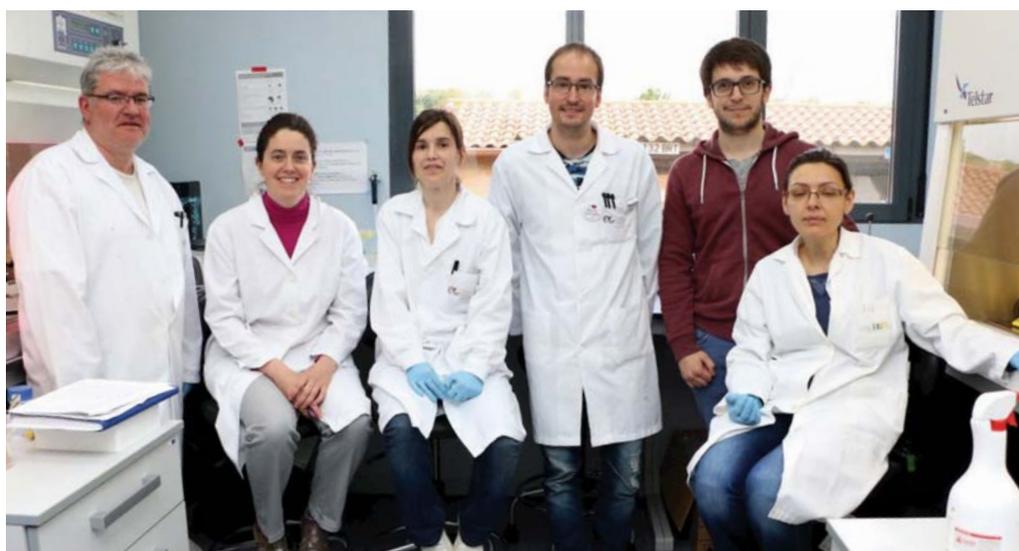


Seguridad alimentaria: el bueno, el feo y el malo, de las UFC a las OTUs.

Marta Hernández Pérez



Instituto Tecnológico Agrario de Castilla y León (ITACyL)



De izquierda a derecha: Julián Jesús Ruiz Orte; Marta Hernández Pérez, Patricia González García; Jaime Ariza Miguel, Narciso Martín Quijada, Lorena López Enríquez.

La microbiología de los alimentos es el estudio de aquellos microorganismos que están o contaminan los alimentos, y que son, o bien necesarios para que ese alimento lo sea (queso, embutidos) “el bueno”, o bien que pueden causar una alteración del mismo “el feo”, o bien ejercen una función en el ser humano, ya sea beneficiosa (probióticos) o una enfermedad “el malo”, siendo estos últimos los denominados microorganismos patógenos. A éstos nos hemos dedicado en el Laboratorio de Biología Molecular y Microbiología del Instituto Tecnológico Agrario de Castilla y León (ITACyL) desde el comienzo de su andadura en 2004, con un afán predominantemente práctico y enfocado a garantizar la inocuidad y calidad alimentaria de los productos de las empresas del sector alimentario.

Según datos de la OMS, mueren 1,8 millones de personas cada año en el mundo como consecuencia de un proceso diarreico originado por el consumo de alimentos o agua contaminados. En Estados Unidos se ha cifrado el

coste anual de casos agudos de gastroenteritis asociados a alimentos (47.780.779 casos) en 77.700 millones de dólares (Scharff, 2012) y el coste de la infección por 5 de los patógenos más relevantes (*Salmonella enterica*, *Listeria monocytogenes*, *Campylobacter* spp., Norovirus, y *Toxoplasma gondii*) en 12.600 millones de dólares (Hoffmann *et al.*, 2012). Estos 5 son los patógenos que más casos producen, pero se conocen alrededor de 200 enfermedades transmitidas por los alimentos, aun siendo solo 31 los patógenos más abundantes, aunque todavía hoy día en la mayoría de los casos, el agente causal de un brote alimentario permanece desconocido (EFSA, 2015).

