

SECCIÓN 1

TEMA 1 : IMPORTANCIA DEL CONTROL MICROBIOLÓGICO

La Revolución industrial originó un aumento masivo de las poblaciones , con el consiguiente aumento de la demanda de recursos . Esto conlleva que se tengan que extremar las precauciones , para evitar microorganismos perjudiciales en el agua y alimentos y también es necesaria una mejora en la conservación de los alimentos .

Desde antiguo se sabe que los alimentos son un excelente transmisor de enfermedades infecciosas . Incluso hoy en día , a pesar de que existe mayor información acerca de los microorganismos y su transmisión , aún así , la transmisión de microorganismos por alimentos es un gran problema . El aumento de nuevos patógenos transmitidos por alimentos atrae a los medios de comunicación sobre la seguridad de los alimentos , haciendo que los consumidores seamos más conscientes de dichas transmisiones y así exigimos alimentos cada vez más seguros .

Por otra parte , el desarrollo microbiano destruye grandes cantidades de alimentos , causando problemas económicos y una considerable pérdida de importantes nutrientes

En todo Control Microbiológico de calidad destacan dos aspectos :

- Calidad Higiénico – Sanitaria : que no se distribuyan microorganismos patógenos para la salud .
- Calidad Comercial : presencia de microorganismos alterantes , que alteren el producto haciéndolo no comestible (aunque no sean patógenos)

La pérdida de calidad de un producto , por tanto , puede ser debida a la presencia de microorganismos patógenos o de microorganismos que alteran el producto de tal manera que lo hagan inadecuado para el consumo . De ahí surge la necesidad de que todas las industrias conozcan la calidad microbiológica de sus productos , a nivel de las materias primas que usan , que conozcan la calidad de todos los procesos de elaboración y por supuesto la calidad del producto final .

- ♦ **Vida útil , de almacén o comercial** : período de tiempo transcurrido desde su obtención hasta que se convierte en inaceptable en términos de seguridad higiénico – sanitaria o de calidad comercial .

La vida útil es muy importante y su valoración es extremadamente difícil , tanto por su subestimación como por la sobreestimación .

La subestimación supone una pérdida económica por disminuir el tiempo de permanencia en el mercado y la sobreestimación supone la pérdida de seguridad higiénico – sanitaria (también pérdidas económicas , porque dejas de comprar el producto si está malo)

Los microorganismos en los productos de consumo suelen ser controlados por eliminación , inhibición de su multiplicación o por su destrucción total . Los métodos dependen de la sensibilidad de los microorganismos que se tienen que controlar y del propio producto . Destacan la sensibilidad al calor o al frío de los microorganismos , a

sus necesidades de agua , sensibilidad a los álcalis , a la radiación y a productos químicos (p.ej : la nevera – el frío impide el aumento de los microorganismos) .

En Microbiología , el cometido principal del microbiólogo es garantizar al consumidor un abastecimiento de productos salubres e inofensivos y evitar el deterioro microbiológico de los mismos . Por estas razones , el campo de estudio de la Microbiología en los productos de consumo es uno de los más diversos : desde bacterias a virus , hongos , protozoos ... deben estar controlados por el microbiólogo , que debe conocerlos a todos .

Pero los microorganismos también cumplen papeles buenos : leche , queso , bebidas alcohólicas ... El control microbiológico también asegura que estos microorganismos cumplan correctamente sus funciones .

Para poder obtener información acerca de la calidad microbiológica de un producto es necesario llevar a cabo análisis microbiológicos . Por eso , hay infinidad de técnicas para establecer esa calidad microbiológica . Pero necesitamos dos informaciones :

- El significado de los grupos y especies de microorganismos presentes
- Normas y especificaciones microbiológicas que deben cumplir los productos : es decir , disponer de patrones de comparación para saber si las cantidades de microorganismos presentes en un producto son normales o no .

En 1962 se creó el Comité Internacional de Normas Microbiológicas para Alimentos (ICMSF) . Es dependiente de la Asociación Internacional de las Sociedades de Microbiólogos .

♦ Componentes de un examen microbiológico :

- Muestreo : de forma adecuada y siguiendo unos protocolos , las muestras tienen que ser estadísticamente significativas y por eso se llevan a cabo planes o programas de muestreo .
- Método Analítico : hoy en día existen muchos , elegimos el más sensible para detectar lo que queramos y se busca también que sea económico .
- Interpretación de resultados : por eso hay que saber el significado de los microorganismos .

Hoy en día se hacen miles de análisis al día , si los resultados están mal hechos , las pérdidas económicas pueden ser enormes (falsos positivos o falsos negativos) .

- ♦ **Análisis de Riesgos y Control de Puntos Críticos (HACCP)**: antes sólo se analizaba el producto final , pero eso no es lo más correcto , hay un riesgo de que lo no analizado esté mal . Un HACCP consiste en analizar toda la cadena de producción , buscar los pasos críticos , de tal manera que si dicho producto se escapa al control , ese producto no sea bueno o fiable .

Por ejemplo , si estudiamos leche pasteurizada y al analizarla sale que tiene enterobacterias ¿ dónde buscamos el problema ? , como sabemos que el tratamiento térmico es un punto crítico , lo analizamos y si aseguramos que siempre está a 80° a 10' sabemos que el problema no estará ahí . Entonces ,

vamos a la leche inicial , porque también es un punto crítico , podría tener microorganismos termorresistentes por lo que habría que analizarla .

Como estos hay multitud de puntos críticos , si aseguramos que todos están bien tendremos garantizado que el producto sea bueno

TEMA 2 : DESARROLLO HISTÓRICO

Las intoxicaciones y la alteración de los alimentos causados por microorganismos ya preocupaban a los hombres primitivos . Pero nunca conocieron el papel de los microorganismos en este problema . De hecho , la capacidad de conservar alimentos y almacenarlos para momentos de escasez fue un prerrequisito para la evolución , desde una sociedad cazadora – recolectora hacia una agrícola . La producción del pan , de bebidas

alcohólicas , alimentos fermentados , conservación de la carne y pescado por salazón ... fueron necesidades para la evolución de sociedades estables .

Durante miles de años el hombre supo que los alimentos podían diseminar enfermedades , por ejemplo la prohibición de comer carne de cerdo en las religiones judía y musulmana tuvo su origen en una doctrina médica : la carne de cerdo es peligrosa en climas cálidos .

A mediados del primer milenio a.C. las leyes religiosas de la India comenzaron a identificar lo que denominaron alimentos impuros . Entre ellos se incluía : carne que había sido cortada con espada , carne de perro , humana y de animales carnívoros , langostas , carne de camellos y la de animales excesivamente peludos . Tiene su fundamento en sencillas reglas de higiene .

La intoxicación por consumo de cereales deteriorados era conocida por griegos y romanos y en la Edad Media se sucedieron grandes epidemias en Europa , Rusia y otros lugares . Como la causa se desconocía las enfermedades se sucedían .

El ser humano comenzó a entender , sin saber por qué , que los alimentos debían mantenerse alejados del contacto con el aire , la luz y humedad . En los primeros tiempos los conservaban cubriéndolos con una capa de miel , arcilla , aceite de oliva y por supuesto con sal . De hecho , la sal se convirtió en un producto muypreciado . Había muy pocos lugares donde se podía obtener la sal, uno de ellos era el Mar Muerto (razón por la cual los romanos se interesaron por palestina) . Como las dificultades de transporte y conservación se agravaban en períodos de guerra , en 1795 el gobierno francés ofreció un premio a quien desarrollara un método nuevo de conservación de alimentos . En 1805 , Appert desarrolló un método muy sencillo , que consistía en el empleo de frascos de vidrio de boca ancha que se llenaban de comida y se cerraban con un tapón de corcho , calentándose al baño maría . de ahí surgieron los tratamientos térmicos .

En 1810 , Durand en Inglaterra patentó el uso de latas de hojalata para alimentos procesados por calor . Pero ni Appert ni Durand sabían porqué los alimentos así procesados no se estropeaban , ya que estos no contaban con el concepto de microorganismo , que ya había sido desarrollado por Lewenhoeck en 1676 .

Sin embargo , el trabajo de Appert sirvió de base importante para los trabajos de Pasteur , Chevalier y Appert , en 1853 , desarrollaron una patente para la esterilización

a temperaturas superiores a 100°C , empleando vapor de agua a presión en un autoclave . Desde 1874 empezaron a comercializarse para el tratamiento de productos.

Pronto Pasteur y otros científicos establecerían los fundamentos que conducirían al descubrimiento de los microorganismos como causantes de las toxoinfecciones alimentarias y también su papel en la alteración de los alimentos .

Entre 1854 – 1864 , Pasteur proporcionó un fundamento científico a los métodos de conservación de los alimentos , los del calor . Hizo muchos experimentos , como pruebas de que las bacterias son responsables del deterioro de alimentos y que causan enfermedades . El primer uso de lo que se denomina Pasteurización fue el calentamiento del vino para destruir microorganismos indeseables .

A lo largo del s. XIX se desarrollaron métodos de cultivo de microorganismos en cultivos puros y se identificaron bacterias específicas , como los agentes causantes de ciertas enfermedades . Kock , en 1884 , aisló por primera vez el vibrio del cólera . Durante este siglo , se produjeron muchos avances en la conservación de los alimentos En 1842 , Benjamín establecía el empleo de una mezcla de hielo y salmuera para congelar más rápidamente los alimentos .

En 1880 se comercializó por primera leche pasteurizada , en Alemania (1890 en EEUU) . Las frutas y

vegetales desecados aparecieron en 1886 .

Poco a poco se hizo evidente que los microorganismos eran responsables de las enfermedades gastrointestinales , de ahí la necesidad de comprobar su presencia en los productos de consumo . Mientras se reglamentaban las formulaciones microbiológicas , se hizo evidente que no se podían realizar ensayos para todos los microorganismos entéricos que podían estar presentes en un alimento . Había que buscar algún tipo de análisis rápido . En 1885 , Escherich aisló una bacteria fecal a partir de heces de niños y que denominó *Bacillus Coli* , hoy en día *E.Coli* .

En 1892 , Schardinger sugirió que *E.Coli* podía ser muy útil como microorganismo indicador de contaminación fecal . En esa época aún no se contaba con métodos para detectar fácilmente *E.Coli* , sobre todo para diferenciarla del resto de microorganismos muy similares , que fueron denominados coliformes .

Eijkman , en 1904 , estableció que incubando las muestras a 46°C era posible discriminar las coliformes fecales de las coliformes no fecales . Se desarrollaron métodos complicados para aislar *E.Coli* , tanto que hasta 1980 no se desarrollaron métodos simples y adecuados para la detección simultánea de las coliformes y *E.Coli* .

De manera similar se desarrollaron métodos sencillos para la identificación de los enterococos , que habían sido identificados en 1899 por Thiercelin . Cada vez se fueron descubriendo más patógenos relacionados con productos de consumo : por ejemplo *Clostridium perfringes* (18855) . Gartner , en 1888 , aisló de muestras de carne implicada en un brote de toxoinfección una bacteria que se denominó *Salmonella enteritis* . Otras bacterias importantes : *Staphylococcus aureus* (1894) , *Shigella dysenteriae* (1898) , *Bacillus aureus* (1906) , *Aspergillus flavus* (1890) ... A comienzos del s. XX surgió un clásico portador crónico de un patógeno intestinal , la fiebre tifoidea .

Con el descubrimiento de los patógenos , se hacía necesario establecer leyes que regularan la presencia de estos microorganismos en los productos de consumo . Sin embargo , la promulgación de leyes que regularan la calidad del agua y alimentos requería de unos métodos analíticos uniformes y eficaces y no los había . Cada laboratorio usaba métodos distintos . En 1899 , la asociación Americana de Salud Pública (APHA) eligió un comité para que se establecieran procedimientos uniformes para la detección de parámetros químicos y bacteriológicos del agua . El informe de este comité , publicado en 1905 constituyó la primera edición de un manual denominado Métodos Estándar para el Análisis del Agua y que ahora va por su 18ª edición y se llama Métodos estándar para el Examen del Agua y Aguas Residuales .

De esta manera se establecieron numerosos comités y aparecieron numerosos informes que recopilaban métodos para el análisis microbiológico del agua y alimentos Uno de estos , muy importante , son los de la AOAC (Asociación Internacional de Químicos Analíticos Oficiales) , que desde 1916 ha venido validando procedimientos , tanto en Química como en Microbiología . Otro de estos importantes es el ICMSF (Comité Internacional de Normas Microbiológicas para Alimentos) , creado en 1962 . En 1963 se crea el Codees Alimentarius , creado por la FAO , conjuntamente con la WHO para desarrollar estándares sobre alimentos .

La FDA americana publica en 1992 un manual de analítica bacteriológica . Si el período entre 1890 y 1940 se describe como la era de la conservación de los alimentos, desde la década de los 50 hasta los 80 , es la era de la ciencia de los alimentos , basada en la Química y en la Ingeniería (conservantes químicos , tratamientos tecnológicos modernos , liofilización ...) De hecho , ya en 1925 Ludwig y Hopt comenzaron a estudiar la posibilidad del empleo de radiaciones ionizantes en la conservación de los alimentos .

En 1959 , Bauman & Co. , en la compañía Pillsbury , en cooperación con la NASA y los laboratorios Natick del ejército americano y los laboratorios de la fuerza aérea espacial , unieron sus fuerzas para producir alimentos casi completamente seguros para el programa espacial . La única forma de asegurar esto era mediante análisis microbiológicos , para tener una seguridad total habría que analizarlo todo . Desarrollaron

un sistema preventivo denominado HACCP : análisis de riesgos y control de puntos críticos , que supone el control completo sobre todo el proceso y distribución del alimento , actuando de esta manera como un sistema integral . El sistema HACCP se hizo público por primera vez en 1971 y fue aceptado seriamente por la industria en 1985 .

- ♦ **Sistema HACCP** : se desarrolla para saber si una empresa cumple los requisitos de control de todos los pasos de elaboración del producto .
- ♦ Posteriormente se creó la Organización Europea de Estándares **ISO9000** : gestión de calidad que tiene como objeto la prevención y detección de productos defectuosos durante la producción y distribución de productos al consumidor , garantizando por medio de una serie de acciones correctoras que no vuelvan a aparecer productos que no cumplan con los requisitos . Es un proceso en el que un grupo de consulta independiente certifica que una empresa determinada práctica un sistema de garantía de calidad de alto nivel .

Con la ISO9000 se garantiza que el producto cumpla las especificaciones el 100% de las veces . Son una serie de estándares incluidos en 20 cláusulas . Para que una empresa cumpla el ISO9000 tiene que tener un sistema HACCP funcionando correctamente .

Hoy en día , gracias al desarrollo de la Biología Molecular , se ha desarrollado la Microbiología Analítica . La Microbiología tradicional de plaquear y contar ha dejado paso a un mundo de PCR , geles de electroforesis ... , que permiten una cuantificación rápida y directa tanto de los patógenos como de sus toxinas , reduciendo el tiempo de los análisis .

TEMA 3 : ORIGEN E IMPORTANCIA PATOLÓGICA DE LOS MICROORGANISMOS PRESENTES EN LOS PRODUCTOS DE CONSUMO

ORIGEN

Según su procedencia podemos agruparlos en dos categorías :

- **Origen endógeno** : ya están presentes en el producto o materia prima antes de su obtención o procesado . Serían aquellos que constituirían la microbiota normal de esas materias primas . Hay que destacar , en el caso de alimentos de origen animal , los microorganismos productores de zoonosis : infecciones causadas por parásitos que afectan a animales , pero que se transmiten también al hombre . También podemos citar la microbiota de la leche , las levaduras de la superficie de las uvas ...

Tanto los animales como los vegetales tienen su microbiota típica , que puede pasar finalmente al producto . Muchas veces esta microbiota es deseable , puesto que interviene en las características del producto final . Sin embargo otros muchos son indeseables , por dos razones : cuando queremos añadir al producto nuestros propios cultivos iniciadores y cuando esta microbiota puede degradar y alterar el producto .

Por tanto , hay que eliminar o controlar esta microbiota mediante técnicas de conservación .

- **Origen exógeno** : microorganismos que no existen en el producto o materias primas en el momento de la obtención , sino que se sumaron posteriormente a él , a partir del ambiente , durante la obtención , el procesado , transporte ...

Dentro de este grupo , hay que destacar los que pueden resultar patógenos y pueden pasar al producto . Esta microbiota exógena está formada principalmente por microorganismos saprofitos (aquellos que viven a expensas de la materia orgánica muerta) . Para controlarlos hay que saber de donde proceden . Pueden contaminar las materias primas o el producto , a partir de 5 lugares :

- **A partir del suelo** : suele ser la fuente de contaminación con una mayor variedad de microorganismos y en cantidades elevadas. Por eso , una práctica habitual en las industrias es el lavado de las materias primas , para eliminar restos de polvo ,

tierra ... También se puede proteger toda la línea de producción , para evitar que las corrientes de aire que levantan polvo lleguen al producto .

