

MÉTODOS RÁPIDOS Y AUTOMATIZACIÓN EN MICROBIOLOGÍA ALIMENTARIA

Carmen Herranz Sorribes

Dpto. de Nutrición, Bromatología y Tecnología de los Alimentos
Facultad de Veterinaria. Universidad Complutense de Madrid
(c.herranz@vet.ucm.es)

El pasado noviembre, tuve la oportunidad de asistir al Workshop sobre Métodos Rápidos y Automatización en Microbiología Alimentaria que, bajo la dirección de los doctores Marta Capellas Puig y Josep Yuste Puigvert, se celebra anualmente en la Facultad de Veterinaria de la Universidad Autónoma de Barcelona. Se trata de un curso muy interesante que permite adquirir una amplia visión de los métodos de detección e identificación rápida de los microorganismos presentes en los alimentos, así como conocer los últimos avances aplicables al análisis microbiológico en la industria alimentaria. El curso consta de: (i) conferencias impartidas por destacados científicos españoles y extranjeros; (ii) presentaciones a cargo de expertos de importantes empresas de microbiología, incluyendo “rotaciones” en las que grupos reducidos de participantes en el curso asisten a la demostración del funcionamiento de equipos y productos; y (iii) dos sesiones prácticas de laboratorio, un taller y una visita a una empresa de Biología Molecular. Entre los conferenciantes que intervinieron en el curso, destaca la figura del Dr. Daniel Y. C. Fung, profesor de la Kansas State University en Manhattan (Kansas) y director del mundialmente conocido Workshop on Rapid Methods and Automation in Microbiology que se celebra anualmente en la mencionada universidad desde 1980. El Dr. Fung, autoridad internacional en el campo de los Métodos Rápidos en Microbiología y autor de más de 800 artículos científicos en la materia, impartió seis interesantes conferencias basadas en su artículo *Rapid Methods and Automation in Microbiology* (1), cuyos aspectos más destacados presento a continuación.

El desarrollo de métodos rápidos y automatizados para la detección, aislamiento, identificación y enumeración de microorganismos (y/o sus metabolitos) relacionados con la alteración y seguridad de los alimentos es una subdivisión del área de la microbiología aplicada con una importancia cada vez mayor. En este sentido, según investigaciones de mercado realizadas en 2003 por Strategic Consulting Inc. ^s, del total de ensayos microbiológicos realizados por la industria en el mundo (1.136,5 millones), el 58% (660, 5 millones) correspondieron a la industria de la alimentación (49%) y bebidas (9%). Aproximadamente, el 20% de los análisis se dirigieron a la detección de los microorganismos patógenos *Salmonella* y *Escherichia coli* O157:H7 y el 80% restante fueron análisis rutinarios (recuento total, de coliformes, de mohos y de levaduras). A nivel mundial, el porcentaje de ensayos realizado en Europa, América del Norte y el resto del mundo fue de un 33% en cada uno de los casos. No obstante, se estima que en un futuro próximo el porcentaje de ensayos realizados en el resto del mundo podría incrementarse hasta el 50% debido a la concienciación que están experimentando países con economías en desarrollo sobre la gran importancia de la seguridad alimentaria (1, 2, 3). Así por ejemplo, las autoridades sanitarias de China, país que se ha visto envuelto en varias ocasiones en escándalos debidos a la exportación de alimentos con condiciones higiénico-sanitarias no adecuadas, están tomando las medidas necesarias para asegurar el suministro de alimentos seguros a los más de 10.000 atletas y 3 millones de espectadores que se calcula asistirán a los Juegos Olímpicos que se celebrarán en agosto de este año en Beijing (4).

Los métodos microbiológicos “convencionales”, empleados actualmente en numerosos laboratorios de todo el mundo y establecidos en muchos casos como métodos estándares de análisis microbiológico de los alimentos, se caracterizan por ser laboriosos, emplear grandes volúmenes de medios de cultivo y requerir un tiempo considerable para la obtención y el análisis de los resultados. Por el contrario, los métodos rápidos requieren un tiempo reducido para la obtención de los resultados y/o permiten procesar un número elevado de muestras por unidad de tiempo, y son en general fáciles de usar, precisos (sensibilidad y especificidad adecuadas y límites de detección bajos) y económicamente rentables (aunque, en algunos casos, pueden requerir una inversión económica inicial considerable). Conviene destacar que, en la mayoría de los casos, el empleo de métodos rápidos no excluye la etapa de enriquecimiento del microorganismo diana ni la necesidad de obtener cultivos puros, así como que los resultados positivos obtenidos con métodos alternativos (distintos del método de referencia) deben ser confirmados. Asimismo, es de suma importancia, al igual que en el caso de los métodos tradicionales, una adecuada toma y preparación de las muestras a analizar. En lo que se refiere a este último aspecto, destacan los siguientes avances: (i) para muestras sólidas, instrumentos gravimétricos que realizan automáticamente las diluciones programadas (Dilumat, AES Chemunex; Dilumacher, PBI; Labpro Gravimetric Diluter, Spiral Biotech) y homogeneizadores que funcionan mediante ondas de choque y una intensa agitación para transferir los microorganismos del alimento al diluyente, produciendo una mínima destrucción de la muestra (Pulsifier,

Microgen); (ii) para muestras líquidas, sistemas rápidos para realizar diluciones seriadas (sistema Dilucup, LabRobots Products AB); (iii) para muestras de superficie, esponjas prehidratadas con un medio de transporte o enriquecimiento diseñadas para obtener muestras de lugares de difícil acceso (SpongeSicle y Extend-a-Sicle, Biotrace International) y el método “manos libres” para la obtención de muestras de la superficie de canales mediante el empleo de cinta adhesiva (5); y (iv) para muestras de aire, instrumentos portátiles que aspiran un volumen determinado de aire y recogen los microorganismos en la superficie del agar de placas de contacto para la estimación de la calidad microbiológica aire (SAS sampler, Bioscience International; MicroBio Air Sampler, Parrett).

Los métodos rápidos utilizados en microbiología de los alimentos pueden dividirse en cinco grandes grupos, incluyendo los empleados para el recuento de células viables, para la medición de la biomasa, los sistemas miniaturizados y kits de diagnóstico, los inmunológicos y los genéticos. En los siguientes apartados se tratan las innovaciones introducidas recientemente en cada uno de estos grupos.

RECuento DE CÉLULAS VIABLES

El recuento de células viables, tanto de los alimentos como de las superficies en contacto con los mismos y del aire de las industrias alimentarias, es uno de los parámetros más importantes a la hora de determinar la calidad y seguridad de los alimentos. Tradicionalmente, el recuento de células viables se ha realizado mediante el método estándar de recuento en placa, que, aunque sencillo, es laborioso, requiere un volumen considerable de tubos de ensayo y medio de dilución, y espacio para el almacenamiento y la incubación de las placas de cultivo. En lo que se refiere a la preparación de placas de cultivo, destacan las siguientes mejoras: autómatas para la preparación y distribución de medios de cultivo (Masterclave, AES Chemunex); siste-

mas que incluyen pectina como agente gelificante en lugar de agar, evitando así la necesidad de calentar el medio para fundirlo (Redigel, 3M); y medios liofilizados que utilizan como soporte una película plástica de tamaño y grosor similar al de una tarjeta de crédito que contiene geles solubles en agua fría que se rehidratan al depositar la muestra en su superficie y que requieren un espacio mínimo para su almacenamiento e incubación (Petrifilm, 3M), existiendo asimismo instrumentos para la lectura rápida y automática de los resultados (Lector de placas 3M Petrifilm, 3M). En este apartado cabe asimismo destacar el desarrollo de numerosos medios de cultivo cromogénicos que acortan el tiempo necesario para la obtención de resultados (RAPID´ Chromogenic Methods, Bio-Rad; BBL CHROMagar, BD; medios cromogénicos bioMérieux; medios cromogénicos AES Chemunex). En cuanto a los métodos de siembra, existen sembradores automáticos en espiral que reducen o eliminan la necesidad de realizar diluciones seriadas de la muestra (Autoplate 4000, Spiral Biotech; WASP, Don Whitley Scientific Limited) y que facilitan el recuento mediante el empleo de contadores automáticos de colonias (Q Count, Spiral Biotech; EasyCount2, AES Chemunex). Con respecto a la enumeración de microorganismos, existen sistemas basados en la simplificación de la técnica del número más probable (NMP), que poseen un rango de enumeración amplio en ausencia de diluciones, tales como el sistema de filtración Isogrid/Neo-Grid (Neogen), que emplea una membrana con 1.600 celdillas o “compartimentos de crecimiento” delimitados por una rejilla hidrofóbica, y la placa SimPlate (Biocontrol), que permite recuentos de hasta 738 ufc (frente a las 300 ufc de una placa de cultivo convencional). Recientemente se ha miniaturizado y automatizado el método NMP mediante el empleo de tarjetas de material plástico que contienen 3 grupos de 16 pocillos, con 1 logaritmo de diferencia en volumen para cada grupo de pocillos, y medios de cultivo con indicadores fluorescentes (Tempo, bioMérieux). Este sistema

disminuye considerablemente la necesidad de reactivos, espacio y tiempo con respecto al método NMP convencional. Aunque la mayoría de los métodos de recuento mencionados están diseñados para la enumeración de microorganismos aerobios, en los años 80, el Dr. Fung desarrolló un método ingenioso y sencillo para el recuento de microorganismos anaerobios, conocido como “doble tubo de Fung”, que permite lograr instantáneamente condiciones de anaerobiosis en el medio de cultivo y que no requiere sistemas generadores de hidrógeno ni jarras de anaerobiosis (6).

Los métodos citados en esta sección facilitan de diversas maneras la realización del recuento microbiano y/o disminuyen el tiempo necesario para la obtención de resultados. Sin embargo, necesitan un tiempo de incubación variable para que los microorganismos crezcan y puedan ser detectados y enumerados. Por el contrario, existen métodos para la realización de recuentos microbianos prácticamente en tiempo real basados en el empleo de colorantes fluorescentes que permiten distinguir células vivas de muertas mediante un microscopio de epifluorescencia (DEFT, del inglés *Direct Epifluorescent Filter Technique*), escáner (ScanRDI, AES Chemunex), o citómetro de flujo digital (BactiFlow ALS, AES Chemunex).

MEDIDA DE LA BIOMASA MICROBIANA

Puesto que el método “convencional” de recuento de microorganismos en placa es muy laborioso, se han desarrollado métodos para estimar de manera indirecta el número de microorganismos presentes en los alimentos. El desarrollo de dichos métodos está íntimamente ligado al de la instrumentación necesaria para detectar las señales relacionadas con el crecimiento microbiano. El principio en el que se basan estos sistemas es que dichas señales (niveles de ATP, enzimas específicas, pH, impedancia, conductancia y capacitancia eléctricas, etc.) se modifican paralelamente con el crecimiento microbiano.

Conviene destacar que para que las mediciones sean significativas es necesario establecer la correlación entre estos parámetros y el recuento de células viables.

Todas las células vivas contienen ATP, que se degrada muy rápidamente mediante autólisis al morir las células. En presencia de la enzima luciferasa y el sustrato luciferina (procedentes de la luciérnaga), oxígeno y magnesio, el ATP facilita el paso de la luciferina a oxiluciferina, generándose luz (bioluminiscencia) que puede ser detectada mediante un luminómetro. La cantidad de luz emitida en esta reacción es directamente proporcional a la cantidad de ATP presente en la muestra, es decir, al número de células vivas, y está correlacionada con la biomasa celular (la cantidad de ATP de 1 unidad formadora de colonia –ufc– oscila entre 0,22 y 1,03 fg). Este método (por ejemplo, el sistema Promicol) puede emplearse para la detección específica de ATP microbiano en productos líquidos tales como leche UHT, zumos, postres lácteos, etc., en los que es necesario determinar la presencia/ausencia de microorganismos. No obstante, la principal aplicación de este principio en la industria alimentaria se encuentra en la monitorización de la higiene de superficies. En este caso, la presencia de altos niveles de ATP de cualquier origen (microbiano o no) es indicativa de una limpieza deficiente. En la actualidad, existen numerosos sistemas que utilizan dispositivos del tipo escobillón o hisopo para la toma de muestra y luminómetros portátiles, robustos, sensibles y fáciles de utilizar que ofrecen lecturas rápidas (en menos de 1 min) del nivel de ATP (Ultrasnap y systemSURE Plus, Hygiena; Accupoint, Neogen; Lightning MVP, Biocontrol; CleanTrace y Uni-Lite, 3M) lo que permite aplicar las acciones correctoras establecidas en el plan de Análisis de Peligros y Puntos de Control Crítico (APPCC) antes de que se contamine el producto. Asimismo, existen sistemas para la detección rápida de restos de proteínas o azúcares en las superficies que actúan como fuente de nutrientes para los microorganismos. Estos sistemas se basan en la

reacción de dichos nutrientes con los reactivos presentes en hisopos especiales, lo que origina un cambio de color (reacción semicuantitativa) que puede detectarse visualmente (PROTECT, Biotrace International; PRO-Clean y SpotCheck plus, Hygiena; Clean Test, LiofilChem). De manera similar, puede detectarse la presencia de *Listeria* spp. en muestras ambientales de la industria alimentaria mediante el uso de escobillones a los que se les añaden antibióticos, sustancias enriquecedoras del crecimiento y compuestos indicadores que cambian de color en aproximadamente 30 h en caso de un resultado positivo (InSite, Hygiena; *Listeria* superficies PDX-LIB/Enviroswab, Paradigm Diagnostics/Tecra). Además, existen otros sistemas para la detección del crecimiento microbiano que se basan en el empleo de instrumentos más o menos sofisticados para la monitorización continua de los cambios de color del medio de cultivo relacionados con la actividad metabólica microbiana y que permiten obtener resultados en pocas horas (Bact/Alert 3D, bioMérieux; Soleris, Neogen).

Otro grupo de técnicas para la medida de la biomasa son las basadas en la detección de cambios en la conductividad eléctrica y la resistencia del medio de cultivo producidas como consecuencia del metabolismo de nutrientes de gran tamaño a moléculas de menor tamaño y químicamente más activas durante el crecimiento microbiano (Bactometer, bioMérieux; RABIT, Don Whitley Scientific Limited). Puesto que se conoce que para que estos cambios tengan lugar debe alcanzarse una población crítica de aproximadamente 10^6 ufc/g, es posible estimar la población inicial de la muestra a partir del tiempo necesario para la detección de dichos cambios.

SISTEMAS MINIATURIZADOS Y KITS DE DIAGNÓSTICO

Los sistemas miniaturizados surgen a partir del concepto de la placa microtituladora (96 pocillos, formato 8x12), que permite reducir el volumen de

reactivos y medio a emplear en los ensayos, así como estudiar en un formato manejable el efecto de un compuesto sobre un gran número de aislados o el de una serie de compuestos sobre un aislado determinado. Esta línea de investigación ha permitido desarrollar algunos de los medios de cultivo selectivos que se encuentran en el mercado actualmente. Entre los sistemas miniaturizados de identificación microbiana disponibles en la actualidad, basados en el metabolismo de sustratos específicos por parte de los microorganismos y su detección mediante diversos sistemas indicadores, destacan los siguientes: tarjetas desechables para la identificación sencilla de colonias sospechosas mediante pruebas bioquímicas rápidas (O.B.I.S., Oxoid); galerías que permiten la identificación de más de 800 especies de bacterias y levaduras (API, bioMérieux); tubos de plástico con compartimentos que contienen agar con distintos sustratos y con una aguja en su interior que posibilita la inoculación del tubo de forma rápida y sencilla a partir de una única colonia (BBL Enterotube y Oxi/Ferm Tube, BD); y soportes plásticos con pocillos de fácil inoculación que contienen sustratos cromogénicos y/o fluorogénicos en estado deshidratado que se rehidratan en contacto con la muestra (BBL Crystal, BD; RapID systems y MicroID, Remel; Biochemical ID systems, Microgen). Uno de los sistemas miniaturizados y automatizados más conocidos y sofisticados es el sistema VITEK (bioMérieux) que, basándose en cambios de color de los sustratos o en la producción de gas de los cultivos inoculados en los pocillos de una tarjeta plástica que contiene los sustratos bioquímicos en forma deshidratada, puede identificar un cultivo típico de *Escherichia coli* en 2-4 h. Una rapidez similar en la obtención de resultados puede obtenerse con el sistema Biolog (AES Chemunex) que detecta la capacidad de los microorganismos para oxidar 95 fuentes de carbono. Los 2^{95} (4×10^{28}) patrones metabólicos posibles permiten, además de la identificación, el establecimiento de relaciones filogenéticas entre distintos aislados. El empleo de un único cromóge-

no como indicador rédox, el violeta de tetrazolio, que se reduce de forma irreversible a formazán (color violeta) como consecuencia de la actividad metabólica bacteriana, facilita la lectura visual de los resultados. En cualquier caso, la mayoría de los sistemas citados en esta sección ofrecen la posibilidad de lectura e interpretación de resultados de manera automática.

MÉTODOS INMUNOLÓGICOS

Los métodos inmunológicos se basan en la reacción específica entre un antígeno y un anticuerpo policlonal o monoclonal. En microbiología de los alimentos, el método inmunológico más empleado para la detección de microorganismos o sus toxinas es el ensayo ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) tipo sándwich. En los últimos años, se han desarrollado sistemas que permiten realizar el ensayo ELISA de manera automatizada, dirigidos fundamentalmente a la detección de *Salmonella*, *E. coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes*, *Campylobacter spp.* y toxinas estafilocócicas (Assurance EIA y TRANSIA PLATE, Biocontrol; TECRA VIA, Biotrace International; Salmonella UNIQUE, Tecra; Detex, Molecular Circuitry Inc.). Un número considerable de laboratorios de microbiología de los alimentos emplea instrumentos automatizados basados en una variante de la tecnología ELISA conocida como ELFA (Enzyme-Linked Fluorescent Assay), en la que el producto final de la reacción es fluorescente en lugar de cromogénico, para la detección de los patógenos alimentarios mencionados (VIDAS, bioMérieux). En ocasiones, se utiliza la técnica de separación inmunomagnética (SIM), que emplea partículas magnéticas recubiertas de anticuerpos específicos (Dynabeads, Dynal), para concentrar el antígeno de interés como etapa previa a la realización del ELISA. La SIM permite reducir el tiempo requerido para el enriquecimiento de la muestra, así como obtener suspensiones que contienen menor cantidad de partículas del alimento, lo que facilita su procesado

posterior mediante distintas técnicas (hibridación con sondas génicas, PCR, etc.). Para laboratorios con un volumen moderado de muestras a analizar existen kits de diagnóstico basados en el principio de la inmunocromatografía de flujo lateral caracterizados por ser rápidos, sencillos y no requerir instrumentación especial (VIP, Biocontrol; Reveal, Neogen; RapidChek, Strategic Diagnostics). Otro tipo de ensayos inmunológicos rápidos y listos para usar son los basados en la inmunodifusión en un vial de agar para la detección rápida de serovares móviles de *Salmonella* (1-2 Test, Biocontrol) o en la aglutinación reversa pasiva con partículas de látex para la detección de microorganismos patógenos (Microscreen, Microgen Bioproducts) y toxinas microbianas (RPLA kits, Oxoid)

MÉTODOS GENÉTICOS

A diferencia de los métodos citados en las secciones anteriores, que detectan características fenotípicas sujetas de manera natural a variación, los métodos genéticos se dirigen a la detección de características celulares mucho más estables contenidas en los ácidos nucleicos. Una técnica para detectar dichas características en ausencia de instrumentación especializada es la hibridación de ácidos nucleicos. Los ensayos comerciales actuales emplean sondas genéticas (oligonucleótidos sintéticos) marcadas enzimáticamente que, tras hibridar con regiones específicas del ARN ribosómico (una célula bacteriana puede contener hasta 10.000 copias de ARN ribosómico frente a una única copia de ADN cromosómico), catalizan una reacción que da lugar a un producto coloreado a partir de un sustrato cromogénico, lo que es indicativo de la presencia del microorganismo en el alimento (GeneQuence, Neogen). En los últimos años es cada vez más frecuente en los laboratorios de microbiología de los alimentos el empleo de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para amplificar el ADN de los microorganismos diana y disponer así de una cantidad suficiente que permita su detección. Se trata

de una técnica específica, sensible (en teoría, puede detectar una única copia del ADN diana en el alimento; en la práctica se necesitan unas 103 ufc/ml para una detección reproducible) y rápida, a lo que contribuye el desarrollo de metodologías alternativas de detección de los productos de PCR que evitan el procesamiento post-reacción. Dichas metodologías están basadas en el empleo de agentes intercalantes (por ejemplo, SYBR Green) o sondas específicas con doble marcaje fluorescente que, además de posibilitar la “visualización” del progreso de la reacción, facilitan la automatización del proceso y permiten la cuantificación de la cantidad de DNA diana presente inicialmente en la muestra (PCR cuantitativo en tiempo real). A pesar de tratarse de una técnica sofisticada, el empleo de la técnica de PCR en tiempo real en el laboratorio de microbiología de los alimentos se está viendo facilitado en los últimos años por el desarrollo de sistemas para la detección de patógenos de los alimentos que son fáciles de utilizar, requieren una manipulación mínima y reducen la necesidad de interpretación de los resultados (BAX Q7, Du Pont Qualicon; iQ-Check, Bio-Rad; TaqMan Pathogen Detection Kits, Applied Biosystems; Roche/Biotecon Diagnostics LightCycler, Roche; Warnex, AES Chemunex). La técnica de PCR cuantitativo en tiempo real es una de las opciones más prometedoras en los laboratorios de control de calidad de los alimentos, no solo para la identificación y cuantificación de microorganismos, sino también para la determinación de la presencia de organismos modificados genéticamente en materias primas y productos terminados y para la autenticación de productos en los que pueda producirse un fraude por sustitución de especies por otras de menor valor comercial. La investigación epidemiológica de brotes alimentarios y la monitorización rutinaria de microorganismos en el ambiente requiere sistemas que sean capaces de identificar los microorganismos más allá del nivel de especie. Para ello, partiendo de una colonia de cultivo puro, pueden emplearse procedimientos automati-

zados basados en la hibridación de sondas específicas con fragmentos de restricción del ADN (Riboprinter, DuPont Qualicon) o técnicas más difícilmente automatizables y que requieren analistas cualificados para su realización e interpretación (Pulsed Field Gel Electrophoresis, PFGE; MultiLocus Sequence Typing, MLST).

SUMARIO Y PERSPECTIVAS

Los métodos rápidos y automatizados en microbiología de los alimentos representan un área de la microbiología aplicada en continua expansión. La rapidez en la obtención de resultados es esencial en la industria alimentaria para reducir los tiempos de espera en los procesos de producción y liberar más rápidamente los lotes producidos. Además, la rapidez es fundamental en un programa de APPCC exitoso, ya que permite la aplicación de acciones correctoras durante el procesado de los alimentos. El tiempo ahorrado mediante el empleo de estos métodos puede utilizarse para otras tareas tales como revisar el plan de APPCC, ampliar los planes de control de patógenos y de análisis químicos (micotoxinas, antibióticos,

alérgenos, etc.), formar a los empleados en los riesgos microbiológicos, etc.

