

Métodos rápidos para la detección de patógenos en la industria biofarmacéutica, cosmética y alimentaria

Estamos viviendo un tiempo extraordinario, donde la única constante es el cambio, promovido por un afán irrefrenable y acelerado de innovación. Los rápidos cambios que están teniendo lugar, acelerados por una cultura cada vez más abierta y cada vez más universal, abren paso a nuevas tendencias científicas, socioeconómicas e, incluso, sociodemográficas, gracias a la coevolución de Ciencia y Tecnología¹ y plantean un grave efecto sobre todos aquellos que no han sabido adaptarse a las nuevas realidades en un mundo cada vez más global.



Juan A. Díaz Martín y Joaquín Matilla Fuentes

Oxoprobics Biosciencias, S.L.

Para sobrevivir en el siglo XXI, las empresas y los grupos investigadores punteros deben obtener lo que necesitan, exactamente cuándo lo necesitan y con métodos cada vez más competitivos, basados en el talento y la innovación.

Consecuentemente, la aparición de nuevos materiales, junto a los avances científicos, ha de proporcionar herramientas novedosas, inimaginables para

las anteriores generaciones, evitando algunos problemas futuros. Además, las exigencias y complejidad de los retos globales actuales reclaman enfoques multidisciplinares aptos para dar una respuesta a nivel global.

Por ejemplo, ante la importancia creciente del envejecimiento de la población², están acelerando la investigación en campos como la oncología y las investigaciones relacionadas con la búsqueda de nuevos y eficaces antiinfecciosos; pero, a día de hoy no existen métodos absolutamente fiables, que aborden adecuadamente y en tiempo real, ensayos *in vitro* realmente eficaces, como una alternativa interesante a los métodos de evaluación bioló-

gica *in vivo*, y, además, capaces de cumplir con “la estrategia de las 3R”: *reemplazar* animales de experimentación por otros métodos, *reducir* su número, si fuese necesario usarlos y *refinar* las técnicas para aminorar su sufrimiento.

Sin embargo, poco ha cambiado desde que a finales del siglo XIX el médico y microbiólogo Julius Richard Petri idease una caja, que, desde entonces, lleva su nombre y que se viene usando sin grandes variaciones metodológicas en los laboratorios para el cultivo celular y estudios *in vitro* de bacterias, mohos y otros microorganismos.

De ese modo, se procede al recuento de colonias, lo que da una estimación del número

de microorganismos viables y cultivables.

Como alternativa a las placas de Petri o a los frascos de Roux (botellas ventiladas o no), se está extendiendo, para todo tipo de ensayos de laboratorio, el uso de microplacas que contienen diferentes pocillos, cuyo número puede variar desde 6 hasta modernas placas de 3.456 pocillos, pasando por los formatos habituales de 96 o 384 pocillos.

Consecuentemente, aunque el método estándar para monitorizar poblaciones microbianas sigue siendo el recuento, las ventajas del pequeño volumen de las placas (100-400 microlitros/pocillo), con el consiguiente ahorro de reactivos, la posibilidad de dispensación

automática de líquidos, las medidas automatizadas de propiedades ópticas y su bajo coste, permiten multiplicar el número de ensayos en microbiología y, consecuentemente, aumentar productividad y resultados.

Para ello, se han implementado algunos sistemas “rápidos”, como los de densidad óptica/turbidimetría.

Sin embargo, la turbidimetría no puede emplearse en medios ópticamente opacos, o con altas concentraciones de muestra que opacan el medio de cultivo, como la leche, los cosméticos o la carne. En estos casos, es preciso hacer diluciones, lo que entorpece los tiempos de detección y dificulta la interpretación de los estudios en microplacas, por ejemplo, la acción de agentes antimicrobianos.

Es por ello, que la búsqueda de métodos más convenientes y universales para la evaluación *in vitro*, se considera una necesidad científico-técnica de primer orden.

Entre dichos métodos, puede considerarse un indicador de extrema importancia la determinación del consumo de oxígeno, por células aerobias en cultivo: procariotas (bacterias, micoplasmas...) y/o eucariotas (protozoos, levaduras...).

