

Citometría de Flujo: Método rápido para el control microbiológico

Workshop Goals

- Los asistentes puedan comprender y llegar a debatir sobre los contaminantes que existen a nivel microbiano en las bebidas. Y cómo afectan al producto final.
- Los métodos convencionales no son lo suficientemente eficaces como para satisfacer las necesidades actuales del mercado.
- Dar a conocer la citometría de flujo como una alternativa existente y una de las respuestas más eficientes para el análisis de muestras.

Introducción a la Citometria de flujo
Soluciones para la industria
Aplicaciones en industria de bebidas



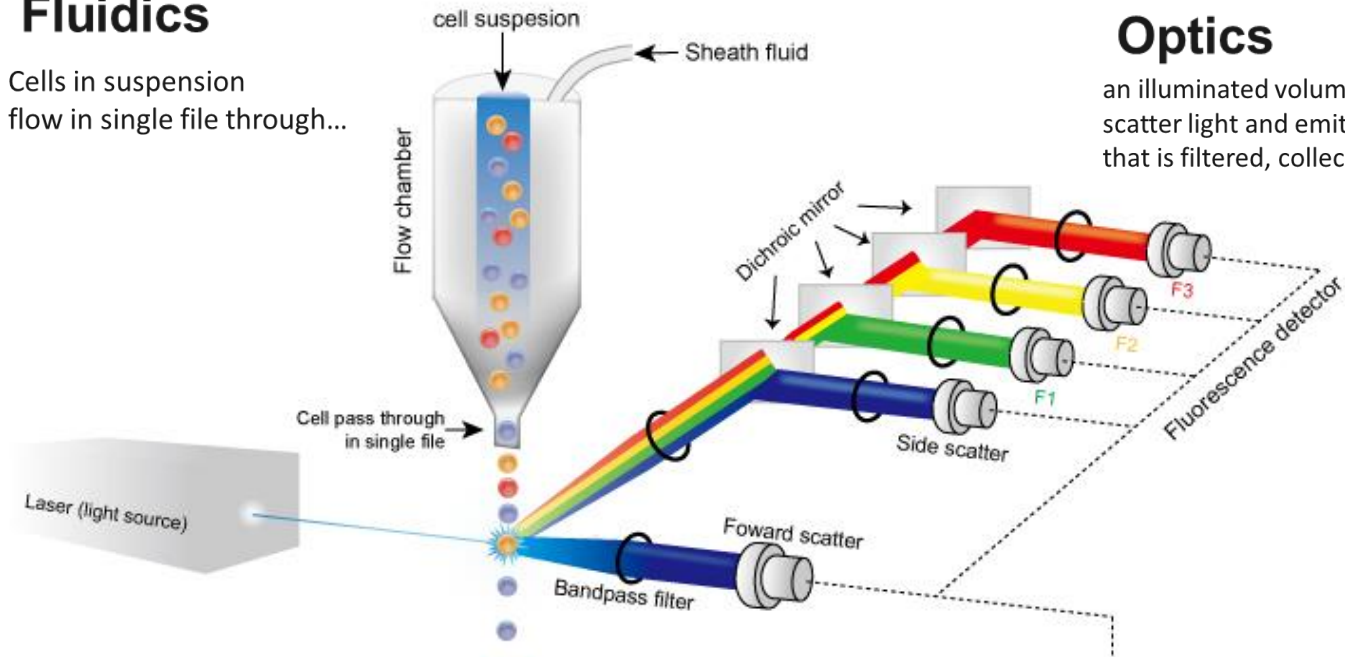
1. Introducción a la Citometria de flujo

Together for a better
healthcare journey

¿Qué es la Citometria de Flujo?

Fluidics

Cells in suspension
flow in single file through...




Optics

an illuminated volume where they
scatter light and emit fluorescence
that is filtered, collected and...

Electronics

converted to digital values
that are processed
and analyzed in a computer.

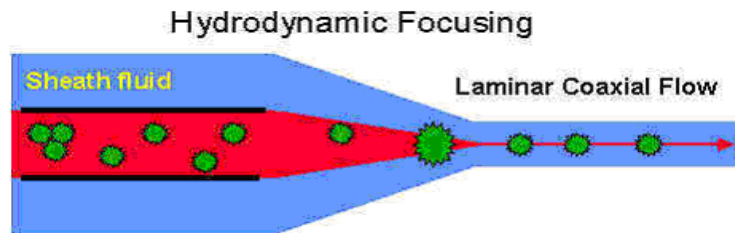


Introducción a la citometría de Flujo : Enfoque hidrodinámico

- Sin Sheath Fluid “Líquido de enfoque”

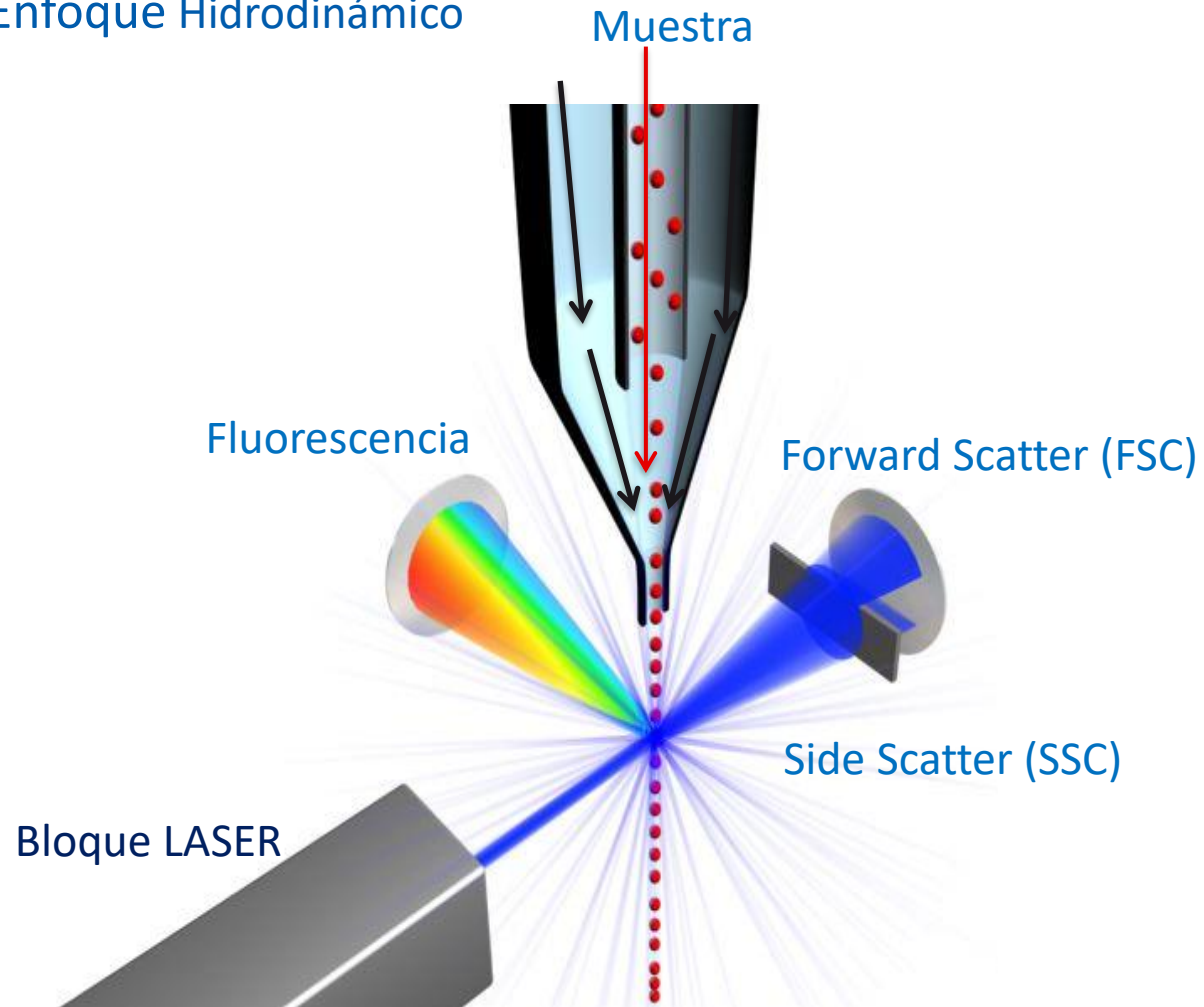


- Con Sheath Fluid “Líquido de enfoque”