Nuestro grupo ha participado desde su creación en la investigación de bacterias en alimentos que causan infecciones (solo citamos algunas publicaciones de los últimos 5 años) como *Listeria monocytogenes* (Valero *et al.*, 2014a y b; Rodríguez-Lázaro *et al.*, 2014a; Gattuso *et al.*, 2014; Dalmasso *et al.*, 2014), *Salmonella* spp. o *Campylobacter*, toxiinfec-

ciones como *Clostridium perfringens* o *E. coli* enterotoxigénico; e intoxicaciones como *Staphylococcus aureus* o *Clostridium botulinum*, realizando estudios de prevalencia y de supervivencia en diferentes escenarios o bien investigando posibles patógenos que llegan a la Unión Europea mediante importaciones de alimentos (Rodríguez-Lázaro *et al.*, 2015a,b; Oniciuc *et al.*, 2015), así como en la mejora u optimización de los métodos de muestreo en la cadena alimentaria basados en la microbiología predictiva (Pérez-Rodríguez *et al.*, 2014).

Pero al cabo de pocos años de andadura del grupo empezamos a trabajar en virus de origen alimentario (norovirus, virus de la hepatitis A y E, y adenovirus) ya que se estima que son los responsables de casi el 80% de los brotes de origen alimentario. Estudiamos los virus presentes en la cadena alimentaria europea (Rodríguez *et al.*, 2012; Díez-Valcarce *et al.*, 2012; D'Agostino *et al.*, 2012; Di Bartolo *et al.*, 2012) o que son importados a través de nuestras fronteras (Rodríguez-Lá-

zaro, *et al.*, 2015c) e hicimos estudios de inactivación vírica por altas presiones (Kovac *et al.*, 2012a y b).

Actualmente coordinamos un proyecto financiado por INIA titulado “Análisis y control integrado de *Toxoplasma gondii* y virus de la Hepatitis E en la cadena alimentaria” en el que participamos junto a VISAVET-Universidad Complutense de Madrid, la Facultad de Veterinaria de la Universidad de Zaragoza y la Universidad de Valencia - Instituto de Agroquímica y Tecnología de Alimentos IATA, en la investigación de un parásito y un virus, para responder a las cuestiones planteadas por el sector alimentario español.

En algunos de los trabajos de bacterias y virus hemos diseñado o mejorado nuevos métodos de detección basados en PCR (Fongaro *et al.*, 2016; Ruhanya *et al.*, 2015; Ariza-Miguel *et al.*, 2015; Rodríguez-Lázaro

et al., 2014a, b y c) y ahora afrontamos la investigación por primera vez de un eucariota, *Toxoplasma*, muy importante para la seguridad alimentaria.

Asimismo iniciamos, no hace mucho tiempo, una línea para estudiar las resistencias a antibióticos transmitidas por los patógenos que se encuentran en los alimentos (Ariza-Miguel *et al.*, 2014a y b) o que se introducen a través de nuestras fronteras (Rodríguez-Lázaro *et al.*, 2015b, Oniciuc *et al.*, 2015).

Nuestro trabajo no sólo ha versado sobre seguridad alimentaria sino que también hemos buscado y caracterizado alteraciones de los alimentos producidas por bacterias del género *Clostridium* y otros microorganismos, principalmente en queso, para responder a problemas que plantea el sector lácteo y en este sentido participamos en la caracterización de toda la microbiota de un alimento para determinar qué

especies están jugando un papel importante en la calidad del mismo. Así los programas de trabajo que actualmente tenemos en el grupo se ven reflejados en el “Nuevo Modelo de Investigación e Innovación (I+i) del Sector Agrario y Agroalimentario”, presentado el pasado 27 de mayo por la Consejería de Agricultura y Ganadería para la mejora de la competitividad del sector agrario y agroalimentario de Castilla y León. Los programas y líneas que nos ocupan en microbiología y que marcan el trabajo que realizamos en el Laboratorio de Microbiología y Biología Molecular en el ITACyL se detallan en la Figura 1.