- **A partir de la materia fecal** : cuando los residuos fecales no son tratados adecuadamente , pueden pasar al suelo o al agua y de ahí a plantas y animales , aportando una gran cantidad de microorganismos que por su origen podrían ser patógenos para el hombre . Esa contaminación es habitual como consecuencia de una práctica , la fertilización de las cosechas con aguas residuales
- **A partir del agua** : el agua puede estar contaminada con materia fecal . las aguas naturales no sólo contienen microorganismos propios , sino que también los que proceden del suelo , de animales y de la materia fecal . Desde un punto de vista microbiológico , interesa un agua de características adecuadas al tipo de producto que se va a elaborar , puesto que puede ser el origen de microorganismos alterantes y patógenos . Por eso , el agua que se usa en la producción de productos de consumo debe cumplir las normas microbiológicas que se usan para el agua de bebida . Por tanto , a la hora de montar una industria es necesario que tenga un abastecimiento hídrico de calidad .
- **A partir del aire** : la contaminación a partir del aire es importante tanto desde el punto de vista económico como sanitario . Sin embargo , el aire desempeña un papel de vehículo transmisor , ya que no tiene una microbiota típica . Los microorganismos del aire llegan a él por medio del polvo , tierra , salpicaduras de agua , de la actividad animal y humana o por hongos esporulados que crecen en paredes ... Como consecuencia, la contaminación de microorganismos del producto puede ser muy grande . Algunos de estos microorganismos pueden ser especialmente patógenos , como los causante de infecciones respiratorias .
- **Por la elaboración y manipulación del producto** : contaminación adicional por el equipo empleado en la preparación del producto , material de empaquetado y personal . La higiene y limpieza en la fábrica son fundamentales . De hecho , la higiene es una parte esencial en la elaboración del producto . las superficies del equipo empleado se ensucian inevitablemente y deben limpiarse adecuadamente . Esta suciedad permite el crecimiento microbiano , de tal manera que hace más fácil que los microorganismos pasen al producto en cantidades elevadas . En cuanto al personal, puede contaminar fácilmente el producto durante la elaboración y manipulación . De hecho , este uno de los procesos más habituales de contaminación , que ha recibido una atención desde el punto de vista de la salud pública . Los microorganismos patógenos pueden proceder de personas infectadas en situaciones diversas , incluido el período de incubación . Durante la enfermedad aguda , la mayoría de las bacterias y virus que provocan enfermedades entéricas son eliminadas en gran número a través de las heces y orina .

La función del microbiólogo es evitar las contaminaciones , sobre todo a causa de la microbiota exógena .

IMPORTANCIA PATOLÓGICA

La enfermedad transmitida por alimentos ha sido determinada por la OMS como una enfermedad de carácter infeccioso o tóxico , causada por o que se cree que es causada

por el consumo de alimentos o agua . Muchas veces es más frecuente usar el término toxoinfección alimentaria . Estas enfermedades tienen el denominador común de un corto período de incubación y de un cuadro clínico gastroentérico : diarrea , vómitos , dolor abdominal ... muchas veces acompañado de fiebre . En general , son de corta duración y es habitual la recuperación total de los pacientes sin tratamiento médico , aunque pueden surgir complicaciones , incluso mortales , en individuos jóvenes , viejos o debilitados . Estas enfermedades son causadas por distintos agentes etiológicos, entre ellos los microorganismos (bacterias , protozoos , virus , hongos ...) , productos químicos , agentes físicos , sensibilidad a determinados alimentos o también deficiencias nutritivas . Los que más destacan son los microorganismos , debido a que pueden constituir importantes focos de epidemias . Muchos microorganismos en los productos de consumo son

capaces de producir estas enfermedades y en general la presencia de los mismos en los productos se debe a un doble fallo : a malas prácticas de fabricación (la contaminación como consecuencia de alguno de los anteriores puntos) y a malas prácticas de conservación (permiten una posterior multiplicación de los microorganismos en el producto) .

Las toxoinfecciones pueden dividirse en dos grupos :

- **Infección alimentaria** : el agente patógeno son los microorganismos , que transportados por el producto , se multiplican en el organismo (tubo digestivo) .

a.1. No invasoras : el microorganismo responsable coloniza la luz intestinal y se adhiere a la superficie , donde tiene lugar la multiplicación . Ej : *Vibrio cholerae* , produce toxinas en la superficie del tubo digestivo . Actúan localmente en el intestino , modificando el flujo de electrolitos y agua a través de la mucosa .

a.2. Invasoras : invasión de las células del epitelio intestinal , por ejemplo *Salmonella* . Las células bacterianas invaden y atraviesan las células epiteliales para multiplicarse en el tejido conjuntivo que se encuentra debajo de los enterocitos . También algunas cepas de *E.Coli* invaden la mucosa del colon , produciendo un síndrome disentérico , caracterizado por la inflamación y ulceración del colon , produciendo heces sanguinolentas .

- **Intoxicaciones** : cuando se trata de toxina preformadas presentes en el alimento en el momento de su ingestión . Por ejemplo , *Staphylococcus aureus* puede multiplicarse en los alimentos , produciendo toxinas muy termorresistentes . También *Clostridium botulinum* (toxina botulínica) , que es muy anaerobio y durante la esporulación produce la toxina .

Las infecciones se pueden caracterizar en dos grupos , en función de que sean altos o bajos dos parámetros :

- **DMI** (Dosis mínima Infecciosa) : el menor número de unidades formadoras de colonia , que han de desencadenar síntomas de enfermedad en individuos sanos .
- **Di50** (Dosis Infecciosa al 50%) : el número de unidades formadoras de colonia que provocará la enfermedad en el 50% de la población expuesta .

El que se desencadene un síndrome infeccioso también depende del estado de la persona (edad , características de su microbiota normal ...) .

ENFERMEDADES

- ◇ *Salmonella*
- ◇ *Staphylococcus aureus*
- ◇ *Clostridium perfringens*
- ◇ *Vibrio parahaemolyticus*

Son los agentes más típicos causantes de enfermedades transmitidas por alimentos . Sin embargo , muchas veces el patógeno permanece sin identificar .

En todo el mundo , las enfermedades diarreicas son la segunda causa (tras las respiratorias) de muerte en adultos y la primera causa en niños . En personas sanas y bien alimentadas del mundo desarrollado , la mayoría de enfermedades por productos de consumo son algo desagradable , que se cura a los pocos días. En el mundo subdesarrollado es mucho más grave , ya que las diarreas causan la mayor mortalidad infantil .

SECCIÓN 2 . CONCEPTOS DE CALIDAD Y CONTROL MICROBIOLÓGICOS

TEMA 4 :

- ◆ **Calidad Microbiológica** : calidad es el grado de excelencia que posee un producto , en qué grado es bueno para cumplir su finalidad . Un producto será de buena calidad cuando cubra los requisitos establecidos por el cliente , reúna las características esperadas por los consumidores , se acoja a la legislación vigente e incorpore a lo largo del tiempo todas las nuevas y cambiantes exigencias .

La calidad puede medirse desde distintos puntos de vista :

- En términos sensoriales u organolépticos
- En términos de su composición química
- En términos físicos
- En términos de su microbiota , tanto cuantitativa como cualitativa

Destacan los relacionados con la calidad microbiológica , debido a su relación directa con la garantía en cuanto a salud humana . Así , destacan dos campos relacionados con la calidad microbiológica en los productos de consumo :

- ◇ La protección del consumidor frente a las enfermedades de origen microbiano , transmitidas por estos productos .
- ◇ La prevención de las alteraciones de estos productos debidas a la acción de estos microorganismos .

En este ambiente surge el término **Calidad Microbiológica** , como un elemento de evaluación de la satisfacción de los requisitos microbiológicos que debe tener un producto , tanto desde el punto de vista sanitario como comercial .

Cuando es la salud del consumidor la que está expuesta a un riesgo , la legislación es severa . Llevan a adoptar a las industrias técnicas adecuadas de manipulación , fabricación y distribución . Además , el desarrollo posterior de microorganismos indeseables , aunque no sean patógenos , pueden alterar el producto de tal manera que deje de ser apetecible , suponiendo el rechazo del consumidor . Hoy en día , hay métodos y tecnologías adecuadas para producir productos de buena calidad . Sin embargo , se siguen produciendo brotes de enfermedades por productos de consumo , sobre todo por el factor humano .

◆ **Concepto de Control Microbiológico :**

Para alcanzar la calidad microbiológica es necesario aplicar pasos ordenados a través de la cadena de producción . A lo largo de esta cadena pueden ir sumándose fallos que llevan a obtener un producto con características distintas a las deseadas por el consumidor y la empresa . Por esta razón , la garantía de esta calidad se basa en el control de la presencia y multiplicación de los microorganismos en el nicho ecológico peculiar constituido por el sustrato que proporciona el producto y por el tipo de ambiente en que se conserva o mantiene . Los problemas microbiológicos suelen presentarse cuando no se alcanza el efecto deseado por el procesado o por los sistemas de conservación y esto suele ser consecuencia de errores en la manipulación o procesado . La detección de dichos errores , su rápida corrección y prevención en el futuro , son el principal objetivo de cualquier sistema de control microbiológico .

◆ **Ámbito del control de calidad :**

- Control del procesado del producto
- Control de las materias primas y productos finales para asegurar que cumplen las normas o estándares establecidos .
- Control de la higiene de la línea de procesado .

♦ Procesos para asegurar la calidad :

- Evaluar las materias primas y los estándares del producto final .
- Diseño de la factoría
- Disposición de la línea de procesado
- Diseño de la maquinaria
- Envasado , almacenamiento y distribución

En términos microbiológicos , para asegurar la calidad , debe monitorizarse el desarrollo microbiano en las materias primas , en el procesado , en los puntos críticos de la cadena de producción y en el producto final . Así , al coste de cualquier producto debe añadirse una cantidad debido a los costes de prevención y mantenimiento :

- ◊ Costes de prevención : programas de entrenamiento de los empleados , limpieza y mantenimiento
- ◊ Costes de evaluación : análisis del producto final , controles del procesado e higiene y todas las inspecciones en general .

Todo este coste extra compensa con mucho las posibles pérdidas financieras del pequeño ahorro que supondría no realizar la confirmación de la calidad o descuidando la higiene del producto o la fábrica .

♦ Objetivos del Control Microbiológico de Calidad :

- Inocuidad : que no contengan patógenos o toxinas que causen trastornos
- Aceptabilidad / vida comercial : no debe contener niveles de microorganismos suficientes para convertirlo en alterado , desde el punto de vista organoléptico , en un tiempo inadmisiblemente corto .
- Estabilidad : debe tener una calidad constante cada vez que se produce , con respecto a 1 y 2 .

TEMA 5 : CRITERIOS MICROBIOLÓGICOS

Para distinguir un producto de calidad microbiológica admisible de uno de calidad inadmisible , es necesario la aplicación de los criterios microbiológicos . Se puede emplear el número o tipo de microorganismos en o sobre el producto, para evaluar su calidad y su seguridad microbiológica .

♦ Todo criterio microbiológico debe incluir :

- El producto al que se le aplicará el criterio : un criterio va a ser específico para cada producto .
- Los contaminantes que vayan a preocupar en ese producto , ya sean los microorganismos o sus toxinas : pueden abarcar tanto microorganismos importantes en salud pública como los que son alterantes .
- Métodos analíticos mediante los cuales buscamos al microorganismo o a sus toxinas .
- Los planes de muestreo : cuántas muestras tomamos , cuántas analizamos ...
- Los límites microbiológicos apropiados para ese producto: qué valor de recuento de microorganismos consideramos, que si el número se pasa el producto ya no tiene calidad microbiológica .

♦ Tipos de criterios :

- Preceptivos u obligatorios : aquel que no debe excederse nunca . Si el producto no cumple los límites establecidos por él , obliga a establecer alguna actividad correctora , incluyendo su rechazo , destrucción , reprocesado o desviación a otros productos . Son sobre todo , muy importantes para microorganismos patógenos para la salud pública .
- Consultivos : no es de cumplimiento obligatorio y permite establecer juicios de aceptabilidad y debería servir para alertar de deficiencias en el procesado , almacenamiento o distribución .

♦ La ICMSF establece 3 Criterios Microbiológicos :

- Patrón estándar o norma microbiológica : es un criterio microbiológico que forma parte de una ley o regulación . Es por tanto , un criterio preceptivo , puesto que es una exigencia legal que deben cumplir los productos considerados y que el organismo regulador debe hacer cumplir. Su incumplimiento supone una violación de la ley y está sujeto a medidas punitivas por el organismo responsable . Como criterio obligatorio , siempre que sea posible , debería contener límites para los microorganismos patógenos , de relevancia para la salud pública , en el producto . Los límites de los microorganismos podrían ser necesarios cuando los métodos de detección para los patógenos son complicados o no fiables .
- Recomendación , pauta o directriz microbiológica : es un criterio microbiológico que puede usar el fabricante o un organismo regulador para monitorizar un sistema o proceso de fabricación . Funciona como un mecanismo de alerta para señalar si las condiciones microbiológicas que prevalecen durante el proceso se encuentran en el rango normal , ayudando a determinar si las condiciones microbiológicas son aceptables o no . Es un criterio más bien consultivo y su intención es aumentar la seguridad en la realización de buenas prácticas higiénicas , aunque puede llegar a ser obligatorio , dependiendo de los microorganismos que preocupan en ese producto . Puede por tanto incluir microorganismos sin importancia directa en la salud pública .

Nº

empres.

UFC

0 10 100 1000

- Especificación microbiológica : criterio microbiológico que se aplica a un producto o a un ingrediente , para su aceptación por parte de un fabricante o un organismo público . Es decir , se aplica al comercio . Es una condición aplicada por un comprador que intenta definir la calidad microbiológica de un producto o ingrediente . La conformidad se convierte en condición de compra entre el comprador y vendedor . Por eso suele ser un criterio obligatorio , en el sentido de que si no se cumplen puede ser rechazado por el comprador o ser vendido por un precio más bajo . Se usa sobre todo en materias primas .

♦ Los criterios microbiológicos se usan para :

- ◇ Seguridad higiénica del producto
- ◇ Implementación de buenas prácticas de producción
- ◇ Mantenimiento de la calidad comercial de los productos
- ◇ Determinar la utilidad del producto para un propósito determinado

Aplicados correctamente , los criterios microbiológicos son una útil herramienta para garantizar la seguridad y calidad de los productos , que a su vez aumentan la confianza del consumidor . Los criterios ofrecen a la industria y organismos reguladores unas directrices para controlar los sistemas de procesado y si éstos son aceptados internacionalmente , pueden aceptar el libre comercio , mediante el establecimiento de normas para los requerimientos en calidad y seguridad . Pueden usarse para formular requisitos de diseño de equipos de fábricas y para indicar el estado de las materias primas y los productos terminados en cualquier fase de la cadena de producción .

♦ Selección de los criterios microbiológicos :

Debería establecerse un criterio microbiológico sólo cuando sea necesario y demuestre que sea necesario y práctico . La elección de una norma ... suele ser un proceso complicado , debido a la gran cantidad de

productos y sus distintas condiciones , diferencias químicas , microbiotas distintas ...

Para establecer un criterio microbiológico y cumplir con sus objetivos , hay que tener en cuenta todos estos factores :

- Evidencia de riesgos para la salud : basados en datos epidemiológicos
- La microbiota de la materia prima : por ejemplo , es más probable encontrar un patógeno para el hombre en un alimento animal que en uno vegetal .
- El efecto del tratamiento en la microbiota : si el producto pasa un tratamiento severo , van a disminuir los microorganismos , por tanto sería absurdo buscar microorganismos que mueran con esos tratamientos .
- La presencia? y consecuencias de la contaminación microbiana y/o el crecimiento de microorganismos durante las posteriores manipulaciones , almacenamiento y distribución .
- El tipo de consumidor : si el producto está destinado a una población de riesgo (ancianos , bebés ...) .
- El estado en el que el producto es distribuido
- Posibilidades de un uso deficiente por parte del consumidor
- Posibilidades de alteración
- En el caso de un alimento , el modo de preparación por el consumidor
- Fiabilidad de los métodos de cuantificación y detección de microorganismos y toxinas de interés .
- La relación coste / beneficio asociada a la aplicación del criterio

La **ICMSF** es la encargada de establecer estos puntos

SECCIÓN 3 . MUESTREO Y TÉCNICAS DE MUESTREO

TEMA 6 : MUESTREO . DEFINICIONES

Se puede analizar un producto , todo o una muestra del mismo . La primera opción destruirá todo el producto y por tanto es impracticable . Entonces , ¿ qué tamaño debe tener una muestra ? ¿ qué conclusiones puedo obtener de su análisis ?

- ◆ **Planes de muestreo** : un procedimiento para la elección de un número de muestras adecuado , el análisis correcto de las mismas y la interpretación correcta de los resultados .

Por tanto el muestreo es impredecible , ya que por regla general es imposible analizar un producto completo . Los resultados obtenidos con la muestra se usan para extraer conclusiones acerca del producto completo . Además , tanto los análisis químicos como los microbiológicos son destructivos , por lo que no se puede analizar el 100% de las muestras .

El muestreo consiste en separar del producto un número de muestras con el fin de analizarlo y poder obtener resultados fiables . Se pretende obtener una muestra representativa . La necesidad de un muestreo adecuado se hace patente cuando cabe la posibilidad de que existan microorganismos patógenos , los cuales están distribuidos de forma irregular . La calidad del informe emitido por el laboratorio de CMCA dependerá directamente de la calidad de la muestra recogida y analizada .

