



II Jornadas de Actualización en Nutrición y Alimentos

Técnicas de detección rápida de patógenos en la
industria alimentaria

Luis Vergara González

Calidad de los alimentos



Características organolépticas - sensoriales

Características nutricionales

Inocuidad

Física - Química - Alergenos - Microorganismos



CARGA MUNDIAL DE ENFERMEDADES
DE TRANSMISIÓN ALIMENTARIA:
ESTIMACIONES DE LA OMS

Las enfermedades diarreicas son las más frecuentes por consumo de alimentos insalubres

Las enfermedades diarreicas representan:



1/2

de la carga mundial de
las ETA provocadas por
31 agentes etiológicos

Principales agentes etiológicos de
enfermedades diarreicas en el mundo:



Norovirus



E. coli



Campylobacter



Salmonella
No tifoidea



550 millones
de personas **enferman**
230 000
mueren



De ellas,
220 millones
son menores de 5 años y
96 000
mueren

**LAS ETA SON PREVENIBLES.
TODOS PODEMOS CONTRIBUIR.**

Para más información: www.who.int/foodsafety/es

#SafeFood

Fuente: Carga mundial de enfermedades de transmisión alimentaria:
estimaciones de la OMS. 2015.



Organización
Mundial de la Salud

CDC Estimates of Foodborne Illness in the United States

FINDINGS

CDC 2011 Estimates

CDC estimates that each year roughly 1 in 6 Americans (or 48 million people) gets sick, 128,000 are hospitalized, and 3,000 die of foodborne diseases. The 2011 estimates provide the most accurate picture yet of which foodborne bacteria, viruses, microbes (“pathogens”) are causing the most illnesses in the United States, as well as estimating the number of foodborne illnesses without a known cause.* The estimates show that there is still much work to be done—specifically in focusing efforts on the top known pathogens and identifying the causes of foodborne illness and death without a known cause.

Reducing foodborne illness by 10% would keep about 5 million Americans from getting sick each year.

Tabla 1: Estadísticas generales de brotes de ETA. Chile, semanas epidemiológicas 1 - 40, años 2016 y 2017* y mediana 2011 - 2015.

Año 2017* (SE 40)		Año 2016 (SE 40)		Mediana 2011 - 2015 (SE 40)	
Nº Brotes notificados	858	Nº Brotes notificados	881	Nº Brotes notificados	804
Nº Casos:	4302	Nº Casos:	5063	Nº Casos:	4888
Nº Hospitalizados:	54	Nº Hospitalizados:	54	Nº Hospitalizados:	133
Nº Fallecidos:	0	Nº Fallecidos:	0	Nº Fallecidos:	5

(*). Información disponible al 30 de octubre de 2017.

Fuente: Base de datos RAKIN ETA, DEIS, DIPLAS - Ministerio de Salud de Chile.

1.136,5 millones de análisis microbiológicos en la industria



660,5 millones (58%) industria alimentos
(966 millones, 2013)



20% detección de patógenos (*Salmonella* y *E. coli* O157:H7)
(23,8%, 2013)



80% análisis indicadores microbiológicos
(RAM – coliformes – mohos, etc.)