Estado de la técnica

La principal limitación de las técnicas de recuento de microorganismos radica en los largos períodos de tiempo necesarios para llevarlos a cabo, lo que ha impulsado la búsqueda de métodos rápidos, que permitan lograr datos en cuestión de horas.

Por ejemplo, en la Industria Alimentaria y/o Biotecnológica, es importante conocer la cinética de crecimiento de los cultivos microbianos para predecir la evolución del cultivo, el consumo del substrato y la probable acumulación de productos de desecho. Cono-

ciendo estos factores es posible iniciar el cultivo a mayores escalas y, en la Tecnología Alimentaria, permitiría predecir la fecha de vencimiento.

En definitiva, se requieren soluciones que aporten valor, para pasar de una mera innovación evolutiva a una auténtica “innovación disruptiva” que suponga un cambio real, significativo y relevante para la investigación y el control de calidad microbiológico en industrias como la farmacéutica, biotecnológica, cosmética y/o alimentaria.

Hasta ahora, los estudios de viabilidad celular se vienen evaluando por muy diversos medios, entre otros:

1. **Ensayos colorimétricos**, como la popular reducción metabólica del bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol (MTT) realizada por la enzima mitocondrial succinato-deshidrogenasa, hasta un compuesto coloreado, permitiendo determinar la funcionalidad mitocondrial de las células tratadas³: las condiciones de ensayo pueden alterar la actividad metabólica y, por tanto, la reducción del colorante de tetrazolio, sin necesidad de afectar realmente la viabilidad celular.
2. Medida del ATP producido en células metabólicamente activas, mediante un ensayo bioluminiscente, usando luciferasa⁴: aunque la evaluación de los niveles del ATP es uno de los ensayos más sensibles, su principal desventaja, además de su alto precio, radica en que la lectura de la luminiscencia está muy influida por fenómenos de atenuación, provocados por las múltiples sustancias presentes en el medio y, por la dependencia frente al tiempo de la intensidad de la luminiscencia.
3. Método de ensayo de la proliferación celular basado en

Se requieren soluciones que aporten valor, para pasar de una mera innovación evolutiva a una auténtica “innovación disruptiva” que suponga un cambio real, significativo y relevante para la investigación y el control de calidad microbiológico en industrias como la farmacéutica, biotecnológica, cosmética y/o alimentaria

la **incorporación de timidina tritiada** a las moléculas de ADN sintetizado *de novo*⁵: entre los inconvenientes más obvios, podríamos citar el mantenimiento permanente de equipos costosos e instalaciones sofisticadas, la lentitud en la velocidad de procesado, el uso de reactivos radiactivos caros, peligrosos y de difícil destrucción, etc.

Todo lo anterior, explica, por un lado, las diferentes medidas de viabilidad celular halladas según la sustancia y el propio ensayo usado en cada caso y, por otro, demuestra que ninguno de los diversos métodos de medida existentes, está exento de problemas y limitaciones. Por ello, el diseño de nuevos métodos más sencillos y fiables se debe considerar

una necesidad científico-técnica inaplazable.

Según apuntamos anteriormente, el oxígeno se consume continuamente en los procesos de respiración aeróbica tanto de orgánulos subcelulares como de células vivas, tejidos y organismos completos, y, por tanto, puede proporcionar información sobre la actividad biológica, el estado metabólico, la viabilidad y/o respuesta fisiológica ante estímulos como la acción de un fármaco, el estrés ambiental y los efectos producidos por tóxicos o efectores.

Por ello, la medida de las variaciones en la concentración del oxígeno disuelto en el medio resulta de importancia capital en el seguimiento de multitud de procesos bioquímicos, en un amplio rango de condiciones normales y/o patofisiológicas.

De ahí, el creciente interés hacia el uso de sensores ópticos no invasivos, útiles para la medida de la concentración de oxígeno, mediante el empleo de sondas moleculares fluorogénicas (sustancias capaces de absorber luz en la región visible y de desactivarse por emisión fluorescente), a través del conocido efecto del “quenching” o atenuación fluorescente provocada por el oxígeno sobre una gran cantidad de sondas moleculares fluorogénicas⁶, logrando una alta fiabilidad, ya que no dependen de la pericia del ojo humano para detectar turbidez del medio, o el número de colonias y, además, estos equipos son susceptibles de ser calibrados y cualificados, aspecto no realizable con métodos manuales.

