

Celebrado anualmente, el workshop MRAMA, de un contenido aplicado y de futuro, amplía y difunde los conocimientos teóricos y prácticos sobre métodos innovadores para detectar, contar, aislar y caracterizar rápidamente los microorganismos y sus metabolitos, habituales en los alimentos y el agua. El workshop cuenta cada año con el profesor Dr. Daniel Y. C. Fung, de la Kansas State University (KSU; Manhattan, Kansas, EUA) como ponente principal, que aborda cuestiones básicas relacionadas con los métodos rápidos y miniaturizados y la automatización en microbiología alimentaria. Además, se ofrecieron las siguientes ponencias:

- Evolución de la seguridad y los métodos microbiológicos alimentarios: breves consideraciones y comentarios. Dra. Cécile Lahellec, Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments, Alfort, Francia.
- La polymerase chain reaction (PCR). Dr. Armand Sánchez Bonastre, UAB.
- Resultados del proyecto de investigación FoBos. Dr. Fabrizio Cecilian, Università degli Studi di Milano, Milán, Italia.
- Evitar los patógenos en el entorno humano. La UE decide cómo. Dr. Stephen Wessels, DHI (Danish Hydraulic Institute), Hørsholm, Dinamarca.
- Requisitos y aspectos prácticos para validar y aplicar métodos alternativos en el laboratorio de microbiología. David Tomás Fornés, Ainia Centro Tecnológico, Paterna.
- Transgénicos, nutrigenética y nutrigenómica en alimentación. Dr. Daniel Ramón Vidal, Biópolis SL, Paterna.
- *Campylobacter spp.*, *Salmonella spp.* y *Listeria monocytogenes*: aspectos epidemiológicos y microbiológicos. Sarah Lafuente van der Sluis y Dra. Mercè de Simón Serra, Agencia de Salud Pública de Barcelona.

Durante tres días, se realizaron unas sesiones prácticas en el laboratorio, en las que se trabajó con algunos

X Workshop “Métodos rápidos y automatización en microbiología alimentaria”

Del 22 al 25 de noviembre de 2011, tuvo lugar el X aniversario del Workshop sobre Métodos rápidos y automatización en microbiología alimentaria (MRAMA), en el salón de actos de la Facultad de Veterinaria de la Universitat Autònoma de Barcelona, dirigido por los Drs. Marta Capellas Puig y Josep Yuste Puigvert, profesores de Ciencia y Tecnología de los Alimentos, y organizado por el Centre Especial de Recerca Planta de Tecnologia dels Aliments (CERPTA) y el Departamento de Ciencia animal y de los alimentos de la UAB.

equipos y los productos más innovadores del campo de los métodos rápidos y la automatización. Y se organizaron tres talleres:

- Uso de los recursos para microbiología predictiva disponibles en internet. Montse Vila Brugalla, Agencia de Salud Pública de Barcelona.
- Inmunosensores electroquímicos para detectar bacterias patógenas. Dra. María Isabel Pividori Gurgo y Susana Liébana Girona y Tamara Laube Chávez, UAB.
- Cuantificación de micotoxinas y alérgenos por inmunodifusión lateral. Generon Srl, Santa Maria di Mugnano, Italia.

Se celebró también una mesa redonda, que reunió a ponentes y profesionales de empresas de microbiología y laboratorios de análisis, moderada

por el Dr. José Juan Rodríguez Jerez, investigador principal del grupo de investigación BIORISC de la UAB y profesor del Departamento de Ciencia y Tecnología de los Alimentos. Con la mesa redonda, sobre la instrumentación en microbiología de los alimentos, las tendencias del mercado mundial y otros temas de actualidad del sector, y las ponencias del workshop, se constató la importancia de la automatización en el laboratorio; la creciente aplicación del análisis por PCR; la diversidad de necesidades en cuanto a métodos microbiológicos, según el sector (p. ej., productos frescos, comidas preparadas, etc.); así como los progresos en el desarrollo de soluciones que aportan rapidez, precisión, sensibilidad y especificidad.



Las exposiciones a cargo de las empresas de microbiología fueron otras de las actividades del workshop. En ellas se explicaron y mostraron diversos productos, presentando su funcionamiento, ventajas y limitaciones, y las técnicas en que se basan. Estas empresas, que patrocinaron el X workshop MRAMA, fueron: 3M España, AES CHEMUNEX España, Becton Dickinson (parte de BD Diagnostic Systems), bioMérieux España, Bio-Rad Laboratories, Bioser, BIOTECON Diagnostics (Alemania), CEERAM (Francia), Generon, IDEXX Laboratorios, IUL, IZASA (parte de Werfen Group), Life Technologies, MicroPlanet Laboratorios (distribuidor de BioControl Systems y LIOFILCHEM), Millipore Ibérica (parte de Merck),

Nirco (distribuidor de Neogen Europe), Oxoid (parte de Thermo Fisher Scientific), y Sigma-Aldrich Química.

También han colaborado con el workshop MRAMA: Diversey España, ACONSA (Asesoría y Consultoría Sanitaria), la Associació Catalana de Ciències de l'Alimentació (ACCA), EyPASA – Revista Alimentaria (publicación oficial del workshop), la Sociedad Española de Microbiología (SEM) – Comisión de Normalización y Validación, y la Sociedad Española de Químicos Cosméticos (SEQC).

Como es habitual, el workshop contó con una gran variedad de participantes (188) de diversos colectivos nacionales e internacionales: además de profesores y estudiantes de

diversas universidades, y personal de otros centros de investigación y la administración; asistieron participantes procedentes de laboratorios; asesorías y consultorías; e industrias de los ámbitos agroalimentario (entre otros, los sectores cárnico y avícola, lácteo, cacao, bebidas analcohólicas –aguas, zumos de frutas, bebidas refrescantes– y alcohólicas –vitivinícola–, alimentación infantil, ingredientes y aditivos), microbiológico, cosmético, productos para limpieza y desinfección, electrónico, etc. El XI workshop MRAMA se celebrará del 20 al 23 de noviembre de 2012.

A continuación, incluimos tres de las ponencias (dos en español y una en inglés) que mayor interés suscitaron en el transcurso del MRAMA.

Introducción

El empleo de métodos alternativos supone considerables ventajas frente a los métodos convencionales o de referencia, como son la rapidez, automatización, interpretación de resultados, etc. No obstante, pueden darse situaciones que limiten su uso en determinadas condiciones o presenten limitaciones que deban ser evaluadas en cada caso particular, debiendo demostrarse que estos métodos permitan obtener resultados equivalentes al método de referencia y que presenta ventajas frente al mismo.

Estos métodos alternativos para el análisis microbiológico de alimentos ya es en la actualidad una realidad, siendo ampliamente empleados tanto por laboratorios de autocontrol como en laboratorios de control oficial de alimentos.

No obstante, no solo es de interés para las empresas y laboratorios de control el empleo de métodos alternativos en el ámbito del cumplimiento de criterios de seguridad alimentaria y de higiene de los procesos, sino que en muchas ocasiones es

Requisitos y aspectos prácticos para validar y aplicar métodos alternativos en el laboratorio de microbiología

David Tomás Fornés

Ainia Centro Tecnológico
 dtomas@ainia.es

necesario también garantizar criterios relacionados con la conservación y estabilidad de los alimentos, de forma que se pueda disponer de forma rápida de información acerca de la potencial presencia de microorganismos alterantes que pueden provocar importantes pérdidas económicas, en cuyo caso también el empleo de métodos rápidos y automatizados es de gran interés y la comprobación de que este método es válido para el uso previsto y es más importante si cabe, puesto que en este caso es frecuente que exista una gran diversidad de microorga-

nismos alterantes y de matrices en las que detectarlos.

Aspectos previos relativos a la validez de los métodos alternativos

La norma UNE-EN ISO/IEC 17025 en su apartado 5.4.2 establece que “El laboratorio debe utilizar métodos de ensayo que satisfagan las necesidades del cliente y sean apropiados para el uso previsto”.

Por tanto, debe tenerse en cuenta el ámbito de aplicación, tanto por el laboratorio en cuanto a la selección de los procedimientos de ensayo y su

validación, como por el organismo de acreditación en las evaluaciones que realice.

Además, la norma establece que *“cuando el cliente no especifique el método a utilizar, el laboratorio debe seleccionar los métodos apropiados que hayan sido publicados en normas internacionales, regionales o nacionales, por organizaciones técnicas reconocidas o en libros o revistas científicas especializados o especificados por el fabricante de equipos”*. (ENAC. NT-32 rev. 2 julio 2010 <http://www.enac.es/web/enac/documentos-descarga>)

Así pues, y en primer lugar, y antes de empezar con las experiencias prácticas de implantación del método alternativo, es necesario verificar la adecuación al uso del mismo, para lo que debemos recopilar toda la información disponible, tanto relativa a los datos disponibles sobre la caracterización del método, como aquellos incluidos en la ficha técnica que nos proporcione el fabricante del método (en el caso de kits o métodos comerciales) o en el artículo o método normalizado que vayamos a emplear.

Aspectos importantes que nunca debemos obviar para garantizar la adecuación del método son:

- Plazo de obtención de resultados (con y sin confirmaciones).
- Matrices objeto de análisis (limitaciones, preparación especial de determinadas muestras...).
- Inversión en equipamiento.
- Cualificación del personal (interpretación de resultados, manipulación...).
- Infraestructuras de laboratorio.
- Validación o reconocimiento por organismos nacionales o internacionales.
- Y por supuesto... el coste por ensayo (reactivos, personal...).

Una vez identificados todos estos aspectos, podemos pasar a revisar con más detalle los datos relativos a la validación del mismo, así como la

MÉTODOS CUALITATIVOS	MÉTODOS CUANTITATIVOS
<ul style="list-style-type: none"> • Eficacia relativa • Sensibilidad relativa • Especificidad relativa • Nivel de detección relativa • Inclusividad y exclusividad 	<ul style="list-style-type: none"> • Linealidad y exactitud relativa • Límites de detección y cuantificación • Sensibilidad relativa • Especificidad y selectividad • Reproducibilidad y repetibilidad

información técnica disponible en literatura científica. Este último aspecto es importante tanto en el caso de los kits (puesto que nos puede dar una visión independiente del funcionamiento del mismo) como en relación con su aplicación e implantación en determinados laboratorios de referencia.

Desde un punto de vista práctico, en relación con los métodos alternativos, el laboratorio se enfrenta básicamente con dos posibilidades:

- Métodos comerciales o “kits”.
- Métodos públicos, como por ejemplo los disponibles en literatura científica o los desarrollados por Laboratorios de Referencia.

Según se recoge en la Norma ISO 17025:2005 que establece los requisitos generales para la competencia de los laboratorios de ensayo y calibración, (punto 5.4.5.2): *“se deben validar los métodos no normalizados, los métodos diseñados/desarrollados internamente, los métodos normalizados utilizados fuera de su campo de aplicación previsto y las ampliaciones y modificaciones de los métodos normalizados con el fin de comprobar que son apropiados para el uso previsto”*.

Por tanto y en ambos casos, a efectos del reconocimiento de la validez técnica del método de ensayo por parte de terceros (p. ej., organismos de acreditación) es necesario disponer de datos de validación acorde a un esquema internacionalmente reconocido, bien siguiendo el esquema de la Norma ISO 16140 – Protocolo para validación de métodos alternativos, bien en el documento “Guidelines for validation of Microbiological Methods of analysis” publicado por AOAC.

En general y en ambos casos, los parámetros que se deben obtener para considerar una validación completa (ver punto 3) son:

En ambos casos, una validación completa requiere la organización de estudios interlaboratorios. Este aspecto podría obviarse en determinados casos en los que el método solo va a ser empleado por un único laboratorio o las técnicas empleadas no son de uso común por parte de un número significativo de laboratorios.

Cualquier aspecto de la validación del método que no haya sido contemplado en la validación inicial del método tendrá que ser complementado debidamente por el laboratorio que vaya a emplear el mismo. No se puede modificar el método.

Por otra parte, tomando al pie de la letra el contenido del Reglamento en vigor relativo a los criterios microbiológicos aplicables a los productos alimenticios (Reglamento (CE) nº 2073/2005 de 15 de noviembre de 2005, DOCE L 338 22/12/05) se recoge en su considerando 24 que *“los resultados de las pruebas dependen de los métodos analíticos utilizados y, por lo tanto, cada criterio microbiológico debe asociarse a un método de referencia determinado” pero indica claramente que “los explotadores de las empresas alimentarias pueden usar métodos analíticos diferentes a los métodos de referencia, en particular métodos más rápidos, siempre que estos métodos alternativos produzcan resultados equivalentes”*.

Así pues desde un punto de vista legal se reconoce el empleo de este tipo de métodos en el ámbito de la legislación actual, si bien posterior-



mente incluye en el artículo 5 punto 5 que “Se autorizará el uso de métodos alternativos cuando los métodos estén validados con respecto al método de referencia establecido en el Anexo I y, si se utiliza un método registrado, certificado por terceros conforme al protocolo de la norma EN/ISO 16140 u otros protocolos similares internacionalmente aceptados”. En la práctica, la legislación indica la exigencia de validar el método en cualquier caso, pero solo es necesario que esté certificado en el caso de los “métodos comerciales” o kits y no en el caso de los métodos públicos.