Métodos analíticos

Convencionales



Rápidos



Tiempo requerido para el análisis microbiológico

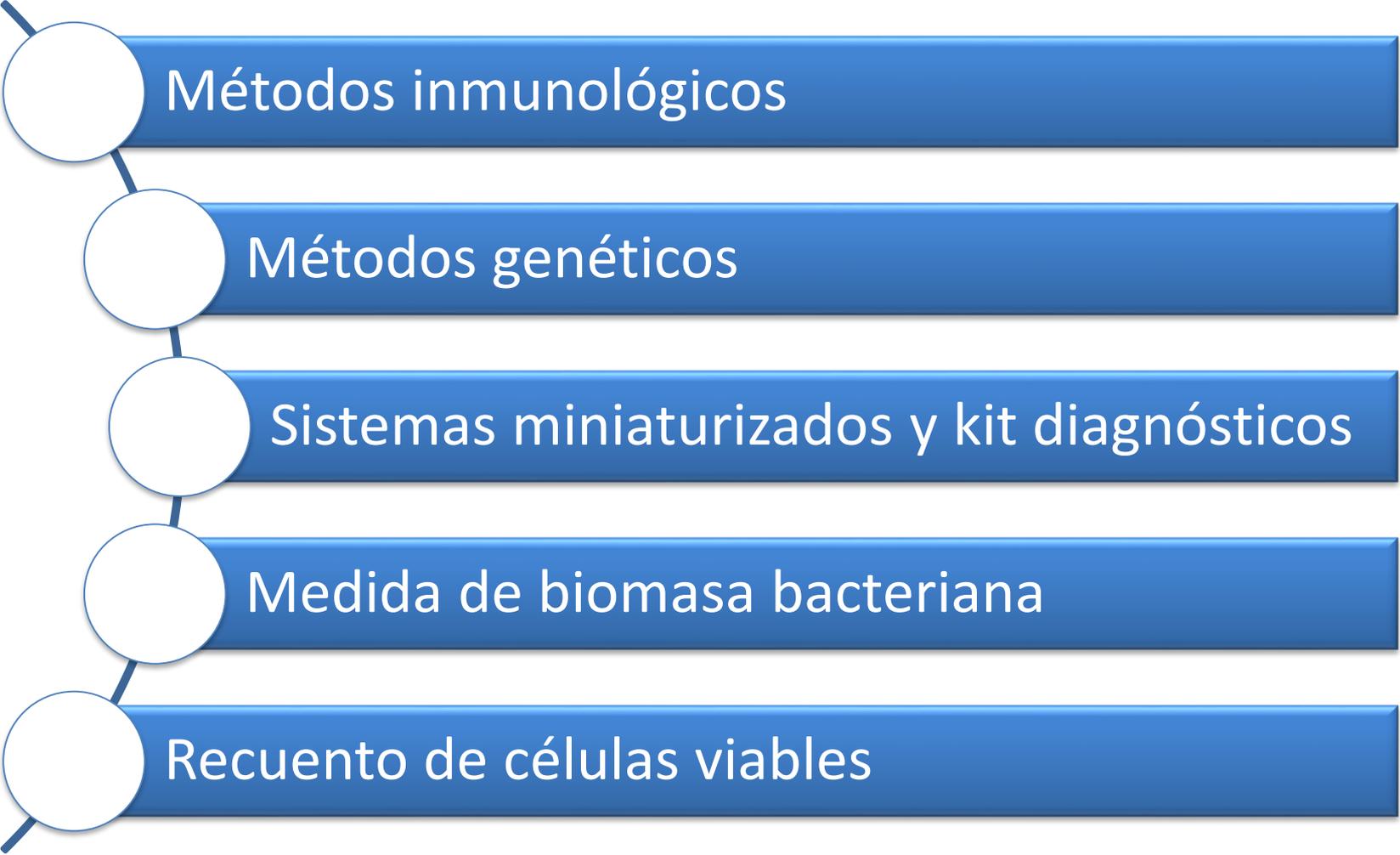


¿PORQUÉ?

Toma de decisiones



Métodos rápidos de diagnóstico



Métodos inmunológicos

Métodos genéticos

Sistemas miniaturizados y kit diagnósticos

Medida de biomasa bacteriana

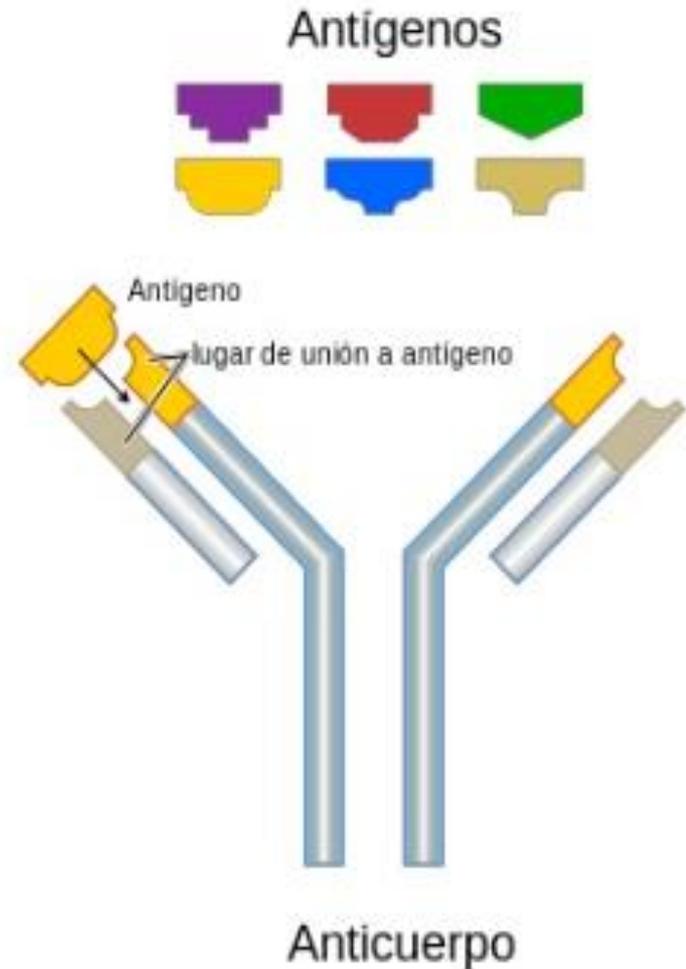
Recuento de células viables

Métodos inmunológicos

Detección de microorganismos y/o sus toxinas en alimentos y muestras ambientales:

Salmonella spp., *L. monocytogenes*,
E. coli O157H7, *Campylobacter*, etc.

