

3er. Seminario

Gestión de la Inocuidad en la Industria Alimentaria

Vigilancia microbiológica del entorno donde se fabrican los alimentos

¿Por qué?



Especial énfasis:

Alimentos ya procesados listos para consumir

Riesgo de ETAS

**Identificar las fuentes
de contaminación**

**Determinar presencia de
microorganismos patógenos**

**Es parte del sistema de
aseguramiento de la calidad**

Validar los POES

Verificar los POES

¿Qué es un POES?

Documento interno de una industria que **explica detalladamente los pasos, sustancias y responsabilidades de saneamiento** de equipos o líneas de producción.

Método de limpieza

Frecuencia

Productos a utilizar

Registros y Check-lists

Temperatura del agua

**Monitoreo: diagnóstico
microbiológico**

**Responsables de
ejecutar la tarea**

Acciones correctivas

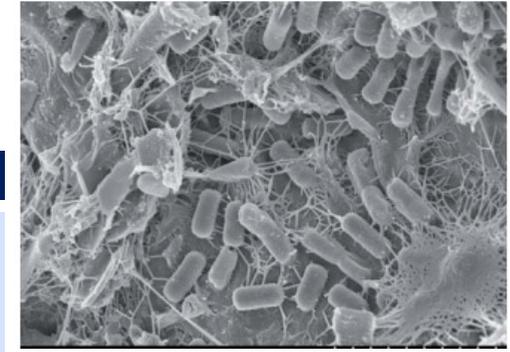
Biopelículas (*Biofilms*)



Comunidades complejas de microorganismos (mono y multiespecie) y sustancias poliméricas extracelulares (EPS) con capacidad de colonizar y posteriormente fijarse a diversas superficies.

Bacillus spp., Enterobacterias, *Staphylococcus aureus*, *E. coli* O157:H7, *L. monocytogenes*, *Salmonella* Typhimurium, *Campylobacter jejuni*, *Yersinia enterocolitica*, *Pseudomonas*.

Los biofilms



Factores de RESISTENCIA

- Crecimiento enlentecido por limitación de nutrientes
- Barrera física y química de las SPE
- Antagonismo de sustancia activas contra desinfectantes

Incrementan su supervivencia



Los métodos habituales de limpieza y desinfección son ineficaces contra las bacterias en un biofilm, lo que dificulta su eliminación.

Prevención



Problemas - Biofilms

* Los biofilms pueden originar una prolongada o persistente contaminación en las plantas de procesamiento de alimentos.

* Corrosión

* Olores desagradables

* Taponamiento de tuberías, disminuyendo la velocidad de transporte de los fluidos

* Deficiencia en la transmisión de calor, disminuyendo la eficiencia de los procesos



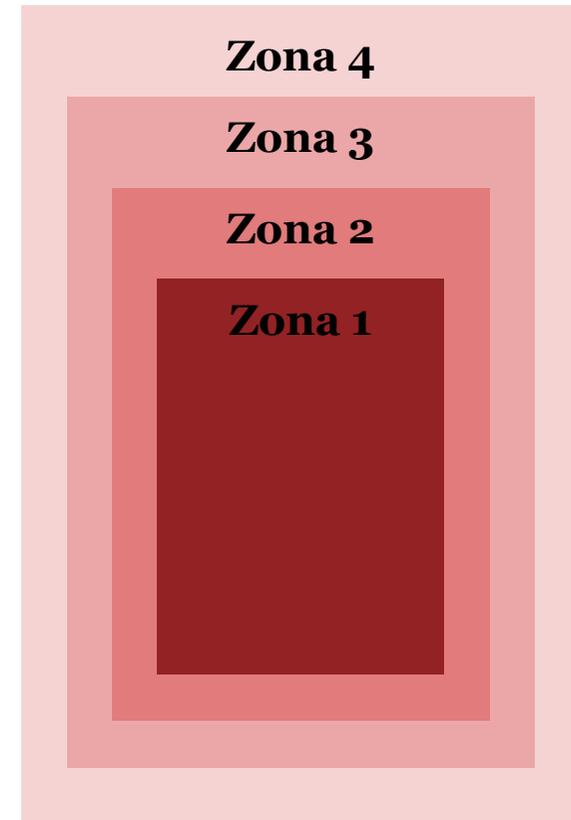
Control microbiológico ambiental

- **Sitios de muestreo - ¿Dónde?**
- **¿Cuándo?**
- **¿Qué MO determinar?**
- **¿Cómo?**

¡Interpretación de resultados!