Por último, indicar que también se refleja que “si el explotador de la empresa alimentaria desea utilizar métodos analíticos distintos a los validados y certificados tal y como se ha descrito en el párrafo anterior, los métodos deben validarse conforme a protocolos internacionalmente aceptados y su uso deberá ser autorizado por la autoridad competente”. Es decir, de nuevo tenemos la necesidad de validar estos métodos, aunque cabe la posibilidad de emplear métodos no certificados, si la autoridad competente lo autoriza y, por tanto, su uso queda restringido al ámbito de actuación que tenga fijado las autoridades sanitarias.

En cualquiera de los casos anteriores, y suponiendo que el método alternativo está validado de forma correcta (esté o no certificado) el laboratorio siempre debe “confirmar que puede aplicar correctamente los métodos antes de utilizarlos para los ensayos”.

Validación de un método alternativo (norma UNE-EN ISO 16140:2003)

La validación inicial o completa, requiere de una importante puesta a punto previa del método de ensayo (ver fig 1) y supone un protocolo extenso que utiliza un diseño de experiencias y unos criterios de evalua-

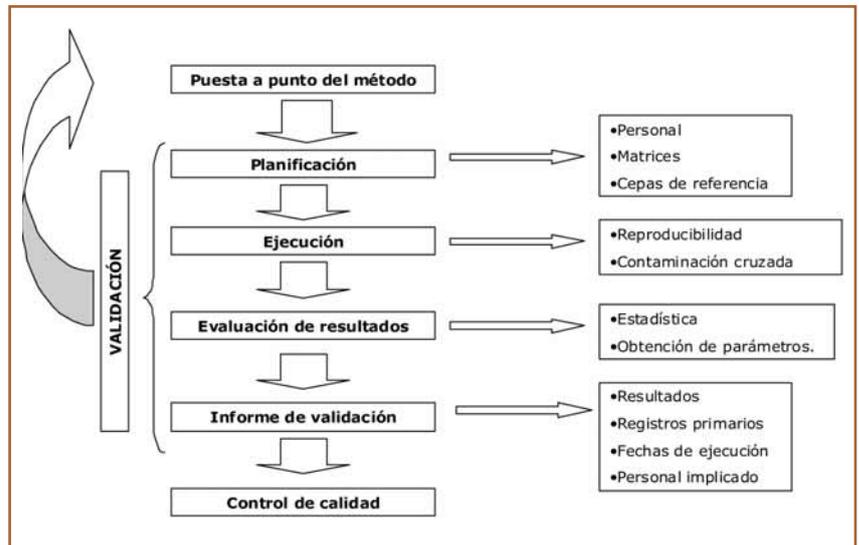


Figura 1.- Diagrama de puesta a punto, validación y control de calidad de métodos alternativos.

Carnes y producto cárnicos	Pescados y mariscos
Aves de corral	Frutas y verduras
Productos lácteos	Chocolate/productos panadería
Otros productos (especies, salsas, huevos, pastas, cereales, bebidas)	Alimentación animal

RESPUESTA	VALOR REF POSITIVO (R+)	VALOR REF. NEGATIVO (R-)
MÉTODO A VALIDAR POSITIVO (A+)	+/+ CONCORDANCIA POSITIVA (PA)	-/+ DESVIACIÓN POSITIVA (PD)
MÉTODO A VALIDAR NEGATIVO (A-)	+/- DESVIACIÓN NEGATIVA (ND)	-/- CONCORDANCIA NEGATIVA (NA)

ción de resultados preestablecidos y reconocidos internacionalmente (como por ejemplo los recogidos en la Norma UNE-EN ISO 16140:2003). Fruto de esta validación se pueden obtener valores que posteriormente pueden ser empleados para la comprobación o verificación (punto 4) del método.

Así pues, el protocolo de validación consiste en dos etapas:

- Estudio comparativo entre el método alternativo y el método de referencia realizado por un laboratorio experto.
- Estudio interlaboratorio en el que se emplean y comparan los resultados obtenidos por los dos métodos.

Matrices objeto de estudio

La norma ISO 16140 contempla el tipo de matrices que deben evaluarse para la validación de un método microbiológico:

En el caso de alimentos, se deben estudiar 5 categorías de alimentos. Este número puede reducirse si el método se aplica a un ámbito restringido. (Puede consultarse en Anexo B de la Norma UNE-EN ISO 16140:2003):

Validación de métodos cualitativos

En primer lugar se realiza un estudio comparativo por parte del laboratorio experto que consiste en la caracte-

terización del método con el siguiente procedimiento:

Se deben analizar al menos 60 muestras por cada método y categoría de alimentos, las cuales, idealmente, deben estar contaminadas en una proporción del 50%.

A partir de los resultados obtenidos con ambos métodos se construye la siguiente tabla:

- Eficacia relativa (AC): Grado de concordancia entre la respuesta obtenida por el método a validar y el valor verdadero obtenido en muestras idénticas.

$$AC = \frac{(PA + NA)}{(NA + PA + PD + ND)} \times 100$$

- Desviación positiva (PD): Se produce cuando el método a validar da un resultado positivo y el valor de referencia es negativo. Una desviación positiva se convierte en un falso positivo cuando se puede demostrar que el resultado verdadero es negativo.

- Desviación negativa (ND): Se produce cuando el método a validar da un resultado negativo y el valor de referencia es positivo. Una desviación positiva se convierte en un falso negativo cuando se puede demostrar que el resultado verdadero es positivo.

- Sensibilidad relativa (SE): Capacidad del método a validar de detectar el microorganismo cuando está presente en la muestra a analizar o no diferir de manera significativa del valor de referencia (<30%).

$$SE = \frac{PA}{(PA + ND)} \times 100$$

- Especificidad relativa (SP): Capacidad del método a validar para no detectar el analito cuando no es detectado por el método de referencia.

$$SP = \frac{NA}{(NA + PD)} \times 100$$

- Nivel de detección relativa (LOD): Menor número de microorganismos

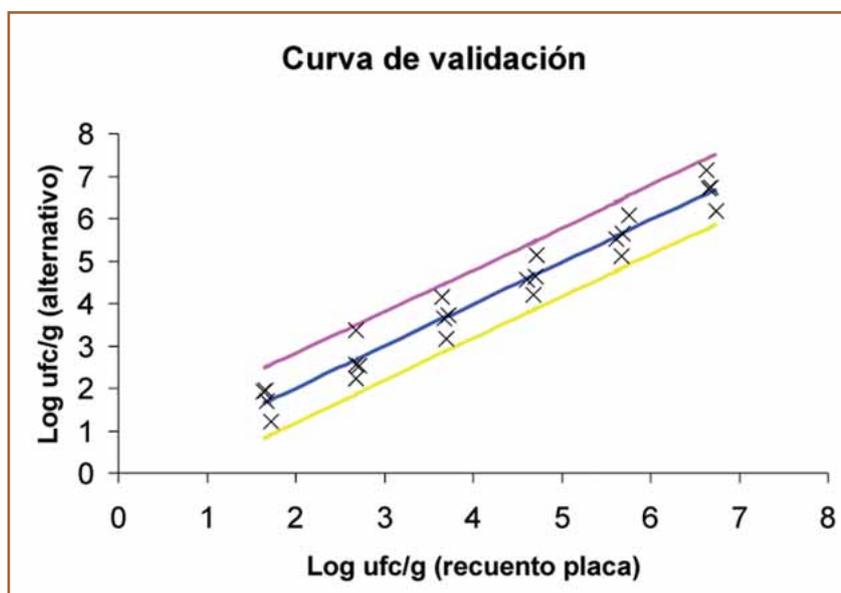


Figura 2.- Representación gráfica para el estudio de linealidad y exactitud relativa.

que puede detectarse en una muestra.

Se seleccionan diferentes matrices que deben contener tres niveles de contaminación (blanco, próximo al límite de detección y por encima del mismo (p. ej., 3xLOD) Para su evaluación es necesario obtener una recuperación parcial en al menos uno de los niveles. Es por ello que generalmente se habla de LOD 50 de forma que se compara un método frente a otro.

Inclusividad: Capacidad para detectar el analito entre un amplio grupo (50) de cepas diana.

Exclusividad: Ausencia de interferencia en el método de un grupo (30) de cepas no diana.

Posteriormente (o de forma paralela) se realiza un estudio intercomparativo, en el que se debe contar con 10 laboratorios participantes y 3 niveles mínimos de contaminación y 8 replicados por cada nivel de contaminación, lo que supone un total de 480 resultados (240 por cada método).

Validación de métodos cuantitativos

Igual que anteriormente se desarrolla en primer lugar un estudio de ca-

racterización por parte del laboratorio experto:

Se trabaja con 5 concentraciones del analito en cada tipo de alimento para establecer una curva de calibración, de forma que se cubra el intervalo completo, realizando al menos 10 mediciones (idealmente 25-50) con muestras contaminadas naturalmente por el método alternativo. De nuevo se estudian 5 categorías de alimentos y de cada muestra se replica entre 2 y 10 veces para lograr de 10 a 50 resultados por método y categoría de alimentos.

Estos datos se representan de forma gráfica (ver Fig. 2) empleando el eje Y para el método alternativo y el eje X para el de referencia, evaluando la existencia de datos anormales.

A partir de los mismos se hace un estudio de regresión ($Y=a+bx$) en el que no solo debemos evaluar el coeficiente de correlación (r) sino que se debe verificar que las hipótesis $a=0$ y $b=1$ se cumplen (p. ej., los valores de la recta están dentro de un intervalo de confianza del 95%) evaluando de este modo la linealidad o defecto de ajuste (aptitud del método para dar resultados que están en proporción con la cantidad de microorganismos presentes en la mues-

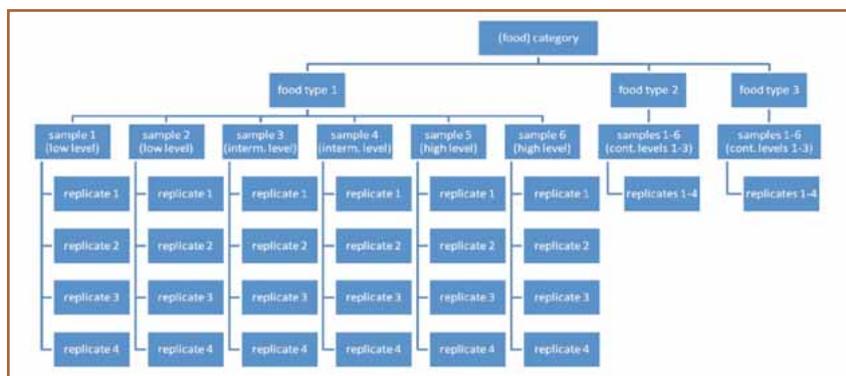


Figura 3.- Diagrama del diseño experimental para una categoría de alimentos asumiendo 3 niveles de contaminación.

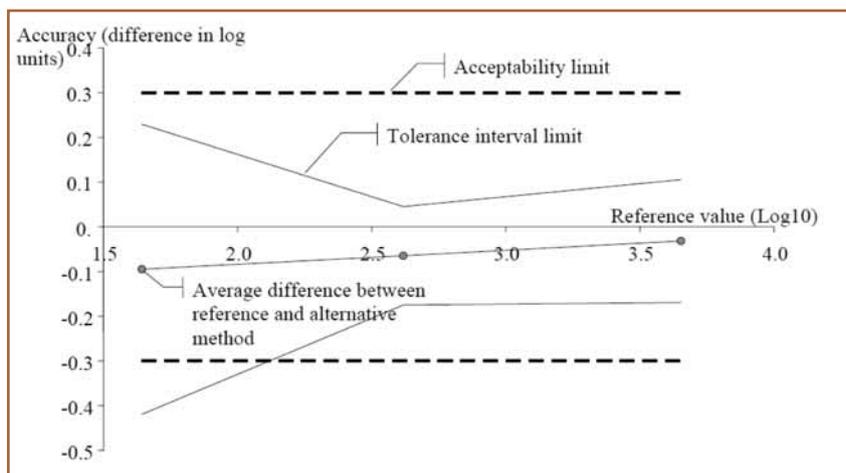


Figura 4.- Presentación general del perfil de exactitud y precisión para la validación de un método alternativo (el límite de aceptabilidad se ha seleccionado arbitrariamente).

tra), así como la precisión de los métodos (límites en los que la exactitud especificada se encuentra con una probabilidad del 95%).

Posteriormente se estiman los límites de detección y cuantificación a través del nivel crítico (menor cantidad que puede ser detectada (no nula) pero no cuantificada como un valor exacto. Para ello se seleccionan tres niveles de microorganismos (mínimo, medio y alto) y se replica cada uno de los niveles al menos 6 veces, a partir de cuyos datos se establece el nivel crítico, el LOD y LOQ. Como dato importante, la AOAC define el LOQ como aquella

cuyo coeficiente de variación (S/X) debe ser inferior al 10%.

