

# Microbiota: un cambio de paradigma en la medicina personalizada\*

---

Ignacio López-Goñi (ilgoni@unav.es)

Departamento de Microbiología y Parasitología, Universidad de Navarra

*Las nuevas técnicas de secuenciación masiva nos permiten estudiar las comunidades microbianas sin necesidad de cultivarlas. Comenzamos así a conocer la inmensidad del mundo microbiano que puebla todos los ecosistemas, nuestro organismo incluido. La microbiota es el conjunto de microorganismos (bacterias, arqueas, virus, hongos y protistas), que residen en nuestro cuerpo. A veces se confunde con el término microbioma, que es mucho más amplio y hace referencia al conjunto de esas comunidades microbianas incluyendo sus genes y metabolitos, así como las condiciones ambientales que les rodean. Estos ecosistemas microbianos se encuentran en el tracto gastrointestinal, genitourinario y respiratorio, la cavidad oral y nasofaríngea, y la piel.*

**D**urante años se ha hecho popular la idea de que tenemos diez veces más bacterias en nuestro cuerpo que células humanas, que el 90% de nuestras células son bacterias. Sin embargo, según los últimos cálculos, aproximadamente la mitad de las células de nuestro cuerpo son microbios:  $3,8 \times 10^{13}$  bacterias y  $3 \times 10^{13}$  células humanas, una bacteria por cada célula humana. Esto puede parecer poco, pero tenemos la misma cantidad de bacterias que de células humanas: somos mitad humano mitad bacteria. El ser humano, por tanto, no es una unidad independiente, sino que consiste en una comunidad dinámica e interactiva de células humanas y microbianas.

## Nuestra microbiota evoluciona a lo largo de la vida

Sabemos que la diversidad de microbios en nuestro organismo es enorme, que la composición es diferente en cada persona y que hay muchos factores que influyen en su evolución a lo largo de la vida. Se estima que en nuestro cuerpo sano habitan más de 10.000 especies bacterianas diferentes, muchas de ellas no cultivables y menos del 1% pueden ser potenciales patógenos. En general, nuestras comunidades microbianas están compuestas de algunos tipos bacterianos (muy pocos) que

---

\* Ponencia presentada en el XX *workshop* "Métodos rápidos y automatización en microbiología alimentaria" – Memorial *DYCFung*, Bellaterra, 22-25 de noviembre de 2022.

son muy abundantes y frecuentes, junto con muchas bacterias distintas pero representadas en pequeño número. Cuando se compara la microbiota en distintas zonas del cuerpo, se observa que las bacterias de cada parte son muy diferentes. La mayor diversidad microbiana la encontramos en el tracto intestinal y en la boca, la piel tiene una diversidad media y donde menos tipos distintos de bacterias hay es en la vagina.

La microbiota cambia con la edad. Desde el mismo momento del nacimiento, comenzamos a reunir a nuestros propios microbios. La composición de nuestra microbiota va a depender de muchos factores, de cómo hayamos nacido, de la dieta que tuvimos cuando éramos bebés, del uso de antibióticos cuando éramos pequeños, del ambiente en el que crecimos e incluso de los que vivían con nosotros o de si tuvimos mascotas. El primer contacto con los microbios lo heredamos de nuestra propia madre. Durante más de un siglo hemos aceptado como un dogma que los bebés nacen estériles y adquieren sus microbios de forma vertical (directamente de la madre conforme pasan por el canal del parto) y horizontalmente (de otros humanos y del ambiente después de nacer). Sin embargo, algunos estudios recientes empleando técnicas moleculares sugieren que existen comunidades bacterianas en la placenta, líquido amniótico, cordón umbilical y el meconio en embarazos sanos sin signos de infección o inflamación. Estos descubrimientos, aunque controvertidos, cambian radicalmente nuestra idea de cómo adquirimos nuestros primeros microbios: quizá no nacemos estériles, sino que ya desde que estábamos en el útero materno teníamos microbios que, lógicamente, los heredamos de nuestra madre.

El modo en el que nacemos también influye en nuestra microbiota, sobre todo en las bacterias que primero colonizan nuestro intestino. Se ha comprobado que la microbiota intestinal de bebés que nacen por cesárea es más parecida a los microbios de la piel de la madre. Por el contrario, la microbiota de los niños que nacen de forma natural por vía vaginal es más parecida a los microbios de la vagina de la madre, en la que domina la bacteria *Lactobacillus*. Se ha demostrado que la edad de gestación puede influir en la microbiota intestinal del bebé:

la estructura de la microbiota es diferente en los bebés prematuros que la de los bebés que nacen al final del embarazo. También influye el tipo de alimentación del bebé, los alimentados con leche materna tienen una microbiota enriquecida en bifidobacterias y lactobacilos, mientras que los que toman biberón tienen una comunidad bacteriana más diversa. Se ha comprobado además que las bacterias que se aíslan de la leche de la madre y de las heces del bebé son semejantes. Cerca del 30% de las bacterias intestinales del bebé vienen de la leche materna y otro 10% de la piel de la madre.

Conforme vamos creciendo nuestra microbiota también va evolucionando (Figura 1). En los bebés la microbiota es bastante uniforme, la diversidad microbiana es baja y muy inestable y fácilmente susceptible a cambios, dependiendo de la dieta y del ambiente. Conforme el niño va creciendo, la microbiota va también madurando y se va diversificando, el número de especies bacterianas se multiplica y aumentan las diferencias entre personas distintas. Durante la infancia la microbiota sigue siendo muy susceptible a cambios: la fiebre, el tomar antibióticos, los cambios en los hábitos alimenticios, el contacto con otras personas, los cambios fisiológicos y hormonales del niño-adolescente, todo ello produce alteraciones en la composición de la microbiota que pueden durar toda la vida, incluso influir en la salud posterior del individuo. En el adulto, la microbiota es cada vez más diversa, pero mucho más estable y más difícil de modificar. Y ya en la tercera edad, el número de especies microbianas disminuye y la microbiota se hace más similar entre individuos. Las especies microbianas que tenemos y el número de ellas no solo cambia con la edad, sino que se ve influenciados según seamos hombre o mujer, nuestra genética, el tipo de dieta, el clima y la localización geográfica, la exposición a fármacos, los tratamientos con antibióticos, la ocupación o la interacción con otros individuos (Figura 2).

