

# Detección de contaminación microbiana en una bebida con sabor y a base de soja para la sustitución de comidas mediante el uso del sistema Innovate™

## Introducción

El procesamiento aséptico es un método ampliamente utilizado en aplicaciones para alimentos y bebidas. Utilice temperaturas ultraelevadas para maximizar la esterilidad de productos con una vida útil larga y útil. No obstante, la contaminación se puede seguir produciendo durante la fabricación y la producción.

Para minimizar el riesgo, es vital comprobar el producto final en busca de contaminación por microorganismos. El sistema de detección rápida de microbios Innovate™ está diseñado para ofrecer una detección rápida de microorganismos para una amplia gama de productos. Para detectar unos niveles muy bajos de contaminantes en estos tipos de productos, se requiere un paso de enriquecimiento para garantizar que haya suficiente ATP para la detección. Normalmente, un producto se incuba en su propio envase para enriquecer el ATP con cualquier célula microbiana contaminante. Las bases de referencia preestablecidas obtenidas del producto no contaminado se utilizan para determinar unos resultados positivos.

## Objetivo

El objetivo de este estudio fue validar el sistema Innovate con el kit RapiScreen™ para productos lácteos para la detección de un crecimiento de microorganismos en una bebida con sabor a base de soja para la sustitución de comidas con el fin de demostrar la equivalencia con las técnicas de placa tradicionales.

## Equipos, suministros y reactivos

- Circuitos de inoculación estériles
- Pipetas y puntas estériles
- Incubadoras capaces de alcanzar  $35 \pm 2$  °C
- Toallitas con alcohol
- Kit RapiScreen para productos lácteos (incluye reactivos, viales de polipropileno (PP) viales, microplacas)
- Placas de agar de dextrosa Saboraud (ADS)
- Caldo de dextrosa de patata (CDP)
- Placas de agar de soja tríptica (AST)
- Caldo de soja tríptica (CST)
- Medidor de pH y electrodos (es decir, sensores InLab® de Mettler-Toledo)
- Sistema de bolsa para la generación de gas anaeróbico GasPak™ EZ con indicador
- Jeringas de 1 ml y 3 ml
- Solución salina con tampón de fosfato de Dulbecco - DPBS (1X)
- Solución de Ringer
- Pasta para calzado, recubrimiento de reparación y protección transparente para calzado
- Agujas deslizantes de precisión, calibre 16 1/2"
- Control positivo de ATP
- Instrumento del sistema Innovate

## Pruebas de organismos y productos

- Microorganismos comprobados
  - *Cronobacter sakazakii*, ATCC n.º 29544
  - *Bacillus cereus* endospores, ATCC n.º 11778
  - *Clostridium sporogenes*, vegetativo, ATCC n.º 7955 (PA 3679)
  - *Pseudomonas aeruginosa*, ATCC n.º 9027
  - *Pseudomonas putida*, ATCC n.º 49128
  - *Staphylococcus aureus*, ATCC n.º 6538
- Tipos de productos lácteos comprobados
  - Bebida para la sustitución de comidas a base de soja, con sabor



## Métodos

### 1. Preparación de cultivos

Para *Cronobacter sakazakii*, *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa*, se adquirieron y utilizaron suspensiones de células Quanti-Cult Plus™ para comprobaciones. *Clostridium sporogenes*, vegetativo, y *Pseudomonas putida* se prepararon con cultivos Culti-Loop® (preparados por Thermo Fisher Scientific y suministrados por un laboratorio externo). La rehidratación y la inoculación de todos los microorganismos se completaron de acuerdo con las indicaciones del fabricante.

*Pseudomonas putida* y *Clostridium sporogenes* se prepararon mediante la inoculación de un Culti-Loop de carbón activo en 5 ml de TSB. Los caldos se incubaron a 37 °C durante 24 horas. Una dilución en serie entre diez se generó con la solución de Ringer y se prepararon recuentos de placas en placas TSA para obtener una concentración de <100 UFC. Se utilizó un sistema GasPak para placas de *Clostridium sporogenes* vegetativo durante la incubación para garantizar el crecimiento. El inóculo real para todos los microorganismos utilizado durante la inoculación de espícula se determinó por duplicado para cada organismo en placas TSA. Las placas se incubaron a 35 ± 2 °C y el recuento se realizó después de 24 horas.

La suspensión de endoesporas de *Bacillus cereus* se preparó añadiendo gránulos EZ-Spore™ a 10 ml de 1X DPBS para obtener una concentración de a 10<sup>3</sup> CFU/ml. Esta suspensión de gránulos bacterianos se incubó a 37 °C durante 30 minutos y, a continuación, se mezcló bien para crear una solución homogénea. Esta suspensión de *B. cereus* se calentó a 80 °C en un baño de agua durante 30 minutos. La muestra se diluyó en serie entre diez en 1X DPBS estéril y se prepararon recuentos de placas en placas TSA para alcanzar una concentración de <100 UFC. La placa se incubó a 37 °C durante 24 horas.