¿Dónde? ICMSF (2002)

- **Zona 1: prioritaria!** superficies en contacto con los alimentos: cintas transportadoras, mesas, feteadoras.
- **Zona 2:** superficies que no están en contacto pero que están en las cercanías : exterior de los equipos, suelos.
- **Zona 3:** áreas con menor contacto que Zona 2. Teléfonos, paredes y desagües.
- **Zona 4:** zonas alejadas de la producción: pasillos, armarios, etc.



¿Dónde?

Los sitios de muestreo son aquellos que tienen alta probabilidad de transformarse en un nicho, o eventualmente en un **biofilm** y que podrían potencialmente contaminar el producto (zonas rugosas, grietas, ángulos)



Control microbiológico ambiental

- **Sitios de muestreo - ¿Dónde?**
- **¿Cuándo?**
- **¿Qué MO determinar?**
- **¿Cómo?**

¡Interpretación de resultados!

¿Cuándo?

La frecuencia depende del objetivo del monitoreo, del tipo de producto obtenido y del proceso.

Inicialmente se deben realizar muestreos intensivos, para obtener un numero significativo de datos.

Los días y horas deben ser al azar, para reflejar las variaciones propias de la planta.

Control microbiológico ambiental

- **Sitios de muestreo - ¿Dónde?**
- **¿Cuándo?**
- **¿Qué MO determinar?**
- **¿Cómo?**

¡Interpretación de resultados!

¿Qué MO determinar?

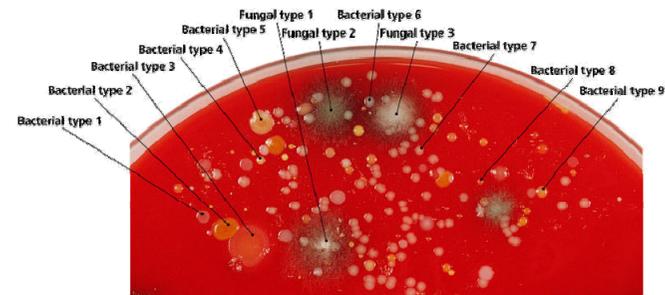


MO indicadores de
calidad e inocuidad

MICROORGANISMOS AEROBIOS MESOFILOS TOTALES

HONGOS Y LEVADURAS

ENTEROBACTERIAS/COLIFORMES/ E.COLI



Muchas veces el tipo de microorganismo reviste mayor importancia que el numero total

PATOGENOS ASOCIADOS AL PRODUCTO

Ej: *E. coli* O157.H7 en frigoríficos

ALTERANTES ASOCIADOS AL PRODUCTO

Ej: *Sacharomyces bailii* en aderezos

Control microbiológico ambiental

- Sitios de muestreo - ¿Dónde?
- ¿Cuándo?
- ¿Qué MO determinar?
- **¿Cómo?**

¡Interpretación de resultados!

¿Cómo?

Análisis microbiológico de superficies

- Método del hisopo
- Método de la esponja
- Método de lavado
- Métodos por contacto directo (Rodac/Petrifilm)
- Método de bioluminiscencia de ATP
- Detección de proteínas



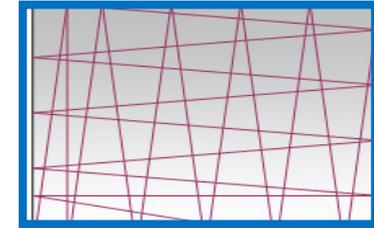
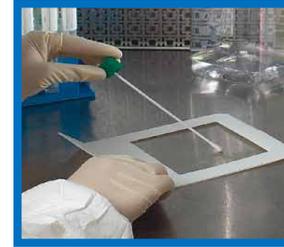
La selección del método debe estar en función de la superficie a muestrear.

Ningún método recupera la totalidad de los microorganismos.

La eficiencia de recuperación es diferencial entre métodos.

Método del hisopo

Superficies planas e irregulares



- Colocar una plantilla sobre la superficie a muestrear (100 cm²).
- Humedecer el hisopo y exprimir la solución en exceso.
- Sostener el hisopo en un ángulo de 30°, frotar la superficie a muestrear en varias direcciones.
- Sumergir inmediatamente el hisopo en la solución, eliminando la parte que estuvo en contacto con el analista.
- Homogeneizar.
- Inocular en las placas para recuento.
- Realizar el recuento.
- Los resultados se expresaran como UFC/cm² o UFC/elemento muestreado. Ej. cuchillo.



