

Implementación del sistema TEMPO
en la rutina del laboratorio de Control de calidad
Grupo Gallina Blanca – Star

Sr. Josep-Julà Antón García (janton@gallinablanca.com)

Objetivo: compartir la experiencia de la implementación del sistema Tempo de BioMérieux en el laboratorio de Control de Calidad de Gallina Blanca – Star en la fábrica de Sant Joan Despí y de esta manera proporcionar elementos de juicio que ayuden en la toma de decisiones similares.

Empecemos centrando el entorno en el que se ha llevado a cabo esta implementación.

La fábrica del Grupo Gallina Blanca – Star en Sant Joan Despí en la actualidad está dedicada a la elaboración de caldos, sopas, sazoadores, platos preparados y salsas deshidratados por mezclado de ingredientes deshidratados y envasado en múltiples formatos. La planta, sus procesos y su sistema de calidad y seguridad alimentaria se encuentran certificados por los estándares de British Retail Consortium e International Food Standard.

La complejidad viene dada por la extensa gama de referencias de productos acabados (unos 400) para lo cual es necesario emplear alrededor de 60 materias primas de 200 proveedores diferentes.

Disponemos de un laboratorio de control de la calidad reconocido por el Departamento de Agricultura, Ganadería y Pesca de la Generalitat como capacitado para la realización de controles de calidad sensoriales, microbiológicos y fisico-químicos. Centrando en los controles microbiológicos, el repertorio incluye presencia/ausencia de *Salmonella* y *Listeria*, y el recuento de flora total aerobia, coliformes totales, *Escherichia coli*, enterobacterias, *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus*, *Clostridia*, mohos, levaduras.

Dentro de una fábrica toman especial relevancia las técnicas rápidas microbiológicas, en nuestro caso básicamente por la necesidad de reducir al máximo el tiempo de espera de dictamen para la aceptación/rechazo de las materias primas. Esta preocupación ha llevado a tomar iniciativas como la incorporación de un equipo MiniVidas BioMérieux para la determinación de presencia/ausencia de patógenos (*Salmonella* y *Listeria*) desde 2001, y diferentes alternativas para obtener el recuento de indicadores de calidad: Malthus 2000 (de 1991 a 2002), Bactometer BioMérieux (de 2002 a 2006) y Tempo BioMérieux a partir de 2006.

Bactometer BioMérieux, al igual que Malthus 2000, presentaban un claro inconveniente en nuestro caso: para poder obtener un recuento era necesario realizar una calibración que depende fuertemente de la matriz, por lo tanto es inabordable para una planta con tanta variación. De esta manera, solamente permiten utilizar un criterio pasa/no pasa basado en un tiempo sin señal de crecimiento. Este criterio obviamente se debe fijar con un margen de seguridad muy alto, por lo que solamente permite descartar niveles de contaminación muy bajos. En el resto de casos (sobre un 15-20% en el caso de Gallina Blanca) es necesario repetir la determinación mediante el método tradicional. Como consecuencia, en una determinada proporción de muestras se gana tiempo, pero en el resto de los casos se pierde.

Coincidiendo con un momento en el que se revisan los costes y cargas de estructura de nuestra fábrica, BioMérieux inicia el proceso de desarrollo de un nuevo sistema destinado a remplazar Bactometer, y basa su proyecto en conocer y dar satisfacción a las necesidades de los clientes. Obviamente los clientes de

Bacterias expresamos nuestras necesidades enfocadas a mejorar las limitaciones actuales: obtener un recuento validado con respecto a los métodos oficiales salvando la necesidad de calibraciones por tipo de matriz, o mejor aún, sin tener que efectuar calibraciones, y que además pueda ser realizado por personal no especialista a un coste competitivo (ya puestos.....) Conocer las expectativas de los clientes es fácil, pero para dar satisfacción han sido necesarios grandes esfuerzos cuyo resultado ha dado lugar al sistema Tempo.