Introducción a la citometría de Flujo: Principios

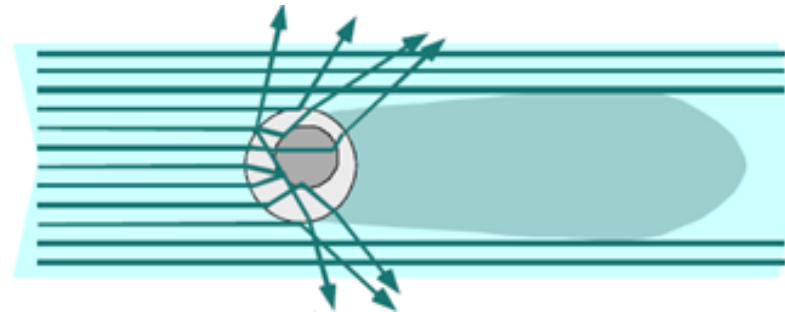
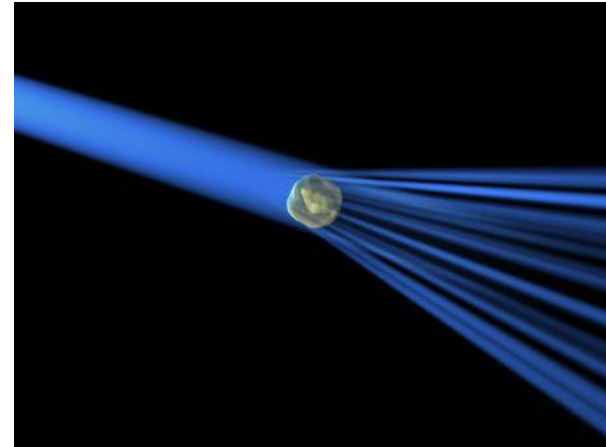
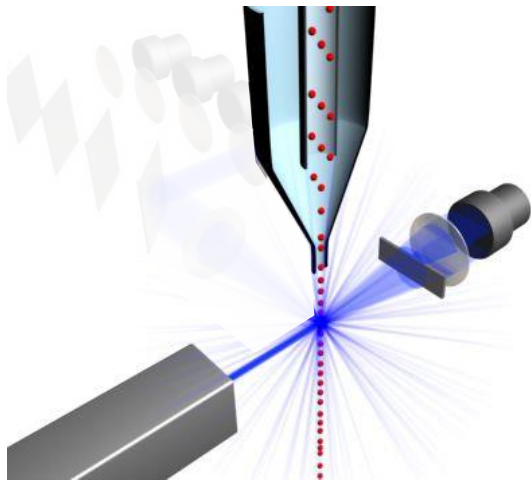
Enfoque Hidrodinámico



- Enfoque Hidrodinámico
- Diferentes señales analizadas:
 - FSC – Tamaño
 - SSC - Granularidad
 - FL - Fluorescencia

Introducción a la citometría de Flujo: Forward Scatter

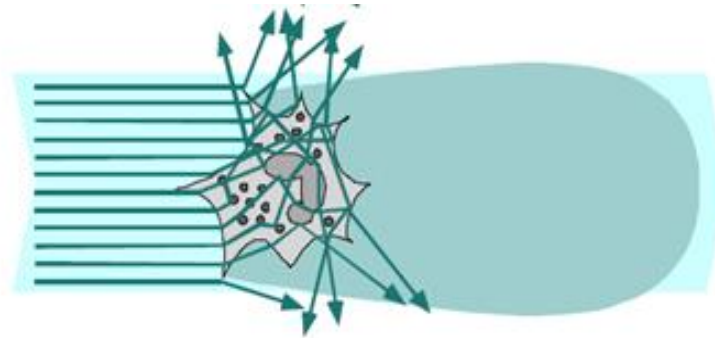
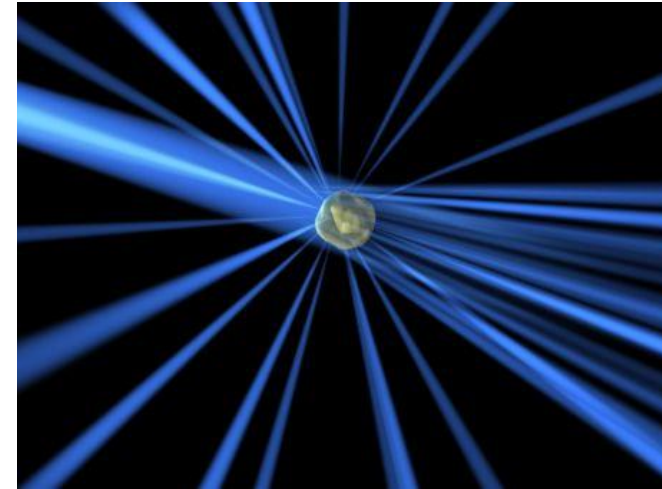
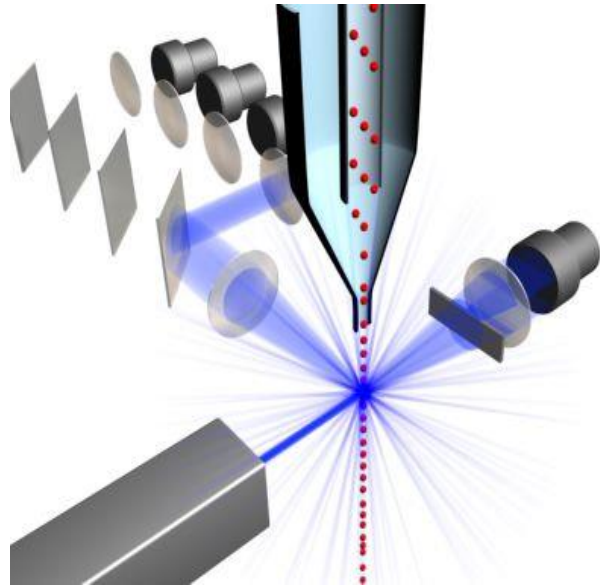
- **FSC = Forward Scatter = Tamaño**
- Luz difractada a bajo ángulo: informa del tamaño de las células



FSC = Forward Scatter

Introducción a la citometría de Flujo: Side Scatter

- **SSC = Side Scatter** = Granularidad Celular
- Luz refractada y reflejada en ángulos amplios: información sobre la estructura celular

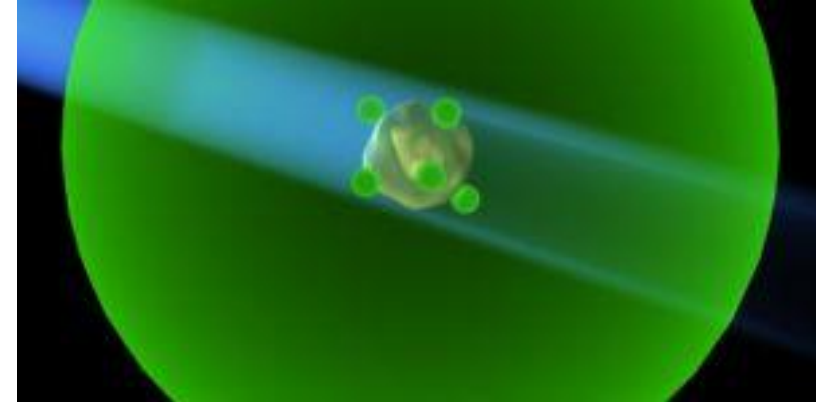
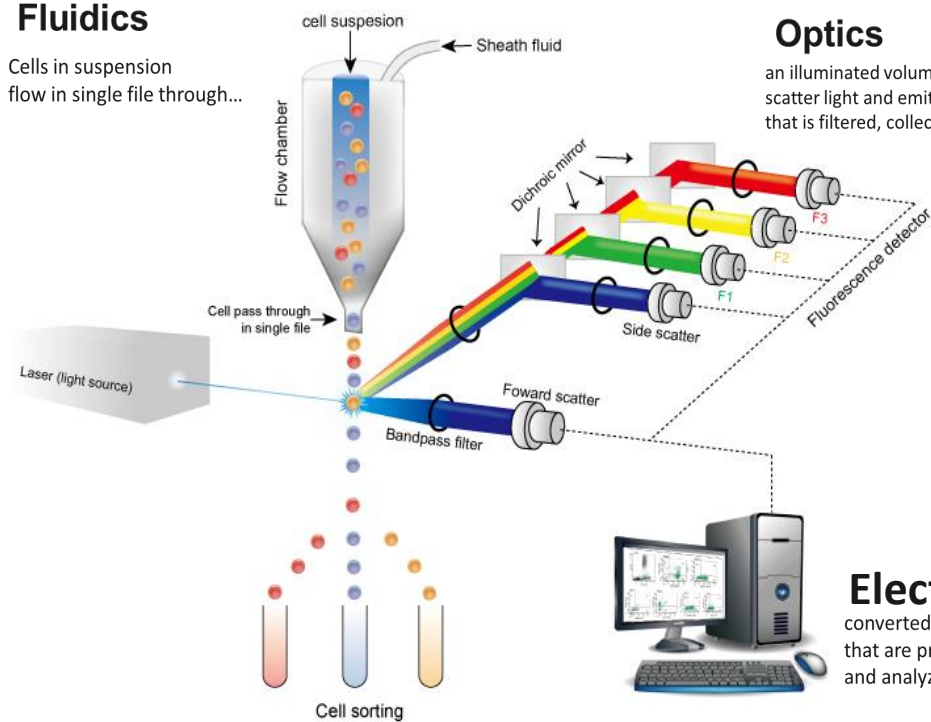