Método de la esponja

Superficies planas e irregulares mayores a 100 cm²

- **Hidratar la esponja con diluyente estéril (10 ml)**
- **Muestrear aéreas mayores a 100 cm² con la esponja humedecida en tres orientaciones**
- **Colocar la esponja en la bolsa y el resto de diluyente estéril.**
- **Homogeneizar.**
- **Inocular en las placas para recuento.**
- **Realizar el recuento.**
- **Los resultados se expresaran como UFC/cm² o UFC/elemento muestreado. Ej: cuchillo.**



Método del enjuague



Para manos

Vaciar el diluyente del frasco (100 ml) en una bolsa plástica de primer uso.

Introducir las manos a muestrear hasta la altura de la muñeca.

Solicitar al manipulador que realice un frotado de los dedos y particularmente alrededor de las uñas y la palma de la mano.

Para recipientes (frascos, jarras, otros)

Vaciar en el recipiente a muestrear una parte de la solución estéril (frasco con 100 ml) y agitar vigorosamente.

Regresar la solución a su frasco original.

Para objetos pequeños (piezas de equipos, otros)

Se introduce individualmente cada objeto en el frasco o bolsa con la solución estéril y agitar vigorosamente.

Luego con una pinza estéril, retirar el objeto pequeño del frasco o bolsa.

Consideraciones adicionales

1. Agentes neutralizantes

Table 1 — Neutralizer which can be used in most situations

Component	Conc.
Sorbitan monooleate (Polysorbate 80)	30 g/l
Lecithin	3 g/l
Sodium thiosulfate	5 g/l
L-Histidine	1 g/l
Saponin	30 g/l

2. Transporte al laboratorio

Refrigerado y análisis dentro de las 24hs.

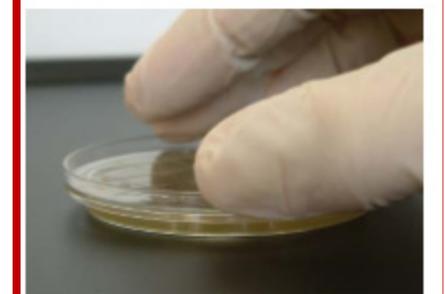
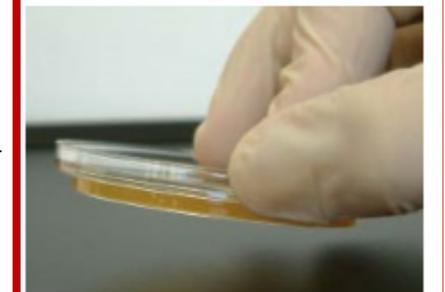
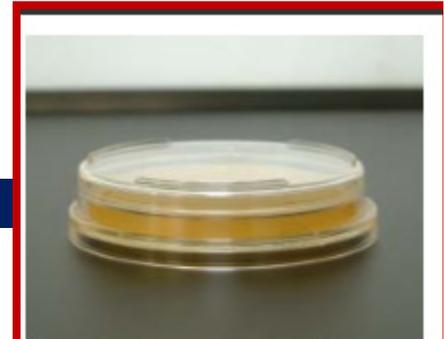
Placas de contacto RODAC

Replicate Organism Direct Agar Contact

- Usualmente tienen 60 mm de diámetro.
- La superficie de agar sobresale del borde de la placa
- Cuando se llenan estas placas el agar debe formar un menisco convexo con la tapa.
- Invertir la placa, contactar e incubar.
- Se expresa como UFC/cm² .

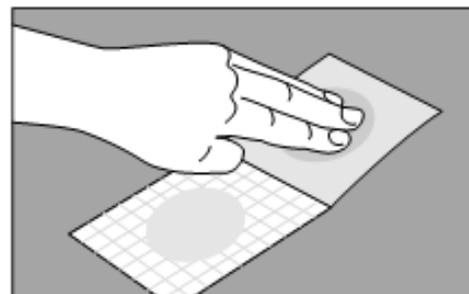
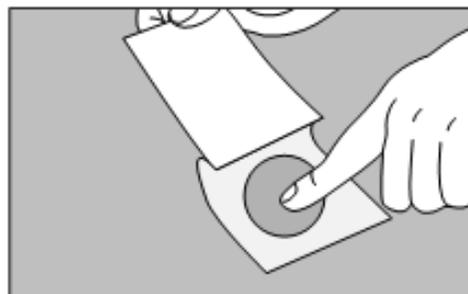
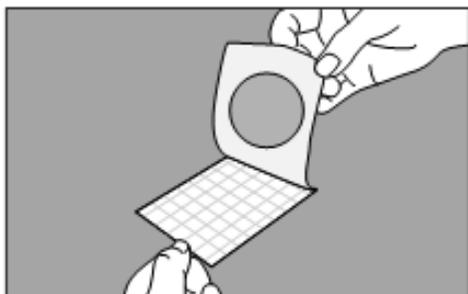
Sólo aplicable a :

- ❖ Superficies lisas (NO porosas).
- ❖ Con recuentos no mayores a 100 UFC/cm².