### Funciones de la microbiota

Cada vez reconocemos más el papel crítico que desempeña la microbiota en la biología y la salud de la persona. Quizá lo

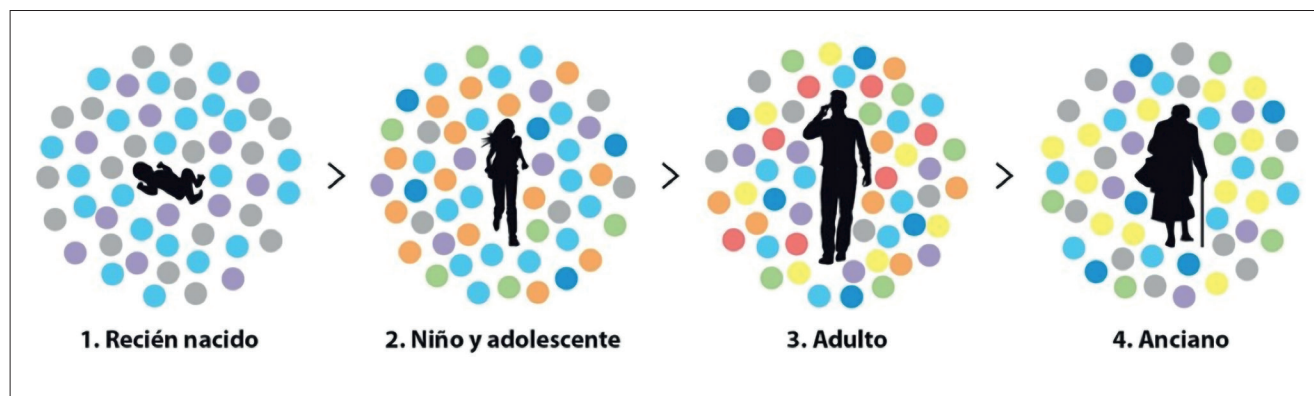


Figura 1: Evolución de la microbiota intestinal con la edad

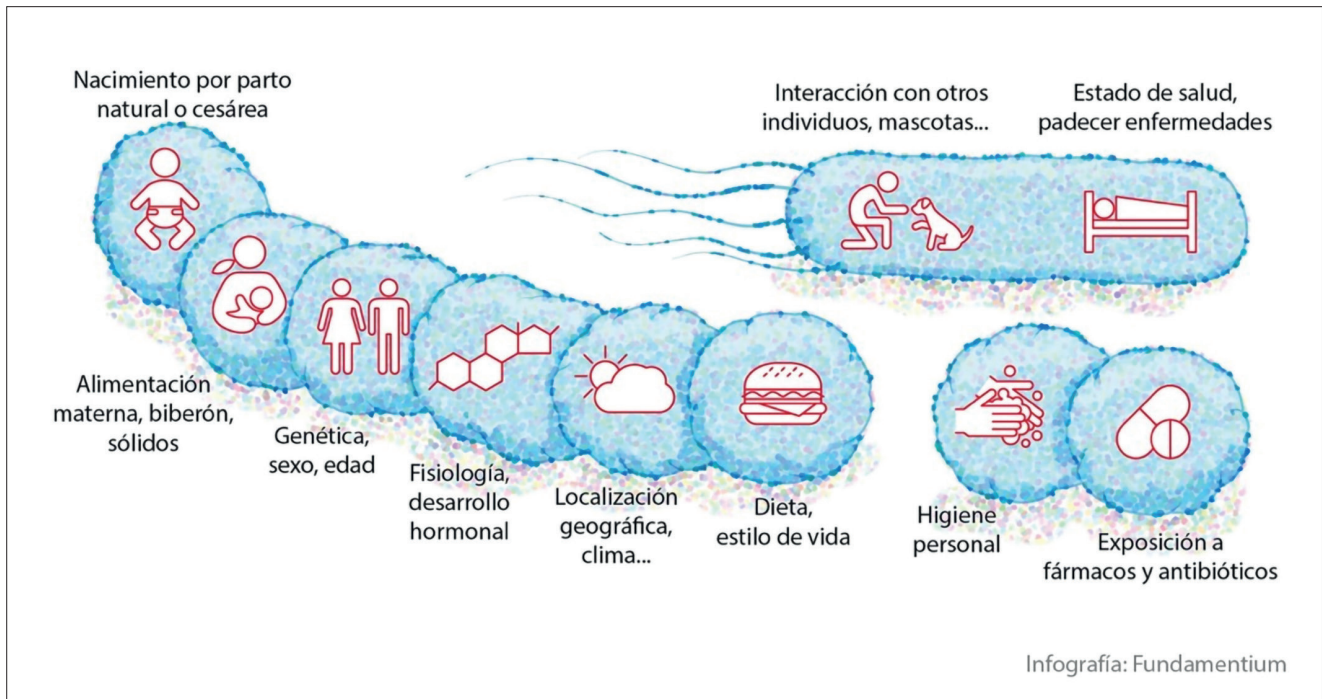


Figura 2: Factores que influyen en la composición de la microbiota

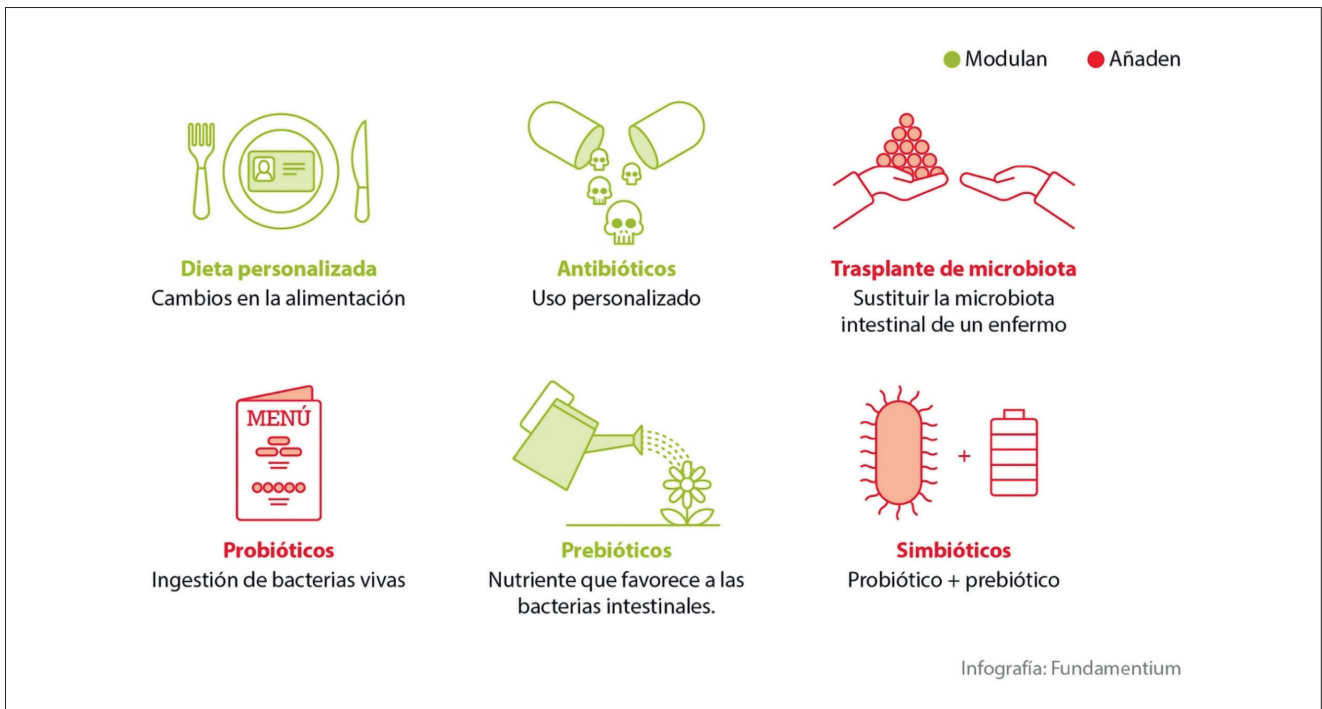
más evidente sea su papel nutricional y en la defensa contra los patógenos. Los microbios intestinales degradan sales biliares, proteínas y polisacáridos, producen vitaminas, cofactores y ácidos grasos de cadena corta y pueden degradar toxinas y drogas. Por otra parte, la microbiota puede evitar la colonización de microorganismos patógenos, mantiene las barreras intestinales, refuerza las uniones entre las células epiteliales y contribuye a la producción de mucina (Tabla 1).

Pero la microbiota también tiene un papel esencial en otros aspectos que tradicionalmente han definido nuestra naturaleza: el sistema inmune que discrimina entre lo que somos y no somos con una precisión molecular exquisita; las funciones cerebrales que influyen en la personalidad y conocimiento humano, y la secuencia de nuestro genoma que guía de forma única nuestro fenotipo. Desde un punto de vista exclusivamente biológico, podríamos decir que cada uno es como es por el sistema inmune, el cerebro y el genoma. Pues nuestra microbiota puede influir a esos tres niveles y puede, por tanto, influir en cómo somos.

El sistema inmune adaptativo es un reconocimiento molecular que diferencia lo propio de lo ajeno, único de cada organismo. La microbiota realiza un importante papel en modular la abundancia y actividad de distintos tipos de células del sistema inmune. La composición de la microbiota intestinal puede determinar el perfil de la población de linfocitos T CD4 en el intestino, e inducir determinados tipos de células T reguladoras con funciones antiinflamatorias. Además, los ácidos grasos de cadena corta que se producen como productos del meta-

