



La salud
es de todos

Minsalud



INSTITUTO NACIONAL DE SALUD
Ciencia, Tecnología e Innovación

Visítenos en
www.ins.gov.co





INSTITUTO
NACIONAL DE
SALUD

Microbiología predictiva

Carla María Blanco Lizarazo

Grupo ERIA y Plaguicidas



La salud
es de todos

Minsalud

Introducción

¿Qué es la ecología microbiana?

Estudio de interacciones entre los **microorganismos** y su ambiente



Factores implícitos

- Intra-especies
- Intra-reinos

- Factores extrínsecos
- Factores intrínsecos

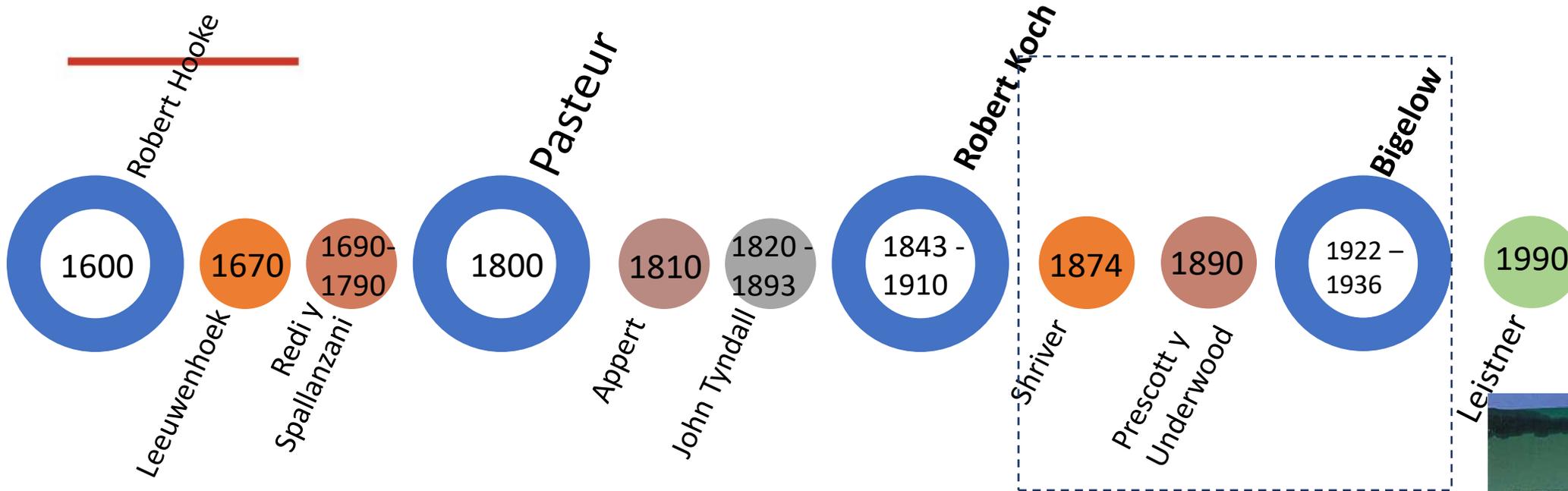
Microbiología predictiva o Ecología microbiana cuantitativa

El uso de matemáticas y estadística para describir el comportamiento de los microorganismos

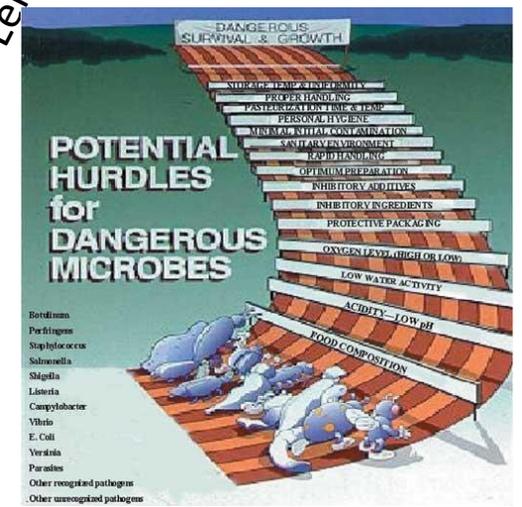
(Buchanan, 2013)

Introducción

Historia de la microbiología de alimentos

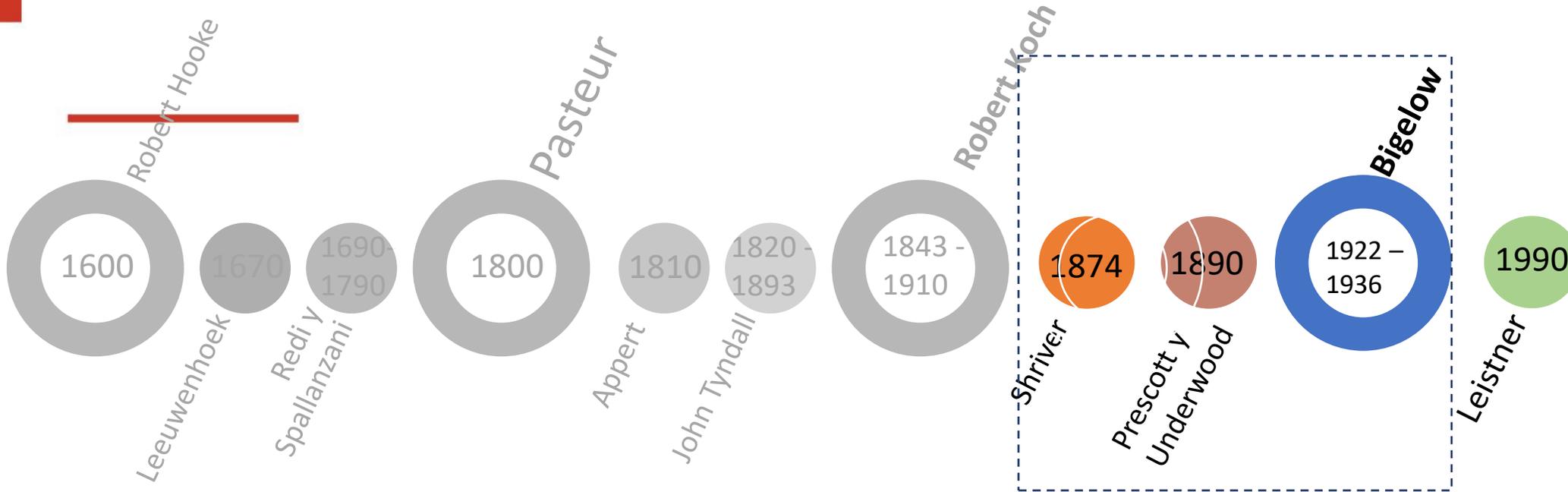


Modelos de procesamiento térmico (T°C y t)



Introducción

Historia de la microbiología de alimentos



¿Transporte seguro?

¿Los microorganismos podrían sobrevivir las condiciones ambientales?

¿Cómo es la variabilidad en el proceso entre lotes?