- ◆ **Lote** : en condiciones ideales , un lote es una cantidad de producto o unidades producidas y manipuladas bajo condiciones uniformes . Debe componerse de un producto obtenido con las mínimas variaciones posibles y bajo un mismo proceso determinado . Si una parte compuesta por una mezcla de lotes de producción distintos se trata como un único lote , el riesgo para el productor puede ser alto , incluso en el caso de que sólo unos pocos lotes , dentro de la partida , fuesen de escasa calidad .

El tratamiento individual de los lotes de fabricación , sin juntarlos , y su adecuada codificación , permite una

identificación más precisa de los lotes de mala calidad , lo que supone un menor riesgo para el productor y un ahorro . Por esta razón es útil persuadir a los suministradores para que asignen una identificación a los lotes producidos en un tiempo corto .

Si se cumplen las características de la determinación del lote , implicaría la homogeneidad de todo el lote y una distribución homogénea de los microorganismos presentes . En realidad , rara vez los microorganismos están distribuidos uniformemente en el producto , sino que están distribuidos de forma heterogénea , dificultando la interpretación de los resultados .

♦ **Muestra representativa** : N° de unidades de muestra

Deben usarse conceptos sobre estadística de probabilidad y muestreo , para determinar el número y tamaño de las muestras que hay que tomar , procedentes del

lote , y poder establecer conclusiones correctas con los resultados obtenidos del análisis .

Una muestra representativa es una porción tomada de un lote que se un reflejo , tanto como sea posible , de la composición y características de ese lote de donde se ha recogido . Por lo tanto , puede consistir en una o varias unidades de muestra .

Una unidad de muestra es la porción del lote tomada aleatoriamente . Al conjunto de todas las unidades de muestra tomadas de un lote es a lo que llamamos muestra representativa .

♦ **Unidad analítica** : es la porción de la unidad de muestra realmente utilizada en un análisis en el laboratorio . Unidad analítica es igual a unidad de muestra , a veces .

En algunas circunstancias , las unidades de muestra consistirán en envases cerrados que contienen una cantidad de producto del que luego se toma la unidad analítica . De cada unidad de muestra se obtiene sólo un resultado , el procedente de la unidad analítica , que debe realizarse sobre una cantidad de producto suficiente para la realización de las diversas pruebas microbiológicas . Pero , a veces , es necesario tomar dos o más unidades analíticas a partir de una unidad de muestra , cuando el procedimiento analítico para cada parámetro supone un protocolo distinto de preparación .

En la mayor parte de los productos , la distribución de los microorganismos es irregular . Cada unidad de muestra es minúscula es comparación con todo el lote o el medio en el que ha sido realizado el muestreo . Por tanto , esto puede llevar fácilmente a cálculos muy por debajo o muy por encima de la abundancia real . En algunos casos , es posible que la muestra sea más representativa del lote (como por ejemplo en líquidos como leche o agua , que pueden mezclarse)

¿Qué procedimiento hay que seguir para obtener una muestra representativa?

Es importante evitar sesgos y obtener un número suficiente de unidades de muestra , para poder confiar en el resultado .

Para que el muestreo tenga utilidad estadística , se debe realizar sobre un número apreciable de unidades de muestra procedentes de un lote del mismo tamaño de la muestra representativa . Uno de los mayores problemas de los análisis microbiológicos es determinar el número de unidades de muestra que debemos obtener de un lote o de un día de trabajo . El número de muestras destinadas a un análisis microbiológico está en relación con la precisión que se desee obtener en los resultados . A mayor número de muestras , mayor confianza de los resultados , pero también mayor coste del análisis , el tiempo y la pérdida de producto . Se puede sugerir que el número de muestras se corresponda con la "n° total de unidades constituyentes del lote . Este es el caso cuando se toman muestras procedentes de industrias cuyo control se desconoce . Si se trata de

productos sometidos a un control regular , es suficiente analizar entre 5 y 10 muestras de cada lote .

- ♦ **Muestreo aleatorio** : el muestreo aleatorio es el método conocido universalmente para evitar subjetividades y proporciona mejores resultados que intentar recoger de forma consciente unidades de muestra de varias partes del lote . Este métodos

consiste en separar del lote un número de unidades de muestra empleando los números aleatorios , de manera que cada elemento del lote tenga la misma probabilidad de ser incluido en la muestra representativa . Para un producto distribuido en paquetes pequeños es frecuente que la unidades de muestreo la constituya un solo paquete .

Una vez establecido el número de muestras , se enumeran todos los componentes del lote y se escogen aquellos que llevan el número obtenido de una tabla de números aleatorios . Dicha tabla está integrada por columnas y filas de dígitos del 0 al 9 , obtenidos mediante cálculos estadísticos . Se han generado aleatoriamente , de tal forma que en cualquier columna , cualquier dígito es completamente independiente de los procedentes en esa o en otra columna .

Se elige una página de la tabla de números aleatorios y sin mirar se marca con un lápiz un punto en la página , el dígito más cercano a la señal del lápiz será el primer dígito el número de la primera muestra Para obtener el número de la muestra , se toman tantos dígitos como sea necesario para numerar todos los envases del lote . Para ello , los dígitos de las siguientes columnas , en la misma fila que el primer dígito elegido , completarán el número de la muestra . Los números del resto de las muestras se completan de la misma manera con los de la misma columna .

- ♦ **Consideraciones generales para el muestreo** : no todos los productos pueden recibir la misma atención , hay productos que pueden ser más importantes que otros o que presenten mayor riesgo , por lo que se someterán a un muestreo más intenso (criterios más restrictivos ...) . Los factores que hay que tener en cuenta para un muestreo más o menos intenso , son los siguientes :

- **Riesgo** : es el más importante , el tipo de riesgo que implica el producto , en qué medida es peligroso el tipo de microorganismos que el producto pueda presentar , lo que hará que la probabilidad de aceptación del producto rechazable sea lo menor posible .
- **Uniformidad** : si tras el proceso de fabricación , el producto obtenido es muy homogéneo , puede usarse un tamaño o número de muestras menor .
- **Estratificación** : si el lote está formado por sublotes , es necesario muestrear cada sublote , lo que supone un mayor número de muestras .
- **Historial** : si un producto de un buen fabricante tiene un historial y es digno de confianza , el muestreo puede reducirse (la confianza aumenta conforme lo hace el historial , por ejemplo : los de Sanidad emplean menos tiempo en inspeccionar a estas empresas) .
- **Limitaciones prácticas** :no siempre puede disponerse de todos los recursos necesarios para poder analizar un gran número de muestras , muchos análisis microbiológicos son laboriosos y lentos , lo que puede llevar a reducir el número de muestras , lo que aumenta el riesgo .

TEMA 7 : PLANES O PROGRAMAS DE MUESTREO

La toma de muestras no es sólo el procedimiento de tomar un número determinado de muestras , su objetivo es suministrar información sobre las características microbiales del producto , útiles para la aceptación o rechazo de dicho producto . Así , después del análisis de esas unidades de muestra , se obtienen unos resultados que se confrontarán con determinados criterios , que permiten decidir si el lote debe aceptarse o rechazarse .

La elección del procedimiento de muestreo y del criterio de decisión , es lo que se llama un plan o programa de muestreo . Todo plan de muestreo debe incluir tanto el procedimiento como los criterios de decisión . El plan se diseña de modo que se rechacen aquellos lotes que no cumplan un determinado nivel de confianza .

En teoría , los criterios de decisión se establecen de modo que se aceptan los lotes de calidad deseada y se rechacen aquellos que no la tienen . Sin embargo, como no se examina el lote completo , siempre hay peligro de no aceptar uno aceptable o aceptar un rechazable , por eso hay que conocer el riesgo que acompaña a cada plan de muestreo .

Cuanto más muestras se examinan , menor es el riesgo de tomar una decisión equivocada , pero más muestras supone un mayor número de análisis , un muestreo más engorroso , más caro y una mayor pérdida de producto , por lo que hay que llegar a un consenso entre el plan de muestreo que se aplique y el grado de riesgo que es aceptable . Los planes de muestreo se clasifican en dos grandes categorías :

- **Por atributos o características** : suele ser el más aplicado en Microbiología . No se hace suposición alguna acerca de la distribución de los microorganismos en el producto . Se divide en dos tipos :
- **Programa de atributos de dos clases** : es el más sencillo de todos , las muestras se clasifican en dos clases (admisibles o rechazables) , dependiendo de los resultados que nos de el análisis . Por regla general , el objetivo de este tipo de análisis es poner de manifiesto la presencia/ausencia de un determinado microorganismo , o también comprobar que el número de microorganismos presentes en esa muestra es mayor que el especificado en el criterio .

Va a ir definido por tres números : n , c y m

- ◊ **n** : es el número de unidades de muestra requeridas para realizar el análisis
- ◊ **c** : el número máximo permisible de unidades de muestra que pueden ofrecer resultados insatisfactorios , como la presencia del microorganismo o un recuento superior a una concentración preestablecida , definida por la letra m
- ◊ **m** : el valor m , sería la cifra del recuento por encima de la cual la muestra se considera insatisfactoria o deficiente , este valor no se tiene en cuenta cuando sólo se hace una prueba de presencia/ausencia , ya que un resultado positivo es suficiente para que la muestra sea calificada como deficiente .

Ejemplo – tenemos un plan de muestreo $n=10$ y $c=2$: analizar 10 unidades de muestra y si en 3 o más veces me da resultados malos , el lote lo tengo que rechazar o dicho de otra manera , analizo 10 muestras y hasta que 2 muestras me den mal aceptamos el lote .

Ejemplo – tenemos un plan de muestreo $n=10$, $c=2$ y $m=10^2$: plan de muestreo para analizar coliformes en un animal . Se debe analizar 10 unidades de muestra aleatoriamente y sólo permite si en 3 o más muestras el recuento de coliformes es superior a 10^2 unidades formadoras de colonia (para coliformes) , lo tiene que rechazar o de otra manera , analizando 10 muestras , aunque en 2 de las 10 muestras haya 10^2 unidades de colonia se acepta .

Ejemplo – plan de muestreo $n=10$, $c=0$: aplicado a *Salmonella* , analizo 10 unidades de muestra y en ninguna puede haber presencia de *Salmonella* (en pruebas de presencia/ausencia no se usa la m , cuando se pone la m es para recuentos no para presencia/ausencia) .

- ♦ **Curva característica de operación** : se usa para ver el riesgo que estamos cometiendo para que un lote que es bueno se rechace y viceversa .

La probabilidad de aceptación o rechazo asociadas con un plan de muestreo por características , pueden

calcularse a partir de una distribución binomial (porque puedes calcular la probabilidad de éxito)

y z

Cuando se representa gráficamente el porcentaje de unidades de muestra deficientes reales presentes en un lote , frente a la probabilidad de aceptación de ese lote se obtiene lo que se denomina una curva característica de funcionamiento o de operación y sirve para determinar el grado de riesgo que se asocia a un determinado plan de muestreo .

Eje y : probabilidad de aceptación : es la razón entre el número de veces que el resultado indicaría que un lote debería ser aceptado realizando un plan de muestreo con unos valores de n , c , y m determinados y el número de veces que ese lote es analizado .

Eje z : probabilidad de rechazo : es la inversa de lo anterior , el número de veces que rechazo el lote siguiendo un plan , en función del número de veces que analizo el lote

Eje x : representa el porcentaje de unidades de muestra defectuosas que en el lote (es una idealización) .

Ejemplo : plan de muestreo $n=10$ y $c=2$ – si supongo que tengo un 20% de unidades defectuosas (p.ej : con *Salmonella*) , aplicamos el plan de muestreo. Cuando aplico los cálculos de distribución binomial para un lote con un 20% de unidades defectuosas , extrayendo 10 unidades y sólo permito que 2 sean defectuosas , ¿ cuál es la probabilidad de que haya 2 ? Se aplica el procedimiento matemático y sale la siguiente curva :

Prob. de aceptación = 0'68

0,68

20

Esto significa que en un lote con un 20% de probabilidad de que haya que coger 2 muestras de 10 con *Salmonella* es de 0'68 . Es decir , de cada 100 veces que aplique el plan de muestra ($n=10$, $c=2$) a un lote con un 20% de probabilidad de que haya *Salmonella* lo estoy aceptando 68 veces ? . Este plan para *Salmonella* sería poco estricto .

De esta manera sabemos lo susceptible que es el plan para el microorganismo que estamos analizando .

Ejemplo : imaginemos lo mismo de antes (aplicando el mismo plan de muestreo) pero suponiendo que es un 10% , al aplicar la estadística nos sale una probabilidad del 93% (0'93) .

Por lo tanto el rigor de estos programas de muestreo depende de los valores de n y c . Para un valor determinado de n , si dejamos c constante , cuanto mayor sea el valor de n , mayor será la rigurosidad del plan . Si mantenemos n constante y cambiamos c , el plan será más restrictivo cuanto menor sea c .

Ejemplo : si tenemos un plan $n=10$ y $c=2$, serán más severos por ejemplo $n=15$, $c=2$ o $n=10$, $c=1$ y menos severos $n=5$, $c=2$ o $n=10$, $c=3$.

Estas curvas de simulación podemos estudiarlas en el ordenador (Internet) , para ver cómo afecta el valor de n y c . Con distintos análisis periódicos puede estimarse el porcentaje de defectuosos .

En este procedimiento son identificables dos tipos de riesgo :

– El del productor : probabilidad de que un lote de calidad aceptable de rechace .

– El del consumidor : probabilidad de que equivocadamente se acepte un lote que sea rechazable .

Por eso al escoger un plan hay que jugar con estas dos cosas . La empresa tiene que establecer un consenso entre la cantidad de muestras que puede rechazar y el riesgo del consumidor .

b. Programa de atributos de 3 clases :

Fueron ideados para situaciones en las que la calidad del producto puede dividirse en 3 categorías : aceptable , dudosamente aceptable , rechazable .

Como consecuencia , se puede deducir que aquí no se puede aplicar nunca un prueba presencia/ausencia , sino que se usan los recuentos de microorganismos . Viene determinado por 4 números (n , c , M , m) :

n = número de muestras que se deben analizar del lote

M = valor del recuento máximo , que si se sobrepasa por cualquiera de las muestras examinadas , hay que rechazar el lote .

m = valor del recuento que separa la calidad adecuada de la marginal , es decir, de los dudosamente aceptables .

c = número máximo de muestras analizadas que pueden ser clasificadas en la categoría de dudosamente aceptables , antes de que sea rechazado el lote .

◇ Serán aceptables las que estén en un valor de recuento entre 0 y m .

◇ Las dudosamente aceptables son las que están entre m y M .

◇ Las rechazables son las que van de M a infinito .

Por ejemplo : $n = 5$, $M = 5 \cdot 10^2$, $m = 50$, $c = 2$; analizamos 5 unidades de muestra del lote y permitimos que en las muestras nos de un recuento , de por ejemplo coliformes entre 50 y 500 unidades formadoras de colonia en dos muestras . Pero si una sola muestra da valores superiores a 500 se rechaza el lote .

◆ **Comparación entre los planes de 2 y 3 clases :**

En el caso de 3 clases , se permite obtener más información acerca de la calidad del lote , porque tenemos la categoría de dudosamente aceptable .

Ejemplo : de 2 clases : $n = 5$, $c = 2$, $m = 10$

Ejemplo : de 3 clases : $n = 5$, $c = 2$, $m = 10$, $M = 100$

En el de 3 clases , una sola muestra que me de un valor superior a 100 me hace rechazar el lote . Pero en el de 2 clases , hay dos muestras que me pueden dar superior a 10 , sin límite por encima , podría dar por ejemplo 400 y se seguiría aceptando igual , mientras que en el de 3 clases se pone un límite superior .

◆ **Elección del programa de muestreo según el objetivo :**

La severidad de un programa de muestreo debe basarse en el riesgo que represente el consumo del producto para el consumidor , por la presencia de microorganismos patógenos o de sus toxinas , o también por la existencia de microorganismos capaces de deteriorar la calidad del producto .

Para la elección de un programa deben de tenerse en cuenta dos cosas :

- ◇ El tipo y calidad de riesgo que conlleva las especies microbianas que se están analizando .
- ◇ Las condiciones previsibles de manejo y consumo a las que el lote se someterá tras su producción .

En base a esto se han establecido una serie de categorías para escoger la severidad de los programas .

	Condiciones esperables		
Tipos de riesgo	Reducen el riesgo	Riesgo sin cambios	Pueden aumentar el riesgo
Riesgo directo para la salud (sin patógenos)	Categoría 1 3 clases : n=5 , c=3	Categoría 2 3 clases : n=5 c=2	
Riesgo para la salud bajo , indirecto			
Riesgo moderado , directo			
Gran riesgo			

La decisión de si los programas deben ser de 2 o 3 clases estriba en si se puede permitir la presencia de una muestra positiva en cualquiera de las unidades de muestra. Si la respuesta es negativa se elegirá un programa de 2 clases con un $c=0$ y si la respuesta es positiva puede aplicarse un programa de 2-3 clases , teniendo en cuenta que si se puede determinar el número de microorganismos se recomienda el programa de 3 clases .

El programa de 2 clases se utiliza para pruebas de presencia – ausencia y si son pruebas de recuento se utilizará el de 3 clases .