P
L
A
C
A
S

P
E
T
R
I
F
I
L
M

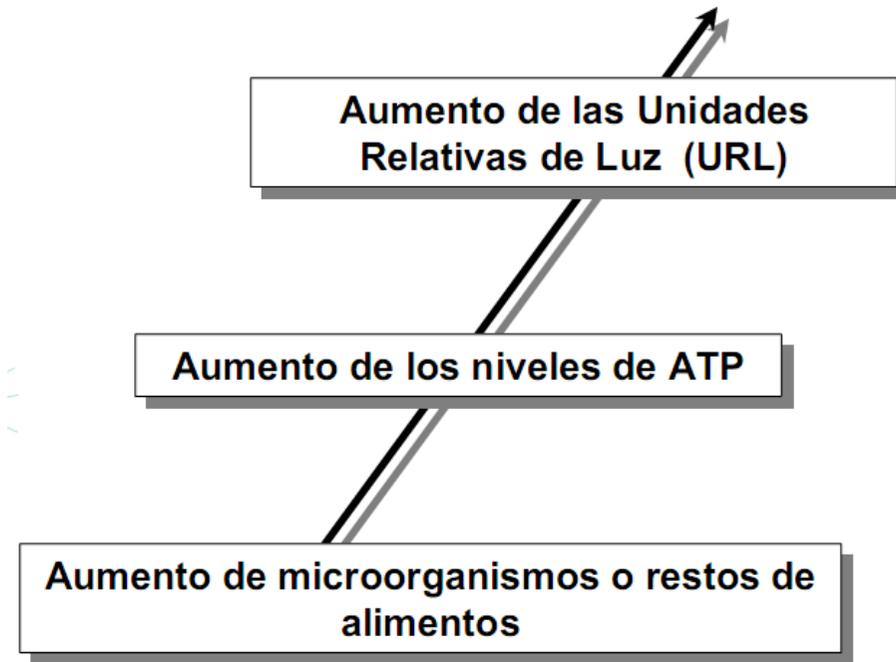


Bioluminiscencia : Detección rápida de ATP

La ATP-Bioluminiscencia está basada en una reacción que ocurre en forma natural en las luciérnagas

La cantidad de luz emitida es proporcional a los niveles de microorganismos y/o materia orgánica presente.





~~URL = UFC~~

Resulta importante establecer los umbrales de aceptación de acuerdo con cada caso en particular

PARÁMETROS	
RANGO [URL]	ESTADO
0 - 150	Limpio
150 - 300	Alerta
> 300	Sucio

Respuesta inmediata → Acción correctiva inmediata

Detección de proteínas - AccuClean



Results

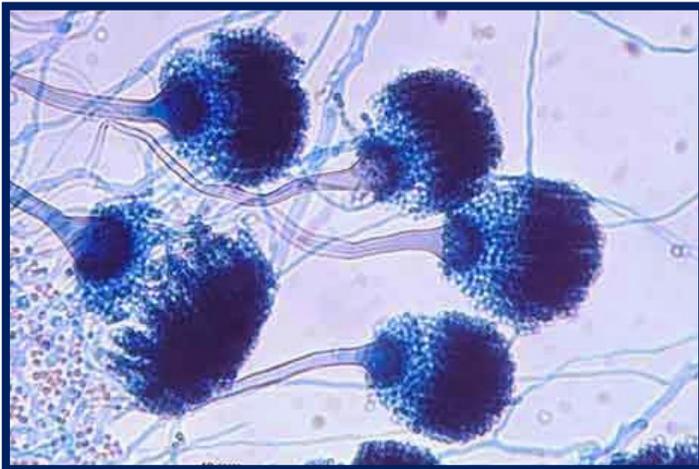


Respuesta inmediata → Acción correctiva inmediata

¿Cómo?

Análisis microbiológico del aire

El aire es un vehículo que puede transportar **esporas** de hongos y también bacterias adheridas a partículas de polvo o contenidas en gotitas microscópicas de líquido (aerosoles).