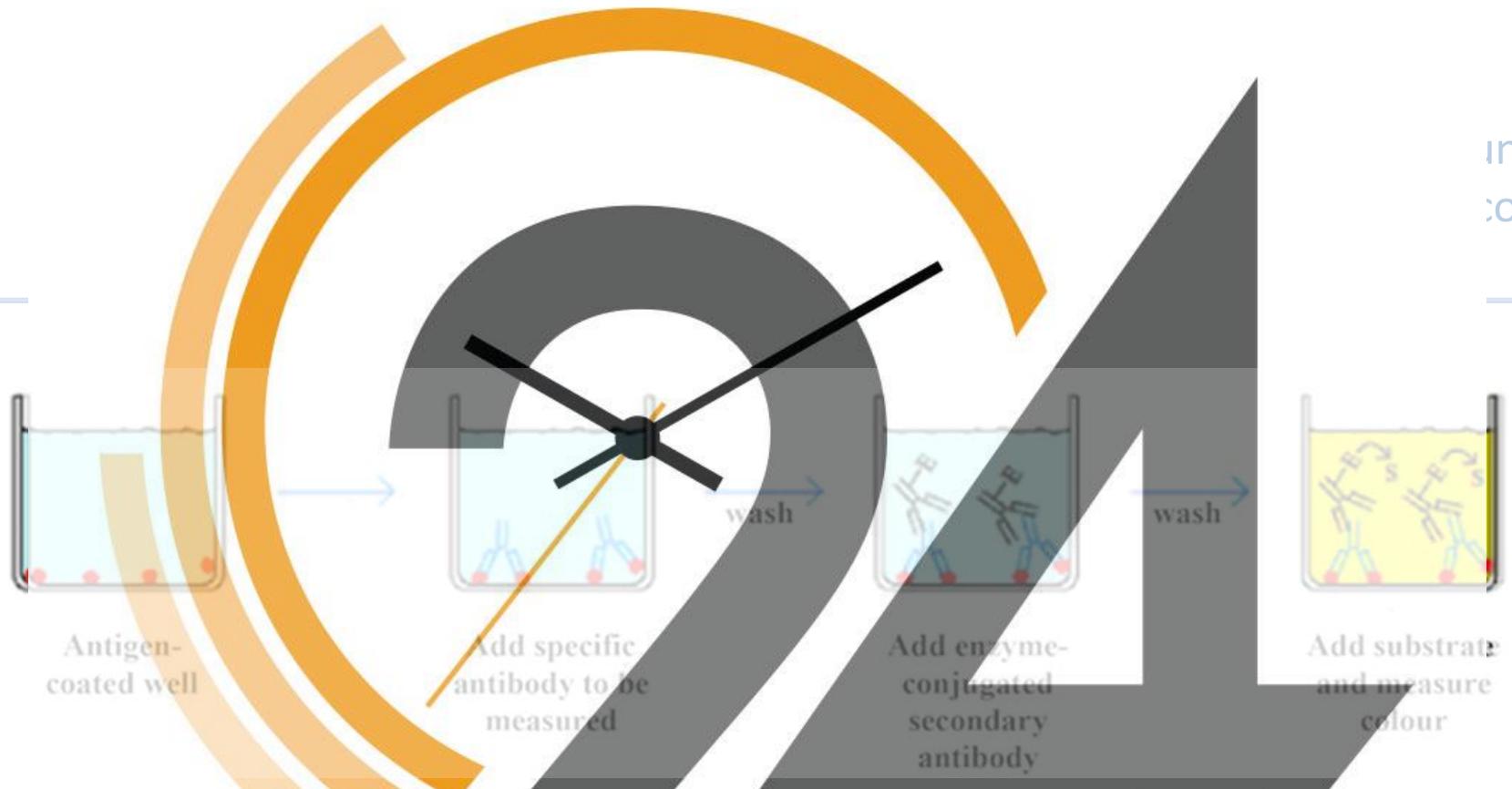
Alergenos – gluten – toxinas



- Kits de ELISA

-
-

ina
on

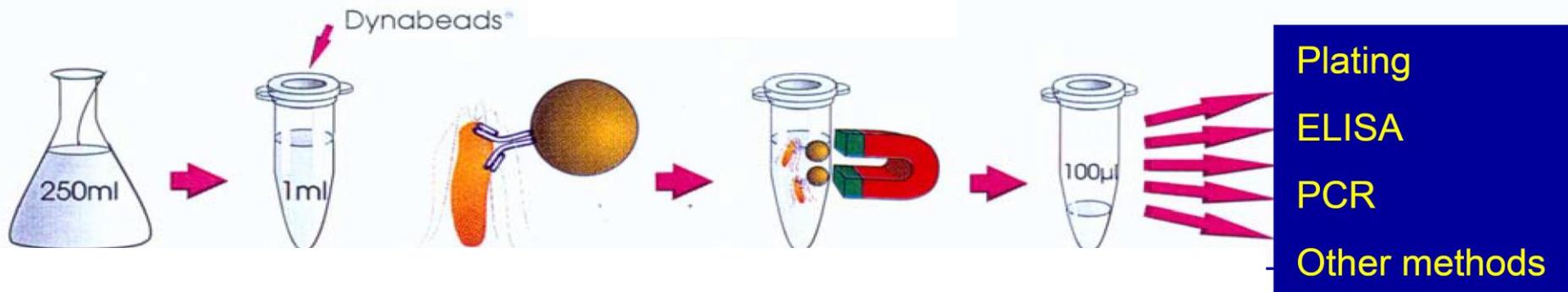


Limitación:

Necesidad de enriquecimiento previo de la muestra para facilitar multiplicación del microorganismo y posibilitar la detección.

- Inmunobeads

La separación inmunomagnética emplea partículas paramagnéticas recubiertas de anticuerpos específicos. Puede utilizarse para separar y concentrar los microorganismos presentes en los alimentos antes de realizar un ELISA.