Del mismo modo debe determinarse la sensibilidad para los diferentes intervalos de medida, la especificidad y selectividad de modo similar a lo realizado en los métodos cualitativos.

Por último, también es necesario realizar un estudio interlaboratorios en el que participen 8 laboratorios en los que se debe estimar la exactitud y precisión del método sobre 3 niveles de microorganismos, lo que implica un mínimo de 96 resultados válidos de la matriz alimenticia escogida, donde se obtienen respec-

tivamente la repetibilidad, precisión y sesgo del método alternativo.

Nuevas estrategias en el desarrollo de normas de validación

En relación con los nuevos métodos de validación, en 2011 se publicó una corrección de la ISO 16140:2003 que afectaba, básicamente, a los aspectos relacionados con la realización de ejercicios intercomparativos para validar métodos cuantitativos.

Por otra parte, se están desarrollando diversas normas (se espera disponer de un borrador público o DIS en julio de 2012) que contemplarán:

- Norma 16140-1: Recoge todo lo relacionado con definiciones y terminología.
- Norma 16140-2: Validación de métodos comerciales o kits, que mantiene la estructura de la actual ISO 16140, explicada anteriormente, pero se introduce algunos cambios, sobre todo en lo referente a métodos cuantitativos donde se contempla un diseño de experimentos diferente, como se refleja en la figura 3.

Asimismo, los métodos cuantitativos se estudian mediante un nuevo estudio estadístico, de modo que el enfoque es mucho más ajustado al rendimiento esperado del método con respecto al método de referencia. El gráfico que permite evaluar este método puede resumirse en la figura 4.

También se está desarrollando un nuevo método (ISO 17468), donde se describe la metodología necesaria para validar métodos de referencia (documento que solo será empleado para organismos de normalización).

Por último y como novedad importante, también se va a desarrollar una norma que sirva de guía para la correcta verificación o comprobación de métodos por parte de los laboratorios usuarios, si bien en este momento está en fase de definición y no se han desarrollado contenidos técnicos.

Verificación o comprobación del funcionamiento de un método alternativo

La validación interna o verificación por parte del laboratorio de control que va a utilizar el método alternativo, que consiste básicamente en comprobar que el laboratorio es capaz de cumplir con los requisitos de funcionamiento del método previamente establecidos en las condiciones habituales de trabajo.

Lo primero que debemos conocer antes de incorporar un método alternativo, como se ha indicado en el punto 2, es si el mismo ha sido validado de forma completa con un esquema internacionalmente reconocido (por ejemplo con la sistemática establecida anteriormente) o si por el contrario esta validación no es completa, en cuyo caso el laboratorio es responsable de obtener (en literatura científica o realizado las experiencias pertinentes) evidencias suficientes para complementar las carencias que pueda presentar dicha validación.

Del mismo modo, es importante que el laboratorio utilice el método alternativo tal y como ha sido diseñado por el fabricante, puesto que en caso contrario no se puede garantizar la validez del mismo, y el laboratorio deberá realizar una validación completa (ver punto 3).

La comprobación es más importante si cabe en los métodos alternativos, puesto que en muchos casos se reconoce que el rendimiento de estos métodos puede verse afectado por diferentes microorganismos, como viene reflejado en algunos protocolos de métodos alternativos *“El parámetro xxxxx ha sido evaluado sobre numerosos productos. Sin embargo, teniendo en cuenta la diversidad de productos y procesos de fabricación, se recomienda verificar que la composición de las matrices analizadas no afecta a la fiabilidad de los resultados”*.

Existen muchas alternativas para realizar la verificación de métodos al-

ternativos y como se ha indicado anteriormente, desde el punto de vista normativo no existe todavía un documento de referencia en el que basarse.

No obstante, los enfoques más habituales consisten en la realización de muestras por duplicado (analizadas en paralelo por el método de referencia y por el método alternativo) o el empleo de materiales de referencia con un valor conocido.

Aunque desde un punto de vista ortodoxo no se deben emitir resultados analíticos antes de realizar una comprobación, es comúnmente aceptado, sobre todo en el caso de métodos ampliamente reconocidos y que disponen de una validación el realizar este tipo de verificaciones mediante el control de calidad interno del laboratorio (empleando para ello un esquema similar al descrito en este punto), así como resultados procedentes de ejercicios intercomparativos (aunque en este último caso el tipo de matrices a analizar no suele ser representativo de muestras reales).

Matrices a emplear

Nunca debemos olvidar que esta comprobación tiene como objetivo demostrarnos a nosotros mismos que, en condiciones reales de ejecución de los ensayos, los resultados que voy a emitir son correctos y, por tanto, no tiene ningún sentido emplear microorganismos o matrices que no reflejen la realidad del método de ensayo. En este sentido, la esterilización de matrices está claramente desaconsejada puesto que se aleja enormemente de la realidad en los análisis de rutina (como excepción podemos citar los laboratorios que analicen exclusivamente conservas o platos preparados tratados térmicamente).

Para una verificación de un método que se emplee en alimentos en general, deben verificarse alimentos de diferentes categorías (ver punto 3.1)

y tipos, así como de diversas procedencias.

El número de categorías a verificar ideal es de 5. No obstante, es razonable realizar una primera evaluación en un número limitado de categorías representativas de las que habitualmente se analicen en el laboratorio y posteriormente, mediante las pruebas de control de calidad interno, ir incorporando nuevas matrices para verificar su influencia en el resultado y las posibles limitaciones del método.

Una vez identificadas el tipo y número de matrices a emplear procederemos de forma diferente en función del tipo de método que queramos verificar.

Así pues el diseño de la verificación del método debe establecerse de tal modo que se garantice de la forma más fiel posible las condiciones de uso habituales del método. Para ello lo ideal es trabajar con matrices naturalmente contaminadas que contengan el microorganismo objeto de análisis. Solo en caso de no disponer de las mismas es posible emplear la inoculación artificial.

Inoculación de microorganismos diana/interfirientes

En el caso de que se requiera de una contaminación artificial, (dada la ausencia de materiales de referencia microbiológicos que incorporen el efecto matriz) se pueden emplear cepas procedentes de Colecciones de Cultivos Tipo (www.cect.org) a partir de las que prepararemos, la suspensión de inóculo, o también pueden utilizarse material de referencia certificado con una concentración y pureza conocida comercializado en diversos formatos por diferentes organismos y empresas (Health Protection Agency [“http://www.hpa.org.uk/”](http://www.hpa.org.uk/), LABAQUA <http://www.labaqua.com/> o MicroBiologics [“http://www.microbiologics.com/”](http://www.microbiologics.com/))

El empleo de cepas salvajes o de muestras procedentes de intercom-



parativos como material de referencia es también posible, siempre que estos microorganismos estén perfectamente caracterizados y se pueda asegurar que cumplen con los requisitos de estabilidad, pureza, viabilidad y comportamiento adecuado al fin buscado.

Métodos cualitativos

El objetivo de la verificación es comprobar que podemos detectar un nivel suficientemente bajo de microorganismos en las diferentes matrices objeto de análisis.

No es razonable que el laboratorio de análisis deba estimar el límite de detección que previamente ha sido estimado en la validación, sino más bien evaluar la influencia de las condiciones reales (matrices, analistas, medios de cultivo...) en la capacidad de detección de microorganismos diana a bajos niveles.

En las validaciones completas se estima el nivel de detección relativo mediante la inoculación de diferentes niveles, siendo el límite de detección en aquel nivel donde se obtiene un número parcial de resultados positivos del total de muestras inoculadas. Posteriormente, se emplean test estadísticos como el Test Fisher para métodos cualitativos o Ley de Poisson para métodos cuantitativos (Tabla P.1 UNE EN ISO 16140), lo cual no suele ser posible en los laboratorios de rutina.

Por otra parte, la estimación del límite de detección requiere del empleo de suspensiones de inóculo con niveles de concentración bajos que deben ser preparadas por el laboratorio, puesto que en la actualidad no existe un material de referencia disponible a estos niveles.

El propio intervalo de confianza a estos bajos niveles (ver tabla 1) hace que, desde un punto de vista estadístico, no se pueda conocer de forma exacta si un determinado inóculo contiene o no el microorganismo a detectar, por lo que un labora-

Número de colonias	Intervalo de confianza (95%)	
	Inferior	Superior
1	<1	2
2	<1	4
3	<1	5
4	1	6
5	2	9
6	2	10
7	2	12

Número de colonias	Intervalo de confianza (95%)	
	Inferior	Superior
8	3	13
9	4	14
10	4	16
11	5	18
12	6	19
13	7	20
14	7	21

torio de control generalmente no dispone de la suficiente experiencia y recursos para abordar la tarea de conseguir un inóculo con una concentración lo suficientemente baja como para estimar el límite de detección.

En su lugar es más adecuado el empleo de material de referencia con bajas concentraciones (p. ej., en torno a 10 ufc/muestra y siempre inferiores a 25 ufc/muestra) o la preparación de inóculos con una concentración tal (por ejemplo, no más de 10 veces el límite de detección) que el laboratorio pueda garantizar su valor y evaluar diferencias entre las distintas matrices, analistas, etc., de forma que, en lugar de estimar el límite de detección, se verifica la capacidad del laboratorio de obtener resultados reproducibles y eficaces con bajos niveles de microorganismos diana.

Así pues, y dado que no deseamos calcular el límite de detección (aspecto que ya ha debido ser evaluado anteriormente en la validación completa del método), la verificación en los métodos cualitativos puede

hacerse con niveles en los que el microorganismo diana se encuentre en valores de entre 4 y 16 ufc/muestra, de forma que se garantiza que en el inóculo disponemos de entre 1 y 25 ufc/muestra (con un límite de confianza al 95% para recuentos con bajos números de colonias) garantizando que la muestra ha sido efectivamente inoculada con al menos 1 microorganismo y no más de 25.

Con estos niveles de inóculo deben inocularse al menos 6 muestras diferentes (idealmente 10) por categoría de alimentos en condiciones de reproducibilidad, obteniendo en todos los casos valores positivos. De este modo, se puede considerar verificado un método de uso general en alimentos, si obtenemos resultados positivos en el análisis de al menos 30 muestras de 5 categorías de alimentos. Las muestras empleadas pueden ser de las que habitualmente recibe el laboratorio, de modo que mediante su análisis habitual se pueda verificar la ausencia del microorganismo diana en las mismas. En caso contrario deberán realizarse análisis complementarios para

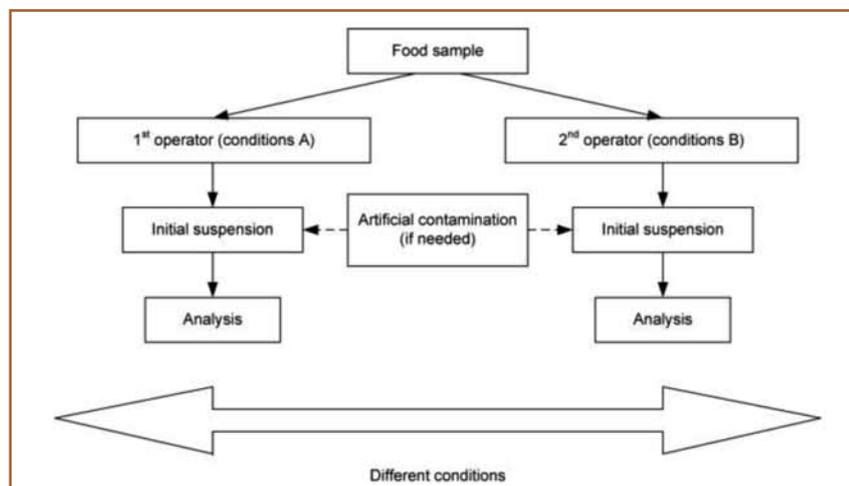


Figura 5.- Esquema de realización de duplicados para estimar la incertidumbre del método.(ISO/TS 19036:2006).

verificar la ausencia del mismo. En algunos casos y siempre que esté debidamente justificado, pueden emplearse niveles más altos de inóculos para verificar un método, pero en estos casos se recomienda revisar si la capacidad del método es la adecuada (p. ej., LOD de los certificados de validación) y en caso de no disponerlos, realizar los análisis de las muestras inoculadas mediante dos métodos diferentes (método de referencia y alternativo), de modo que podamos evidenciar si el problema es del método que empleamos, o bien de una determinada cepa o por el contrario del laboratorio.

Métodos cuantitativos

En este tipo de métodos debemos estimar:

- Recuperación puede ser estimada mediante la exactitud (grado de concordancia entre un resultado de un análisis y el valor de referencia aceptado) o el sesgo (diferencia entre el resultado esperado y el valor de referencia aceptado).
- La exactitud, cuando se aplica a un conjunto de análisis, incorpora combinación de resultados aleatorios y el error sistemático común, que es el que estimamos a través del sesgo. El término exactitud es complementario

al de eficacia o veracidad. Dado que en microbiología no es posible en la práctica obtener un valor de referencia, deberemos emplear en su caso el término relativo, puesto que el valor de referencia se obtiene mediante el propio análisis de la muestra con un método de referencia aceptado.