Análisis de cinéticas de comportamiento bacteriano

- Describe cambios en el número de bacterias respecto al tiempo
- Condiciones ambientales específicas
- Información de salida: fase lag y tiempo de generación

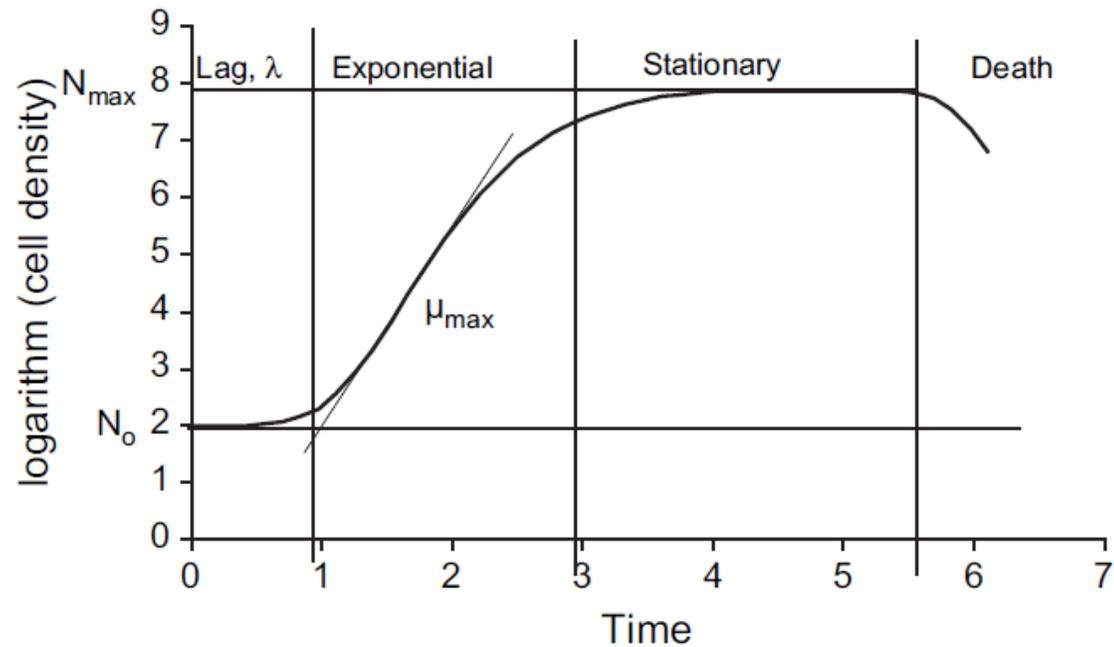


Fig. 1. Growth curve. λ lag time, μ_{max} the maximum specific growth rate, N_0 inoculum and N_{max} maximum bacterial population.

CONDICIONES EXTRACELULARES:

$c(t) = \Delta$ extracelulares $f(\text{metabolismo bacteriano})$

$D(t) = \Delta$ ambiental

$z(t) = \text{varianza biológica } (p)$

$$\mu(t) = \varphi(z(t), c(t); D(t))$$

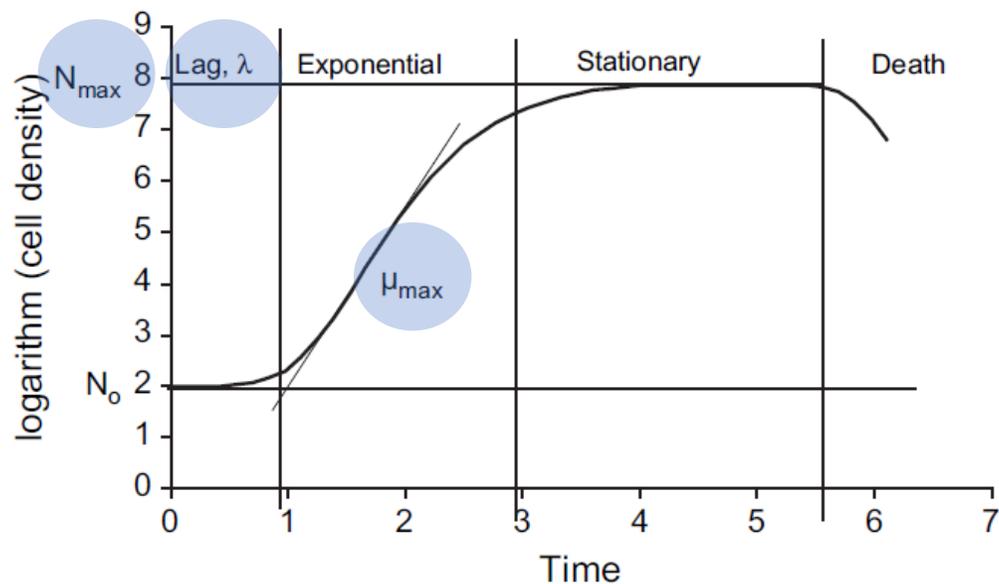
$$\frac{dN(t)}{dt} = \mu(t)N(t)$$

Evaluación de la exposición – Microbiología predictiva

Ecología microbiana cuantitativa o microbiología predictiva:

El uso de matemáticas y estadística para describir el comportamiento de los microorganismos

(Buchanan, 2013)



$$\frac{dN(t)}{dt} = \mu(t)N(t)$$

Modelos primarios

Modelos secundarios

Modelos terciarios

Fig. 1. Growth curve. λ lag time, μ_{max} the maximum specific growth rate, N_0 inoculum and N_{max} maximum bacterial population.

Fuente: Lebert and Lebert, 2006



Evaluación de la exposición – Microbiología predictiva

Ecología microbiana cuantitativa o microbiología predictiva:

El uso de matemáticas y estadística para describir el comportamiento de los microorganismos

(Buchanan, 2013)

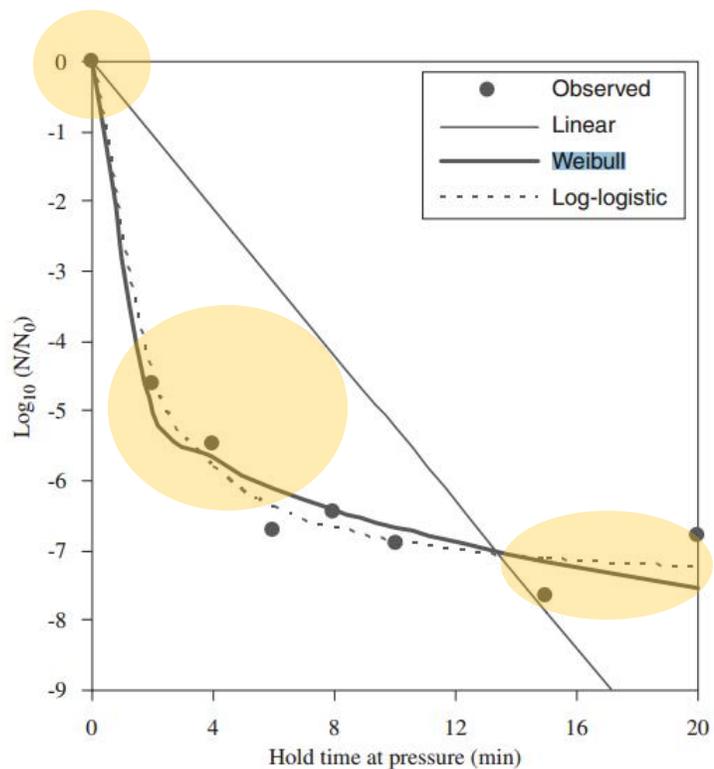


Fig. 2. Survival data (without the data during the come up time period) of *Salmonella enterica* serovar Enteritidis fitted with the linear, log-logistic, and Weibull models.