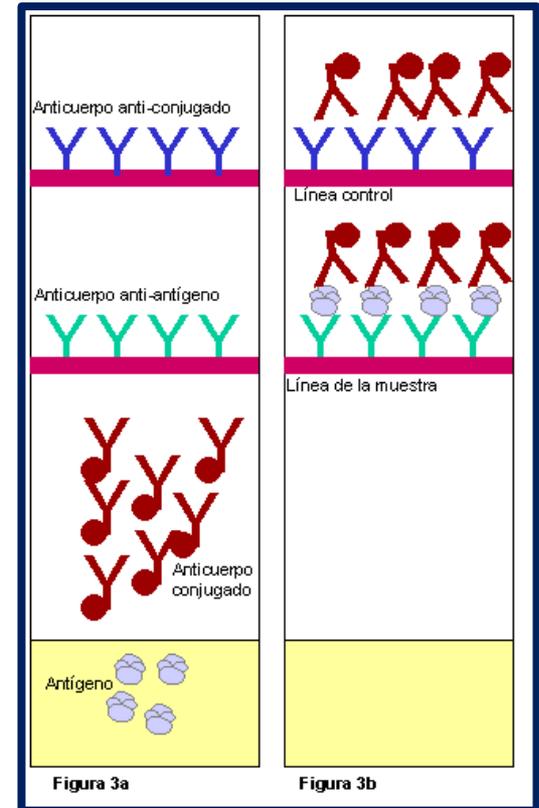


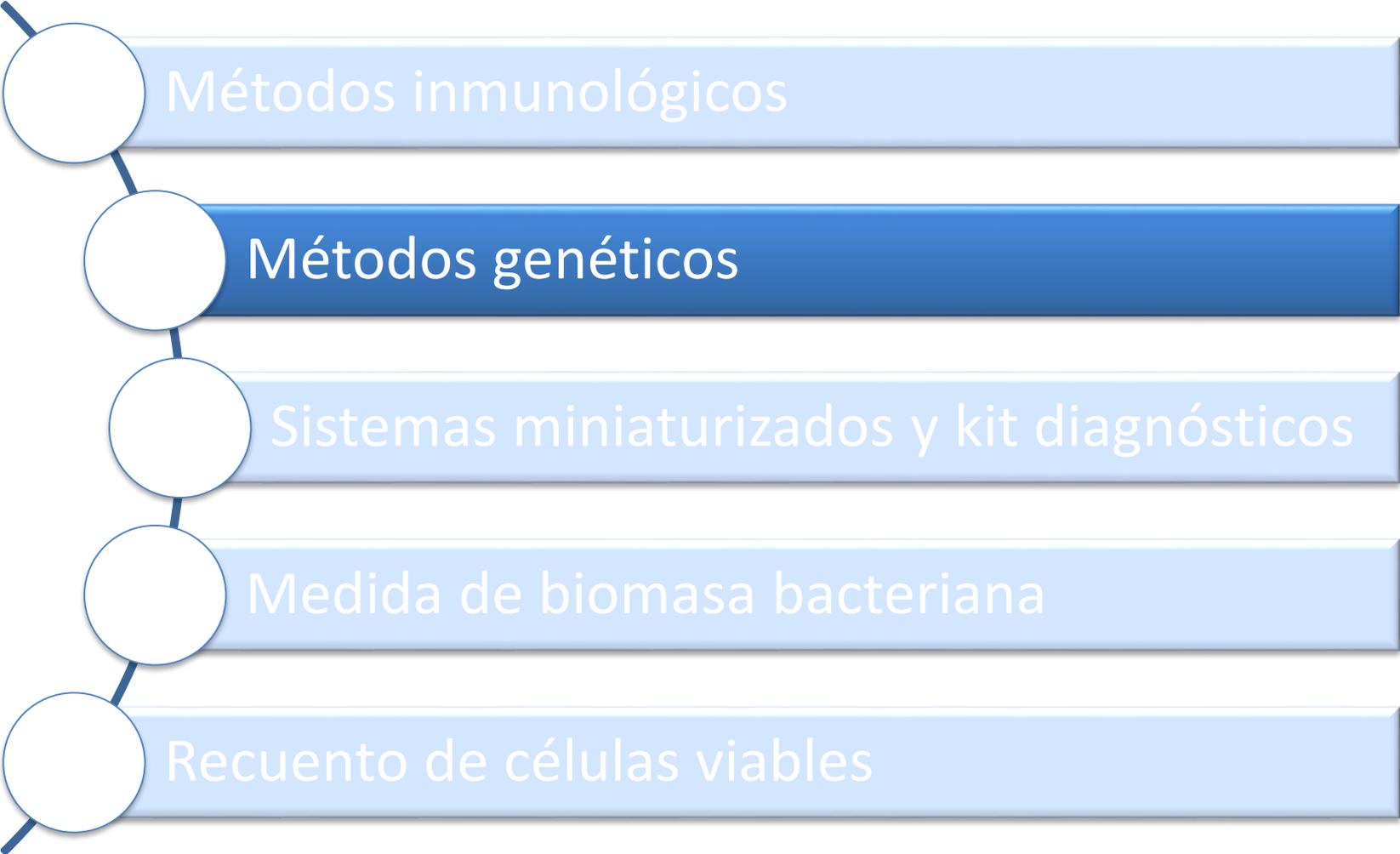
¿PRE-ENRIQUECIMIENTO?

Inmunocromatografía

1. Membrana con Ac absorbidos anti-antígeno en la línea de reacción.
2. Sobre la línea control Ac anti-conjugado.
3. Si la muestra contiene el antígeno, este queda retenido en la línea de reacción.
4. El conjugado, Ac específico frente al antígeno, que está marcado con una molécula de oro coloidal, es retenido por el Ag en la línea de reacción y por el Ac en la línea control.
5. Muestras negativas que no contienen antígeno, el conjugado es retenido sólo en la línea control.