### 2. Evaluaciones de pH

Los productos para los que se evaluó el pH se midieron por triplicado para garantizar la precisión de las mediciones. El medidor de pH utilizado para la medición de productos se calibró antes de su uso. Esto demostró que no era necesario realizar más pruebas para confirmar que el kit RapiScreen para productos lácteos era capaz de neutralizar los productos suficientemente.

### 3. Determinación de RLU inicial y de referencia

Para determinar los niveles de la base de referencia de ATP, cada producto se incubó inicialmente durante 24 horas a 37 °C. Las muestras se mezclaron cuidadosamente y se transfirieron 20 ml de cada producto a un contenedor estéril para la comprobación de pH y los valores iniciales y de referencia.

El nivel inicial de ATP de cada producto se determinó mediante la ejecución de un ensayo utilizando una solución de búfer ATS en lugar de reactivo ATX reconstituido. A continuación, se repitió el uso de ATX reconstituido para permitir el vaciado de la señal inicial de ATP. Estos resultados hacen referencia a los valores iniciales de RLU. Los valores de referencia de RLU deberían ser bajos y consistentes, demostrando que la señal inicial de RLU se ha vaciado por completo. Un valor de referencia y estable de RLU permite ajustar un umbral (positivo/negativo) para el valor de corte de identificación de las muestras contaminadas.

- Protocolo de base de referencia: Dispensar 60 µl de ATX – Agitar durante 10 minutos – Seguir las instrucciones del kit RapiScreen para productos lácteos para la detección
- Protocolo inicial: Dispensar 60 µl de solución tampón ATX – Agitar durante 10 minutos – Seguir las instrucciones del kit RapiScreen para productos lácteos para la detección

Una vez establecidas las bases de referencia y preparados los cultivos, se inoculó cada uno de los productos por duplicado con <100 UFC por contenedor. Los microorganismos se inocularon con espícula con una jeringa a través de la parte superior el contenedor sellado con cola en pasta para calzado. Se incubó un contenedor no

inoculado con cada juego inoculado como un control negativo. Se establecieron controles positivos mediante la inoculación de TSB o PDB con 100 µl del cultivo <100 UFC.

Las muestras se incubaron a 35 ± 2 °C durante un periodo de hasta siete días. En los días 1-7, se obtuvieron alícuotas de cada contenedor y se comprobaron en el sistema Innovate con el kit RapiScreen para productos lácteos. En paralelo, se inocularon 50 µl de cada muestra de producto en las placas TSA y se incubaron durante 24 horas a 35 ± 2 °C para confirmar el crecimiento y la morfología. Las bolsas para la generación de gas anaeróbico GasPak EZ se utilizaron para incubar las placas de confirmación marcadas con *C. sporogenes* para permitir que el organismo crece de forma efectiva si está presente. El crecimiento observado en las placas de confirmación igualó la morfología del microorganismo utilizado para la inoculación de la espícula.

**Resultados**

Para el producto inicial no inoculado, las pruebas no mostraron ninguna propiedad anómala que pueda interferir con el estudio (véase la Tabla 1, a, b y c). El pH del producto fue neutro, de acuerdo con lo esperado para estas bebidas, y no se observó ningún crecimiento en las muestras de las placas. Además, el valor inicial fue bajo (395) y consistente en 32 pruebas individuales (intervalo comprendido entre 357 y 481 RLU). Cuando se realizó la comprobación de los valores de referencia, los resultados de RLU fueron todavía inferiores y, de nuevo, consistentes, con una media de 11 RLU. Como resultado, el umbral se estableció en 32.

En las pruebas de productos con inoculación de espícula, se detectó *C. sakazakii*, *P. aeruginosa* y *P. putida* en el sistema Innovate durante las 24 horas posteriores a la inoculación de espícula (Tablas 2 y 3). *B. cereus*, *C. sporogenes* y *S. aureus* se detectaron después de 48 horas. Los valores de RLU solo se recopilaron durante los días 1-4 para *C. sakazakii* y *C. sporogenes* debido a un crecimiento excesivo en este producto y una producción excesiva de gas, provocando fugas en los contenedores del producto. Todos los resultados positivos del sistema Innovate se confirmaron marcando los productos en TSA. Se muestra un resumen de los resultados en la Tabla 3.