Fuente: Chen et al., 2007

$$\frac{dN(t)}{dt} = -\mu(t)K(t)$$

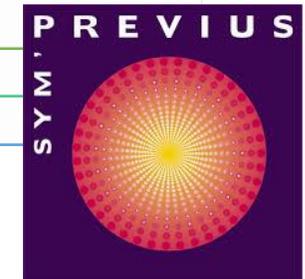
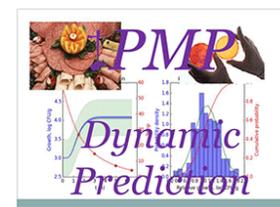
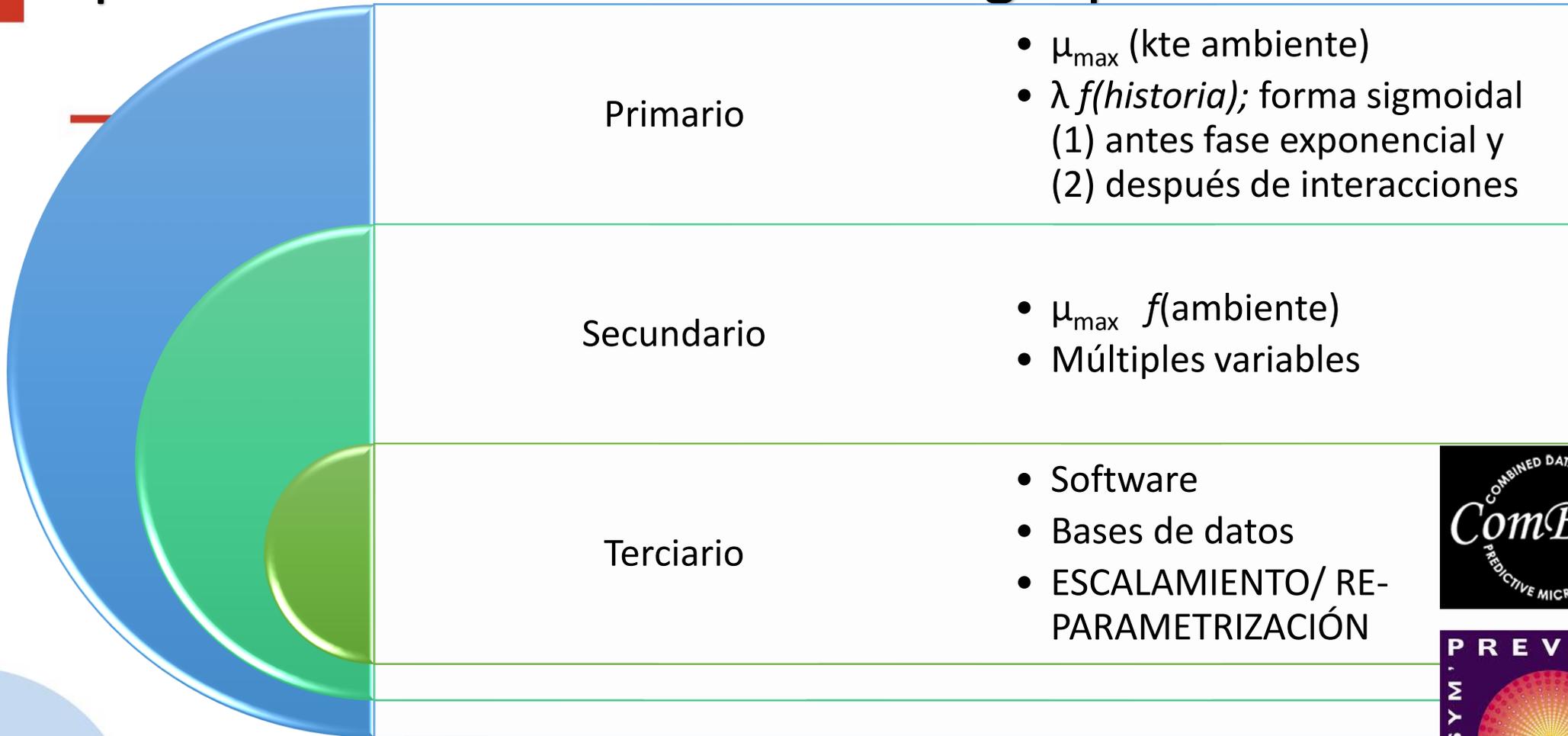
Modelos primarios

Modelos secundarios

Modelos terciarios



Tipos de modelos de microbiología predictiva



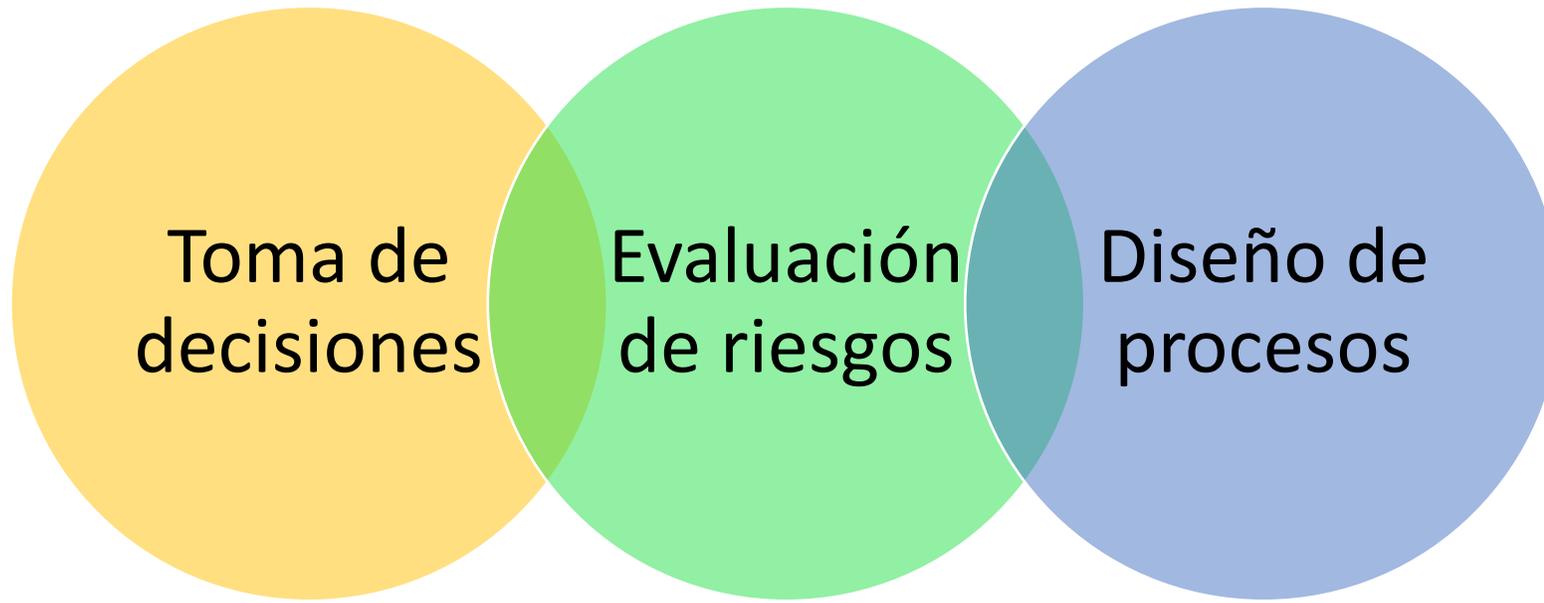
Respuesta de las entidades regulatorias a la Microbiología Predictiva

- **USDA: Guía de compilación para enfriamiento y tratamiento térmico de productos cárnicos y pollo (Estabilización)**
 - Modelación computacional y/o muestreo que asegure seguridad de un alimento. Información sobre prevalencia de *C. perfringens* (LIMITACIONES DE MUESTREO). En donde la modelación computacional aunque no provee determinaciones exactas sobre el crecimiento de *C. perfringens* SÍ PROVEE ESTIMADOS ÚTILES
- **DETERMINACIÓN DE VIDA ÚTIL**
 - Comission of European Communities Guidance Document (2008) on *Listeria monocytogenes* shelf – life studies for ready-to- eat foods, Regulation (EC) No. 2073/2005 of 15 november 2005 on Microbial criteria for foodstuffs**
 - A pesar de las limitaciones de los modelos predictivos, son herramientas útiles para estimar el crecimiento de *L. monocytogenes* en alimentos.
- **Anexo II: Guía de aplicación de principios generales de higiene y control de *L. monocytogenes* en alimentos listos para el consumo**
 - Codex alimentarius (CAC/GL 61-2007)**
 - Crecimiento bajo límites críticos/ factores de supervivencia