Tecnología de medida del consumo de oxígeno

De todo lo anterior se infiere que hay que poner en marcha soluciones, capaces de dar respuesta a la rápida evolución tecnológica que estamos

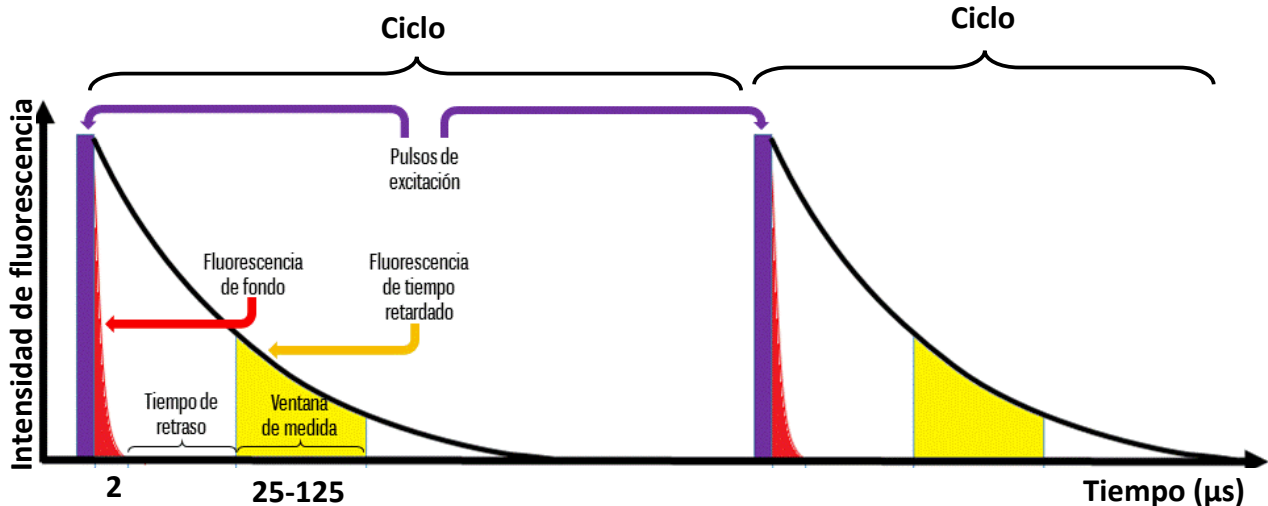


Figura 1. La TRF se basa en el uso de moléculas fluorescentes capaces de emitir durante "largos períodos de tiempo" tras ser excitarlas con una fuente de luz pulsada y midiendo, una vez desaparecida la fluorescencia de fondo ("background").

viviendo, mediante el uso de placas multipocillo, que contienen una película sensible a las variaciones de la concentración de oxígeno disuelto en el medio y, consecuentemente, son capaces de medir dinámicamente el consumo de oxígeno, por procariontes, eucariotes, orgánulos celulares, enzimas oxidativas, etc., en tiempo real, mediante procedimientos simples y reproducibles, fácilmente adaptables a robotización y con una capacidad de "screening" muy elevada. Además, los diferentes formatos hacen a estas placas muy flexibles frente a las diversas aplicaciones para cada laboratorio y ensayo en particular.

Para llevar a cabo dichas medidas, cada pocillo de la microplaca no sólo está revestido con una película sensible al oxígeno, sino que, de modo simultáneo, dicha película químicamente inerte puede estar precargada con una variedad de sustancias bioactivas (antibióticos, mitógenos, etc.), lo que daría lugar a una película biofuncional, fabricada con un material inerte biocompatible y estable en las condiciones habituales del ensayo; además, biológicamente activa, ya que, por ejemplo, es capaz de anclar

células adherentes y de liberar fármacos, por lo que se puede definir como bioactiva⁷.