De este Nuevo Modelo se denota que la microbiología clásica, basada en el enriquecimiento, cultivo y selección de microorganismos por sus características fenotípicas, bioquímicas y morfológicas, la hemos venido complementando con la identificación y tipado genético basada en la amplificación de determinados genes y/o la secuenciación de los mismos, principalmente la secuenciación del gen ADNr16S y otros genes marcadores, dando lugar a técnicas de tipado por MLST, PFGE, etc. Pero desde el desarrollo de las nuevas tecnologías de secuenciación de *high-throughput sequencing* (HTS, anteriormente conocida como *next-generation sequencing*, NGS) se ha revolucionado el campo de la microbiología y la genómica debido a la gran cantidad de información generada y a la capacidad de identificar microorganismos que no son cultivables mediante métodos clásicos. Actualmente el uso de HTS, en colaboración con la Universidad de Burgos, nos permite caracterizar la microbiología y hacer ecología de una muestra o ambiente para cuantificar la abundancia relativa de todos los taxones microbianos presentes y también estudiar el genoma de los microorganismos, y así obtener el metagenoma de la muestra. Estas tecnologías han introducido nuevos términos más allá de las colonias o unidades formadoras de colonias (UFC), como por ejemplo los *clusters* de secuenciación o agrupaciones de secuencias idénticas generadas a partir de una porción de genoma o las Unidades Taxonómicas Operacionales (OTUs) que se definen como la unidad operacional utilizada para seleccionar y clasificar grupos de individuos genéticamente relacionados, que permiten posteriormente la asignación taxonómica de dichos OTUs mediante análisis bioinformáticos de diversidad y agrupación.

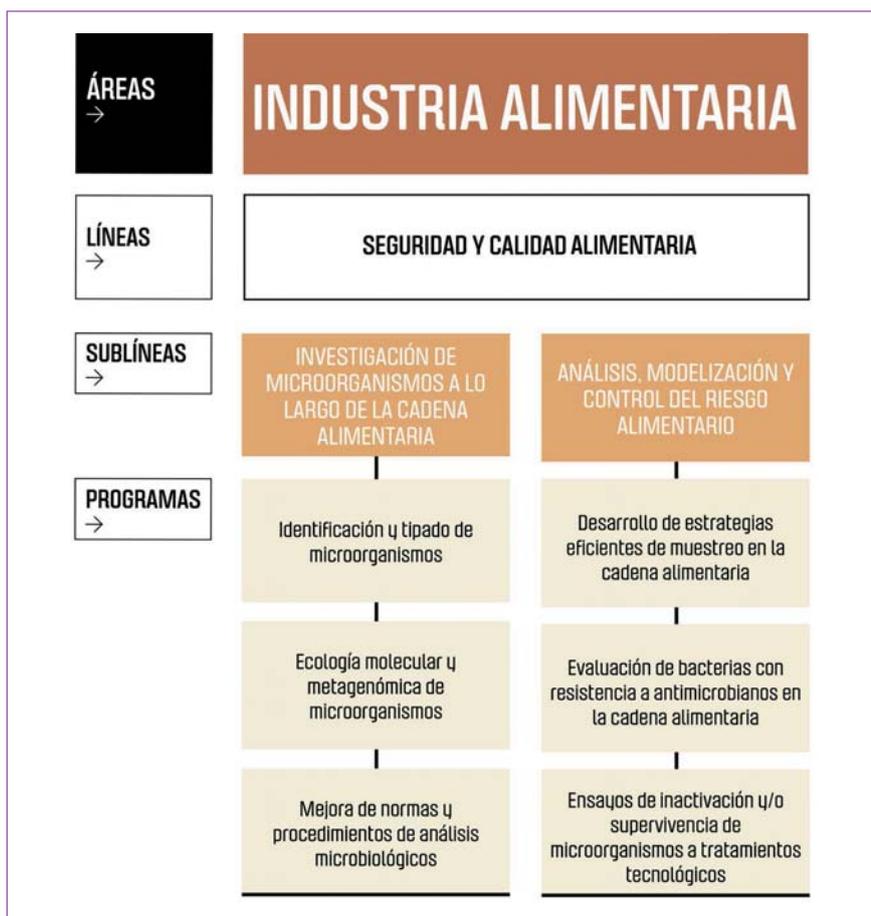


Figura 1. Programas de investigación en Microbiología del “Nuevo Modelo de Investigación e Innovación (I+i) del Sector Agrario y Agroalimentario”.

El trabajo de estos años ha sido posible gracias a las nuevas técnicas que la ciencia ha puesto en manos de los investigadores, a la inversión en infraestructuras y en proyectos de la Junta de Castilla y León a través de la Consejería de Agricultura y Ganadería y del Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria INIA, pero sobre todo a las colaboraciones nacionales e internacionales que hemos tenido y que se reflejan en las publicaciones, y finalmente, al trabajo personal que estudiantes y contratados han desarrollado en el ITACyL, entre los cuales es de destacar el trabajo realizado por la becaria predoctoral Marta Diez Valcarce, ahora investigadora desde el 2012 en el *Centers for Disease Control and Prevention* (CDC) de Atlanta (Estados Unidos) y principalmente por la contribución desde 2007 del investigador Dr. David Rodríguez Lázaro, premio Jaime Ferrán de Microbiología en 2013, que es desde septiembre de 2015, profesor y Director del Área de Microbiología en la Universidad de Burgos.