Aunque en la actualidad la mayoría de las técnicas rápidas se dirigen a la detección de bacterias, es previsible que se desarrollen nuevos métodos para la identificación rápida de virus y parásitos implicados en la transmisión de enfermedades a través de los alimentos. Asimismo, se espera que en el futuro próximo se incremente el uso de los biosensores en la industria alimentaria y de los microchips para la detección simultánea de varios patógenos, así como de envases inteligentes que alerten a los consumidores sobre la presencia de microorganismos alterantes o patógenos en los alimentos. Asistir a próximas ediciones del curso sobre Métodos Rápidos y Automatización en Microbiología Alimentaria será sin duda una excelente manera de estar al día de los avances que se produzcan en este dinámico campo.

Bibliografía

1.- Fung, D.Y.C. (2002). Rapid Methods and Automation in Microbiology. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 1: 3-22.

2.- Anónimo (2004). Fung's forecast on rapid and automated methods: where are we now? *Food Safety Magazine*, agosto-septiembre: 24-31, 60.

3.- Yuste, J., D.Y.C. Fung y M. Capellas (2007). Métodos rápidos y automatización en microbiología alimentaria. *Alimentaria*, mayo 07, 78-80.

4.- Chambers, H. (2007). Invitrogen strives for gold medal performance at Beijing Olympics. *San Diego Business Journal*.

5.- Fung, D. Y. C., L. K. Thompson, B. A. Crozier-Dodson y C. L. Kastner (2000). Hands-free "Pop-up" adhesive type method for microbial sampling of meat surfaces. *Journal of Rapid Methods and Automation in Microbiology*, 8(3): 209-217.

6.- Fung, D.Y.C. y C.M. Lee (1981). Double-tube anaerobic bacteria cultivation system. *Food Science*, 7: 209-213.

Nota

La información contenida en este artículo se basa en las referencias citadas en la Bibliografía y en el manual del "VI Workshop sobre Métodos Rápidos y Automatización en Microbiología Alimentaria" (Bellaterra, 20-23 noviembre de 2007). Los nombres de productos e instrumentos comerciales y de las empresas que los comercializan se citan únicamente a título informativo y no implican en ningún caso la recomendación expresa de un producto concreto frente a otros de características similares.

RAPID METHODS AND AUTOMATION IN MICROBIOLOGY: 25 YEARS OF DEVELOPMENTS AND PREDICTIONS

Daniel Y.C. Fung

Ph.D., Professor of Food Science
Kansas State University, Manhattan, Kansas
University Distinguished Professor, UAB, Barcelona, Spain

Rapid methods and automation in microbiology is a dynamic area in applied microbiology dealing with the study of improved methods in the isolation, early detection, characterization, and enumeration of microorganisms and their products in clinical, pharmaceutical, food, industrial, and environmental sam-

ples. In the past 25 years this field has emerged into an important sub-division of the general field of applied microbiology and is gaining momentum nationally and internationally as an area of research and application to monitor the numbers, kinds, and metabolites of microorganisms related to food spoilage, food preservation,

food fermentation, food safety, and foodborne pathogens.

Medical microbiologists started to be involved with rapid methods around mid-1960's and started to accelerate in the 1970's and continue developments in the 80's, 90's and up to the present day. Other disciplines such as Food, Pharmaceutical,

Environmental, and Food Microbiology were lagging about 10 years behind. Many symposia and conferences were held nationally and internationally to discuss the developments in this important applied microbiology topics. The current Rapid Methods and Automation in Food Microbiology Workshop in Barcelona, Spain is an example of such an effort to provide up-dated information and constructive discussions on this topic.

Advances in Viable Cell Counts and Sample Preparation

The number of living organisms in the product, on the surface of manufacturing environment and the air of processing plants is very important for the food science and industry. Colony forming units (CFU) is the standard way to express the microbial loads. In the past 25 years several ingenious systems in “massaging” or “pulsifying” the solid or liquid samples were developed so that the samples are homogeneously distributed in a disposable bag after 1 to 2 minutes of operation. Typically one ml (after dilutions) is placed into melted agar to encourage microorganisms to grow into discrete colonies for counting (CFU/ml). These colonies can be isolated and further identified as pathogenic or non pathogenic organisms. In the past 25 years, convenient systems such as nutrient housed in films (Petrifilm), mechanical instrument to spread a sample over the surface of a preformed agar plate (Spiral plater), trapping microorganisms on a bacteriological membrane and look for growth of target microorganisms on selective and non-selective culture media (Isogrid), non-thermal Pectin-Ca gel system (Micrology, Inc.), etc. greatly help to reduce labor time in performing viable cell count. The 3 or 5 tube Most Probable Number (MPN) system has been in use for more than 100 years in water testing and food testing but the procedure is very labor intensive and utilizes large amounts of test tubes and media. In 2007 a completely mechanized, automated, and hands-off 16 tube, three dilution MPN system named TEMPO by bioMerieux is being marketed for ease of operation of this tedious but yet powerful MPN

viable cell count procedure used in Public Health, Pharmaceutical and Food laboratories around the world. Results indicated that TEMPO provided equivalent data compared with standard viable cell count methods. This author predicts that TEMPO will be very successful in food and water microbiology in the near and far future.

As a guide the following FUNG scale on viable cell counts has been developed:

0 to 2 log CFU/ g, ml, or cm²
Low count, no concern

3 to 4 log CFU/ g, ml, or cm²
Intermediate count, slight concern

5 to 6 log CFU/ g, ml, or cm²
High count, definite concern

7 log CFU/ g, ml, or cm²
Index of Spoilage, serious concern

8 log CFU/ g, ml, or cm²
Odor, unacceptable

9 log CFU/ g, ml, or cm²
Slime, highly unacceptable

10 log CFU/ g, ml, or cm²
Discard immediately

This scale is for general microbial population of food and water. No food pathogens are allowed (e.g. *Salmonella*, *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* O157:H7, *Campylobacter jejuni*, etc.) especially in cooked ready-to-eat foods.

Also in the case of food fermentation high number of good bacteria such as lactic acid bacteria, and yeasts are to be expected and encouraged such as in cheese and yoghurt making, beer and wine, bread, sauerkraut, and other fermented foods.

Air Samples and Surface Samples

The Food industry also needs to ascertain the air quality as well as surfaces for product manufacturing, storage, and transportation. An active air sampling instrument can “suck” a known volume of air and deposit it on an agar surface (impaction) or trapped it in liquid (impin-

gement) to obtain CFU/ m³ or ml. A variety of swabs, tapes, sponges, contact agar methods have been developed to obtain surface count of Food manufacturing environment.

Fung scale for air and surface samples:

Total Counts for Air Samples

0-100 CFU/m³
Acceptable count

100-300 CFU/m³
Intermediate count

>300 CFU/m³
Too high, need corrective action needed

Note: In Singapore >500 CFU/m³ is not allowed in food plants.

Total Counts for Food Contact Surfaces such as forks, knives, dishes, spoons, chopping blocks, table tops, glass for drinking water, etc.

0-10 CFU/cm²
Acceptable count

10-100 CFU/cm²
Intermediate count

>100 CFU/cm²
Too high, corrective actions needed

Aerobic, Anaerobic, and “Real Time” Viable Cell Counts

By use of the correct gaseous environment or suitable reducing compounds one can obtain aerobic, anaerobic, facultative anaerobic microbial counts of products. Typically microbial counts were obtained in 24 to 48 hours. Several methods have been developed and tested in recent years that can provide “real” time viable cell counts such as the use of “Vital” stains (Acridine Orange) to report living cells under the microscope to count fluorescing viable cells or measuring ATP of micro-colonies trapped in a special membranes. These real time test can give viable cell counts in about 1 to 4 hours.

A simple Fung Double Tube system using appropriate agar and incubation

conditions has been developed and tested in Hawaii recreational waters in 2007 that can provide a *Clostridium perfringens* count for water testing in 6 hours.

The **Fung/Fujioka scale** for beach water in Hawaii, USA based on single sample concentrations (CFU/ml) of *Clostridium perfringens* using the Fung Double Tube (FDT) methods is as follows: Tabla 1.

Advances in Miniaturization and Diagnostic Kits

Identification of normal flora, spoilage organisms, clinical and foodborne pathogens, starter cultures, etc. in many specimens is an important part of food microbiology. In the past 25 years many miniaturized diagnostic kits have been developed and widely used to conveniently introduce the pure cultures into the system and obtain reliable identification in as short as 2 to 4 hrs. Some systems can handle several or even hundreds of isolates at the same time. These diagnostic kits no doubt saved many lives by rapidly, accurately, and conveniently identifying pathogens so that treatments can be made correctly and rapidly. Fung is a pioneer in the development of these type of system starting at around 1970's. There are about 20 miniaturized systems on the market to identify pathogens ranging from enterics (*Salmonella*, *Shigella*, *Proteus*, *Enterobacter*, etc.) to non-fermentors, anaerobes, gram positives, and even yeasts and molds.

Advances in Immunological Testings

Antigen and antibody reaction has been used for decades for detecting and characterizing microorganisms and their components in medical and diagnostic microbiology. This is the bases for serotyping bacteria such as *Salmonella*, *Escherichia coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes*,

etc. Both polyclonal antibodies and monoclonal antibodies have been used extensively in applied food microbiology. The most popular format is the "Sandwiched" ELISA test. Recently some companies have automated the entire ELISA procedure and can complete an assay from 45 minutes to 2 hours after overnight incubation of the sample with suspect target organisms. Lateral Flow Technology (similar to pregnancy test with three detection areas on a small unit) offers a simple and rapid test for target pathogens (e.g. *E. coli* O157) after overnight incubation of food or allergens (e.g. wheat gluten) The entire procedure takes only about 10 minutes with very little training necessary. A truly innovative development in applied microbiology is the immuno-magnetic separation (IMS) system. Very homogenize paramagnetic beads have been developed which can be coated with a variety of molecules such as antibodies, antigens, DNA, etc. to capture target cells such as *E. coli* O157, *Listeria*, *Cryptosporidium*, *Giardia*, etc. These beads can then be immobilized, captured and concentrated by a magnet stationed outside a test tube. After clean-up, the beads with the captured target molecules or organisms can be plated on agar for cultivation or used in ELISA, Polymerase Chain Reaction (PCR), microarray technologies, biochips, etc. for detection of target organisms. Currently many diagnostic systems (ELISA test, PCR, etc.) are combining an IMS step to reduce incubation time and increase sensitivity of the entire protocol. Using the Pathatrix system of capturing circulating enriched meat samples by IMS Fung's laboratory can detect *E. coli* O157:H7 in 5.25 hours from the time of enriching the meat sample to the time of ELISA results of the presence or absence of the pathogen.

Advances in Instrumentation and Biomass Measurements

Instruments can be used to automatically monitor changes (such as ATP levels, specific enzymes, pH, electrical impedance, conductance, capacitance, turbidity, color, heat, radioactive carbon dioxide, etc.) of a population (pathogens or non-pathogens) growth kinetic and dynamics in a liquid and semi-solid sample. It is important to note that for the information to be useful, these parameters must be related to viable cell count of the same sample series. In general, the larger the number of viable cells in the sample, the shorter the detection time of these systems. A scatter gram is then plotted and used for further comparison of unknown samples. The assumption is that as the number of microorganisms increases in the sample, these physical, biophysical, and biochemical events will also increase accordingly. When a sample has 5 log or 6 log organisms/ml, detection time can be achieved in about 4 hrs. Some instruments can handle hundreds of samples at the same time.

Advances in Genetic Testings

Phenotypic expression of cells are subject to growth conditions such as temperature, pH, nutrient availability, oxidation-reduction potentials, etc. Genotypic characteristics of a cell is far more stable. Hybridization of DNA and RNA by known probes has been used for more than 30 years. More recently Polymerase Chain Reaction (PCR) is now an accepted method to detect viruses, bacteria and even yeast and molds by amplification of the target DNA and detecting the target PCR products. By use of reverse transcriptase, target RNA can also be amplified and detected. After a DNA (double stranded) molecule is denatured by heat (e.g. 95C), proper primers will anneal to target sequences of the single stranded DNA of the target organism, for example *Salmonella* at a lower temperature (e.g. 37C). A polymerase (TAQ) will extend the primer at a higher temperature (e.g. 70C) and complete the addition of complement bases to the single stranded denatured DNA. After one thermal cycle one piece of DNA will beco-

Tabla 1.

Pollution category	FDT	Extrapolated FDT	Scale of beach pollution
I	0	<10 CFU	Uncontaminated
II	1-10 CFU	10-100 CFU	Non-point contamination
III	11-50 CFU	110-500 CFU	Sewage contamination
IV	>50 CFU	>500 CFU	Elevated Sewage Contamination

me two pieces. After 21 and 31 cycles one piece will become 1 million and 1 billion copies, respectively. At the beginning PCR products are detected by gel electrophoresis. Now ingenious ways to detect either the occurrence of the PCR procedure by fluorescent probes or special dyes, or by actually reporting the presence of the PCR products by molecular beacon. Since these methods generate fluorescence, the PCR reaction can be monitored over time and provide "real-time" PCR results. Some systems can monitor 4 different targets in the same sample (multiplexing). These methods are now standardized and easy to use and interpret.

To further characterize closely related organisms, detail analysis of the DNA molecule can be made by obtaining the patterns of DNA of specific organisms by pulse field gel electrophoresis (DNA finger-printing) or by "Riboprinting" of the ribosomal genes in the specific DNA fragment. Since different bacteria exhibit different patterns (e. g. *Salmonella* versus *E. coli*) and even the same species can exhibit different patterns (e. g. *Listeria monocytogenes* has 49 distinct patterns), these information can be used to compare closely related organisms for accurate identification of target pathogens (such as comparing different patterns of *E. coli* O157:H7 isolated from different sources in an outbreak) for epidemiological investigations.

Advances in Biosensor, Microchips, and Nanotechnology

Biosensor is an exciting field in applied microbiology. The basic idea is simple but the actual operation is quite complex and involves much instrumentation. Basically, a biosensor is a molecule or a group of molecules of biological origin attached to a signal recognition material. When an analyte comes in contact with the biosensor the interaction will initiate a recognition signal which can be reported in an instrument. Many types of biosensors have been developed. Sometime whole cells can be used as biosensors. Analytes detected include toxins, specific pathogens, carbohydrates, insecticides and herbicides, ATP, anti-

biotics, etc. The recognition signals used include electrochemical (e.g. potentiometry, voltage changes, conductance and impedance, light addressable, etc.), optical (such as UV, bioluminescence, chemiluminescence, fluorescence, laser scattering, reflection and refraction of light, surface plasmon resonance, polarized light, etc.) and miscellaneous transducers (such as piezoelectric crystals, thermistor, acoustic waves, quartz crystal, etc).

Recently, much attention has been directed to "biochips" and "microchips" developments to detect a great variety of molecules including foodborne pathogens. Due to the advancement in miniaturization technology as many as 50,000 individual spots (e. g. DNA microarrays) with each spot containing millions of copies of a specific DNA probe can be immobilized on a specialized microscope slide. Fluorescent labeled targets can be hybridized to these spots and be detected. Biochips can also be designed to detect all kinds of foodborne pathogens by imprinting a variety of antibodies or DNA molecules against specific pathogens on the chip for the simultaneous detection of pathogens such as *Salmonella*, *Listeria*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, etc. The market value is estimated to be as high as \$5 billion at this moment. This technology is especially important in the rapidly developing field of proteomics and genomics which require massive amount of data to generate valuable information. Nanotechnology is starting to make major advances in pure and applied sciences, including Food Science and Applied Microbiology.

Testing Trends and Predictions

There is no question that many microbiological tests are being conducted nationally and internationally in agricultural and food products, environmental samples, medical specimens, and water samples. The most popular tests are total viable cell count, coliform/*E. coli* count and yeast and mold counts. A large number of tests are also performed on pathogens such as *Salmonella*, *Listeria* and *Listeria monocytogenes*, *E. coli* O157:H7,

Staphylococcus aureus, *Campylobacter* and other organisms. According to reliable sources in 1998, the worldwide microbiological tests was estimated to be 755 million tests with a market value of US\$1 billion. The projection is that in 2008 the number of tests will be about 1.5 billion tests with a market value of US\$5 billion. In 2007 about one third of the tests are being performed in North America (USA and Canada), another third in Europe, and the last third in the Rest of the World. This author predicts in twenty year the Rest of the World will perform 50 % of the tests with North America and Europe performing 25% each. This is due to rapid economic developments and food and health safety concerns of the world in the years to ahead.

Prediction of the Future

The following are the ten predictions made by the author in 1995. Many predictions have been correct in 2007. (+) is a good prediction. (?) is an uncertain prediction.

1. Viable cell counts will still be used in the next 25 years. (+)
2. Real-time monitoring of hygiene will be in place. (+).
3. PCR, Ribotyping, and genetic tests will become reality in food laboratories. (+)
4. ELISA and immunological tests will be completely automated and widely used. (+)
5. Dipstick technology will provide rapid answers. (+)
6. Biosensors will be in place for Hazard Analysis Critical Control Point programs. (?)
7. Biochips, microchips, and nanotechnology will greatly advance in the field. (+)
8. Effective separation, concentration of target cells will assist rapid identification. (+)
9. A microbiological alert system will be in food and other packages. (?)
10. Consumers will have rapid alert kits for pathogens at home. (?)

In conclusion, it is safe to say that the field of rapid method and automation in microbiology will continue to grow in numbers and kinds of tests to be done

in the future due to the increase concern on food safety and public health. The future looks very bright for the field of rapid methods and automation in microbiology. The potential is great and many exciting developments will certainly unfold in the near and far future in Food Microbiology and other applied microbiology areas.

References

- 1.- Fung, D. Y. C. 2002. Rapid Methods and Automation in Microbiology. Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety. Inaugural Issue, Vol 1(1), 3-22 (www.ift.org).
- 2.- Fung, D. Y. C., R. Fujioka, K. Vijayavel, D. Sato, and D. Bishop. 2007. Evaluation of Fung Double Tube for Clostridium perfringens and Easyphage Test for F-Specific RNA Coliphages as Rapid Screening Tests for Fecal Contamination in Recreational Waters in Hawaii. Journal of Rapid Methods and Automation in Microbiology, Vol 15(3), 217-229.

Biographic Details

Daniel Y. C. Fung, M.S.P.H., Ph.D., is a Professor of Food Science at Kansas State University (KSU). He is the Founder and Director of the world renowned International Workshop of Rapid Methods and Automation in Microbiology since 1981 at KSU. He has published more than 800 papers and is a Fellow of American Academy of Microbiology, Institute of Food Technologists and International Academy of Food Science and Technology. In 2006 he was honored as University Distinguished Professor at Universitat Autònoma de Barcelona, Spain. In 2007 he completed 33 Ph.D. and 67 M.S. degree students as the Major Professor. In 2007 he won the Inaugural Outstanding Educator in Food Safety Award given by Food Safety Magazine and ConAgra Foods and presented at the 2007 International Association for Food Protection Annual meeting in Florida.

NORMAS PARA LOS AUTORES

ALIMENTARIA considerará para su publicación todos aquellos trabajos de carácter técnico y científico relacionados con la tecnología, la elaboración y el control de los alimentos. La revista consta de las siguientes secciones para la aceptación de trabajos: Artículos originales, revisiones y cartas al editor.

- Exclusivamente podrán remitirse para su publicación trabajos que no hayan sido editados previamente en otras publicaciones, de cualquier naturaleza o contenido editorial.
- El texto podrá ser redactado en español o en inglés, y deberá incluir un resumen (abstract) en ambos idiomas. La extensión recomendada para los abstracts es de 12-15 líneas.
- Se aconseja que la estructura de los trabajos sea la siguiente: Introducción, métodos, resultados, discusión/conclusiones, notas y referencias.
- Las referencias bibliográficas se incluirán al final del texto.
- El documento digital del trabajo debe ser guardado en formato .doc de Microsoft Word, sin incorporar gráficos, esquemas, diseños o imágenes, que serán guardadas aparte.
- Las tablas, fotografías y gráficos se adjuntarán en un documento distinto del texto, en formato JPEG, EPS, TIFF, BMP o PICT, con una resolución de 300 ppp (dpi).
- Los autores, junto al trabajo enviado, adjuntarán una nota indicando su nombre y dirección completos, cargos y lugar de trabajo así como el teléfono y dirección de correo electrónico para su localización y contacto.
- Los trabajos pueden ser remitidos a la redacción de **ALIMENTARIA** por correo postal a la dirección: C/Santa Engracia nº90 - 4ª planta, 28010 Madrid, adjuntando una copia en formato digital (CD), o bien enviados por correo electrónico a la dirección: redaccion@eypasa.com
- Una vez recibido el trabajo, **ALIMENTARIA** enviará acuse de recibo a los autores y se procederá a su revisión, por parte del Comité Científico, para su aceptación y publicación. El Comité de Redacción se reserva el derecho de rechazar aquellos trabajos que no juzgue apropiados, así como de proponer modificaciones cuando lo considere necesario.
- El autor concede expresamente todos los permisos y derechos necesarios para la publicación de los trabajos por él remitidos y que sean aceptados para su publicación, que podrá ser impresa o digital, así como para su traducción, distribución, comunicación pública, o cualquier otra forma que Eypasa –Alimentaria pueda considerar oportuna.

EJERCICIOS DE EQUIVALENCIA ENTRE MÉTODOS DE ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO: EL EJEMPLO DEL EJERCICIO ESPAÑOL DE BACTERIAS COLIFORMES Y *ESCHERICHIA COLI*

Ferrán Ribas

Aigües de Barcelona, AGBAR – fribas@agbar.es

INTRODUCCIÓN

La Directiva 98/83/CE (1) especifica un método oficial de análisis para cada uno de los parámetros microbiológicos del control de las aguas destinadas al consumo humano. En el caso de las bacterias coliformes y *E.coli*, la metodología es la descrita en la norma ISO 9308-1:2000 (2), basada en el método de filtración de membrana utilizando el agar lactosa TTC Tergitol (en lo sucesivo, TTC) incubado a 36°C. No obstante, está prevista la posibilidad de utilizar métodos alternativos, siempre y cuando los estados miembros faciliten toda la información de interés sobre dichos métodos y su equivalencia.

La Comisión Europea ha establecido un comité (EMAG) para asesorar sobre los aspectos microbiológicos de la Directiva. Este grupo ha recomendado a la Comisión que los datos presentados para demostrar la equivalencia de métodos alternativos debería cumplir con los requisitos del procedimiento ISO para los estudios de equivalencia de métodos microbiológicos (ISO 17994:2004) (3).

Bajo los auspicios de la Comisión de Normalización y Validación (CNV) de la Sociedad Española de Microbiología (SEM) y de la Comisión 2ª de la Asociación Española de Abastecimiento y Saneamiento (AEAS) se han realizado (2004 – 2006) tres estudios en paralelo para comprobar si, con otros métodos alternativos (Colilert, Chromocult, m-Endo/m-FC), utilizados por laboratorios españoles, se obtienen resultados equivalentes o significativamente más altos en el análisis de bacterias coliformes y *E.coli* que con el método de referencia (TTC) descrito en la norma ISO 9308.

Antes de iniciarse el estudio, los participantes fueron entrenados en la ejecución de los distintos métodos y en la preparación de muestras desinfectadas para asegurar que, en lo posible, el trabajo se llevara a cabo de forma idéntica en todos los laboratorios (4). El análisis estadístico de equivalencia se realizó de acuerdo con el procedimiento ISO 17994 (3). De acuerdo con este procedimiento, la comparación debe hacerse entre resultados confirmados. El test de equivalencia estándar se ha efectuado confirmando los resultados analíticos de acuerdo con los criterios de confirmación del método de referencia (TTC): un coliforme es un presunto confirmado como citocromo oxidasa negativo; una *E.coli* es un presunto oxidasa negativo e indol positivo a 44°C.