Introducción a la citometría de Flujo: Fluorescencia

- Señal de fluorescencia : FL
- Luz fluorescente emitida por los fluorocromos acopladas a la célula.

Fluidics

Cells in suspension flow in single file through...

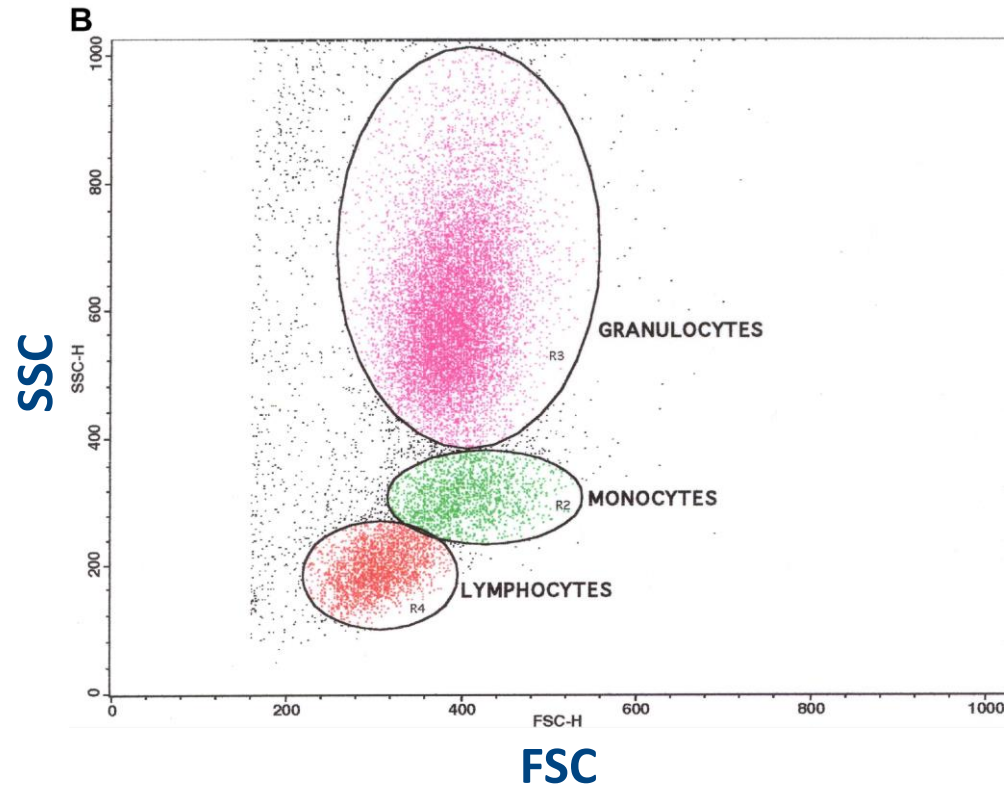


Intrínseca = Autofluorescencia

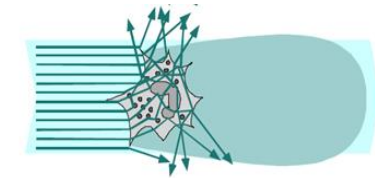
Extrínseca = Fluorocromo añadido

Introducción a la citometría de Flujo: Identificación

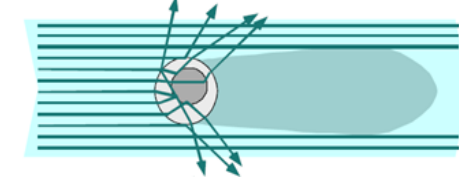
Ejemplo de identificación a través de tamaño y complejidad celular:



SSC = Granularidad Celular



FSC = Tamaño

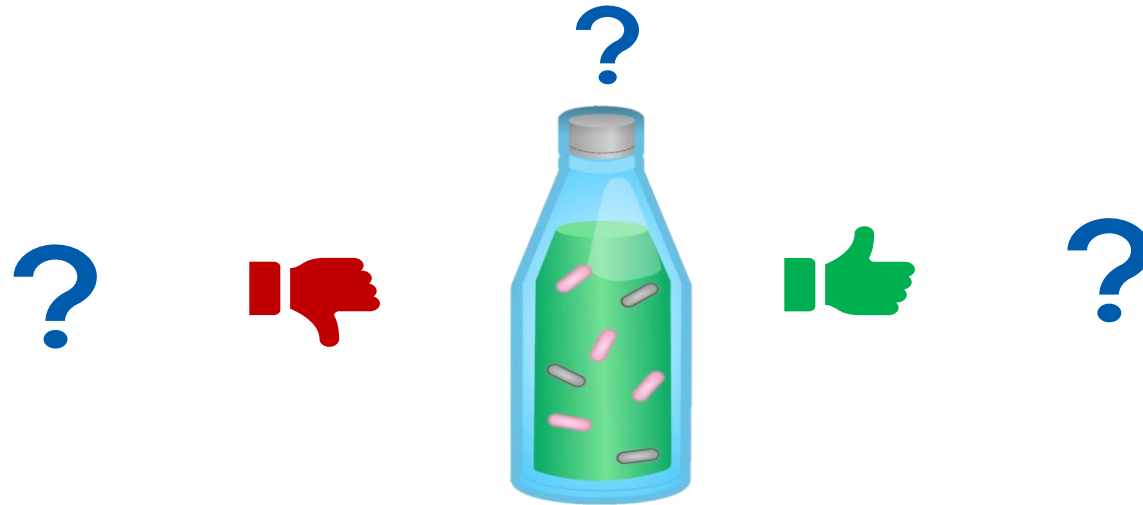


Introducción a la citometría de Flujo: Identificación Conclusión

- Tamaño de la célula
- Granularidad y complejidad Celular
- Fluorescencia



Microorganismos en bebidas: ¿buenos o malos?