Respuesta de las entidades regulatorias a la Microbiología Predictiva

- **USDA: Guía de compilación para enfriamiento y tratamiento térmico de productos cárnicos y pollo (Estabilización)**
 - Modelación computacional y/o muestreo que asegure seguridad de un alimento. Información sobre prevalencia de *C. perfringens* (LIMITACIONES DE MUESTREO). En donde la modelación computacional aunque no provee determinaciones exactas sobre el crecimiento de *C. perfringens* SÍ PROVEE ESTIMADOS ÚTILES
- **DETERMINACIÓN DE VIDA ÚTIL**
 - Comission of European Communities Guidance Document (2008) on *Listeria monocytogenes* shelf – life studies for ready-to- eat foods, Regulation (EC) No. 2073/2005 of 15 november 2005 on Microbial criteria for foodstuffs**
 - A pesar de las limitaciones de los modelos predictivos, son herramientas útiles para estimar el crecimiento de *L. monocytogenes* en alimentos.
- **Anexo II: Guía de aplicación de principios generales de higiene y control de *L. monocytogenes* en alimentos listos para el consumo**
 - Codex alimentarius (CAC/GL 61-2007)**
 - Crecimiento bajo límites críticos/ factores de supervivencia

Aplicaciones en la industria de alimentos de la microbiología Predictiva



Análisis de casos puntuales – liberación de lotes

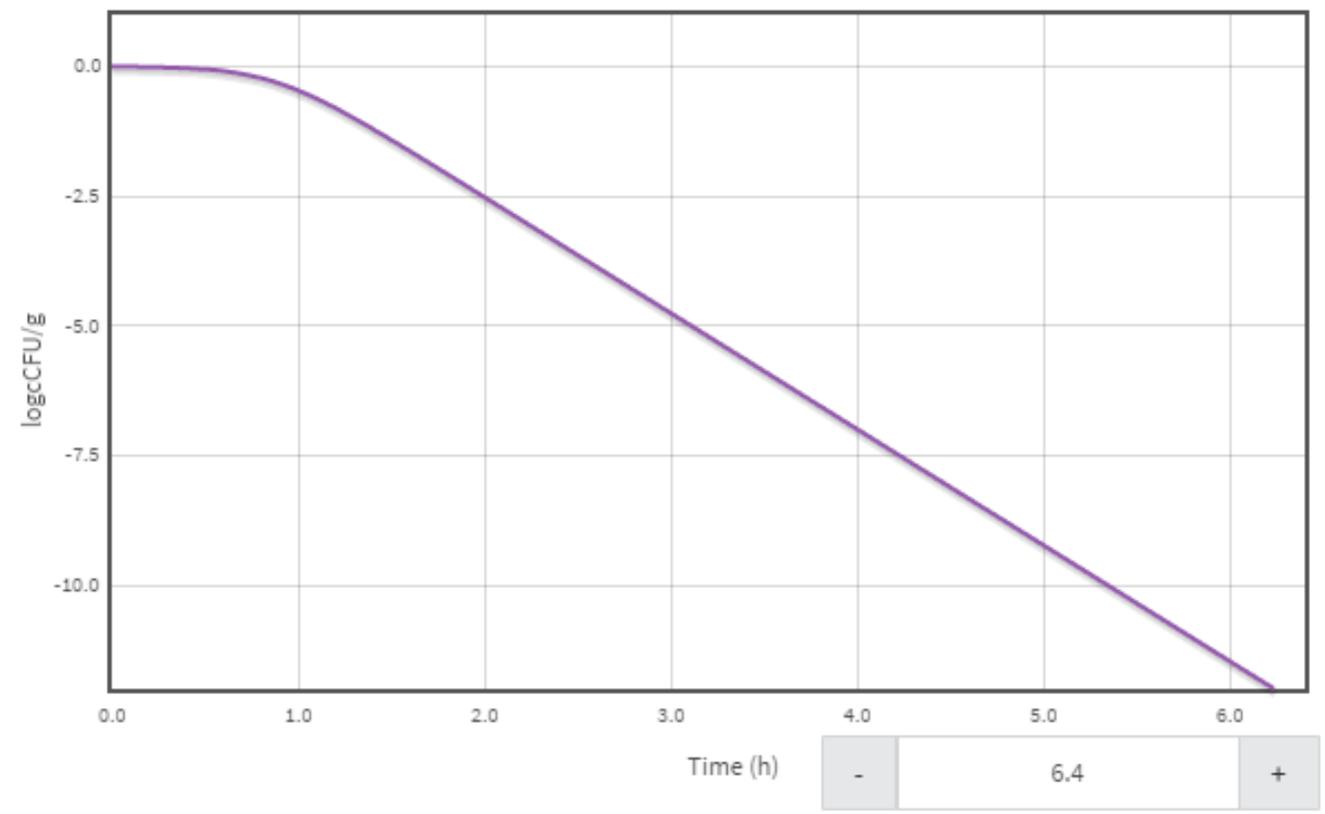
Toma de decisiones

Fue procesado un dulce de leche (pH 7, Aw 0.986), para ello se sometió a un proceso de cocción a 92°C con agitación constante, por 30 min.

* En los muestreos microbiológicos fue encontrado *Bacillus cereus* en el alimento, ¿Se aseguró bajo las condiciones de procesamiento la inactivación del M.O?

Bacillus cereus

Phys.state	1.1e-2
Temp (°C)	92
pH	7
Aw	0.986



Diseño de métodos de conservación

Diseño de
procesos



Prioridad de control ALTA

Listeriosis es la segunda ETA de mayor importancia a nivel mundial por su severidad (CDC, 2014; WHO, 2008)

¿Alternativa al control, uso de cultivos iniciadores?

Múltiples mecanismos de inhibición involucrados:

- Competencia por nutrientes y factores de crecimiento
- Producción de ácidos orgánicos
- Proteasas y bacteriocinas
- Peróxidos
- Otros metabolitos secundarios

DIFERENTES niveles de resistencia y prevalencia de *L. monocytogenes*

Modelo de interacciones inter-bacterianas

Modelo de respuesta a la inactivación de diversas subpoblaciones bacterianas

Diseño de métodos de conservación

Modelo de interacciones inter-bacterianas

Diseño de procesos

Food Sci. Biotechnol. 25(1): 341-348 (2016)
DOI 10.1007/s10068-016-0048-0

Food Science and Biotechnology

In vitro* Modelling of Simultaneous Interactions of *Listeria monocytogenes*, *Lactobacillus sakei*, and *Staphylococcus carnosus

Carla María Blanco-Lizarazo¹, Indira Sotelo-Díaz*, and Adriana Llorente-Bousquets²

Agroindustrial Process Research Group, EICEA, University of La Sabana, Colombia

¹*Engineering Faculty, Agroindustrial Process Research Group, University of La Sabana, Cundinamarca, Colombia*

²*Engineering and Technology Department, Faculty of Graduate Studies Cuautitlan, National Autonomous University of Mexico (UNAM), Mexico*

- i. Interacciones microbianas referidas a inhibición MDP
- ii. Relación entre población minoritaria vs. mayoritaria