- Reproducibilidad, o precisión intermedia, considerando este término en realidad como el de reproducibilidad interlaboratorios, es decir, el grado de concordancia entre resultados de análisis individuales, empleando el mismo método obtenido en las condiciones más diversas que se puedan dar en el laboratorio (operadores diferentes, lotes de reactivos diferentes, equipos diferentes...).

Desde un punto de vista práctico, es aconsejable realizar la verificación de la recuperación y la reproducibilidad simultáneamente mediante el análisis por duplicado de muestras con una concentración conocida. En este caso, es aconsejable que las muestras contemplen diferentes niveles de contaminación y que estos permitan realizar un recuento dentro del rango habitual de lectura (p. ej., en el caso de placas petri de 90 mm recuentos de entre 15 y 150 o 30 y 300 colonias), no siendo incluidos en

el cálculo los casos en los que los recuentos son inferiores a 10 colonias (como recuento total en todas las placas).

El diseño de experiencias podría ser el que aparece en la Fig. 5.

Generalmente, se realizan entre 5 y 10 muestras (ver ISO 19036) de diferentes categorías (entre 3 y 5) representativas del alcance, debiendo contemplarse para un alcance de alimento en general entre 25 y 30 muestras por duplicado.

Para la estimación de la tasa de recuperación se puede evaluar cada recuento individualmente como:

$$Rec = \frac{X_i}{Y_i}$$

Siendo:

X_i = Recuento del método a comprobar en ufc/g.

Y_i = Valor de referencia en ufc/g.

Estos valores se expresan en valor logarítmico y posteriormente el valor de recuperación se pueden comparar con los valores de referencia indicados en la norma ISO 11133-2 Anexo B. Los valores que habitualmente se estiman adecuados son $Rec \geq 0,5$ en métodos que incluyen el empleo de medios selectivos y $Rec \geq 0,7$ para aquellos en los que se emplean medios no selectivos.

También podemos realizar otras aproximaciones para evaluar la exactitud al objeto de estimar diferencias entre el valor de referencia de diferentes poblaciones (muestras) mediante empleo de criterios estadísticos como al "t student" o la realización de ANOVA si los datos así lo permiten.

No obstante este enfoque está siendo cuestionado, dado que pueden producirse casos en los que se aprecien diferencias estadísticamente significativas que indiquen que la exactitud de un método no es la adecuada y, sin embargo, desde el punto de vista microbiológico, dicho método es válido e incluso mejor que otros, como se puede observar en la figura 6.



En cuanto a la reproducibilidad (así como la estimación de la incertidumbre) a partir de los resultados obtenidos de las muestras analizadas por duplicado obtenidas en varias matrices (fig 6), se realizarán los siguientes cálculos.

- a) Transformar los valores ufc/g en valor logarítmico.
- b) Calcular la media de los duplicados de cada muestra según la fórmula:

$$\bar{y}_i = \frac{y_{iA} + y_{iB}}{2}$$

- c) Calcular la varianza de la reproducibilidad (SRi2) para cada muestra, según:

$$s_{Ri}^2 = (y_{iA} - \bar{y}_i)^2 + (y_{iB} - \bar{y}_i)^2 = \frac{(y_{iA} - y_{iB})^2}{2}$$

- d) Calcular la desviación estándar de la reproducibilidad (sR) según:

$$s_R = \sqrt{\sum_{i=1}^n \frac{s_{Ri}^2}{n}} = \sqrt{\sum_{i=1}^n \frac{(y_{iA} - y_{iB})^2}{2n}}$$

- e) Calcular la incertidumbre U
La modificación de la norma ISO 19036:2006, Amd. 1:2009, considera el cálculo de la incertidumbre expandida (U), asumiendo que el número de colonias en placa sigue una distribución de Poisson y permite obtener la incertidumbre en casos donde se obtiene recuentos bajos (aunque la suma de colonias en todas las placas debe ser al menos >10). La incertidumbre expandida se calcula con la siguiente fórmula:

$$U = 2 \sqrt{s_R^2 + \frac{0,18861}{\sum c}}$$

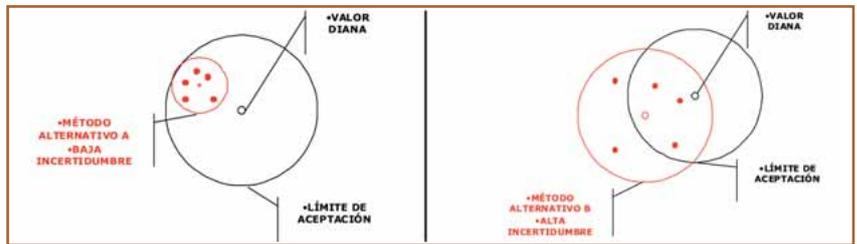


Figura 6.- El método A (izquierda) es más exacto y preciso que el B, sin embargo el método A presenta diferencias estadísticas, frente al valor de referencia mientras que el método B no presenta diferencias estadísticas mediante un estudio t student o ANOVA.

Donde \sum^c es la suma de colonias que se cuentan en todas las placas que se han utilizado para el análisis. Cuando esta fórmula se aplica en los casos que se hayan obtenido ensayos con un número de colonias total elevado, el segundo término puede considerarse despreciable y calcular la incertidumbre como: $U=2SR$. A partir de la integración de todos los resultados de recuento expresados en ufc/g, se estimará la Desviación Estandar de Reproducibilidad (SR) y este dato permite calcular la Reproducibilidad intermedia (R) según la fórmula:

$$R = 2\sqrt{2}S_R = 2.82 * S_R$$

El valor de SR y R (o Sr y r) obtenido debe ser inferior al valor de referencia disponible en la norma o, en caso de ausencia, aquellos publicados en artículos científicos o guías de carácter horizontal (p. ej., 19036). Algunos de los datos disponibles para comparar la obtenida en nuestro laboratorio figuran en la tabla 1. También podemos comparar estos valores con los proporcionados por los certificados de validación del método alternativo. No obstante, en estos casos, el valor de reproducibilidad

se estima a partir de un ejercicio colaborativo, por lo que en su estimación se han considerado los datos de múltiples laboratorios con diferentes analistas, equipos, mayor número de muestras lo que en general implica una mayor heterogeneidad y la suma de contribuciones que no van a darse en un único laboratorio.

Es por ello que el valor de reproducibilidad obtenido pueda ser muy elevado en relación con el valor obtenido en la verificación. En este caso se recomienda tomar como criterio en lugar del R (reproducibilidad interlaboratorios) el valor de referencia identificado como r (repetibilidad intralaboratorio), que es más semejante a las condiciones experimentales que se dan en este tipo de verificaciones.

Control de calidad interno

La Norma UNE-EN ISO 17025:2005 (punto 5.9) indica que el laboratorio debe tener procedimientos de control de calidad para realizar el seguimiento de la validez de los ensayos (...).

El control de calidad debe realizarse de tal forma que permita detectar

Ensayo	Repetibilidad	Reproducibilidad	Referencia
Aerobios mesófilos	r=0,25	R=0,45	ISO 4833
Coliformes totales	Sr = 0.20	SR=0.5	ISO 4832
E. coli	Sr = 0.11	SR=0.47	ISO 19036
Mohos y levaduras	Sr = 0.29	SR=0.75	ISO 19036
Enterobacteriaceae	Sr = 0.04	SR=0.52	ISO 19036
S. aureus	r=0.28	R=0.43	ISO 6888-1
		B. cereus	r=0.29 R=0.42 ISO 7932-2

Tabla 1.-

Certificadora			
Microorganismo	AFNOR	MicroVAL	AOAC
Salmonella	28	4	29
Listeria spp	15	-	18
Listeria monocytogenes	25	1	10
E. coli O157	9	-	23
Cronobacter	1	2	-
Campylobacter	2	2	3

Tabla 2.-

Tecnología	AOAC	AFNOR
Inmunoenzimática	10	14
Genética	16	9
cultivo	3	5

Tabla 3.-

tendencias y aplicar técnicas estadísticas para la revisión de los resultados. Además, el control de calidad interno puede permitir obtener información que indique si los métodos son apropiados para el tipo y volumen de trabajo que se realiza de forma cotidiana en el laboratorio.

Los datos debe ser analizados y si no satisfacen los criterios predefinidos, se deben tomar acciones planificadas para corregir el problema y evitar los resultados incorrectos.

Estos criterios, si bien pueden obtenerse a partir de los datos propios de la validación del método, es más coherente emplear los valores reales obtenidos a partir de las pruebas de verificación o comprobación del método para asegurar la correcta evaluación de los mismos.

Métodos alternativos certificados

Como se ha indicado anteriormente, en algunos casos (empleo de métodos comerciales o "kits") la legislación recoge la necesidad de que el método alternativo haya sido certificado por terceros.

En la actualidad, y a nivel mundial solo existen 3 organismos que certifican la validez de métodos alternativos:

- AFNOR VALIDATION (<http://www.afnor-validation.org/>)

- MICROVAL (<http://www.microval.org/>)
- AOAC RI (<http://www.aoac.org/>)

Las dos primeras organizaciones emplean como norma para validar la ISO 16140:2003, mientras que AOAC, emplea criterios propios pero armonizados con la ISO 16140 (http://www.aoac.org/Official_Methods/Food_Micro_Validation_Guidelines.pdf), aunque en su organización hay diferentes niveles de exigencia para los métodos alternativos. La certificación de un método permite, además de garantizar la validez del método, asegurar que el fabricante del método alternativo disponga de un sistema de calidad para la producción del kit (p. ej., ISO 9001), así como la certificadora debe realizar una verificación regular de los métodos y evaluar cualquier modificación del producto o del proceso de producción para ver si estas modificaciones afectan a la validación del kit.

Además, la certificadora suele evaluar un gran número de aspectos complementarios a la norma de validación, como las ventajas del método, su aplicabilidad, facilidad de uso, etc.

Puede verse un resumen de el número y tipología de métodos alternativos disponibles bajo un esquema certificado, en la tabla 2.

En cuanto a las diferentes tecnologías empleadas para la validación de métodos, y tomando como ejemplo los métodos alternativos empleados para la detección de *Salmonella spp.*, las diferentes técnicas empleadas pueden agruparse en la tabla 3.

Conclusiones

El empleo de métodos alternativos es una posibilidad técnicamente válida y reconocida tanto por los organismos de acreditación como por la legislación vigente.

El laboratorio debe utilizar métodos de ensayo que satisfagan las necesidades del cliente y sean apropiados para el uso previsto.

Una vez seleccionado el método alternativo que cubra nuestras necesidades y se adecúe al uso previsto, el laboratorio comprobará que el método se ha validado y si procede el certificado en el caso de kits comerciales (punto 3), así como confirmar o verificar que lo ha implantado adecuadamente y es capaz de obtener resultados válidos en las condiciones reales de ensayo (punto 4).

El empleo de métodos validados y certificados aporta además la garantía por parte de terceros de otros aspectos complementarios, como los relacionados con la producción y revisión periódica de los métodos de ensayo.



Aspectos epidemiológicos

Salmonella

Epidemiología

Salmonella (S) Typhi y Paratyphi. Este tipo de bacterias tiene como único reservorio el ser humano y, por tanto, solo puede adquirirse a través de una persona enferma o portadora, o a través de agua o alimentos contaminados con restos fecales. La transmisión directa persona persona es poco frecuente.

Esta enfermedad sigue siendo un problema en los países en vías de desarrollo, con un impacto aproximado de 16 millones de casos y 600.000 muertes anuales. En estos países, con incidencias cercanas a 900 por 100.000 habitantes la introducción de cepas multiresistentes es altamente problemática.

En los países desarrollados la incidencia de esta enfermedad ha disminuido muchísimo, siendo ahora cercana a 0,2 por 100.000 habitantes en EUA. Esta espectacular mejoría es debida sobre todo al cambio radical de las condiciones de saneamiento de las aguas y a la manipulación más correcta de los alimentos. La mayor parte de los brotes que hoy en día se ven de esta enfermedad están relacionados con la contaminación a partir de un manipulador infectado. Los viajes a países en vías de desarrollo también son una vía importante de adquisición de esta enfermedad.

Salmonella no tifoidea.

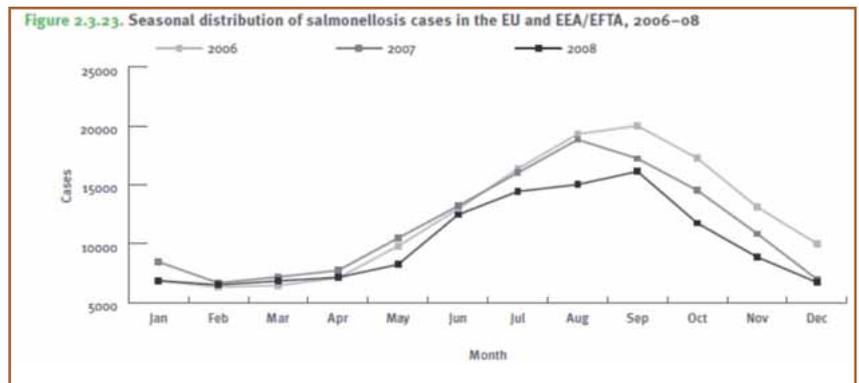
S. Thypimurium y S. Enteritidis son los serotipos más comunes de infección por S. no tifoidea. En el año 2000, en EE.UU., representaron el 42% de todas las salmonelosis confirmadas microbiológicamente. El mayor número de casos de salmonelosis se reportan durante los meses más cálidos del año, coincidiendo con el aumento de toxiinfecciones alimentarias.