En la industria de las bebidas es necesario distinguir entre microorganismos

 que son deseados y parte integrante del proceso de producción

 no útiles, no deseables o perjudiciales para el producto o el consumidor

Saccharomyces cerevisiae en procesos industriales



La levadura se utiliza, por ejemplo:

- elaboración de cerveza
- la destilación del whisky
- fermentación del vino

Los consumidores esperan bebidas sin defectos

- Libres de olores
 - Mal gusto
- » Por tanto, la mayoría de las bebidas deben estar libres de microorganismos



Fuentes de contaminación:

Durante el proceso de producción

Materia prima

Entorno de la fábrica

Estado microbiológico de los equipos y envases

Falta de higiene

Material de envasado (latas y botellas)

Efectos de las levaduras:

Producción de etanol

Superación de los límites legales para productos no
alcohólicos

Provocando el abombamiento de las latas o la
explosión de las botellas

Producción hidrocarburo volátil (pentadieno)

Dando un sabor de queroseno, plástico y/o pintura



Typical strains: *Saccharomyces*, *Brettanomyces*, *Hanseniaspora*,
Hansenula, and *Pichia*

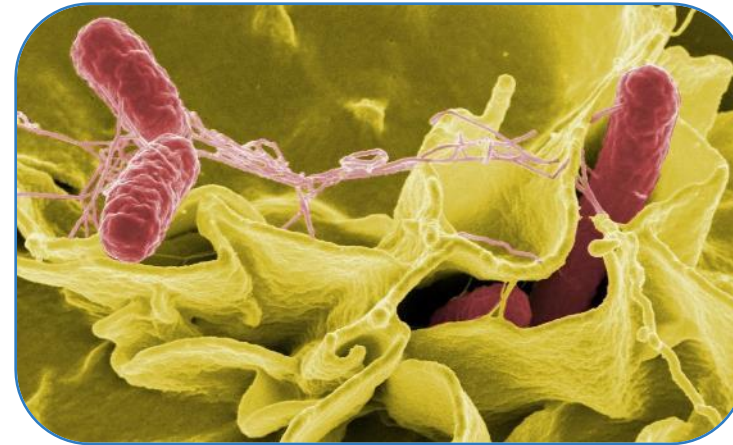
Efectos de degradación de las bacterias:

- Bacterias lácticas (BAL)
 - Producción de ácido láctico, etanol, acetato, formiato y diacetilo (sabor y olor a mantequilla)
- Bacterias del ácido acético (BAA)
 - Cambios de sabor, hinchazón del envase y formación de biopelículas en las superficies y el material de envasado
- Alicyclobacillus Olor y/o sabor a desinfectante



Efectos de las bacterias patógenas:

- Patógenos Entericos
 - » Enterohemorrhagic (EHEC) or Shiga-toxin-producing *E. coli*
 - » *Salmonella*
- *Listeria monocytogenes* y *Yersinia enterocolitica*
Listeriosis, monocitosis, gastroenteritis...





2. Soluciones para la Industria

Together for a better
healthcare journey

- Desde 1883, el análisis microbiano de las muestras se realiza mediante recuentos de cultivos en placa heterotrófica (HPC)
- Limitaciones de HPC:
 - Debilidad estadística del método.
 - Mano de Obra
 - Periodo necesario de cultivo






- » Tiempo de obtención de resultados: **2-14 días**
- » **Baja sensibilidad** (sólo UFC, sin detección de bacterias VBNC)
- » **Escasa** reproducibilidad
- » **Es difícil** tomar decisiones claras, rápidas y fiables
- » **Aumenta el stock** en almacén



1




Colocar el agar fundido en un baño de agua circulante a una temperatura de 44 °C a 46 °C

2




Pipetear la muestra de ensayo en el fondo de la placa de Petri. Prueba por duplicado

3



Verter 12 - 20 mL de agar fundido sobre el inóculo. Mezclar la muestra en todo el agar

4



Una vez endurecido el agar, incubar las placas invertidas de 48 h a 72 h.

5



Recuento de Colonias

Soluciones para la Industria: Citometría Flujo + Kits especializados

Citómetro de flujo: **CyFlow™ RI-300**

1 Láser: Azul 488nm

5 parámetros ópticos: FSC, SSC, FL1, FL2, FL3
















Muestreador Automático: **CyFlow™ AL-20** - 96 pocillos



Soluciones para la Industria: kits dedicados para cada aplicación

-  **OenoYeast™ Reagent Kit** : Actividad metabólica de levaduras en product acabado. Levaduras Vivas
-  **CyFlow™ BrettCount:** *Brettanomyces Bruxellensis- RNA (vitaes)*
-  **FlowVIT® *Dekkera anomala* RNA (vivas)**
-  **Yeast Control - Viability:** Cuantificación Levaduras en fermentación (Vitaes)
-  **CyStain™ GramCount** : Cuantificación de Levaduras y bacterias en producto acabado
-  **CyStain™ OenoCount:** Cuantificación y separación bacterias Gram+ y Gram –
-  **CyStain™ BacCount Total:** cuantificacion de bacterias totals
-  **CyStain™ BacCount Viable:** cuantificación bacterias vivas en muestra
-  **CyStain™ VitalCount;** cuantificación bacterias/mohos y levaduras
-  **FlowVIT® *Alicyclobacillus* RNA (vitaes)**
-  **Sticky Control Reagent** : Industria papelera
-  **CyStain™ VitalCount Cosmetics:** cuantificación bacterias
-  **SAFIA Micotoxins Kits**
-  **CyStain™ UV Ploidy:** Identificación de la ploidia (plantas, Individuos)
-  **CyStain™ PI Absolute P** : Identificación de la ploidia (plantas, Individuos)

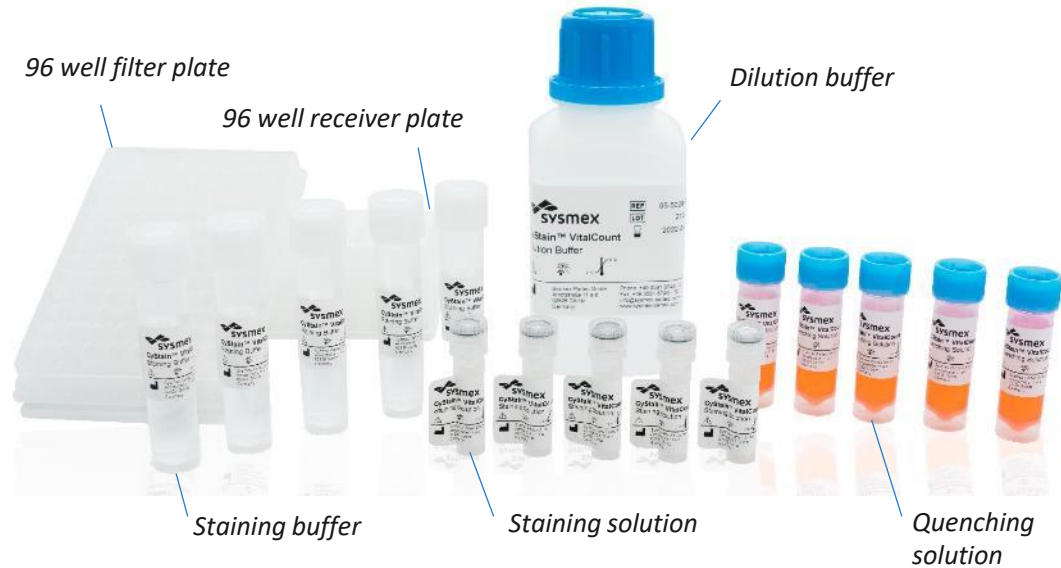
Soluciones para la Industria: CyStain VitalCount / Alicyclobacillus

-  **OenoYeast™ Reagent Kit** : Actividad metabólica de levaduras en product acabado. Levaduras Vivas
-  **CyFlow™ BrettCount:** *Brettanomyces Bruxellensis*- RNA (vivas- Muertas)
-  **FlowVIT® *Dekkera anomala***
-  **Yeast Control - Viability:** Cuantificación Levaduras en fermentación (Vitales)
-  **CyStain™ GramCount** : Cuantificación de Levaduras y bacterias en producto acabado
-  **CyStain™ OenoCount:** Cuantificación y separación bacterias Gram+ y Gram –
-  **CyStain™ BacCount Total:** cuantificacion de bacterias totales
-  **CyStain™ BacCount Viable:** cuantificación bacterias vivas en muestra
-  **CyStain™ VitalCount**
-  **FlowVIT® Alicyclobacillus**
-  **Sticky Control Reagent**
-  **CyStain™ VitalCount Cosmetics**
-  **SAFIA Micotoxins Kits**
-  **CyStain™ UV Ploidy**
-  **CyStain™ PI Absolute P**



Soluciones para la Industria: CyStain™ VitalCount

The CyStain VitalCount Kit:



Description	Volume	Quantity	Cap color
CyStain™ VitalCount Dilution Buffer	250 mL	1x	Blue
CyStain™ VitalCount Quenching Solution	3.5 mL	5x	Blue
CyStain™ VitalCount Staining Solution	120 µL	5x	White
CyStain™ VitalCount Staining Buffer	9.48 mL	5x	White