Las propiedades de los programas de 3 clases son más recomendables por :

- ◇ En este programa se acepta que una proporción de unidades de muestra de resultados comprendidos en el intervalo de aceptables provisionalmente , esto es importante , porque incluso un producto que se fabrique en las mejores condiciones , alguna unidades de muestra pueden dar valores por encima de los habituales sin que originen problemas .
- ◇ La experiencia también permite definir el límite por encima del cual , los recuentos indican la posibilidad de un riesgo evidente para la salud o la alteración del producto , este límite es M y se mantendrá hasta que nuevas experiencias digan que es inapropiado .
- ◇ Un programa de 3 clases permite a los organismos reguladores controlar la tendencia de los análisis , por ejemplo si se observa un aumento en el número de muestras con valores dentro del intervalo de aceptables provisionalmente , puede indicar que hay falta de control .

◆ Determinación de los valores de m y M :

- ◇ El valor de m : es la cantidad aceptable y esperable que un microorganismo puede alcanzar en un producto . Si el microorganismo analizado es un patógeno , m puede ser 0 o un número muy pequeño que se corresponda con el nivel de detectabilidad de la prueba .

◇ El valor de M : es el nivel de contaminación de riesgo o inaceptable , alcanzado merced a unas prácticas higiénicas deficientes o condiciones de almacenamiento inadecuadas . Son varias las estrategias para establecer el valor de M :

- Como un *índice de utilidad del producto* : en este caso se relaciona la cantidad de microorganismos con la alteración ya evidente (olor , sabor ...) o con una vida del producto inaceptablemente corta .
- Como un *índice higiénico general* : se relaciona la cantidad de microorganismos indicadores con una condición higiénica claramente inaceptable .
- Como un *peligro para la salud* : relaciona la cantidad de bacterias con una enfermedad (dosis mínima infecciosa) . para este fin , se considera la máxima cantidad de producto consumido y la sensibilidad de las personas que probablemente lo consuman .

M va a estar definida siempre por el riesgo y el valor de m va a quedar definido simplemente por las buenas prácticas de fabricación .

◆ Probabilidad de aceptación satisfactoria :

La severidad de un programa se mide por la probabilidad de aceptación de los lotes en los que una determinada proporción de unidades es rechazable :

Tenemos un lote con : $5\% > M$ (no aceptable) y $30\% > m$ (dudosamente aceptable), $n=5$, $c=3$ (3 clases) . La probabilidad de aceptación que sale es de 0'75 , es decir , acepto 3 de cada 4 lotes . Por lo que no es nada severo . Si $n=60$, $c=0$ (2 clases) , la probabilidad de aceptación es de 0'05 , es decir , acepto 1 lote de cada 20 , por lo que este sí que es estricto . En un trabajo , de por ejemplo sanidad , se utilizaría el primer programa , el segundo es muy costoso , incluso el primero para la empresa es una gran pérdida el perder un lote de cada 4 y esto le obliga a la empresa a mejorar la productividad .

Por lo que para hacer un plan más severo podemos aumentar n o disminuir c , también hay que tener en cuenta lo que supone para la empresa y para hacerlo más severo alejamos m de M .

• Planes de muestreo por variables :

Es poco usado . Se emplean cuando se puede asumir que los microorganismos se distribuyen en lote de modo normalmente logarítmico . Los recuentos transformados en logaritmos siguen una distribución normal . Ocurre por ejemplo cuando el lote se prepara con condiciones muy uniformes .

En estas condiciones , este plan consigue una discriminación mejor haciendo pleno uso de los datos numéricos , en lugar de asignar sólo a categorías los resultados del análisis .

Una distribución normal viene determinada por dos parámetros (media y desviación típica - , -) si consideramos una variable el logaritmo de los recuentos , v sería el logaritmo de los recuentos , vamos a tener : $v \sim N(,)$

Asumiendo esta distribución normal puedo saber en cada momento que porcentaje de la población está por encima de un valor de v .

Para trabajar con la distribución normal hay que tipificar la variable :

$$(V - \mu) / \sigma = K \sim N(0, 1)$$

En las tablas , puedo saber el porcentaje que está por encima de un valor , en función del valor de k en las tablas . Por ejemplo : para $K=0$; $v=$, por lo que aquí estamos en que el 50% de la población está por encima

de ese valor . Si $K=1$, $v= +$, esto sería que el 16% de la población está por encima de v . Si $K=1'65$, $v= + 1'65$, por lo que sería el 5% . Cada porcentaje de la población se corresponde con un valor de K .

Si producimos un lote con 100 unidades de muestra , el que lo aceptemos o no dependerá del porcentaje de unidades defectuosas . Si por ejemplo , el 10% de las unidades da superior a un determinado valor , rechazo el lote .

$+ K.$ = v v es el valor que pongo como límite

Para que yo rechace el lote tendría que verificarse que $+ K. > v$. Si en una distribución normal el 10% da mayor que el valor de v lo rechazo .

No se puede muestrear todo el lote , sino que sólo se puede una muestra , por lo que trabajamos con la media muestral y la desviación típica muestral :

$X + K1.S > V$ Si esto ocurre se rechaza la muestra

7

Por ejemplo : límite crítico = 10 ($V=7$) , quiero analizar 5 muestras ($n=5$) , si el 10% de las muestras dan mayor que V , rechazo el lote . Además , quiero tener la certeza del 95% de aceptar o rechazar . En la tabla obtenemos el valor de $K1=3'4$: $x + 3'4.S > 7$.

♦ Muestreo investigativo y muestreo riguroso :

En algunas circunstancias cuando existe un problema microbiológico reconocido o potencial , se necesitan muestreos investigativos . Suelen hacerse cuando el lote no pasa la investigación rutinaria . El muestreo investigativo suele hacerse para confirmar que existe un problema , para contribuir a la descripción y alcance de un problema y obtener información sobre el origen de un problema .

Suelen ser más complicados que los de rutina , ya que cuando se ponen en marcha se hace en respuesta a un problema determinado .

En ciertas circunstancias pueden precisarse muestreos rigurosos que precisan una mayor cantidad de muestras y hasta pueden variarse las características del plan de muestreo . Estas inspecciones pueden realizarse para establecer cargas económicas adicionales cuando hay historial de carga microbiológica deficiente o cuando la importancia del producto lo requiere . Se hace cuando se quiere que una empresa mejore su producción .

◇ Programas de muestreo para situaciones con riesgo directo de presencia de patógenos :

Los juicios sobre los riesgos derivados de la existencia de patógenos se basan en análisis microbiológicos , pero los resultados de tales análisis y las conclusiones que de ellos derivan dependen de la sensibilidad del método empleado . Por eso , es muy habitual emplear el concepto de tolerancia cero .

Tradicionalmente , se especificaba que en un producto debería existir la ausencia de patógenos , es decir , que los programas de muestreo $c=0$ y esto es lo que se denomina tolerancia 0 . Pero esta situación debería ser considerada incorrecta , porque:

* Ningún programa de muestreo puede asegurar la ausencia total de un microorganismo . Incluso cuando $c=0$ no se puede garantizar que el lote esté exento de ese microorganismo .

* Los programas en los que $c=0$, no son necesariamente los más exigentes , por ejemplo , un programa $n=95$, $c=1$, aceptará lotes rechazables menos frecuentemente y lotes buenos con más frecuencia , que lo que haría un programa con $n=60$, $c=0$, es decir , el primero es más discriminativo , aún siendo el segundo $c=0$.

* No es posible ofrecer productos libres de patógenos , ano ser que sean productos estériles , de hecho , suelen detectarse Salmonellas en carne . Un programa de muestreo que se ajuste a esta situación , es más realista que otro que se base en la ausencia .

Todo esto ilustra la dificultad de establecer un compromiso racional entre el deseo de eliminar completamente los microorganismos patógenos de los productos , para proteger a los consumidores y los que se consideran métodos de producción practicables . Así , los programas de muestreo severos de $c=0$ representan un ideal impracticable . Por ejemplo : Salmonella , si $n=60$, $c=0$, en carne rechazaríamos prácticamente toda la producción . Se aplican planes menos severos , de por ejemplo : $n=5$, $c=1$, así rechazaríamos 1 lote de cada 12 y aún así la empresa no podría mantenerse . Se fija un límite M , que desde el punto de vista sanitario sea bueno , pero también intentando que la empresa no pierda .

TEMA 8 : NORMAS GENERALES PARA EL MUESTREO

Como la finalidad del muestreo en Microbiología es obtener fundamentalmente una muestra representativa del producto para el análisis inmediato y conseguir resultados fiables sobre su estado higiénico – sanitario o sobre los niveles de alterantes , es necesario que la muestra en el momento de su análisis reúna las mismas condiciones microbiológicas que tenía el producto antes de ser muestreado .

Por esto , son necesarias unas pautas para conseguir la muestra idónea . Todas las personas implicadas en el muestreo deben tomar todas las medidas adecuadas para prevenir hasta donde sea posible , cualquier tipo de contaminación , tanto del producto

como unidades de muestra , durante el transporte al laboratorio , su almacenamiento , manipulación y durante el análisis .

♦ Material utilizado en el muestreo :

El material para la toma de muestras en Microbiología debe de reunir características que lo hagan adecuado para este tipo de análisis .

– Envases para la toma de muestras : los envases deben estar perfectamente limpios , secos , estériles y sin fugas , su tamaño guardará relación con la muestra que se vaya a tomar , serán herméticos e inaccesibles a cualquier contaminación posterior a su esterilización , los envases que vayan a reutilizarse deben ser de una calidad y material apropiados , para que puedan esterilizarse repetidas veces . Ejemplos : envases de vidrio de boca ancha , envases de plástico esterilizable , bolsas de plástico esterilizadas , envases metálicos .

– Instrumentos para la apertura de envases : todos estériles , ejemplo : tijeras estériles , pinzas estériles , cuchillos estériles , taladros estériles ...

– Etiquetas y material para marcar : toda muestra debe ser correctamente etiquetada e identificada , ejemplos : etiquetas de cartulina , etiquetas adhesivas , lápiz grueso , rotuladores , bolígrafos .

– Equipo de esterilización : en el laboratorio los envases para muestras y otro tipo de material , se esteriliza en el autoclave o se puede usar un horno , mediante calor seco , que puede alcanzar los 170°C (y que el material aguante) , en el trabajo de campo se puede utilizar un mechero de alcohol .

– Refrigeración : casi siempre , las muestras deben , mantenerse en frío para preservar sus características

microbiológicas , para ello tenemos que llevar una nevera portátil , una caja de plástico aislante o un congelador portátil .

– Líquidos desinfectantes : muchas veces para la toma de muestras es necesario desinfectar superficies de contacto , como por ejemplo los grifos , de ahí que sea necesario usar un líquido desinfectante , como el alcohol etílico al 70% (es mejor desinfectante diluido , porque el agua facilita la acción penetrante) , una disolución de hipoclorito sódico (lejía) y también tener algodón hidrófilo .

– También sería conveniente un termómetro .

Todo el material que entra en contacto con la muestra tiene que estar estéril .

♦ Condiciones para el muestreo :

Es importante identificar y comprender cada factor que puede influir en el proceso de la toma de muestras , así se podrán evaluar estos factores y se adoptarán las medidas de control necesarias .

En el proceso de toma de muestras pueden estar implicadas hasta 3 personas: el encargado directo de la toma de muestras , el recepcionista del laboratorio que recoge la muestra y el técnico analista .

En muchos casos , las tres tareas son realizadas por una única persona . De todas formas , el encargado de la toma de muestras es el que tiene una influencia más directa sobre los factores críticos , por lo que se debe poner total atención en su preparación y dirección . Para obtener la muestra representativa que se va a analizar se deben cumplir ciertas condiciones :

* La persona destinada a hacer el muestreo debe conocer perfectamente su finalidad e importancia , por lo que estará bien entrenada para actuar como corresponda en cada caso . Dicha persona deberá estar debidamente autorizada para ejercer su labor

* A ser posible , las unidades de muestra se tomarán en sus envases originales

* En ocasiones , las muestras que se recogen son únicas (productos sospechosos de toxoinfecciones) por lo que hay que extremar las precauciones para no estropear la muestra .

* El muestreo debe hacerse siguiendo la técnica del muestreo aleatorio .

* Si se trata de cajas grandes , que contienen paquetes pequeños , se escogen al azar dichas cajas y paquetes .

* Cuando los envases son muy grandes y difíciles de transportar , se toman asépticamente muestras representativas y se pasan a envases estériles más pequeños .

* Los productos a granel , se muestrean tomando porciones de distintas zonas con material estéril y pasándolas asépticamente a envases estériles .

* Si el producto tiene salida por un conducto se desechan las primeras porciones , si son productos líquidos se agitarán en su envase y se pasarán asépticamente a envases estériles .

* Si la toma es de un agua de grifo , hay que considerar que estos pueden contaminarse fácilmente a partir del medio ambiente , y en sus partes internas pueden desarrollarse microorganismo formando un , por lo tanto , es importante que el grifo se limpie adecuadamente y se deje correr abundante agua . Los grifos de metal o cerámica , pueden ser desinfectados durante el flameado con un soplete . Los grifos no resistentes al calor , deben ser desinfectados utilizando el alcohol o la lejía . Después de la desinfección se abre el grifo y se

desecha la primera porción , dejando fluir el agua durante 1–2 minutos antes de recogerla en el recipiente estéril , este permanecerá cerrado hasta el momento de llenarlo y posteriormente será cerrado convenientemente en condiciones asépticas . Es importante dejar un espacio aéreo en el recipiente , al menos de 2'5 cm , para poder agitarlo fácilmente , porque es muy importante la homogeneización .

* Para productos sólidos , se tomarán las muestras en varias zonas y estas muestras se introducen en recipientes estériles adecuados .

* Es conveniente anotar la temperatura de almacenamiento del producto e incluso su propia temperatura .

El muestreo durante un brote de enfermedad puede ser muy distinto al muestreo rutinario . En base al juicio del microbiólogo , las muestras del producto y de las superficies de los utensilios usados en su fabricación deben recogerse en el punto que se estima más probable para recoger a los microorganismos patógenos , es decir , donde pueda haber ocurrido la contaminación o el crecimiento de los mismos . Se deben recoger unidades de muestra del producto terminado y del producto antes del procesado o de sus ingredientes . Si el producto está formado por varios componentes , se deben recoger muestras de cada uno de ellos , puesto que podrían haber sido preparados por personas o procedimientos distintos . También deben tomarse muestras de las superficies o de otros entornos que contacten con el producto .

◊ Una vez que tenemos la muestra viene la preparación de la muestra para su envío al laboratorio :

Una vez tomadas las muestras se empaquetan de forma adecuada según su naturaleza , para evitar su rotura o deterioro , los paquetes se etiquetarían y marcarían inmediata y correctamente , cuidando que la etiqueta quede bien fijada . La etiqueta irá numerada y adecuadamente identificada para que concuerde con el informe de muestreo que debe acompañar siempre a la muestra . Este informe se identificará con los datos del envase y recopilará todos los datos que puedan ser interesantes para el microbiólogo .

- Nombre y dirección de la persona que tomó la muestra .
- Nombre y dirección de la persona/empresa ... donde se tomó la muestra
- Fecha , lugar y hora donde se tomó la muestra .
- Clase de productos (breve descripción de lo que es ese producto)
- Nombre del fabricante , vendedor , importador ...
- Razón por la que se realiza el muestreo
- Número , tamaño y marca de las unidades que forman el lote .
- Forma de transporte , junto a origen y destino
- Fecha de embarque y llegada del lote
- Método de muestreo utilizado
- Temperatura del producto en el momento del muestreo
- Temperatura ambiental y de almacenamiento
- Forma de transporte y condiciones de envío de las muestras al laboratorio .

Una de las cosas más importantes es anotar la procedencia de la muestra .

◊ Transporte y conservación de la muestra :

El espacio de tiempo transcurrido entre la toma de muestras y el comienzo del análisis en el laboratorio debe ser lo más corto posible , para que en los resultados de los análisis quede reflejada con la mayor fidelidad la microbiota que cuantitativa y cualitativamente estaba presente en el producto en el momento del muestreo .

Si no puede procesarse la muestra en la hora siguiente se guardará en una nevera de hielo , nunca se congelan las muestras . esto en el transporte al laboratorio (porque si se congela se forman cristales y se mueren los

microorganismos) .

Este transporte debe ser rápido y mantenerse las condiciones de refrigeración o congelación adecuadas . si el producto está enlatado (producto estable) o está seco , el enfriamiento de las unidades de muestra es innecesario , pero deben evitarse temperaturas superiores a 40°C .

Si el producto está descongelado y es perecedero , enfriar las unidades de muestra rápidamente hasta 0–5°C y mantener esa temperatura durante el transporte y no volver a congelar la muestra . Mantener las unidades de muestra de un producto congelado en tal estado hasta su análisis .

Cuando el método de recuento no está diseñado para diferenciar microorganismos vivos de los muertos , las muestras pueden conservarse añadiéndoles formaldehído o glutaraldehído . Dicha preparación es apropiada para la observación directa al microscopio .

SECCIÓN 4 . MÉTODOS DEL EXAMEN MICROBIOLÓGICO DE PRODUCTOS COMERCIALES

Existen una serie de razones que justifican la necesidad de analizar los productos comerciales , con el fin de determinar tanto cuantitativa como cualitativamente sus microorganismos .

