

## Uso de la citometría de flujo como método de control rutinario en la industria alimentaria

Sr. Franck Guilloteau (fguilloteau@aes-lab.es)  
Sr. Andreas Politzer (andreas.politzer@wild.de)

En la industria farmacéutica, cosmética y alimentaria, los laboratorios de control de calidad se enfrentan a una presión cada vez mayor para reducir sus plazos de respuesta y entregar sus resultados de control microbiológico. Las mejoras en rapidez y precisión de las analíticas de bioquímica o química han sido impresionantes durante los últimos 15 años. No obstante ha sido mucho menos espectacular en el campo de la microbiología que sigue siendo el componente más lento en el proceso de control de calidad, aunque el método de referencia de recuento en placa de Petri tan universal y aceptado por todos es todavía laborioso y requiere la aptitud de los microorganismos en multiplicarse sobre el agar para que se puedan detectar y contar.

Cada vez más la industria debe intentar reducir el tiempo de sus ciclos de producción, sus existencias, implementar procesos de fabricación just-in-time, y minimizar los riesgos y costes asociados a las contaminaciones potenciales en proceso. Con el objetivo de alcanzar estas optimizaciones y responder de forma proactiva a los incidentes de contaminación microbiana, la capacidad de detectar en tiempo real, cantidades bajas de contaminantes bacterianos célula por célula en productos acabados es primordial.

### **Analizar productos filtrables**

Al final de los años 90, se introdujo un nuevo método, que elimina la necesidad del crecimiento celular como requisito de detección : el Chemscan RDI. Después de la filtración de la muestra sobre una membrana y el marcaje fluorescente de cada microorganismo viable, se realiza la detección y el recuento a través de un analizador de escaneo láser. Ya que este método no requiere la multiplicación celular, permite, por primera vez en la historia de la microbiología, una sensibilidad de hasta una célula en una muestra, con un resultado disponible en 90 minutos.

Los microorganismos viables contienen sistemas enzimáticos capaces de hidrolizar un sustrato enzimático no fluorescente que ha sido introducido en la célula. La fluoresceína liberada en el citoplasma hace que la célula emita fluorescencia bajo el efecto de un rayo láser (fig1)

La combinación entre el marcaje de células viables, su detección con un citómetro, y el uso de un sistema matemático de discriminación perfeccionado permite contar específicamente las células bacterianas entre las numerosas partículas autofluorescentes presentes en la muestra. Este método, el método ChemScan RDI, ha sido registrado y aprobado por la FDA (Food and Drug Administration) en EEUU para el análisis de las aguas de uso farmacéutico.

### **Analizar productos no filtrables**

Con el objetivo de cumplir con los requisitos del análisis microbiológico industrial, era necesario proponer un analizador de microbiología totalmente automatizado de alta sensibilidad, para el análisis en tiempo real de los productos no filtrables. El fruto de dichos requisitos es el sistema D-Count, citómetro de flujo digital, que incorpora las mismas tecnologías que el ChemScan RDI : marcaje de viabilidad celular fluorescente, excitación láser y tratamiento digital de los datos.

Al ser un sistema de control industrial rutinario, el D-Count tiene que cumplir con una serie de exigencias primordiales. El sistema tiene que ofrecer la capacidad de detectar con

fiabilidad cantidades muy bajas de microorganismos viables con una reducción significativa del tiempo de respuesta en comparación con el método tradicional u otros métodos rápidos. Los resultados deben ser correlativos con el método estándar en placas y ser cuantitativo. La técnica debe también permitir analizar un amplio rango de productos con composiciones distintas, sin efecto matriz. Este punto es muy importante ya que la matriz puede cambiar de forma importante en los distintos sectores de la alimentación. Para acabar, el sistema debe emitir resultados reproducibles, ser fácil de usar y necesitar pocas manipulaciones por parte del usuario, claves de la automatización.

Incorporando una automatización total desde la carga de las muestras hasta el procesamiento digital de los datos, el D-Count no sólo asegura poca necesidad de mano de obra, también mejora la productividad del laboratorio. Muchos productos pueden ser cargados directamente en la unidad de preparación automática del D-Count sin la necesidad de pretratamiento, y además hasta 50 muestras pueden ser cargadas en una sola tanda.

Una vez cargadas, el proceso automatizado de marcaje celular incluye todos los añadidos de reactivos y tiempos y temperatura de incubación, y tarda unos 20 minutos. Las muestras marcadas están entonces automáticamente inyectadas de forma secuenciada en el analizador dónde pasan a través de una célula de flujo de quartz (fig2). Los microorganismos atraviesan el rayo láser uno por uno y las señales fluorescentes de cada célula son recogidos por detectores sensibles y analizados por un tratamiento de datos digital. Los resultados finales se obtienen en algunos minutos, y no requieren interpretación ya que se presentan en recuento directo de células. Todos los datos se archivan automáticamente en una base de datos informática que permite una trazabilidad total.