BIBLIOGRAFÍA

- Ariza-Miguel J, Hernández M, Fernández-Natal I, Rodríguez-Lázaro D.** (2014). Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* harboring *mecC* in livestock in Spain. *J Clin Microbiol.* 11 4067-4069.
- Ariza-Miguel J, Hernández M, Fernández-Natal I, Rodríguez-Lázaro D.** (2014). Molecular epidemiology of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in a university hospital in northwestern Spain. *International Microbiology* 17(3):149-57.
- Ariza-Miguel J, Oniciuc EA, Sanz I, Fernández-Natal I, Hernández M, Rodríguez-Lázaro D.** (2015). Evaluation of two commercially available chromogenic media for Confirmation of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* from human, animal, and food samples. *Int. J. Food Microbiol.* 209:26-8.
- D'Agostino M, Cook N, Di Bartolo I, Ruggeri FM, Berto A, Martelli F, Banks M, Vasickova P, Kralik P, Pavlik I, Kokkinos P, Vantarakis A, Söderberg K, Maunula L, Verhaelen K, Rutjes S, de Roda Husman AM, Hakze R, Van der Poel W, Kaupke A, Kozyra I, Rzezutka A, Prodanov J, Lazic S, Petrovic T, Carratala A, Gironés R, Diez-Valcarce M, Hernandez M, Rodríguez-Lázaro D.** (2012). Multicenter Collaborative Trial Evaluation of a Method for Detection of Human Adenoviruses in Berry Fruit. *Food Anal Methods.* . 5:1-7.
- Dalmasso M, Bolocan AS, Hernandez M, Kapetanakou AE, Kuchta T, Manios SG, Melero B, Minarovičová J, Muhterem M, Nicolau AI, Rovira J, Skandamis PN, Stessl B, Wagner M, Jordan K, Rodríguez-Lázaro D.** (2014). Comparison of polymerase chain reaction methods and plating for analysis of enriched cultures of *Listeria monocytogenes* when using the ISO11290-1 method. *J Microbiol Methods.* 98:8-14.
- Di Bartolo I, Diez-Valcarce M, Vasickova P, Kralik P, Hernandez M, Angeloni G, Ostanello F, Bouwknegt M, Rodríguez-Lázaro D, Pavlik I, Ruggeri FM.** (2012). Hepatitis E virus in pork production chain in Czech Republic, Italy, and Spain, 2010. *Emerg Infect Dis.* 18,1282-1289.
- Diez-Valcarce M, Kokkinos P, Söderberg K, Bouwknegt M, Willems K, de Roda-Husman AM, von Bonsdorff CH, Bellou M, Hernández M, Maunula L, Vantarakis A, Rodríguez-Lázaro D.** (2012). Occurrence of Human Enteric Viruses in Commercial Mussels at Retail Level in Three European Countries. *Food Environ Virol.* 4, 73-80.
- European Food Safety Authority European Centre for Disease Prevention and Control.** (2015). Summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2014. *The EFSA Journal*13;12.
- Fongaro G, Hernández M, García-González MC, Barrardi CRM, Rodríguez-Lázaro D.** (2016). Propidium Monoazide Coupled with PCR Predicts Infectivity of Enteric Viruses in Swine Manure and Biofertilized Soil. *Food Environ Virol.* 8,1(1): 79-85.
- Gattuso A, Gianfranceschi MV, Sonnessa M, Delibato E, Marchesan M, Hernandez M, De Medici D, Rodríguez-Lázaro D.** (2014). Optimization of a Real Time PCR based method for the detection of *Listeria monocytogenes* in pork meat. *Int J Food Microbiol* 184:106-108.
- Hoffmann S, Batz MB, Morris JG Jr.** (2012). Annual cost of illness and quality-adjusted life year losses in the United States due to 14 foodborne pathogens. *J Food Prot.* 75(7):1292-302.
- Kovač K, Bouwknegt M, Diez-Valcarce M, Raspor P, Hernández M, Rodríguez-Lázaro D.** (2012). Evaluation of high hydrostatic pressure effect on human adenovirus using molecular methods and cell culture. *Int J Food Microbiol* 157:368-374.
- Kovač K, Diez-Valcarce M, Raspor P, Hernández M, Rodríguez-Lázaro D.** (2012). Effect of high hydrostatic pressure processing on norovirus infectivity and genome stability in strawberry puree and mineral water. *Int J Food Microbiol.* 152:35-39.