Estas razones :

- Asegurar que ese producto cumpla con las normas microbiológicas establecidas.
- Que las materias primas que llegan a la fábrica cumplan con las especificaciones microbiológicas exigidas o pactadas con el productor .
- Que se mantiene el control del proceso y la higiene en la fabricación .

Los métodos del examen microbiológico son muy variados y dependientes del producto que se va a analizar . En la elaboración de los análisis microbiológicos se pueden realizar las siguientes cosas :

- * La estimación del número total de microorganismos
- * La estimación del número de microorganismos indicadores
- * La estimación del número de microorganismos alterantes
- * La estimación del número de patógenos específicos
- * Análisis de los productos metabólicos de los microorganismos , por ejemplo sus toxinas .

TEMA 9 : PROCESADO DE LAS MUESTRAS

Llegadas las muestras al laboratorio , es necesario seguir unos pasos dentro de la sistemática analítica microbiológica , que serán establecidos por el microbiólogo teniendo en cuenta la clase de producto , su procedencia y la finalidad del análisis .

La operación de preparación de muestras para el análisis microbiológico exige una reglas de manipulación asépticas muy estrictas , así como la esterilización de material y diluyentes estériles .

Se deben evitar contaminaciones en el momento de la apertura de los envases que contienen las muestras , para ellos es conveniente eliminar la contaminación de la superficie en y alrededor del envase mediante flameado o frotando con alcohol al 70% y quemando al aire el exceso de alcohol .

Cuando un producto conste de distintos componentes o capas , es deseable determinar la contaminación de cada componente , pero hay que tener en cuenta que supone un mayor coste y tiempo , por eso se debe utilizar en productos sospechosos de toxoinfección .

En muy pocas ocasiones , las poblaciones microbianas que se encuentran en los productos están en concentraciones convenientes para las mediciones o recuentos , por lo tanto los microorganismos de la muestra tienen que ser concentrados o diluidos. Las muestras con demasiados microorganismos han de modificarse a las concentraciones adecuadas mediante diluciones seriales . la dilución seriada es el método de diluir secuencialmente un cultivo o muestra a través de una serie de volúmenes conocidos , conteniendo una solución estéril . El líquido que se usa para hacer estas diluciones puede ser una dilución salina , medio de cultivo o cualquier otra solución estéril que no altere la viabilidad de las células presentes .

Las muestras con números demasiado bajos de microorganismos hay que concentrarlas , si es un líquido por filtración , centrifugación y enriquecimiento selectivo .

Hay que hacer distinción entre el procesamiento de productos sólidos y líquidos :

% **Productos sólidos** : cuando se trata de productos sólidos es necesario someterlos previamente a una suspensión , utilizando un eluyente estéril y una posterior homogeneización con la finalidad de liberar los microorganismos presentes en el producto . Esto es una tarea difícil , en los cuales los microorganismos suelen estar adheridos a las partículas .

◇ En el procesado se pueden distinguir las siguientes etapas :

- * Toma de muestras analítica
- * Pesada de la muestra
- * Dilución
- * Triturado
- * Preparado de las diluciones seriadas

◇ Toma de la muestra analítica en laboratorio :

La fracción de muestra destinada al análisis microbiológico (unidad analítica) debe ser representativa de la totalidad de la unidad de muestra y dejando parte de ella por

si hay que repetir el análisis . Siempre que sea posible , se utilizará una cantidad lo más voluminosa posible , que permita buena trituración y homogeneización . Si el producto está integrado por varios componentes , se tomarán fracciones representativas de cada uno de ellos , en superficie y en profundidad . Si la muestra viene congelada , pero puede desmenuzarse fácilmente , no se espera a que se descongele , hay que descongelarla parcialmente en sus envases originales y siempre en refrigerador (2-5°C) .

La toma de las muestras analíticas se hará en condiciones asépticas muy estrictas , con todo el material estéril . A ser posible usando cámaras de flujo laminar y siempre en las proximidades de la llama de un mechero .

◇ Pesada de la muestra :

La técnica más sencilla consiste en : tarar el recipiente estéril que se va a utilizar , introducir asépticamente una porción de la muestra en el recipiente y pesar de nuevo para determinar el peso neto .

◇ Dilución y diluyentes :

Con una probeta graduada estéril , se añadirá al recipiente donde está la muestra pesada , la cantidad de diluyente estéril para obtener la dilución deseada que denominaremos dilución madre . Por ejemplo : si la dilución madre debe tener un valor de 1:10 , se emplea un título : la cifra de pesada se multiplica por 9 y el resultado es el número de mililitros de diluyente que tendremos que añadir .

Características de los diluyentes : la característica principal es que el diluyente no produzca una modificación analítica ni cuantitativa en la microbiota del producto , es decir , sin suprimir ni favorecer su crecimiento . La eficacia de la recuperación de los microorganismos depende en gran parte de la composición química y la presión osmótica del diluyente , del tiempo de mezcla , de la temperatura , del elemento dispersor y del grado de agitación .

En Microbiología son habituales los siguientes diluyentes : agua de triptona , solución Ringer $\frac{1}{4}$, agua de peptona tamponada .

Es evidente que las condiciones que no son compatibles con los requerimientos fisiológicos de grupos particulares de microorganismos , producirán resultados inferiores a los reales , debido a la pérdida de viabilidad . Por ejemplo , en un recuento de psicrófilos (viven a bajas temperaturas) , los diluyentes , pipetas ... tendrá que estar enfriado .

◇ Triturado de la muestra :

Es una operación importante y cuidadosa , porque hay que evitar la destrucción de los microorganismos y es necesario obtener una mezcla homogénea .

Una vez pesada la muestra y mezclada con la cantidad adecuada de diluyente , se procede a su trituration para obtener la dilución madre , para ellos se emplean las trituradoras , que hay varios tipos , como la denominada *jarra* (consiste en un envase

de vidrio provisto de una hélice conectada a un motor) *el vástago* (con una hélice en su extremo que se introduce en la mezcla que se va a triturar) , el *tritador de paletas o stomaches* (actúa golpeando rítmicamente con unas paletas la muestra , previamente introducida en una bolsa de plástico estéril con el diluyente , los choques producidos por las paletas disgregan el producto y ponen a los microorganismos en suspensión) .

◇ Preparación de diluciones seriadas :

Como se desconoce la carga microbiológica inicial de la muestra , es necesario preparar diluciones seriadas de la misma , para poder realizar un recuento . Se preparan usando el mismo diluyente que la suspensión madre y consiste en realizar una serie de diluciones decimales que servirán para realizar los análisis necesarios .

◇ Protocolo de análisis de un alimento sólido :

Partimos del alimento , pesando una determinada cantidad , suele pesarse en las bolsas que después se usan en el triturado , se tara la bolsa y se pesa . Una vez que tenemos el alimento pesado en la bolsa , se añade el diluyente , se pone en el stomacher y pasado el tiempo que queramos , el alimento va a quedar en partículas muy pequeñas y los microorganismos quedan en el eluyente (homogeneización) , se saca de la bolsa y se pone en un recipiente estéril . Así tenemos la dilución madre (con el alimento y el eluyente) , después se van haciendo diluciones seriadas , teniendo tubos de 9 ml de eluyente y añadiendo 1 ml de la muestra diluida y así sucesivamente de un tubo a otro . Una vez mezclado se hace la siembra de cada una de las diluciones .

Si tenemos , por ejemplo , 28 gramos de alimento : $28 \times 9 = 252$ ml (para la dilución 1:10) , tenemos que tener una probeta estéril de 250 ml y después con una pipeta añadir los 2 ml . peso el alimento , por ejemplo 28 gramos y luego tengo preparada una cantidad fija de diluyente , por ejemplo de 200 ml , cojo toda la botella y la vuelco y tengo que calcular ahora qué dilución he hecho : $28 \text{ g} + 100 \text{ ml}$ de eluyente . Si en lugar de 28 g tomo 28 ml y los hecho en los 100 ml de eluyente : $128/28 = 4'57$, estoy diluyendo el de 28 ml 4'57 veces . Cuando tengo gramos , se considera que los gramos equivalen a ml : $128/28 = 4'57$.

Los tubos de la serie se mantendrán en el frigorífico hasta el comienzo del análisis si este se retrasa , el cual no deberá demorarse más de 2 horas . Sin embargo , como muchos productos industriales han sido sometidos a distintos procesos (deshidratación, congelación ...) , durante los cuales las células microbianas sufren inhibición , se pueden mantener estas diluciones ya preparadas a temperaturas de 25–30°C durante media hora , para permitir la redivificación de las células antes de la siembra .

% **Productos líquidos :**

El procesado de productos líquidos como agua , refrescos ... es más sencillo , ya que no es necesaria la trituración . Se pueden muestrear con pipetas directamente , por

supuesto después de mezclarse bien . La muestra obtenida ya es la suspensión madre y a partir de ella se pueden realizar las diluciones seriadas .

TEMA 10 : MÉTODOS TRADICIONALES DEL ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO

En Microbiología , el fundamento de la detección de microorganismos por métodos clásicos de análisis es de dos tipos :

- Detección y recuento de microorganismos individuales
- Detección de presencia/ausencia

La mayoría de los métodos microbiológicos están diseñados para detectar o enumerar, por los métodos ya vistos , tipos específicos de microorganismos que denominaremos microorganismos diana . Los otros microorganismos que pueden estar presentes en la muestra , no deben de ser detectados ni deben de interferir en el proceso analítico , estos son los microorganismos no diana o también llamados interferentes , microbiota competitiva o microbiota de fondo .

Si un microorganismo no diana es identificado erróneamente como diana , produce un falso resultado positivo (falso–positivo) y un falso–negativo es la identificación incorrecta de un microorganismo diana cuando no da lugar a una reacción característica típica , es decir , no se detecta .

♦ **Examen microscópico directo :**

Cuando se analiza microscópicamente un producto , no se debe de aprovechar la posibilidad de descubrir la presencia de microorganismos observando la muestra directamente al microscopio , es un procedimiento muy sencillo , ya que se puede montar la preparación con una pequeñísima cantidad de muestra , ponerle una gota de agua y el cubre .

Así , resulta fácil ver levaduras y mohos y a veces con paciencia ver bacterias . Pero esta técnica es muy limitada , ya que sólo se examina una pequeñísima porción del producto , con lo que el límite de detección es muy elevado "10 . Además , no permite la identificación de los microorganismos , salvo que se utilice fluorescencia . Se aplica sobre todo a líquidos , porque es más fácil hacer la preparación .

Dentro de las técnicas de observación microscópica está la *técnica del filtro epifluorescente* , que se emplea

sobre todo en cerveza y leche , fue ideada para obtener una respuesta rápida de la calidad de leches de granja y se usa sobre todo para muestra líquidas no turbias . Se hace pasar un volumen de muestra a través de un filtro de membrana de policarbonato , que retiene a las bacterias . A continuación se tiñen con un colorante fluorescente , se lava la muestra para retirar el exceso de colorante y se observa en un microscopio de epifluorescencia , en el cual la luz viene a través del objetivo , ilumina desde arriba debido a que la muestra se encuentra sobre un filtro . Un colorante muy usado es el naranja de acridina , que es un fluorescente metacromático (con doble coloración) , tiene fluorescencia de color verde o amarilla , dependiendo de las características de la célula (en células vivas emite fluorescencia amarillo–naranja y en células muertas o dañadas emite fluorescencia verde) .

♦ Métodos de cuantificación de poblaciones microbianas :

Existen varias formas de cuantificar las poblaciones microbianas , las cuales se pueden agrupar en dos tipos de procedimientos : métodos directos y métodos indirectos .

- Métodos directos : son los que permiten estimar directamente el número de células de la muestra .
- Métodos indirectos : usan parámetros que no son directamente el número de células , sino otros parámetros relacionados con la cantidad de población , como por ejemplo el peso seco , cantidad de proteínas , cantidad de clorofila ...

Pero en muchos estudios es muy importante conocer cuántos microorganismos vivos hay en la muestra y para saber si un microorganismo está vivo o muerto se usa una definición : un microorganismo es viable si es capaz de formar colonias en un medio de cultivo sólido . Por lo que el número de viables es el número de células capaces de dividirse en un medio sólido y esto supone el problema de que no hay un medio de cultivo ideal que soporte el crecimiento de todos los microorganismos y además las colonias formadas pueden provenir de más de un microorganismo que permanecieran muy próximos , por eso los microbiólogos emplean el término de unidad formadora de colonias (UFC) , más que recuento de viables .

• Métodos directos :

Permiten obtener directamente el número de células en un volumen , cultivo ... Pero este número de células puede ser de dos tipos : sólo viables o células totales (vivas y muertas) .

Para el *recuento de viables* existen varias posibilidades :

◇ Técnicas de recuento en placa :

Es el mejor método para determinar células vivas . Se realiza sembrando un determinado volumen de la muestra sobre placas con medio de cultivo , el cual debe permitir el crecimiento o de una gran cantidad de microorganismos o sólo de los que nos interesan . Se basa en la hipótesis de que todas las células formarán una colonia y que todas las colonias surgen de una sola célula (aunque no va a ser así exactamente)

Dentro de los medios de cultivo tenemos : medios selectivos , medios enriquecidos y medios diferenciales . En general , todos los medios de cultivo son selectivos , porque no permiten el crecimiento de todos los microorganismos .

Antes de hacer las siembras hay que hacer las diluciones seriadas . A partir de cada dilución hay que hacer una siembra y una vez que está incubado se escoge para contar aquella placa que nos de un conteo entre 30 y 300 colonias y sabemos de que dilución procede .

Existen tres métodos para hacer el recuento :

- *Recuento por siembra en superficie* : a partir de la dilución madre se hacen las seriadas , de ellas se toma una parte y se añade a la placa que tiene el medio de cultivo sólido y con un asa se extiende la siembra por la superficie de la placa y después de incubada se hace el recuento . Las ventajas son que permite ver la morfología , color y textura de las colonias y además es el mejor métodos para el crecimiento de aerobios estrictos , la desventaja es que lleva más tiempo , hay que usar el asa de Drigalski que hay que esterilizar y además sólo permite sembrar volúmenes muy pequeños (hasta 0'1 ml) .
- *Recuento por siembra en inclusión* : se siembra en placas Petri vacías y a continuación se añade el medio de cultivo fluido todavía y con movimientos circulares ligeros se homogeniza . Por lo que los microorganismos crecen dentro del agar una vez solidificado .
- *Recuento por filtración de membrana* : un volumen conocido se filtra a través de una membrana estéril de 0'22 micras , con lo que las bacterias quedan retenidas en el filtro y después es el filtro el que se coloca sobre el medio de cultivo y se incuba . Para facilitar la filtración cuando el volumen de muestra es muy pequeño , esta se disuelve en un volumen indeterminado de una solución estéril . Este volumen no influye en el recuento porque está estéril , y se está filtrando toda la muestra , por lo que sólo se recuenta lo que hay en 1 ml de muestra .

◊ Método de las gotitas de agar : la muestra se diluye realizando diluciones seriadas en tubos con el medio de cultivo sólido , pero fundido , y luego se transfiere a una placa Petri gotitas de 0'1 ml de cada dilución , se incuba y se cuentan las colonias con una lupa de 10 aumentos . Este método suele ser más rápido que los métodos convencionales de recuento en placa y gasta mucho menos material .

◊ Técnicas del número más probable (también de viables) : la técnica consiste en sembrar en distintos tubos , conteniendo un medio de cultivo líquido apropiado , distintos volúmenes de la muestra problema . Una vez realizada la incubación de los tubos , se valora aquellos en los que se produjo crecimiento de los microorganismos que nos interesa cuantificar , anotando el número de tubos de cada dilución realizada que dieron positivos. Con este resultado se va a unas tablas estadísticas realizadas para esto (tablas del NMP) , que dan el número más probable de microorganismos considerados por unidad de volumen , junto con el intervalo de confianza para este valor . A veces , este método se considera semicuantitativo , porque sólo da una estima .

◊ Recuento microscópico con cámara de recuento : cuando nos interesa realizar un recuento de células totales , uno de los métodos más usados es el de la cámara de conteo usando un microscopio . es un método directo , ya que determina directa y exactamente el número de células en un determinado volumen . Para ello , se coloca una suspensión de los microorganismos en las cámaras de recuento , las cuales permiten determinar el número de partículas que hay en un determinado volumen . Las partículas se cuentan visualmente , con ayuda de un microscopio .

Uno de los tipos de cámaras más utilizado , son las de Neubauer ? , tienen una especie de H en el medio , que está un poco levantada , sobre donde puedo colocar un cubre , a los lados lleva una escala , de manera que cada cuadro tiene 1 mm de ancho y largo . Cuando coloco el cubre sobre la H , se llenan estas dos cámaras con un poco de agua y las células se distribuyen por los cuadrados de 1mm x 1mm y se que la altura que separa el cubre del fondo de la cámara es de 0'1 mm , por lo que conozco el volumen : $1\text{mm} \times 1\text{mm} \times 0'1\text{mm} = 0'1\text{mm}^3 = 0'1\text{ l}$

Se pueden hacer varios conteos para obtener una buena media . Se usa mucho en industrias lácteas , para evaluar la calidad de leche pura y a veces se mezcla con técnicas de fluorescencia y con naranja de acridina se puede hacer el conteo de células vivas/células muertas .