Los resultados obtenidos para *E.coli*, de acuerdo con el test de equivalencia estándar, presentan un elevado número de falsos positivos, lo cual ha aconsejado tener en cuenta otros criterios alternativos para la identificación de *E.coli*, basados en la actividad del enzima β -D-glucuronidasa sobre un sustrato definido (en el Colilert, metil-umbeliferil glucurónido, MUG)

De acuerdo con el EMAG, para que un método alternativo sea aceptado debe demostrar ser equivalente o mejor que el de referencia en el ejercicio de equivalencia, para lo cual debe cumplirse la condición de que la diferencia relativa media (x) entre ambos métodos tenga una incertidumbre expandida (U) tal que se cumpla que $x-U > -0,10$. Además, cuando se cumple esta condición, casi siempre x tiene valor positivo, pues, si fuera negativo, para que $x-U > -0,10$, la incertidumbre debería ser inusualmente baja ($U < 0,10$).

MÉTODOS

Preparación de muestras

Las muestras estudiadas se prepararon en su mayor parte (sin desinfectar o desinfectadas) mediante la dilución con agua de grifo de un efluente secundario, hasta el rango esperado de 10-80 microorganismos por 100 ml. También se utilizaron muestras de agua subterránea o de agua superficial natural. En la preparación de muestras desinfectadas se utilizó casi siempre efluente de aguas residuales y no agua superficial. El procedimiento usado para la preparación de muestras desinfectadas fue el descrito en *The Microbiology of Drinking Water* (4). Muy brevemente: efluentes secundarios decantados de agua residual se diluyeron con agua de grifo a aproximadamente 1:10 - 1:20, para producir 10 L de muestra diluida y se añadió una solución de cloro libre apropiada (generalmente 10-15 mg). Tras una buena agitación manual de los frascos con las muestras, se prosiguió de modo mecánico utilizando un agitador magnético. Submuestras de 500 mL se iban tomando a intervalos de un minuto, neutralizando el cloro presente con tiosulfato sódico. Las submuestras se cuantificaron para bacterias coliformes y *E. coli* utilizando Colilert 18-Quantitray y se almacenaron a 2-8°C. Las diluciones de las submuestras de las que se esperaba que dieran recuentos de 10-80 fueron las usadas para producir las que se consideraron muestras para la comparación de ambos métodos, aunque se aprovecharon también las que, en contra de lo esperado, proporcionaron recuentos en el intervalo 0-10 por lo menos con uno de los dos métodos a comparar (sobre todo para

E. coli). Es imprescindible efectuar todas las comparaciones entre los dos métodos utilizando alícuotas procedentes del mismo frasco.

Procedimientos para el recuento de bacterias coliformes y *E. coli*

El método descrito en la norma ISO 9308-1, basado en el agar lactosa TTC Tergitol 7 (5) incubando a 36°C, fue utilizado tanto para la detección de bacterias coliformes como de *E. coli*. Aunque este procedimiento tenga el inconveniente de presentar membranas con un crecimiento significativo de microbiota acompañante distinta a la diana, nos permitió llevar a cabo una comparación usando la norma ISO en las condiciones estrictas descritas en su texto. Este método considera bacterias coliformes las lactosa positivas que son oxidasa negativas y como *E. coli* las bacterias coliformes capaces de producir indol del triptófano a 44°C. Para los tres ejercicios se utilizó TTC-Tergitol agar de la firma Bio-Rad (Marnes-la-Coquette, Francia).

El procedimiento en medio líquido cromogénico para la β-D-galactosidasa y fluorogénico para la β-D-glucuronidasa, con recuento por el número más probable (NMP), elegido como alternativa en el primer ejercicio ha sido el Colilert®-18/Quanti-Tray® (6) (IDEXX Laboratories, Inc., Westbrook, Maine, EUA) y los análisis se efectuaron de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

En el segundo estudio se ha usado el Chromocult® Coliformes Agar (7)

(Merck, Darmstadt, Alemania). Aunque para el análisis de muestras de aguas de distribución se recomienda el citado medio de cultivo sin adición de antibióticos, el protocolo de obtención de muestras ha recomendado para este ejercicio la utilización del medio con adición de 5 mg/L de cefsulodina y 5 mg/L de vancomicina.

Los procedimientos basados en los medios de cultivo m-Endo y m-FC (8) utilizan también la fermentación de la lactosa como criterio definitorio de bacteria coliforme y el carácter indolpositivo a 44°C como criterio definitorio de *E. coli*. Ambos medios de cultivo se utilizaron de la firma Biolife (Milano, Italia).

Para cada uno de los citados medios de cultivo, los distintos laboratorios utilizaron el mismo lote. Todos los filtros de membrana de acetato de celulosa de 0,45 mm utilizados para los análisis en TTC, Chromocult, m-Endo y m-FC fueron de Millipore Corporation (Bedford, MA, EUA)

Confirmación e identificación de las cepas aisladas

Se describen las necesidades de confirmación de cepas únicamente basadas en las comparaciones estándar, así como las confirmaciones e identificaciones complementarias derivadas de la voluntad de efectuar comparaciones alternativas y un estudio más exhaustivo de las cepas.

Según el protocolo de laboratorio, se confirmaron todas las colonias o "pocillos" (caso del Colilert) presuntivos cuando el recuento estaba com-

prendido entre uno y diez. En el caso de recuentos superiores a diez, se seleccionaron diez colonias o "pocillos" al azar para llevar a cabo la confirmación. En el caso del procedimiento Colilert®-18, los cultivos seleccionados de los pocillos fluorescentes fueron un subconjunto de los (diez) pocillos amarillos. En el caso del procedimiento Chromocult, las colonias a confirmar se repartieron de modo proporcional a su relativa abundancia entre las de color rojo-salmón (presuntivas de ser un coliforme no-*E. coli*) y las de color azul-violeta (presuntivas de *E. coli*).

Análisis estadístico

Según los principios del procedimiento ISO 17994 (3), la comparación de dos métodos se basa en la diferencia relativa media de los recuentos confirmados. La diferencia relativa (x_i) se define como

$$x_i = \ln(a_i) - \ln(b_i), \text{ donde}$$

a_i = recuento confirmado por el método alternativo en la muestra i

b_i = recuento confirmado por el método de referencia en la muestra i

Si uno de los recuentos confirmados es cero, la fórmula que define la diferencia relativa se aplica como

$$x_i = \ln(a_i+1) - \ln(b_i+1)$$

Esto se hace para evitar la necesidad de omitir las muestras en las que se presentan ceros. No obstante, se eliminan las muestras en las cuales el resultado de ambos métodos es cero. La evaluación de la equivalencia se fundamenta en la diferencia relativa media y la incertidumbre expandida

Laboratorio	n	Diferencia relativa media (X)	Desviación estándar (SD)	Incertidumbre expandida (U)	X - U	X + U	Evaluación
1	7	0,3399	0,2773	0,2095	0,1304	0,5494	+
2	42	1,0644	0,8766	0,3285	0,7359	1,3929	+
3	48	0,6941	0,6970	0,2012	0,4929	0,8953	+
4	55	0,7604	0,9314	0,2511	0,5093	1,0115	+
7	19	0,4001	0,6339	0,2908	0,1093	0,6909	+
8	53	0,8966	0,7614	0,2091	0,6875	1,1057	+
9	37	0,4149	0,5186	0,1705	0,2444	0,5854	+
10	42	0,0907	0,4043	0,1247	-0,0340	0,2154	Eq.
11	30	0,7894	0,6278	0,2292	0,5602	1,0186	+
TOTAL	333	0,6612	0,7176	0,0786	0,5826	0,7398	+

+ = diferencia positiva significativa; Eq = equivalente.

Cuadro 1. Coliformes totales. Test estándar. Criterio de confirmación: oxidasa-negativos.

(U), basada en la desviación estándar de la media.

A partir de la diferencia relativa media (x) y la incertidumbre expandida, se calcula el intervalo de confianza de la incertidumbre expandida alrededor de la media (intervalo comprendido entre x+U y x-U). Un método alternativo es equivalente al de referencia cuando x+U tiene un valor positivo y x-U tiene un valor negativo pero superior (inferior en valor absoluto) a un valor D fijado de antemano. Para este tipo de ejercicios se considera D = -0,10 (10 %). Si todo el intervalo entre x+U y x-U es positivo, se considera que existe una diferencia significativa en favor del método alternativo y si, por el contrario, todo el citado intervalo es negativo, la diferencia significativa está a favor del método de referencia. Las demás posibilidades conducen a resultados inconcluyentes. De acuerdo con el EMAG, para que un método candidato a alternativo pueda ser aceptado como tal debe ser equivalente al método de referencia o dar resultados significativamente superiores.

Se consideran test estándar los que se han efectuado con recuentos confirmados de acuerdo con los criterios de confirmación de la norma ISO 9308 y test no estándar o alternativos aquellos en que se han utilizado otros criterios de confirmación de los resultados.

En las muestras en que no se confirmaron todos los cultivos presuntivos, el recuento confirmado de colonias fue calculado, de acuerdo con el protocolo, de la siguiente forma:

$$b = \frac{c}{n} \cdot p$$

b = recuento confirmado de colonias
 p = recuento presuntivo
 n = número de colonias ensayadas
 c = número de colonias confirmadas
 La fórmula general que se empleó para estimar el número más probable (NMP) de la serie Colilert®-18 de 51 "pocillos", cuando se confirmaron todos los "pocillos" presuntivos, fue la siguiente:

$$a = 51 \cdot 1n \left(\frac{51}{51-c} \right)$$

a = recuento (NMP) confirmado por el Colilert®-18
 c = número de pocillos presuntivos confirmados

En los casos en que se analizó solo un subconjunto de los positivos presuntivos, se aplicó la siguiente fórmula:

$$a = 51 \cdot 1n \left(\frac{51}{51 - \left(\frac{c}{n} \cdot p \right)} \right)$$

a = recuento (NMP) confirmado por el Colilert®-18
 p = número de pocillos positivos presuntivos
 n = número de pocillos seleccionados para su confirmación
 c = número de pocillos confirmados

EJERCICIO TTC-COLILERT

Bacterias Coliformes

Los resultados del test de equivalencia estándar se resumen en el Cuadro 1. La diferencia relativa media total de 0,6612 indica un recuento total medio

de bacterias coliformes superior en un 66% con el método Colilert®-18 en comparación con el método TTC.

La mayor frecuencia de cepas lactosa-negativas y β-D-galactosidasas-positivas (LAC-ONPG+) entre las aisladas del Colilert®-18 (5,67% vs. 1,46%) no explica, por sí sola, la diferencia hallada de +66%. La proporción de falsos positivos fue de 2,02% en el Colilert®-18 y de 26,5% en el TTC. Este resultado concuerda con el hecho establecido de que el análisis de bacterias coliformes no requiere confirmación cuando se lleva a cabo usando el procedimiento Colilert®-18. En cambio, el método TTC requiere confirmación, de acuerdo con el párrafo 4.3 de la norma ISO 9308.

Escherichia coli

Para el ensayo de equivalencia estándar (criterios de confirmación del método de referencia TTC) (Cuadro 2) la confirmación de *E. coli* de las cepas presuntivas aisladas con ambos métodos se ha basado en un resultado indol positivo a 44°C. Los presuntivos ensayados a partir del TTC fueron cepas aisladas de colonias LAC+ que se hallaron oxidasa negativas. Los presuntivos del Colilert®-18 fueron cepas aisladas de los "pocillos" fluorescentes amarillos que se hallaron oxidasa negativas. (No obstante, en este último caso, no se observó ninguna cepa que resultara ser oxidasa positiva.)

La diferencia relativa media total de -0,3816 mostró que, en las comparaciones realizadas de acuerdo con los criterios de confirmación de la norma ISO 9308, la recuperación de *E. coli*

Laboratorio	n	X	SD	U	X - U	X + U	Evaluación
1	7	- 0,0070	0,3425	0,2589	- 0,2659	0,2519	o
2	39	0,0915	1,2116	0,3880	- 0,2965	0,4795	o
3	41	- 0,6154	0,9871	0,3784	- 0,9938	- 0,2370	-
4	42	- 0,3055	1,0356	0,3196	- 0,6251	0,0141	o
7	17	- 0,8018	1,1861	0,5753	- 1,3771	- 0,2265	-
8	42	-0,8420	0,9391	0,2898	- 1,1318	- 0,5525	-
9	33	-0,3770	0,9619	0,3348	- 0,7118	- 0,0422	-
10	33	- 0,3164	0,7406	0,2578	- 0,5742	- 0,0586	-
11	21	0,0704	0,9459	0,4127	- 0,3423	0,4831	o
TOTAL	275	-0,3816	1,0318	0,1244	- 0,5060	- 0,2572	-

o = no concluyente; - = diferencia negativa significativa.

Cuadro 2. *Escherichia coli*. Ensayo estándar de equivalencia. Criterio de confirmación: indol-positivos.

Laboratorio	n	X	SD	U	X - U	X + U	Evaluación
1	7	- 0,0070	0,3425	0,2589	- 0,2659	0,2519	o
2	37	0,8765	1,3098	0,4306	0,4459	1,3071	+
3	38	0,3226	0,8193	0,2658	0,0568	0,5884	+
4	47	- 0,0141	1,0572	0,3084	- 0,3225	0,2943	o
7	12	0,3845	0,9613	0,5550	- 0,1705	0,9395	o
8	28	0,2167	1,0747	0,4061	- 0,1894	0,6228	o
9	33	-0,0689	0,7914	0,2755	- 0,3444	0,2066	o
10	33	- 0,0970	0,7521	0,2618	- 0,3588	0,1684	o
11	21	0,1835	1,0073	0,4396	- 0,2561	0,6231	o
TOTAL	256	0,2072	1,0178	0,1272	0,0800	0,3344	+

o = no concluyente; - = diferencia negativa significativa.

Cuadro 3. *Escherichia coli*. Ensayo no estándar de equivalencia. Criterio de confirmación: b-D-glucuronidasa-positivos.

por el método Colilert®-18 era un 38% inferior en comparación con el método TTC.

En un test de equivalencia no estándar (Cuadro 3), los ensayos especiales con el enzima β -D-glucuronidasa (metil-umbeliferil-glucurónido, MUG, como sustrato) y otras observaciones efectuadas ofrecen una oportunidad para evaluar alternativas a la confirmación por indol.

En este caso, que se ajusta más a la realidad de *E.coli*, los resultados del ejercicio de equivalencia experimentan un cambio total, pues el Colilert pasa a recuperar un 33% más *E.coli* que el TTC.

EJERCICIO TTC-CHROMOCULT

Bacterias Coliformes

Once laboratorios han analizado 364 muestras (cuadro 4). Para bacterias coliformes, la valoración estadística de los resultados, con una diferencia relativa media positiva (+ 0,426) y todo el intervalo entre x-U y x+U positivo, permite afirmar que el Chromocult recupera casi un 43% más que el TTC.

Esta diferencia no es tan grande como la hallada en el ejercicio anterior entre el Colilert y el TTC (+66%). La contribución a la diferencia del 43% a favor del Chromocult por parte de cepas LAC-ONPG+ apenas supera el 5%, pues éstas representan un 8,57% de las aisladas del Chromocult (5,67% en el caso del Colilert) y un 2,80% de las aisladas del TTC (1,46% en el ejercicio Colilert).

Al igual que en el ejercicio Colilert, se detectó una diferencia significativa

en los falsos positivos entre Chromocult y TTC: 3,87% el Chromocult y 22,6% el TTC. Aunque el porcentaje sigue siendo bajo, el Chromocult presenta casi el doble de falsos positivos que el Colilert. En el informe final del ejercicio, se han desestimado algunos datos de algún laboratorio con porcentajes de cepas oxidasa-positivas en Chromocult anormalmente altas, sin lo cual las diferencias a favor del Colilert serían aún superiores.

Escherichia coli

En el caso de *E.coli*, de acuerdo con el test de equivalencia estándar (Cuadro 5), el TTC recupera un 43% más que el Chromocult y esta ventaja es significativa porque todo el intervalo entre x-U y x+U es negativo. Este porcentaje es muy semejante (ligera y superior) al obtenido en el ejercicio TTC- Colilert (38%).

Los presuntivos ensayados a partir del TTC fueron, como en el ejercicio TTC-Colilert, cepas aisladas de colonias LAC+ que se hallaron oxidasa negativas. Los presuntivos del Chromocult fueron cepas aisladas de las colonias azul-violeta que se hallaron oxidasa negativas.

Al igual que en el ejercicio TTC-Colilert, se ha llevado a cabo un test de equivalencia alternativo, identificando *E.coli* por el criterio de la b-D-glucuronidasa (Cuadro 6).

En este caso, a diferencia de lo que sucedía en el ejercicio TTC- Colilert, en el cual la diferencia relativa media se hacía claramente positiva (+ 21%), la diferencia relativa media es solo ligeramente positiva (+ 1,9%), es decir, el TTC da valores por término

medio ligeramente inferiores, lo cual, unido a una incertidumbre expandida de 0,1004, permite afirmar que ambos métodos son equivalentes: $x-U = -0,0850$ ($> - 0,10$).

EJERCICIO TTC-MENDO/MFC

Bacterias coliformes

La combinación de m-Endo y m-FC es el método de referencia para filtros de membrana de coliformes totales y coliformes fecales en los *Standard Methods* norteamericanos (8).

La diferencia relativa media total para coliformes (Cuadro 7) de 0,2055 indica un recuento total medio de bacterias coliformes superior en casi un 21% con el método m-Endo en comparación con el método TTC, es decir, una ventaja significativa del estándar norteamericano respecto al europeo.

No se ha detectado una diferencia significativa en falsos positivos entre los métodos m-Endo (25,9%) y TTC (28,9%), pero en ambos casos se precisa confirmación de las cepas presuntivas.

Basándose ambos métodos en la fermentación de la lactosa, no se ha encontrado ninguna explicación a la superior recuperación del m-Endo respecto al TTC, a no ser la mayor facilidad en el desarrollo y aislamiento de colonias presuntivas debido a los menores problemas relacionados con la microbiota acompañante, a causa de su mayor selectividad.

Escherichia coli

A pesar de que ninguno de los dos métodos a comparar se basa en la

Laboratorio	n	X	SD	U	X - U	X + U	Evaluación
1	34	0,0842	1,8997	0,6516	- 0,5674	0,7357	o
2	21	0,0138	0,4336	0,1892	- 0,1755	0,2030	o
3	58	0,4702	0,6911	0,1815	0,2888	0,6517	+
4	53	0,3005	0,6017	0,1653	0,1352	0,4658	+
5	36	0,1636	0,1981	0,0660	0,0975	0,2296	+
6	30	0,4414	0,4463	0,1630	0,2785	0,6044	+
7	29	- 0,0101	0,5715	0,2123	- 0,2224	0,2021	o
9	60	1,1805	1,3595	0,3510	0,8295	1,5315	+
10	18	0,1104	0,4740	0,2234	- 0,1131	0,3338	o
11	12	1,2765	0,2565	0,1481	1,1284	1,4246	+
12	13	0,1342	0,8198	0,4547	- 0,3206	0,5889	o
Total	364	0,4260	1,0083	0,1057	0,3203	0,5317	+

o = no concluyente; - = diferencia negativa significativa.

Cuadro 4. Coliformes totales. Test estándar. Criterio de confirmación : Oxidasa-negativos.

b-D glucuronidasa para caracterizar *E. coli*, este enzima se ha utilizado como ensayo confirmativo alternativo porque en los ejercicios TTC-Colilert y TTC-Chromocult, desarrollados de modo teóricamente paralelo (pero realmente un poco antes, lo cual ha permitido obtener conclusiones de ellos antes de iniciar el presente ejercicio), se ha demostrado que el MUG constituye un criterio identificativo para *E.coli* mucho mejor que el indol. Para el ensayo de equivalencia estándar (criterios de confirmación del método de referencia TTC) se ha podido disponer de los datos de 232 muestras (Cuadro 8). En ambos métodos a comparar, los presuntivos ensayados fueron cepas aisladas de colonias LAC+ (incubadas a 36°C en el TTC y a 44°C en el m-FC) que se hallaron oxidasa negativas. La diferencia relativa media total de -0,5485 mostró que la recuperación

de *E. coli* por el método m-FC era un 55% inferior en comparación con la del método TTC.

Mientras que el número de muestras estudiado para bacterias coliformes rebasa el número mínimo recomendado de unas 256 muestras, en el caso de *E.coli* el número de muestras estudiado es algo inferior. No obstante, los resultados son tan claros a favor del TTC que sería imposible que, aunque se estudiaran algunas muestras más hasta llegar a las 256, variaran los resultados globales incluso si se invirtieran del todo las tendencias.

De las 751 colonias presuntivas (747 oxidasa-negativas) en m-FC ensayadas, 639 (85,1% del total y 85,5% de las oxidasa-negativas) fueron indol positivas a 44°C. De las 1.896 colonias presuntivas en TTC, 783 (41,3 %) fueron indol positivas a 44°C. Dejando aparte la mayor selectividad

del medio m-FC respecto al TTC debido a su composición, su mayor (más del doble) porcentaje de indol-positivos se debe con toda seguridad al hecho de su incubación a una temperatura superior (44°C). No se han efectuado ensayos utilizando el m-FC a 36°C, pues no está previsto en el método alternativo cuya equivalencia estamos evaluando, por lo que en teoría es difícil conocer qué parte del mayor porcentaje de indol-positivos se debe a la selectividad de la composición del medio y qué parte a la selectividad de la mayor temperatura.

No obstante, como la nota 2, párrafo 8.3 de la norma ISO 9308 2 permite incubar el TTC a 44°C, en este ejercicio se han estudiado también muestras paralelas en TTC a 44°C. Un motivo de este proceder ha sido la realización de tests de equivalencia alternativos, pero también ha ser-

Laboratorio	n	X	SD	U	X - U	X + U	Evaluación
1	30	- 0,7100	1,3701	0,5003	- 1,2103	- 0,2097	-
2	19	- 0,2161	0,9476	0,4348	- 0,6509	0,2186	o
3	52	- 0,1871	0,8602	0,2386	- 0,4256	0,0515	o
4	48	- 0,6683	0,8400	0,2425	- 0,9108	- 0,4258	-
5	36	- 0,3204	0,6004	0,2001	- 0,5205	- 0,1202	-
6	30	- 0,2761	0,5573	0,2035	- 0,4796	- 0,0726	-
7	29	- 0,6168	0,6356	0,2361	- 0,8529	- 0,3808	-
9	45	- 0,0623	0,6423	0,1915	- 0,2538	0,1292	o
10	18	- 1,6712	0,6930	0,3267	- 1,9979	- 1,3446	-
11	8	0,1733	0,8013	0,5666	- 0,3933	0,7399	o
12	3	- 0,3662	0,9396	1,0849	- 1,4511	0,7187	o
Total	318	- 0,4324	0,8967	0,1006	- 0,5330	- 0,3319	-

o = no concluyente; - = diferencia negativa significativa.

Cuadro 5. *Escherichia coli*. Test estándar. Criterio de confirmación: indol-positivos (en Chromocult, sólo de presuntivos: colonias azul-violeta).