En humanos, este tipo de infecciones se asocia con brotes causados por alimentos [TIA], y el agente etiológico más comúnmente identificado en los brotes, en general, es la salmo-

Campylobacter spp., Salmonella spp. y Listeria monocytogenes: aspectos epidemiológicos y microbiológicos

Sarah Lafuente van der Sluis¹
Mercedes de Simón Serra²

¹(slafuent@aspb.cat)
Servicio de Epidemiología, Agència de Salut Pública de Barcelona
²(mdsimon@aspb.cat)
Servicio de Microbiología, Agència de Salut Pública de Barcelona



nella no tifoidea. Muchos alimentos están contaminados con este tipo de bacterias, carne roja, pollo y huevos entre muchos otros. La ingesta directa de estos productos insuficientemente cocinados, o bien de otros productos que han sido contaminados a partir de estos, con la llamada contaminación cruzada son los responsables de esta infección en humanos. Los productos que mayoritariamente se han visto asociados a este tipo de brotes son el pollo y los huevos, pero existen muchísimas fuentes más de infección descritas.

No es raro que huevos y aves estén infectados por esta bacteria. Muchos brotes han sido descritos después de comer ovo productos contaminados y aunque calentar el huevo hasta que la clara esté totalmente solidificada elimina la capacidad de transmisión,

la medida preventiva más eficaz recomendada es utilizar el huevo pasteurizado en la cocinas que preparan alimentos para un importante número de personas.

También las aves y otras carnes son una fuente potencial de esta infección. La prevalencia de infección en aves no es nada despreciable. La contaminación cruzada a partir de carne cruda contaminada en las cocinas también se asocia con brotes de esta enfermedad.

Cada vez más, se asocia esta infección al consumo de productos frescos contaminados: las heces de animales infectados podrían contaminar frutas y verduras frescas y, debido a una limpieza inadecuada, transmitir la infección. El melón, tomate, zumo de naranja, cilantro y brotes crudos son productos relacionados con estos brotes.

Los productos manufacturados distribuidos también pueden suponer un importante riesgo en cuanto a la transmisión de esta enfermedad. Helados, leche, leche en polvo y leche maternizada son también productos asociados a brotes.

La transmisión nosocomial de salmonella no es demasiado frecuente, pero sí la transmisión de pacientes al personal, que queda controlada si se siguen los protocolos de prevención frente a las infecciones nosocomiales. Sin embargo, los neonatos hospitalizados sí que son susceptibles de adquirir infecciones a raíz de familiares infectados, debido a la baja concentración ácida del estómago. Los pacientes de edad avanzada también están expuestos a mayor riesgo de bacteriemia y formas extraintestinales de esta enfermedad debido a su debilidad, patologías de base y menor eficiencia inmunitaria.

Manifestaciones clínicas

Gastroenteritis.

Es la manifestación más típica de la salmonella no tifoidea. Tras de 6 a 48 horas de la ingesta del alimento contaminado aparecen náuseas, vómitos y diarreas. En la mayoría de los casos, la diarrea no es sanguinolenta. El cuadro se puede acompañar de fiebre, dolor abdominal y escalofríos. A veces también aparecen síntomas sistémicos como dolor de cabeza y mialgia. En algunos pacientes es necesaria la hospitalización para rehidratarlos, pero la mayoría de los casos se resuelven espontáneamente. Los pacientes que suelen tener complicaciones o un desenlace fatal son las personas mayores y los inmunodeprimidos.

Fiebre entérica.

Es un cuadro clínico severo caracterizado por fiebre y dolor abdominal, se da mayoritariamente, en niños y jóvenes de 4 a 25 años. En los niños menores de 1 año, los inmunodeprimidos y otras personas con enfermedades de base las complicaciones son mucho más frecuentes. Actualmente,

con tratamiento antibiótico óptimo la tasa de mortalidad es del 0,4%. Normalmente el agente causante es la Salmonella Typhi, S Paratyphi A, B y C, que suele dar una sintomatología similar pero menos grave. El periodo de incubación suele ser de 5 a 21 días. La enfermedad empieza con síntomas no específicos como debilidad, anorexia, dolor muscular, dolor de garganta y a veces hasta síntomas neuropsiquiátricos. La fiebre es inicialmente baja y sube durante la segunda semana de la enfermedad, también es frecuente un rash cutáneo característico. La perforación intestinal es una complicación bastante frecuente de los casos no tratados.

Otras manifestaciones clínicas mucho menos frecuentes de S. son: la bacteriemia e infección vascular y las infecciones localizadas. En pacientes infectados por el virus VIH se dan otro tipo de complicaciones más específicas.

Tratamiento

La fiebre tifoidea se trata mayoritariamente con fluorquinolonas (ciprofloxacino durante 1 semana) o con azitromicina en casos de resistencia. La gastroenteritis por S no tifoidea normalmente se suele limitar espontáneamente y el tratamiento suele ir dirigido a la reposición de líquidos y electrolitos. De rutina, no se deben administrar antibióticos. Sin embargo, en neonatos, inmunodeprimidos o personas mayores sí que se benefician de ellos. Las fluorquinolonas son también en este cuadro el antibiótico de elección. Los portadores crónicos de S tifoidea y no tifoidea deben ser tratados con antibiótico para que cese dicho estado.

Prevención y control

La prevención y control de esta enfermedad se basan en un buen conocimiento de su ciclo vital y en la vigilancia continuada para conocer su evolución y detectar los cambios. En los países en vías de desarrollo me-

jorar las condiciones de saneamiento de las aguas es el primer paso para reducir el importante impacto que tiene la fiebre tifoidea.

En los países desarrollados son las toxiinfecciones alimentarias las que deben ser controladas mediante regulaciones que dificulten el paso de la Salmonella “de la granja a la mesa” para disminuir las infecciones por S no tifoidea. Si los médicos que diagnostican los casos cuando detectan brotes los notifican rápidamente a las autoridades éstos se pueden controlar de manera rápida y eficaz. Otras estrategias, como limitar el uso de antibióticos en ganado, vacunar animales y mejorar las prácticas de manipulación de alimentos, son básicas para reducir esta infección.

Entre las estrategias comerciales importantes para evitar toxiinfecciones con muchos afectados podemos destacar: no servir ningún alimento preparado con huevo insuficientemente cocinado, utilizar siempre que sea posible huevo pasteurizado y vigilar mucho el riesgo de contaminación cruzada durante la manipulación de varios alimentos. También en residencias y hospitales se recomienda utilizar preparados de huevos pasteurizados.

En cuanto a los manipuladores de alimentos es importante insistir en la higiene personal y en el cuidado de mantener siempre los tiempos y temperaturas necesarias para controlar esta infección. No queda claro si es mejor hacer pruebas rutinarias a manipuladores que han estado infectados antes de reincorporarse al trabajo o que vuelvan a trabajar cuando se haya resuelto el cuadro. De todas maneras es bueno asegurar la negativización con como mínimo dos coprocultivos seguidos en manipuladores que han sido infectados y que están en contacto con alimentos o preparados que no vayan a ser cocinados posteriormente.

La infección nosocomial se puede prevenir siguiendo los protocolos de precauciones estándares, los trabaja-

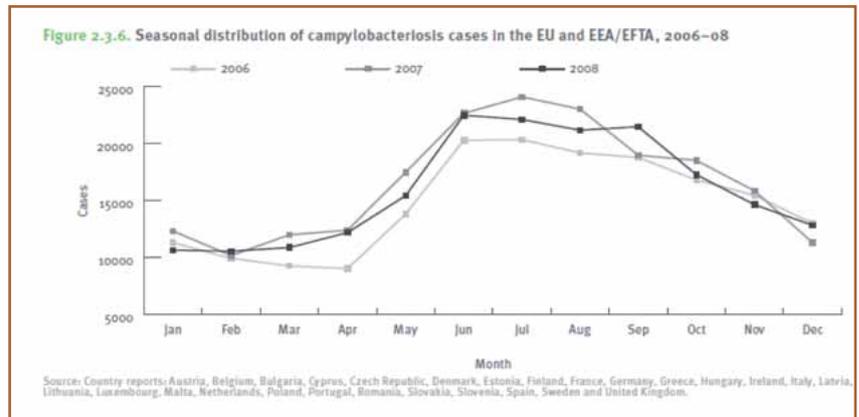


dores infectados, pueden volver a trabajar cuando se haya resuelto la enfermedad, ya que el riesgo de infección del trabajador al paciente es muy bajo, siempre y cuando cumplan con tales precauciones.

Campylobacter **Epidemiología**

La principal vía de transmisión de esta infección para los humanos es el consumo de carne contaminada. Muchos animales son portadores de esta bacteria durante toda su vida. Aunque la infección también causa morbimortalidad en animales, las carnes que provienen de animales infectados que se contaminan cuando son procesados. Un buen ejemplo son los pollos de criaderos, muchos de estos animales están colonizados, durante el proceso de descuartizar se contamina la carne que se vende infectada en los supermercados. Leche cruda no pasteurizada también es un vehículo muy común de esta infección. Y la transmisión a través de aguas contaminadas no tratada también está ampliamente documentada. También han sido descrito brotes a partir de la cocción insuficiente de carne contaminada, tanto de vacuno como de carne de cordero, quesos, leche de cabra e incluso almejas. Sin embargo, las aves (los pollos), no suficientemente cocinadas son responsables de la mayor parte de casos de campylobacteriosis esporádicas (50-70%). Con el consumo creciente de carne aumenta el impacto de esta enfermedad.

El contacto directo con animales infectados también puede transmitir la enfermedad. Animales de compañía tipo gatos y perros jóvenes con diarreas también han sido responsables de infecciones en humanos. Tampoco es improbable que animales sanos excreten la bacteria y provoquen infección. Personas con empleos relacionados con animales de campo, así como de laboratorio, presentan mayor riesgo de sufrir esta enfermedad.



Transmisión fecal-oral persona persona es también posible, por ejemplo, gente con contacto con niños que aún son incontinentes. La transmisión persona persona en niños de edad escolar es infrecuente, tampoco la transmisión a partir de manipuladores de alimentos infectados pero asintomáticos es demasiado común. Los homosexuales tienen un riesgo aumentado de sufrir infecciones por subtipos menos comunes de esta bacteria (*C. coli*, *C. jejuni*), así como pacientes con infección por el virus VIH.

Esta bacteria provoca un pico de infección durante el verano y principios de otoño, sin embargo durante todo el año su incidencia y transmisión son importantes.

Se trata de la infección bacteriana intestinal más común. En el año 2008, fue la primera causa de gastroenteritis humana esporádica en la Comunidad Europea. Los grupos de niños menores de un año y jóvenes entre 15 y 29 años son los grupos de edad más afectados. La prevalencia de esta infección en personas sanas es mucho más baja que la que encontramos personas con alguna enfermedad de base.

En los países en vías de desarrollo esta infección sigue un patrón epidemiológico marcadamente distinto, afecta principalmente a niños sanos durante sus cinco primeros años de vida, las infecciones que sufren los adultos son mayoritariamente asintomáticas. Parece que, en estos casos,

la fuente de transmisión más común es entre personas. También es una infección comúnmente vista en viajeros que acuden a estos países.

Tanto estudios realizados reinyectando la bacteria en voluntarios sanos así como la evidencia de que en países en vías de desarrollo la infección disminuye su prevalencia con la edad apunta hacia una inmunidad adquirida para esta infección y esto deja la puerta abierta a que sea posible obtener algún día una vacuna frente a la misma.

Manifestaciones clínicas

C. jejuni es el subtipo que causa el cuadro clínico más típico. *C. coli* suele provocar un cuadro similar pero más leve. La manifestación más común es la enteritis, a la que suele preceder el dolor de cabeza, la mialgia y el malestar general, y seguidamente aparece la diarrea, con dolor abdominal y fiebre. La diarrea puede ser de intensidad variable (desde deposiciones semilíquidas a diarrea acuosa o sanguinolenta). El dolor abdominal suele ser intenso y ceder con las deposiciones. Normalmente este cuadro es autolimitado y benigno, sin embargo en algunos pacientes se puede prolongar más de 7 días. Otras manifestaciones más graves y mucho menos frecuentes son la colitis, principalmente manifestada con diarrea sanguinolenta de más de una semana de evolución o la bacteriemia.