Las lecturas se llevan a cabo con cualquier lector de microplacas estándar, de los usados de forma rutinaria en investigación, validación de bioensayos, control de calidad y procesos de fabricación en la industria farmacéutica, biotecnológica, alimentaria y en organizaciones académicas

En general, los bioensayos fluorescentes no han gozado de gran popularidad, hasta la fecha, ya que el fenómeno físico de la fluorescencia aunque es una técnica sencilla y apropiada para la caracterización cualitativa de sustancias en disolución, son múltiples los factores que influyen y distorsionan los espectros.

Por ejemplo, en ciertos casos, la autofluorescencia de la muestra, puede ser suficientemente intensa, como para confundirse con las señales provenientes de las sondas fluorogénicas, sujetas a medida.

Por ello, la señal física medible, se basa en el conocido fenómeno de la fluorescencia en tiempo retardado ("Time-Resolved Fluorescence"; TRF),

que evalúa la distribución de tiempo entre la excitación de un fluoróforo y la emisión de un fotón por el decaimiento radiante del electrón desde el estado excitado hasta el estado

electrónico fundamental (Figura 1).

Dichas medidas de TRF, además de ser independientes de la turbidez y/o del color de la muestra, posibilitan medidas, directamente en medios translúcidos (leche, sangre, etc.) y eliminan la fluorescencia de fondo (de vida corta), logrando una relación señal/ruido máxima, al introducir un retraso entre la excitación inicial y emisión. A ello se uniría la posibilidad de recuperar la muestra inalterada, para ser usada en ensayos adicionales si fuese necesario.

En definitiva, la TRF aprovecha que la mayoría de las sustancias fluorescentes emiten unos pocos nanosegundos después de ser excitadas, mientras que, en la sonda fluorogénica usada en estos experimentos, la excitación/emisión se prolonga durante algunos microsegundos, dando lugar a ensayos repetitivos, muy robustos y fácilmente miniaturizables⁸.

Usos potenciales

De todo lo que antecede, podemos inferir que la concentración de oxígeno es un parámetro estrechamente relacionado con la calidad del agua, la fres-

La Agencia Europea del Medicamento a través de la Farmacopea Europea, en su última actualización, abre la puerta al uso de "Métodos alternativos para el control microbiológico de la calidad" como variantes al uso centenario e invariable de la placa Petri

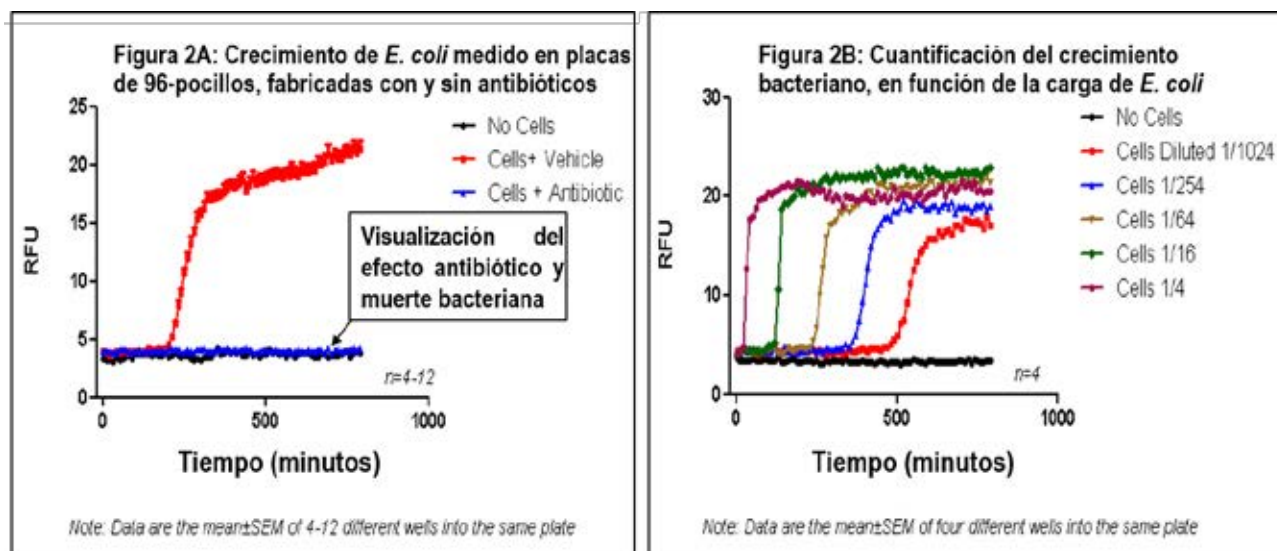


Figura 2. Medida del crecimiento de *E. coli*, cultivada con medio estándar en placas de 96 pocillos.