Laboratorio	n	X	SD	U	X - U	X + U	Evaluación
1	25	- 0,0756	1,3409	0,5363	- 0,6119	0,4608	o
2	16	-0,0104	1,1845	0,5923	-0,6027	0,5819	o
3	50	0,2146	0,8250	0,2333	-0,0187	0,4480	Eq.
4	41	- 0,0265	0,8984	0,2806	- 0,3071	0,2541	o
5	36	- 0,3825	0,6935	0,2312	- 0,6137	- 0,1513	-
6	30	0,0594	0,5591	0,2042	- 0,1447	0,2636	o
7	29	- 0,3126	0,7331	0,2723	- 0,5849	- 0,0403	-
9	45	0,1208	0,7380	0,2200	- 0,0992	0,3409	Eq.
10	15	0,5790	1,1650	0,6016	- 0,0226	1,1806	Eq.
11	9	0,6931	0,8844	0,5896	0,1035	1,2828	+
12	3	- 0,3662	0,9396	1,0849	- 1,4511	0,7187	o
Total	299	0,0194	0,9026	0,1004	- 0,0850	0,1238	Eq.

o = no concluyente; + = diferencia positiva significativa; - = diferencia negativa significativa; Eq. = equivalente.

Cuadro 6. *Escherichia coli*. Test no estándar. Criterio de confirmación: β -D-glucuronidasa-positivos.

Laboratorio	n	X	SD	U	X - U	X + U	Evaluación
2	5	0,7029	0,5377	0,4809	0,2220	1,1838	+
3	9	0,7883	0,4745	0,3163	0,4720	1,1046	+
4	85	-0,0040	1,0555	0,2290	-0,2250	0,2330	O
5	63	0,7445	1,1220	0,2827	0,4618	1,0272	+
6	68	0,0173	0,5409	0,1312	-0,1139	0,1485	O
8	40	-0,0965	0,5521	0,1746	-0,2711	0,0781	O
Total	270	0,2055	0,9435	0,1148	0,0907	0,3203	+

o = no concluyente; + = diferencia positiva significativa.

Cuadro 7. Coliformes totales. Test estándar. Criterio de confirmación : Oxidasa-negativos.

vido para comparar la capacidad selectiva del TTC y el m-FC a la misma temperatura (44°C).

De 910 cepas (831 oxidasa-negativas) presuntivas, 668 (73,4% del total y 80,4% de las oxidasa-negativas) son indol positivas en el TTC incubado a 44°C, lo cual sugiere que, ya en razón de su propia composición, el m-FC es bastante más selectivo (más del 85% de indol positivos). Esta mayor selectividad también se manifiesta en que, a diferencia del TTC44, el m-FC apenas deja crecer bacterias oxidasa-positivas.

No obstante, a pesar de su mayor selectividad, el m-FC permite una recuperación de *E. coli* significativamente inferior que la del TTC incubado a 36°C.

De cualquier modo, queda demostrado que la diferencia entre el m-FC y el TTC a 36°C en el porcentaje de recuperación de indol-positivos se debe más a la diferencia de temperaturas que a posibles diferencias en la composición del medio.

Al igual que en los ejercicios TTC-Colilert y TTC-Chromocult, se ha lle-

vado a cabo un test de equivalencia alternativo (Cuadro 9), identificando *E. coli* por el criterio de la β -D-glucuronidasa, aunque en este caso ninguno de los dos métodos a comparar se base en la utilización de este enzima, porque, como ya indicamos, en los dos ejercicios anteriores se ha demostrado su mayor idoneidad.

En este caso, aunque la ventaja sigue siendo muy clara para el TTC, la diferencia relativa media aumenta de valor respecto al test estándar (de -55% a -38%), va algo menos a favor del TTC, lo cual parece indicarnos que, siendo el m-FC más selectivo, también incrementa su selectividad considerando para *E. coli* el criterio correcto, pues experimenta en esas condiciones una ligera mejoría. No obstante, y a pesar del número de muestras aún ligeramente más bajo que en el ensayo estándar (n=224), estamos aún lejos de una situación hipotética que pudiera alterar los resultados incluso con una "racha" de valores a favor del m-FC si se estudiaran algunas muestras más hasta completar las 256 mínimas recomendadas.

Aceptando como mejor criterio de definición de *E. coli* el MUG respecto al indol, es interesante considerar cuáles serían las tasas de confirmación con el criterio MUG:

De los 751 colonias (747 oxidasa-negativas) presuntivas en m-FC ensayadas, todas desarrolladas a 44°C, 619 fueron MUG positivas (82,4% del total y 82,9% de las oxidasa-negativas, algo inferior a los 85,1% y 85,5% de las indol positivas). De las 1.896 colonias presuntivas en TTC, 673 fueron MUG positivas (35,5%, bastante inferior al 41,3% de indol positivas). No obstante, la diferencia entre 35,5 y 82,4 es mayor que la diferencia entre 41,3 y 85,1.

De 910 cepas (831 oxidasa-negativas) presuntivas, 666 (73,2% del total y 80,1% de las oxidasa-negativas) son MUG positivas en el TTC a 44°C. En este caso, la cifra coincide prácticamente con la de las indol positivas (668 cepas, que representaban un 73,4% del total y 80,4% de las oxidasa-negativas). Estos resultados sugieren que, si bien el m-FC es bastante más selectivo, para las cepas

Laboratorio	n	X	SD	U	X - U	X + U	Evaluación
2	4	0,7945	1,3527	1,3527	-0,5582	2,1472	o
3	8	0,6298	0,8270	0,5848	0,0450	1,2146	+
4	68	-0,9569	0,9650	0,2340	-1,1909	-0,7229	-
5	55	-0,1678	1,0960	0,2956	-0,4634	0,1278	o
6	57	-0,6412	0,8106	0,2147	-0,8559	-0,4265	-
8	40	-0,6191	0,9036	0,2857	-0,9048	-0,3334	-
Total	232	-0,5485	1,0287	0,1351	-0,6836	-0,4134	-

o = no concluyente; + = diferencia positiva significativa; - = diferencia negativa significativa.

Cuadro 8. *Escherichia coli*. Test estándar. Criterio de confirmación: indol-positivos.

Laboratorio	n	X	SD	U	X - U	X + U	Evaluación
2	4	1,3220	1,0289	1,0289	0,2931	2,3509	+
3	8	0,2878	0,7019	0,4963	-0,2085	0,7841	o
4	67	-0,8277	1,0036	0,2452	-1,0729	-0,5825	-
5	51	0,1315	0,9893	0,2771	-0,1456	0,4086	o
6	54	-0,4380	0,8273	0,2252	-0,6632	-0,2128	-
8	40	-0,4967	0,9069	0,2868	-0,7835	-0,2099	-
Total	224	-0,3781	1,0223	0,1366	-0,5147	-0,2415	-

o = no concluyente; + = diferencia positiva significativa; - = diferencia negativa significativa.

Cuadro 9. *Escherichia coli*. Test no estándar. Criterio de confirmación: MUG.

indol positivas, que el TTC a 44°C, este último selecciona una mayor proporción de auténticas *E.coli* entre las cepas indol positivas.

El hecho de haber analizado, en este ejercicio, las muestras por cuadruplicado (TTC a 36°C, TTC a 44°C, m-Endo a 36°C y m-FC a 44°C) permite efectuar múltiples comparaciones entre los distintos métodos tomados de dos en dos. Las más interesantes pueden verse en un Cuadro resumen (cuadro 10).

Quizás una de las cosas más interesantes a constatar es que el TTC a 44°C y el m-FC (también a 44°C) son equivalentes si se considera el m-FC como método de referencia (criterio Standard Methods norteamericanos). Si se considera como referencia el TTC a 44°C (criterio de la nota 2, párrafo 8.3 de la normas ISO 9308-1:2000) ambos métodos siguen siendo no significativamente diferentes, pero la evaluación del ejercicio debe considerarse no concluyente.

ESTUDIO DE LAS CEPAS AISLADAS

A partir de las colonias presuntivas o los pocillos de Colilert presuntivos se aislaron las cepas a estudiar en agar

Mac Conkey. Cuando no se obtuvo un cultivo puro, se utilizaron para la confirmación los aislamientos lactosa positivos, tras un subcultivo posterior en un agar nutritivo.

De cada muestra, para cada medio de cultivo se confirmaron todas las colonias o pocillos de Colilert positivos si su número era igual o inferior a 10. Cuando su número era superior a 10, se confirmaron solo 10.

Aunque para las comparaciones estándar hubiera bastado confirmar las bacterias coliformes presuntivas como oxidasas-negativas y *E.coli* como coliforme indol-positivo a 44°C, la aplicación de un criterio alternativo para *E.coli* implicaba también la necesidad de confirmar las cepas por la β -D-glucuronidasa. El mismo medio utilizado para estudiar la actividad de este enzima permite también detectar la actividad de la β -D-galactosidasa, carácter definitorio de las bacterias coliformes que comparten muchas más Enterobacteriaceae que la capacidad de fermentar la lactosa.

Además, en los ejercicios Colilert y Chromocult se obtuvo una mayor información de las cepas buscando posibles falsos positivos de bacterias coliformes que fueran oxidasas-negativas pero aminopeptidasa-negativas. La constatación de la actividad enzimática de la aminopeptidasa (APD) sirve en

cierto modo como rápido sustituto de la tinción Gram. En general, las bacterias Gram-positivas son APD-negativas y las Gram-negativas suelen ser APD-positivas. No obstante, las Enterobacteriaceae son siempre APD-positivas. Las escasas cepas APD-negativas detectadas son con gran probabilidad Gram-positivas, aunque algunas pueden pertenecer excepcionalmente a un grupo de Gram-negativos distinto a las bacterias coliformes o Enterobacteriaceae.

Finalmente, también en los ejercicios Colilert y Chromocult, en los que interviene como mínimo un medio de cultivo no basado en la fermentación de la lactosa, se ha confirmado (para las cepas aisladas a partir de Colilert y Chromocult) o reconfirmado (para las cepas procedentes de TTC) el posible carácter lactosa-positivo, tanto a 36 como a 44°C. El hecho de que algunas cepas procedentes del TTC no se hayan podido reconfirmar como lactosa-positivas puede ser debido a un error diagnóstico del presuntivo por parte del analista o a inconstancia en aislar un lactosa-positivo a partir de un cultivo no puro.

Los protocolos de confirmación de cepas y obtención de características bioquímicas que permitan distribuir las en distintos fenotipos se ha efectuado

Comparación	Criterio	n	X	SD	U	X - U	X + U	Eval.
Colilert – TTC	Coliformes lactosa	333	0,6612	0,7176	0,0786	0,5826	0,7398	+
	<i>E.coli</i> indol	275	-0,3816	1,0318	0,1244	-0,5060	-0,2572	-
	<i>E.coli</i> β-D-glucuronidasa	256	0,2072	1,0178	0,1272	0,0800	0,3344	+
Chromocult – TTC	Coliformes lactosa	364	0,4260	1,0083	0,1057	0,3203	0,5317	+
	<i>E.coli</i> indol	318	-0,4324	0,8967	0,1006	-0,5330	-0,3319	-
	<i>E.coli</i> todos los indol +	329	0,1095	0,9421	0,1039	0,0057	0,2134	+
	<i>E.coli</i> β-D-glucuronidasa	299	0,0194	0,9026	0,1004	-0,0850	0,1238	Eq
mEndo– TTC36	Coliformes lactosa	270	0,2055	0,9435	0,1148	0,0907	0,3203	+
	<i>E.coli</i> indol	241	0,0339	0,1265	0,1451	-0,1112	0,1790	o
	<i>E.coli</i> β-D-glucuronidasa	222	0,0121	1,0897	0,1463	-0,1342	0,1584	o
mFC – TTC 36	<i>E.coli</i> indol	232	-0,5485	1,0287	0,1351	-0,6836	-0,4134	-
TTC 44 – TTC 36	<i>E.coli</i> indol	224	-0,3781	1,0223	0,1366	-0,5147	-0,2415	-
	<i>E.coli</i> β-D-glucuronidasa	231	-0,5151	1,0662	0,1403	-0,6554	-0,3748	-
mFC – TTC 44	<i>E.coli</i> β-D-glucuronidasa	225	-0,3111	1,0754	0,1415	-0,4546	-0,1696	-
	<i>E.coli</i> indol	217	-0,0876	1,1089	0,1506	-0,2382	0,0630	o
TTC 44 – mFC	<i>E.coli</i> β-D-glucuronidasa	218	-0,0741	0,8287	0,1123	-0,1864	0,0382	o
	<i>E.coli</i> indol	217	0,0876	1,1089	0,1506	-0,0630	0,2382	Eq
	<i>E.coli</i> β-D-glucuronidasa	218	0,0741	0,8287	0,1123	-0,0382	0,1864	Eq

Cuadro 10. Cuadro-resumen de las comparaciones efectuadas en los distintos ejercicios de equivalencia.

con dos protocolos distintos en los ejercicios Colilert y Chromocult (Figura 1) y en el ejercicio m-Endo/m-FC (Figura 2). En los Cuadros 11, 12 y 13 se indican los números y porcentajes de cada fenotipo encontrados respectivamente para las cepas estudiadas en los ejercicios Colilert, Chromocult y m-Endo/m-FC.

ESTUDIO DE LAS CEPAS AISLADAS

EL FALSO DILEMA DE ESCHERICHIA COLI: ¿INDOL O β-D-GLUCURONIDASA?

Como ya indicamos, el procedimiento de referencia ISO no es muy selec-

tivo para *E. coli* y parece permitir que se confirmen otras especies de coliformes de modo erróneo como *E. coli*, lo cual genera una proporción muy alta de falsos positivos.

La distribución del conjunto de cepas identificadas en API 20E en los tres ejercicios de equivalencia se presenta en el Cuadro 14, en el que se indica,

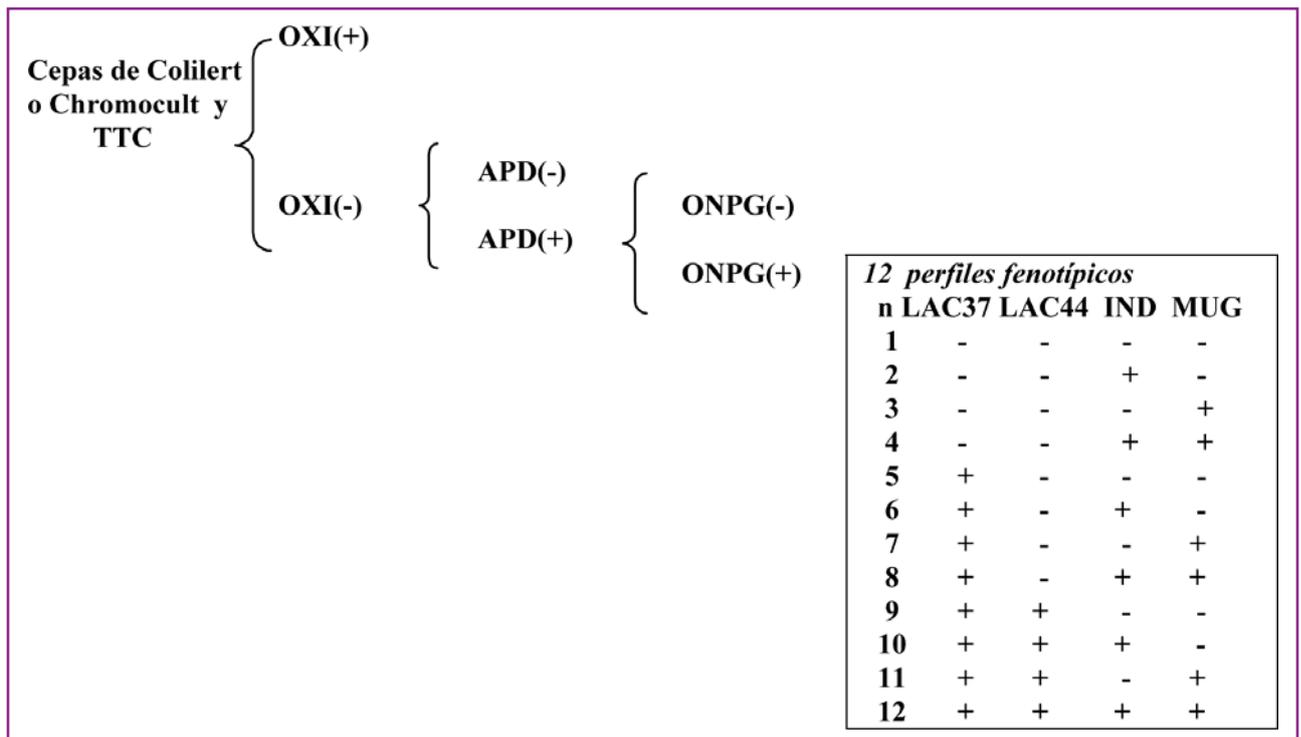


Figura 1.- Protocolo utilizado para la confirmación de cepas en los ejercicios Colilert y Chromocult.

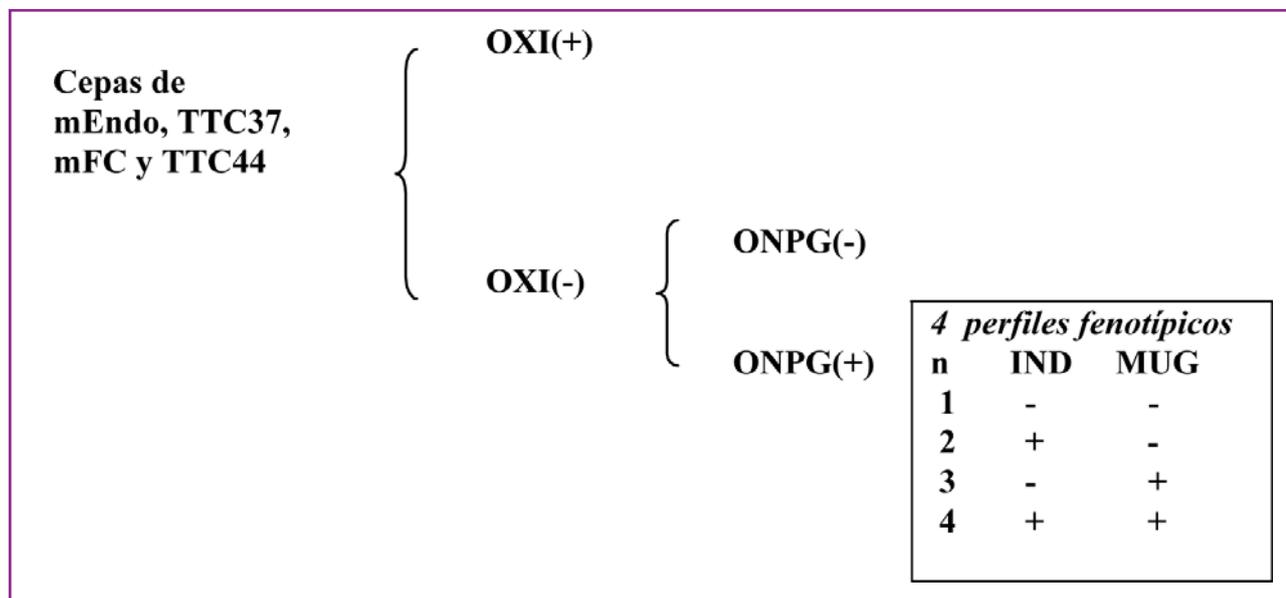


Figura 2.- Protocolo utilizado para la confirmación de cepas en el ejercicio m-Endo/m-FC.

asimismo, la proporción de los 4 fenotipos correspondientes a las combinaciones posibles entre INDOL+/- y MUG+/- dentro de las cepas aisladas (confirmadas) y dentro de las que han sido identificadas por el sistema API 20 E.

En el conjunto de los tres ejercicios, el fenotipo (IND-MUG-) es el que se ha encontrado con mayor frecuencia (47,4%). No obstante, como no es previsible identificar dentro del mismo ninguna *E. coli*, el porcentaje de

cepas de este perfil elegido para su identificación por el sistema API 20E ha sido, con respecto al total de cepas identificadas, de solo un 2,0%.

El perfil siguiente en orden de importancia cuantitativa es el (IND+MUG+) (36,6%), que es de esperar que corresponda a *E. coli*. En este caso, las cepas elegidas de este perfil para identificar con API 20E representan un porcentaje ligeramente inferior respecto al total de cepas identificadas (29,1%), pero resultan más que sufi-

cientes para comprobar que nos hallamos, en efecto, en presencia de *E. coli* típicas.

En cambio, en los otros dos perfiles, que a priori deberían ser los más problemáticos, dudosos o controvertidos respecto a la presencia de *E. coli*, se han identificado, de modo deliberado, porcentajes dentro de las identificaciones API 20E que superan ampliamente el porcentaje real de cada perfil dentro del conjunto de cepas confirmadas.

Fenotipos							Número de cepas (%)	
OXI	APD	ONPG	LAC37	LAC44	IND	MUG	Colilert	TTC
+							42 (1,54)	636 (24,6)
-	-						13 (0,48)	50 (1,94)
-	+	-					2 (0,07)	41 (1,59)
-	+	+	-	-	-	-	122 (4,49)	21 (0,81)
			-	-	+	-	24 (0,88)	5 (0,19)
			-	-	-	+		1 (0,04)
			-	-	+	+	5 (0,18)	
			+	-	-	-	836 (30,7)	570 (22,1)
			+	-	+	-	212 (7,79)	127 (4,92)
			+	-	-	+	15 (0,55)	5 (0,19)
			+	-	+	+	11 (0,40)	4 (0,15)
			+	+	-	-	532 (19,6)	437 (16,9)
			+	+	+	-	214 (7,87)	184 (7,13)
			+	+	-	+	33 (1,21)	24 (0,93)
			+	+	+	+	659 (24,2)	476 (18,4)
Total OXI-/APD+/ONPG+							2663 (97,9)	1854 (71,8)
TOTAL							2720 (100)	2581 (100)

Cuadro 11. Número y porcentaje de cepas de los distintos fenotipos aislados en el ejercicio Colilert.

Fenotipos							Número de cepas (%)	
OXI	APD	ONPG	LAC37	LAC44	IND	MUG	Colilert	TTC
+							81 (3,10)	540 (21,6)
-	-						19 (0,73)	24 (0,96)
-	+	-					11 (0,42)	12 (0,48)
-	+	+	-	-	-	-	225 (8,61)	72 (2,88)
			-	-	+	-	32 (1,22)	9 (0,36)
			-	-	-	+	6 (0,23)	1 (0,04)
			-	-	+	+	3 (0,11)	1 (0,04)
			+	-	-	-	491 (18,8)	341 (13,6)
			+	-	+	-	107 (4,09)	44 (1,76)
			+	-	-	+	17 (0,65)	8 (9,32)
			+	-	+	+	9 (0,34)	1 (0,04)
			+	+	-	-	703 (26,9)	500 (20,0)
			+	+	+	-	251 (9,61)	251 (10,0)
			+	+	-	+	34 (1,30)	42 (1,68)
			+	+	+	+	621 (23,8)	656 (26,2)
Total OXI-/APD+/ONPG+							2502 (95,8)	1926 (77,0)
TOTAL							2613 (100)	2502 (100)

Cuadro 12. Número y porcentaje de cepas de los distintos fenotipos aislados en el ejercicio Chromocult.