bolismo de la microbiota intestinal, pueden promover la diferenciación de células B en plasmáticas, la secreción de IgA protectora, o inhibir la IgE que media en reacciones alérgicas y enfermedades autoinmunes. Aunque todavía no entendemos completamente esta relación o comunicación cruzada entre el sistema inmune y la microbiota, no podemos ignorar que la microbiota estimula y entrena nuestro sistema inmune contra los patógenos, al mismo tiempo que le enseña a tolerar a nuestros propios microbios. Desde el punto de vista inmunológico, la respuesta inmune es el producto de un conjunto de interacciones muy complejas entre las células humanas y la multitud de células microbianas que habiten en el organismo.

En parte, nuestra forma de ser, nuestra personalidad y estado emocional, y nuestra identidad dependen del cerebro. Puede resultar en parte inquietante, pero la microbiota puede tener un papel crucial en funciones nerviosas relacionadas con el comportamiento. En roedores se ha comprobado que cambios en la microbiota intestinal se correlacionan con funciones cognitivas, comportamientos sociales y respuestas relacionadas con el estrés, la ansiedad y la depresión. También se ha demostrado que la microbiota tiene un papel importante en el desarrollo neuronal y en enfermedades neurodegenerativas. De alguna forma existe una compleja comunicación entre productos de la microbiota intestinal y las funciones del sistema nervioso central, lo que se ha denominado el eje cerebro-intestino. Se ha demostrado que bacterias intestinales como *Lactobacillus* y *Bifidobacterium* son capaces de producir GABA; *E. coli*, *Bacillus* o *Saccha-*



**Figura 3: Métodos para modificar la microbiota intestinal**

*romyces* puede producir noradrenalina; *Candida*, *Streptococcus* y *Enterococcus*, serotonina; *Bacillus*, dopamina, y *Lactobacillus*, acetilcolina. Estos neurotransmisores pueden atravesar la mucosa intestinal e influir de alguna forma en las funciones cerebrales. Se ha sugerido que esta comunicación es probable que se realice por medio del nervio vago. Algunas bacterias, como *Faecalibacterium* y *Coprococcus* se han asociado como indicadores de buena salud. En personas con depresión, por ejemplo, se han comprobado que *Coprococcus* y *Dialister* se ven disminuidas.

La secuencia del genoma de cada individuo es fija y única (con algunas excepciones). También la microbiota de cada individuo es única, es como una huella dactilar microbiana. El conjunto de genes de esa microbiota, el microbioma, también es único y contribuye con más genes que el propio genoma humano, y puede influir en muchos aspectos del hospedador, desde aspectos nutricionales y metabólicos hasta cómo responde a una terapia concreta.