- Oniciuc EA, Ariza-Miguel J, Bolocan AS, Diez-Valcarce M, Rovira J, Hernández M, Fernández-Natal I, Nicolau AI, Rodríguez-Lázaro D.** (2015). Foods confiscated from black market at EU border as a neglected route of potential Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* transmission. *Int. J. Food Microbiol.* 209:34-8.
- Pérez-Rodríguez F, González-García P, Valero A, Hernández M, Rodríguez-Lázaro D.** (2014). Impact of the prevalence of different pathogens on the performance of sampling plans in lettuce products. *Int J Food Microbiol.* 184: 69-73.
- Rodríguez-Lázaro D, Cook N, Ruggeri FM, Sellwood J, Nasser A, Nascimento MSJ, D'Agostino M, Santos R, Saiz JC, Rzezutka A, Bosch A, Gironés R, Carducci A, Muscillo M, Kovač K, Diez-Valcarce M, Vantarakis A, von Bonsdorff CH, de Roda Husman AM, Hernández M, van der Poel WHM.** (2012). Virus hazards from food, water and other contaminated environments. *FEMS Microbiol Rev.* 36,786-814.
- Rodríguez-Lázaro D, Gonzalez-García P, Gattuso A, Gianfranceschi MV, Hernandez M.** (2014). Reducing time in the analysis of *Listeria monocytogenes* in meat, dairy and vegetable products. *Int J Food Microbiol.* 184: 98-105.
- Rodríguez-Lázaro D, Gonzalez-García P, Delibato E, De Medici D, García-Gimeno RM, Valero A, Hernandez M.** (2014). Next day *Salmonella* spp. detection method based on real-time PCR for meat, dairy and vegetable food products. *Int J Food Microbiol.* 184, 113-120.
- Rodríguez-Lázaro D, Gonzalez-García P, Valero A, Hernandez M.** (2014) Application of the SureTect Detection Methods for *Listeria monocytogenes* and *Listeria* spp. in Meat, Dairy, Fish, and Vegetable Products. *Food Anal Methods.* 8, 1: 1-6.
- Rodríguez-Lázaro D, Ariza-Miguel J, Diez-Valcarce M, Stessl B, Beutlich J, Fernández-Natal I, Hernández M, Wagner M, Rovira J.** (2015). Identification and molecular characterization of pathogenic bacteria in foods confiscated from non-EU flights passengers at one Spanish airport. *Int J Food Microbiol.* 209:20-5.
- Rodríguez-Lázaro D, Ariza-Miguel J, Diez-Valcarce M, Fernández-Natal I, Hernández M, Rovira J.** (2015). Foods confiscated from non-EU flights as a neglected route of potential methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* transmission. *Int J Food Microbiol.* 209:29-33.
- Rodríguez-Lázaro D, Diez-Valcarce M, Montes-Briónes R, Gallego D, Hernández M, Rovira J.** (2015). Presence of pathogenic enteric viruses in illegally imported meat and meat products to EU by international air travelers. *Int J Food Microbiol.* 209:39-43.
- Ruhanya V, Diez-Valcarce M, D'Agostino M, Cook N, Hernández M, Rodríguez-Lázaro D.** (2015). Monitoring of Extraction Efficiency by a Sample Process Control Virus Added Immediately Upon Sample Receipt. *International: Food and Environmental Virology.* 7, 4(1): 413-416
- Scharff RL.** (2012) Economic burden from health losses due to foodborne illness in the United States. *J Food Prot.* 75(1):123-31.
- Valero A, Hernandez M, De Cesare A, Manfreda G, García-Gimeno RM, González-García P, Rodríguez-Lázaro D.** (2014). Probabilistic approach for determining *Salmonella* spp. and *L. monocytogenes* concentration in pork meat from presence/absence microbiological data. *Int J Food Microbiol.* 184: 60-63.
- Valero A, Hernandez M, De Cesare A, Manfreda G, González-García P, Rodríguez-Lázaro D.** (2014). Survival kinetics of *Listeria monocytogenes* on raw sheep milk cured cheese under different storage temperatures. *Int J Food Microbiol.* 184:39-44.