Phenotypes				Number of strains (%)			
OXI	ONPG	IND	MUG	mEndo(37)	TTC(37)	mFC(44)	TTC(44)
+				516 (25,9)	547 (28,9)	4 (0,53)	79 (8,68)
-	-			30 (1,50)	27 (1,42)	20 (2,66)	7 (0,77)
-	+	-	-	725 (36,4)	519 (27,4)	73 (9,72)	121 (13,3)
		+	-	147 (7,37)	131 (6,91)	36 (4,79)	37 (4,02)
		-	+	45 (2,26)	24 (1,27)	19 (2,53)	35 (3,85)
		+	+	531 (26,6)	648 (34,2)	599 (79,8)	631 (69,3)
Total OXI-/ONPG+				1448 (72,6)	1322 (69,8)	727 (96,8)	824 (90,5)
TOTAL				1994 (100)	1896 (100)	751 (100)	910 (100)

Cuadro 13. Número y porcentaje de cepas de los distintos fenotipos aislados en el ejercicio m-Endo/m-FC.

De este modo, el perfil (IND-MUG+), el de menor importancia cuantitativa dentro de las cepas detectadas (2,3%), comprende el 8,5% de las cepas en que se ha llevado a cabo identificación API 20E. En teoría esas cepas deberían corresponder a *E. coli*. En la realidad, aunque esta especie ha sido la encontrada con mayor frecuencia, solo corresponde a un 35% de los casos identificados. Es probable que las cepas identificadas como *Citrobacter* sean *E. coli* citrato-positivas. De acuerdo con Farmer (1999) 9, solo un 2% de las cepas de *E. coli* serían indol-negativas. En el conjunto de nuestros ejercicios, dentro de los MUG+ aislados con todos los medios de cultivo utilizados, los indol negativos representan un 5%. Por otro lado, solo el 1% de cepas de

E. coli serían citrato-positivas 9. Se comprende que una base de datos como la del API 20E difícilmente identifique un citrato-positivo como *E. coli* cuando considera 10 que esta especie tiene un 0% de cepas citrato-positivas.

Aunque el Bergey's Manual of Systematic Bacteriology (11) alude al carácter MUG+ de *E. coli*, no aporta información sobre el pequeño porcentaje de cepas de *E. coli* que son MUG-negativas, pero es sabido que cepas patógenas muy conocidas como la O157:H7 lo son. Un estudio británico que compara el Colilert con el TTC36 y el TTC44 12 cita una referencia a un 1% de cepas de *E. coli* MUG-negativas (2 de 200 estudiadas).

Al perfil (IND+MUG-), al que pertenecen solo el 13,7% de las cepas confir-

madadas, corresponde el 60,4% del total de cepas identificadas. Según la norma ISO 9308, todas las cepas (IND+MUG-) deberían ser *E. coli*, y la realidad es que con el sistema API 20E apenas se ha identificado como tal el 10%. Este hecho, unido al de que la especie más abundante dentro del perfil (IND+MUG-) es *Klebsiella oxytoca*, a la cual corresponde el 51% de las cepas, demuestra que considerar, como hace la norma ISO 9308, que cualquier coliforme indol-positivo es *E. coli* es un criterio, además de erróneo, demasiado conservativo y claramente alarmista en el contexto de la evaluación de posibles riesgos. El criterio de la norma ISO solo aparentará ser correcto para las muestras en que la mayor parte de bacterias coliformes IND+ sean realmente

Especie/género	IND(-) MUG(-)	IND(+) MUG(-)	IND(-) MUG(+)	IND(+) MUG(+)	Total
<i>Escherichia coli</i>		40	19	183	242
Other <i>Escherichia</i> spp.		1			1
<i>Klebsiella oxytoca</i>	1	198	1		200
Other <i>Klebsiella</i> and <i>Raoultella</i> spp	5	8	1		14
<i>Enterobacter</i> spp.	3	11	6		20
<i>Pantoea agglomerans</i>		11			11
Other <i>Pantoea</i> spp.	1	66	4		71
<i>Citrobacter</i> spp.	1	9	14		24
<i>Kluyvera</i> spp.		17			17
<i>Leclercia adecarboxylata</i>		7			7
<i>Serratia</i> spp.	1	1	3		5
<i>Rahnella aquatilis</i>			2		2
<i>Salmonella arizonae</i>		2			2
<i>Hafnia alvei</i>			1		1
Unidentified	1	19	4	5	29
Total	13	390	55	188	646
% in API profile	2,01	60,4	8,51	29,1	100
% of profile in confirmed strains	47,4	13,7	2,33	36,6	100
Total confirmed strains	6287	1817	308	4854	13266

Cuadro 14. Distribución y frecuencia de cepas OXI(-)ONPG(+) identificadas por el sistema API 20E.

MUG+, situación que puede darse con relativa frecuencia, pero que no puede preverse de antemano antes de analizar las muestras, lo que refuerza aún más el criterio de que la b-D-glucuronidasa es mejor definitorio de *E. coli* que el indol.

Dentro del conjunto de cepas identificadas por API 20E, se clasificaron como *E. coli* un 83% de las MUG+ y solo un 38% de las INDOL +. Ciertamente que los anteriores porcentajes tienen una representatividad limitada, pues la selección de cepas para identificar con el sistema API 20E no se ha efectuado con criterios proporcionales a la abundancia relativa de los distintos fenotipos en las muestras estudiadas. No obstante, permiten observar claras tendencias. El sistema API 20E, aunque no es definitivo, ofrece una buena indicación de las probables identidades de las especies de *Enterobacteriaceae*. Sin embargo, en las consultas con el fabricante se ha detectado una dificultad en el sistema para reconocer de modo correcto algunas cepas de bacterias indol positivas, a menudo identificándolas como *E. coli* cuando en realidad serían miembros del género *Klebsiella*.

Los anteriores resultados recomendaron como mínimo la necesidad de una investigación adicional sobre el tema.

En esta línea, ante los primeros datos procedentes del ejercicio TTC-Colilert, el fabricante de este último medio propició la realización de un estudio en el Reino Unido (12), en el que un solo laboratorio ha comparado en 125 muestras el Colilert, el TTC incubado a 36°C y el TTC incubado a 44°C para la detección de *E. coli*, considerando como tal las dos alternativas anteriormente consideradas de criterio INDOL y criterio MUG. Utilizando el sistema de identificación Vitek 2, del mismo fabricante que el API 20E y en teoría más fiable, se ha confirmado que el método ISO con la incubación de las membranas a 36°C produce un número significativo de falsos positivos de *E. coli*. De 27 coliformes del perfil (IND+MUG-) identificados a partir de TTC incubado a 36°C, solo uno (3,7%) se identificó como *E. coli* y 25 (92,6%) lo hicieron como *K. oxytoca*. Por otra parte, aunque al incubar las membranas a 44°C se observó una reducción sustancial en el número de falsos positivos, las cepas pertenecientes al perfil (IND+MUG-), ahora mucho más escasas que las del perfil (IND+MUG+), seguían siendo predominantemente *K. oxytoca*. Los (IND+MUG+) eran siempre *E. coli*, tanto a 36°C como a 44°C. El aislamiento menos frecuente

de *K. oxytoca* a 44°C puede explicarse por el hecho de que, aunque esta especie sea capaz de crecer a 44°C en medios no selectivos (por ejemplo, en un caldo triptófano produciendo indol o en un caldo lactosa peptona fermentando la lactosa), su crecimiento generalmente se inhibe cuando se somete a la vez a los factores estresantes de temperatura elevada y agentes selectivos.

Asimismo, como consecuencia de los primeros resultados obtenidos en el ejercicio TTC-Colilert, en un solo laboratorio participante se ha efectuado un estudio (13) siguiendo el mismo protocolo de desinfección de efluentes secundarios para la obtención de muestras en los ejercicios de equivalencia, cuyo objetivo no ha sido conseguir muestras sino la mayor parte de cepas posibles de bacterias coliformes del perfil (INDOL + MUG -). De 180 cepas aisladas de este fenotipo, sólo una ha sido identificada por el sistema API 20 E como *E. coli*, a pesar de que, según el protocolo de la norma ISO 9308, todas hubieran sido identificadas como *E. coli*. Asimismo, la mayor parte de las cepas (139, un 77,2%) se han identificado como *Klebsiella oxytoca*.

En otro estudio llevado a cabo previamente en el mismo laboratorio, relati-

vo a una red de distribución de agua potable (14), se habían efectuado identificaciones API 20E de los diferentes fenotipos de cepas de coliformes aisladas con TTC. Se identificaron 233 cepas (IND+MUG-) y ninguna de ellas fue *E. coli*, mientras que 194 (un 83,3%) eran *K. oxytoca*. En cambio, tanto la única cepa aislada del fenotipo IND-MUG+ como las 20 cepas identificadas del perfil IND+MUG+ fueron *E. coli*.

Es evidente que los resultados falsos positivos de *E. coli* representan una carga financiera importante para las empresas abastecedoras de agua y, si se siguiera utilizando para confirmar *E. coli* tan solo la prueba del indol, se generarían datos estadísticos erróneos con respecto a la calidad del agua de consumo humano. Los métodos empleados en la evaluación de la calidad del agua potable deben ser sensibles y específicos. La incubación de placas de TTC con Tergitol a 36°C no cumple con estos requisitos. En cambio, el uso del Colilert®-18 y del Chromocult, tanto en el presente estudio como en otros precedentes, sí los cumple.

En otras palabras, si se tienen en cuenta los numerosos falsos positivos de *E. coli* que se obtienen cuando se siguen los criterios de confirmación por el indol, preconizada por la norma ISO 9308 (es decir, si se utiliza el MUG como criterio de definición de *E. coli*), el Colilert®-18 y el Chromocult demuestran ser unos métodos aceptables en comparación con el método de referencia ISO para la recuperación de *E. coli* en agua. Los métodos basados en la β -D-glucuronidasa no solo han detectado un mayor número de *E. coli* que el procedimiento de referencia, sino que lo han hecho con una especificidad mucho mayor, lo cual es de extrema importancia para la protección de la salud pública. En base a los resultados del presente estudio, el Colilert®-18 y el Chromocult pueden recomendarse como métodos alternativos aceptables e incluso más específicos para la detección de tanto bacterias coliformes como de *E. coli* en agua.

Tanto el presente estudio de equivalencia como los otros estudios mencionados han contribuido a crear una

masa crítica hacia un nuevo estado de opinión, dando importantes argumentos a favor de considerar la posesión del enzima β -D-glucuronidasa como un mejor carácter definitorio para *E. coli* que la capacidad de producir indol del triptófano a 44°C. En este sentido está trabajando el grupo ISO para el análisis de bacterias coliformes / *E. coli* en agua, que ya ha introducido enmiendas en la propia ISO 9008-1 recomendando la confirmación adicional de *E. coli* por la β -D-glucuronidasa, aunque solo sea a nivel de nota a pie de página, y está estudiando posibles futuros métodos ISO basados en la β -D-galactosidasa para coliformes y, especialmente, en la β -D-glucuronidasa para *E. coli*.

CONCLUSIONES DEL ESTUDIO: MÉTODOS ALTERNATIVOS ACEPTABLES

- Tanto el Colilert como el Chromocult y el m-Endo recuperan un número significativamente superior de bacterias coliformes que el TTC.
- Esta superior recuperación se explica, en las condiciones de los ejercicios, solo en una mínima parte por el hecho de que con los métodos cromogénicos y fluorogénicos se consideran dentro de las bacterias coliformes cepas lactosa negativas pero β -galactosidasa positivas (ONPG +).
- La principal limitación de los ejercicios de equivalencia estándar para *E. coli* es el criterio de la norma ISO 9308 de considerar que es *E. coli* cualquier coliforme indol-positivo, con el cual pueden darse como *E. coli* muchos falsos positivos. De acuerdo con este criterio, en el test de equivalencia estándar, tanto el Colilert como el Chromocult presentarían resultados significativamente más bajos que el TTC.
- Una situación más conforme a la realidad se asocia al criterio alternativo (por lo menos, en el momento en que se llevó a cabo el estudio) de definir *E. coli* como un coliforme β -D-glucuronidasa positivo (MUG +). Las confirmaciones de cepas

(INDOL+ MUG-) por el sistema API 20E (en los propios ejercicios y en estudios paralelos) demuestran que solo en una mínima parte son *E. coli* y en su mayoría son *Klebsiella oxytoca*. El propio fabricante admite problemas de falsa asignación a *E. coli* de cepas (INDOL+ MUG-). En cambio, las cepas (INDOL+ MUG+) son *E. coli*. De acuerdo con el ensayo de equivalencia alternativo (criterio MUG), para *E. coli* el Colilert es significativamente mejor que el TTC y el Chromocult es equivalente.

- La baja tasa de falsos positivos del Chromocult y, sobre todo, del Colilert permite su utilización en las condiciones definidas por los respectivos fabricantes: sin confirmación. Esto implica una importante ventaja adicional en la rapidez del análisis.
- Otras ventajas del Colilert respecto al Chromocult y aún más respecto al TTC son la menor interferencia de la microbiota acompañante y la mayor facilidad de recuento, ligadas a una menor subjetividad en la interpretación de los resultados.
- El TTC, el m-Endo y el m-FC son medios de cultivo elaborados con formulaciones idénticas por distintos fabricantes. Por tanto, aunque puedan existir pequeñas diferencias en su rendimiento en función de la calidad de las materias primas empleadas, los resultados obtenidos en este ejercicio usando m-Endo y m-FC de Biolife son extrapolables a los que se hubieran obtenido utilizando medios de cultivo de otro fabricante.
- No obstante, en el caso de los medios líquidos cromogénicos y fluorogénicos y de los agaros cromogénicos la situación es distinta: el Colilert y el Chromocult tienen sus propias características y sus composiciones no coinciden con las de otros medios de cultivo basados en las mismas reacciones enzimáticas. De ahí que, aunque sea muy probable que este tipo de medios en general sean equivalentes o superiores al TTC, los resultados de este ejercicio obtenidos en los casos concretos del Colilert y el Chromocult no son directamente extrapolables a otros medios, ni

siquiera al Chromocult sin antibióticos.

- Aunque en el ejercicio TTC-mEndo/mFC, el m-Endo recupera significativamente más bacterias coliformes que el TTC, el m-FC recupera significativamente menos *E. coli* que el TTC.
- La alta selectividad de la temperatura es responsable de las recuperaciones significativamente inferiores del m-FC y el TTC44 respecto al TTC36 y m-Endo, aunque en los primeros aumenta la especificidad para *E. coli* (pero no lo suficiente como para no necesitar confirmación).
- En las condiciones del ejercicio TTC - mFC/mEndo, el TTC44 recupera significativamente menos *E. coli* que el método de referencia (TTC36). Aunque la norma ISO 9308 contempla la posibilidad de usar el TTC44 para el análisis de *E. coli*, los resultados de este ejercicio de equivalencia parecen invalidar, por lo menos bajo determinadas circunstancias, su posible consideración como método de referencia. De ahí que sea irrelevante que el m-FC sea muy semejante (equivalente si se considerara el m-FC como método de referencia) al TTC44 para la recuperación de *E. coli*. En el momento de efectuar el estudio, la comparación correcta parecía ser para *E. coli* la del m-FC con el TTC36.
- Por tanto, la conclusión inequívoca de los ejercicios TTC-Colilert y TTC-Chromocult es que, tanto para bacterias coliformes como para *E. coli*, el Colilert y el Chromocult son más específicos y permiten obtener unos resultados reales significativamente más altos o, como mínimo, equivalentes a los del método de referencia. En cambio, la combinación del medio m-Endo para bacterias coliformes con el m-FC para *E. coli* no parece adecuada, pues el m-FC proporciona recuentos de *E. coli* significativamente más bajos.

Bibliografía

- 1.- Consejo de la Unión Europea (1998). Directiva 98/83/CE del Consejo de 3 de noviembre de 1998 relativa a la calidad de las aguas destinadas al consumo humano. Diario Oficial de las Comunidades Europeas 5.12.98: L330/32.
- 2.- Asociación Española de Normalización y Certificación (2001). Norma española UNE-EN ISO 9308-1: 2000. Calidad del agua. Detección y recuento de *Escherichia coli* y de bacterias coliformes. Parte 1: Método de filtración de membrana.
- 3.- International Organization for Standardization (2004). International standard ISO 17994. Water quality - Criteria for establishing equivalence between microbiological methods. First edition 2004.
- 4.- Environment Agency (2002). The Microbiology of Drinking Water - Part 3 - Practices and procedures for laboratories. p.43.
- 5.- Chapman, G.H. (1947). A superior culture medium for the enumeration and differentiation of coliforms. *Journal of Bacteriology* 53: 504 T.
- 6.- Edberg, S.C., Ludwig, F. and Smith, D.B. (1991). The Colilert System for Total Coliforms and *Escherichia coli*. American Water Works Association Research Foundation. Denver, Colorado, EUA.
- 7.- Ossmer, R., Schmidt, W. and Mende, U. (1999). Chromocult Coliform Agar - Influence of Membrane Filter Quality on Performance. XVII Congreso de la SEM. Granada.
- 8.- American Public Health Association, American Water Works Association and Water Pollution Control Federation (1998). 9222B. Standard Total Coliform Membrane Filter Procedure; 9222D. Fecal Coliform Membrane Filter Procedure, en Clesceri, Greenberg and Eaton edit. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. 20th edition, Washington, DC.
- 9.- Farmer III, J.J. (1999). Enterobacteriaceae: introduction and identification, en Murray, Baron, Pfaller, Tenover and Tenover edit. Manual of Clinical Microbiology. 7th edition. p. 442. American Society for Microbiology, Washington, D.C., EUA.
- 10.- Biomerieux (2002). API 20E 07584 D-XI-2002/10
- 11.- Brenner, D.J. and Farmer III, J.J. (2005). Family I. Enterobacteriaceae, en Brenner, Krieg and Staley edit. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Second Edition. Volume Two . The Proteobacteria. Part B, The Gammaproteobacteria. p. 587. Springer, New York, EUA.
- 12.- Fricker, C.R., Bullock, S., Murrin, K. and Niemela, S.I. (2007). Evaluation of the performance of the ISO 9308-1 procedure for the detection of *E. coli* in water utilising two incubation temperatures and two confirmation procedures. (submitted to the Journal of Water and Health)
- 13.- Terradillos, A., Galofré, B., Saucedo, G., Isern, A.M., Ferrer, D. y Ribas, F. (2005). Biodiversidad de enterobacteriáceas en efluentes secundarios de EDAR sometidas a estrés por cloración. XX Congreso de la SEM. Cáceres.
- 14.- Blanch, A.R., Galofré, B., Lucena, F., Terradillos, A., Vilanova, X., and Ribas, F. (2006). Characterisation of coliform bacteria occurrences in different zones of a drinking water distribution system. *Journal of Applied Microbiology* 102: 711-72

APLICACIÓN DE LA MICROBIOLOGÍA PREDICTIVA EN LA INDUSTRIA ALIMENTARIA

Montserrat Vila Brugalla

Facultad de Veterinaria. Universidad Autónoma de Barcelona
m.vila@catar.es

En esta charla se hace una breve introducción teórica a la microbiología predictiva (historia, clasificación de modelos, utilización en el APPCC); en su segunda mitad se muestra su aplicación mediante ejemplos usando el software COMBASE de libre acceso en la red.

INTRODUCCIÓN A LA MICROBIOLOGÍA PREDICTIVA

EL REGLAMENTO (CE) nº 2073/2005

El Reglamento (CE) de la Comisión de 15 de noviembre de 2005, relativo a los criterios microbiológicos aplicables a los productos alimenticios, establece una serie de **criterios** para algunos alimentos y tipos de microorganismos que, de forma complementaria a las normas nacionales, implican un nuevo enfoque, dado que introduce **conceptos dinámicos** relacionados con los controles de producción, la vida útil del alimento, el uso que se va a hacer del mismo, así como el riesgo asociado al microorganismo a controlar.

Artículo nº 5, sobre normas específicas para las pruebas y la toma de muestras:

“Se autorizará el uso de métodos analíticos alternativos cuando los métodos estén validados con respecto al método de referencia establecido en el anexo I y si se utiliza un método registrado, certificado por terceros conforme al protocolo de la norma EN/ISO 16140 u otros protocolos similares internacionalmente aceptados.

Si el explotador de la empresa alimentaria deseara utilizar métodos analíticos distintos a los validados y certificados tal como se ha descrito en el párrafo anterior, los métodos deberán validarse conforme a protocolos internacionalmente aceptados y su uso deberá ser autorizado por la autoridad competente”.

Artículo 3, punto 2, sobre condiciones generales y **Anexo II**:

“Cuando sea necesario, los explotadores de las empresas alimentarias responsables de la fabricación del producto realizarán estudios conforme a lo dispuesto en el anexo II para investigar el cumplimiento de los criterios a lo largo de toda la vida útil. Esto es aplicable especialmente a los alimentos listos para el consumo que puedan permitir el desarrollo de *Listeria monocytogenes* y puedan suponer un riesgo para la salud pública en relación con dicha bacteria”.

“Cuando sea necesario, basándose en los estudios antes mencionados, el explotador de la empresa alimentaria realizará estudios complementarios, entre los que pueden incluirse los siguientes:

- Elaboración de modelos matemáticos de pronóstico establecidos para el alimento de que se trate, utilizando factores críticos de crecimiento o supervivencia aplicables a los microorganismos en cuestión presentes en el producto.
- Pruebas para investigar la capacidad que tiene el microorganismo en cuestión, adecuadamente inoculado, para crecer o sobrevivir en el producto en diferentes condiciones de almacenamiento razonablemente previsibles.

- Estudios para evaluar el crecimiento o supervivencia de los microorganismos en cuestión que puedan estar presentes en el producto durante su vida útil en condiciones razonablemente previsibles de distribución, almacenamiento y utilización”.

DEFINICIÓN

“Every model is wrong. The question is, how much wrong still useful it can be” (Box and Draper)

El término **Microbiología Predictiva** surgió al aplicar una serie de técnicas matemáticas y estadísticas a la Microbiología que permitían predecir la respuesta de una población microbiana a partir de observaciones previas. Whiting (1995) la describe como el **campo de estudio que combina elementos de microbiología, matemáticas y estadística para desarrollar modelos que describan y predigan matemáticamente el crecimiento o muerte de microorganismos, cuando se les somete a condiciones ambientales específicas**.

Hoy en día, la Microbiología Predictiva se engloba dentro de la emergente **Ecología Microbiana Cuantitativa**, que comprende todas aquellas técnicas que permiten cuantificar un proceso microbiológico en un ecosistema. El interés generado en esta área ha conducido a la rápida creación de una subespecialidad en microbiología alimentaria caracterizada por su interdisciplinariedad: microbiólogos, tecnólogos alimentarios, matemáticos, estadísticos o ingenieros colaboran compartiendo ideas, conceptos, técnicas matemáticas y bases de datos para generar y validar más modelos y más efectivos.

En Microbiología Alimentaria, los modelos predictivos constituyen un método rápido, relativamente económico y no invasivo para la determinación objetiva de la calidad de los alimentos. Se adopta generalmente un punto de vista reduccionista y las respuestas de los microorganismos son medidas bajo condiciones controladas. Los resultados se resumen en forma de ecuaciones matemáticas que, por interpolación, pueden predecir respuestas en condiciones nuevas, no testadas anteriormente.

HISTORIA

La posibilidad de predecir el comportamiento microbiano en los alimentos no es nueva, y ya se pueden encontrar referencias al uso de la microbiología predictiva en literatura de los años 1920, cuando Esty y Meyer (1922) establecieron la metodología predictiva para un enlatado seguro de alimentos bajos en acidez con respecto al *C. botulinum*. La industria conservera adoptó el concepto de las 12 reducciones decimales propuesto por ellos (12D). En sus trabajos presentaron numerosas combinaciones de tiempo y temperatura capaces de causar 12 D en *C. botulinum*. Estos valores D eran predecidos a partir de modelos matemáticos. En los años 1930, Scott (1937) escribió sobre el efecto de la temperatura sobre el crecimiento de microorganismos en musculatura de buey. En la introducción de su artículo demuestra entender perfectamente el uso potencial del conocimiento de la cinética del crecimiento microbiano para predecir la vida útil y la seguridad de los alimentos. Tras esos primeros años, el uso de modelos matemáticos en microbiología alimentaria se ha extendido, hallándose bien establecidos en procesos productivos de fermentación de alimentos y conservación mediante tratamientos térmicos.