El sistema Tempo BioMérieux se basa en recuento por la técnica del NMP de 48 pocillos (16 x 3 volúmenes diferentes) miniaturizados e integrados en una tarjeta de incubación, con un único protocolo de trabajo para todos los parámetros disponibles:

1. Preparación de la muestra en una bolsa estéril provista de un filtro específico;
2. Inoculación/rehidratación del medio de cultivo específico no selectivo para recuento total de aerobios (TVC), selectivo para coliformes totales (TC), *Escherichia coli* (EC) y enterobacterias (EB) a la dilución establecida;
3. Llenado y sellado de las tarjetas en equipo automatizado;
4. Incubación de las tarjetas a la temperatura y tiempo correspondientes;
5. Lectura por fluorescencia de los pocillos con crecimiento positivo de las tarjetas en equipo automatizado, con cálculo del resultado expresado en ufc/g según tabla NMP y dilución empleada.

El medio específico utilizado incluye en su formulación un compuesto fluorescente, la 4-metil umbeliferona (4-MU). Para TVC y EC, la 4-MU se encuentra ligada a un substrato enzimático, no fluorescente. La actividad bacteriana produce la hidrólisis de este substrato y se libera la 4-MU, produciendo fluorescencia en los pocillos que son por lo tanto contabilizados como positivos y los no fluorescentes, negativos. En cambio, para TC y EB el medio contiene 4-MU libre a pH=7, presentando fluorescencia inicialmente. En este caso, la acidificación del medio a causa de la actividad bacteriana es la que provoca la extinción de la fluorescencia ya que deja de serlo a pH inferior a 6. Así, los pocillos que presentan fluorescencia son negativos, y los que no presentan fluorescencia, positivos.

El rango de lectura es ya de por sí bastante amplio y varía según la dilución empleada, pero también puede ser ampliado en caso necesario encadenando dos o tres tarjetas, es decir, utilizando 48, 96 o 144 pocillos:

Dilución	1 tarjeta	2 tarjetas	3 tarjetas
1/40	10-49.000 ufc/g	5-62.000	3-69.000
1/400	100-490.000 ufc/g	50-620.000	30-690.000
1/4000	1.000-4.900.000 ufc/g	500-6.200.000	300-6.900.000

Los métodos Tempo han sido validados por AFNOR como métodos rápidos alternativos con respecto al método tradicional equivalente mediante la norma NF EN ISO 16140 (octubre 2003) en productos para alimentación humana y de animales de compañía, con excepción de bebidas, leche cruda y piensos:

Método Tempo	Método tradicional	Validación AFNOR	Incubación	Procesado
TVC	EN ISO 4833 Febrero 2003	BIO 12/15 – 09/05	40 h / 72 h	4 min/ 14 min
TC	EN ISO 4832 Febrero 2003	BIO 12/17 – 12/05	24 h / 24 h	4 min / 10 min
EC	NF ISO 16649-2 Julio 2001	BIO 12/13 – 02/05	24 h / 24 h	4 min / 11 min
EB	NF ISO 21528-2 Diciembre 2004	BIO 12/21 – 12/06	24 h / 72 h	4 min / 19 min

La linealidad y exactitud de los métodos alternativos Tempo son equivalentes a las de los métodos tradicionales en general, con una mejor reproducibilidad (con una tarjeta por parámetro, basta).

La selectividad (TC, EC, EB) de los métodos alternativos Tempo son equivalentes a la de los métodos tradicionales, mostrando una mejor recuperación para EC.

Además de verificar las prestaciones de linealidad y exactitud, también se evalúan las ventajas de índole práctico de los diferentes métodos:

- Reducción del plazo de obtención de resultados para TVC y EB
- Importante reducción del tiempo de trabajo, considerando que además no es necesaria la preparación de medios y materiales, no es necesario preparar un banco de diluciones ni inocular y tratar una serie de placas o tubos, no se realiza la lectura e interpretación de colonias placa a placa, el tratamiento de resultados está integrado en la lectura, y se reduce enormemente la limpieza de material
- Espacio de trabajo necesario menor que por la técnica tradicional
- Espacio de consumibles y espacio de incubación mucho menores que por la técnica tradicional
- Formación analistas en menos de un día
- Reducción del tratamiento de residuos
- Mantenimiento reducido (kit mensual para verificación de la lectura de fluorescencia)
- Completa trazabilidad al identificarse desde el principio la muestra con la tarjeta y el vial utilizados por lector de código de barras y comunicación vía Wifi entre la estación de llenado y la de lectura