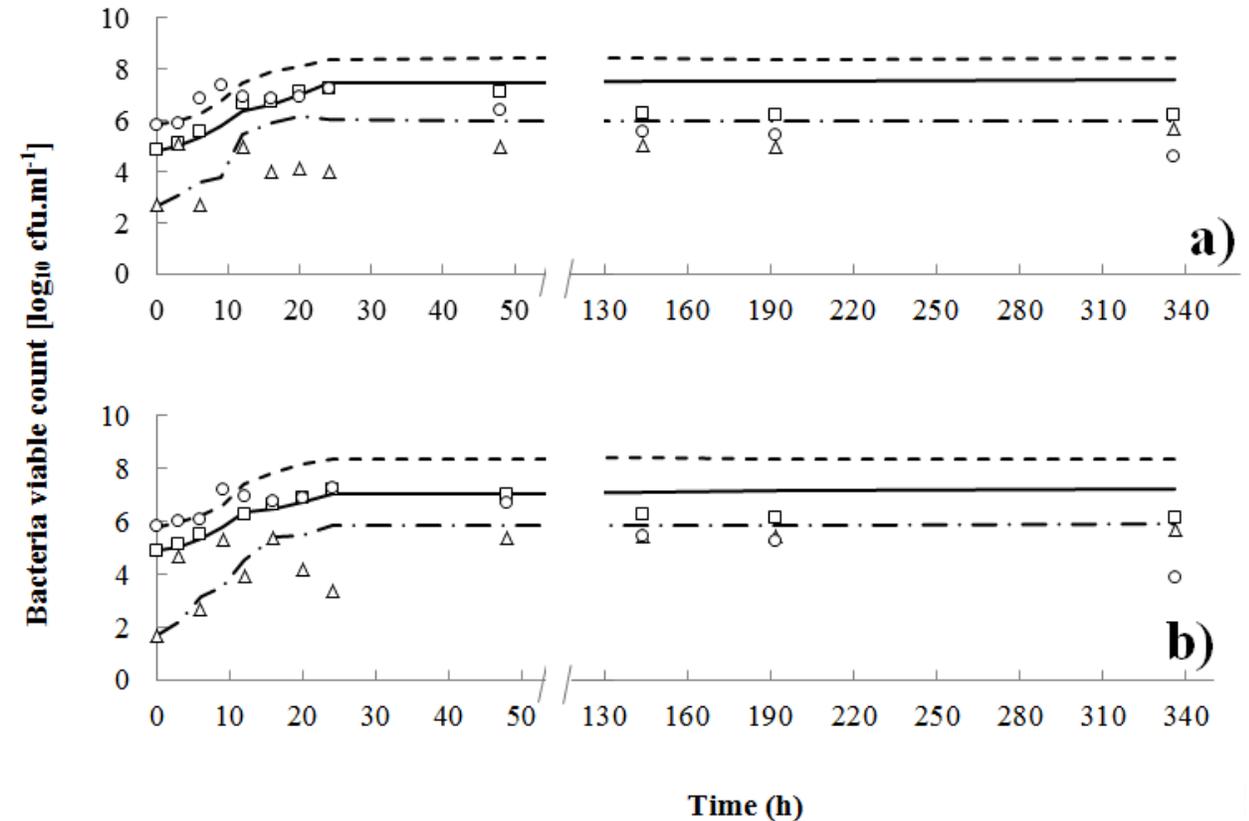
Mellefont *et al.* (2008)
 “Carrera entre especies para usar los recursos del ambiente, para maximizar crecimiento poblacional. Cuando los recursos se han agotado, la carrera termina y las poblaciones cesan su crecimiento”

Diseño de métodos de conservación

$$\frac{dN_{LS}}{dt} = \mu_{LS}^{\max} N_{LS} \frac{Q_{LS}}{1+Q_{LS}} \left(1 - \frac{N_{LS} + \left(\beta_{\frac{LS}{SC}} \cdot N_{SC} \right) + \left(\beta_{\frac{LS}{LM}} \cdot N_{LM} \right)}{N_{LS}^{\max}} \right)$$

$$\frac{dN_{SC}}{dt} = \mu_{SC}^{\max} N_{SC} \frac{Q_{SC}}{1+Q_{SC}} \left(1 - \frac{N_{SC} + \left(\beta_{\frac{LS}{SC}} \cdot N_{LS} \right) + \left(\beta_{\frac{LS}{LM}} \cdot N_{LM} \right)}{N_{SC}^{\max}} \right)$$

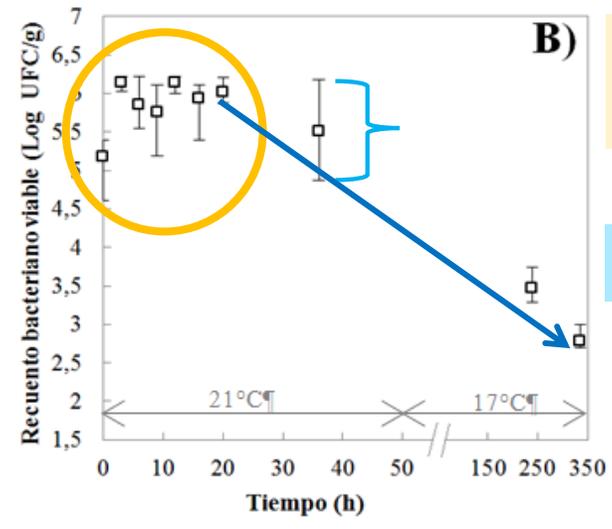
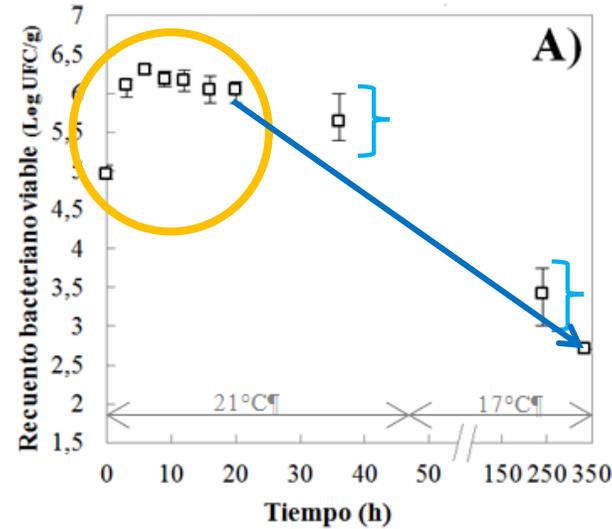
$$\frac{dN_{LM}}{dt} = \mu_{LM}^{\max} N_{LM} \frac{Q_{LM}}{1+Q_{LM}} \left(1 - \frac{N_{LM} + \left(\beta_{\frac{LS}{SC}} \cdot N_{SC} \right) + \left(\beta_{\frac{LS}{LM}} \cdot N_{LS} \right)}{N_{LM}^{\max}} \right)$$



Modelling the simultaneous growth based in Jameson effect in co-culture without sodium nitrite (a); and 50 ppm sodium nitrite (b). Real datasets for *L. monocytogenes* (□), *L. sakei* (Δ) and *S. carnosus* (○). Estimation by model (Eq. 3) for *L. monocytogenes* (-), *L. sakei* (-.-) and *S. carnosus* (-.-)

Diseño de métodos de conservación

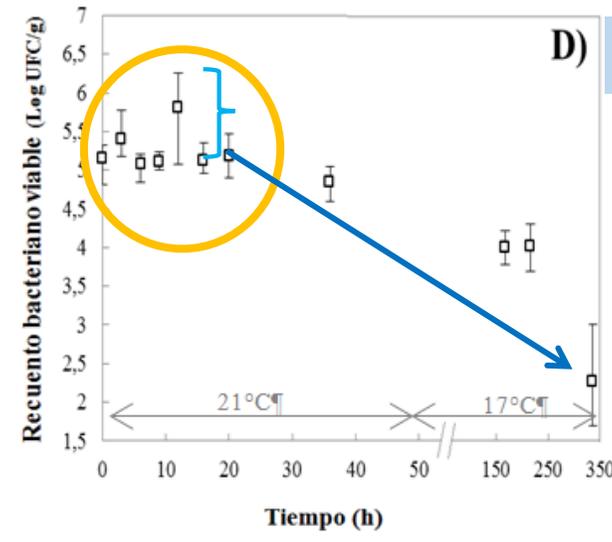
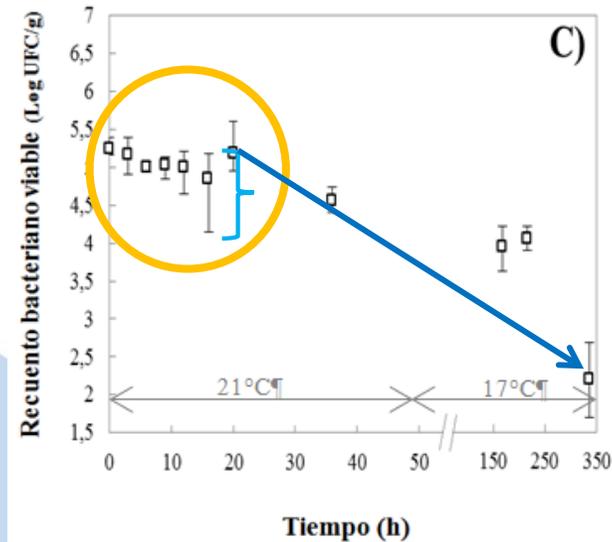
Modelo de respuesta a la inactivación de diversas subpoblaciones bacterianas



