

Detección de Microorganismos Patógenos Mediante PCR a Tiempo Real

PCR a Tiempo Real permite ofrecer los mejores resultados en relación con su fiabilidad, plazo de entrega y precio. PCR a Tiempo Real permite ofrecer los mejores resultados en relación con su fiabilidad, plazo de entrega y precio.



Foto: Red Salud República de Chile

En la industria alimentaria es de vital importancia garantizar la ausencia de microorganismos patógenos en el mínimo plazo de tiempo, lo cual ha provocado el desarrollo de metodologías analíticas alternativas, que permitan una detección rápida, económica y fiable.

Estos métodos alternativos para el análisis microbiológico de alimentos ya están siendo empleados tanto por laboratorios de autocontrol como en laboratorios de control oficial de alimentos. En este sentido, el actual Reglamento relativo a los criterios microbiológicos aplicables a los productos alimenticios (Reglamento (CE) nº 2073/2005 de 15 de noviembre de 2005, DOCE L

338 22/12/05) recoge en su considerando 24 y 5 que "los explotadores de las empresas alimentarias pueden usar métodos analíticos diferentes a los métodos de referencia, en particular métodos más rápidos, siempre que estos métodos alternativos produzcan resultados equivalentes y estén validados"

Estas metodologías pueden estar basadas en técnicas muy diversas (medios cromogénicos, sistemas ELISA...) entre las que se encuentran las técnicas de análisis genéticos basadas en la tecnología PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa). Dentro de los métodos basados en PCR, aquellos que están demostrando una mejor adaptación



Foto: Universidad De Girona



Foto: IFPC Eden Bottles

para el control de patógenos en alimentos son los basados en PCR a Tiempo Real que permiten ofrecer los mejores resultados en relación con su fiabilidad, plazo de entrega y precio.

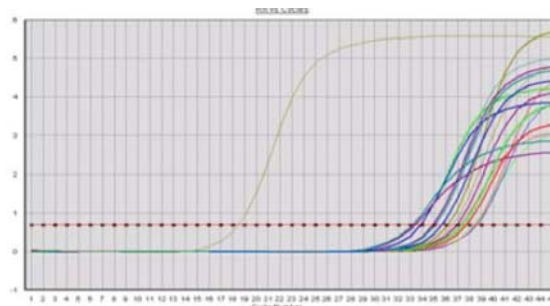
Controles de calidad utilizados en los métodos de PCR a Tiempo Real:

La utilización de la PCR a Tiempo Real permite la estandarización de los ensayos y la incorporación de sistemas de control de calidad internos

que suponen un importante avance en cuanto a la fiabilidad de los resultados obtenidos. Ainia, en la ejecución de estos ensayos, incluye y amplía los criterios de control de calidad establecidos en la Norma ISO 22174:2005, contemplando los siguientes controles analíticos:

Ventajas y limitaciones de las técnicas basadas en PCR a Tiempo Real:

El empleo de la técnica de PCR a Tiempo Real supone numerosas ventajas frente a las técnicas convencionales de análisis microbiológico, entre las que se pueden destacar:



Control positivo de proceso	Permite asegurar que se detectan bajos niveles de células diana contemplando todas las fases del análisis (crecimiento en la fase de pre-enriquecimiento, extracción de ADN, amplificación y detección)
Control negativo de proceso	Garantiza la ausencia de contaminaciones cruzadas durante toda la manipulación de las muestras
Control positivo de extracción	Permite evaluar eficiencia en la extracción de ADN y posterior amplificación y detección del mismo
Control endógeno	Se encuentra en el mismo tubo donde se está analizando la muestra y permite detectar inhibición y pérdida de eficiencia de la reacción de PCR
Control negativo de PCR (NTC)	Permite detectar contaminaciones cruzadas entre muestras de la misma tanda durante el proceso de amplificación y detección de ADN
Referencia pasiva ROX	Permite normalizar todas las señales de fluorescencia de forma que se pueda comparar los resultados de las muestras y de los controles internos para evaluar sus resultados de forma cuantitativa.
Reactivo UNG-Gly	Consiste en un enzima presente en la mezcla de reactivos que permite hidrolizar cualquier fragmento de ADN procedente de anteriores análisis, evitando la posibilidad de contaminación cruzada en la reacción de amplificación y detección.

- Obtención de resultados en 24 horas, gracias a los menores plazos de incubación necesarios para detectar la bacteria y a la posibilidad de automatizar la técnica.
- Mejores límites de detección con menor influencia del efecto matriz.
- Mínimo efecto de otros microorganismos interfirientes, debido a la eficacia de las dianas génicas seleccionadas.
- Interpretación de resultados de forma objetiva, basada en valores numéricos con tolerancias establecidas en lugar de en características subjetivas (aspecto de la colonia, pruebas bioquímicas...)

Entre las limitaciones asociadas a estas técnicas, indicar que:

- Es posible obtener resultados falsos positivos debido a la detección de bacterias no viables. No obstante, tanto la etapa inicial de pre-enriquecimiento de las muestras minimizan esta posibilidad.

De forma adicional, esta técnica permite realizar análisis complementarios sobre la misma porción de muestra mediante técnicas tradicionales de aisla-

miento en cultivo, por lo que la posibilidad de obtener un falso positivo con respecto al método de referencia es nula.

- Existen alimentos que pueden inhibir la reacción de PCR y por tanto dar resultados falsos negativos. Sin embargo, los controles de calidad que se incluyen y, sobre todo, el control endógeno permite conocer si se ha podido producir esta inhibición y, en caso afirmativo, realizar análisis complementarios mediante técnicas de cultivo.

Tanto los métodos de análisis basados en PCR a Tiempo Real como las técnicas de análisis complementarias basadas en cultivo que emplea ainia han sido validadas y disponen de la acreditación ENAC acorde a los criterios establecidos en la ISO 17025:2005.

Fuente:

Ainia
España, 2005.