### Microbiota y enfermedad

Cada vez son más numerosas las evidencias que relacionan alteraciones en la microbiota con diversas patologías, aunque no siempre tenemos una certeza plena de esta asociación (Tabla 1). Aunque es difícil detectar una comunidad microbiana concreta asociada con la enfermedad, sí que parece que existen pérdidas o ganancias de funciones del microbioma asociadas con enfermedades particulares.

La relación de la microbiota intestinal con diversas patologías ha sido la más estudiada. Hay evidencias de alteraciones de la microbiota relacionadas con la enfermedad inflamatoria intestinal, la diarrea por *Clostridioides difficile* (antes *Clostridium difficile*), el cáncer colorrectal, enfermedades metabólicas, alergias y asma o enfermedades del sistema nervioso central. Un desequilibrio de la microbiota puede desencadenar un proceso patológico también por alteración del sistema inmune: metabolitos tóxicos que generen una respuesta inmune exagerada o una inflamación mantenida. Las alteraciones de la microbiota pueden inducir efectos a largo plazo en la fisiología que pueden derivar en trastornos como la depresión, autismo o enfermedades neurodegenerativas como el Alzheimer, Parkinson o esclerosis múltiple. Una pérdida de diversidad de la microbiota respiratoria se ha relacionado con la gravedad de la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC) o algunos tipos de fibrosis pulmonar. En muchos casos todavía no sabemos si las alteraciones de la microbiota son la causa o el efecto de la enfermedad, pero cada vez hay más datos que relacionan ambos factores. Por ejemplo, la presencia de *Streptococcus dentisani* en la placa dental se ha relacionado con una buena salud bucodental; *Fusobacterium nucleatum* es frecuente en tejidos de cáncer colorrectal y puede ser un biomarcador de esta patología; y la reducción de *Faecalibacterium prausnitzii* en pacientes con enfermedad de Crohn se relaciona con una mejoría de la mucosa intestinal. Además, aunque la relación entre microbiota y cáncer todavía se conoce poco, la microbiota puede amplificar o mitigar la carcinogénesis, y puede también ser responsable de la efectividad de algunos tratamientos y re-

ducir o aumentar las complicaciones y efectos tóxicos de los mismos. Por ejemplo, se ha descrito un conjunto de microorganismos intestinales característico y específico de pacientes con cáncer de páncreas que puede servir como indicador o señal de esta patología.

### Microbiota y covid-19

La puerta de entrada del virus SARS-CoV-2 al interior de las células es el receptor ACE2. Esta proteína también está presente en la superficie de las células epiteliales intestinales, por lo que el intestino también es un órgano diana del virus. De hecho, uno de los síntomas de la infección por SARS-CoV-2 es la diarrea, el virus se excreta por las heces y puede transmitirse por la ruta de fecal-oral. Se ha comprobado además que los pacientes con covid-19, especialmente los que padecen una covid-19 persistente o duradera, presentan síntomas gastrointestinales, diarrea, dolor abdominal, pérdida de apetito, náuseas y vómitos, y una menor diversidad microbiana.

Se ha comprobado que la covid-19 presenta una mortalidad alta en personas mayores, inmunocomprometidas o con otros problemas de salud o patologías, como la diabetes. Se sabe que las personas con diabetes, por ejemplo, presentan también una menor diversidad microbiana intestinal. Por estas razones, es muy interesante conocer cómo puede influir la diversidad y composición de la microbiota intestinal en la gravedad de la covid-19.

<b>Funciones de la microbiota</b>	<b>Enfermedades relacionadas</b>
• Evitar la colonización de patógenos	• Obesidad, diabetes tipo 2
• Mantener la barrera intestinal: uniones entre células, mucina...	• Enfermedades autoinmunes, alergias, asma
• Modular el sistema inmune	• Enfermedad inflamatoria intestinal
• Maduración de linfocitos, inducir producción de IgA...	• Enfermedad de Crohn
• Balancear el proceso inflamatorio	• Cáncer colorrectal
• Degradación sales biliares, proteínas, polisacáridos...	• Depresión, estrés
• Producción de ácidos grasos de cadena corta	• Esclerosis múltiple
• Producción de cofactores y vitaminas	• Alzheimer, Parkinson, autismo
• Degradación de drogas y toxinas	• EPOC, fibrosis pulmonar
• Producción de neurotransmisores, neuromoduladores y hormonas	• Caries
	• Cáncer

**Tabla 1: Funciones y enfermedades relacionadas con la microbiota**

Aunque no se conoce el mecanismo molecular concreto de cómo podría relacionarse la microbiota intestinal con la gravedad de la infección por SARS-CoV-2, existen algunas hipótesis. El genoma del virus se detecta en heces en más del 85% de los pacientes infectados, incluso más de 30 días después del comienzo de la infección. Se ha demostrado además que existe multiplicación viral en la mucosa del intestino delgado. Aunque no se ha encontrado daño tisular, el virus puede causar un daño indirecto. La unión del virus al receptor ACE2 intestinal puede generar una respuesta de aumento de la inflamación por estimulación de citoquinas proinflamatorias y desregulación del sistema inmunitario. Esto podría alterar la viabilidad de los enterocitos, generar una disfunción en la barrera intestinal e influir en la ecología de la microbiota. Todo esto puede generar dolor, aumento de la permeabilidad intestinal y diarrea.

En pacientes con covid-19 se ha observado, por ejemplo, una disminución de la diversidad bacteriana intestinal: disminuyen algunos grupos y géneros beneficiosos como *Bacteroides*, *Roseburia*, *Faecalibacterium prausnitzii*, *Eubacterium rectale*, *Bifidobacterium*, *Ruminococcus*, *Lachnospiricaea*, mientras que aumentan otros como *Streptococcus*, *Rothia*, *Veillonella*, *Clostridium hathewayi*, *Actinomyces viscosus*, *Bacteroides nordii* y otros patógenos oportunistas que se sabe que causan infecciones bacterianas en el hospedador. Estos cambios pueden persistir incluso más de 30 días después de haber eliminado totalmente el virus. Estos resultados no significan que los cambios en la microbiota sean la causa de una covid-19 más grave, pero sí pueden contribuir a un mejor o peor pronóstico, o a explicar una diferente susceptibilidad individual según la persona. Por ejemplo, una condición preexistente de disbiosis intestinal podría explicar por qué respondemos de forma distinta a la enfermedad.