Durante los años 1960 y 1970, se desarrollaron dos líneas de investigación distintas en microbiología predictiva:

- El control de la alteración del pescado, (Spencer and Baines, 1964).
- La prevención del botulismo y otras intoxicaciones microbianas. El grupo de Genigeorgis en la

Universidad de California buscó en el trabajo de otros investigadores combinaciones de factores que podrían prevenir el crecimiento de patógenos y la formación de toxinas. Modelizaron la reducción decimal del recuento microbiano como consecuencia de factores intrínsecos y extrínsecos de la comida, como la temperatura, el pH, la concentración de NaCl, etc. La reducción decimal fue entonces relacionada con la probabilidad de crecimiento bacteriano o de producción de toxina. Estos estudios desarrollaron los llamados **modelos probabilísticos**, basados en un cálculo de probabilidades: de iniciación de crecimiento de un microorganismo o de producción de una toxina a partir de una célula. (Genigeorgis 1993).

Pero no fue hasta los años 1980 cuando surgió un nuevo interés en la microbiología predictiva, debido a tres causas principales (Buchanan, 1993):

- La disponibilidad de ordenadores cada vez más potentes.
- El incremento de la demanda por parte de los consumidores de alimentos más frescos, menos procesados. Esto ha resultado en la aplicación de sistemas de preservación multi-barrera en los que la combinación de varios factores, más que la acción individual de cada uno de ellos controla la alteración del alimento. En estos casos, los modelos matemáticos ayudan a tratar cuantitativamente la interacción entre múltiples factores.
- La imposibilidad, tanto científica como económica, de tener la información microbiológica cuantitativa de todos los alimentos presentes en el mercado necesaria para la toma de decisiones sobre la seguridad de los productos alimentarios. Esta limitación está siendo compensada por la identificación de un número limitado de factores clave responsables en gran parte del comportamiento de los microorganismos en la comida. A través de la cuantificación sistemática y la comprensión del impacto de estos factores en sistemas modelo y productos prototipo, es posible generar modelos efectivos que

estimen el comportamiento microbiano en un rango amplio de productos.

En este contexto, uno de los factores clave que ha contribuido al rápido progreso de la microbiología predictiva en los últimos años ha sido la identificación de modelos que describen las curvas del crecimiento bacteriano. Se trata de los llamados **modelos cinéticos** que, bajo condiciones ambientales determinadas, describen curvas sigmoideas mediante parámetros con significado biológico como la duración de la fase de latencia (t_0), la velocidad máxima de crecimiento (μ_{max}) o la densidad máxima de población (N_{max}), entre otros. El recuento de microorganismos puede llegar a presentar una fase de decrecimiento o declivio, que normalmente no es considerada por estos modelos.

Pero los modelos deben de ser usados con cautela. En su fase de desarrollo es necesario ser especialmente cuidadoso con las etapas de validación, y realizar un muestreo control de forma paralela (Campden & Chorleywood Food Research Association, 1997). Los que son escépticos con la microbiología predictiva tienen argumentos en la variabilidad que presenta el crecimiento microbiano, causada tanto por factores intrínsecos como extrínsecos. Conviene tener en cuenta que los experimentos basados en condiciones laborales pueden no reflejar el comportamiento de los microorganismos en los alimentos. La flora microbiana de un alimento es un sistema complejo: las interacciones microbianas pueden cambiar con variaciones de temperatura y las condiciones fisiológicas previas del microorganismo pueden afectar su comportamiento en el nuevo ambiente. Esto plantea un dilema en los que quieren aplicar la microbiología predictiva al crecimiento microbiano en los alimentos: o se trabaja con modelos complejos, que tienen en cuenta las propiedades conocidas del sistema, o se hacen ciertas simplificaciones justificables biológicamente, modelizando medidas relativamente simples en función de pocas variables ambientales. Esta segunda

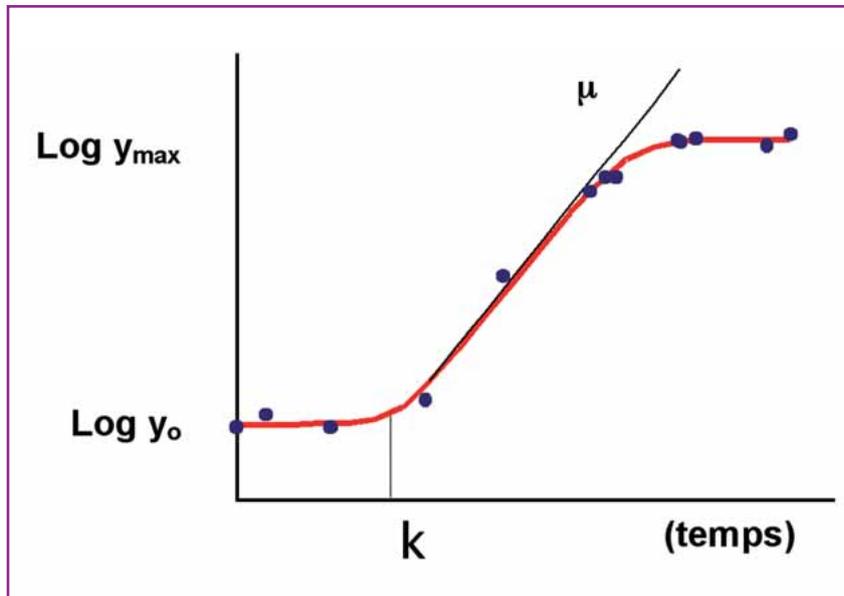


Figura 1.- Parámetros clásicos del crecimiento bacteriano (Baranyi y Pin, 2001)

aproximación ha conducido a estimaciones útiles de la respuesta de los microorganismos en un amplio margen de alimentos y circunstancias relativas tanto a la microbiología como en la industria alimentaria (Baranyi i Roberts, 1995).

CLASIFICACIÓN DE MODELOS

Diferentes esquemas han sido propuestos para categorizar los modelos predictivos. A continuación se describen cuatro de ellas, que no son excluyentes entre sí.

Según el **suceso microbiológico** que describen, encontramos:

- Modelos de crecimiento: Modelan el crecimiento de la población microbiana.
- Modelos de inactivación: Modelan la destrucción microbiana o la inactivación de sus toxinas.

En función de la **aproximación matemática** usada, se dividen en:

- Modelos probabilísticos: La variable en estudio es la probabilidad de inicio de crecimiento de una célula, o la probabilidad de producción de una toxina.
- Modelos cinéticos: Las variables son una serie de parámetros de la cinética microbiana y sus transformaciones.

La **metodología** usada en su creación los divide en:

- Modelos empíricos: Derivan de una perspectiva esencialmente

pragmática. Simplemente describen los datos mediante una expresión matemática adecuada; por eso, a menudo dan poca o ninguna información del proceso subyacente.

- Modelos mecanicistas: También llamados deterministas, se construyen desde una base teórica y, si son correctamente formulados, pueden permitir la interpretación de la respuesta modelada en términos de fenómenos y procesos conocidos.

El **número y tipos de variables** que incluyen, los diferencian en:

- Modelos primarios: Describen los cambios en el recuento microbiano o en otras respuestas microbianas en el tiempo. El modelo puede cuantificar las unidades formadoras de colonias por ml, la formación de toxina, o los niveles de substrato (que son medidas directas de la respuesta), o absorbancia o impedancia (que son medidas indirectas de la respuesta). Una ecuación o función matemática describe el cambio en la respuesta en el tiempo dadas unas condiciones ambientales determinadas. Son ejemplos de modelos primarios la curva de crecimiento exponencial, la función de Gompertz, y la inactivación térmica de primer orden.
- Modelos secundarios: Describen el impacto de las variables ambienta-

les como la temperatura, el pH o la a_w en las características de crecimiento o supervivencia del microorganismo. Ejemplos de modelos secundarios son la relación de Arrhenius o el modelo de la raíz cuadrada.

- Modelos terciarios: Son resultado de la incorporación de modelos primarios, secundarios o una combinación de ambos en aplicaciones informáticas y sistemas expertos. Estos programas pueden calcular la respuesta microbiana a condiciones ambientales que fluctúan, comparar el efecto de diferentes condiciones o contrastar el comportamiento de varios microorganismos. Un ejemplo de modelo terciario es el llamado Pathogen Modelling Program, creado por USDA.

MICROBIOLOGÍA PREDICTIVA Y APPCC

Muchos microbiólogos y responsables del control de calidad en las industrias alimentarias intuyen que los modelos predictivos publicados tienen un gran potencial de uso, pero desconocen cómo aplicar un modelo particular a sus procesos y productos. La generación de modelos predictivos con programas informáticos accesibles (user-friendly) potenciará en el futuro su aplicación.

En el diseño e implantación de sistemas APPCC, los modelos de Microbiología Predictiva constituyen una buena herramienta para:

- La toma de decisiones respecto a la valoración del riesgo asociado a cada peligro detectado.
- La toma de decisiones respecto a la determinación de PCC, aportando información para responder a cuestiones que aparecen en el árbol de decisión respecto a probabilidad de ocurrencia de un peligro, o el nivel aceptable /inaceptable de un peligro.
- El establecimiento de límites críticos. Decidir respecto al destino de un producto que se ha desviado de un límite crítico.
- Valorar la seguridad de un producto tras un cambio en la formulación o procesado sin necesidad de realizar análisis laboratoriales.

Los modelos predictivos proporcionan ayuda a los equipos APPCC en la toma de decisiones sobre la seguridad durante la producción de alimentos. En algunos casos pueden ser inexactos a causa de la falta de conocimiento de las propiedades físicas, químicas o microbiológicas del alimento, de forma que habrá que realizar igualmente pruebas de laboratorio para validar los PCC. Aun así, **aportan información objetiva que permite realizar un análisis de peligros completo, no limitado únicamente a valoraciones cualitativas basadas en juicios subjetivos o en la experiencia personal de los microbiólogos integrantes del equipo APPCC.**

APLICACIÓN DE LA MICROBIOLOGÍA PREDICTIVA: COMBASE

COMBASE (<http://www.combase.cc/>) es una iniciativa fruto de la colaboración entre la Food Standards Agency y el Institute of Food Research en el Reino Unido; el USDA Agricultural Research Service y su Eastern Regional Research Center de los Estados Unidos; y el Australian Food Safety Centre of Excellence. Su propósito es elaborar herramientas predictivas sobre las respuestas de los microorganismos en los alimentos, de libre uso en software disponible en la web. La base de datos ComBase (accesible via el *ComBase*

Browser) consiste en miles de curvas de crecimiento e inactivación que han sido reunidas a partir de instituciones de investigación y publicaciones. Son la base para los numerosos modelos microbianos presentados en el *ComBase Predictor*, una herramienta muy útil tanto para la industria (en el desarrollo de nuevas tecnologías manteniendo la seguridad de los alimentos) y administración (estableciendo nuevos límites microbiológicos), como a nivel académico (tanto en docencia como en investigación).

Bibliografía

- 1.- Baranyi, J. Roberts, T.A., McClure, P.J. (1993): A non-autonomous differential equation to model bacterial growth. *Food Microbiology*, 10, 43-59.
- 2.- Baranyi, J. Roberts, T.A. (1994): A dynamic approach to predicting bacterial growth in food. *International Journal of Food Microbiology*, 23, 277-294.
- 3.- Baranyi, J. Roberts, T.A. (1995): Mathematics of predictive food microbiology. *International Journal of Food Microbiology*, 26, 199-218.
- 4.- Baranyi, J., Pin, C. (2001): Primer curso teórico-práctico en Microbiología Predictiva de Alimentos. Facultad de Veterinaria, Universidad Complutense de Madrid.
- 5.- Buchanan, R.L. (1993): Predictive food microbiology. *Trends in Food Science and Technology* Vol 4: 6-11.
- 6.- Buchanan, R.L., Whitting, R.C. (1996): Risk assessment and predictive microbiology. *Journal of Food Protection*, 1996 supplement, 31-36.
- 7.- Buchanan, R.L., Whiting, R.C., Damert, W.C. (1997): When is simple good enough: a comparison of the Gompertz, Baranyi, and three-phase linear models for fitting bacterial growth curves. *Food Microbiology*, 14: 313-326.
- 8.- Campden & Chorleywood Food Research Association (1997): Evaluation of Shelf Life for Chilled Foods. Technical Manual nº 28.
- 9.- Garthright, W.E. (1991): Refinements in the prediction of microbial growth curves. *Food Microbiology*, 8, 239-248.
- 10.- Genigeorgis, C. (1993): Avances en microbiología de los alimentos: significado para los problemas de salud alimentaria de la microbiología predictiva. Simposium conmemorativo del Bicentenario de la Facultad de Veterinaria, Universidad Complutense, Madrid.
- 11.- Elliot, P. (1996): Predictive microbiology and HACCP. *Journal of Food Protection*, 1996 supplement, 48-53.
- 12.- Man C.M.D. et al (1994). Shelf life valuation of foods. Chapman & Hall.
- 13.- McMeekin, T.A. et al (1993): Predictive microbiology: Theory and Application. Research Estudios Press, LTD.
- 14.- Ratkowsky, D.A., Olley, J., McMeekin, T.A., and Ball, A. (1982): Relationship between temperature and growth rate of bacterial cultures. *Journal of Bacteriology*, 149, 1-5.
- 15.- Ross, T. i McMeekin, T.A. (1994): Predictive Microbiology. Review paper. *International Journal of Food Microbiology*, 23: 241-264.
- 16.- Zwietering, M.H., Jongenburger, I., Rombouts, F.M., van't Riet, K. (1990): Modelling of the bacterial growth curve. *Applied and Environmental Microbiology*, 56, 1875-1881.

DETECCIÓN DE VIRUS EN ALIMENTOS: PERSPECTIVAS Y LIMITACIONES

Rosa M. Pintó

Grup Virus Entèrics, Departament Microbiologia, Universitat de Barcelona
Av. Diagonal, 645; 08028 Barcelona
E-mail: rpinto@ub.edu
Tel: (+34) 934034621. Fax: (+34) 934034629

INTRODUCCIÓN

Antes que nada es necesario precisar la amplitud del término virus en el marco de la detección de virus en ali-

mentos. ¿A qué virus nos referimos? Pues a aquellos virus que se transmiten por ingestión y que, por lo tanto, se pueden adquirir mediante el consumo de alimentos contaminados. A este tipo de virus se les denomina técnicamente

virus de transmisión fecal-oral, es decir virus que se adquieren por ingestión y se excretan en las heces, o virus entéricos, es decir virus que replican en el aparato digestivo. Existe más de un centenar de virus distintos que pueden

Virus	Año	Alimento	Casos	País	Origen Alimento
NoV	1988	Frambuesas	108	Finlandia	Unknown
	1993	Ostras	190	US	Louisiana (US)
	1996	Ostras	75	US	Louisiana (US)
		Ostras	153	US	Louisiana (US)
HAV	1997	Frambuesas	200	Canada	Unknown
	1979	Mejillones	41	UK	Ireland
	1988	Almejas	300,000	China	China
		Lechugas	202	US	Kentucky (US)
	1997	Fresas	153	US	México / US Processing
	1998	Cebollas tiernas	43	US	México / California (US)
	1999	Almejas	184	Spain	Perú
	2002	Arándanos	39	New Zealand	New Zealand
	2003	Cebollas tiernas	600	US	México
	2005	Ostras	39	US	Mississippi (US)

Tabla 1. Ejemplos de brotes alimentarios asociados a NoV y HAV.

encontrarse como contaminantes alimentarios, como pueden ser Enterovirus, Aichivirus, Hepatovirus, Hepevirus, Norovirus, Sapovirus, Rotavirus, Astrovirus y Adenovirus, entre otros. Sin embargo, la gran mayoría de brotes de gastroenteritis y hepatitis víricas de transmisión alimentaria se han asociado a Norovirus (NoV) y Hepatovirus, comúnmente llamado virus de la hepatitis A (HAV) (Tabla 1), con lo cual se han convertido en las principales dianas de la virología de alimentos.

Las infecciones por NoV son muy comunes (Lopman et al 2003; Mead et al 1999) y van a más debido a la constante emergencia de nuevas cepas asociada a la replicación en dinámica de quasiespecies de los virus RNA. La situación con el HAV es bastante distinta puesto que a pesar de replicar en quasiespecies (Sánchez et al 2003a) posee fuertes restricciones estructurales en su cápside (Sánchez et al 2003b) que impiden la emergencia de nuevos serotipos (Aragonès et al 2008), con lo cual la vacuna existente es de amplia protección. Sin embargo, dicha vacuna es muy cara y de uso restringido en países del Tercer Mundo donde, por otra parte, es muy necesaria debido a la deficiente situación higiénico-sanitaria. Además, no hay que olvidar que mientras una gastroenteritis por Norovirus cursa durante 48-72 horas, una hepatitis A cursa durante un mínimo de 3-4 semanas.

En la actual situación de comercio global, las infecciones víricas entéricas transmitidas por alimentos están

cobrando mucha importancia (Tabla 1), lo cual hace necesario establecer un cierto control sobre la calidad vírica de los alimentos. Entre los alimentos más susceptibles de estar contaminados en origen y responsables de grandes brotes cabe destacar, en primer lugar, el marisco por su capacidad filtradora y concentradora de los potenciales virus que pueda haber en el entorno marino y, por otro, las verduras y frutos tipo baya regados con aguas contaminadas. Sin embargo, el control de la calidad vírica de este tipo de alimentos se hace muy difícil debido a tres motivos: primero, las dificultades técnicas de la detección de virus; segundo, el gran volumen de producto que puede llegar a la unidad de toneladas; y tercero, el bajo precio de muchos de estos productos que no permite la gravación económica del valor añadido de la seguridad viral. Llegados a este punto veamos cómo manejar la situación.

TÉCNICAS DE DETECCIÓN DE VIRUS EN ALIMENTOS

En el diagnóstico clínico de virus son muy comunes las pruebas serológicas de detección de anticuerpos específicos contra los virus a identificar. Sin embargo las pruebas serológicas no tienen sentido en la detección de virus en alimentos puesto que, en este caso, es el antígeno el objeto de interés. Alternativamente, se pueden también usar técnicas de detección de virus que se basan en el aislamiento del virus en cultivo celular o su detección por técni-

cas inmunológicas. Sin embargo, estas técnicas son difícilmente aplicables al mundo alimentario, por un lado, porque los virus diana (HAV y NoV) no replican de forma rutinaria en cultivo celular y, por otro, porque las técnicas inmunológicas no ofrecen la sensibilidad necesaria para detectar las bajas cargas víricas de los alimentos contaminados. En cuanto a la replicación en cultivo celular solo cabe destacar que, muy recientemente, se han hecho avances en cuanto a la posibilidad de replicar cepas salvajes del HAV (Konduru & Kaplan 2006) y de NoV (Straub et al 2007) en sistemas celulares, pero que todavía es muy prematuro afirmar que los sistemas de cultivo propuestos sean aplicables a la detección rutinaria de dichos virus.

Todo ello deriva en la necesidad de recurrir a sistemas moleculares de detección y amplificación de ácidos nucleicos víricos y, concretamente en el caso del HAV y NoV, que como se ha dicho son virus de genoma RNA, a la técnica de la RT-PCR.

TÉCNICAS MOLECULARES PARA LA DETECCIÓN DE VIRUS EN ALIMENTOS: PERSPECTIVAS Y LIMITACIONES

Aunque se han descrito otras alternativas como el NASBA (nucleic acid sequence-based amplification) (Jean et al 2001; Jean et al 2004) para la detección de virus RNA, la RT-PCR

(Retrotranscription-Polymerase Chain Reaction) sigue siendo la técnica más utilizada. Una modificación de ésta, la RT-PCR a tiempo real (Real Time RT-PCR), hace uso de la adición de marcadores fluorescentes y permite no solo la amplificación y detección sino, además, la cuantificación del número de copias genómicas. La ventaja de la cuantificación hace de esta nueva técnica una herramienta de gran valor para determinar la seguridad vírica de los alimentos. Aunque existen diversas químicas para la incorporación de la fluorescencia la más usada por su reproducibilidad es la tecnología TaqMan que hace uso de una sonda marcada.

Para el desarrollo de una RT-PCR a tiempo real es muy importante: 1) establecer un buen diseño de primers y sonda para obtener resultados fiables, robustos y de amplio espectro; 2) optimizar las condiciones del programa de amplificación para tener la máxima sensibilidad; y 3) determinar la molécula más adecuada para la construcción de las curvas estándar de cuantificación para asegurar una titulación correcta (Pintó & Bosch 2008).

El primer aspecto, el diseño de primers y sonda es de vital importancia, sobre todo en el mundo de los virus RNA, para garantizar la detección de todas las posibles variantes víricas por un lado y la robustez de la cuantificación de todas estas variantes. Para ello, hay que llevar a cabo análisis de alineamiento de secuencias con todos los genomas existentes para un determinado virus, a fin de poder determinar las mejores regiones en cuanto a nivel de conservación de nucleótidos. Estas regiones altamente conservadas suelen coincidir con regiones altamente estructuradas del RNA, es decir aquellas regiones del RNA donde la propia estructura secundaria tiene un papel funcional dando señales para la interacción con proteínas víricas y celulares involucradas en la replicación y expresión genómica. Concretamente, en el caso del HAV, al tratarse de un picornavirus, posee un extremo 5' no codificante (5'NCR) en su RNA que se halla altamente estructurado y que contiene el sitio de entrada del ribosoma (Internal Ribosome Entry Site IRES). Esta región imprescindible para llevar a

cabo la traducción cap-no dependiente es una excelente candidata para el diseño de primers y sonda. En el caso de NoV, existe una región de solapamiento entre el ORF1 y ORF2 que también posee estructuras secundarias destinadas en este caso a señalar dónde el ribosoma debe llevar a cabo un cambio de pauta de lectura mediante la vuelta atrás de dos nucleótidos.

El segundo aspecto hace referencia a la optimización de los pasos críticos de las reacciones moleculares de la RT-PCR a tiempo real, como adecuar temperatura y tiempo de la RT, temperatura y tiempo de la desnaturalización, temperatura y tiempo de la hibridación de primers y sonda y temperatura y tiempo de la extensión.

Finalmente, es imprescindible determinar cuál es la mejor molécula para ser usada como patrón en la curva estándar de cuantificación. Existen tres posibilidades: el propio genoma vírico, un ssRNA idéntico a la diana a detectar y un dsDNA idéntico al amplímero. La primera alternativa no es, en la práctica, adecuada puesto que exige trabajar con grandes cantidades de virus patógenos. Entre la segunda y la tercera, los datos empíricos demuestran que mejor la segunda, probablemente por problemas de sobreestimación de la concentración de ssRNA después de llevar a cabo una transcripción *in vitro*.