Susceptibilidad en la primera fase del tratamiento "Hombro"

Alta variabilidad en la inactivación

La variabilidad de la respuesta de *L. monocytogenes*, está atribuida a la influencia del cultivo iniciador y la a_w (Mataragas *et al.*, 2015)



Tendencia a la **inactivación**

Atribuida a factores simultáneos, relacionados con la competencia por nutrientes y la actividad metabólica de starter (Albano *et al.*, 2007)

Dinámica de crecimiento de *L. monocytogenes* en salami inoculado para tratamientos Ls-Sc (A), Ls-Sc+ (B), C (C) y C+ (D). Las barras indican valores máximos y mínimos

Modelo de respuesta a la inactivación de diversas subpoblaciones bacterianas

Modelo de Coroller *et al.* (2006)

$$N(t) = \frac{N_0}{1 + 10^\alpha} \left[10^{-\left(\frac{t}{\delta_1}\right)^p + \alpha} + 10^{-\left(\frac{t}{\delta_2}\right)^p} \right]$$

Tratamiento	α	p	δ_1 (s)	δ_2 (s)
<i>Ls-Sc</i> ⁺	3.13	1.31	25.92	219.42
<i>Ls-Sc</i>	2.00	2.47	40.90	254.70
<i>C</i> ⁺	31.15	6.00	140.72	304.11
<i>C</i>	48.57	4.86	197.69	385.94

Aumenta tiempo para reducción de primera
reducción decimal ∴ k_{max}

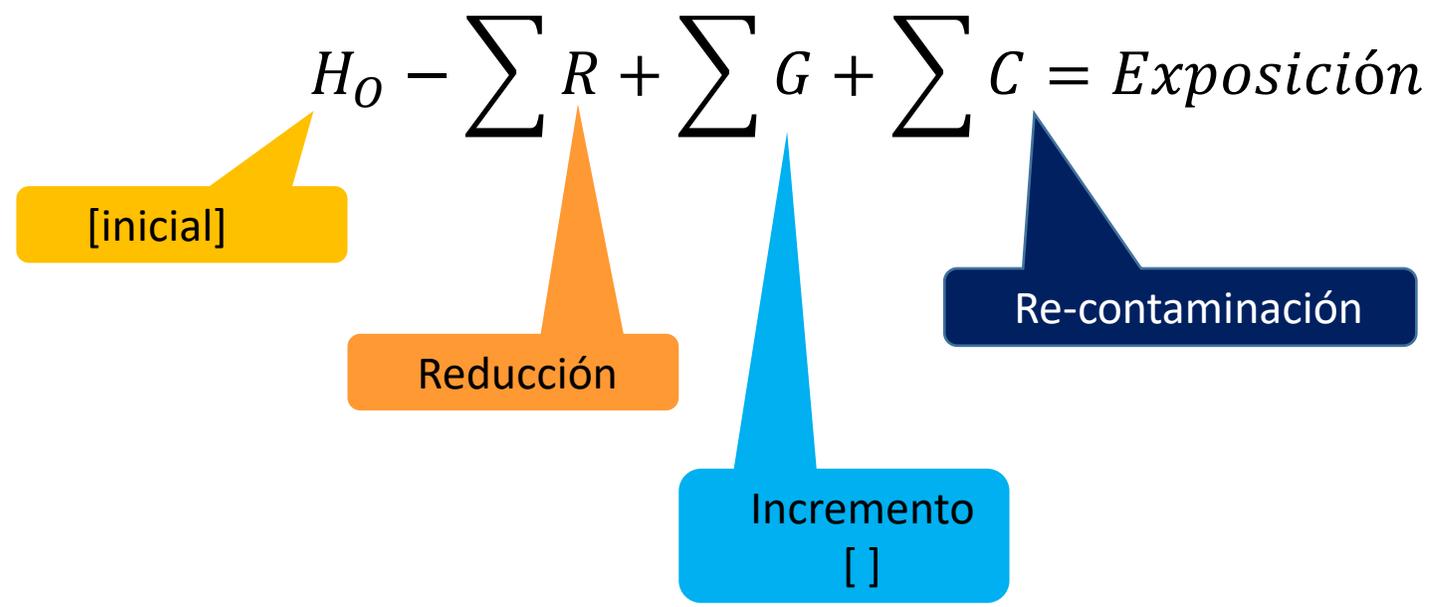
Recuento Microbiano *L. monocytogenes* post-maduración (Log ufc.g⁻¹)

<i>C</i>	2.20	<i>C</i> ⁺	2.27
<i>Ls-Sc</i>	0.30	<i>Ls-Sc</i> ⁺	1.25
%INHIBICIÓN vs. CONTROL	86.36	%INHIBICIÓN vs. CONTROL	44.78

Evaluación de riesgos

Evaluación de riesgos

Base de la evaluación a la exposición (ICPMF, 2002; Nauta, 2013)





INSTITUTO
NACIONAL DE
SALUD

Evaluación de riesgos de *Salmonella* spp para huevo de gallina líquido pasteurizado en Colombia

Carla Blanco, John Vásquez

Contratistas

ERIA y Plaguicidas



La salud
es de todos

Minsalud

Justificación

El trabajo fue realizado en el marco del Convenio 374 de 2017 celebrado entre INS y INVIMA.

*Con base al **Plan de Monitoreo de Salmonella spp. en plantas productoras de huevo líquido seleccionadas a nivel nacional de Invima en el 2016***