Tratamiento

El tratamiento adecuado para esta enfermedad es la reposición de líquidos y electrolitos vía oral, para los casos leves, y para aquellos que cursen con deshidratación severa, vía endovenosa. Los antibióticos son necesarios en casos en los que la evolución es larga y la diarrea tiene sangre o la fiebre es elevada. En estos casos, recibir antibióticos de forma precoz disminuye la severidad del cuadro. Muchos antibióticos son efectivos, sin embargo, el preferido, por causar pocos efectos secundarios y ser de fácil administración, es la eritromicina.

El pronóstico es bueno en la mayoría de casos, aunque pueden surgir algunas complicaciones reumáticas o el síndrome de Guillain Barré, infrecuentes pero que son posibles tras una infección de este tipo.

Prevención y control

A diferencia de la Salmonella, esta enfermedad no causa demasiados brotes y, por tanto, tiene impacto en cuanto a que produce muchas infecciones espontáneas que no suelen tener un origen común. Sin embargo, una buena estrategia para disminuir la prevalencia de esta infección es reducir la cantidad de carne contaminada que se produce, mejorando los controles de calidad de los mataderos. Además, reducir al máximo el riesgo de contaminación cruzada durante la manipulación y cocinar durante suficiente tiempo a temperaturas adecuadas son clave para limitar la transmisión de esta enfermedad.

Listeria

Listeria monocytogenes es una bacteria Gram positiva de forma bacilar. Por lo general se manifiesta en los recién nacidos y adultos como meningoencefalitis, septicemia o ambas, y en las mujeres embarazadas por corioamnionitis que puede producir el aborto. Se transmite habitualmente por ingestión de alimentos contaminados. En las infeccio-

nes neonatales se puede transmitir de la madre al feto en el útero o durante el paso por el conducto del parto infectado. El período de incubación va de 3 a 70 días. También, aunque no es frecuente, en la literatura se han descrito brotes de infección nosocomial por contaminación cruzada. En el año 2008 en Europa el 20% de los casos reportados (134/653) tuvieron un desenlace fatal. Según la legislación Europea existen criterios de seguridad alimentaria para comidas que se venden preparadas y a punto para comer. Las categorías de comidas en las que se encuentra un mayor incumplimiento de la normativa son pescados ahumados, quesos y platos precocinados con carne.

Aspectos microbiológicos

Campylobacter, *Salmonella* y *Listeria monocytogenes*, patógenos humanos transmitidos por los alimentos

Campylobacter, *Salmonella* y *Listeria monocytogenes* son los principales agentes bacterianos causantes de zoonosis transmitidas por los alimentos en los países desarrollados.

Según el informe de la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA) del año 2011 sobre agentes zoonóticos y brotes de origen alimentario en el año 2009, *Campylobacter* sigue siendo la causa de gastroenteritis bacteriana de origen zoonótico más común en los países de la comunidad europea (UE) con 198.252 casos humanos confirmados, y con un aumento del 4% respecto al 2008.

Salmonella es el segundo agente enteropatógeno, con 108.614 casos. En España, la incidencia de *Salmonella* en los casos de gastroenteritis es aún ligeramente superior a la de *Campylobacter*.

Debido a las medidas de control aplicadas por los estados miembros de la UE y la Comisión Europea, especialmente en la producción aviar, la salmonelosis ha experimentado un des-

censo por quinto año consecutivo, con un 17% menos de casos en el 2009 respecto al 2008.

Las infecciones humanas de origen alimentario debidas a *Listeria monocytogenes*, han aumentado un 19% en 2009 respecto al año 2008 con 1.645 casos confirmados. Aún siendo su incidencia menor que la de *Campylobacter* y *Salmonella*, ha sido responsable de 270 muertes humanas durante el año 2009, mientras que solo 60 han sido causadas por *Salmonella* y 40 por *Campylobacter*.

Salmonella spp

Salmonella es el principal agente etiológico bacteriano de brotes de toxoinfección de origen alimentario en España y en los países tanto desarrollados como emergentes. En la UE es la causa del 31% del total de brotes de origen alimentario.

El reservorio de las salmonellas gastroenteríticas está constituido por los animales enfermos o portadores de sangre caliente y fría, especialmente los mamíferos y las aves, dentro del primer grupo los animales de abasto. Las aves de corral tienen la incidencia más elevada de infección por *Salmonella*, particularmente pollos, gallinas y patos. El cerdo y el ganado bovino presentan también una alta contaminación. El reservorio de infección entre los animales domésticos (tortugas, perros, gatos, ratones, hámsters, etc.) es también de fundamental importancia en la epidemiología de la salmonelosis. Las salmonellas se eliminan por las heces y se diseminan en el medio ambiente donde pueden sobrevivir durante un tiempo según las condiciones de temperatura, pH y humedad.

Ciertos serovars de *Salmonella* en el curso de la evolución se han adaptado de modo estricto a determinados huéspedes. Este es el caso de *Salmonella typhi* y *Salmonella paratyphi A* en el hombre en el que pueden causar enfermedad grave, no siendo patógenas para otras especies animales.



Otros serovares están adaptados a una especie animal, como *Salmonella Gallinarum*, *Salmonella Abortusequi*, *Salmonella Choleraesuis*, etc., en los pollos, équidos y ganado porcino, respectivamente. La transmisión no puede realizarse más que en el interior de la especie animal sin huésped intermediario.

Al lado de estos serovares de *Salmonella* adaptados a un huésped están los muy numerosos tipos ubiquitarios, con un amplio rango de huéspedes potencialmente patógenos para el hombre y los animales. Son responsables de las gastroenteritis en el hombre, que constituyen la expresión clínica más frecuente de la infección por *Salmonella*. Mientras que en los países industrializados se producen sobre todo por el consumo de alimentos contaminados, en los países en vías de desarrollo, donde los abastecimientos de agua, frecuentemente, no están sometidos a procesos de higienización, las salmonelosis de origen hídrico son, probablemente, las más comunes. La transmisión también puede ser directa –vía orofecal–, especialmente en niños y enfermos hospitalizados, dando lugar en guarderías, salas de pediatría, de enfermos crónicos, etc., a brotes difíciles de controlar y que pueden producir una mortalidad elevada.

El pH óptimo para la supervivencia y la multiplicación de *Salmonella* se sitúa entre 6.5 y 7.5, aunque entre valores de 4.5 a 9 también pueden multiplicarse. La mayoría de serovares de *Salmonella* se inactivan a temperaturas superiores a los 60°C durante 20 minutos y resisten hasta tres meses a temperaturas de congelación.

La *Salmonella* tiene múltiples factores de virulencia, especialmente los que se sitúan en diversas islas de patogenicidad que están formadas por secuencias de DNA que codifican determinantes de virulencia responsables de interacciones con el huésped. Determinados serotipos de *Salmonella* (*Typhimurium*, *Dublin*,

Gallinarum-Pullorum, *Enteritidis*, *Choleraesuis* i *Abortusovis*) presentan plásmidos de virulencia que permiten una multiplicación rápida de las cepas dentro de las células del huésped, y resistir a sus mecanismos de defensa. También confieren la posibilidad de inducir la lisis de los macrófagos, una respuesta inflamatoria anómala y una enteritis. Estos plásmidos también son portadores de un operón que codifica una adhesina involucrada en la colonización del intestino delgado. Otros factores de virulencia son una enterotoxina diarreagénica y una proteína citotóxica termolábil localizada en la membrana externa de la bacteria. Estudios en voluntarios indican que la dosis infectiva de *Salmonella* es elevada (100.000 células), pero en alimentos implicados en brotes de intoxicación alimentaria se ha comprobado que las concentraciones inferiores a 50 células provocan la enfermedad.

La carne y los productos derivados constituyen uno de los principales vehículos de transmisión de *Salmonella* al hombre. A partir de la carne, puede entrar en la cadena alimentaria en cualquier punto, durante la elaboración de alimentos, así como en la fase de comercialización y preparación de los alimentos en catering y en el ámbito doméstico.

Campylobacter spp.

Dentro del género *Campylobacter* se incluyen 18 especies. Las especies termofílicas son las causantes de la infección en el hombre: *C. jejuni*, *C. coli*, *C. fetus*, *C. upsaliensis*. *C. Jejuni* es el responsable del 90% de los casos y es muy frecuente en pollos. *C. coli* se aísla principalmente en el cerdo y tiene una incidencia mucho menor en las enfermedades intestinales en humanos.

El reservorio de *Campylobacter* es el tubo digestivo de un gran número de animales de sangre caliente, donde se encuentra como comensal y también como patógeno entérico ocasio-

nal. Los más frecuentes son las aves de corral (pollos), conejos, roedores, bóvidos, porcinos, ovinos, pájaros y animales de compañía incluidos gatos y perros. Los vegetales los crustáceos y las moscas pueden ser vehículos de la infección. Sobrevive en aguas superficiales y aguas tratadas incorrectamente, lo que es importante para el ciclo vital de *Campylobacter*.

Campylobacter jejuni se multiplica entre 30°C y 45°C y no a 4°C, por lo tanto no lo hace en alimentos mantenidos a temperatura ambiente o en condiciones de refrigeración. Crece en atmósferas de baja concentración de oxígeno (5% de O₂) y según recientes estudios sobrevive en la superficie de las carnes gracias a la interacción con *Pseudomonas*. Es un microorganismo frágil, vulnerable a diferentes factores físicos y químicos. La congelación reduce la población de *Campylobacter* en los alimentos (hasta dos unidades logarítmicas).

El mecanismo enteropatogénico de *Campylobacter jejuni* no está establecido del todo pero se sabe que puede colonizar e invadir el epitelio intestinal produciendo una enteritis difusa, inflamatoria, hemorrágica y edematosa. El único flagelo de *Campylobacter jejuni* se considera un factor de virulencia ya que facilita la colonización. Las fimbrias son también importantes en la virulencia, así como la actividad endotóxica del lipopolisacárido de la membrana externa de este microorganismo. Son necesarios más estudios para establecer si la producción de citotoxinas parecidas a la enterotoxina *cholera-like* tiene también un papel en la capacidad patogénica del microorganismo. La dosis infectiva es baja, en general 500 células son suficientes para producir la enfermedad.

Los alimentos más frecuentemente contaminados con *Campylobacter* son las carnes, especialmente las aves y la leche cruda y sus derivados. Según datos de la EFSA en los paí-

ses miembros de la UE en el 2008, el porcentaje medio de pollos contaminados era del 71% y el pollo en la fase de comercialización variaba entre 8-74% según el país.

Aunque *Campylobacter* puede ser la causa de brotes de origen alimentario, la mayoría de infecciones humanas son esporádicas y el principal vehículo de la transmisión es la carne de pollo por el cual *Campylobacter* se introduce en el ámbito doméstico y puede dar lugar a una contaminación cruzada de los alimentos en la cocina.

Listeria monocytogenes

Listeria monocytogenes es un patógeno oportunista que causa infección sistémica (septicemia, meningitis). La listeriosis invasiva, afecta particularmente a las personas inmunodeprimidas, así como a las mujeres embarazadas, los recién nacidos y a los ancianos. A pesar de tener una baja incidencia, la enfermedad tiene una alta mortalidad. En el año 1997 se describieron cepas de *L. monocytogenes* en brotes de toxiinfección alimentaria con síntomas similares a los cuadros de gastroenteritis con un inicio rápido, a diferencia de lo que sucede en la infección invasiva por *Listeria*, que tiene un periodo de incubación que puede llegar hasta las 6 semanas. En la infección que cursa como gastroenteritis la mayoría de personas afectadas no presentan enfermedades de base.

Este microorganismo se encuentra ampliamente distribuido en la naturaleza. Se puede aislar del tubo digestivo de numerosas especies de mamíferos y pájaros, de algunos peces y del marisco. Se encuentra también en la tierra, las plantas, el agua y ambientes de producción y procesamiento de alimentos. En el hombre entre un 1% y un 10% son portadores intestinales asintomáticos de este microorganismo.

Aunque es un organismo no esporulado, es resistente a las condiciones ambientales adversas. Puede crecer

Tabla 1.- Prevalencia de *Campylobacter* spp. en productos cárnicos en Barcelona (2005-2010).

Tipo muestra	nº muestras	% muestras positivas
Pollo y derivados	233	18,0
Otras aves	55	18,1
Ovino	62	8,0
Porcino	93	1,0
Bovino	76	1,3
Conejo	15	6,6
Total	534	11,0

Tabla 2.- Prevalencia de *Salmonella* spp en alimentos en Barcelona (2005-2010).

Tipo muestra	nº muestras	% muestras positivas
Carnes y derivados cárnicos de ave	179	17,8
Otros productos cárnicos	666	8,1
Productos charcutería	120	1,6
Productos de la pesca	552	1,4
Moluscos bivalvos	451	5,9
Ovoproductos	170	1,2
Comidas preparadas	929	3,1
Otros alimentos *	1500	0,7
Total	6067	2,7

* Productos lácticos, pastelería, hortalizas, especias y condimentos, salsas...

entre 0°C y 45°C, característica que le permite la multiplicación en alimentos en refrigeración. La temperatura óptima de crecimiento es entre 30°C y 37°C. Es moderadamente resistente al calor y sobrevive a temperaturas de congelación. Crece a pH 4.4-9.5 por debajo de 4.3 las células bacterianas sobreviven pero no crecen.