Todos los compromisos tomados por BioMérieux con respecto a las necesidades planteadas por sus clientes fueron por lo tanto resueltas. Queda la última, ya puestos que fuese económicamente competitiva. En este punto es necesario revisar los costes internos que suponen las tareas y medios no necesarios con el sistema Tempo para compararlos con el coste de los consumibles, la amortización y el mantenimiento del equipo, pero sí se puede aportar un dato importante: un solo analista entrenado puede realizar 500 determinaciones Tempo en su jornada de trabajo.

En el caso del laboratorio de control de calidad de Gallina Blanca se valoraron todos estos elementos y se tomó finalmente la decisión de implementar el sistema Tempo en junio de 2006.

La implementación fue planificada cuidadosamente, ya que obviamente su éxito iba a contribuir a una reducción de los recursos humanos necesarios en control de calidad y dependía en gran medida de la aceptación por parte de las personas directamente implicadas.

Para ello se realizó una primera presentación del sistema al equipo de analistas unos días antes de la llegada del equipo, exponiendo todas las nuevas aportaciones con total transparencia, es decir, transmitiendo explicando el principio de trabajo novedoso, la sencillez de tareas que iba a comportar, eliminando o reduciendo substancialmente aquellas más tediosas, pero también que el nuevo método de trabajo iba a transformar totalmente la rutina de trabajo y que iba a comportar además una reducción de la carga de trabajo.

La formación se realizó inmediatamente después de la preparación y entrega del equipo teniendo en cuenta que se trata de un equipo de analistas con experiencia en trabajo en laboratorio de control microbiológico de alimentos, de formación interna y reacio a los cambios.

En los primeros días tan solo se encuentran pequeños problemas:

- Habitación a la rutina de tareas (lectura de tubo y placa, inoculación, agitación)
- Confusiones en las lecturas de tarjetas antes de tiempo (códigos de colores)
- Pérdida de lecturas de tarjetas cuando ha pasado el periodo máximo (habitación al sistema de semáforos de advertencia en Tempo Reader)

El resultado global de la implementación es que en tan solo 2 semanas el equipo Tempo estaba totalmente integrado en la rutina de trabajo del laboratorio, cuando por experiencias previas con el mismo equipo de analistas, jamás se disminuía de un periodo de adaptación de 4-5 semanas en el mejor de los casos.

A las ventajas establecidas para el sistema Tempo BioMérieux en los protocolos de validación de métodos alternativos citados anteriormente, en el caso particular del laboratorio de control de calidad en la fábrica de Gallina Blanca se deben añadir unas cuantas:

- Robustez del sistema informático
- Eliminación de las repeticiones de resultados "no pasa"
- No necesario consultar colonias
- Mayor confianza en los resultados obtenidos

A su vez, también se presentan algunas limitaciones:

- Reducción de sensibilidad para TC y EB en muestras fuertemente coloreadas, especialmente en tonos marrones (caramelo, champiñón, cacao) hasta el punto de ser inviable la determinación
- Aparición de resultados inválidos para muestras con elevado contenido en grasas, como en el caso de bacon, probablemente debido a la separación de la grasa
- Necesidad de compaginar método Tempo y método tradicional ya que el repertorio de indicadores disponibles es por el momento reducido. El desarrollo de nuevos proyectos está lógicamente ligado a la viabilidad comercial para BioMérieux y a su vez a la significación del indicador para la industria. En el momento de redacción de esta ponencia es inminente el lanzamiento de kit para el recuento de *Staphylococcus aureus* y de bacterias acidolácticas, y está en desarrollo el recuento de mohos.