◇ Recuento electrónico : para realizar recuentos de microorganismos se pueden utilizar un instrumento electrónico llamado contador de partículas de Coulter . Lleva una sonda en cuya base lleva un orificio , en ese tubo lleva un electrodo conectado a una fuente de voltaje y por fuera del tubo lleva otro electrodo . El tubo lleva dentro una solución electrolítica (conduce la electricidad) . El circuito se cierra con la muestra , colocándola en una cubeta con una solución electrolítica y ya puede pasar la corriente . Al Coulter se le puede indicar el volumen que me interesa contar , porque está asociado a una bomba de vacío que chupa a través del orificio el volumen que interesa . Al chupar la bomba , las células comienzan a entrar por el orificio y cuando pasa una partícula cae la corriente y después se vuelve a recuperar . Este cambio de corriente además es proporcional al tamaño de la partícula y le podemos indicar que sólo cuente las partículas de un tamaño determinado , mediante un calibrado . Uno de los inconvenientes es que pueden pasar más de una célula juntas o también que pueden pasar partículas que no son células y se cuentan como células .

* *Citometría de flujo* (dentro del electrónico) : permite , además de contar , determinar algunas de las características de las células en una suspensión líquida . Las células suspendidas una por una son llevadas a un detector por medio de un conducto de flujo , al pasar por el detector , sobre las células se incide una luz láser , de tal manera que se puede detectar fluorescencia , absorbancia y dispersión de luz , que permiten obtener información sobre propiedades celulares .

b. Métodos indirectos :

- ◇ Determinación del peso seco : como resultado del crecimiento , se produce nueva biomasa . Una técnica que permite realizar una estima indirecta de esta biomasa es la determinación del peso seco de una alícuota de un cultivo . Se toma una alícuota del cultivo y se retiran las células , bien por centrifugación o filtración . En la centrifugación previamente hay que pesar el tubo donde vamos a retirar las células , a continuación lo ponemos en una estufa para eliminar el agua , después se vuelve a pesar el tubo y por la diferencia sacamos el volumen de lo centrifugado . En la filtración , se pesa previamente el filtro , se seca y se vuelve a hacer la diferencia . Después se hacen los cálculos . Así , podemos saber cuanto pesa una célula .
- ◇ Determinación de algún componente celular : si la cantidad de una sustancia es constante en cada célula , la cantidad total de dicho constituyente celular , estará directamente relacionada con la masa celular total . Por ejemplo para proteínas , ADN , ARN , clorofila ...
- ◇ Medidas turbidimétricas : la turbidimetría mide la cantidad de luz transmitida por una suspensión . Las poblaciones microbianas en medio líquido actúan como suspensiones de partículas , teniendo la capacidad de dispersar la luz que incide sobre estas . El grado de dispersión será proporcional a la concentración de células presentes . Podemos medir la cantidad de luz que pasa a través de esa dilución de partículas o cultivo y mediante una calibración saber el número de partículas de esa dilución aproximadamente y esto se hace con el espectrofotómetro .
- ◇ Determinación del ATP : el ATP se encuentra en todas las células vivas , ya que es el agente universal de transferencia de energía , pero se deteriora rápidamente en el momento en que la célula muere . Por esto , la medida del ATP también se puede considerar como una medida indirecta de la biomasa .

Es útil , sobre todo , en productos acelulares como por ejemplo las bebidas , en las cuales es fácil separar las

células de los microorganismos del resto del líquido . Pero es compleja en el caso de alimentos , en los cuales previamente habría que eliminar el ATP del alimento que no son células , sin tocar el ATP de los microorganismos .

El ATP se puede medir gracias a una técnica muy sencilla , en la que se usa una enzima proveniente de un organismo (la luciérnaga) , los cuales producen luz de forma natural , debido a una reacción enzimática . La luciferasa actúa sobre la luciferina y en presencia del ATP produce oxiluciferina , hidrolizando el ATP , produciendo CO₂ y luz . A más ATP mayor será la cantidad de luz .

Hoy en día se vende la luciferina y luciferasa purificada y en el momento en que se añade el ATP se produce luz , pudiendo calibrar la cantidad de luz emitida por una cantidad de ATP .

luciferasa

ATP + D-luciferina + O₂ oxiluciferina + PPi + AMP + CO₂ + luz

TEMA 11 : MÉTODOS RÁPIDOS PARA LA DETECCIÓN , ENUMERACIÓN E IDENTIFICACIÓN

Realizar un test en Microbiología suele ser una labor que consume gran cantidad de tiempo y trabajo , de ahí la necesidad de desarrollar métodos rápidos y fáciles para cuantificar y detectar microorganismos . Muchas veces es necesario dar resultados rápidos , que permitan tomar decisiones lo más pronto posible , lo cual muchas veces es imposible , debido a :

- La necesidad de la espera a que los microorganismos crezcan en los medios de cultivo y podamos así visualizar su presencia , siendo además muchos de ellos de crecimiento lento .
- Los microorganismos de interés están presentes a menudo en cantidades muy pequeñas con respecto al resto de la microbiota acompañante , de ahí que sea necesario hacer un preenriquecimiento previo en medios selectivos .
- En función del producto a analizar , es necesario realizar un previo tratamiento o purificación de los microorganismos , para evitar las interferencias de la matriz en la que estos se encuentran (decantaciones , trituraciones ...) .

Los métodos rápidos ofrecen la posibilidad de evitar algunos de estos pasos , con el ahorro de tiempo y trabajo . pero no siempre se dispone de estos métodos y a veces son caros .

◊ Pruebas de reducción de colorantes : considerado también como un método indirecto de recuento de microorganismos , es aquel que se basa en la respuesta de varios colorantes redox ante la presencia de microorganismos activos desde el punto de vista metabólico . habitualmente la forma oxidada del colorante es de algún color y la forma reducida es incolora . estos colorantes son capaces de captar los electrones de un sistema biológico activo y esta captación es la que origina el cambio de color . Se utilizan colorantes como el azul de metileno o la resazurina , que se decoloran a una velocidad proporcional a la actividad de las reductasas bacterianas . Para realizar una prueba de reducción de colorantes se mezclan sobrenadantes de los alimentos con una disolución patrón del colorante . El tiempo transcurrido para que tenga lugar la reducción del colorante (decoloración) es inversamente proporcional al número de microorganismos existentes en la muestra. Estas técnicas son sencillas , baratas y rápidas y han sido muy usadas en las industrias lácteas para evaluar de forma rápida la calidad microbiana de las leches crudas .

- *Azul de metileno* : el principio en el que se basa esta prueba es el siguiente : cuando se añade una pequeña cantidad de azul de metileno , por ejemplo a la leche , y la mezcla se incuba a 37°C , se produce una

decoloración debida al metabolismo bacteriano , ya que la mayoría de microorganismos cuando crecen son capaces de modificar el potencial óxido-reducción lo suficiente como para transformar el azul de metileno en un derivado incoloro . La velocidad a la que se produce el cambio de color , es directamente proporcional al número de microorganismos presentes . Pero puesto que distintos microorganismos lo hacen a distinta velocidad , esta prueba no sirve para valorar el número de microorganismos presentes .

* Leche excelente : si no decolora en 8 horas

* Leche buena : decolora en menos de 8 horas , pero en más de 6

* Leche regular : decolora en menos de 6 horas , pero en más de 2

* Leche pobre : decolora en menos de 2 horas

- *Resazurina* : el principio de esta técnica es el mismo que en el caso anterior , pero aquí , la reducción pasa por una serie de etapas intermedias caracterizadas por distintas coloraciones , hasta la transformación de resazurina en resorufina . esas coloraciones son azul-violeta , violeta – malva , malva – rosa y rosa – rosa . En este momento la reacción ya es irreversible . Pero la reducción todavía continúa , transformándose la resorufina en dihidrorresorufina que es incolora , esta reacción sí es irreversible y el oxígeno atmosférico puede transformar la dihidrorresorufina en resorufina . Este test permite también valorar la cantidad de bacterias presentes , porque el tiempo

necesario para la transformación en incoloro depende directamente del número y actividad de los microorganismos presentes .

◇ Métodos basados en sustratos fluorógenos o cromógenos : una forma de ganar especificidad para la detección de un determinado microorganismo en un medio de cultivo , es detectando la presencia de laguna enzima que sólo esté presente en ese microorganismo o en ese grupo . La presencia de esa enzima se puede detectar añadiendo al medio de cultivo un sustrato adecuado , que al ser hidrolizado por la enzima genere un compuesto fluorescente o coloreado . El sustrato más importante es el 4-metilumbeliferil- -D-glucurónico (MUG) . El cual es hidrolizado por la -D-glucuronidasa , para liberar el compuesto fluorescente 4-metilumbeliferil , que se detecta cuando se ilumina con luz UV . Se usa para la detección específica de E.Coli , que es el principal microorganismo productor de esta enzima , de ahí que sea de gran utilidad como agente diferencial en los medios de cultivo . Así , usando un medio selectivo para enterobacterias , suplementado con el reactivo MUG , podemos hacer un recuento simultáneo de enterobacterias y dentro de ellas de E.Coli , puesto que serían aquellas colonias que presenten fluorescencia cuando se iluminan con luz UV .

◇ Métodos basados en anticuerpos (inmunoensayos) : estos métodos están disponibles para una gran cantidad de microorganismos y grupos bacterianos , así como también para muchas toxinas . Estos ensayos consisten en el uso de anticuerpos para la detección específica de antígenos presentes en el microorganismo o grupo bacteriano que queramos identificar o directamente contra sus toxinas . Existen varias técnicas que usan anticuerpos :

- *Inmunofluorescencia* : los anticuerpos suelen marcarse con fluorescencia , uniéndoles algún colorante fluorescente como la rodamina B , de fluorescencia roja , o el isotiocianato de fluoresceína , que da fluorescencia amarillo-verdosa . Cuando el anticuerpo se une al antígeno específico , el complejo antígeno – anticuerpo emite fluorescencia y puede ser detectado mediante un microscopio de fluorescencia , esta es

una de las técnicas más rápidas para la detección e identificación de microorganismo y consiste en obtener células procedentes de un cultivo , fijarlas a un portaobjetos y tratar esas células con el anticuerpo específico fluorescente . Después del lavado se observa el porta al microscopio de fluorescencia , si se observa fluorescencia es que el anticuerpo ha quedado retenido y por tanto los microorganismos objetivo de la prueba estaban presentes .

Se utilizan dos técnicas de tinción distintas con anticuerpos fluorescentes , directa e indirecta :

* Inmunofluorescencia directa : el propio anticuerpo es el que está marcado con fluorescencia

* Inmunofluorescencia indirecta : la presencia de un anticuerpo no fluorescente sobre la superficie de la célula , se detecta mediante un anticuerpo fluorescente dirigido contra el anticuerpo no fluorescente .

Así , no tenemos que marcar con fluorescencia cada uno de los anticuerpos específicos que tenemos (ventaja de la indirecta) .

- *Aglutinación en látex* : los anticuerpos se fijan a microesferas de látex . Cuando están presentes las células del microorganismo diana , las microesferas se activan por la formación de puentes entre anticuerpos y células diana .
- *Inmunoensayo enzimático* : (EIA o ELISA) es una técnica que se basa en anticuerpos fijados sobre un soporte y a los que se le añade el antígeno , volviendo luego a añadir el mismo anticuerpo pero esta vez unido covalentemente a una enzima , así se conservan las propiedades catalíticas del enzima y la especificidad de los anticuerpos . La actividad enzimática sobre un sustrato determinado permite poner de manifiesto si hubo reacción antígeno-anticuerpo . Las enzimas de unión típicas incluye a la peroxidasa , la fosfatasa alcalina y la α -galactosidasa .
- *Radioinmunoanálisis* (RIA) : es equivalente al ELISA , pero emplea isótopos radiactivos en lugar de enzimas . El más usado es el yodo 125 , esta técnica es menos usada que el ELISA , porque los instrumentos para detectar la radiactividad son costosos y además se generan residuos radiactivos .

◊ Métodos basados en ácidos nucleicos : la emergencia de la biología molecular ha dado lugar a nuevas herramientas moleculares , que se han adaptado rápidamente al campo diagnóstico microbiológico . La secuencia de bases en el ADN de un microorganismo es lo más claro para identificarlo. El ADN entero contiene demasiada información para procesarlo , pero secuencias cortas de nucleótidos que son únicas en ese microorganismo , resultan más fácilmente analizadas y son la base de estas técnicas . Estas técnicas son :

Hibridación : proceso por el cual , una sonda de ADN se une complementariamente a una región de ADN de cadena sencilla o de ARN . La sonda suele ser una secuencia de ADN de 20–2000 nucleótidos , que es única y particular de un grupo bacteriano . La sonda debe ser marcada de alguna manera con el fin de poder determinar si ha tenido lugar la hibridación . Los radioisótopos son los marcadores más utilizados y entre ellos se incluye el P32 , tritio , yodo 125 y C14 , aunque también se utilizan enzimas o compuestos fluorescentes . La especificidad del ensayo de hibridación está controlada por la secuencia nucleotídica de la sonda .

Hay dos formas de hibridación : en fase sólida (tipo southern , tipo sándwich)

y en fase líquida

La fase se refiere a la localización de la secuencia diana durante la hibridación, en la fase sólida la secuencia diana está unida a un soporte sólido , mientras que en la fase líquida está en una suspensión líquida y después de la hibridación es retirada de la suspensión para su detección .

- *Fase sólida :*

En una preparación típica de hibridación en fase sólida como southern, se toman las células y se lisan , realizándose después la fragmentación del ADN con endonucleasas , el estrato obtenido donde se encuentra el ADN se separa por electroforesis y se transfiere a filtros de nitrato de celulosa , el cual actúan de soporte sólido y es donde

se lleva acabo la hibridación con la sonda marcada , se lava y si después del lavado se detecta la presencia de la sonda , es que hay secuencias homólogas , por lo que está presente el microorganismo que queremos detectar .

En hibridación en sándwich , es la sonda la que se inmoviliza en el soporte y se utiliza para capturar el ADN problema . Posteriormente se añade otra sonda marcada que híbrida con una secuencia adyacente de la misma molécula de ácido nucleico problema. La detección se realiza después de lavar , para arrastrar la sonda indicadora que no se hubiera unido .

La hibridación en fase sólida también puede llevarse acabo directamente con colonias , se transfieren las colonias a un filtro de membrana , esta se trata con reactivos para lisar las células , se desnaturaliza el ADN quedando en esa zona de la M , se añade la sonda y se procede a su lavado y detección.

- *Fase líquida :*

Tanto la sonda como el ADN diana permanecen en solución , tras la hibridación , el ADN junto con la sonda hibridada se separa de la solución mediante su captura en un soporte sólido , como es la hidroxil apatita , por la cual el ADN de doble cadena tiene grana afinidad y se procede a realizar la detección .

El número mínimo de células que pueden ser detectadas con una sonda convencional suele ser del orden de 10³–10⁴/ml , por eso , cuando se utilizan sondas , es necesario muchas veces utilizar cultivos de enriquecimiento , para tener una cantidad de células suficientes que pueden ser detectadas , lo cual alarga el tiempo del análisis , aunque la especificidad es muy grande

PCR : debido a la necesidad de incremento de la sensibilidad , los métodos basados en ácidos nucleicos incluyen una etapa de amplificación , la cual puede realizarse sin la necesidad de un enriquecimiento del microorganismo a detectar El componente amplificado puede ser directamente el ADN a detectar y esto se consigue con las técnicas de PCR . La PCR usa un procedimiento de amplificación enzimática , para producir en unas pocas horas millones de copias de una secuencia determinada de ácido nucleico. Tal cantidad de ADN se puede visualizar con una banda en un gel de electroforesis teñido con bromuro de etilo . la amplificación se producirá si los cebadores se unen a la secuencia diana , por lo tanto , la especificidad dependerá de si los cebadores encuentran secuencias de ADN complementarias , si éstas están presentes se producirá amplificación y se detectarán los productos de la PCR , lo que indicará que el ADN del microorganismo , para el cual se diseñaron los cebadores , está presente .

TEMA 12 : EXAMEN MICROBIOLÓGICO DE SUPERFICIES

La necesidad de mantener en estado higiénico las superficies con las que contactan los productos , tiene una importancia evidente para obtener dicho producto con una buena calidad microbiológica .

Las superficies de contacto de los utensilios son muchas veces los focos de contaminación , donde pueden quedar retenidos gran cantidad de microorganismos que van a pasar al producto durante su elaboración . Por esto, la limpieza adecuada de utensilios utilizados durante la elaboración y de las superficies con las que contacta el

producto , es uno de los aspectos más importantes que cualquier productor debe tener en consideración y no descartar . Esto conduce a la necesidad de desarrollar técnicas que permitan valorar de forma adecuada el estado microbiológico de las superficies . Los métodos más usados en la valoración higiénica de superficies durante la manipulación de productos comerciales son :

◊ Método de la torunda : es el método más antiguo y utilizado . Se utilizan torundas estériles y de algodón o de alginato cálcico , que se hacen frotar sobre la superficie a controlar . La torunda expuesta se puede sembrar directamente sobre una placa con medio adecuado o introducirse en un diluyente adecuado para liberar los microorganismos recogidos y luego sembrar alícuotas o diluciones de ese diluyente, en placas de recuento .