La dosis infectiva de *L. monocytogenes* varía según la cepa bacteriana y la susceptibilidad del huésped. En pacientes inmunodeprimidos se considera que pueden ser suficientes 1.000 microorganismos para producir la enfermedad, mientras que en personas sanas la dosis infectiva es más elevada (1,9x10⁵ a 1x10⁹ ufc).

Más del 95% de las cepas aisladas en humanos son serovar 4b, 1/2 y 1/2b. No hay diferencias geográficas en la distribución de cepas y tampoco existe relación entre el origen, características fenotípicas y moleculares de las cepas y su virulencia. Las cepas responsables de brotes corresponden a un pequeño número de clones.

La infección humana tanto de las cepas invasivas como gastroenteríticas se produce principalmente por el consumo de alimentos contaminados como la leche y quesos blandos durante la maduración, los patés, los vegetales crudos y todo tipo de carnes, en especial el pollo, pescado crudo o ahumado y marisco.

Los principales factores que pueden motivar el aumento de la listeriosis son la creciente población sensible, la mayor conservación en frío para prolongar la vida de los alimentos y la emergencia de la listeriosis gastroenterítica.

Prevalencia de *Campylobacter*, *Salmonella* y *Listeria monocytogenes* en los alimentos

Para asegurar la inocuidad de los alimentos para el consumo humano, las diferentes autoridades competentes controlan los aspectos relacionados con la producción y comercialización de los alimentos. Una parte esencial de este control es la recopilación, análisis e interpretación sobre la pre-



sencia en los alimentos de microorganismos que puedan ser origen de enfermedad en el hombre.

En el Servicio de Microbiología del Laboratorio de la Agencia de Salud Pública de Barcelona (ASPB) se realiza el análisis microbiológico de alimentos producidos y/o comercializados en Barcelona. Una gran parte de los alimentos analizados corresponden a programas de control y vigilancia sanitaria de los alimentos en el punto de venta de acuerdo con la normativa comunitaria, pero también proceden de la investigación de brotes de toxiinfecciones alimentarias en las que el laboratorio actúa como soporte analítico. Otros alimentos proceden de mercados centrales de la ciudad de Barcelona así como del comercio internacional y de empresas alimentarias.

En el laboratorio se utilizan métodos de análisis de referencia y métodos alternativos rápidos acreditados por ENAC. Para la detección de *Salmonella* spp. actualmente se utiliza el método convencional de referencia ISO 6579:2002 y el método rápido de ensayo inmunofluorescente enzimático *Salmonella* Vidas. La detección de *Campylobacter* spp. se lleva a cabo mediante el método ISO 10272-1:2006 y la detección de *Listeria monocytogenes* mediante el método ISO 11290-1:1996/Ammendment 1:2004 y también mediante el método inmunofluorescente enzimático *Listeria* Vidas.

En las tablas 1, 2 y 3 se recogen los resultados obtenidos sobre la presencia de *Campylobacter* spp, *Salmonella* spp. y *Listeria monocytogenes* en los alimentos estudiados durante el periodo 2005-2009. Los alimentos que corresponden a programas de control fueron recogidos por los servicios de inspección de la Agencia de Salud Pública de Barcelona y de la Agencia de Salud Pública de Catalunya.

Las cepas de *Salmonella* aisladas en los alimentos pertenecen a 33 sero-

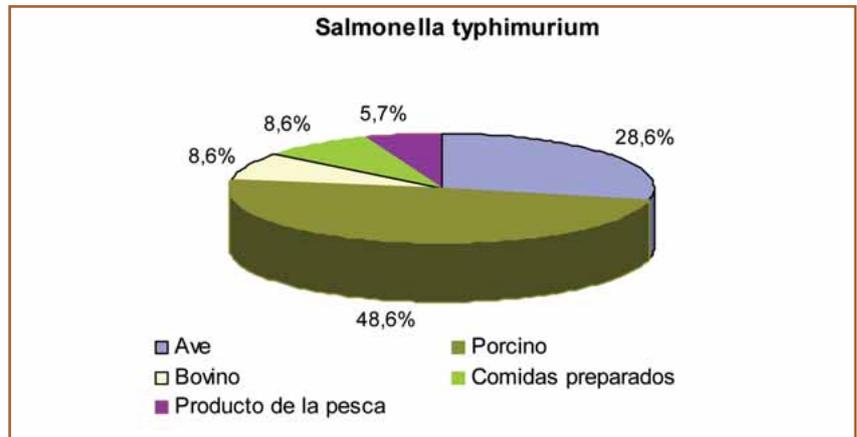


Figura 1.- Porcentaje de aislamientos de *S. Typhimurium* en los alimentos.

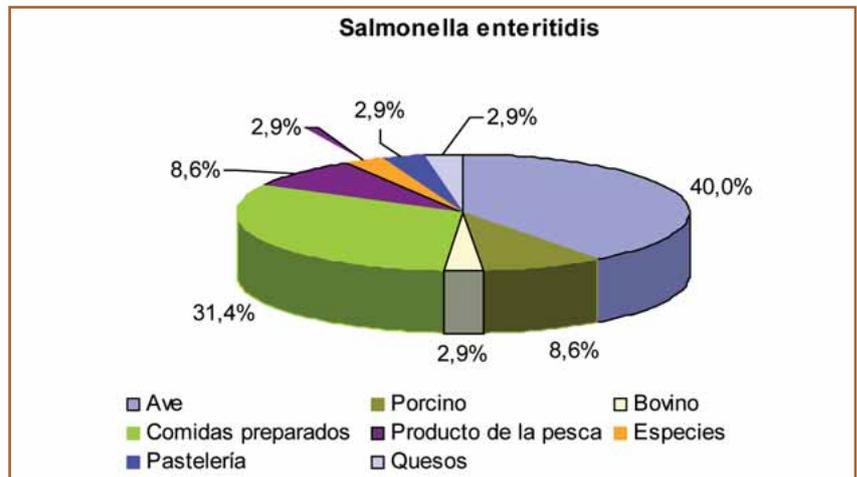


Figura 2.- Porcentaje de aislamientos de *S. Enteritidis* en los alimentos.

Tabla 3.- Prevalencia de *Listeria monocytogenes* en alimentos en Barcelona (2005-2011).

Tipo muestra	nº muestras	% muestras positivas
Carnes y derivados cárnicos	417	22,5
Pescados ahumados	64	14,0
Comidas preparadas	701	5,1
Quesos	167	0,5
Otros alimentos *	312	1,2
Total	1661	9,0

* Productos lácticos (leche, natas y mantequillas), pastelería, hortalizas, especias y condimentos, salsas...

vares de *Salmonella* diferentes. Los serovares prevalentes fueron *S. Typhimurium* (35 aislamientos) y *S. Enteritidis* (34 aislamientos) que son los serovares que con mayor frecuen-

cia infectan al hombre y que se incluyen en los programas de control alimentario de la UE. La distribución de estos serovares en los diferentes alimentos se indica en las figuras 1 y 2.

The title of this presentation is “Evolution of Food safety and microbiological methods: a few considerations and comments”. The reason of that choice is as follows: I think that we are always at one period of history, whichever the field we consider and it is always uneasy to be conscious of the fact that the period we live is the result of many discoveries, many efforts and events which occurred previously. That is particularly true in the field of Food safety.

The problems of Food safety are not new; they have occurred from a very long time and, at each period of our history, men tried to face problems; but, of course, the way of thinking has been submitted to a lot of changes and evolutions. That is the reason why I shall comment some crisis described in the early Food safety history before the time when the role of some particular agents in Food safety problems was pointed out.

The discovery of microorganisms and of their incidence in food has been an important step in the origin of different diseases obviously related with food; however, Food microbiology found its own identity after the 2nd world's war only. That will be the second part.

The microbiological methods said “pastorian” were used all around the world and are still used as “reference” methods; but the face of Food microbiology as completely changed with the development of rapid methods and automation in microbiology and, especially, with molecular biology approaches.

Due to the necessity to be accepted officially in international trade, those methods had, of course, to face different difficulties; I shall mention those related to their acceptance by standardization bodies.

Then, after a few considerations and comments on changes observed within the types of foods and ways of eating during the past decades I'll describe shortly, in the last part, the new scientific context of Food safety and

Evolution of food safety and microbiological methods: a few considerations and comments

Cécile Lahellec

Honorary Research Director, French Food Safety Agency
(cecile.lahellec@sfr.fr)

the role of Food safety agencies; we shall examine till which extent the improvement of microbiological methods may help our understanding of some health problems related with food. Finally, I'll draw a short conclusion.

Food Safety: what was it a few centuries ago?

The concept of Food safety is not a new one. From the beginning of humanity, food had some sacred meaning and, for that reason, it has been considered that eating must not lead to any health problem.

We all know that, even nowadays, some types of foods, like pork, are still submitted to religious prohibitions (for Jews and Muslims especially), even if they are no more in relation with any concrete health problem, they have anyway to be considered as prescriptions written in the Bible or the Coran. In fact, from a long time, food has been incriminated in problems of illness but the origin of contaminations was not known. One of those crisis, related to bread was described firstly by Ademar de Chabannes in 997. The illness was very severe and a lot of people died from in the center of France; however, people were very poor and they had to make a cruel choice: eat the contaminated bread or not to eat at all and die. Most often, Food security problems had to be taken under consideration before those of Food safety.

The agent of the disease, *Claviceps purpurea*, was identified, at the beginning of the 19th century only by a botanist called Candolle.

When we have the opportunity to learn a little about the history of fears resulting from the ingestion of food (a very interesting book written by Madeleine Ferrières and published in 2002), we are conscious that, during many centuries, even if the situation was very different from now as the existence of microbes was not known, different approaches concerning the risks related to food were undertaken. From different examples, we can foresee what is called now “Risk Evaluation”; different groups of people: scientists, experts, profane, may be consulted to give their advice and try to find a consensus; then, the decision may be taken by a magistrate and, sometimes, somewhat different from that of the experts.

The discovery of the existence of microorganisms has opened a decisive step in the comprehension of the origin of food diseases. However, we have to keep in mind that, by intuition, empirically, men were conscious of the presence of microorganisms in food. As an example, we know that there was a brewery in Babylona, most probably 5 to 7 thousand years Before Christ (B.C.) We know also that salt from the Dead Sea was used to preserve Food, that Babylonians and Chinese even prepared fermented sausages 1500 years B.C. They knew what they could do but they did not know why they were so successful.

Many centuries passed along: according to James M. Jay, 1978, in “Modern Food Microbiology”, “the first scientist who suggested the role of mi-



croorganisms in food was probably A. Kircher who, as early as 1658, observed decaying bodies, meat, milk and other substances and saw what he referred to as “worms” invisible for the naked eye. It is then, possible to take under consideration the works of L. Spallanzani (1765), who observed that beef broth submitted to boiling for one hour and sealed remained sterile but he did not succeed in convincing his colleagues because the treatment to which the broth had been submitted excluded oxygen. A lot of researches were carried out consequently. We can remember here especially, the beginnings of canning; in 1795, the French government offered a prize of 12000 fr for the discovery of a practical method of food preservation. In 1809, a Parisian confectioner, François (Nicolas) Appert could preserve meats in glass bottles that had been kept in boiling water for varying periods of time. This discovery was made public in 1810 when Appert was issued a pattern for his process. Not being a scientist, Appert was probably unaware of the long-range significance of his discovery or why it worked. This is, of course, the beginning of canning as it is known and used today. This event occurred some 50 years before Louis Pasteur demonstrated the role of microorganisms in French wines, a development which gave rise to the rediscovery of bacteria (they were seen under a microscope and described by A. Leeuwenhoek in 1883 but it is unlikely that Appert was aware of this development since he was not a scientist and Leeuwenhoek’s report was not available in French.

The first man to appreciate and understand the presence and role of microorganisms in food was Louis Pasteur who, in 1837, showed that the souring of milk was caused by microorganisms; he employed for the first time the use of heat to destroy undesirable microorganisms in wine and beer (pasteurization).

The evolution of microbiological methods

The first real developments in Food microbiology can be observed after the Second World War only: as nowadays, the evaluation of Food safety always began by a visual inspection and microbiology was used as a help to the decision.