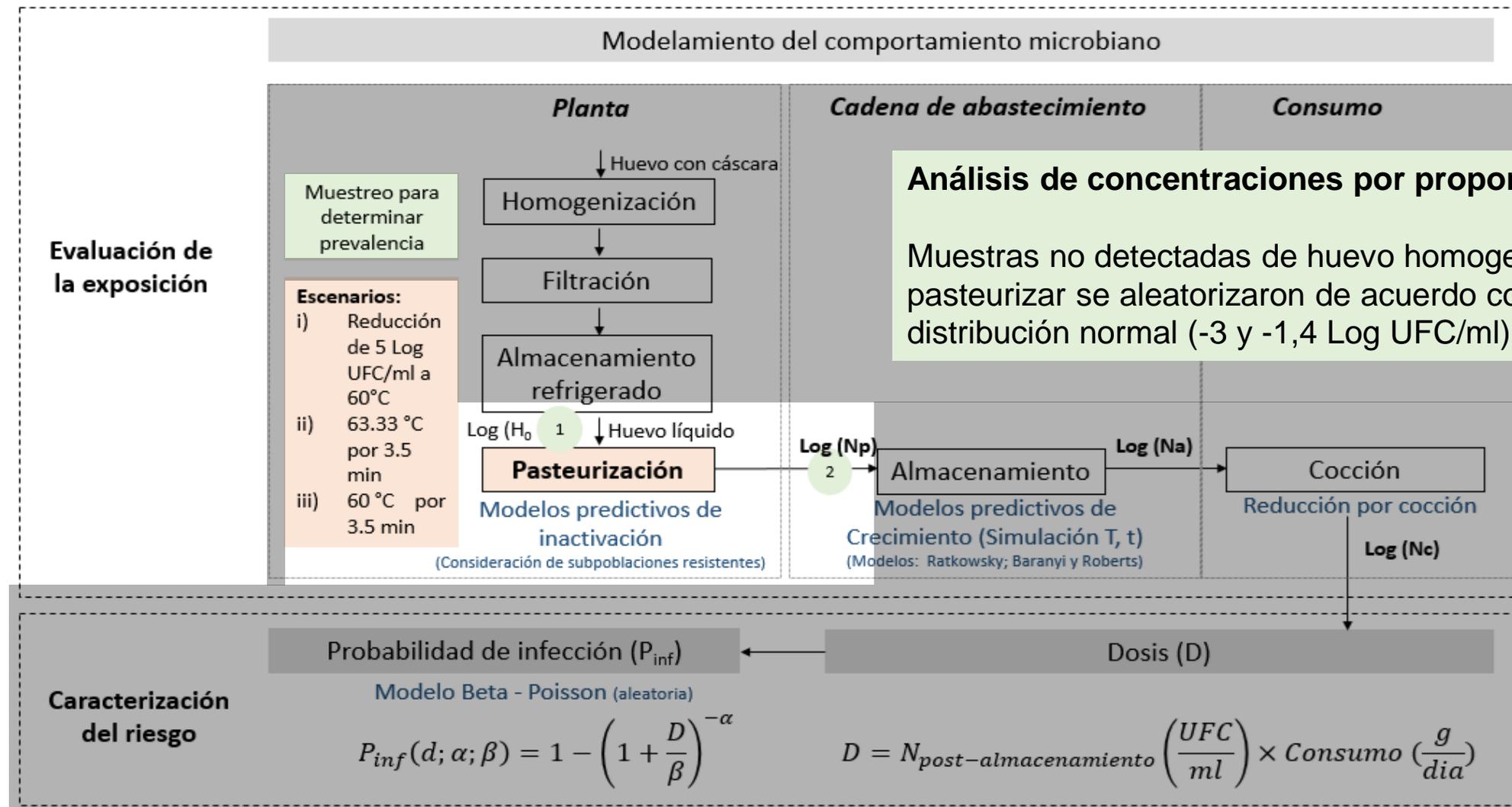


Prevalencia de *Salmonella* spp. en huevo pasteurizado

Prevalencias de *Salmonella* spp. en huevo líquido antes y después de pasteurización con base en los datos aportados por el Invima

Tratamiento	Número de muestras	Prevalencia	
		Número de muestras positivas para <i>Salmonella</i> spp.	%
Huevo líquido homogenizado, sin pasteurizar	55	38	69,1
Huevo Líquido pasteurizado	45	8	17,8

Desarrollo de modelo para evaluación de riesgo

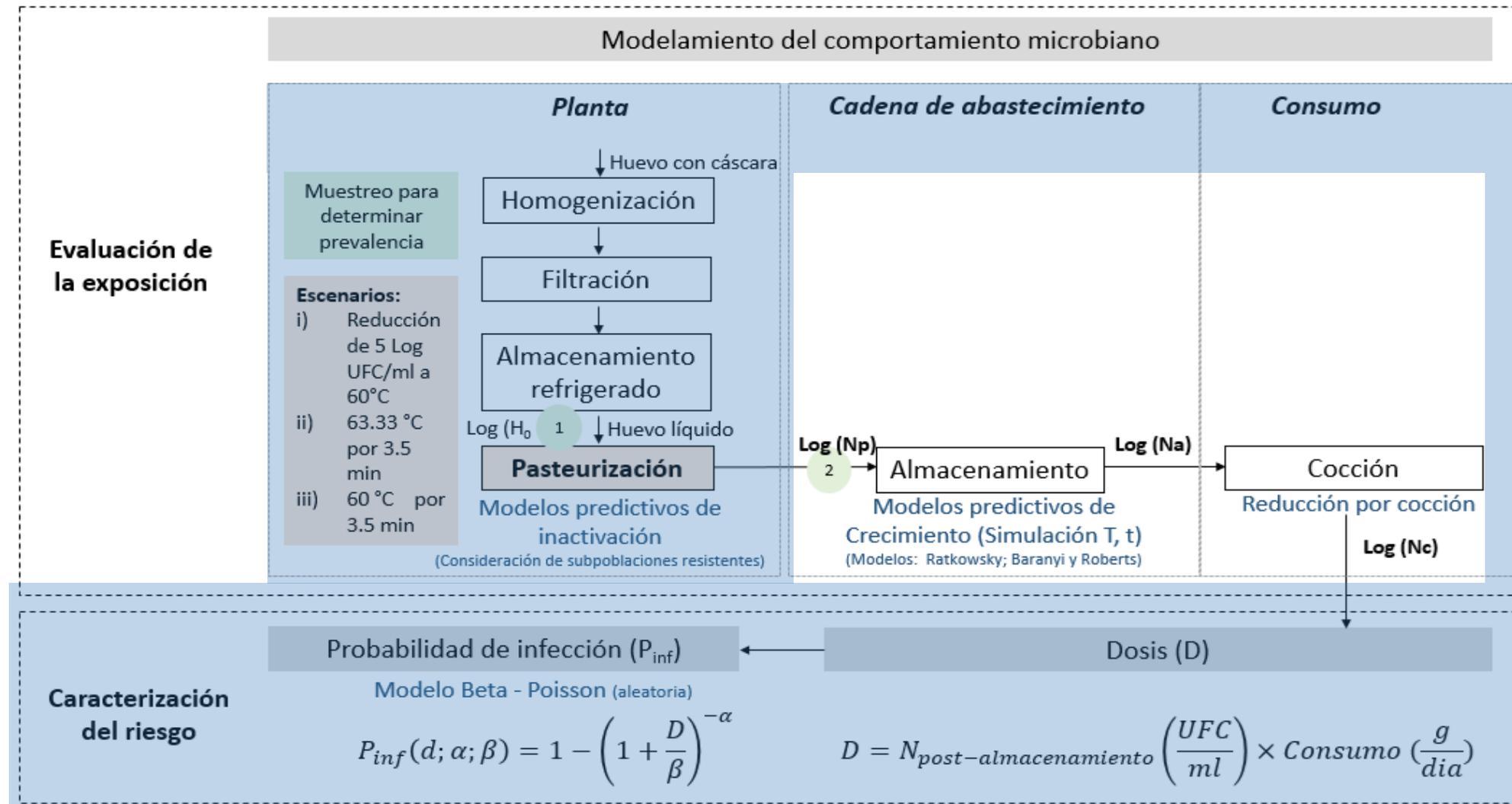


Desarrollo de modelo para evaluación de riesgo

Notación	Descripción de evento	Distribución - Modelo, valores	Unidades	Fuente
Inactivación por pasteurización en planta				
P_i	Prevalencia de <i>Salmonella</i> spp.	Distribución beta	%	Datos Invima
H_o	Concentración antes de pasteurización	Distribución Normal, simulado para cada escenario	Log UFC/ml	Calculado
R_p	Reducción por pasteurización	Distribución Normal, inactivación simulada para cada escenario (Modelo no lineal de Baranyi y Roberts, con base en la velocidad de inactivación (μ) y reducción Log (UFC/ml) para poblaciones susceptibles y resistentes) Temperatura 60°C: $\mu_{prom} = -66,3 \text{ Log UFC/ ml. h} \rightarrow P(-21,8 \leq X \leq -45,6) = 0,90$ Temperatura 63,33°C: $\mu_{prom} = -201 \text{ Log UFC/ ml. h} \rightarrow P(-179 \leq X \leq -376) = 0,90$ *P, corresponde a la probabilidad de fluctuación de μ , considerando la variabilidad biológica de los microorganismos	Log UFC/ml	Calculado con base en simulaciones en Combace (www.combase.cc)
N_p	Concentración después de pasteurización	$N_p = H_o - R$	Log UFC/ml	Calculado por de simulación Montecarlo