Hechas estas consideraciones, estamos ya a punto de cuantificar los virus diana en alimentos. Sin embargo, cuando los títulos de genomas víricos/g obtenidos por estas técnicas moleculares de cuantificación se relacionan con los datos reales de niveles de ataque asociados al consumo de estos alimentos, todas las previsiones de riesgo de infección fallan. Concretamente, en un brote de hepatitis A asociado al consumo de marisco contaminado (Sánchez et al 2002) se determinaron dosis de 0.0025 virus infecciosos/g, después del proceso de cocción al que se sometió el marisco (100 copias genómicas/g antes del procesado), asociadas a niveles de ataque reales del 50%. Es decir suponiendo un consumo de 60 g de marisco, que contendrían tan solo 0.15 virus infecciosos, la probabilidad de infección sería del 50%. Es evidente que debe de haber algún eslabón perdido.

ESTANDARIZACIÓN DE LOS PROTOCOLOS DE DETECCIÓN DE VIRUS EN ALIMENTOS

El eslabón perdido corresponde a la falta de medidas correctoras de aquellos pasos críticos del proceso. Ello se puede resolver mediante la adopción de medidas de control de calidad. Los puntos más críticos de todo el proceso de determinación del título de genomas víricos en un alimento son la extracción de virus y ácidos nucleicos y la reacción de RT-PCR, principalmente el paso de RT. Con el fin de controlar ambos pasos, lo más idóneo es añadir concentraciones conocidas de virus y ssRNAs previamente a la ejecución de los citados procesos. Lo más difícil es escoger correctamente estos controles a añadir.

En cuanto al control de la extracción, lo más idóneo es utilizar un virus animal, un bacteriófago o un armored RNA. Sin embargo, tanto los bacteriófagos como los armored RNA, que son cápsides del fago MS2 con un RNA diana en su interior, presentan el problema de poseer una cápside que, a pesar de tener una estructura parecida a la de los virus entéricos, químicamente es muy distinta y por lo tanto no modelizarían correctamente el comportamiento de éstos. Por lo tanto, lo más aconsejable es usar virus estructural y químicamente similares como el picornavirus Mengo (Costafreda et al 2006) o los calcivirus murino y felino (Cannon et al 2006). Cualquiera de estos virus se puede cuantificar y añadir a concentraciones conocidas a la muestra, a fin de determinar la eficiencia de los procesos de extracción de virus y ácidos nucleicos.

En cuanto a los controles de las reacciones de RT-PCR, lo ideal es disponer de moléculas de ssRNA amplificables con los mismos primers y de longitud similar. Lo más práctico es modificar los amplímeros mediante la introducción de nuevas dianas de restricción, su clonaje en un vector de transcripción y la obtención de los correspondientes transcritos (ssRNA). Estas moléculas se cuantificarán y se añadirán a concentraciones conocidas para determinar la eficiencia de la RT-PCR.

Evidentemente, no hay que olvidar que, además, el control de calidad exige siempre incorporar controles negativos de extracción, RT y PCR.

Aplicando este tipo de controles, la cuantificación es mucho más aproximada a la realidad y adoptando estas correcciones se obtienen valores de estimación del riesgo de infección tras el consumo de alimentos contaminados mucho más acordes con el nivel de ataque real. En el ejemplo expuesto anteriormente, los títulos corregidos del HAV en el marisco, una vez cocinado, serían de 2.5 virus infecciosos/g, y esta dosis presenta unos niveles de riesgo estimados del 41% mucho más cercanos a los reales que fueron del 50%.

RETOS ACTUALES EN LA DETECCIÓN DE VIRUS EN ALIMENTOS

De todo lo dicho hay que concluir que, en la actualidad, se dispone de las herramientas para el control de la presencia/cuantificación de virus en alimentos. Sin embargo, todavía hay toda una serie de cuestiones que resolver: 1) Científicamente sigue estando por determinar el significado de una copia genómica, desde la perspectiva de la infectividad. 2) Desde una perspectiva de salud pública hay que decidir si se amplían los virus diana. 3) Estadísticamente sigue sin resolverse el tema del muestreo significativo, así como todos los temas de incertidumbre de la cuantificación. 4) Legalmente se

requiere establecer normas. 5) Económicamente hay que decidir cuando se analizan los alimentos, siempre o cuando existen indicios de contaminación, análisis prospectivo o retrospectivo. 6) Y, finalmente, hay que decidir quién lleva a cabo estos análisis los productores, los distribuidores o la administración.

Responder estas cuestiones es de vital importancia para la futura implementación del control de virus en alimentos y, evidentemente, requiere de más de una reflexión por parte de científicos, gestores e industriales.

Bibliografía

- 1.- Aragones, LL., A. Bosch, and R.M. Pintó. 2008. Hepatitis A virus mutant spectra under the selective pressure of monoclonal antibodies: codon usage constraints limit capsid variability (en Prensa).
- 2.- Cannon, J. L., E. Papafragkou, G. W. Park, J. Osborne, L. A. Jaykus, and J. Vinje. 2006. Surrogates for the study of norovirus stability and inactivation in the environment: A comparison of murine norovirus and feline calicivirus. *J. Food Prot.* 69:2761–2765.
- 3.- Costafreda, M. I., A. Bosch, and R. M. Pinto. 2006. Development, evaluation, and standardization of a real-time TaqMan reverse transcription-PCR assay for quantification of hepatitis A virus in clinical and shellfish samples. *Appl. Environ. Microbiol.* 72:3846–3855.
- 4.- Jean, J, Blais, B, Darveau, A, and, Fliss, and I. 2001. Detection of hepatitis A virus by the nucleic acid sequence-based amplification technique and comparison with reverse transcription-PCR. *Appl. Environ. Microb.* 67:5593–5600.

- 5.- Jean, J., D. H. D'Souza, and L. A. Jaykus. 2004. Multiplex nucleic acid sequence-based amplification for simultaneous detection of several enteric viruses in model ready-to-eat foods. *Appl. Environ. Microbiol.* 70:6603–6610.
- 6.- Konduru, K., and G. Kaplan. 2006. Stable growth of wild-type hepatitis A virus in cell culture. *J. Virol.* 80:1352–1360.
- 7.- Lopman, B. A., M. H. Reacher, Y. van Duynhoven, F. X. Hanon, D. Brown, and M. Koopmans. 2003. Viral gastroenteritis outbreaks in Europe, 1995–2000. *Emerg. Infect. Dis.* 9:90–96.
- 8.- Mead, P. S., L. Slutsker, V. Dietz, L. F. McCaig, J. S. Bresee, C. Shapiro, P. M. Griffin, and R. V. Tauxe. 1999. Food-related illness and death in the United States. *Emerg. Infect. Dis.* 5:607–625.
- 9.- Pintó, R.M., and A. Bosch. 2008. Rethinking virus detection in food. In: *Foodborne Viruses: Progress and Challenges*. Koopmans, M., Bosch, A. and Cliver, D (Eds). ASM Press.
- 10.- Sanchez, G., R. M. Pinto, H. Vanaclocha, and A. Bosch. 2002. Molecular characterization of hepatitis a virus isolates from a transcontinental shellfish-borne outbreak. *J. Clin. Microbiol.* 40:4148–4155.
- 11.- Sánchez, G., A. Bosch, G. Gomez-Mariano, E. Domingo, and R. M. Pintó. 2003. Evidence for quasi-species distributions in the human hepatitis A virus genome. *Virology* 315:34-42.
- 12.- Sánchez, G., A. Bosch, and R. M. Pintó. 2003. Genome variability and capsid structural constraints of hepatitis A virus. *J. Virol.* 77:452-9.
- 13.- Straub, T. M., K. Höner zu Bentrup, P. O. Orosz-Coghlan, A. Dohnalkova, B. K. Mayer, R. A. Bartholomew, C. O. Valdez, C. J. Bruckner, C. P. Gerba, M. Abbaszadegan, and C. A. Nickerson. 2007. In vitro cell culture infectivity assay for human noroviruses. *Emerg. Infect. Dis.* 13:396-403.

IMPACT OF THE DEVELOPMENT OF MICROBIOLOGICAL RAPID METHODS ON FOOD SAFETY IMPLEMENTATION IN THE EUROPEAN UNION

Cécile Lahellec (F)

Honorary Research Director, French Food Safety Agency (AFSSA)
cecile.lahellec@club-internet.fr

During the past decades, due to the emergence of different crisis incriminating Food, the consideration of problems related to Food Safety has taken an

increasing importance all around the world. In order to answer to consumers' fears, a lot of initiatives have been taken; as it appeared necessary to evaluate the risks for

the consumers, Food Safety Agencies have been created at a national then at the European level; the risk's monitoring has led to the setting up of new regulations.

Of course, all measures which are recommended must be implemented; different aspects have to be considered: among them, the impact of rapid methods in Food microbiology. In order to get a comprehensive understanding of that impact, I would like to share with you a few data: at first, they will concern the evolution of the place of Food Safety in Europe, then we shall have a look at the development of rapid methods during the past decades; then we'll try to answer to the question: Which is the impact of the development of rapid methods on Food Safety implementation in the European Union?

EVOLUTION OF THE PLACE OF FOOD SAFETY IN EUROPE DURING THE PAST DECADES

In fact, the concept of Food Quality from the point of view of consumers has somewhat changed according to the periods. In a book published about ten years ago, Pierre Feillet indicated different periods:

- 1945-1955: efforts to improve the shelf life of food products.
- 1965-1985: development of the concept of Food Science.
- 1975-1995: the years of biotechnologies.
- 1990-1995 and later: priority is given to Food Hygiene.

Then, during a long time, the relationship between Food and the consumer's health has been somewhat underestimated; then, around the nineties, it may have been overestimated, due to the BSE crisis, to the increase of the knowledge on listeriosis as being mostly a foodborne disease and, generally speaking, to the development of molecular tools allowing to trace the contaminants (a lot of examples may be taken).

Whichever the reasons, Food Safety has become a very important topic and, in different countries, people in charge of the consumer's health had to reorganize the expertise which, in fact, did exist, but necessitated a reorganization. As an example, in France, different groups of people

were in charge of Food Safety but the coordination between those groups was far to be perfect; the creation of the French Food Safety Agency including the existing groups and organisms in charge of consumers' protection has been considered in a short time as a noticeable progress. An important date has now to be mentioned: on January 12th 2000, David Byrne, nominated to the European Commission in 1999 and serving as a Commissioner with responsibility to Health and Consumer Protection, presented what has been called the "White Paper". It originated from the "Green Paper" published in 1997; its purpose was to reach the highest level of Food Safety in Europe. In order to do so, it was considered as necessary to set up an important program of new regulations taking the "New Approach", from farm to fork into account in order to harmonise the expertise of the European scientific community. As we shall examine later, the impact of those recommendations would be far more important it was possible to imagine at first, especially in the field of rapid methods whose development has been spectacular during the past decades.

DEVELOPMENT OF RAPID METHODS IN FOOD MICROBIOLOGY FROM THE END OF THE SIXTIES TILL NOW

From many decades, in the field of Food Microbiology, industrials and, consequently research laboratories have been seeking for methods which may be used as alternatives of reference methods, in order to detect and/enumerate microorganisms; in fact, reference methods are usually somewhat expensive and many days are necessary to obtain a result; alternative methods should give a quicker result, allow to examine a lot of samples simultaneously, win of the place.

During a long period, that looked like a dream; now, the situation has changed for different reasons.

In fact, along the past years, the question of Food Safety has taken an increased importance in the consumers' mind, in all countries worldwide. Different measures have been taken at different stages from food's production till distribution to the consumers in order to improve Food Safety whose responsibility now belongs to industrials; in that context, implementation of the HACCP method (Hazard Analysis Critical Control Point) is mostly important when it is applied to raw materials and foods examined at different stages "from farm to fork". The results of those controls must be available, accepted by all concerned groups, including, of course, official controls. That means the validation of two steps: sampling as the sample must be representative of the population to be examined; the conditions of sampling must be perfectly defined and be founded on statistic considerations; the nature of samples must be defined and known; then, the method used for the analysis must be the good one and practiced in a competent laboratory; if those two conditions are not respected, the results can't be taken under consideration. The advantages of alternative methods have often been described. The laps of time necessary for implementing the whole method must be significantly less than which is used for traditional methods (including the time for sample preparation and eventually for preenrichment), be cheap.

Their use in epidemiological studies which necessitates the examination of a high number of samples appears necessary if one wants to examine a sufficient number of samples. Presently, as we shall see in a few minutes, the introduction of principles of Risk Analysis seem to have made the use of alternative methods unavoidable.

During a very long period, traditional methods have been the only ones registered in regulations in all countries worldwide; however, different improvements have been observed along the years:

for example, official methods concerning milk and dairy products have

been revised regularly during the annual meetings of National Reference Laboratories organized by the Community Reference Laboratory. In priority, methods standardized by CEN, ISO or IDF have been taken under consideration which, most of them, are considered as reference methods. However, from many years, at a European level, alternative methods have been allowed to be used, subject to a validation (presently according to the recommendations of the standard EN/ISO 16140 which defines the conditions of validation and certification).

- One of the resolutions taken at Parma (It), on April 23rd 2004 during a joined meeting of ISO/TC34/SC9 and CEN/TC275/WG6 has to be mentioned; it indicates that, each time a reference method is being revised, the possibility of using new technologies, including PCR, must be examined by comparing results with those obtained when using the conventional method (based on the use of culture media).
- For a given microorganism, in order to complete the existing method, the development of standardized methods based on new technologies can be proposed when the purpose to be obtained (for example the pathogenicity level makes it necessary).
- When new technologies, including PCR are used as alternative methods, they must be validated against the reference method. Those two examples show an important progress in the acceptance of alternative methods.

Finally, in the EC new regulation, alternative methods are now accepted as we can read in the EC regulation (2073/15 December 2005):

“Test results are dependent on the analytical method used, and therefore a given reference method should be associated with each microbiological criterion. However, food business operators should have the possibility to use analytical methods other than the referen-

ce methods in particular more rapid methods, as long as the use of these alternative methods provide equivalent results.

Moreover, a sampling plan needs to be defined for each criterion in order to ensure harmonized implementation. It is nevertheless necessary to allow the use of other sampling and testing schemes including the use of alternative indicator organisms on condition that these schemes provide equivalent guarantees of food safety”.

The dream becomes a reality.

IMPACT OF THE DEVELOPMENT OF RAPID METHODS ON FOOD SAFETY IMPLEMENTATION IN THE EUROPEAN UNION

As we have said previously, from a long time the necessity of implementing the HACCP method has led a lot of industrials and research laboratories to be conscious of the necessity of rapid methods to be used in Food microbiology; the eldest of us have been able to follow the progress of the first kits presented of the market, many of them concerning Salmonella (I remember some of them “forgot” to include the time of pre-enrichment, and sometimes enrichment in the time necessary to get a result!); later, the request of trying to reach the highest level of Food Safety in Europe has led to a package of new regulations called the “Hygiene Package” including general rules for all types of foods, specific regulations for foods of animal origin; in addition, specific regulations for animal feeds; other regulations have been set up which concern official controls and inspections.

It seems easy to understand that the implementation of regulations represents a huge work in terms of laboratory work.

In order to make the situation more complicated, a lot of problems of harmonization did exist, especially for microbiological criteria; in the new context, as a consequence of those

regulations and in order to evaluate the acceptability of the process as well as the safety of food products, it has been necessary to set up microbiological criteria; the result of that important work was published (Regulation EC n° 20073/2005 of the Commission). It must be mentioned that harmonisation is a very difficult topic to be implemented.

Criteria include the sampling plan, the number of samples to be tested, the microbiological limits and, of course, the microbiological methods. Harmonisation of microbiological methods is prepared by working groups of ISO (TC34 /SC9) and CEN (TC275/WG6). From many years (many decades for ISO), an important work of methods harmonization has been undertaken; recently, EC has given a mandate to CEN and finance collaborative studies to fully validate reference methods. Moreover alternative methods are now allowed to be used, on approval of validation according to the standard EN/ISO 16140.

What to say as a **conclusion**?

Many people do not know the idea of miniaturized and rapid methods have germinated about 40 years ago in the brain of a very young and enthusiastic microbiologist, American Chinese, who is present in the room and will teach you the whole week (I don't know if you can imagine how much you, we are lucky).

So, the idea has been the beginning of a long story: rapid methods have been developed; in the beginnings, they were not always well accepted; there were a lot of obstacles; now, the situation has changed; Food Safety has become a priority; in order to be able to examine samples representative of the populations, the need of rapid methods has become more and more obvious; the improvements in the field of standardization have made the use of rapid methods at a large scale possible and realistic. What was only a concept at the beginnings has become a very important reality and I am sure that, during the week, you will appreciate the efforts realized, enjoy yourselves and go back home with a lot of ideas to develop.

TRANSGÉNICOS, NUTRIGENÉTICA Y NUTRIGENÓMICA EN ALIMENTACIÓN

Daniel Ramón Vidal^{1,2}

¹Instituto de Agroquímica y Tecnología de Alimentos, Consejo Superior de Investigaciones Científicas
²Biópolis S.L.

EL EMPLEO DIRECTO DE LA GENÉTICA EN LA AGROLIMENTACIÓN: MEJORA GENÉTICA DE LOS ALIMENTOS

La comunidad científica entiende por biotecnología el uso de un organismo vivo con un propósito industrial. Biotecnología de alimentos no es más que el uso de seres vivos en la producción de alimentos, lo que incluye toda la alimentación, porque todo cuanto comemos son, o han sido, seres vivos, ya sean animales, vegetales, o alimentos o bebidas fermentadas por un microorganismo. Pero el consumidor, sobre todo el europeo, tiene una percepción distinta de lo que es y entiende que este término hace referencia a la aplicación de la genética en la alimentación. En otras palabras, los consumidores europeos entienden por biotecnología de alimentos “poner genes en su sopa”. Hay que recordar a los consumidores que la genética se ha aplicado en la alimentación desde que comenzó la agricultura y la ganadería. Desde entonces, el hombre ha mejorado empíricamente el genoma de las variedades vegetales comestibles, las razas animales y los fermentos. Esta mejora se ha fundamentado en la aparición de mutantes espontáneos, la variabilidad natural y la aplicación del cruce sexual o hibridación. De esta forma se han obtenido variedades de trigo con espigas incapaces de dispersar sus semillas en la naturaleza, pero capaces de generar unas harinas panaderas con inmejorable aptitud tecnológica, o patatas comestibles al contener niveles mínimos de alcaloides tóxicos. Desde hace treinta años, los científicos aíslan en el laboratorio fragmentos concretos que portan genes determinados. Esos genes se pueden variar en el tubo de ensa-

yo y se pueden reintroducir en el organismo natural o en uno distinto generando un transgénico. Al global de estas técnicas las llamamos ingeniería genética y cuando se aplica en el diseño de un alimento surgen los llamados alimentos transgénicos.

Hoy se comercializan muchos alimentos transgénicos en todo el mundo, sobre todo en Estados Unidos, Australia, Canadá y China. Los más conocidos son la soja resistente al herbicida glifosato y el maíz Bt, aunque existen muchos más. Son de gran importancia los que hacen referencia a la mejora nutricional de los alimentos. Desde algunas organizaciones ecologistas se acusa a los alimentos transgénicos de ser un veneno para la salud y el medioambiente. No es cierto. Desde hace más de quince años, FAO, OCDE y OMS han establecido grupos de trabajo para evaluar la seguridad para el consumidor de los alimentos transgénicos. Se ha llevado a cabo una evaluación de riesgos sanitarios de todos los alimentos transgénicos comercializados atendiendo al contenido nutricional, la posible presencia de alérgenos y el nivel de toxicidad. Son los alimentos más evaluados de la historia de la alimentación y no disponemos de un dato científico que indique que representen un riesgo para la salud del consumidor superior al que implica la ingestión del alimento convencional correspondiente. Este hecho ha sido puesto de manifiesto por la OMS en su página de internet. Es interesante destacar que, tras la publicación de esta decisión, dichos grupos han variado su estrategia y apenas hablan de los riesgos sanitarios de los transgénicos pero sí de los riesgos ambientales. Ahí las cosas son menos claras porque hay una falta de metodologías para analizar este tipo de riesgos que afectan tanto a las plantas transgénicas como a las convencionales. Aun así, debemos afir-

mar con contundencia que existen tres posibles riesgos: la transferencia de los genes exógenos desde la variedad transgénica a variedades silvestres, la pérdida de biodiversidad y los efectos dañinos que ciertas plantas transgénicas resistentes a insectos pueden tener sobre poblaciones de insectos distintos de aquellos contra los que protegen. Todos estos riesgos ya existen con las variedades convencionales. Por ello, la cuestión clave es conocer si el empleo de transgénicos acelerará la aparición de estos riesgos. Parece que no, siempre que se mantengan y mejoren las normas de evaluación que empleamos actualmente con las plantas transgénicas. Finalmente, debemos considerar los riesgos económicos. El 90% de los agricultores que utilizaron semillas transgénicas en el 2006 eran agricultores pobres de países en desarrollo. Una realidad muy lejana del estereotipo que hace de lo transgénico un negocio en manos de pocas compañías multinacionales.

Pero conviene debatir acerca de la opinión del consumidor sobre los transgénicos. En general, y destacando la falta de formación e información en biotecnología de nuestra sociedad, así como la constante presencia de los grupos en contra en los medios de comunicación, los perciben como algo peligroso. Por ello resulta importante la divulgación de los datos reales que desde la Ciencia tenemos de estos productos.

LAS NUEVAS APLICACIONES DE LA GENÉTICA EN LA AGROLIMENTACIÓN: NUTRIGENÉTICA Y NUTRIGENÓMICA

En el año 2003 se hizo pública la secuencia que conforma nuestro

genoma, el genoma humano. Somos poco más de 23.000 genes interactuando con el ambiente. Pero lo que somos no depende de nuestro color de piel, ni de nuestro credo político o religioso; está escrito en ese alfabeto molecular y se traduce en función de nuestro ambiente físico o cultural. Es evidente el impacto de la genómica en nuestra vida cotidiana y ello ha dado lugar a la aparición de dos nuevas disciplinas científicas: la nutrigenética y la nutrigenómica. Por nutrigenética entendemos la disciplina científica que estudia el efecto de las variaciones genéticas entre individuos en la interacción dieta y enfermedad. Por nutrigenómica, aquella que estudia el efecto de los nutrientes de los alimentos sobre la expresión de nuestros genes. Con su empleo empezamos a entender como se va a definir en el futuro una alimentación a la carta en función de lo que podríamos llamar "pasaporte genético". Puede que a muchos les aterre, pero quizás no lo vean tan grave si piensan en la ventaja que para un recién nacido puede suponer que sus padres sean informados sobre una posible mutación en su genoma que le predisponga a desarrollar una enfermedad cardiovascular si su alimentación no es adecuada.

Es claro el enorme potencial que el conocimiento del genoma humano puede tener en las pautas de alimentación, pero no será menor el que tenga la secuenciación de los genomas de otros organismos vivos de interés agroalimentario. Hasta ahora, se han secuenciado totalmente más de quinientos genomas distintos y hay más de setecientos proyectos de secuenciación en marcha. Algunos de ellos se refieren a animales, plantas o microorganismos de relevancia alimentaria, como por ejemplo el arroz, la levadura panadera, la bacteria *Bifidobacterium bifidum* (usada en muchos productos probióticos) o patógenos responsables de toxiinfecciones alimentarias como *Escherichia coli*. El conocimiento de los genes que componen el genoma de estos organismos permite conocer sus genes clave para así definir estrategias de mejora por genética clásica (la llamada mejora asistida por marcadores) o

por ingeniería genética, desarrollar mecanismos de defensa frente a su patogenicidad, o descubrir nuevas funciones fisiológicas con impacto nutricional.