CyStain VitalCount: 480 test (AL)

Product	Article No.
CyStain VitalCount	05-5029
96 well receiver plates	04-2025
96 well filter plates	04-2026



Soluciones para la Industria: CyStain™ VitalCount

- ...es un Kit de detección y cuantificación
- Inespecífica de
- Bacterias Mohos y Levaduras vivas
- De manera rápida y automatizada
- En amplia gama de bebidas



CyStain VitalCount: Tipos de bebidas aplicables

Beverage Type	Examples
Fruit Juice	Apple Juice Orange Juice Banana Juice Multivitamin Juices
Carbonated soft drink	Cola Orange limonade Energy drinks Isotonic / sport soft drinks apple spritzer
Non-carbonated soft drink	Juice concentrate drinks
Ice Tea	Black, peach & hibiscus Green, lime & mint
Coffe drinks	Prepackaged coffe drinks
Fermented Drinks	Kombucha Organic fermented beverages
Alcoholic	Alcopops Hard Seltzer
Other	Flavored Water Smoothies Coconut Water



CyStain VitalCount: Target de mercado

VitalCount está destinado a productores de bebidas, proveedores, laboratorios de control y servicios encargados del control de calidad...

Medianas y grandes empresas productoras de bebidas

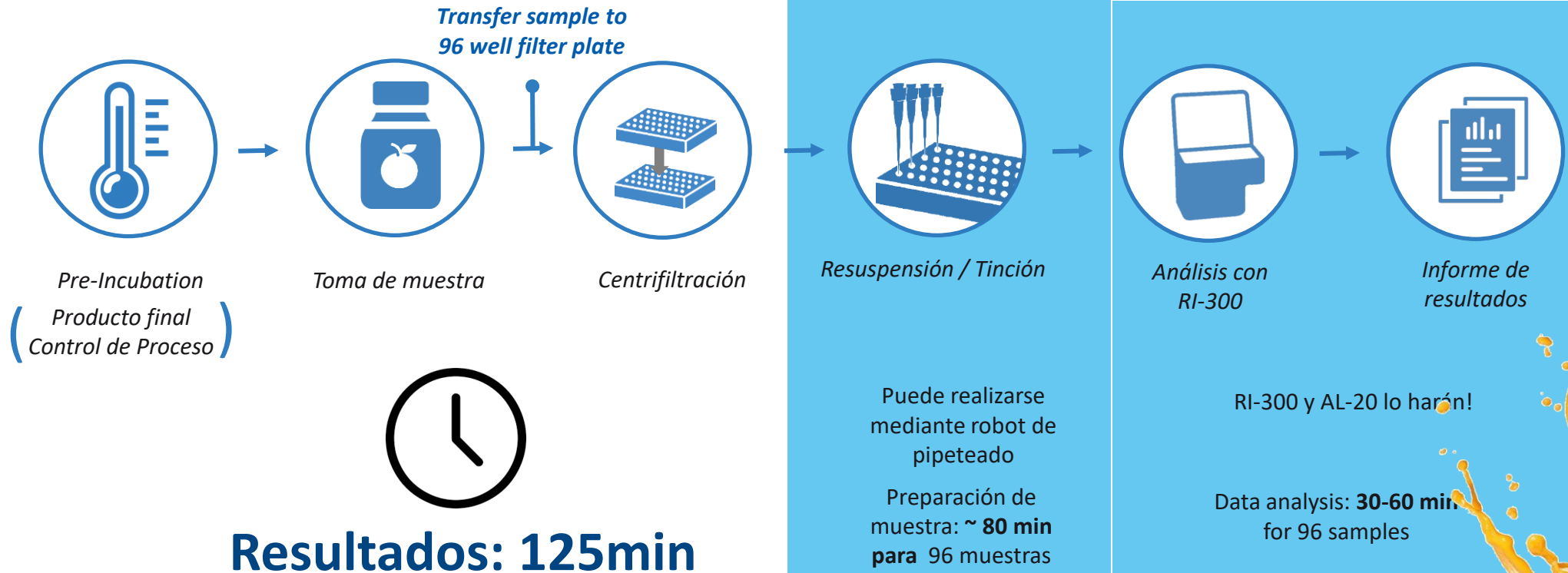


Laboratorios de control y servicios

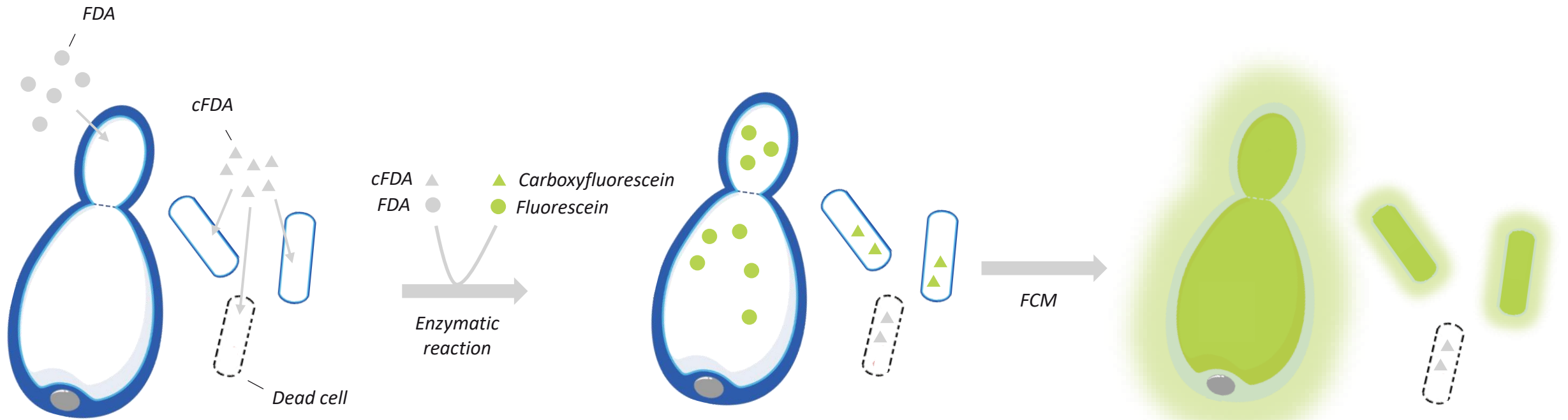


Soluciones para la Industria: CyStain™ VitalCount Workflow

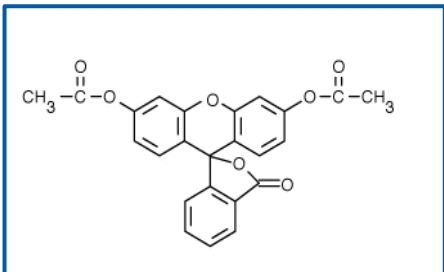
- Tiempo de preparación muestra: ~80min para 96 muestras (según volumen de muestra y lavados intermedios)
- Tiempo de análisis: ~30min – 60min. para 96 muestras (según volumen de muestra y lavados intermedios)
- No se necesita personal especializado en citometría