Métodos más utilizados:

- Sedimentación
- Impactación en medio sólido

Bajo metabolismo

Paredes gruesas que las protegen de la desecación

Muchas son pigmentadas que las protegen de la radiación

Escasa densidad lo cual les permite permanecer suspendidas en el aire sin sedimentar

Producción intensiva

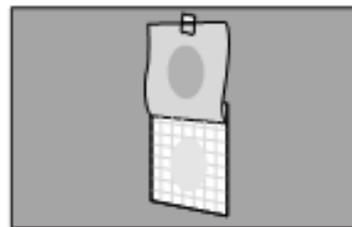
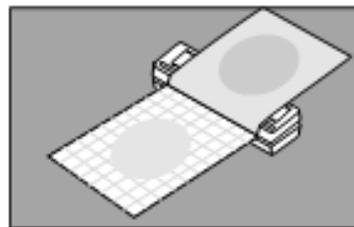
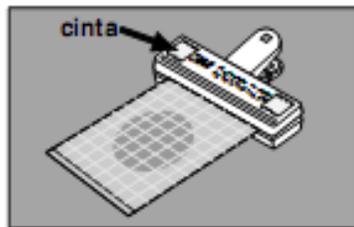
Sedimentación

Consiste en la exposición de placas de Petri al ambiente durante un cierto tiempo. Se colectan partículas en su estado original dependiendo de la fuerza gravitacional y las corrientes de aire.

Este procedimiento no permite conocer el volumen de aire muestreado, pero da una estimación del grado de contaminación del aire.

Tiempo 15-30 min. Placa de 90 mm.

El resultado se expresa como UFC/min (cm²)



Impactación en medios sólidos

Son sistemas portátiles con un único nivel de captación. El aire atraviesa el cabezal con una serie de orificios y la captación de partículas tiene lugar en una placa Rodac o similar. El caudal de aire se puede modificar.

El resultado se expresa como UFC/ m³



La recuperación es (2-10 veces mayor)

COMPARACIÓN DE RESULTADOS

Table 1. Count range, average, and standard deviations of the numbers of yeast and molds and mesophilic aerobic bacteria as determined by impactation technique at processing areas in a dairy plant.

Processing areas	Yeast and Molds		Mesophilic Aerobic Bacteria		Total Coliform		
	Count range CFU.m ⁻³	X ± s CFU.m ⁻³	Count range CFU.m ⁻³	X ± s UFC.m ⁻³	Count range CFU.m ⁻¹		X ± s UFC.m ⁻³
Milk reception	70 – 160	111.1 ± 6.9	110 – 600	313.3 ± 6.6	0.00	0.66	0.00 – 0.66
Milk pasteurization	90 – 260	176.7 ± 49.8	20 – 380	161.1 ± 98.0	0.00	0.66	0.00 – 0.66
Butter and doce de leite	60 – 1310	410.0 ± 490.8	10 – 440	135.6 ± 119.3	0.00	0.00	0.00 – 0.00
Cheese	90 – 610	342.2 ± 39.1	100 – 920	381.1 ± 289.8	0.33	1.66	0.33 – 1.66
Yoghurt	100 – 940	294.4 ± 238.3	100 – 320	212.2 ± 47.6	0.00	0.66	0.00 – 0.66
Milk packaging	100 – 280	184.4 ± 38.6	60 – 170	100.0 ± 47.6	0.00	0.33	0.00 – 0.33

Table 2. Count range, average, and standard deviations of the numbers of yeast and molds and mesophilic aerobic bacteria as determined by culture settling plates technique at processing areas in a dairy plant.

Processing areas	Yeast and Molds		Mesophilic Aerobic Bacteria	
	Count range CFU.cm ² .week ⁻¹	X ± s CFU.cm ² .week ⁻¹	Count range CFU.cm ² .week ⁻¹	X ± s CFU.cm ² .week ⁻¹
Milk reception	10-42	21.7 ± 6.7	11-89	64.9 ± 11.6
Milk pasteurization	21-52	31.4 ± 4.0	10-73	73.6 ± 55.6
Butter and doce de leite	10-87	39.6 ± 28.0	18-95	46.9 ± 53.6
Cheese	15-79	45.2 ± 5.4	15-84	37.6 ± 8.3
Yoghurt	10-97	45.5 ± 30.2	10-79	54.0 ± 58.5
Milk Packaging	13-42	36.1 ± 6.6	10-50	26.4 ± 58.5

Control microbiológico ambiental

- Sitios de muestreo - ¿Dónde?
- ¿Cuándo?
- ¿Qué MO determinar?
- ¿Cómo?
- **¡Interpretación de resultados!**

Interpretación de los resultados

La interpretación dependerá de los objetivos del muestreo.

Si bien existen algunos criterios pre-operacionales, ej.

Superficie limpia (APHA):

Recuento de aerobios mesófilos totales : 1 - 10 UFC/cm² / < 100

UFC/utensillo

Recuento de Enterobacterias: <1 UFC/ cm²

Aire de área de proceso : 90 UFC/m³ (impactación)

El desafío consiste en generar CRITERIOS PROPIOS.

¿Cómo generarlos?