cura de los alimentos, la producción de biocombustibles, la respiración y el metabolismo celular (incluyendo bacterias, levaduras y protozoos), así como muchas otras posibles aplicaciones en campos como la industria farmacéutica, vinícola y láctea, la biotecnología, el control biológico de aguas, tanto potables como residuales o la obtención de biodiesel a partir de microalgas.

Entre ellos, el análisis microbiológico es una herramienta de capital importancia en el ámbito de la salud, la tecnología alimentaria y el medio ambiente, ya que una detección rápida y eficaz de microorganismos de riesgo, permite garantizar la salud del consumidor de forma preventiva y una identificación inequívoca de los alimentos contaminados, facilitando su rápida retirada del mercado y evitando retiradas injustificadas de productos aptos, causando importantes pérdidas económicas.

En general, en los estudios microbiológicos, dadas las características propias de los métodos de ensayo, se opta por la utilización de métodos publicados, para evitar el requisito de validación.

Sin embargo, en la última década del pasado siglo, se comenzó a demostrar que los resultados obtenidos pueden ser dependientes del método utilizado. Con la publicación de la norma ISO 17025 y la interpretación de la misma realizada por los organismos de acreditación, la validación de los métodos microbiológicos, alcanza un papel primordial.

Todo lo anterior se explica por las peculiaridades y rasgos distintivos que muestra el análisis microbiológico, frente a otros procesos de medida:

1. Posibilidad de la presencia de individuos atípicos, con comportamientos que pueden depender de la historia reciente (por ejemplo, en cepas estresadas), dando lugar a resultados erróneos.
2. Valores de referencia dependientes del método de obtención, ya que el número de microorganismos obtenido depende de las condiciones usadas: medio de cultivo, tiempo y temperatura de incubación.
3. Ausencia de garantías cuantitativas en medidas con bajas densidades de microorganismos (inferiores a 15 UFC), igual que ocurre con

el número de glóbulos rojos por unidad de área visibles bajo el microscopio, o el número de accidentes de tráfico en un cruce en un lapso de tiempo dado.

Por ello, tanto los organismos certificadores, como los técnicos y laboratorios que llevan a cabo los análisis deben acreditar la fiabilidad de los resultados, al máximo nivel permitido por el desarrollo científico, incluso más allá del método de referencia, reconocido internacionalmente y ampliamente aceptado.

Consecuentemente, los métodos microbiológicos alternativos (a ser validados por comparación con el método de referencia que corresponda, de acuerdo a un estándar aceptado tal como las ISO 16140, ISO/TR 13843, ISO, 7994, etc. y que son generalmente reconocidos por la comunidad científica y tecnológica como equivalentes al método de referencia) surgen como una necesidad científico-técnica para obtener respuestas más rápidas, exactas y reproducibles de la presencia de un microorganismo determinado en la muestra analizada; a ello, se añadiría el actual escenario de crecientes obligaciones y responsabilida-

des, tanto legales como éticas, lo que exige mayores niveles de calidad y confianza.

En ese sentido, la Agencia Europea del Medicamento a través de la Farmacopea Europea, en su última actualización (Suplemento 9.2, capítulo 5.1.6), abre la puerta al uso de "Métodos alternativos para el control microbiológico de la calidad" como variantes al uso centenario e invariable de la placa Petri. Enumerando una serie métodos tales los basados en variaciones de turbidimetría, métodos electroquímicos (cambios de impedancia), medida del ATP y los de medida de consumo/producción de gases (O_2/CO_2).