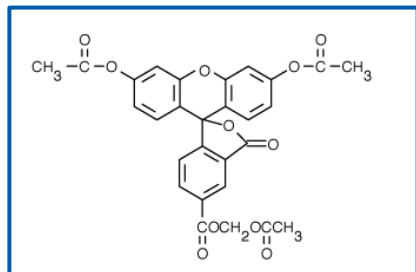
CyStain™ VitalCount: Staining Principle



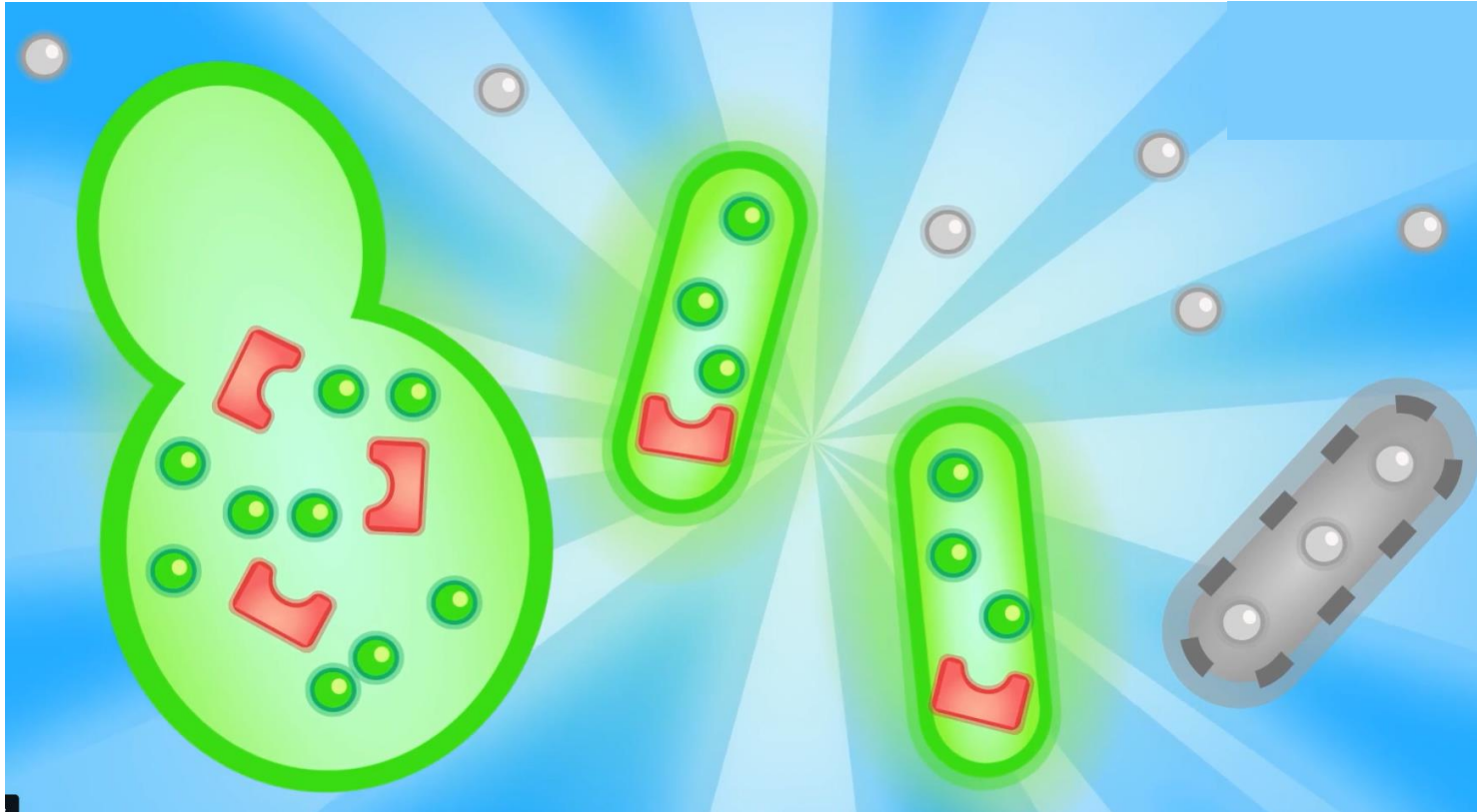
FDA: Fluorescein diacetate



cFDA: 5(6)-Carboxy-fluorescein-diacetate



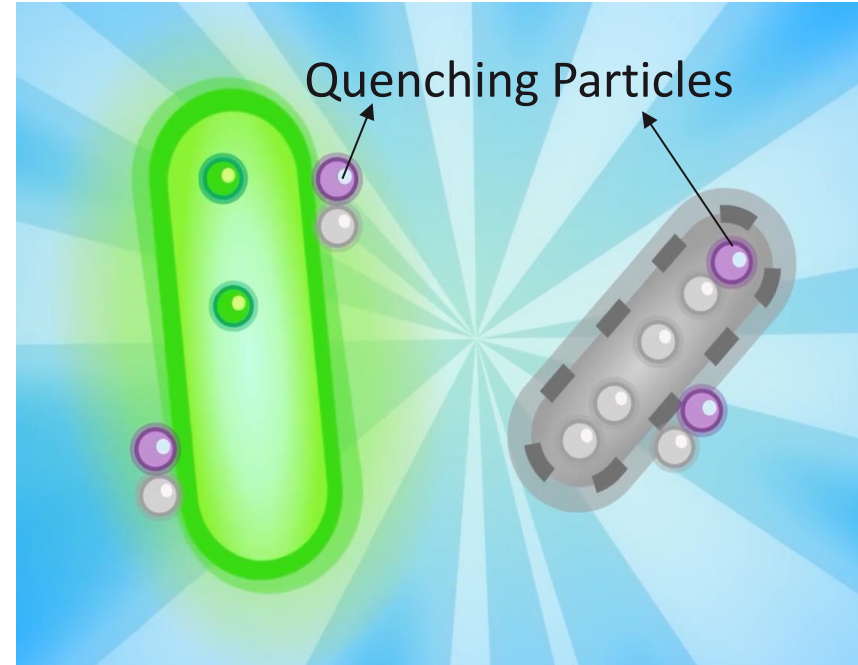
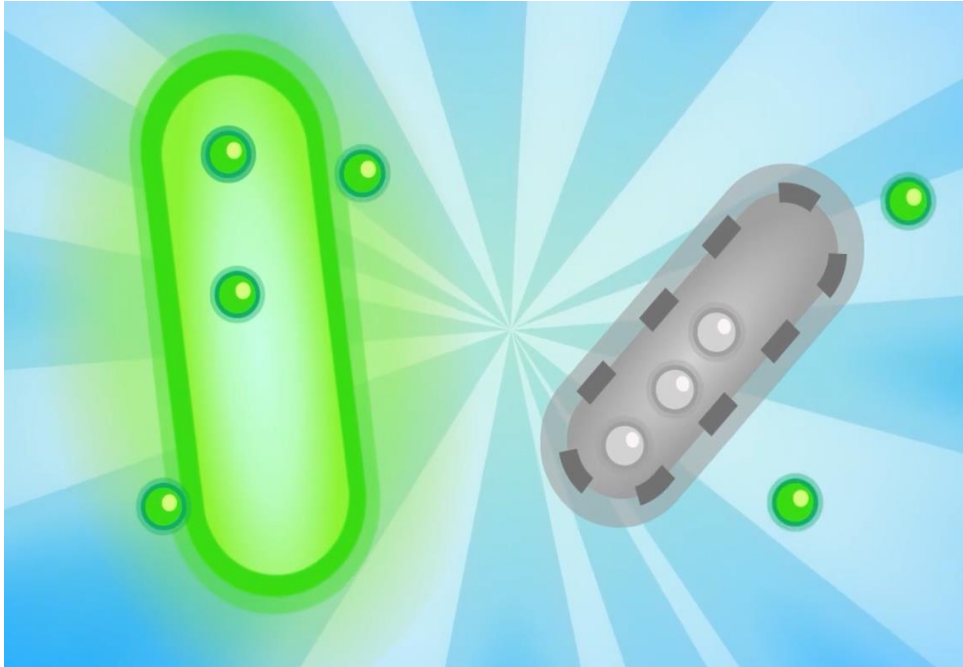
CyStain™ VitalCount: Staining Principle



La conversión de FDA/cFDA en una forma fluorescente hace que el organismo vivo «brille en verde» mientras que los muertos permanecen como estaban (Razón: no hay enzimas presentes para convertir FDA/cFDA en fluoresceína)