### Manipular la microbiota

Estamos viendo cómo la microbiota puede influir en muchos aspectos de nuestra biología y nuestra salud. Por eso, existen distintas estrategias para intervenir en la estructura y función de la microbiota para mantener la salud, prevenir enfermedades o incluso mejorar los pronósticos (Figura 3). Este es el objetivo de los probióticos (suplementos alimenticios que contienen cepas de bacterias y levaduras vivas), prebióticos (nutrientes no digeribles que estimulan el crecimiento y actividad de nuestras propias bacterias), o incluso el trasplante de microbiota (trasplante de materia fecal, TMF) aprobado por la FDA desde 2013. Sin embargo, manipular la microbiota o restaurarla en caso de alguna enfermedad es mucho más complicado de lo que podríamos imaginar. La razón es que la microbiota es un complejo consorcio de millones de interacciones entre los propios microbios y las células del huésped. De momento, el único tratamiento que pa-

rece efectivo es el trasplante fecal para la infección recurrente por *Clostridioides difficile*.

En el caso de los probióticos y prebióticos, se ha sugerido que su efecto beneficioso podría estar relacionado con la modulación de la respuesta inmunitaria y la inflamación, la normalización de la microbiota original, el bloqueo de la colonización por patógenos oportunistas, la estabilización de la barrera epitelial, la promoción de secreción de moco o la elevación de los niveles de butirato. Por eso se han publicado cantidad de trabajos que los relacionan con un efecto preventivo o terapéutico de problemas de salud muy variados: desde diarreas agudas por consumo de antibióticos, síndrome de colon irritable, enterocolitis neonatal, infecciones por *Helicobacter pylori*, infecciones respiratorias, dermatitis atópica, hasta riesgo cardiovascular, depresión o ansiedad. Sin embargo, un número similar de estudios ponen en duda su efecto beneficioso, por lo que, de momento, ninguno de estos tratamientos se puede considerar válido para curar o prevenir enfermedades, desde un punto de vista clínico. El problema radica en la enorme variabilidad y heterogeneidad de los estudios publicados: no existe consenso en los protocolos y formulaciones y faltan ensayos clínicos objetivos, bien diseñados y multicentro. Además, el efecto de los probióticos depende del tipo de bacteria o levadura que se emplee, no solo del género y especie sino probablemente del tipo de cepa, y de la combinación entre ellas. Por otra parte, se ha comprobado que la colonización y permanencia de un probiótico depende no solo del tipo de cepa que se ensaye, sino también de la variabilidad individual y de hecho se ha demostrado que hay personas más o menos permisivas o resistentes a la colonización. En el futuro los probióticos y prebióticos personalizados permitirán su aplicación terapéutica.

### El futuro: la traslación a la aplicación clínica

Uno de los grandes problemas es que la composición de la microbiota cambia no solo entre individuos distintos sino incluso a lo largo del tiempo en un mismo individuo. Esta fluidez en la relación hospedador-microbio tiene una consecuencia importante: la medicina de precisión basada en el genoma necesita ajustarse a la interacción con el microbioma. En un futuro próximo el análisis del microbioma humano se incorporará a los protocolos de medicina personalizada de precisión. Una medicina a la carta que propondrá un tratamiento personalizado teniendo en cuenta los millones de datos no solo del genoma, del metabolismo y del sistema inmune del paciente, sino también del microbioma: estudiará la composición de la microbiota y su función, identificará microorganismos oportunistas potencialmente patógenos, posibles deficiencias y cómo los microbios pueden afectar al tratamiento. Con todos esos datos, podrá estudiar la susceptibilidad genética a padecer una enfermedad, podrá predecir

la respuesta a un tratamiento y posibles reacciones adversas, incluso recomendar un cóctel de microbios concreto, una nutrición o probióticos personalizados o un autotrasplante de microbiota intestinal, por ejemplo.

Para ello, necesitamos conocer mejor la composición e interacciones de nuestra microbiota, descubrir los mecanismos bioquímicos y moleculares que relacionan la microbiota con la enfermedad, y desarrollar tratamientos personalizados de modulación o modificación de la microbiota. El objetivo es desarrollar medidas preventivas, diagnósticas y terapéuticas basadas en la microbiota.

No es que el microbioma influya en nuestra biología, es que es constitutivo del metaorganismo que somos. Somos más que simples humanos. No somos individuos, sino entidades discretas con un sinfín de interacciones siempre cambiantes con nuestros microbios.

### Bibliografía recomendada

- Abbasi, J. Are probiotics money down the toilet? or worse?. 2019. *JAMA*. 321(7):633-635.
- Almeida, A., y col. A new genomic blueprint of the human gut microbiota. 2019. *Nature*. 568(7753):499-504.
- Chakrabarti, A., y col. The microbiota-gut-brain axis: pathways to better brain health. Perspectives on what we know, what we need to investigate and how to put knowledge into practice. 2022. *Review Cell Mol Life Sci*. 79(2):80.
- Cryan, J.F., y col. Microbiota-brain axis: context and causality. 2022. *Science*. 376(6596):938-939.
- Galloway-Peña, J., y col. Impact of the microbiota on bacterial infections during cancer treatment. 2017. *Trends in Microbiology*. 25(12):992-1004.
- Kartal, E., y col. A faecal microbiota signature with high specificity for pancreatic cancer. 2022. *Gut*. 71(7):1359-1372.
- López-Goñi, I. 2018. *Microbiota: los microbios de tu organismo*. Guadalquivir, Córdoba.
- Rees, T., y col. How the microbiome challenges our concept of self. 2018. *PLoS Biol*. 16(2):e2005358.
- Rocchi, G., y col. Gut microbiota and COVID-19: potential implications for disease severity. 2022. *Pathogens*. 11(9):1050.
- Tremlett, H., y col. The gut microbiome in human neurological disease: A review. 2017. *Annals of Neurology*. 81(3):369-382.
- Young, V.B. The role of the microbiome in human health and disease: an introduction for clinicians. 2017. *British Medical Journal*. 356:j831.
- Valles-Colomer, M., y col. The neuroactive potential of the human gut microbiota in quality of life and depression. 2019. *Nat Microbiol*. 4(4):623-632.
- Wilson, B.C., y col. The super-donor phenomenon in fecal microbiota transplantation. 2019. *Front. Cell. Infect. Microbiol*. 9:2.