A modo de ejemplo y dada la potencial utilidad de la *E. coli* para el chequeo de la calidad higiénica alimentaria, así como la utilidad de proceder a una prueba de concepto de este tipo de placas sensoras, se ha chequeado el crecimiento bacteriano en medio de cultivo estándar, con distintas densidades por pocillo, como método alternativo a los procedimientos clásicos usados en Microbiología (Figura 2).

Para ello, la muestra original se coloca en un lector de placas

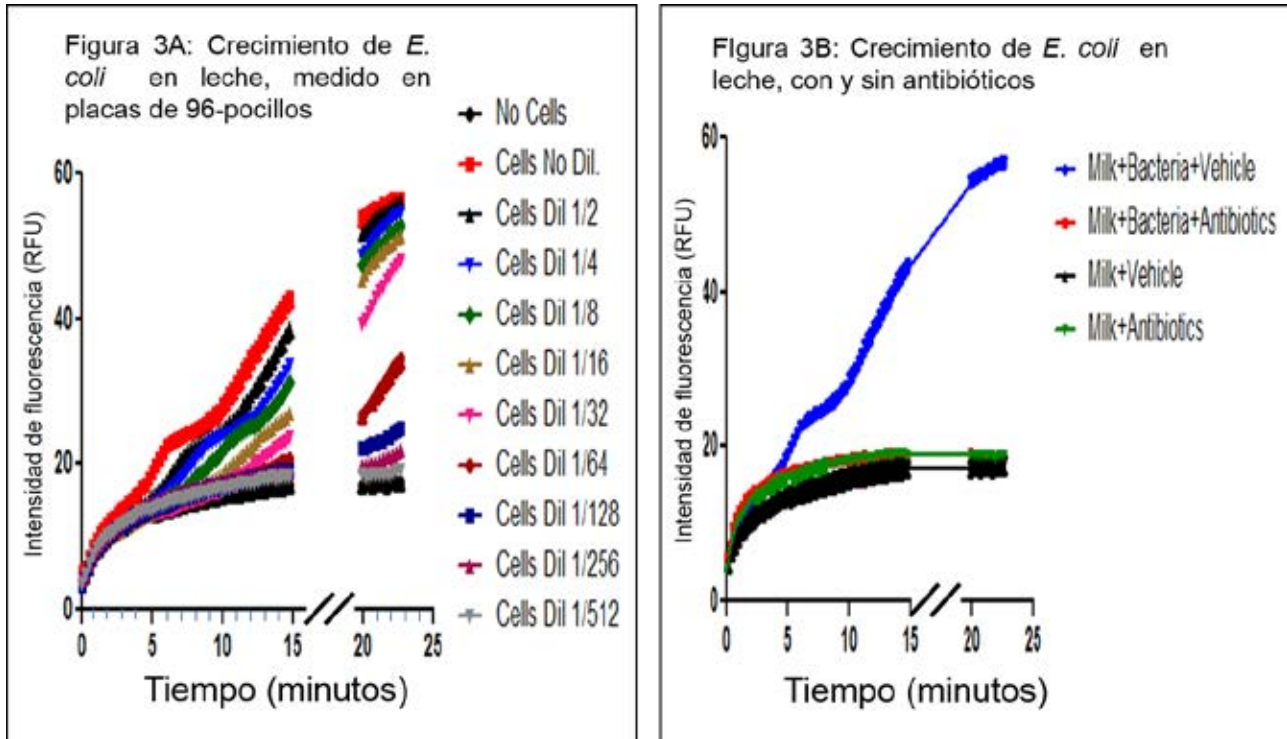


Figura 3. Medida del crecimiento de *E. coli*, cultivada en leche pasteurizada en placas de 96 pocillos.

y tras la lectura continua (entre 40 y 80 lecturas cada 15 minutos) de la placa a 37°C, se obtiene un gráfico del consumo de oxígeno/crecimiento bacteriano en cada pocillo dotado con una película sensora y fabricada con o sin antibiótico (Figura 2).

De este modo, se obtienen curvas de crecimiento, a partir de las cuales se podrían cuantificar el número de células y deducir la fase de latencia, la fase exponencial y, finalmente, cuando entra el cultivo en un estado estacionario.