- Graficar datos
- Analizarlos en conjunto
- Evaluar tendencias
- Correlacionar otras variables de interés

Ejemplo N° 1

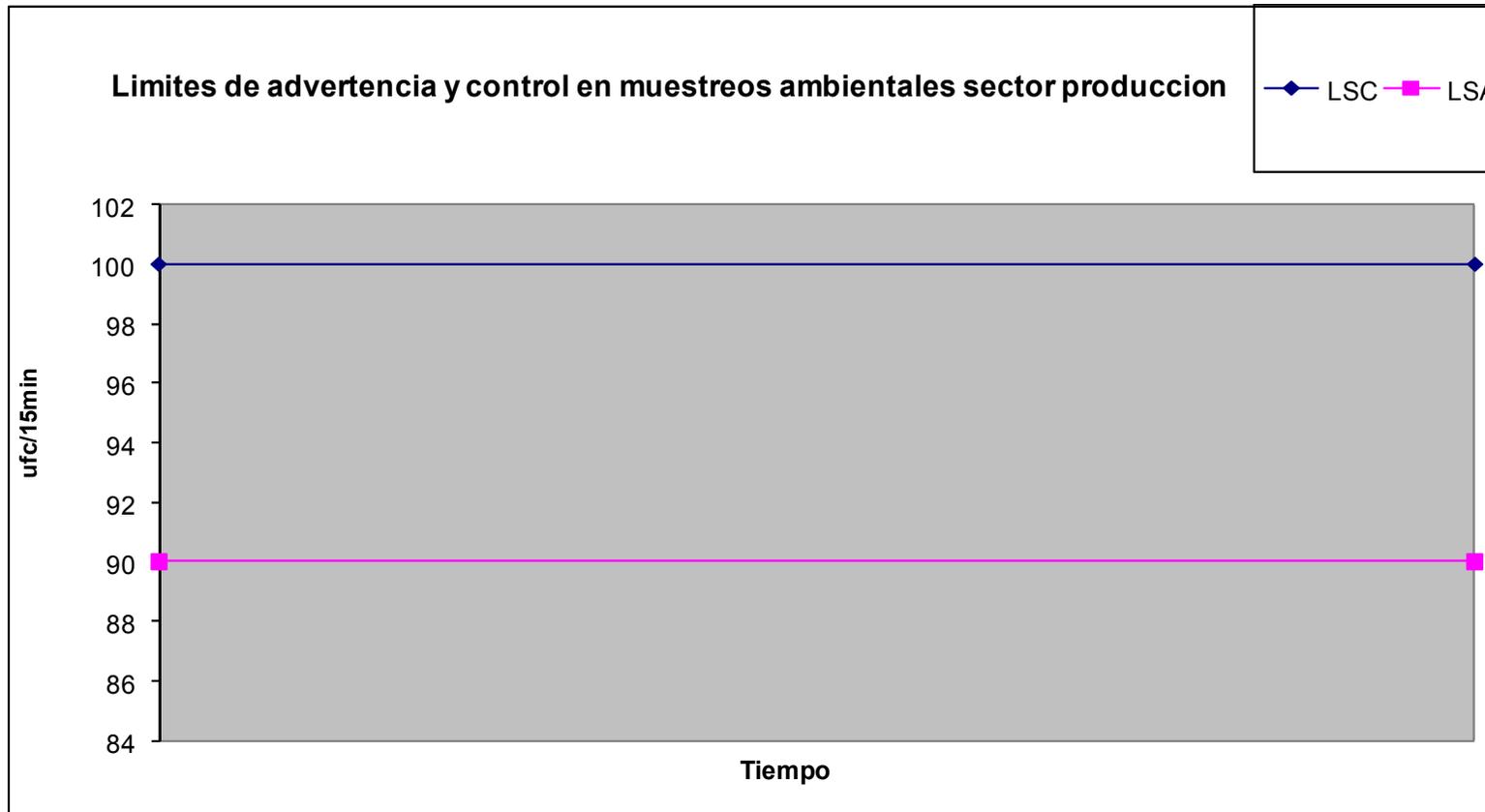
2010 Hongos y Levaduras						
Fecha de analisis	Prod. A	Emp. A	Prod. B	Emp. B	Prod. C	Emp. C
22-01-10			20	13	7	15
04-02-10			12	10	1	11
18-03-12			8	6	14	7
29-03-10			4	3	8	3
05-04-10			6	20	10	9
14-04-10			1	10	1	8
22-04-10			9	17	9	27
29-04-10			6	35	2	51
07-05-10			10	35	9	15
14-05-10			5	76	1	6
21-05-10			8	83	11	25
28-05-10			10	40	9	19
11-06-10			36	66	45	21
18-06-10			12		8	92
25-06-10			4	17	1	13
07-07-10			23	80	11	64
16-07-10			11		19	71
23-07-10			11	16	3	10
06-08-10			4	16	4	7
12-08-10	1	31	3	90		
24-08-10			2	19		
03-09-10	3	45			<1	9
10-09-10	1	13			6	21
17-09-10	1	1			<1	1
24-09-10			3	10	7	7
07-10-10	2	2			<1	<1
29-10-10	3	41			3	12
15-11-10			1	29	9	26
24-11-10			4	13	9	7
26-11-10	4	8			3	11
03-12-10	2	12			3	11
10-12-10	3	21	19	7		