REQUIERE PRE-ENRIQUECIMIENTO





Métodos inmunológicos

Métodos genéticos

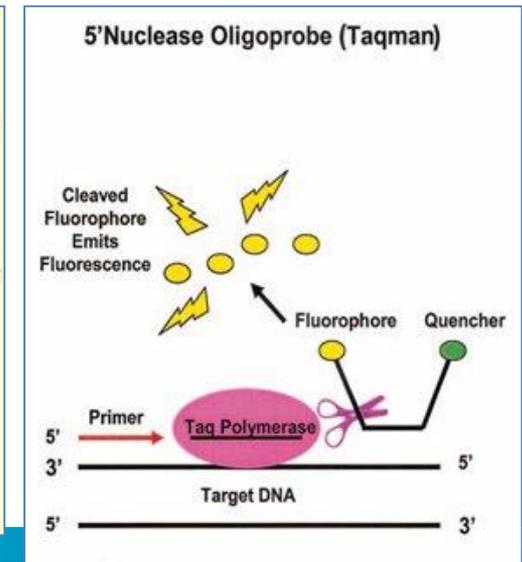
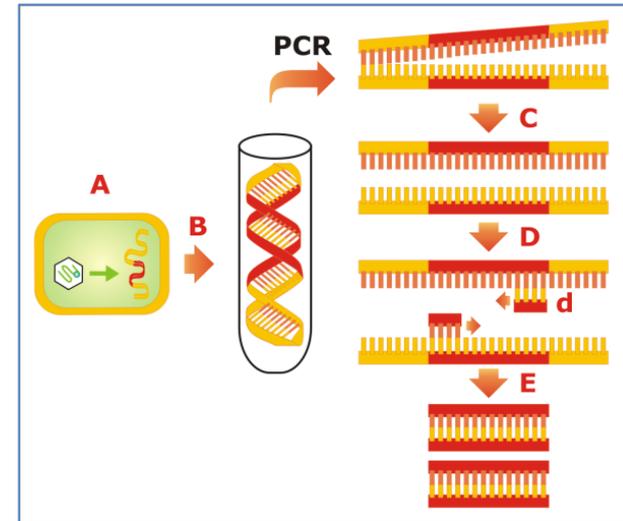
Sistemas miniaturizados y kit diagnósticos

Medida de biomasa bacteriana

Recuento de células viables

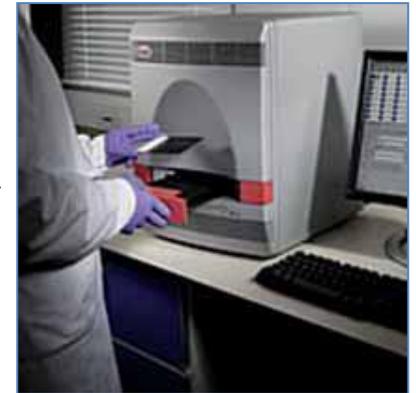
Reacción en Cadena de la Polimerasa

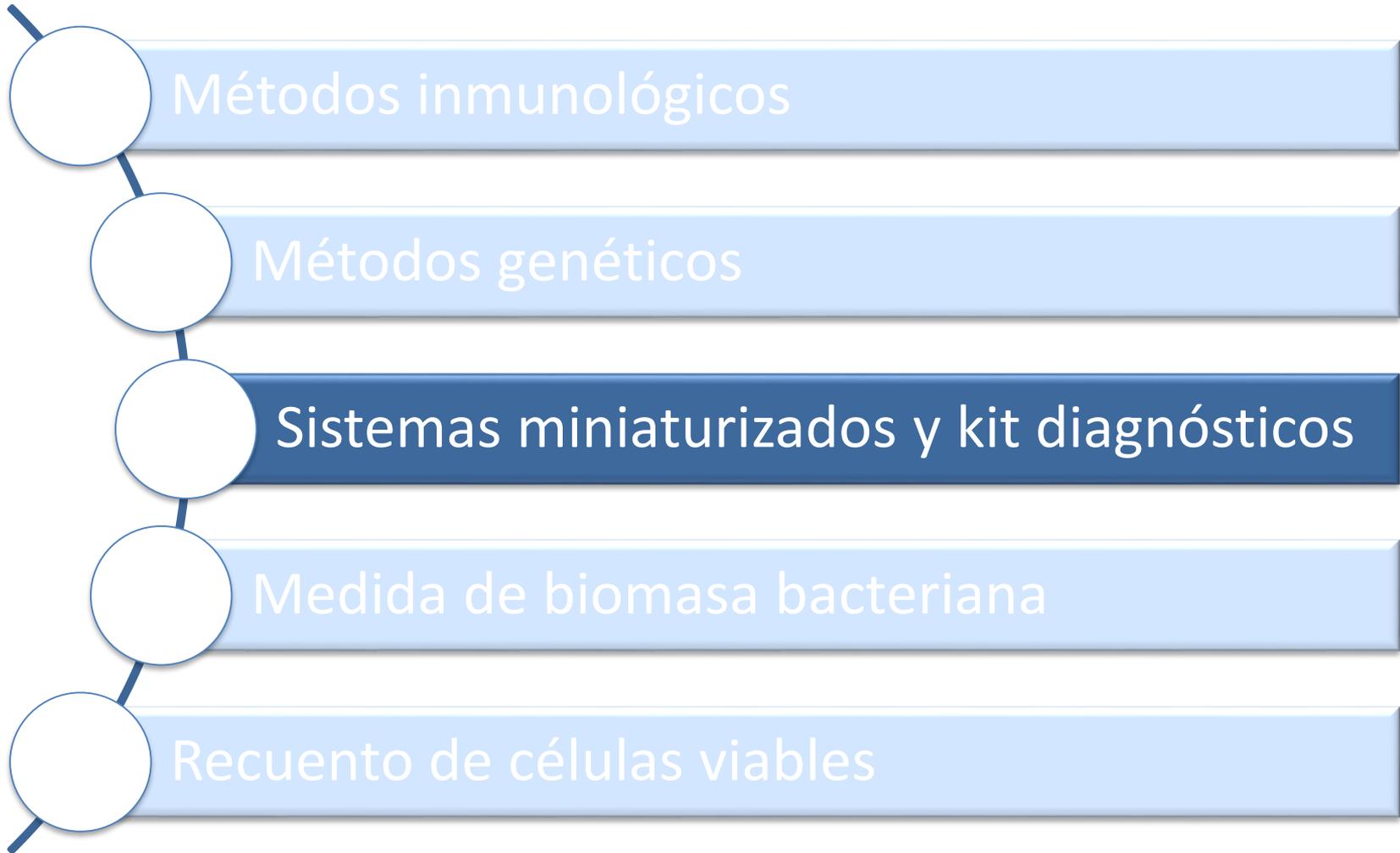
- Basada en la amplificación del ADN.
- PCR tradicional
 - Lectura por **Electroforesis**. Se identifican las bandas de ADN que migran en un campo eléctrico..
- PCR en tiempo real.
 - **Lectura por sistema óptico unido a un termociclador** que identifica marcadores fluorescentes específicos. La fluorescencia emitida es proporcional a la cantidad de producto formado en cada ciclo de PCR.