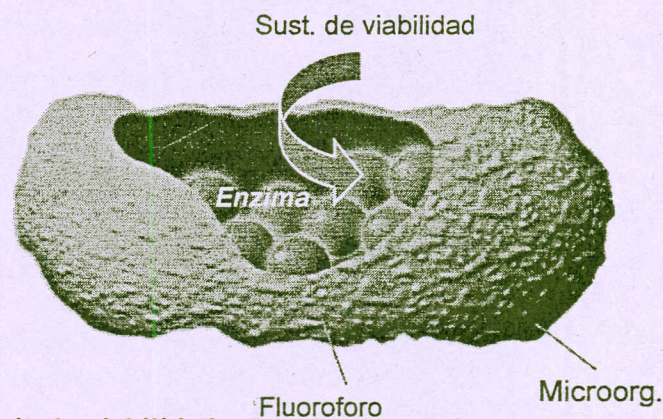


Fig 1 : marcaje de viabilidad

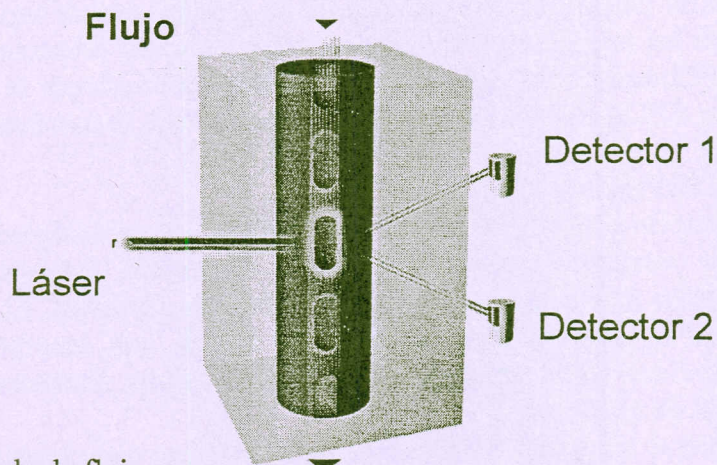


Fig 2 : célula de flujo

### Citometría de flujo digital

Con el objetivo de permitir el análisis de una gama muy amplia de productos no filtrables, la base de la tecnología D-Count es la citometría de flujo digital. La citometría ha sido muy utilizada para detectar células marcadas por fluorescencia en investigación o laboratorios clínicos, pero es una nueva tecnología para la industria. Es mayoritariamente debido a la complejidad del tratamiento de muestra, como a la dificultad para los citómetros clásicos de diferenciar células marcadas y una cantidad muy importante de partículas autofluorescentes presentes en la matriz de las muestras.

La mayoría de los productos fabricados, desde zumos de fruta hasta postres de chocolate, contienen una gran cantidad de partículas de tamaños distintos que tiene que ser diferenciadas de los microorganismos potencialmente contaminantes. Esta diferenciación sólo es posible si la unidad de detección permite generar una cantidad de información suficiente sobre los eventos detectados. Es frecuentemente problemático para un sistema análogo que sólo puede dar la intensidad de fluorescencia de la señal obtenida del evento fluorescente. Las limitaciones de este tipo tienen un efecto negativo directo sobre la sensibilidad de detección. La linealidad de detección tampoco se ve afectada por la presencia de partículas con el D-Count, ya que los recuentos son lineales hasta  $10 \times 10^6$  células por ml, y perfectamente correlativos al recuento en placa.

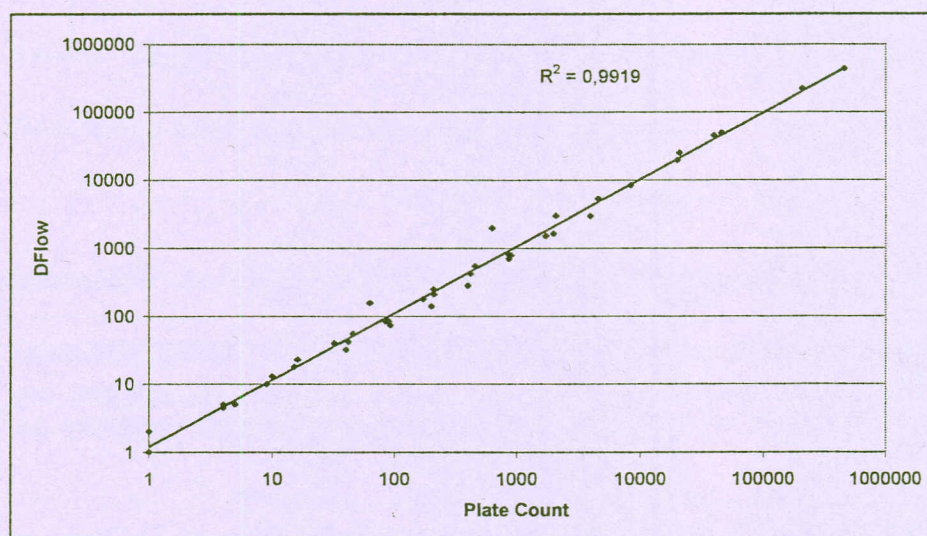


Fig 3 : correlación del recuento por el D-Count con el recuento en placa, para una mezcla de cepas (*S. aureus*, *E. coli*, *B. circulans*, *B. licheniformis*, *E. cloacae*, *C. albicans*)