Además, se chequeó un medio que presentaría dificultades para las medidas de densidad óptica, tal como la leche, usando un procedimiento totalmente análogo al descrito en párrafos anteriores, dando lugar a las gráficas recogidas en la Figura 3.

Conclusión

Habitualmente, los frenos organizativos están ligados, por un lado, a la exagerada inmediatez a la que se ven sometidos los decisores, para la con-

secución de un rápido éxito empresarial y, por otro, a las propias Administraciones encargadas de fomentar la I+D+i, que siguen manteniendo las innovaciones más disruptivas “al margen de la normativa vigente”, incluso en momentos donde tiempo y coste son primordiales.

Con ello, en muchos casos, se obliga a que las empresas biofarmacéuticas tengan que optar entre cumplir estrictamente con la normativa o, sólo, cumplir con su espíritu, respecto a la metodología y protocolos a aplicar, puesto que la maquinaria administrativa no incluirá los avances científico-técnicos hasta pasado demasiado tiempo.

No obstante, podemos decir que el estado actual de la tecnología podría permitir un impacto positivo gracias a la automatización (frente los vigentes métodos manuales) y a la disminución significativa del tiempo de detección (frente a las metodologías actuales),

aprovechando, no sólo que se trata de ensayos rápidos, en tiempo real, sino que, además, son simples, económicos, sin necesidad de equipos sofisticados o personal altamente cualificado y, al abrir nuevos horizontes científico-técnicos, podrán ofrecer soluciones que aportan valor, al ser:

- **Mínimamente invasivas**, no interfieren con el metabolismo celular
- **Innovadoras**, con medidas a tiempo real (en lugar de las clásicas de punto final)
- **Fiables**, no se ven afectadas por sustancias coloreadas y/o fluorescentes
- **Flexibles** y adaptables a estudios de alta capacidad (robotizados o no)
- **Fácil detección** de microorganismos viables, frente a PCR o determinaciones de ATP
- **Adaptables** a necesidades presentes y futuras en el campo de la viabilidad celular *in vitro*
- **Rápidas**, lo que permite una reducción en los costes de

almacenaje

- **Utilizables** fácilmente con cualquier medio y/o fluido biológico ◀◀

Bibliografía

- 1.- Díaz J.A. (2012), *De la convergencia a la coalescencia científico-técnica. ¿Reto futuro en Investigación Biofarmacéutica?*. Industria Farmacéutica. 170: 70-74
- 2.- "Aging Statistics", Department of Health and Human Services Administration on Aging, (2014)
- 3.- Alley, M.C.; Scudiere, D.A.; Monks, A.; Czenwinski, M.; Shoemaker, R.H. y Boyd, M.R. (1986), Validation of an automated microculture tetrazolium assay (MTA) to assess growth and drug sensitivity of human tumor cell lines, *Proc. Am. Assoc. Cancer Res.* 27: 389
- 4.- Crouch, S.P.; Kozlowski, R.; Slater, K.J. y Fletcher, J.; (1993), The use of ATP bioluminescence as a measure of cell proliferation and cytotoxicity. *J. Immunol. Methods* 160: 81-88
- 5.- Härkönen, P.L. y Laine, J.K. (2001), Cell Proliferation Assay by Using MicroBeta 3H-Thymidine Incorporation. *PerkinElmer Application Note*
- 6.- Mills, A. (1997), Optical oxygen sensors. *Platinum Metals Rev.* 41, (3), 115-126
- 7.- Hubbell, J.A. (1999), Bioactive biomaterials. *Current Opinion in Biotechnology.* 10:123-129
- 8.- Heredero-Bermejo, I., Criado-Fornello, A., Soliveri, J., Díaz-Martín, J.A., Matilla-Fuentes, J., Sánchez-Arias, J.A., Copa-Patiño, J.L. y Pérez-Serrano J., (2015). Development of a new oxygen consumption rate assay in cultures of *Acanthamoeba* (Protozoa: Lobosea) and its application to evaluate viability and amoebicidal activity *in vitro*. *Exp. Parasitol.* 155: 35-39