Si se desea examinar determinadas zonas de una superficie , se pueden preparar platillas con aberturas que se correspondan con la extensión de la superficie a examinar , por ejemplo 1 cm² , lo cual permite obtener el número de UFC/cm² . Se puede utilizar una batería de medios de cultivo selectivos y diferenciales , para investigar concretamente determinados grupos de microorganismos .

◊ Método de la placa de contacto o de la placa RODAC : el método de contacto directo del agar con los microorganismos que se multiplican , emplea placas Petri especiales en las cuales se vierten entre 15'5 y 16'5 ml de un medio de cultivo determinado , obteniéndose así , una superficie de agar que sobresale del borde de la placa . Cuando se invierte la placa , el agar contacta directamente con la superficie que se examina , después las placas se tapan , se incuban y se cuentan las colonias . No suele ser un método adecuado para superficies muy contaminadas , pero se puede aumentar la selectividad con medios selectivos .

◊ Método del laminocultivo : los laminocultivos son sistemas diseñados especialmente para la determinación cuantitativa y cualitativa de superficies. Constan de unas tiras rectangulares de plástico , en donde va depositado un medio de cultivo , de forma similar a una placa Petri de contacto , pero rectangular . este medio de cultivo se hace que contacte con la superficie a examinar , se incuba y se hace el recuento .

SECCIÓN 5 . IDENTIFICACIÓN DE MICROORGANISMOS ESPECÍFICOS: INDICADORES DE CALIDAD

Un microbiólogo debe tener conocimientos de los microorganismos más importantes en los productos de consumo , que le permita identificar los tipos principales que encuentre . De modo que puede usar sus conocimientos sobre las características de los mismos para poder establecer el riesgo que puede presentar para la salud o producto y poder realizar su eliminación o control adecuados .

En bacterias , todas las especies se incluyen en el denominado manual de Bergey de Bacteriología Determinativa , el cual constituye el libro de referencia para las identificaciones bacterianas .

TEMA 13 : IDENTIFICACIÓN DE MICROORGANISMOS ESPECÍFICOS

La presencia de microorganismos en productos de consumo , no significa necesariamente un peligro para el consumidor o una calidad inferior de ese producto , en realidad , si consideramos un alimentos , cada bocado puede contener levaduras inocuas , mohos , bacterias y otros microorganismos .la mayor parte de productos se convierten en potencialmente peligrosos después de que no hayan sido respetados los principios de higiene , limpieza y desinfección . El riesgo se hace evidente cuando de esta manera pueden llegar a un producto agentes infecciosos o microorganismos alterantes que reduzcan la vida comercial del producto .

Muchas veces es deseable una estimación del número de microorganismos viables que hay en el producto , pero con mayor frecuencia se obtiene más información del recuento de microorganismos de algún componente de la microbiota total , por ejemplo mohos en cereales , bacterias psicótrofas en productos que se tienen que almacenar a bajas temperaturas , anaerobios almacenados al vacío o levaduras en pepitas de fruta .

Otras veces , es necesario saber si un producto satisface determinados criterios microbiológicos , por lo cual se hace necesario identificar y contar la población de determinado microorganismo .

♦ **Indicadores de calidad microbiológica :**

A menudo , la vida útil de un producto comercial , viene determinada por el número de microorganismos presentes , como regla general , un producto con una alta población de microorganismos alterantes tendrá una vida más corta que el mismo producto si contiene sólo unos pocos microorganismos . Algunos microorganismos tienen un mayor impacto que otros sobre las características organolépticas , debido a la presencia de determinadas enzimas o rutas metabólicas , por ejemplo , en la carne si hay microorganismos proteolíticos , aunque sean pocos la degradan .

Los criterios microbiológicos son un buen referente para garantizar el cumplimiento de unas buenas prácticas de fabricación . Se espera que productos producidos y almacenados con tales prácticas , presentes un perfil biológico bastante distinto a los producidos y conservados en condiciones deficientes .

El empleo de materiales de baja calidad , manipulación inadecuada o condiciones poco higiénicas , rendiría mayores recuentos bacterianos en el producto acabado y una vida comercial más corta . El examen microbiológico rutinario para detectar toda una serie numerosa de microorganismos patógenos y/o de sus toxinas o de microorganismos alterantes , no es practicable .

Los métodos usados para el aislamiento y recuento de microorganismos patógenos en agua , alimentos ... pueden no ser eficaces , debido a que dichos microorganismos se encuentran en muy baja cantidad , sobre todo en presencia de números altos de otros microorganismos , o que tengan una distribución irregular en el producto , aún cuando se cuenta con métodos sensibles , en general , son largos y costosos .

Además , hay patógenos difíciles de detectar y que no pueden determinarse en laboratorios no especializados . Si además tuviéramos que detectar todos y cada uno de los posibles patógenos que puedan estar en un producto de consumo , sería tal , que el producto tendría que estar retenido hasta obtener un diagnóstico definitivo .

Tales dificultades han determinado la amplia utilización de grupos de microorganismos cuya enumeración o recuento se realiza con mayor facilidad y cuya presencia en un producto , indica que estuvieron expuestos a condiciones que pudieron haber introducido y/o permitido la proliferación de organismos peligrosos para la salud o que pudieran alterar el producto . Los grupos o especies utilizadas para estos fines se denominan microorganismos indicadores y sirven tanto para evaluar la seguridad del producto como su calidad microbiológica .

♦ **Microorganismos indicadores :**

Se establecen dos tipos : los indicadores de calidad microbiológica (de vida comercial) y los indicadores de inocuidad .

◇ Indicadores de calidad microbiológica : en los criterios microbiológicos suelen usarse microorganismos indicadores m, que permiten evaluar la calidad de un producto o predecir su vida útil . Un microorganismo indicador de calidad ideal debería cumplir los siguientes requisitos :

- * Estar presente y ser detectable en todos los productos cuya calidad quiera evaluarse
- * Su crecimiento y recuento deberían mostrar una correlación alta y negativa con la calidad del producto , es decir , cuanto mayor sea la concentración del microorganismo peor será la calidad .
- * Deberían ser fáciles de detectar y cuantificar y ser claramente distinguibles de otros microorganismos .
- * Deberían poder cuantificarse rápidamente .
- * Su crecimiento no debería verse afectado adversamente por el resto de componentes de la microbiota del producto .

El *recuento de aerobios en placa* , suele ser uno de los procedimientos usados por los criterios microbiológicos para evaluar la calidad de un producto , además , con esta técnica se pueden variar los parámetros de incubación o el medio de cultivo , para poder examinar grupos de microorganismos como los termorresistentes , mesófilos , psicrófilos , proteolíticos , lipolíticos ... Por ejemplo , la incubación entre 0–7°C favorece el crecimiento de bacterias psicrófilas , los mesófilos se incubarían a 30–37°C , la incubación a temperaturas más elevadas como 50–70°C permite el desarrollo de termófilos . Sin embargo , el denominado *recuento de bacterias aerobias mesófilas* , es el más comúnmente utilizado para indicar y valorar la calidad de un producto de consumo . Recuentos altos de estos microorganismos pueden indicar materias primas contaminadas , tratamientos insatisfactorios o una alteración del producto ya muy avanzada . Además , la presencia de un número altos de bacterias mesófilas , que crecen bien a temperatura corporal o próxima , significa que pueden haberse dado condiciones favorables para la multiplicación de microorganismos patógenos . Por esto, este tipo de recuento también es un buen indicador de inocuidad .

Cuando se hace un recuento de este tipo , también hay que tener en cuenta que :

- Sólo se cuantifican células viables , por lo que no tiene valor para conocer cuál era la calidad de las materias primas de los productos , que luego fueron procesadas .
- Puede resultar de escaso valor si se quiere conocer la calidad organoléptica , ya que normalmente es necesario un recuento elevado antes de observar una pérdida de esta calidad organoléptica .
- Como las distintas bacterias difieren en sus actividades bioquímicas , la pérdida de calidad también puede ocurrir por recuentos bajos , dependiendo de la microbiota presente .

En general , los indicadores más fiables de la calidad de algún producto como alimentos , tienden a ser específicos para cada alimentos , con lo cual podemos hacer el recuento específico de ese microorganismo , para relacionarlo con la calidad comercial .

Estos microorganismos son a su vez , los principales alterantes de los productos . No sólo los microorganismos en sí sirven como indicadores de calidad , sino que también sus productos metabólicos pueden ser usados para evaluar y predecir la calidad microbiológica de algunos alimentos . Cuando se llega a establecer una correlación entre la presencia de un determinado producto metabólico y la pérdida de calidad del producto , el ensayo de metabolitos puede formar parte también de un criterio microbiológico . Por ejemplo en la carne , cuando está mala se acumulan aminos volátiles (cadaverina y putrescina) que indican su mala calidad .

◊ Indicadores de inocuidad (patógenos y toxinas) :

Los criterios microbiológicos para evaluar la seguridad sanitaria de los productos , utilizan también ensayos de microorganismos indicadores que sugieren la posibilidad de un riesgo microbiológico . El ensayo directo , en busca de los patógenos o de sus toxinas es impracticable , salvo en algunos casos , como el análisis de *Salmonella* o el de *Staphylococcus* . En su lugar se lleva a cabo el análisis de los microorganismos indicadores

El principal objetivo en la utilización de microorganismos como indicadores en prácticas no sanitarias , es revelar efectos de tratamiento que llevan consigo un peligro potencial . Peligro que no tiene porque estar necesariamente presente en la muestra particular analizada .

Al igual que los microorganismos indicadores de calidad comercial , los indicadores de patógenos deben cumplir también unos requisitos :

- * Ser fáciles de detectar de forma rápida , directa
- * Ser fácilmente distinguibles del resto de la microbiota del producto
- * Su presencia estar siempre asociada a la presencia del patógeno/s que se quiera indicar
- * Ser un microorganismo cuyo número se relaciona con la cantidad de patógeno
- * Poseer requerimientos metabólicos y tasas de crecimiento iguales a los del patógeno de interés
- * Tener una tasa de muerte al menos paralela la del patógeno de interés y que persista durante algún tiempo más que el patógeno
- * Estar ausente en los productos en los que no se presente el patógeno de interés

Los indicadores de inocuidad más frecuentes son :

- ◇ Los mesófilos aerobios totales
- ◇ Las Enterobacterias
- ◇ *E.Coli*
- ◇ Los Enterococcus
- ◇ Los Clostridios

Enterobacterias :

Bacterias entéricas indicadoras : *Enterobacteriaceae* y *E.Coli* . El grupo de las enterobacterias es muy usado en Microbiología como microorganismos indicadores de contaminación fecal . Uno de los hábitats típicos de este grupo bacteriano es el tracto digestivo de los animales de sangre caliente , aunque también se encuentran en el suelo , plantas , agua ... Su presencia en un producto puede ser por una elaboración poco higiénica , contaminación posterior o ambas .

La familia *Enterobacteriaceae* incluye a bacterias bacilares , Gram – , anaerobias facultativas , las cuales fermentan la glucosa con producción de ácido y gas a 37°C . Aunque el término coliforme total es el más utilizado , no siempre puede considerarse un sustituto del grupo *Enterobacteriaceae* , puesto que coliforme se refiere a bacterias anaerobias facultativas , Gram – , no formadoras de esporas y que fermentan la lactosa con producción de ácido y gas a 37°C , de tal manera que el término coliforme puede incluir a otras especies como *Aeromonas* , no incluida en Enterobacterias , o no tener en cuenta un grupo importante de Enterobacterias que es *Salmonella* , que no fermenta la lactosa .

El término de coliforme termotolerante , hace referencia a un grupo de microorganismos entéricos que se caracteriza por tener propiedades químicas del grupo de las coliformes , pero además por su crecimiento a temperaturas elevadas (44–45°C) , en este grupo se incluyen a los géneros *Escherichia* y *Klebsiella* .

Coliforme fecal es aquel que se caracteriza directa e incuestionablemente relacionado con el hábitat fecal , en este grupo se incluye a *Escherichia* , sin embargo , como la detección de coliformes fecales se realiza por su termotolerancia , muchos resultados pueden ser falsos positivos , debido a la presencia de *Klebsiella* , que no tiene porque indicar contaminación fecal .

Lo mismo que la mayoría de bacterias Gram – , las coliformes crecen bien en un gran número de medios y también en muchos alimentos , son capaces de crecer en presencia de sales biliares que inhiben el crecimiento de muchas bacterias , lo que se aprovecha para su aislamiento selectivo .

- ◆ *E.Coli* : es una bacteria cuyo hábitat natural es el tracto entérico del hombre y de los animales de sangre caliente , por ello , la presencia de este microorganismo en un producto indica generalmente una contaminación directa o indirecta de origen

fecal , pudiendo estar presentes patógenos entéricos . Hoy en día , *E.Coli* es el indicador de contaminación fecal más utilizado , pero la presencia de *E.Coli* en un producto no constituye una connotación directa de la presencia de algún patógeno, sino que implica únicamente un cierto riesgo de que pudiera estar presente . La no detección de *E.Coli* no garantiza la presencia de patógenos entéricos . Se destruye a temperatura de Pasteurización y también durante su almacenamiento en frío , por eso , la presencia de *E.Coli* en un producto tratado por calor , significa que o bien ha ocurrido un fallo en el proceso o más frecuentemente ha ocurrido una contaminación después del tratamiento térmico , a partir del equipo , empleados o de producto no procesados (malas prácticas de fabricación) .

La mayoría de cepas de *E.Coli* son comensales entéricos inocuos , pero algunas pueden producir enfermedad . Las *E.Coli* patógenas intestinales se definen como aquellas cepas capaces de causar una enfermedad diarreica en hombres y animales . Las cepas de *E.Coli* importantes como posibles patógenos se encuentran en las heces y pueden pasar a los productos de consumo , bien por prácticas antihigiénicas o por materias primas contaminadas como el uso de aguas fecales . Las cepas de *E.Coli* implicadas en enfermedades pueden incluirse en 5 grupos basados en su virulencia y serología :

* EPEC : son enteropatógenas , no producen enterotoxinas , aunque pueden producir diarrea grave puesto que son capaces de invadir células epiteliales . Las personas son un reservorio importante .

* ETEC : cepas que son enterotoxigénicas , son la causa principal de la diarrea infantil en los países en desarrollo y son los agentes más típicos de la diarrea del viajero . Colonizan el intestino delgado y producen toxinas que atraen la acumulación de líquido y una respuesta diarreica .

* EIEC : enteroinvasoras , no producen toxinas , pero invaden y se multiplican en el interior de las células epiteliales del colon .

* EHEC : enterohemorrágicas , producen toxinas y factores citotóxicos que producen una colitis hemorrágica . Destaca la cepa *E.Coli* 0157:H7 , produce una toxina denominada verotoxina , esta se identifica como causa de colitis hemorrágica , que se asocia con la ingestión de carne picada vacuna poco cocinada .

* FEEC : facultativamente enteropatógenas , son poco importantes , con brotes esporádicos .

- ◆ Detección e identificación : existen 3 métodos para la detección y recuento de Enterobacterias y *E.Coli* :

- Método del NMP : usando caldos lactosados y posterior confirmación por siembra en placa y en medio EMP .
- Recuento por siembra en placa , usando el medio VRBG o medio ENDO (distintos) para coliformes totales , incubando a 37°C .

* El medio mFc para coliformes fecales cuando lo incubamos a 44°C . Muy usado es el VRBG que usa como agente selectivo las sales biliares y el colorante cristal violeta . Otro medio es el MacConkey , que se puede hacer en líquido (caldo) o placa .

- Detección de enzimas presentes en este grupo mediante reacciones cromogénicas o fluorogénicas , por ejemplo el reactivo MUG , específico para *E.Coli* , dando un componente fluorescente .

Para identificar *E.Coli* se realizan pruebas bioquímicas y/o fisiológicas . El método más general de identificación y confirmación de enterobacterias , incluyendo a *E.Coli* , es el que utiliza las pruebas bioquímicas IMV:C y la tinción Gram , aunque hoy en día existen pruebas mucho más rápidas y completas como son las famosas tiras API y también hay pruebas serológicas , que son importantes para la determinación de las cepas patógenas , como por ejemplo de *E.Coli* , que no poseen las características típicas de las cepas de *E.Coli* .

TEMA 14 : OTROS MICROORGANISMOS DE IMPORTANCIA SANITARIA EN LOS PRODUCTOS DE CONSUMO

***Salmonella* :**

Pertenece a la familia *Enterobacteriaceae* , se diferencian de otras bacterias de esta familia por reacciones bioquímicas y serológicas . Algunos serotipos son más virulentos que otros .

Son bacterias Gram – , anaerobias facultativas , no forman esporas , fermentan la glucosa con producción de gas , pero no la lactosa . Producen una infección alimentaria denominada salmonelosis , la cual es consecuencia de la ingestión de células vivas de este género . Los síntomas son náuseas , vómitos , dolor abdominal y diarrea . La epidemiología es muy compleja , por lo que resulta difícil en la práctica establecer los métodos adecuados para el control .