### Adquisición de los datos

La metodología de captura de datos digitales desarrollada para el D-Count soluciona el problema de discriminación, para dar más información sobre cada evento detectado en la muestra y eliminar ruidos de fondo interferentes y de este modo se obtiene la sensibilidad de detección requerida. La señal de fluorescencia obtenida por una partícula o una célula está recogida con una frecuencia de 5MHz lo que les permite emitir una información de su forma con una alta precisión. Por ejemplo, una bacteria de  $1 \mu\text{M}$  marcada con los marcadores de viabilidad de Chemunex (Fluorasure) da una curva de señal definida con aproximadamente 25 puntos. Ya que el sistema está equipado de 2 detectores distintos, cada evento produce 2

curvas de señal precisamente dibujadas que están entonces directamente explotadas para procesar los datos de forma automática.

### Procesamiento automático de los datos

A pesar de la cantidad importante de datos obtenidos, el D-Count puede, con precisión, realizar una discriminación muy sofisticada a través de un sistema de tratamiento de datos especialmente diseñado. Sacando el beneficio de las tecnologías actuales como softwares muy potentes y microcircuitos, la etapa de discriminación puede ser efectuada automáticamente en tiempo real, al mismo momento que la adquisición de los datos. Es lo que permite la producción de resultados instantáneos. Cada evento individual, detectado por sensores sensibles, se analizan en detalles utilizando una decena de parámetros de discriminación diferentes, comunes a los que se utilizan para el ChemScan RDI. Por ejemplo se analiza el tamaño de partícula, las curvas de Gauss, el ratio de fluorescencia y la correlación (fig4 y fig5).

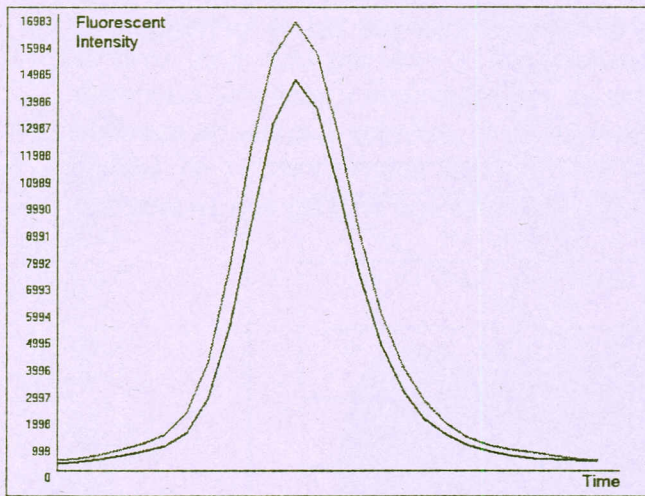


Fig 4 : Señal obtenida con una bacteria

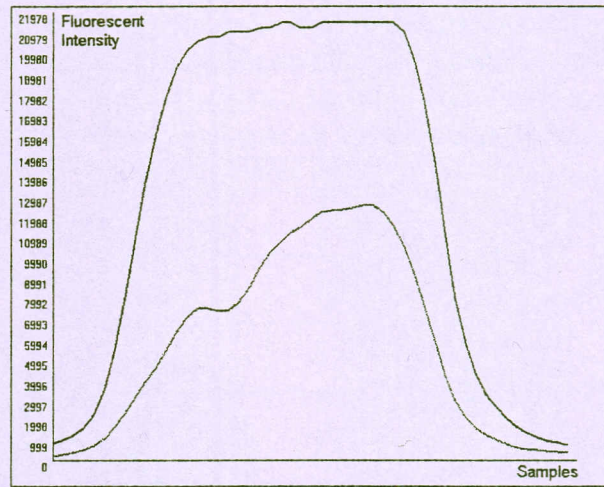


Fig 5 : Señal obtenida con una partícula autofluorescente

Gracias a la combinación de automatización y citometría de flujo, el D-Count sirve en un número importante de aplicaciones de controles en proceso, donde la disponibilidad de resultados en tiempo real para productos no filtrables tiene un valor importante. Además del control de producto acabado para una liberación más rápida de lotes producidos, puede incluir aplicaciones como el control de materias primas, de productos intermedios, validación de limpieza y control ambiental.

Además de la rapidez del proceso analítico (capacidad de tratamiento de 250 hasta 1000 muestras en un turno para el D-Count) y del tiempo de respuesta para entregar un resultado en planta, este método detecta gérmenes viables potencialmente responsables de deterioraciones del producto, que no crecen en los medios de cultivo (viables pero no cultivables).