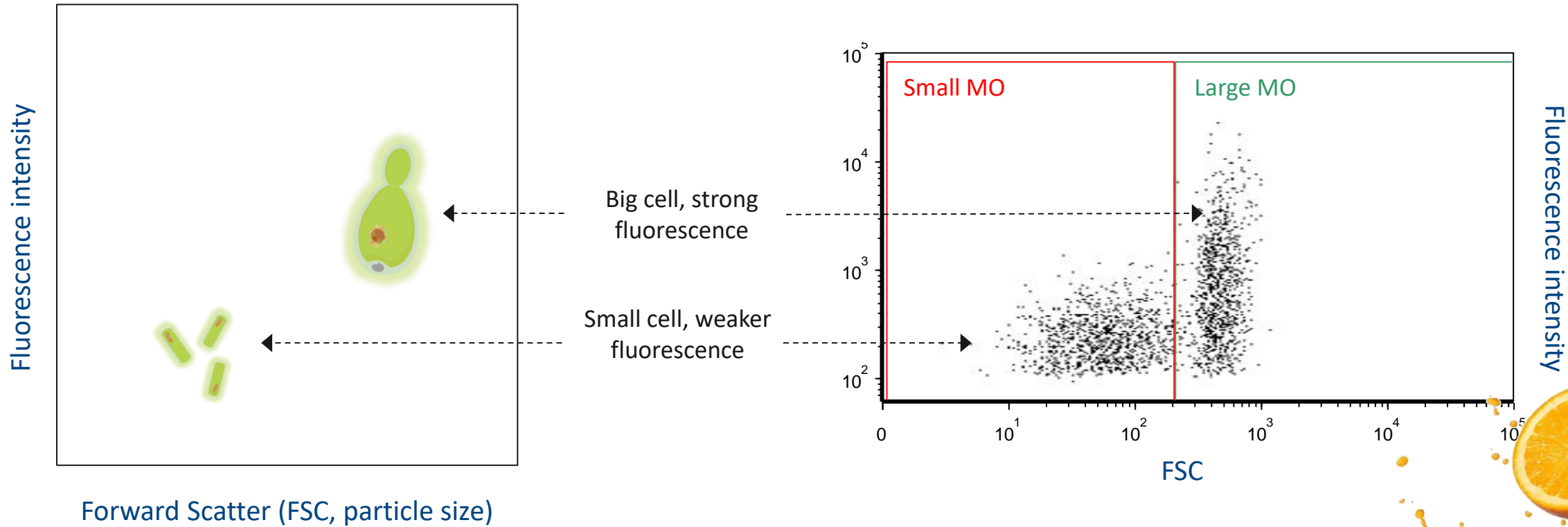
CyStain VitalCount: Staining Principle



Si algunas de las partículas de fluoresceína/fluoresceína (también conocidas como partículas verdes brillantes) salen de las células (especialmente de las células bacterianas), las partículas atenuadoras las encontrarán, se unirán a ellas y disminuirán su fluorescencia para evitar señales positivas falsas.

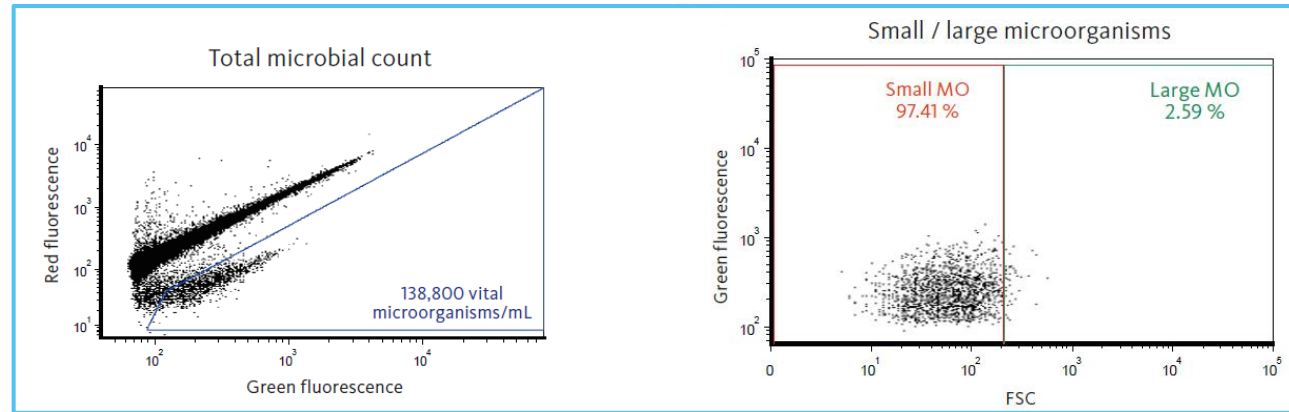


CyStain VitalCount: Staining Principle

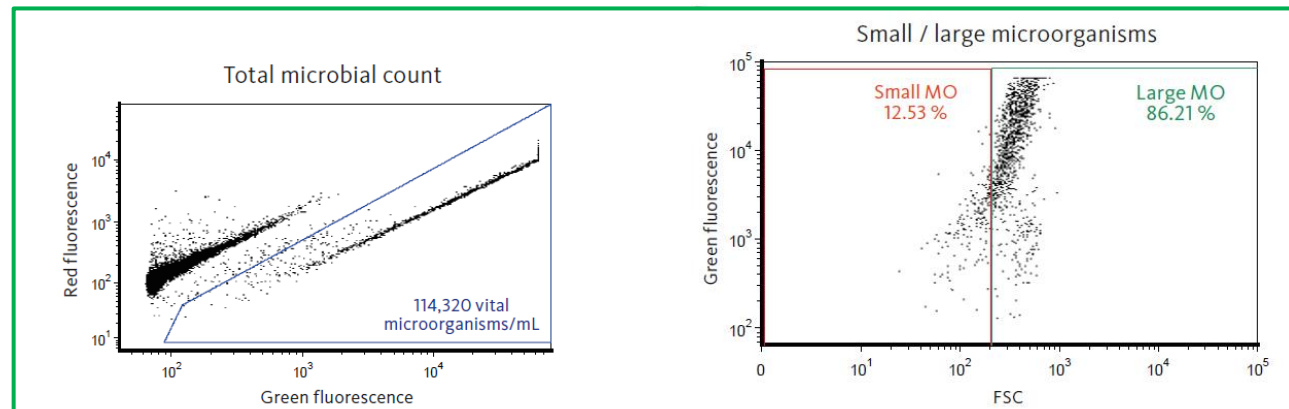


CyStain VitalCount: Ejemplo de Resultados

Bacterial contamination (Zumo de Naranja)

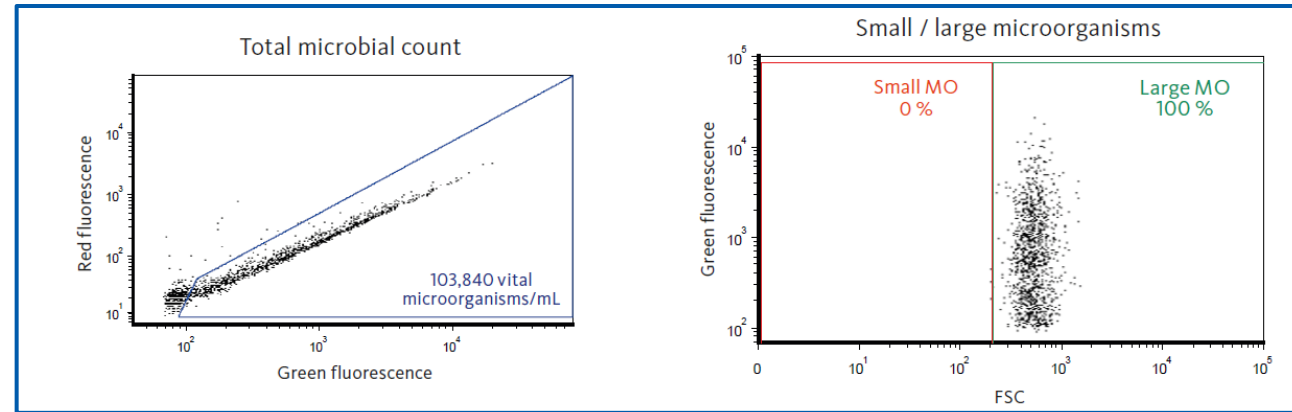


Mold contamination (Zumo de Naranja)