# Métodos de referencia ISO: ¿qué hay de nuevo?\*

David Tomás Fornés (davidtomasfornes@gmail.com)

Coordinador del Grupo Nacional de Normalización en Microbiología de Alimentos de UNE y delegado en los comités internacionales ISO y CEN.

## Introducción

En España los métodos de referencia para el análisis microbiológico de alimentos se encuentran completamente armonizados con los métodos internacionales desarrollados por ISO, así como con los métodos europeos adoptados por CEN. Esta normalización nos permite asegurar que los métodos incorporados son aceptables a escala nacional e internacional sin requerir cambios o adaptaciones adicionales. Asimismo, el empleo de métodos normalizados permite el cumplimiento de la legislación en vigor en lo relacionado con los criterios microbiológicos aplicados a alimentos (Reglamento 2073/2005 y sus modificaciones).

Las normas publicadas cubren un amplio abanico de microorganismos, tanto patógenos como indicadores de higiene y calidad. También se encuentran incluidas normas para el análisis de parásitos en alimentos, así como de las toxinas producidas por bacterias (enterotoxina estafilocócica y cereulida). De modo adicional, existen normas que incluyen requisitos generales o guías para la ejecución de los análisis, control de medios de cultivo, validación, incertidumbre, técnicas de PCR, etc. Es por tanto clave para las industrias alimentarias y los laboratorios de control garantizar la correcta aplicabilidad de los métodos de referencia o en su caso, de los métodos alternativos equivalentes, así como conocer cuáles son las versiones en vigor, sus modificaciones y correcciones, así como las nuevas publicaciones de normas a incorporar en caso necesario.

## Desarrollo y revisión de métodos normalizados

Como se ha indicado, todas las normas microbiológicas publicadas en España a través de UNE están alineadas con las normas ISO y CEN.

Todas las normas de referencia son desarrolladas y revisadas por comités ISO/TC34/SC9 y CEN/TC463. En particular el comité ISO gestiona un total de 90 normas publicadas en vigor y 25 normas en revisión o desarrollo. En este comité participan en total 40 países.

El proceso de desarrollo y revisión de una norma incluye diferentes etapas:



Los plazos de desarrollo o revisión de la norma, desde su aprobación formal hasta su publicación pueden ser de entre 18 y 36 meses. La fase en la que se encuentra una determinada norma puede consultarse en la página web de ISO ([www.iso.com](http://www.iso.com)).

\*Ponencia presentada en el XX *workshop* "Métodos rápidos y automatización en microbiología alimentaria" – Memorial *DYCFung*, Bellaterra, 22-25 de noviembre de 2022.

A modo de resumen, las fases más importantes son:

- Propuesta de norma (10): Consiste en la redacción del proyecto de norma acorde a los requisitos de ISO, así como a la votación por parte de los miembros del comité técnico para que se inicie la etapa de normalización.
- Fase de consulta (40): En esta fase se elabora un documento técnico o borrador (DIS) que contiene todos los requisitos técnicos que va a contemplar la norma. Este documento se envía a todos los miembros del comité para su evaluación y aprobación. Si es aprobado por más de los 2/3 de los votos, la norma pasa a la etapa de publicación. Es posible, y muy frecuente en el caso de las normas microbiológicas, que la norma se vuelva a votar en su formato de borrador final (FDIS), incluyendo todas las correcciones y modificaciones recibidas durante la fase de consulta. Durante esta segunda fase de consulta (50) no se puede realizar ninguna modificación técnica sino solo modificaciones editoriales.
- Fase de publicación (60): En esta etapa se incorporan los cambios editoriales respectivos y se pone a disposición del usuario la norma definitiva. Las normas ISO se publican en primer lugar en inglés, francés y alemán y todas aquellas que son adoptadas por el CEN e identificadas como EN, son posteriormente traducidas a los diferentes idiomas, español incluido.

Las normas sufren un proceso de revisión periódica cada 5 años en el que se decide si la norma se renueva por otro período de 5 años, se retira al considerarse que no es aplicable o está obsoleta, o bien se solicita su revisión o modificación (proceso identificado con el código 90), para lo cual se crea un grupo de trabajo específico con expertos internacionales.

Las revisiones de los métodos de ensayo contemplan una evaluación de los cambios que ha sufrido la norma. Esta evaluación va a condicionar las acciones a realizar por parte de los laboratorios:

Si los cambios se consideran mayores ello significa que se ha incluido cambios técnicos que afectan al funcionamiento del método, por lo que el laboratorio debe evaluarlos y considerar su impacto en aspectos como:

- Nueva verificación del método
- Medios de cultivo
- Adquisición de cepas
- Registros de datos
- Control de calidad interno y cualificación del personal.

Si los cambios se consideran menores, los cambios pueden ser únicamente editoriales o que no tienen un impacto significativo en el funcionamiento del método. Estos cambios deben ser evaluados para incorporarlos al laboratorio, pero no requieren una nueva verificación del método.

### Modificaciones, revisiones y nuevos métodos de ensayo recientemente publicados (2021-2022)

**ISO 6888-1 & 2:2021 Microbiology of the food chain — Horizontal method for the enumeration of coagulase-positive staphylococci (*Staphylococcus aureus* and other species) — Part 1: Method using Baird-Parker agar medium; Part 2: Method using rabbit plasma fibrinogen agar medium.**

Los cambios se consideran menores, consistiendo principalmente en la ampliación del alcance, incluyendo muestras ambientales, el intervalo de incubación de las placas (de 34 a 38 °C), un control de pureza y ejemplos de interpretación de prueba de confirmación de la coagulasa (parte 1), así como la posibilidad de confirmar colonias aisladas en medio Baird Parker (parte 1) mediante el empleo del agar RPF (Rabbit Plasma Fibrinogen).

