

## Métodos rápidos: una herramienta útil y práctica para el análisis microbiológico de los alimentos

Se define como "método rápido" a cualquier método destinado a la detección, el recuento, la caracterización y la subtipificación de microorganismos (patógenos y del deterioro) mediante el cual se obtienen resultados de manera sencilla, fiable y en menor tiempo que con los métodos convencionales. El desarrollo de métodos rápidos y automatizados constituye un área de la microbiología aplicada muy dinámica y en continua evolución. En las últimas cuatro décadas hubo numerosos avances en el desarrollo de métodos rápidos y desde hace 15 años este campo cobró gran importancia en investigación y en la industria alimentaria.

Los métodos rápidos se basan en técnicas físico-químicas (películas de medios de cultivos deshidratados generales o selectivos, sistemas para determinar el número más probable, medios cromogénicos y fluorogénicos), bioquímicas (galerías miniaturizadas y automatizadas), inmunológicas (precipitación, aglutinación, inmunofluorescencia, citometría, radioinmunoensayo, enzoinmunoensayo, inmunocromatografía, nefelometría, inmunomicroscopía) y moleculares (hibridación, PCR de punto final, PCR en tiempo real, ribotipificación, *microarrays*, *biochips*).

Desde la década del 70, el desarrollo y la implementación de los métodos rápidos para la identificación de microorganismos evolucionaron en paralelo con los adelantos en otras áreas de la investigación científica, en particular con la generalización del uso de galerías de pruebas bioquímicas miniaturizadas. A partir de la década del 80, el avance en la producción de anticuerpos monoclonales hizo posible el desarrollo de pruebas inmunológicas de identificación, como el ELISA o la inmunocromatografía. En 1990, con el advenimiento de las técnicas de biología molecular comenzaron a utilizarse técnicas como la PCR, tanto para tamizaje como para la identificación de microorganismos y sus factores de virulencia. A partir del año 2000, comenzó el desarrollo de biosensores y en menor medida de *biochips* y *microarrays*. El crecimiento exponencial de los métodos rápidos aplicados a la microbiología de los alimentos puede evidenciarse en la gran cantidad de equipos comerciales que se ofrecen en la actualidad con el objetivo de tener resultados rápidos, en tiempo real, exactos y de bajo costo. Por ejemplo, como consecuencia de la automatización, el estudio de genotipos bacterianos pasó de ser un proceso tedioso y lento a un método práctico que se puede aplicar en los ensayos microbiológicos cotidianos (3).

Los factores que justifican la utilización de métodos rápidos e impulsan su desarrollo son numerosos, entre ellos se pueden mencionar las presiones regulatorias, las modernas prácticas de producción y la complejidad analítica. Para hacer frente a las presiones regulatorias, la industria alimentaria debe utilizar métodos oficiales de referencia, como los recomendados por la ISO (*International Standards Organization*) y AOAC (*International Association of Official Analytical Chemists*), entre otras. Actualmente, algunos métodos rápidos son recomendados como técnicas de tamizaje por agencias regulatorias internacionales (6). En consecuencia, la oferta de métodos rápidos es cuantiosa. Sin embargo, se debe considerar que antes de la adopción de nuevos métodos por parte de la industria, estos deben tener constancia del proceso de estandarización y validación ante entidades internacionales, o bien en instancias inter e intralaboratorio (1, 2, 4, 5).

Algunos métodos para la detección de patógenos evolucionaron desde los análisis estándar realizados en el laboratorio, hacia análisis efectuados en tiempo real en la línea de producción. Esta tendencia hacia las pruebas en tiempo real, que surgió debido a la necesidad de ofrecer información de utilidad durante la operación de producción de alimentos, se trata de un esfuerzo para superar en parte las deficiencias de los métodos convencionales cuyos resultados no se pueden utilizar para controlar el

proceso *in situ*. En el presente, la industria de alimentos basa la seguridad y calidad de sus productos en pruebas o medidas fuera de la línea de producción. Sin embargo, las nuevas tendencias hacen cada vez más necesaria la implementación de un sistema de medición continua y en tiempo real, que haga posible la intervención *in-line* u *on-line*. Las medidas de intervención *in-line* son aquellas que se efectúan directamente en la línea del proceso y las medidas de intervención *on-line* son aquellas que pueden efectuarse en un asa *by-pass* de la línea principal del proceso y que luego de la medida se retorna a la línea principal.