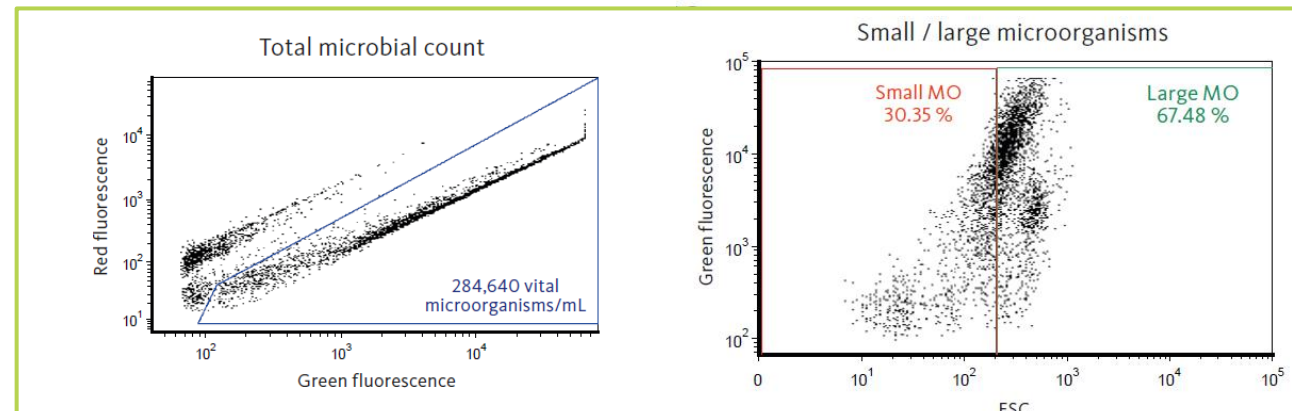
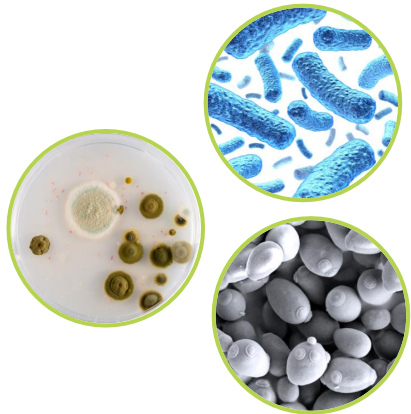


CyStain VitalCount: Ejemplo de Resultados

Contaminación Levaduras (Zumo de manzana)



Bacteria, Mold and Yeast (Zumo Multivitaminas)



CyStain VitalCount: Ejemplo de Resultados

Report CyStain™ VitalCount CyFlow™ RI-300 Flow Cytometer



17-Nov-2024

Sample and Reagent Information

Sample #: 20241117_130747_PJ Bact Yeast.fcs

LOT CyStain™ VitalCount: [REDACTED]

Report Summary:

Vital Microorganisms --- POSITIVE ---	
Small Microorganisms	Large Microorganisms
POSITIVE	POSITIVE

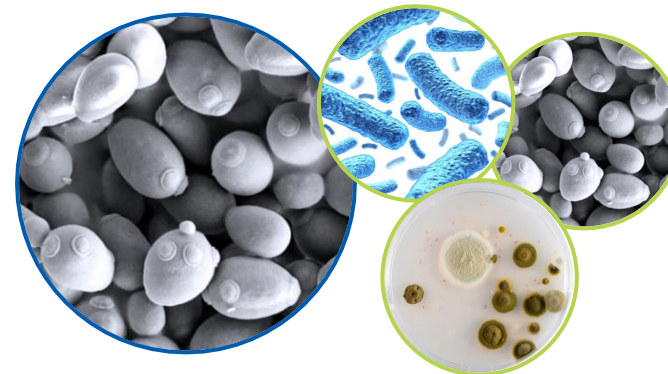
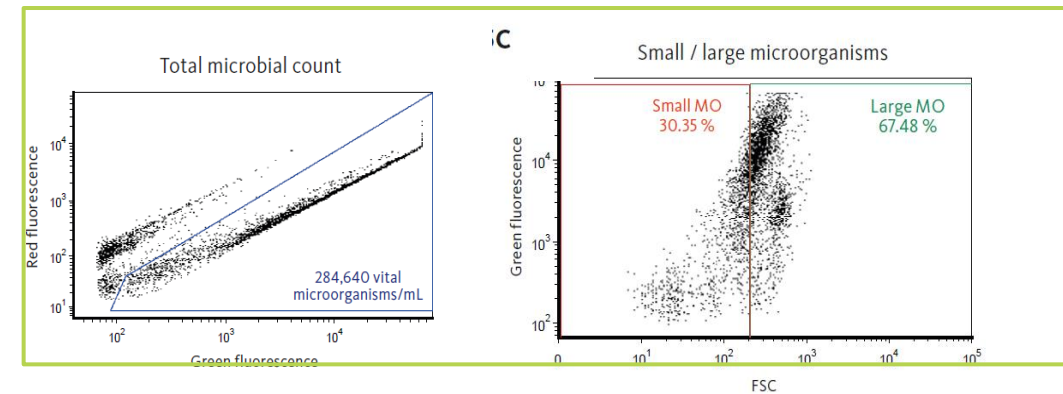
Results:

Vital Count Total:	1023920 per mL
Small Microorganisms:	150480 per mL
Percentage Small Microorganisms:	14.70 %
Large Microorganisms:	761120 per mL
Percentage Large Microorganisms:	74.33 %

Information:

Laboratory: [REDACTED]
 CyView Operator: **Administrator**
 Date of Measurement: **17-Nov-2024**

Bacteria, Mold and Yeast (Zumo Multivitaminas)



La Solución completa de Sysmex:

ALTO RENDIMIENTO

El análisis automatizado de muestras con AutoLoader (AL-20) y la preparación automatizada de muestras opcional evitan los errores humanos



RECTIVO: VitalCount

Detección de microorganismos vitales
(sin falsos positivos/negativos)
Discriminación: Bacterias y Levaduras

INSTRUMENT: RI-300

1 único equipo para diferentes
matrices One instrument for different
matrices (zumos, refrescos, agua...)

MANTENIMIENTO / SUPPORT

Alta fiabilidad de los instrumentos
Costes de servicio comparablemente bajos

FACIL MANEJO DEL CyView SOFTWARE

Resultados positivos/negativos de un vistazo



Key advantages de la Citometría de Flujo



Velocidad



Automatización



Flexible



Standardizado



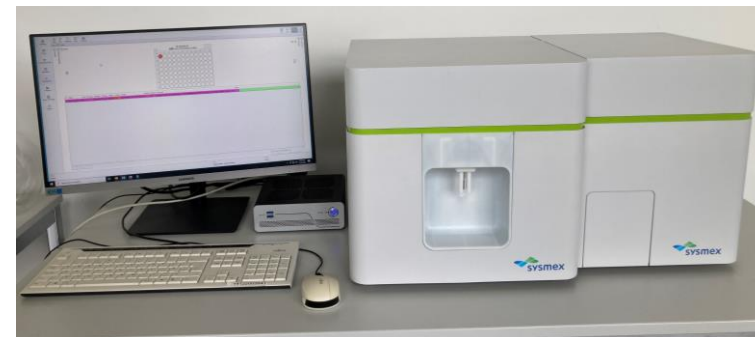
Sensible



Mejora tu rentabilidad

El mayor beneficio para la empresa

- Libera lotes más rápido
- No hay error humano en la lectura
- Se puede interrumpir la frecuencia
- Resultados reproducibles y estandarizados
- Método sensible de conteo de células/mL LC: 150cel/mL



Citometría de Flujo: Método rápido para el control microbiológico

GRACIAS!

- Los asistentes podrán comprender y debatir sobre la contaminación y calidad de las bebidas en términos de presencia y cantidad de agentes microbianos.
- Los métodos convencionales no sólo tienen más de un siglo de antigüedad, sino que además no son lo suficientemente eficaces como para satisfacer las necesidades de la era actual (industria/mercado) y, por lo tanto, deben sustituirse.
- La citometría de flujo es una de las respuestas más eficientes y una excelente alternativa para el análisis de muestras

Marta Masegosa

Masegosa.marta@sysmex.es

XXII MRAMA – 27 de Noviembre 2024

**Together for a better
healthcare journey**



GRACIAS!

Citometría de Flujo: Método rápido para el control microbiológico

El kit VitalCount de Sysmex Partec ofrece resultados para 96 muestras en menos de una hora, tras una preincubación de 24-48 horas. De este modo, la liberación de lotes puede llevarse a cabo con un ahorro de tiempo de hasta el 83%. Esto conlleva un importante ahorro en costes de almacenamiento.

Marta Masegosa

Masegosa.marta@sysmex.es

XXII MRAMA – 27 de Noviembre 2024

**Together for a better
healthcare journey**