**ISO 15216-1:2017/Amd 1:2021 Microbiology of the food chain — Horizontal method for determination of hepatitis A virus and norovirus using real-time RT-PCR — Part 1: Method for quantification — Amendment 1**

Básicamente consiste en una corrección de errores sin impacto en la técnica o protocolo analítico. Se corrige la composición y preparación de tampones y reactivos, se incluye la referencia del virus de control Mengo (ahora disponible en la Colección Española de Cultivos Tipo) y se incluyen modificaciones en el protocolo de extracción empleando el kit de extracción Nucli-SENS®.

**ISO 23036-1&2:2021 Microbiology of the food chain — Methods for the detection of Anisakidae L3 larvae in fish and fishery products — Part 1: UV-press method; Part 2: Artificial digestion method**

Nuevos métodos para la detección de parásitos en pescado, mediante método de visualización por lámpara ultravioleta después de congelación y presión (parte 1) o mediante digestión enzimática seguida de filtración y microscopía (parte 2).

**ISO 4833-1 & 2:2013/Amd 1:2022 Microbiology of the food chain — Horizontal method for the enumeration of microorganisms — Part 1: Colony count at 30 °C by the pour plate technique; Part 2: Colony count at 30 °C by the surface plating technique — Amendment 1: Clarification of scope**

Los cambios se consideran menores y consisten básicamente en indicar que ambas normas pueden emplearse para todo tipo de alimentos, con determinadas recomendaciones como:

- La parte 1 (siembra en profundidad) es particularmente adecuada para bajar el límite de detección de la técnica, en aquellos casos que se espere la presencia de colonias invasivas (por ejemplo, leche o productos lácteos) o cuando se quiera bacterias sensibles al oxígeno (por ejemplo, bacterias del ácido lácticas)



- La parte 2 (siembra en superficie) resulta particularmente adecuada para productos que contengan organismos sensibles al calor (por ejemplo, psicrotrofos en alimentos refrigerados y congelados); bacterias aerobias (por ejemplo *Pseudomonas*); productos que contengan partículas pequeñas o con color intenso o bien cuando se desee una distinción entre distintos tipos de colonias.

Indicaremos que el Centro Nacional de Alimentación (CNA) publica documentos en los que se realiza un análisis pormenorizado de los cambios en las normas que pueden consultarse en: [https://www.aesan.gob.es/AECOSAN/web/laboratorios/subseccion/metodos\\_normalizados.htm](https://www.aesan.gob.es/AECOSAN/web/laboratorios/subseccion/metodos_normalizados.htm)

### Nuevas normas incluyendo guías y documentos técnicos recientemente publicados (2021-2022)

**ISO 16140-3:2021 Microbiology of the food chain — Method validation — Part 3: Protocol for the verification of reference methods and validated alternative methods in a single laboratory.**

Norma relevante para todos los laboratorios de microbiología, pues incluye el protocolo a seguir para demostrar que, en un determinado laboratorio, un método analítico funciona correctamente y es adecuado para el uso que se va a hacer de él. La norma incluye la verificación de métodos cualitativos y cuantitativos, el número y tipo de muestras a analizar, la evaluación estadística de resultados y criterios de aceptación y rechazo.

**ISO 20836:2021 Microbiology of the food chain — Polymerase chain reaction (PCR) for the detection of microorganisms — Thermal performance testing of thermal cyclers.**

Incluye los requisitos para la instalación, mantenimiento y calibración de temperaturas de termocicladores convencionales y a tiempo real. En mi opinión, es una norma compleja y difícil de implementar en los laboratorios de análisis de alimentos, siendo necesaria su aplicación por parte de un laboratorio de calibración especializado.

**ISO 23418:2022 Microbiology of the food chain — Whole genome sequencing for typing and genomic characterization of bacteria — General requirements and guidance**

La guía incluye los requisitos mínimos para generar y analizar la información generada por secuenciación genómica de bacterias, incluyendo el manejo de bacterias y el aislamiento de ADN; la preparación de muestras, secuenciación y verificación de la calidad de las secuencias de ADN; el proceso de análisis bioinformático y su validación; el almacenamiento de datos y la validación de todo el flujo de trabajo.

**ISO 20976-2:2022 Microbiology of the food chain — Requirements and guidelines for conducting challenge tests of food and feed products — Part 2: Challenge tests to**

**study inactivation potential and kinetic parameters**

Guía para la realización de estudios de desafío microbiano, herramienta que permite validar las medidas de control establecidas en el plan de APPCC, incluyendo el diseño experimental y la selección de condiciones para la realización de estudios de inactivación de microorganismos tanto en forma vegetativa como esporulada (por ejemplo, para evaluar eficacia de tratamientos térmicos de pasteurización, esterilización, etc.)

Cabe indicar que la primera parte de esta norma se publicó en 2019, dedicada a los estudios de potencial de crecimiento, fase de latencia y tasa máxima de crecimiento, principalmente dedicada a estudios de vida útil y al cumplimiento de los requisitos para *Listeria monocytogenes* del Reglamento 2073/2005 de criterios microbiológicos.

### Métodos de ensayo en fase final de revisión

Como complemento a los métodos ya publicados, es conveniente realizar un resumen de aquellos métodos de ensayo que se encuentran en la fase final de revisión y que serán publicados en breve (previsiblemente 2022-2023).

**ISO 10272-1&2:2017/FDAmd 1 Microbiology of the food chain — Horizontal method for detection and enumeration of *Campylobacter* spp. — Part 1: Detection method; Part 2: Colony-count technique— Amendment 1: Inclusion of methods for molecular confirmation and identification of thermotolerant *Campylobacter* spp., the use of growth supplement in Preston broth and changes in the performance testing of culture media**

Los cambios propuestos son considerados menores. En el caso del caldo Preston, empleado para muestras con bajos niveles de *Campylobacter* y altos niveles de microbiota acompañante, se incluye un suplemento de crecimiento para favorecer el crecimiento de *Campylobacter* spp, pues el caldo actual puede ser demasiado selectivo para la recuperación de algunas cepas de *C. coli*. También se incluyen ensayos de PCR para la confirmación de colonias.