Desde una perspectiva futurista, el Dr. Daniel Fung (3), profesor de la Universidad de Kansas y uno de los mayores expertos sobre métodos rápidos aplicados a la microbiología de alimentos, propuso el siguiente escenario para los próximos años: 1) no se podrá reemplazar el recuento de microorganismos viables, 2) la supervisión de la higiene con métodos rápidos se efectuará en tiempo real, 3) las técnicas genotípicas serán habituales en los laboratorios de alimentos, 4) las pruebas inmunológicas serán automatizadas, 5) los resultados más rápidos se obtendrán con inmunocromatografía, 6) en los programas de Análisis de Peligros y de Puntos Críticos de Control o HACCP (su sigla en inglés) se utilizarán biosensores, 7) los patógenos se detectarán inmediatamente de forma computarizada, 8) se realizará la separación y la concentración eficaz de las bacterias buscadas, 9) se utilizará un sistema de alerta microbiológico en los envases de alimentos, 10) los consumidores tendrán dispositivos de alerta rápido para detectar patógenos en sus hogares.

Como se puede deducir, el desarrollo de métodos rápidos está dirigido hacia las empresas productoras de alimentos en primera instancia y luego a los consumidores. Sin embargo, se debe considerar que para los organismos municipales, provinciales o nacionales responsables del control de los alimentos no es habitual el uso de métodos rápidos, sobre todo de métodos moleculares. Esto se debe a que actualmente la tendencia internacional de los organismos de control está orientada al aseguramiento de los programas de HACCP utilizados por las empresas productoras de alimentos y no al análisis microbiológico del producto final. Aunque en países como el nuestro, donde la aplicación de este tipo de programas de control aún no es de cumplimiento obligatorio, no es posible asegurar que la oferta de alimentos en la boca de expendio provenga de empresas que utilizan programas HACCP. Es entonces cuando la utilización de los métodos rápidos puede agilizar y mejorar los resultados generados por los organismos de control. Sin embargo, también se debe considerar que para la utilización de los métodos rápidos, además de inversiones y operadores capacitados, se requieren políticas estatales de control tendientes a asegurar la calidad de los alimentos que consumimos.

GERARDO A. LEOTTA

*Laboratorio de Microbiología de los Alimentos, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional de La Plata. Instituto de Genética Veterinaria (CONICET-UNLP). Calle 60 y 118, (1900) La Plata, Pcia. de Buenos Aires, Argentina.*

E-mail: gleotta@fcv.unlp.edu.ar

1. Feldsine P, Abeyta C, Andrews W. AOAC International Methods Committee Guidelines for Validation of Qualitative and Quantitative Food Microbiological Official Methods of Analysis. *J AOAC Int* 2002; 85: 1187-200.
2. Guía para validación de métodos de ensayo. Organismo Argentino de Acreditación. 2003; Código DC-LE-05: 1-16.
3. Il Curso sobre métodos rápidos en microbiología de aguas y alimentos. 2008. Departamento de Microbiología y Genética, Universidad de Salamanca, España. Disponible en: <http://fundacion.usal.es/metodosrapidos>. Consultado 18-04-08.
4. NordVal Validation. Protocol for the validation of alternative microbiological methods. NV-DOC.D-2004-01-01.
5. Trullols E, Ruisánchez I, Rius X. Validation of qualitative analytical methods. *Trends Analyt Chem* 2004; 23: 137-45.
6. United States Department of Agriculture/Food Safety and Inspection Service, Office of Public Health and Science. USDA/FSIS (2008) United States Department of Agriculture Food Safety and Inspection Service, Office of Public Health and Science. Detection, isolation and identification of *Escherichia coli* O157:H7 from Meat Products. MLG 5.04. Effective 1/28/08. Washington DC, EE.UU.