Equipo Automatizado

Enriquecimiento: 25 g de muestra + 225 mL caldo de cultivo
Incubación 18 – 24 h

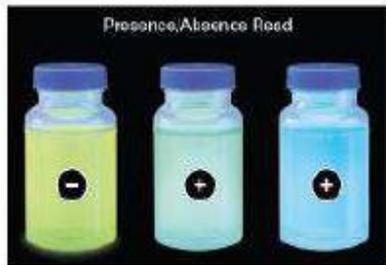




MINIATURIZACIÓN

NMP (número mas probable)

- Colilert-18/, Enterolert-DW/, Pseudalert/Quanti-Tray



GALERÍAS DE IDENTIFICACIÓN

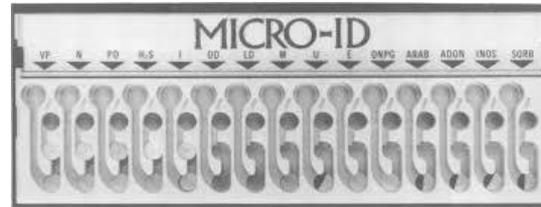
❖ API (Biomerieux)



❖ Enterotube (BBL)



❖ Micro-ID (Remel)



❖ Food-System (Liofilchem)



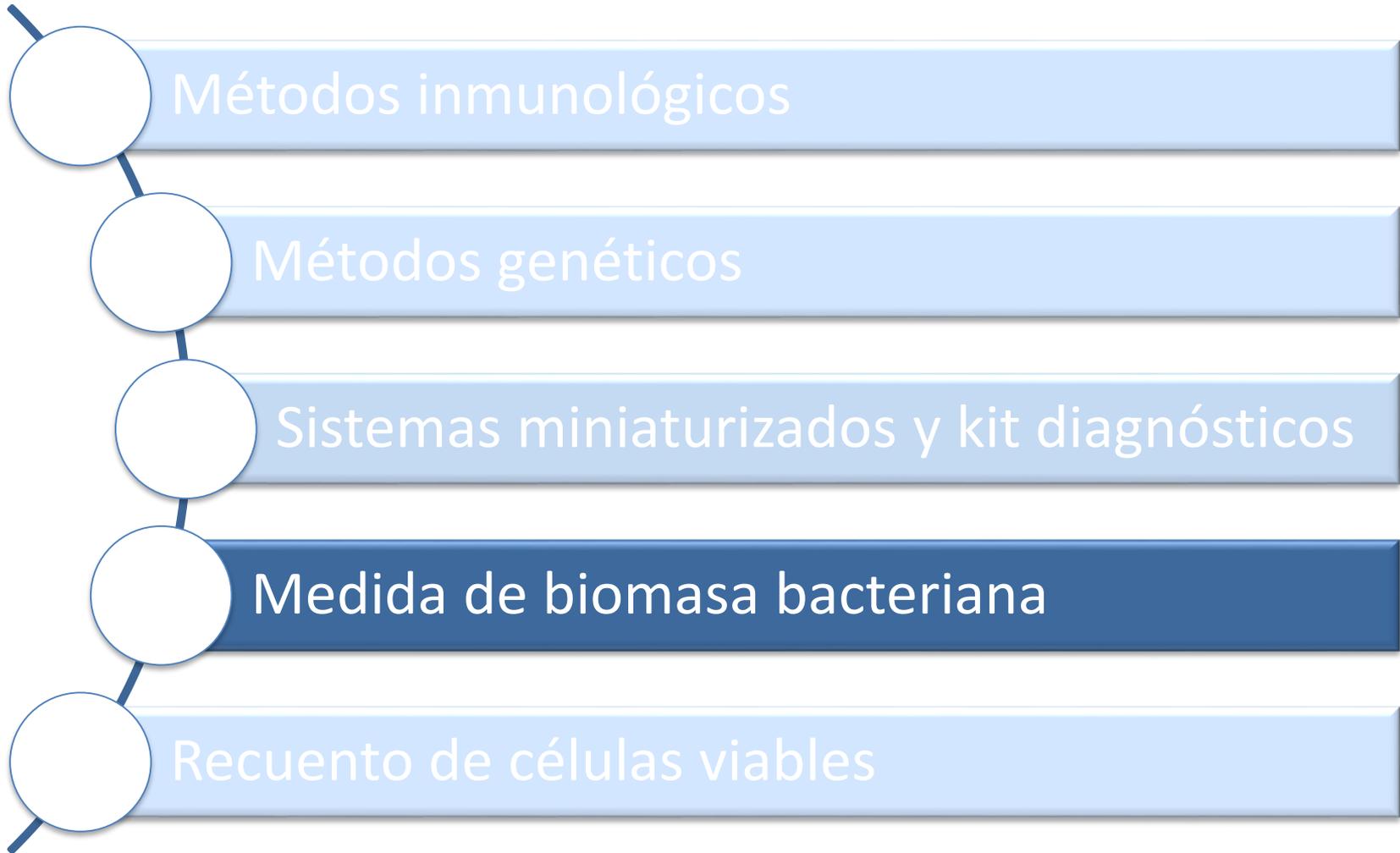
GALERÍAS DE IDENTIFICACIÓN

❖ VIDAS (Biomerieux)



❖ OMNILOG (Biolog)