**Tabla 1.** Evaluaciones del producto – pH, valor inicial, valor de referencia y esterilidad

a) pH

pH de las muestras de producto			
Lectura 1	Lectura 2	Lectura 3	Media
7,13	7,12	7,12	7,12

b) Lecturas de valores iniciales y de referencia

Promedios de RLU (n=32)		
Valor inicial	Valor de referencia	Umbral
395	11	32

c) Confirmación de esterilidad

Placas de esterilidad	
TSA	SDA
Sin crecimiento	Sin crecimiento

**Tabla 2.** Detección de crecimiento de microorganismos a lo largo del tiempo en un producto de sustitución de comidas a base de soja, con sabor

Base inicial del producto: 395 RLU		Base de referencia del producto: 11 RLU		Umbral: 32 RLU						
Panel de organismos	Inóculo objetivo	Inóculo real	Confirmación Resultado de la placa	Días: Valor RLU (medio)						
	Células o *esporas (UFC)	Células o *esporas (UFC)		1	2	3	4	5	6	7
Endoesporas de <i>Bacillus cereus</i>	<100	28	Crecimiento	10	70	33144	1068	2489	2782	1460
<i>Clostridium sporogenes</i> vegetativo	<100	20	Crecimiento	18	52063	89495	85773	FUGA	FUGA	FUGA
<i>Cronobacter sakazakii</i>	<100	92	Crecimiento	39812	56762	60615	14594	FUGA	FUGA	FUGA
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<100	138	Crecimiento	10141	2338	2590	877	1555	1902	1517
<i>Pseudomonas putida</i>	<100	59	Crecimiento	1010	6842	5232	317	573	37263	14846
<i>Staphylococcus aureus</i>	<100	35	Crecimiento	9	461	7056	892	6821	20111	9441
Panel vacío	Inóculo objetivo	Inóculo real	Confirmación Resultado de la placa	1	2	3	4	5	6	7
<i>Control negativo</i>	0	0	Sin crecimiento	8	12	9	12	8	12	28

\*Fuga: producción de gas del organismo que provoca que el contenedor del producto explote o tenga fugas.

**Tabla 3.** Resumen del tiempo de detección para el crecimiento de microorganismos en el producto de sustitución de comidas

Tiempo de detección para el producto en el sistema Innovate					
<i>B. cereus</i>	<i>C. sporogenes</i>	<i>C. sakazakii</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>P. putida</i>	<i>S. aureus</i>
48 horas	48 horas	24 horas	24 horas	24 horas	48 horas

**Conclusiones**

El producto de sustitución de comidas a base de soja, con sabor, se inoculó con un objetivo de <100 UFC y se incubó a 35 ±2 °C, con lecturas obtenidas en los días 1-7. Los niveles de UFC se establecieron como 28, 20, 92, 138, 59 y 35 para los organismos *B. cereus*, *C. sporogenes*, *C. sakazakii*, *P. aeruginosa*, *P. putida* y *S. aureus*, respectivamente.



Tal como se muestra en las tablas anteriores (Tablas 2 y 3), *C. sakazakii*, *P. aeruginosa* y *P. putida* se detectaron en el sistema Innovate durante las 24 horas posteriores a la inoculación de espícula. *B. cereus*, *C. sporogenes* y *S. aureus* se detectaron después de 48 horas. Los valores de RLU para *C. sakazakii* y *C. sporogenes* solo se pudieron obtener los días 1-4 debido a un crecimiento excesivo en el producto y a una producción excesiva de gas, haciendo que se produjesen fugas en los contenedores. Todos los resultados positivos del sistema Innovate se confirmaron marcando los productos en TSA.

## Resumen

El procesamiento aséptico de los productos a base de soja puede ayudar a reducir el riesgo de contaminación microbiana de los productos. Esto queda mostrado claramente en los valores de línea de base bajos para la detección de ATP en muestras no inoculadas. Además, los valores de RLU de referencia fueron estables de forma consistente, permitiendo la obtención de un valor umbral positivo/negativo. El umbral para este producto se estableció en 32 RLU. Los valores de RLU por encima de este umbral indicaron un resultado positivo.

La señal del crecimiento de todos los cultivos de organismos comprobados en este producto demostró que la relación señal-ruido no supuso un problema. Incluso inoculadas con niveles bajos de microorganismos (<100 UFC), las muestras comprobadas produjeron niveles de RLU muy altos a las 24 y 48 horas, validando así la utilidad del sistema Innovate a la hora de detectar la contaminación microbiana de los productos de sustitución de comidas a base de soja, con sabor.

Tomando como base estos resultados, Hygiena® recomienda el uso del sistema Innovate para la detección de niveles bajos de contaminación microbiana en productos de sustitución de comidas a base de soja.