The microbiological techniques used, which, in France, were taught from the early fifties by R. Buttiaux (who was a physician), in the Pasteur Institute in Lille (France) derived from the discoveries of Louis Pasteur. I was lucky to follow the courses in 1967 and 1968. If I remember well, in May, each year, it was possible to learn through theoretical and practical work all bases of Food microbiology; four courses were organized: one on water, one on meat and derived products, one on milk and dairy products, and the last one concerned all other types of food products (fish or poultry, for example). I still have those courses in mind as R. Buttiaux had never any paper to help him during his presentations. From that time, he taught us about the ecological development of microorganisms; concerning the practical work, he was very keen of the way we were conducting the manipulations and, to help us, we could follow on a screen all developments; we had also to know by heart the characteristics of microorganisms; we were conscious to learn the real basis of Food microbiology. Those techniques are the conventional ones used at reference methods even if, of course, a lot of improvements have been afforded, new media have appeared of the market, a lot of specifications have been given in the purpose of accreditation, as we’ll see later, new technologies may be introduced in some cases (It has to be mentioned that, In France, the first regulation giving microbiological criteria, published 21st December 1979, gave criteria and the related microbiological conventional methods). Quite at the same period,

due to the necessity of examining a sufficient number of samples, representing as closer as possible the population, many scientists began to think to alternative methods which may be used in laboratories in order to control and maintain Food safety in most countries. The first scientist to propose practical solutions is somebody who, providentially, is among us today, and I’d like to tell you a story I repeat every year: I was participating in a symposium in Kiel(D) in 1974. I can’t forget it. I did not present anything on that day; I was just learning and listening at the different papers when, suddenly, we had a very interesting and unusual presentation: the speaker, a young American Chinese was quite “dancing”, showing beautiful slides: the miniaturized methods used to detect or enumerate microorganisms from poultry was the subject of his presentation: he was using microplates instead of tubes and a micro-inoculator instead of platina loops. He had a very simple principle “THINK SMALL”. As I was working on poultry meat microbiology and was very much interested by rapid and economic methods in order to study a large number of strains simultaneously, I met Dr. Fung at the end of the session, asking for informations and reprints; I must say it was the beginning of a long story, first because he sent me reprints and even his thesis and, from that time we became very good friends but I must say, too, that it opened me new horizons, new contacts and a willingness to communicate about the possibilities which were offered to food microbiologists: they could use rapid method which were, till that period, used in the medical field only. For me, it was the beginning of a long story in science and friendship. Dr. Fung visited our Institute in 1976 and, from that time, miniaturized methods were introduced in our laboratory and used to identify a lot of strains to trace Salmonella, then different types of pathogenic mi-

microorganisms “from farm to fork”; we were so enthusiastic with those methods that we presented the technique as well as the results during different meetings in different laboratories: we wanted those methods be adopted by the scientific community and were somewhat successful. In fact, Dr. Fung is really the “father” of all the commercial methods of identification which appeared on the market from the seventies, and I must say I have been very lucky to stay in his laboratory during 2 months in 1980.

Simultaneously, different scientists around the world began to think to new techniques derived from different branches of Science; in fact, the microbiological controls taking place in industrial laboratories, they had to find a way in order to:

- Get a rapid answer in order to cancel any abnormality in processing food and, by that way, avoid to put on the market some products which would not fill regulatory standards or standards proper to the concerned industry.
 - Low cost in order to allow a high number of samples to be examined.
- All that being realized, keeping in mind the results have to be accepted by the scientific community.

In that context, many efforts have been proposed quite early, in order to set up methods based on the following principle: the microbial population is evaluated by detecting a signal related with the activity of microorganisms, most often an enzymatic or the concentration of a molecule (coenzyme, metabolite) or a change appearing in the medium (pH or Redox potential impedance, heat production variation) in connection with that activity. Radiometric methods were proposed and studied by P. Mafart in Quimper.

A lot of methods based on immunology have been developed but it seems that, during the last decade, the most spectacular developments have concerned the introduction an use of

methods based on molecular biology, including now DNA chips, which means a fantastic technological evolution, for the characterization of strains. During the week, you will be lucky to learn a lot about the evolutions but one of the difficulties, of course, was to make the commercial techniques accepted for official controls. That is the reason why I would like to share with you an example of the difficulties encountered to introduce new technologies in regulations.

The long way for the official acceptance of alternative microbiological methods

The problem of acceptance of alternative microbiological methods has been thoroughly studied during the past years and somewhat solved, due especially to the actions undertaken in ISO and CEN meetings. Those two organizations will be described shortly in order to better understand the context.

- ISO (International Standards Organization) is the International Standards Organisation; this organization was created in October 1946; its seat is located in Geneva (CH); the creation results from the fusion of two organizations:

- ISA which was the International Federation of National Associations of Standardization, founded in New York in 1926.

- UNSC, i.e Committee for coordination of standardization of United Nations, created in 1944.

The first national Assembly was held in 1949 in the great amphitheater in Sorbonne (Paris). ISO is composed of 247 committees. All standards are obtained by consensus; however, they are not mandatory. The technical committee in charge of Food microbiology is TC34 / SC9; the actual president is Bertrand Lombard (F); the meetings are held in a different country each year; for example, in 2009, the meeting was held in Valencia (Spain); In June 2011, the

meeting was held in Bournemouth (UK); as usual, it was a joined ISO/CEN meeting.

- CEN, Comité Européen de Normalisation (“*European Committee for Standardization*”) has been created in 1961 in order to harmonize the standards elaborated in Europe; that means that the standards are mandatory in all countries of EC (at the contrary, the standards which are elaborated by ISO are facultative, which means a great difference... All members are members of ISO as well.

The seat of CEN is located in Brussels (B). In the beginnings, it was created by the national organisms for standardization from France, Germany and Benelux countries. Nowadays, the full members are the 27 countries of EU and the three countries of AELE (Association Européenne de Libre Echange) which own such an organism (Switzerland, Norway and Iceland). CEN elaborates technical standards in favor of international trade.

CEN/TC275/WG6 was created in 1993 and I was nominated as the convener; nowadays, from July 2005, Alexandre Leclercq from Institut Pasteur in Paris, is in charge of the group.

From the beginnings, one main principle has been followed during the work of this group, i.e the Vienna Agreement; this agreement requires that, as often as possible, ISO methods are taken In order to avoid any overlap, there is also an agreement between different groups of CEN that only one group is in charge of a particular method (the “Vienna agreement”). For example, TC302 in charge of milk and dairy products analysis may choose one specific technique. In this case, it requests TC 275/WG6 to refer to this specific technique in the standard method. The necessity of taking into account the experience of other groups around the world, for example AOAC and IDF (International Dairy Federation), has



also been emphasized from the beginning and, presently, the basis for a good cooperation has been set up.

In order to maintain a good international cooperation, one part of the meeting concerns the liaison with other organizations, ie: International Dairy Federation (IDF) Codex Committee on Food Hygiene, AOAC (Association of Official Analytical Chemists), WHO (World Health Organisation), IUMS (International Union of Microbiological Societies). The necessity of getting an international consensus, especially with Codex Alimentarius, is always kept in mind.

Due to the evolution of techniques proposed, one important problem discussed during many ISO /CEN meetings has been the introduction of new technologies in Food microbiological methods and, to finalize the project, it took a very long time...

Finally, an important resolution was taken during the joined meeting held in Parma (It) in April 2004.

- *Each time a standard method is being revised, the possibility of using new technologies, including PCR, must be examined by comparing results with those obtained when using the official conventional method.*
- *For a given microorganism, in order to complete the existing method, the development of standardised methods based on new technologies can be proposed when the purpose to be obtained (for example pathogenicity level) makes it necessary.*
- *When new technologies, including PCR, are used as alternative methods, they must be validated against the reference method.*

Those sentences look probably as quite simple, but I am sure you cannot imagine how many hours of discussions which were necessary to obtain a consensus: that is “international cooperation”. But the hours of discussions were very fruitful... as, finally, rapid methods were accepted accor-

ding to the EC regulation 2073 15 December 2005 concerning microbiological criteria:

“Test results are dependent on the analytical method used and, therefore, a given reference method should be associated with each microbiological criterion. However, Food business operators have the possibility to use analytical methods other than the reference method, in particular more rapid methods, as long as the use of these alternative methods provide equivalent results”.

So, alternative methods were finally, officially accepted in the EC, which is surely an important step in the new context of Food safety as a lot of controls and investigations have to be realized.

The new context of Food Safety

The new context which will be described shortly thereafter has taken place in the early 1990’s after different food crisis which may be explained through different reasons.

The types of foods we eat is very different of that we ate 50 years ago; and a lot of microbiological changes may be observed according to the food, the conditions of preparation, of storage. As an example, I still remember the time when crude vegetables, as minced carrots, appeared on the market; a lot of controls began which showed the presence of Yersinia (including some Yersinia enterocolitica), and some types of fears suddenly appeared; at that time, they concerned more the scientists than the consumers who were not really informed of any eventual, potential danger. At that time, even if some familial outbreaks were published, the situation was really very different from now.

There are also large changes concerning the origin (different types of meats or vegetables, etc., come from different parts of the world); moreover, different meals are prepared in a central place, then distributed around...

That explains the contamination of a lot of people from a unique preparation.

Those changes have led progressively to large outbreaks which have been known from the consumers. Nowadays, each incident seems to be published immediately in the newspapers, and that is very different from what we could observe, even 20 years ago. I always remember what I heard in 1992: I was in Washington DC for a Codex Alimentarius meeting and I went to a travel agency to change my plane ticket. At the desk, a nice lady asked me: “which is the reason of your stay in US?” I answered I was participating in the Codex Hygiene and she asked me: “are you aware of the problems of E. coli?” I was really surprised by that question and I remembered that this year.

In fact, from 1992, we have had to face different problems of Food safety. As an example, we can remember the problems of *Listeria monocytogenes* when the responsibility in different outbreaks have been discovered; then, other foodborne diseases have taken place in the public debate.

The result of those food crisis, which were better and better investigated due to new techniques and new technologies have led, in Europe, to large changes in the apprehension of Food Safety: I want to speak of the creation of Food Safety agencies in quite all European countries and, in 2002, the creation of the European Food Safety Agency. All problems are now investigated according to a protocol of Risk analysis. In order to set up a good Risk assessment necessitates to have a lot of good and representative data—and that is very difficult in microbiology—; in that context, the improvement of methods as well as the introduction of predictive microbiology can help but realistic quantitative risk analysis are only a few at the moment as microbes are alive and can grow and multiply in very different conditions; a lot of analytical problems are

not solved, in spite of many improvements; virulence characterization is always very difficult to appreciate and may vary even for strains belonging to a same species; we have also to consider a lot of factors which may influence the growth or, simply, the survival of microorganisms (pH, temperature, water activity, oxygen, nature of the food and available substrates...); then, we must not forget the individual susceptibility... A quantitative evaluation of microbial risk will always be very difficult to set up.

Whichever the context in which we try to put the microbes, they will always make us know their personality!

That seems very important at a period when young microbiologists may forget they are working on microbes and many teachers in universities think that problem has to be seriously taken under consideration. Of course, we have to recognize we are far from the time we were drawing the shape of microbes when looking in a microscope !! Probably, an equilibrium has to be found in order the improvement of techniques does not hidden the real world microbiologists are studying.

What to say as a conclusion?

At first, the problems of Food Safety are not new (M. Ferrières asks "what is new?") but, of course, along the centuries, the world has changed (the types of foods we eat are very different from those of the Middle age, or even very different from what we had 50 years ago, the origin of food is worldwide, the way of eating) and the way of apprehension of the problems too.

All changes in our environment, our way of living and eating, the type of published informations, have led to radical changes. Different crisis: Listeriosis, BSE have led to a new way of apprehension of the problems and the creation of national Food safety agencies, then of the EFSA (European Food Safety Agency).

And, suddenly, I realize, that, personally, I have been living one important

period of the History of Food safety and I would like to share with you some comments as a conclusion:

The reason why I have been interested in pathogenic microorganisms as *Salmonella* in the early 70's was the development of further processed poultry products on the market; at that time, the Ministry of Agriculture was afraid of potential Public health problems due to the contamination of those products; we were then requested to participate in the elaboration of microbiological criteria. That was the beginning of the story; we observed the Salmonella contamination of a somewhat high percentage of products and decided to look at the origin. A lot of epidemiological surveys were then realized which made us observe the contamination "from farm to fork", but the communication was very difficult at that time because there was not any obvious problem of public health. Later on, the problem of the vertical transmission of *Salmonella* through eggs seemed more important to the public authorities, and especially because it was officially worldwide. Some physicians were involved in the problem, visiting US as well to try to understand what did happen; epidemiological surveys were realized and the results were published in profes-

sional journals; more and more people began to be aware of the problems.

Simultaneously, rapid/alternative methods were developed on the market and catch on (the first API galleries were found on the market from 1970), but there was no official acceptance. Then, from 1992, the Food safety problems became caught on from the media when the evidence of foodborne transmission of Listeriosis was shown. At that time, our laboratory was involved in methods of detection; simultaneously, I participated in meetings organized in Paris by the "Conseil supérieur d'hygiène publique de France"; those were the first approaches to the creation a few years later, of the Food Safety Agencies..

During the same period too, the standardization bodies (AFNOR in France, CEN in Europe, and ISO) were more and more involved in the problems of acceptance of alternative microbiological methods.

I feel lucky to have been involved in all those developments.

But a long way remains and the improvement of our knowledge in Food safety must not make us forget the topic is a very difficult one. Microbes are alive and will make them know if we are tempted to forget the reality.

All changes in our environment, our way of living and eating, the type of published informations, have led to radical changes. Different crisis: Listeriosis, BSE have led to a new way of apprehension of the problems and the creation of national Food safety agencies, then of the EFSA (European Food Safety Agency)