- Colorimetría: BacT/ALERT 3D (Biomérieux)

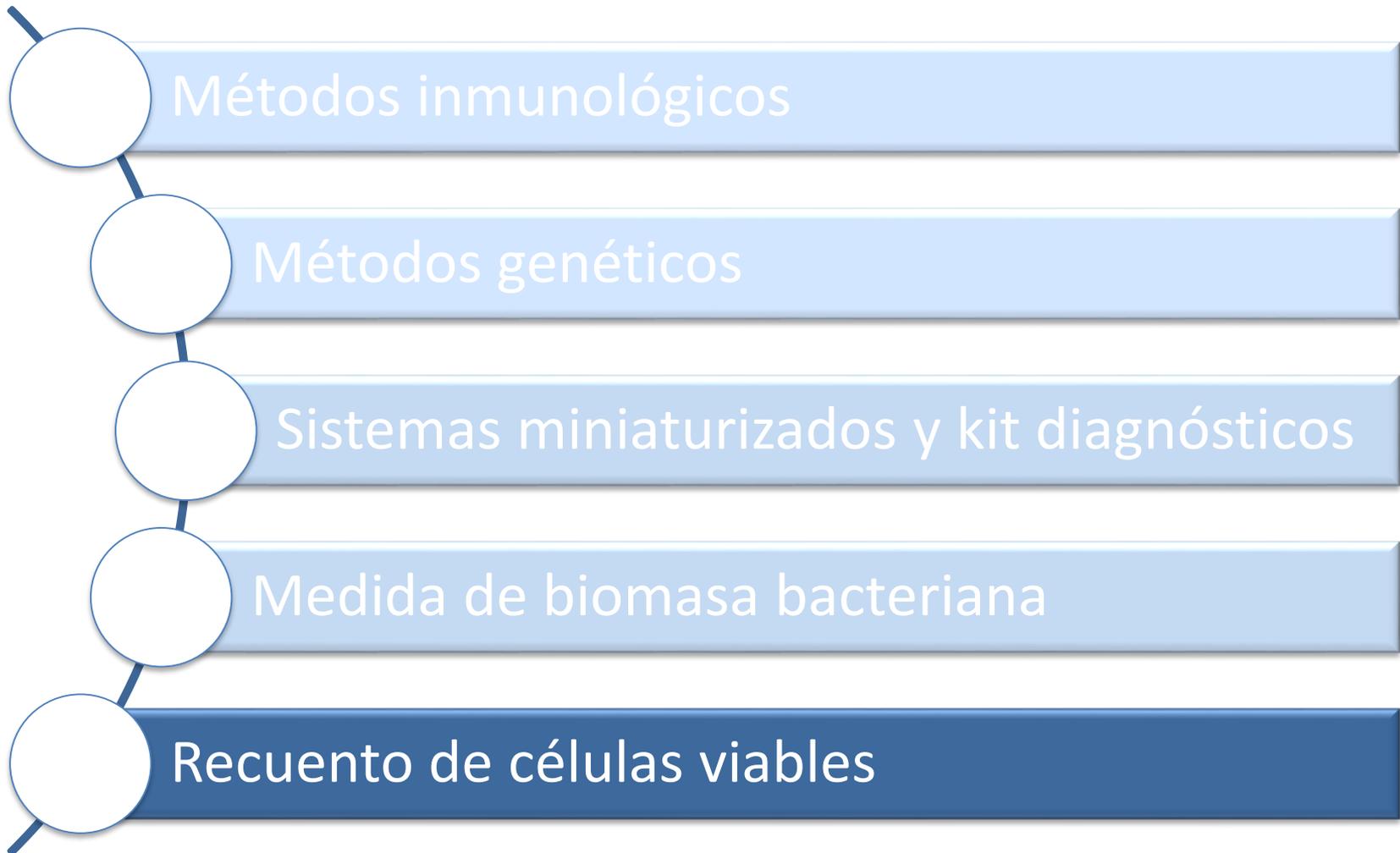
Soleris/MicroFoss (Neogen)

- Impedancia eléctrica: RABIT (*Rapid automated bacterial impedance technique*), BacTrac

- ATP – Bioluminiscencia

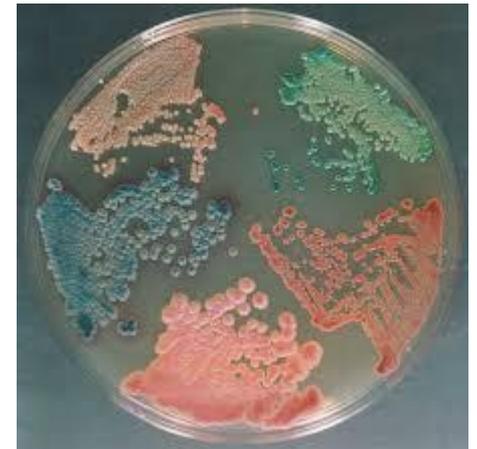
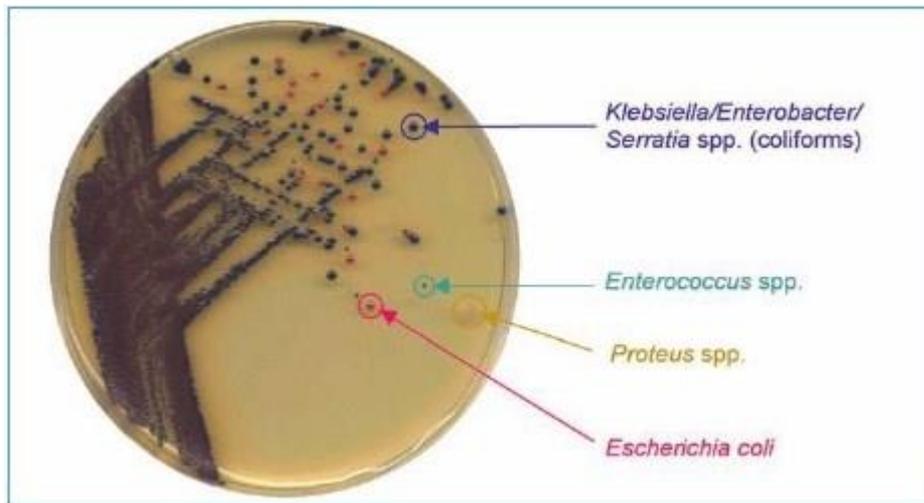
Available ATP kits