El origen de la contaminación de los productos de consumo por *Salmonella* es doble :

- Estos alimentos pueden contener el microorganismo originalmente , origen endógeno , como consecuencia de que los animales productores tenían salmonelosis o eran portadores sanos de salmonellas .
- Además , hay que tener en cuenta una contaminación de origen exógeno , de los productos libre de salmonellas , a partir de los manipuladores , utensilios , heces , ingredientes ... O en el caso de alimentos de origen vegetal , pueden contaminarse por la utilización de abonos orgánicos o por el riego con aguas contaminadas .

Sin embargo , la contaminación inicial de los alimentos por salmonelas suele ser pequeña en términos cuantitativos , son las condiciones que permiten la multiplicación de estos microorganismos , es decir , una conservación inadecuada , las que potencian y hacen más real el riesgo de infección . En salmonelas menos patógenas deben encontrarse en centenares o millones para ser capaces de producir infección y en las más patógenas la cantidad es mucho menor . En general , para producir salmonelosis , o debe tener lugar una contaminación original muy fuerte o que haya habido una multiplicación en el producto .

Dentro de la sistemática analítica , para el aislamiento e identificación de bacterias del género *Salmonella* se utilizan varias etapas :

- Se hace un preenriquecimiento en medio líquido no selectivo . Aquí se logra la revivificación de las salmonelas lesionadas . Se incrementa su vitalidad y se adquieren las condiciones fisiológicas adecuadas para su desarrollo . Se utiliza cuando se analizan productos que han sido calentados , congelados o desecados y en aquellos en los que es de esperar que se encuentren células de salmonela en escaso número . El medio que más se usa es el agua de peptona tamponada .

- Enriquecimiento en medios líquidos selectivos . Aquí se estimula y favorece el crecimiento de salmonelas y se restringe la proliferación de la microbiota acompañante . Se consigue mediante compuestos químicos inhibidores , que permite que la proporción de salmonelas con respecto a los demás microorganismos aumente , de modo que puedan ser identificadas en la siguiente etapa . Entre los medios selectivos más usados destaca el caldo tetrationato – bilis – verde brillante y el caldo selenito – cistina .
- Aislamiento diferencial sobre medios sólidos selectivos . La presencia de salmonelas se determina sembrando muestras de los caldos de enriquecimiento , en placas conteniendo medios selectivos . Lo que restringe aún más el crecimiento de la microbiota acompañante . Los medios que más se usan son : agar verde brillante rojo fenol , agar SS , agar xilosa – lisina – desoxicolato y el agar entérico Hektoem. La diferenciación de salmonela en estos medios con respecto a otros microorganismos se suele conseguir mediante cambios de color que produce en estos medios .
- Confirmación bioquímica o serológica , las colonias típicas de salmonela de los medios anteriores deben finalmente confirmarse mediante pruebas bioquímicas . Las más definitorias son la prueba de la lisina descarboxilasa , la aureasa , el Kliger y la del citrato . Existen también pruebas rápidas como el API 20E . También se puede recurrir a la identificación por anticuerpos , destacando las pruebas del ELISA . las pruebas serológicas son muy utilizadas en la industria alimentaria , con preferencia alas pruebas bioquímicas , ya que son rápidas y específicas .

Vibrio

Son microorganismos corrientes en las aguas oceánicas y costeras , de ahí que se encuentren asociados a una gran cantidad de mariscos y pescados , siendo estos productos una de las principales vías de dispersión . Son microorganismos Gram – , halófilos , que se suelen aislar a partir de caldos de enriquecimiento y siempre a posterior en medio sólido .

Tres especies destacan por ser patógenas en el hombre : *Vibrio parahemolyticus* , *V. Cholerae* y *V. ___* .

El *Vibrio parahemolyticus* es muy termosensible y se destruye a temperaturas superiores a 50°C , produce una gastroenteritis febril , a veces acompañada por una diarrea en la que las heces están teñidas de sangre . El período de incubación es de 6 – 20 horas y los síntomas recuerdan a los de la salmonelosis (dolor abdominal ,

vómitos , diarrea , náuseas) . Este microorganismo se encuentra exclusivamente en animales marinos , abundando en los meses de verano en aguas costeras . Por eso , los principales productos implicados en su transmisión son mariscos y pescados , que no han recibido un tratamiento térmico adecuado .

De las tres especies , la más patógena es el *Vibrio cholerae* , que cuando se ingiere un gran número de células , éstas se multiplican en el intestino delgado y producen una enterotoxina que produce la pérdida de grandes cantidades de líquido en forma de diarrea acuosa . Esta especie no se multiplica en el agua , pero sobrevive en este elemento desde unos días hasta 2 semanas .

Los medios de enriquecimiento que se utilizan en el aislamiento de *Vibrio* aprovechan la gran tolerancia a la alcalinidad de estos microorganismos , usándose agua de peptona alcalina (pH:8'6–9) . El medio sólido selectivo y diferencial más usado es el denominado TCBS , que es un agar tiosulfato – citrato – sales biliares – sacarosa . Este medio es extraordinariamente selectivo para *Vibrio* , por su pH alto y presencia de sales biliares . En este medio , el *Vibrio cholerae* da colonias amarillas y el resto de vibrios da colonias verdes . la identificación posterior es en base a la morfología , a la prueba de la oxidasa (+) y a la sensibilidad al compuesto 0/129 . También existe confirmación mediante anticuerpos .

Streptococcus

Este género incluyen a bacterias Gram + , en forma de coco que forman cadenas , catalasa – , anaerobias facultativas y que carecen de respiración aerobia , por lo que su energía procede principalmente de la

fermentación de azúcares , tanto si crecen en condiciones aerobias como anaerobias . Con este tipo de metabolismo producen ácido láctico . Dos grupos tienen importancia en los análisis microbiológicos : los Enterococcus y los Streptococcus hemolíticos .

Enterococcus o *Streptococcus* fecales son comúnmente usados como indicador de contaminación fecal , porque de forma general , el hábitat de estas bacterias es el intestino de animales de sangre caliente . pertenecen a la familia *Streptococaceae* y se caracterizan por ser cocos Gram + , catalasa – , no productores de esporas y no móviles .

El término *Enterococcus* se puede considerar sinónimo al grupo D Lancefield , en el cual se incluye *E. Fecalis* , *E. Faecium* , *S. Bovis* y *S. Equinus* . Suelen considerarse buenos indicadores porque mueren más lentamente que los coliformes , ya que son muy resistentes a las condiciones adversas (congelación , desecación ...) y de este modo normalmente sobrevivirían a los patógenos cuya presencia se quiere indicar .

Los productos de consumo pueden contener enterococos procedentes de una contaminación fecal directa o indirecta . En los productos semiconservados , procesados por calor pero no estériles , los enterococos junto con microorganismos esporulados , son con frecuencia los únicos microorganismos supervivientes . Los productos mantenidos en el rango de temperaturas entre 10–45°C pueden contener cifras muy altas de estos microorganismos .

El análisis de enterococos es interesante cuando se realiza un análisis de muestras de agua , puesto que *S. Bovis* y *S. Equinus* , son indicadores de contaminación por

animales de sangre caliente no humana y además son los enterococos que más rápidamente mueren en el medio exterior , por eso , cuando se detectan indican una contaminación reciente por animales de granja ; también en alimentos tienen su importancia , especialmente en industrias que procesan carne , productos de granja ...

Para su análisis se usa la técnica de NMP , usando el medio EVA (etil violeta azida) o métodos de siembra en placa , que es el medio KF – streptococcus . La azida sódica y el cristal violeta , se utiliza mucho para el cultivo de estos microorganismos .

Streptococcus pyogenes originan en el ser humano faringitis , escarlatina y anginas . Esta bacteria se encuentra en la garganta de individuos aparentemente sanos , después de la infección puede permanecer en la garganta días o semanas , no suele tenerse en cuenta en análisis rutinarios , no hay medios selectivos para su detección y recuento , aunque uno de los más usados son agar sangre o el agar nutritivo tamponado que contenga telurito , sacarosa , azul – tripan y cristal violeta , las colonias son de color azul pálido . Suele utilizarse mucho la técnica de anticuerpos fluorescentes .

Staphylococcus

En este grupo destaca *Staphylococcus aureus* . La importancia de esta bacteria radica en su capacidad de producir enterotoxinas , las cuales son resistentes a las proteasas del intestino y termoestables . Al ser ingeridas producen gastroenteritis con náuseas , vómitos , diarreas y debilidad general , constituyendo una intoxicación , ya que no requiere una multiplicación de la bacteria .

Staphylococcus aureus es un coco Gram + , que forma agrupaciones irregulares como consecuencia de la división celular en más de un plano , son catalasa + , oxidasa – y anaerobios facultativos . Crece en medios sólidos , dando colonias de color dorado o amarillo , destaca su capacidad para crecer en medios con elevado contenido de sal (5–7'5%) , de ahí que se emplee esta característica para su aislamiento . Su hábitat principal es la piel , sus glándulas anejas y las mucosas de los animales de sangre caliente . Por eso , cuando se encuentra un gran número de estas bacterias en un producto , significa por lo general que las prácticas

higiénicas de limpieza y desinfección y el control de temperatura no han sido adecuados .

En productos procesados , los estafilococos son buenos indicadores de la higiene corporal de los trabajadores de la industria . Los manipuladores pueden ser el origen de los estafilococos que llegan a los productos , como consecuencia de infecciones respiratorias , lesiones supuradas , tos o estornudos .

Staphylococcus aureus se detecta por análisis microbiológicos clásicos , siembra en medios selectivos como los medios sal y manitol o el Baird – Parker , luego se hace aislamiento e identificación . Para la identificación existen pruebas comerciales como los API para estafilococos y para la detección de la toxina se emplean anticuerpos específicos . El procedimiento de confirmación más frecuente es el test de la coagulasa

Clostridium

Destacan *C. botulinum* y *C. Perfringens* .

- ♦ *Clostridium botulinum* : es la bacteria productora del botulismo , el cual es una intoxicación debida al consumo de productos contaminados por la toxina botulina , producida por la multiplicación de esta especie . Estas exotoxinas son muy tóxicas para el hombre , porque son inhibidoras de la liberación de la acetilcolina . Se caracteriza por un síndrome no febril , neurológico , con un índice de mortalidad generalmente alto .

Es un bacilo Gram + , anaerobio estricto , móvil , produce esporas termorresistentes . es una bacteria muy difundida por el suelo y se aísla fácilmente de las aguas dulces y marinas , de los alimentos y del pescado . Algunas cepas son intensamente proteolíticas y con frecuencia su presencia en un producto será revelada por la desintegración parcial de ese producto y por un ligero olor rancio o a queso .

Se conocen 7 tipos de *C. Botulinum* , que se designan de la letra A a la G , basándose en las toxinas que producen . Los tipos A , B y E originan exotoxinas , siendo casi exclusivamente los productores del botulismo humano y muy rara vez también el F . Los tipos C y D tienen interés como causa del botulismo en animales , incluidas aves . Hasta ahora no hay evidencias que relacionen al tipo G con enfermedad .

Los primeros síntomas son náuseas , vómitos y posiblemente diarrea , con debilidad muscular . En los casos más graves , los músculos involuntarios se paralizan , extendiéndose la parálisis al sistema respiratorio y corazón , la muerte se produce por fallo respiratorio o cardíaco .

Las esporas de *C. Botulinum* están distribuidas ampliamente en suelos , aguas y el tracto intestinal de animales terrestres . Su termorresistencia tiene importancia en la epidemiología de la enfermedad .

La formación de toxina en los productos de consumo depende de las esporas que han resistido el tratamiento térmico o de la contaminación después del procesado . luego tienen que darse las condiciones que permiten la germinación de las esporas y la producción de la toxina , temperatura , condiciones de O₂ , pH ... Para evitar el crecimiento de las esporas de *clostridium* , muchas conservas son ácidas .

Los métodos modernos de diagnóstico de la intoxicación botulínica se basa en la puesta en evidencia de las toxinas , mediante el bioensayo en ratones o mediante el ELISA . Ninguno de los métodos tradicionales es específico para el recuento de *C. botulinum* .

- ♦ *Clostridium perfringens* : pertenece a la familia Bacillariaceae , son bacterias con forma bacilar , esporuladas , Gram + , inmóviles y anaerobios estrictos , aunque pueden crecer en presencia de niveles bajos de O₂ . es una bacteria muy corriente en la naturaleza , pudiendo encontrarse en hábitats diversos (suelo , polvo ...) y también en el intestino de hombre y animales . produce una enfermedad leve después de la ingestión de grandes cantidades del

microorganismos , debido a una enterotoxina . la toxina sólo se produce cuando existe multiplicación del microorganismo en el intestino .

Para detectar el microorganismo suele emplearse una técnica de recuento en tubos , con el medio TSN (agar – triptona – sulfito – neomicina) o el medio TSC (agar – triptona – sulfito – cicloserina) . En la identificación se utiliza tanto el bioensayo como el ELISA .

Bacillus

- ◆ *Bacillus cereus* : bacteria perteneciente a la familia bacillariaceae , es anaerobio facultativo , de forma bacilar , grande , Gram+ . esporulado , común en el suelo , vegetación , pelo de los animales y en muchos alimentos tanto naturales como industriales .

La facultad de formar esporas , garantiza la supervivencia a través de muchas fases de tratamiento , sin embargo , sus esporas son menos resistentes que las de *C. perfringens* y se destruyen a 100°C en 5–30 minutos . Pueden producir enfermedad en el hombre cuando se dan ciertas condiciones :

- * El producto ingerido está muy contaminado (" 10 cél/g)
- * Cuando la temperatura de conservación del producto es adecuada para el desarrollo de la bacteria (12–45°C)
- * Cuando el tratamiento térmico al que se ha sometido el producto para su preparación ha sido insuficiente para destruir las esporas .

Produce dos tipos de toxinas , una endotoxina durante el crecimiento , termolábil y se destruye e 30 minutos a 56°C , da lugar a un síndrome diarreico con dolor abdominal , vómitos , fiebre y diarrea profusa . La otra endotoxina es más termorresistente y produce un síndrome vomitivo .

Los distintos métodos de aislamiento de las bacterias se basan en proporcionar ciertas condiciones para que se muestre su propiedad lecitinásica y su falta de acción sobre determinados azúcares . El medio más efectivo es el de Mossel , que lleva polimixina B y yema de huevo . Muy pocos microorganismos producen en este medio reacciones parecidas a las del *B. Cereus* , por eso es necesaria una diferenciación de especies . Cuando es necesaria una confirmación de las colonias sospechosas , se realizan pruebas bioquímicas , existiendo también tiras API CHB .

Listeria

La listeriosis es una enfermedad de origen alimentario , atípica , de interés principal para la salud pública debido a varias causas : la gravedad y el carácter no entérico de la enfermedad , la alta proporción de muerte (20–30%) , un tiempo de incubación frecuentemente largo y una predilección por individuos inmunodeprimidos . Siendo un patógeno oportunista , capaz de sobrevivir y multiplicarse fuera de hospedadores animales y en medios nutritivos muy simples .

La listeriosis se caracteriza por una diversidad de síndromes graves , que tienen especial relevancia en las mujeres embarazadas , ya que provoca abortos o nacimientos prematuros . Se da frecuentemente meningitis y meningoencefalitis .

El agente causante es la *Listeria monocytogenes* , que es omnipresente , ha sido aislado del agua dulce y salada , en el suelo , lodo y en vegetales en putrefacción . Es

resistente a condiciones ambientales diversas , es microaerófila . Son bacilos cortos , Gram + , anaerobio

facultativo principalmente microaerófilo , no productor de esporas y catalasa + . Su distribución es amplia en el ambiente y su capacidad para crecer en superficies de productos de consumo no ácidos , permiten a esta bacteria muchas posibilidades para introducirse en la cadena alimentaria . La leche cruda suele ser una fuente importante de esta bacteria y en general los productos lácteos , sobre todo el queso . Son capaces de crecer en medios bacteriológicos simples . Han sido adoptados dos medios de agar selectivo : Oxford y Palcam . Una vez aisladas , hay que confirmarlas bioquímicamente . También existen procedimientos de ELISA y sondas de ADN .

Campylobacter

El *Campylobacter jejuni* se considera una de las principales causas de gastroenteritis aguda de origen bacteriano en los seres humanos y puede afectar a personas de cualquier edad . Este importante patógeno , a menudo se transmite mediante productos de aves de corral poco cocinadas , por ejemplo la transmisión es frecuente cuando los utensilios y recipientes de cocina se utilizan para la preparación de pollos y a continuación ensaladas .

La contaminación con tan sólo 10 células de *C. jejuni* viables puede provocar el inicio de la diarrea . Es de la familia de las *Campylobacteriaceae* , son bacilos en forma de S , Gram- , no formadores de endosporas y móviles por un flagelo polar . El *C. jejuni* es sensible a una diversidad de condiciones ambientales que hacen que sea improbable que sobreviva durante períodos prologados fuera del hospedador , no crece a temperaturas menores de 30°C , es microaerófilo , sensible a la desecación y a las condiciones de elevado O₂ y a bajos pH , es sensible a altas temperaturas , por lo que no sobrevivirá en productos alimenticios sometidos a temperaturas altas de cocción .

Las muestras se toman de empresas que sabemos que están realizando buenas prácticas microbiológicas

Valor tomado como recomendación : como sabemos que todas las empresas llevan a cabo buenas prácticas , el máximo valor que podremos esperar será ese .

Modelo teórico : empleado rutinariamente en las empresas