2011 Hongos y Levaduras						
Fecha de analisis	Prod. A	Emp. A	Prod. B	Emp. B	Prod. C	Emp. C
14-01-11	3	3			5	2
11-02-11	5	4			4	4
21-02-11			3	138	4	1
18-03-11	9	14			21	19
23-03-11			1	24	1	14
01-04-11	7	53			7	56
04-04-11			5	26	14	25
12-04-11	5	20			7	4
20-04-11			2	23	4	9
29-04-11	1	52			9	32
04-05-11	7	105			19	33
17-05-11	7	67			13	21
23-05-11	2	13			4	13
31-05-11	2	13			25	10
08-06-11	6	15			4	7
15-06-11			4	93	8	33
24-06-11	3	49			19	27
28-06-11	11	54			24	37
05-07-11	31	286			103	121
15-07-11			3	35	11	119
20-07-11	<1	12			7	4
02-08-11	37	261			66	107
12-08-11	28	105			44	67
17-08-11			5	27	36	43
24-08-11	13	331			24	91
05-09-11	26	28			75	89
08-09-11			4	73	21	32
16-09-11	7				6	20
21-09-11	3	10			6	178
28-09-11	19	271	43	196		
05-10-11	4	11			22	99
12-10-11			35	103	43	68
24-10-11	58				207	233
02-11-11	8	45			16	48
09-11-11	53	153			178	127
17-11-11	102	438			29	54
23-11-11			12	70	35	21
30-11-11	15	39			21	62
07-11-11	5	27			7	9
14-11-11	3	27			14	16
22-11-11	11	39			5	53

2012 Hongos y Levaduras						
Fecha de analisis	Prod. A	Emp. A	Prod. B	Emp. B	Prod. C	Emp. C
02-01-12	6	10			8	59
04-01-12			9	109	18	22
16-01-12	2	5			10	4
20-01-12			2	14	5	4
25-01-12	2	39			29	21
30-01-12	6	19			11	26
06-02-12			4	61	26	55
13-02-12	1	43			41	185
22-02-12	8	21			7	6
29-02-12			3	12	12	12
06-03-12	22	65			51	88
16-02-12			104	21	12	15
22-02-12			11	45	29	15
26-02-12	12	22			6	17
05-04-12	21	104			22	34
12-04-12			2	15	7	7
16-04-12	17	82			105	
23-04-12			14	42	17	50
14-05-12			6	11	13	12
16-05-12	9	46			7	15
29-05-12			288	38	22	25
05-06-12			12	62	24	71
11-06-12			26	78	38	55
19-06-12	105	157			63	101
28-06-12			18	70	50	59
03-07-12	7	16			7	7
10-07-12			7	236	9	36
17-07-12	18	185			19	40
25-07-12			2	42	12	66
31-07-12	14	67			17	40
06-08-12			17	13	12	513
13-08-12	12	218			12	16
21-08-12	171		152			
29-08-12	18	64	11	16		

	Prod. A-B-C
Nº muestras	212
Suma	4084
μ	19,3
σ	35
2σ	89,3
3σ	105

- **Limite de alerta: la media más 2 desvíos std**
- **Limite de acción correctiva: la media más 3 desvíos std**



Ejemplo N° 2

Vivas Palencia, 2010

Dia	UFC/m ³ de aire			T (°C)			% HR		
	Prom	DE	CV(%)	Prom	DE	CV(%)	Prom	DE	CV(%)
1	363	150	41,3	24,6	1,4	5,7	54,6	6,8	12,5
2	412	192	46,7	25,5	0,4	1,6	55,8	2,7	4,8
3	614	755	123,0	25,2	0,5	2,0	57,1	4,2	7,4
4	267	91	34,0	25,5	1	3,9	52,3	4,3	8,2
5	294	99	33,5	27,4	0,8	2,9	47,7	4,3	9,0