Manufacturer	Swab	Luminometer	Test time (s)
Biotrace	Clean-trace	Unilite NG	25
BioControl	Lightening MVP swab	Lightening MVP	25
Neogen	AccuClean	Accupoint	30
Merck	Hy-lite rinse pen	HY-Lite 2	45
Hygiena	UltraSnap	SystemSURE II	45
Charm	PocketSwab plus	Luminator-T	65

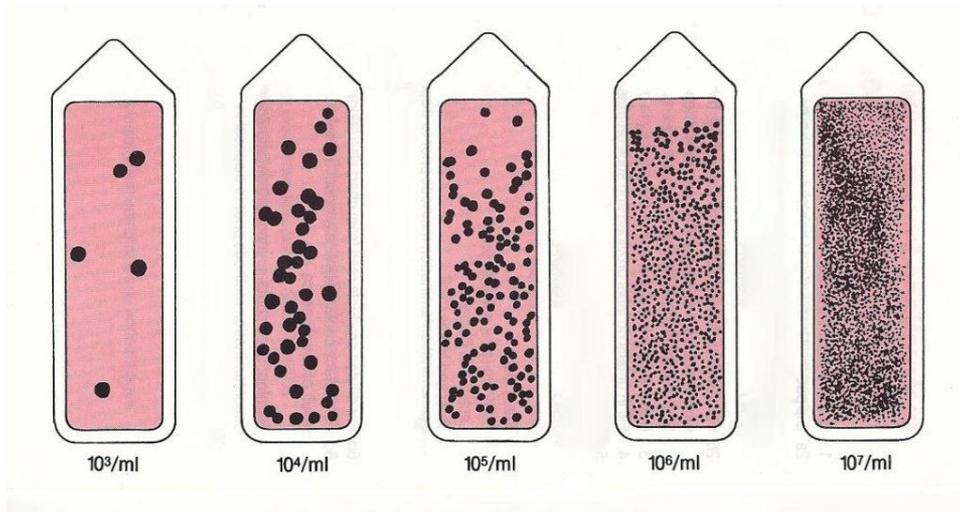


RÁPIDAS TRADICIONALES

Agares cromogénicos



Placas de contacto



Hy-labs



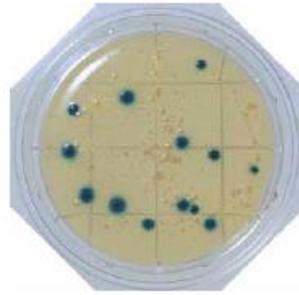
Placas de contacto (Food Stamp)



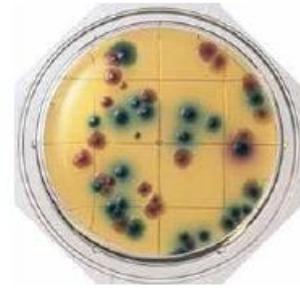
① **Standard method**
(Total viable count)



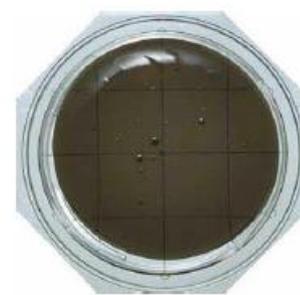
② **Desoxycholate**
(Coliform)



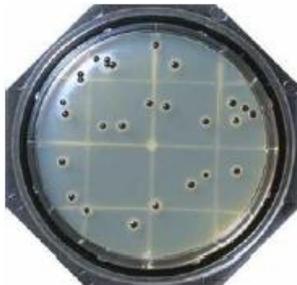
③ **X-GAL**
(Coliform)



④ **XM-G**
(Coliform/*E. coli*)



⑤ **TCBS**
(*V. parahaemolyticus*)



⑥ **TGSE**
(*S. aureus*)



⑦ **MLCB**
(*Salmonella*)



⑧ **Cereus**
(*B. cereus*)



⑨ **Sabouraud**
(Yeast and Mold)



⑩ **Potato Dextrose with CP**
(Food poisoning Yeast and Mold)

Placas Petrifilm



Aerobios mesófilos

Enterobacterias

Mohos y levaduras

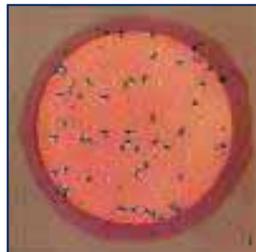
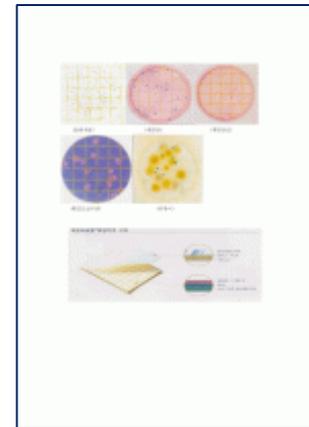
Escherichia coli

Escherichia coli/coliformes

Salmonella spp.

Staphylococcus aureus

Listeria spp.



GRACIAS