**ISO/FDIS 15213-1 Microbiology of the food chain — Horizontal method for the detection and enumeration of *Clostridium* spp. — Part 1: Enumeration of sulfite-reducing *Clostridium* spp. by colony-count technique**

Este nuevo método reemplazará la actual Norma ISO 15213:2003 para el recuento de bacterias anaerobias sulfitorreductoras. El nuevo método se basa en el método actual, con cambios mayores relacionados con la nueva formulación del agar de aislamiento (Iron Sulfite Agar) reduciendo la concentración de sulfito de 1,0 g/L actual a 0,5 g/L; la extensión del alcance a muestras de producción primaria, incluyendo un diluyente especial y diferentes factores de dilución; la necesidad de confirmar las colonias mediante cultivo en aerobiosis y anaerobiosis, así como se elimina la posibilidad de hacer el recuento en tubo.

Señalaremos también que están en fase de preparación la Norma ISO 15213-2, que reemplazará la Norma ISO 7937:2004 para recuento de *Clostridium perfringens*, y la Norma ISO 15213-3 para la detección de *Clostridium perfringens*.

**ISO 16654:2001/FDAmd 2 Microbiology of food and animal feeding stuffs — Horizontal method for the detection of *Escherichia coli* O157 — Amendment 2: Inclusion of performance testing of all culture media and reagents**

Básicamente, cambios menores para incluir las pruebas de control de calidad de medios de cultivo (cepas a emplear, criterios, etc.).

**ISO 21872-1:2017/FDAmd 1 Microbiology of the food chain — Horizontal method for the determination of *Vibrio* spp. — Part 1: Detection of potentially enteropathogenic *Vibrio* parahaemolyticus, *Vibrio cholerae* and *Vibrio vulnificus* — Amendment 1: Performance testing of culture media**

Básicamente se trata de cambios menores para incluir las pruebas de control de calidad de medios de cultivo (cepas a emplear, criterios, etc.).

### Otros proyectos en curso

Las revisiones de normas y proyectos de nuevas normas que se incluyen a continuación están en fase de desarrollo y, por tanto, pueden sufrir cambios técnicos importantes. En la mayoría de los casos, aún es posible contribuir con la participación de expertos técnicos en el desarrollo de las futuras normas. Algunas de las diferentes actividades en curso que probablemente no verán su publicación hasta al menos 2024-2025 son:

**ISO/DIS 22174 Microbiology of the food chain — Polymerase chain reaction (PCR) for the detection and quantification of microorganisms — General requirements and definitions**

La norma en vigor desde 2005 está siendo revisada para integrar las normas ISO 20837:2006; ISO 20838:2006 y 22119, todas ellas incluyendo requisitos generales para el análisis mediante PCR. Además, contempla nuevas tecnologías como la PCR digital y cuantificación, así como requisitos de instalaciones, distribución de actividades y controles ambientales en laboratorios que realizan análisis mediante PCR.

**ISO/DIS 7218 Microbiology of the food chain — General requirements and guidance for microbiological examinations**

La norma de requisitos generales para análisis microbiológicos originada en 2007 también está siendo objeto de revisión con el objetivo de simplificar la expresión de resultados, incluir información general relacionada con el control de calidad en el laboratorio, así como la caracterización de cepas de control y reestructurando el apartado de equipos. También se incluyen múltiples referencias a otras normas microbiológicas donde se desarrollan aspectos como validación y verificación (ISO 16140), control de calidad de medios de cultivo (ISO 11133), estimación de incertidumbre (ISO 19036), etc.

**ISO 16140-4:2020/CD Amd 1 Microbiology of the food chain — Method validation — Part 4: Protocol for method validation in a single laboratory — Amendment 1: Annex H - Validation of larger test portion size for qualitative methods**

Con la modificación de esta norma, se incluirá el protocolo para validar el análisis de muestras con un tamaño superior al validado en el método de referencia. Por ejemplo, cuando el laboratorio quiere analizar muestras de 125 g o 375 g (por ejemplo, muestras combinadas) en lugar del tamaño validado, que suele encontrarse entre 10 y 25 g.

**ISO/AWI 13136-1& 2. Microbiology of the food chain — Detection, isolation and characterization of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) — Part 1: Horizontal method for the detection and isolation of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC); Part 2: Horizontal method for the characterization of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) isolates**

Para la detección de STEC se emplea actualmente una norma técnica que data de 2012. La nueva norma se divide en dos partes, contemplando la primera el cribado de STEC mediante detección de genes stx por PCR y su aislamiento y confirmación en medios de cultivo. La segunda parte estará destinada a la caracterización de serogrupos de STEC mediante métodos de PCR.

**ISO/AWI 21527 Microbiology of the food chain — Horizontal method for the enumeration of yeasts and moulds**

En estos momentos, se dispone de dos partes de la norma 21527 para el análisis de mohos y levaduras en función de la actividad del agua del alimento (Aw superior a 0.95 o inferior o igual que 0.95). La nueva norma tiene como objetivo integrar estas dos partes y facilitar las opciones de los laboratorios en función de los objetivos del ensayo.

**ISO 11290:2017 Microbiology of the food chain — Horizontal method for the detection and enumeration of *Listeria monocytogenes* and of *Listeria* spp.**

Por último y aunque no se ha materializado aún en una modificación de la norma, en relación con *Listeria monocytogenes* se ha detectado un comportamiento heterogéneo de la cepa *L. monocytogenes* WDCM 00109, por lo que se pretende reemplazarla por la cepa *L. monocytogenes* DSM 112143.

En relación con la fase de primaria de enriquecimiento, hay un grupo de trabajo evaluando condiciones alternativas para optimizar el crecimiento de *Listeria*, incluyendo el uso de caldos de enriquecimiento alternativos al Fraser semiconcentrado.

Por último, indicaremos que la página web de la Organización Internacional de Normalización (ISO) dispone de una página web donde están disponibles novedades y material adicional relacionado con la microbiología de alimentos:

<https://www.iso.org/committee/47920.html>