La secuenciación de genomas ha sido hasta ahora una técnica costosa en tiempo y dinero. Hace apenas un año, se describió una nueva técnica de secuenciación basada en el empleo de nanomateriales. Dicha técnica se denomina pirosecuenciación y permite secuenciar genomas de forma masiva en mucho menos tiempo y a un menor costo. Por ejemplo, la tecnología clásica de secuenciación aplicada en un laboratorio convencional tardaba en secuenciar el genoma de una bacteria láctica un tiempo variable entre uno y tres años. Con la tecnología de pirosecuenciación es posible hacerlo en tan solo ocho horas y por un precio en costo de materiales diez veces menor al de la tecnología convencional. Sin duda, la pirosecuenciación va a revolucionar la secuenciación de genomas y también de los llamados metagenomas. Con este último sustantivo se hace referencia a la secuenciación de DNA extraído de un ecosistema, de forma que, a partir de los datos de secuencia, es posible inferir los organismos presentes en dicho nicho ecológico. Su aplicación en alimentación y nutrición es más próxima de lo que muchos imaginan. Por ejemplo, recientemente se han llevado a cabo proyectos de secuenciación masiva en voluntarios humanos, determinándose que más de trece mil cepas bacterianas distintas pueblan nuestro tracto digestivo. También mediante el empleo de metagenómica se han detectado diferencias en la composición de la flora microbiana del tracto digestivo de individuos obesos. Son los primeros resultados de una tecnología potente que permitirá conocer aspectos nuevos de nuestra fisiología y su relación con la alimentación. Podemos concluir, por todo lo expuesto, que el futuro de la genética en la alimentación es importante. La época en que los tecnólogos de alimentos eran expertos en el manejo de las tuberías de las instalaciones industriales ha quedado lejos. La nueva tecnología de alimentos preci-

sa de nuevos profesionales que entiendan la importancia de la biotecnología y la genética y también puedan discutir sobre conocimientos de otros campos del saber como la farmacología, la nutrición, el control automático de sistemas o las nanotecnologías.

Bibliografía

- 1.- Fedoroff N. (2004). Mendel in the kitchen. Joseph Henry Press, Washington.
- 2.- Pafundo S, Agrimonti C, Maestri E, Marmiroli N. (2007). Applicability of SCAR markers to food genomics: olive oil traceability. J. Agric. Food Chem. 55:6052-6059.
- 3.- Turnbaugh PJ, Ley RE, Mahowald MA, Magrini V, Mardis ER, Gordon JI. (2006). An obesity-associated gut microbiome with increased capacity for energy harvest. Nature 444:1027-1031.
- 4.- Withee J, Dearfield KL. (2007). Genomics-based food-borne pathogen testing and diagnostics: possibilities for the U.S. Department of Agriculture's Food Safety and Inspection Service. Environ. Mol. Mutagen. 48:363-368.

PRESENTACIÓN DEL VI WORKSHOP MRAMA

Jesús Prado

Dpto. de Microbiología
3M España, S.A.
www.3M.com/microbiology

Se ha celebrado la VI edición del ya clásico seminario del Dr. Fung en la UAB, todo un hito en nuestro país en lo que se refiere a Microbiología Alimentaria. Se trata de un foro excelente donde se ofrece a todos los asistentes la posibilidad de entrar en contacto con las más recientes técnicas disponibles, valorar las diferentes opciones, realizar prácticas con las mismas y poder tratar aspectos particulares en lo que a análisis microbiológicos de alimentos se refiere. Los cada vez más estrictos requerimientos de la sociedad y del mercado, en relación a la Seguridad Alimentaria, ponen de relieve la vigencia y plena actualidad de los métodos rápidos y de este seminario en particular.

Nada más indicado que la definición de método rápido para incidir en su justificación en el contexto de exigencias de seguridad y competitividad que el mercado y la sociedad demandan, pero ¿cómo se define un método rápido? Son aquellos métodos capaces de aportar eficiencia y consistencia a las prácticas analíticas habituales. Esto conlleva el empleo de métodos validados, fáciles de usar, resultados reproducibles y en menor tiempo, calidad del resultado igual o superior al método convencional y capacidad para la gestión de la documentación y los datos.

Disponer consistentemente de los resultados completos de los análisis microbiológicos en el menor tiempo posible es objetivo crucial de la industria alimentaria. El abanico de técnicas rápidas disponibles permite llegar a este nivel de respuesta en 24 h para la mayoría de los conceptos de indicadores, contaminación y patógenos que requiere la legislación y el mercado. No hay quien pague la confianza y satisfacción generada, tanto propia como de los clientes, por disponer de resultados microbiológicos de manera rápida y consistente y, además, ¿cuán-



to cuesta mantener el inventario mientras no se autorizan los lotes al mercado? ¿Qué beneficio supone aumentar en dos días la vida útil del producto? Siendo el anterior concepto de la rapidez de la máxima importancia, no conviene olvidar otro beneficio trascendental proveniente de los recursos que quedan liberados como consecuencia de la adopción de los métodos rápidos que no es otro que el incremento de la eficiencia y productividad de la función técnica y de calidad en las empresas. Así, se podrán atender demandas crecientes de mayor número de análisis, implicación en programas de mejora, asistencia a la gestión del APPCC e implantación interna del autocontrol, auténtica garantía de calidad, consistencia y competitividad.

¿Resultan más caros los métodos rápidos? Justamente todo lo contrario, ahorran tiempo e inventario. Más aún,

los valiosos recursos liberados se emplean para aumentar la competitividad de las empresas.

“El ahorro de tiempo que suponen los métodos rápidos, no supone reducción de plantilla, antes al contrario, los recursos liberados incrementan los niveles de calidad, conocimiento del proceso, cualificación del personal y compromiso de la organización técnica con los objetivos de la empresa”, aseguró el Dr. Fung.

SISTEMA BAX® Q7 DE DU PONT QUALICON

Itziar Olea

Product Manager. Departamento de Marketing. Thermo Fisher Scientific



Para *Salmonella*, *Listeria monocytogenes*, Reverse transcriptasa *Listeria* genus 8 horas, *Escherichia coli* O157:H7 MP, *Enterobacter sakazakii*, *Campylobacter coli* / *jejuni/lari*, Levaduras y Hongos, *Staphylococcus aureus*.

DESCRIPCIÓN

El sistema de detección BAX es un método PCR rápido y exacto de detección de patógenos y otros microorganismos en alimentos y muestras medioambientales.

El proceso del Sistema BAX consta de la preparación de muestras enriquecidas, seguida de amplificación y detección automatizadas. Estas etapas usan técnicas de biología molecular simplificadas y no requieren destrezas especializadas adicionales. Las muestras se enriquecen mediante protocolos estándar para el tipo de alimento. Posteriormente, alicuotas de los medios de enriquecimiento se calientan en una solución de proteasa para lisar las bacterias, que liberan el ADN. El procedimiento no requiere ningún paso de centrifugación, minimizando así la manipulación de las muestras.

Seguidamente, se monta la reacción de PCR. Este paso del protocolo de

trabajo no requiere la preparación del cóctel de reacción, ya que cada tubo de reacción PCR contiene un comprimido, que incluye todos los reactivos necesarios, incluyendo el control interno para la amplificación. Las pastillas se hidratan con la muestra de ADN y se procesan en el cicladador/detector. En unas pocas horas, la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) amplifica el fragmento de ADN que es específico de la diana.

Con un único programa para la mayoría de las bacterias, el Sistema BAX permite analizar múltiples dianas en una única operación, hasta 96 muestras por lote. Las indicaciones que aparecen en pantalla, de fácil comprensión, guían al usuario a través de todo el proceso, reduciendo la necesidad de técnicos muy especializados y de una formación costosa.

El Sistema BAX Q7 permite realizar análisis en tiempo real y a la conclusión. Ofrece análisis en tiempo real para la detección, diferenciación y cuantificación de especies de *Campylobacter* (*C. jejuni*, *C. coli* y *C. lari*.) en la misma muestra; la detección y la cuantificación umbral de *Staphylococcus aureus*; y resultados claros a la conclusión de otros impor-



tantes patógenos que se transmiten por los alimentos.

El sistema Bax ha lanzado un nuevo ensayo que usa la PCR para amplificar RNA ribosómico por transcripción reversa. Este nuevo ensayo permite detectar de forma rápida y precisa *Listeria* spp en 8 horas. El gran número de fragmentos de ARN presentes al inicio de la reacción de PCR implica una espectacular mejora de la sensibilidad frente a otros métodos de detección.

El Sistema BAX es el método adoptado por los laboratorios USDA-FSIS para el análisis de *Salmonella*, *Listeria monocytogenes* y *E.coli* O157:H7. Asimismo, ha obtenido la validación o certificación AFNOR, AOAC y de otros organismos internacionales para analizar una amplia variedad de productos alimentarios, entre otros, productos lácteos, cárnicos, mariscos, chocolate, fruta y zumos de fruta, hortalizas, ensaladas y piensos para animales¹. Oxoid Ltd distribuye el Sistema BAX para toda Europa, Australia, Nueva Zelanda y Canadá.

¹ Todos los particulares sobre las validaciones, autorizaciones y certificaciones pueden obtenerse de Oxoid.

©2001 - 2007 Oxoid Limited, Todos los derechos reservados.

MICROBIOLOGÍA A LA VELOCIDAD DE LA LUZ

Natàlia Reig

Especialista de producto, Vitaltech Ibérica S.L.

EL CONTROL MICROBIOLÓGICO EN LA INDUSTRIA AGROALIMENTARIA

Una de las mayores preocupaciones en la industria agroalimentaria es el control microbiológico de sus productos. La legislación actual recopila una serie de normas microbiológicas a seguir, que indican los microorganismos a analizar dependiendo de los alimentos que se produzcan o procesen. La mayor parte de estos análisis microbiológicos en la industria alimentaria, un 80 - 85%, se realizan para controlar los microorganismos de desecho e indicadores y solo el 15 - 20% se realizan para analizar patógenos. El número de ensayos microbiológicos crece año tras año y diversos factores hacen que los industriales dejen de mirar hacia la microbiología clásica y busquen métodos rápidos y automatizados que les permitan lanzar los productos al mercado con mayor rapidez y seguridad. Los métodos tradicionales requieren demasiado tiempo para muchos fabricantes, ya que requieren la preparación de las muestras, una incubación larga y el contaje y la subsiguiente interpretación de los resultados. Además debemos tener en cuenta que los resultados siempre están sujetos a la subjetividad humana y que nos interesa reducir al máximo al riesgo de error de la informatización de los resultados. Con las nuevas técnicas y equipos

automatizados se solucionan la mayor parte de estos inconvenientes, pero las necesidades de este tipo de industria son muy amplias y en la mayor parte de los casos no se limitan a un simple control de algún microorganismo en una matriz en concreto. El control microbiológico va mucho más allá dependiendo del cliente en concreto y su problemática específica.

NECESIDADES ESPECÍFICAS

Aunque la legislación actual no obliga a testar los microorganismos de desecho, la industria alimentaria dedica muchos esfuerzos al análisis de éstos, ya que representan una medida de calidad del producto. Este grupo de control es muy amplio. Incluye determinaciones generalizadas a la mayoría de las empresas del sector, como el análisis de aerobios mesófilos, enterobacterias, coliformes, o mohos y levaduras. Pero también incluye determinaciones tan específicas como la determinación de bacterias del ácido láctico, que causa problemas en aliños; alicyclobacillus, que produce un sabor metálico a los zumos de frutas o las levaduras osmofílicas que, en productos con elevadas concentraciones de azúcares, producen gases. En las industrias de bebidas, es necesario trabajar con un gran volumen de muestra y uno de los hándicaps de los sistemas automatizados actuales es la imposibilidad de trabajar con estos

volúmenes. Es necesario disponer de un sistema que nos permita automatizar este tipo de muestras.

El mercado actual requiere una alta versatilidad en estos nuevos equipos, ya que uno de los requisitos microbiológicos incluye analizar no solo el producto en sí, o las materias primas, sino también las superficies de trabajo y los puntos de control críticos. Por lo tanto, necesitamos poder analizar también los parámetros de control en escobillones o esponjas.

SISTEMA SOLERIS

Desde hace 7 años, con una tecnología sencilla e innovadora y con más de 600 equipos en funcionamiento, Neogen Corporation ofrece la posibilidad de solucionar todos estos requerimientos con un único equipo comercializado con el nombre de Soleris.

El sistema se diseñó basado en las necesidades del departamento de control de calidad de la industria alimentaria, cosmética y nutracéutica para la determinación de todos los microorganismos de desecho e indicadores. Su diseño permite la automatización de los análisis, con la mínima manipulación por parte del usuario, la mayor especificidad posible y la obtención de resultados en horas en lugar de días. Por lo tanto, reduce sensiblemente los tiempos de liberación de los lotes y de aceptación de las materias primas.



Equipo Soleris con incubador de capacidad para 128 muestras o de 32 muestras.

La tecnología usada se basa en la capacidad de los microorganismos de convertir los azúcares en ácidos durante la fermentación. La muestra a analizar se introduce en los viales específicos y éstos se introducen en el incubador. Estos viales contienen medio de cultivo específico con un indicador de pH. En los viales hay dos zonas bien diferenciadas, una de crecimiento y una de detección. El crecimiento microbiano en los viales produce un cambio de pH y, por lo

tanto, un cambio de color en el medio, que es detectado a tiempo real por el incubador. Las ventajas de esta metodología son la simplicidad de uso, la rapidez en la obtención de los resultados y la monitorización de éstos. Además, nos permite trabajar con un gran número de microorganismos, con niveles de sensibilidad de hasta 1 organismo por vial, con un rango de detección de hasta 10⁷-10⁸ y con gran versatilidad de muestras (materia

prima, membranas de filtración para grandes volúmenes, escobillones para superficies, producto acabado,...). Finalmente, un software fácil de usar basado en windows, que realiza la lectura y el almacenaje de los análisis automáticamente, con aplicaciones HACCP, capacidad de trabajo con código de barras y vista remota de los datos, convierte a este equipo en el compañero ideal en el laboratorio alimentario.

DETECCIÓN DE BACTERIAS PATÓGENAS MEDIANTE LA TÉCNICA PCR A TIEMPO REAL PARA LABORATORIOS DE MICROBIOLOGÍA

Richard Fielder

International Marketing Manager de Bioser
e-mail: rfielder@tepnelbiosystems.com

La PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa) es una técnica de biología molecular que consiste en la obtención de replicados de DNA a partir de un DNA molde, utilizando una enzima DNA-Polimerasa. Esta polimerasa comienza a copiar sólo si existe un fragmento de DNA específico, el cebador o *primer*. Los cebadores son fragmentos de DNA diseñados de forma complementaria a los extremos del DNA molde para poderlo replicar. Actualmente, el proceso de la PCR está totalmente automatizado mediante un aparato llamado termociclador.

La PCR a tiempo real, que permite obtener millones de copias de un fragmento de DNA en pocas horas, se utiliza en laboratorios de microbiología para la identificación de patógenos, como *Salmonella*, *Listeria* o *Legionella*. Para la detección de bacterias patógenas se utiliza un fragmento del DNA bacteriano específico y perfectamente definido.

El gran número de copias de DNA que se obtiene tras la reacción de PCR a tiempo real puede detectarse mediante fluorescencia. La detección del DNA se hace con fluoróforos, que son moléculas que emiten fluores-

cencia cuando vuelven a su estado normal desde un estado excitado. Los fluoróforos pueden ser inespecíficos, si detectan todo el DNA producido durante la reacción, o específicos, si distinguen entre la secuencia de interés y los dímeros de *primers* o las amplificaciones inespecíficas.

Las etapas de la técnica PCR pueden resumirse en los siguientes pasos:

1. Desnaturalización. Las dos cadenas de ADN molde se separan (normalmente mediante calentamiento).
2. Apareamiento (hibridación). Los cebadores se unen a la parte complementaria del ADN molde.
3. Extensión. La ADN polimerasa (termoestable) copia el ADN molde.
4. Repetición cíclica de los tres pasos: 20-30 veces.

La PCR supone muchas ventajas inmediatas respecto a los sistemas de cultivo tradicionales. Una de ellas es la rapidez de la técnica, que permite efectuar la determinación en tan solo 4-5 horas (a diferencia de las casi 70 horas que se necesitan en los métodos clásicos). Otro punto positivo de la PCR es la elevada especificidad si se eligen los genes diana adecuadamente. Además, también hay que



tener en cuenta los excelentes niveles de sensibilidad y reproducibilidad del método. Todo estas ventajas harán que incremente la capacidad de análisis y que mejore la optimización de los recursos humanos, materiales y temporales del laboratorio que utilice la PCR.

La técnica PCR se encuentra en estos momentos en pleno auge. Así lo demuestran la gran cantidad de artículos científicos sobre PCR que están siendo publicados en revistas especializadas durante los últimos años. Además, la venta de equipos de PCR va creciendo también de forma exponencial año tras año, con el consiguiente abaratamiento de los equipos. Muchas empresas nos hemos dado cuenta del tremendo potencial que tiene la técnica PCR de cara al futuro, por lo que hemos puesto a la venta kits especialmente diseñados para la detección de patógenos concretos.

PCR A TIEMPO REAL. ANÁLISIS DE PATÓGENOS EN ALIMENTOS

Mireia Robles

Laboratorio de Genética. Applus

La presencia de microorganismos patógenos en alimentos es uno de los problemas esenciales en la salud pública. *Salmonella* spp, *Listeria monocytogenes*, *E. coli* 0157:H7 y *Campylobacter* spp. pueden considerarse las principales causas de enfermedad y/o mortalidad asociadas a patógenos de origen alimentario.

La industria alimentaria debe asegurarse que cada uno de sus productos cumpla la normativa establecida para cada patógeno y alimento, para evitar así posibles toxicoinfecciones de los consumidores.

Tradicionalmente, el proceso de detección de microorganismos en la industria se basa en técnicas de microbiología clásica. Estas técnicas de identificación suelen ser largas y tediosas y, en la mayoría de los casos, no pueden aplicarse a alimentos o productos perecederos con una vida corta.

El desarrollo de las técnicas de biología molecular y el estudio del genoma de especies de interés han permitido desarrollar métodos de control de calidad basados en el estudio del ADN. Estos métodos son más precisos, sen-

sibles, fiables y rápidos que los convencionales.

En Applus-Roche hemos desarrollado una técnica de detección de patógenos basada en la PCR a tiempo Real que permite un análisis en 24-48 horas. La PCR a tiempo real es un método específico que permite amplificar un segmento concreto y conocido del ADN de modo exponencial. La DNA polimerasa es la enzima encargada de amplificar esta secuencia, junto al par de cebadores o *primers*, que delimitan la zona a amplificar, y el uso de un tercer primer específico para cada patógeno capaz de captar y emitir fluorescencia, conocido como sonda. La fluorescencia emitida por la sonda es captada por el equipo LightCycler® 480 ROCHE, y nos permite visualizar los resultados simultáneamente a la amplificación.

Habitualmente, esta detección de patógenos mediante PCR a tiempo real, se realiza en reacciones en uniplex, es decir, una PCR para cada uno de los patógenos, donde cada sistema es exclusivo y específico para un patógeno en concreto. En Applus, hemos desarrollado un sistema en multiplex, donde se amplifican simultáneamente

distintas secuencias de ADN en una misma reacción. Cada patógeno a detectar va marcado con un fluorocromo diferente y con el LightCycler® 480 ROCHE se leen las distintas emisiones y se interpretan los resultados. De este modo, se pueden detectar varios patógenos en una misma PCR. Esta técnica conserva la elevada especificidad para cada patógeno y nos permite un ahorro importante de tiempo y costes. Las matrices alimentarias pueden llegar a ser muy complejas, y pueden contener sustancias que inhiban la PCR, pudiendo ocasionar resultados falsos negativos, por este motivo, es importante utilizar un control de inhibición que permita asegurar que la PCR no está inhibida y los resultados son fiables.

Tras la recepción de la muestra es necesaria la homogenización mediante el *stomacher* o homogenizador y el posterior cultivo *overnight* con un medio de cultivo apropiado según la especie a detectar. A continuación, se realiza la extracción del ADN con protocolos adaptados a cada matriz alimentaria, PCR a tiempo real y, finalmente, la interpretación de los resultados.

SISTEMAS AUTOMÁTICOS VALIDADOS DE RECUENTO BACTERIANO EN LA INDUSTRIA ALIMENTARIA

Francisco García Bejarano

Especialista en Microbiología Industrial
bioMérieux España S.A.

BioMérieux es una empresa de biotecnología que desarrolla, produce y comercializa reactivos y equipos automatizados destinados a análisis clínicos

y a controles microbiológicos industriales.

A través del diagnóstico biológico, queremos contribuir a mejorar la Salud Pública en el mundo.

Actualmente, bioMérieux es líder destacado en la automatización de detección de patógenos alimentarios con los equipos Vidas y miniVidas, con más de 240 equipos instalados

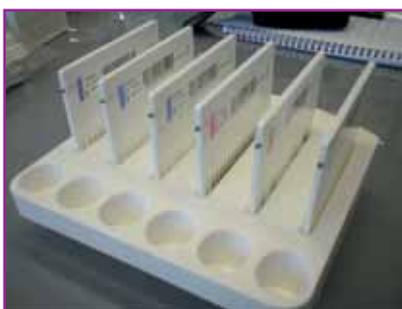


Estación de trabajo al completo.

en Industrias, en laboratorios externos públicos y privados y acreditados por la ISO 17025, y realizando más de 600.000 determinaciones de patógenos durante 2007. Con medios de cultivo de reconocido prestigio internacional, cumpliendo con los criterios de calidad más exigentes en su producción, como por ejemplo la norma de fabricación y control de medios de cultivo, ISO 11133, en todos los medios que lo precisan.

¿QUÉ ES TEMPO?

Tempo es la primera solución automática multiparamétrica **para recuento de Indicadores de Calidad** en cualquier matriz de alimentos, con un único protocolo, basada en microbiología tradicional: método NMP miniaturizado.



Filling rack.

- TEMPO® - Automatización.
- TEMPO® - Flexibilidad.
- TEMPO® -Trazabilidad.

Exactamente el MISMO PROTOCOLO :

- Para TVC, TC, EC, EB... todos los parámetros.
- Para todas las matrices de alimentos.
- Lecturas 24h (40hTVC).

Simplifica la acreditación

Flexibilidad en el laboratorio:

- Inicio y lectura de los análisis en cualquier momento del día.
- Permite afrontar picos de trabajo.
- Formación del técnico es simple.
- Permite cambio de turno de operarios.
- Dedicar recursos a tareas extra (gestión, calidad...).



Incubation / Reading Rack

Mejora de la organización, distribución de tareas y el flujo de trabajo del laboratorio

- Resultados reproducibles: eliminar errores de asignación, muestras, transcripción, cálculo de diluciones, cambio de reactivos, interpretación resultados...

**1 muestra = 10 operarios =
10 resultados distintos
1 muestra = 1 tempo =
1 resultado reproducible**

- Gestión de datos integral en el laboratorio: conexión LIMS.
- Datos históricos de producto-proceso.
- Análisis de tendencias, ARPCC.
- Auditorías más sencillas.

Validación AFNOR (según ISO 16140) **en todos los alimentos en los siguientes parámetros disponibles:**

- TEMPO EC (*E. Coli*).
- TEMPO TVC (Aerobios Mesófilos).
- TEMPO TC (Coliformes totales).
- TEMPO EB (Enterobacterias).



Estación de trabajo al completo.