Desarrollo de modelo para evaluación de riesgo



-
-
-
-

Desarrollo de modelo para evaluación de riesgo

Notación	Descripción de evento	Distribución - Modelo, valores	Unidades	Fuente
Crecimiento durante almacenamiento en cadena de abastecimiento				
T_a	Temperatura de almacenamiento refrigerado	Distribución Triangular (10,8; 6; 3,1)	°C	(Lee, Kim, Choi, & Yoon, 2015)
T	Tiempo de almacenamiento	Distribución Uniforme (72; 960)	h	Calculado
μ_a	Tasa de crecimiento durante almacenamiento	Modelo de Ratkowsky $\sqrt{\mu_a} = 0,0137(T_a - 4,6 \text{ } ^\circ\text{C})$	Log UFC/ml. h	Calculado por regresión lineal
α_0	Estado fisiológico	Distribución Normal, $\alpha_{0, \text{prom}} = 0,0263$ $P(0,357 \leq X \leq 0,0130) = 0,90$	Adimensional	Calculado con base en simulación por Combase
λ	Fase de latencia	$\lambda = \frac{-\log(\alpha_0)}{\mu_a}$	h	Calculado por simulación de Montecarlo
N_a	Concentración posterior al almacenamiento	Modelo de Baranyi y Roberts $\log N_p(t) = \log N_{max} + \log \left(\frac{-1 + e^{\mu_a \cdot \lambda} + e^{\mu_a \cdot t}}{e^{\mu_a \cdot t} - 1 + e^{\mu_a \cdot \lambda} \times 10^{\log N_{max} - \log N_p}} \right)$	Log UFC/ml	Calculado por simulación de Montecarlo
N_c	Concentración posterior a cocción	$N_c = N_a - 0,9$	Log UFC/ ml	(USDA - FSIS, 2005)

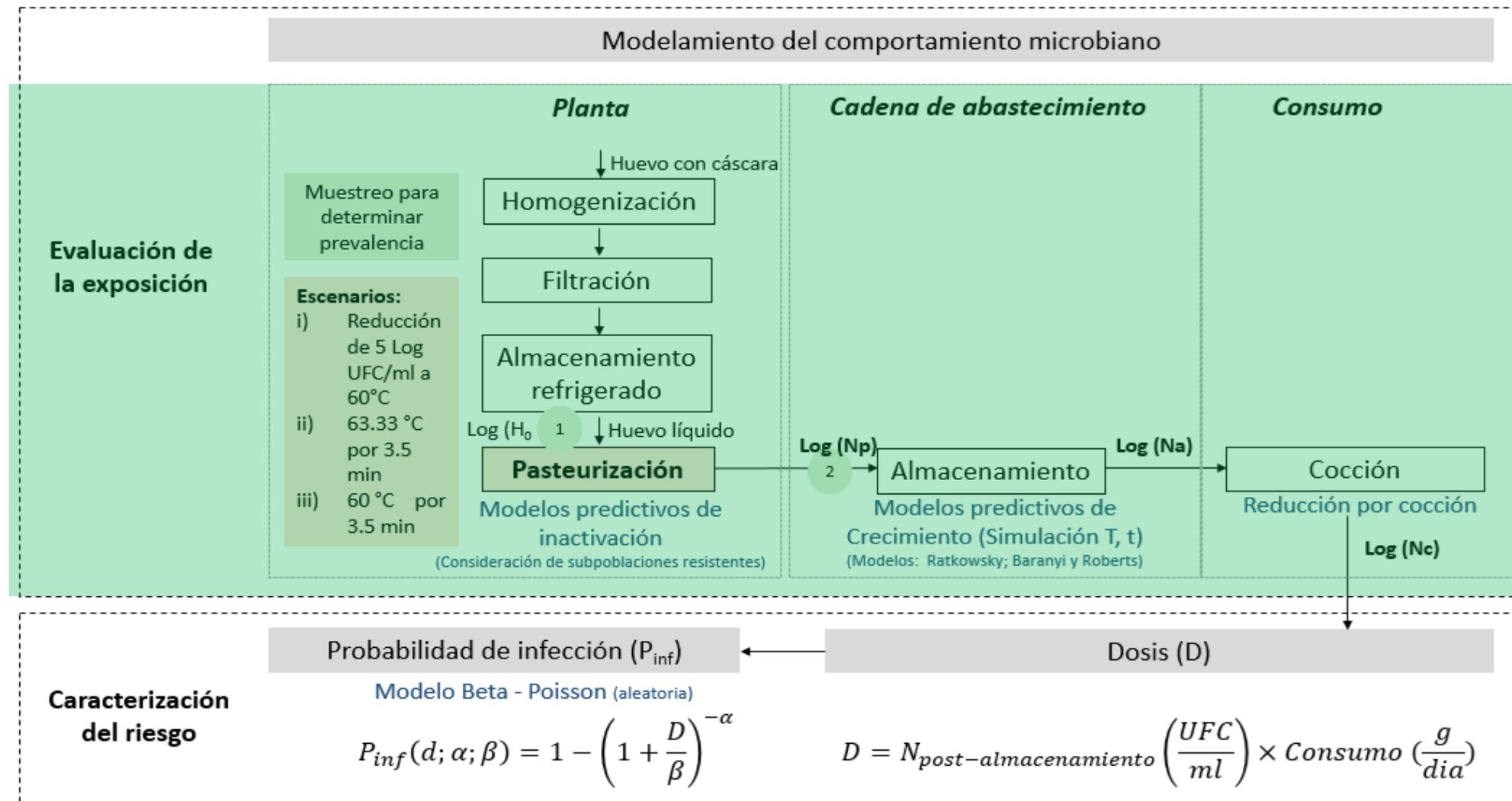


Resultados de evaluación de la exposición

Concentración de *Salmonella* spp. en diferentes etapas de procesamiento. Percentil 95 (P95) 99 (P99)

Etapa	Escenario*	Concentración Log UFC/ml			
		Promedio	Máximo	P95	P99
Post - Pasteurización (N _p)	1	-4,604	8,883	1,972	4,839
	2	-8,309	8,957	3,077	7,771
	3	-1,916	5,886	1,943	3,598
Post - Almacenamiento (N _a)	1	-4,220	7,690	2,361	4,827
	2	-8,289	9,530	2,827	8,243
	3	-1,766	7,641	2,040	4,047

Desarrollo de modelo para evaluación de riesgo



Resultados de la caracterización de riesgo

Caracterización probabilística del riesgo de *Salmonella* spp. en huevo. Percentiles 95 y 99 (P95, P99)

Escenario	Probabilidad de infección (P_{inf})			
	Promedio	Máximo	P95	P99
1	0,041	0,985	0,367	0,742
2	0,051	0,987	0,495	0,897
3	0,050	0,909	0,351	0,631

Análisis de correlación

Variables de mayor influencia

Concentración de microorganismos pre- pasteurización: 0,441 – 0,624

Reducción de la concentración del microorganismo generada por la pasteurización: -0,140 a – 0,367

Incertidumbre

- No se cuenta con datos acerca de la **concentración del microorganismo** en los puntos de muestreo evaluados
- Las cinéticas de inactivación y crecimiento, se basaron en datos obtenidos por otros autores que se obtuvieron en circunstancias que no necesariamente deben coincidir exactamente con las de este estudio. **Es decir, el resultado es meramente indicativo.** Para disminuir la incertidumbre se debería haber trabajado con datos obtenidos en los productos bajo estudio, los productos elaborados en Colombia inoculados con *Salmonella* spp.
- Los escenarios planteados están basados en la revisión de la literatura, debido a que **no se conocen las condiciones de proceso de las plantas de procesamiento muestreadas**
- No se conoce el **consumo y frecuencia de consumo de huevo líquido pasteurizado**, ni cuanta de esta proporción se dirige al consumo directo y no como materia prima para productos de panadería y otras





INSTITUTO NACIONAL DE SALUD
Ciencia, Tecnología e Innovación

Carla Blanco

cblanco@ins.gov.co

ERIA y P

@INSColombia



Visítenos en
www.ins.gov.co