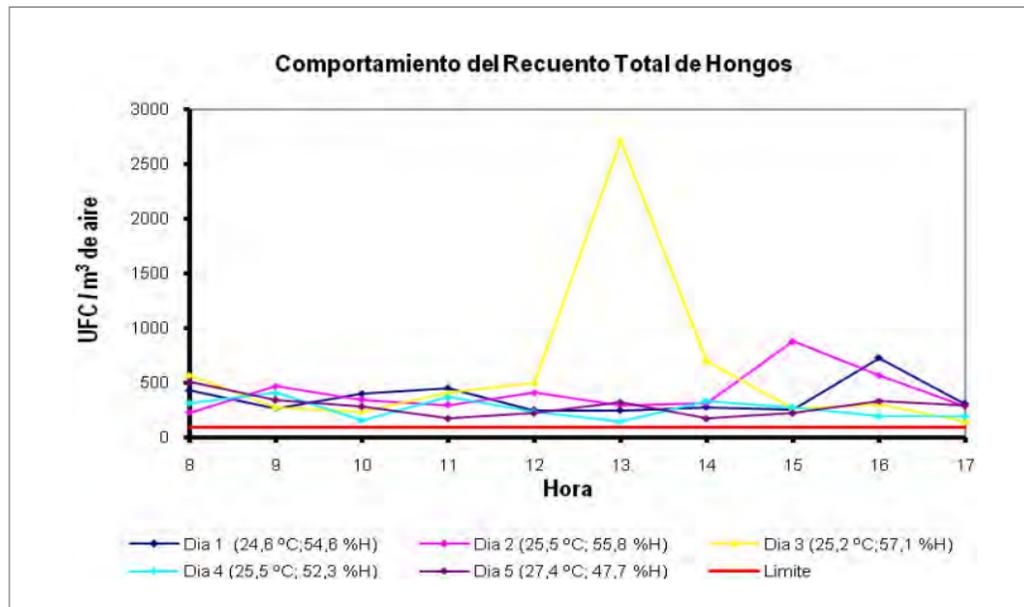


Figura 4.5. Comportamiento de la carga fúngica del aire en la sala de Llenado de Mayonesa, Línea 1. Se presenta el límite de UFC/m³ de aire establecido (línea roja), y el comportamiento en el transcurso de cada día del recuento total de hongos; asociado con el promedio de la temperatura y porcentaje de humedad relativa (%HR) registrado para cada día de evaluación.

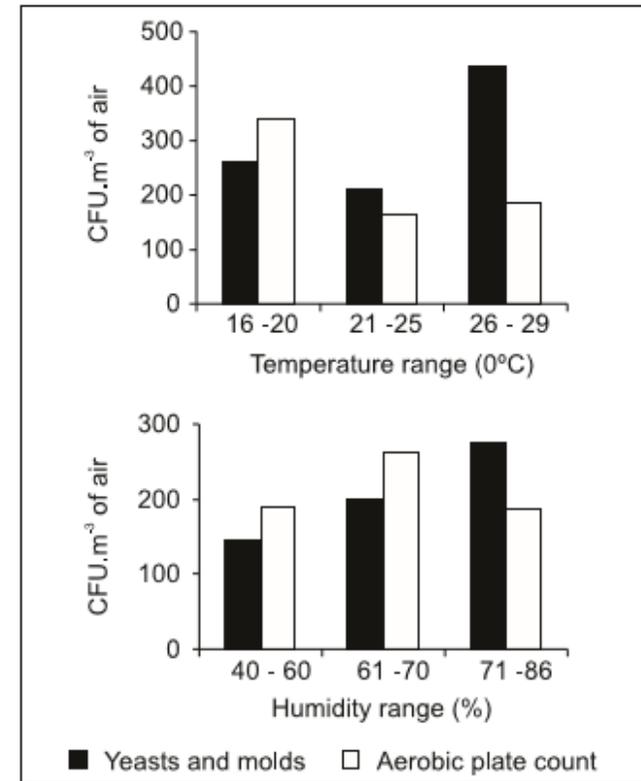


Figure 1. Influence of the temperature and humidity at processing areas in the number of yeast and molds and mesophilic aerobic bacteria, as determined by impaction technique.

Costa Salustiano, et al; 2003

Ejemplo N° 3

Gracias por su atención

Referencias:

Compendium of methods for the Microbiological examination of foods. APHA, 2001.

Microbiology of food and animal feeding stuffs-Horizontal methods for sampling techniques from surfaces using contact plates and swabs. ISO 18593, 2004.

Microbiología de los alimentos. Mossel, A.; Moreno, B. y Struijk, C.B., 2004

Monitoreo de la higiene de superficies. Michaine, S.