



El test de desafío (*challenge test*) como herramienta para evaluar la seguridad microbiológica de un alimento

Apellidos, nombre	Pérez Esteve, Édgar (edpees@upv.es) Rivas Soler, Alejandro (alriso@tal.upv.es)
Departamento	Departamento de Tecnología de los Alimentos
Centro	Universitat Politècnica de València



1 Resumen de las ideas clave

Imagina que estás diseñando un nuevo alimento que quieres llevar al mercado. ¿Cómo podrías saber si es seguro desde el punto de vista microbiológico? También es posible que, en vez de diseñar la formulación, lo que propongamos es un nuevo método de conservación de los alimentos (altas presiones hidrostáticas, irradiación...). ¿Cómo podrías asegurar que el tratamiento alternativo proporciona un alimento igual de seguro que el tratamiento convencional? Si no lo sabes, no te preocupes, está todo inventado. A esta metodología se le denomina test de desafío, y en este artículo te mostramos los pasos para que la puedas ejecutar correctamente.

2 Objetivos

Una vez leído con detenimiento este documento, serás capaz de:

- Definir el término de “test de desafío”.
- Diferenciar entre la metodología para realizar un “test de desafío” o determinar la “vida útil”.
- Diseñar un test de desafío microbiológico en función de los factores intrínsecos del alimento y del tipo de procesado al que se le somete.

3 Introducción

El Reglamento (CE) n.º 853/2004 sobre la higiene de los alimentos establece que la responsabilidad principal de la seguridad alimentaria recae en las empresas alimentarias, que son, además, legalmente responsables de la determinación de la fecha de duración mínima de los alimentos que ponen en el mercado. De acuerdo con el Reglamento (CE) n.º 2073/2005 sobre criterios microbiológicos para productos alimenticios, las empresas alimentarias deben garantizar el cumplimiento de sus productos con los límites establecidos por el Reglamento hasta el final de la vida útil. La determinación de la vida útil de un producto se debe basar en evidencias científicas. Una herramienta científica para evaluar la seguridad microbiológica de un determinado alimento son los llamados test de desafío (*challenge test*).

Un **test de desafío microbiológico** consiste en determinar la supervivencia de un microorganismo intencionadamente inoculado en el alimento tras ser sometido a las condiciones previstas de procesado, almacenamiento o distribución.

Este tipo de ensayo se usa para:

- determinar la capacidad del alimento para soportar, o no, el crecimiento o la supervivencia microbiana, evaluando de esta manera su seguridad y estabilidad durante el almacenamiento

- proporcionar datos científicos que ayuden a establecer la vida útil del producto.
- ayudar en la formulación del producto en términos de factores de control intrínsecos (p. ej., pH y actividad del agua) y establecer puntos críticos en una línea de procesado.

Tras leer estas líneas puedes creer que es lo mismo determinar la vida útil de un alimento que realizar un test de desafío. Sin embargo, no hay que confundir ambas metodologías. En el análisis de vida útil, el alimento se almacena en condiciones normales y se analiza a lo largo del tiempo para garantizar que sea seguro y estable. Este enfoque supone buenas condiciones de fabricación bajo un plan APPCC que limitaría las posibilidades de que los microorganismos, distintos de la flora natural del producto (no patógenos), contaminen el producto. Por lo tanto, en los ensayos de vida útil, el análisis se centrará en la flora alteradora naturalmente presente que crece durante el almacenamiento en las condiciones estipuladas. Sin embargo, las pruebas de desafío están diseñadas para responder a la pregunta de si el producto podría ser seguro y estable si se contamina accidentalmente con microorganismos patógenos o alteradores, es decir, por ejemplo, si una formulación específica del producto favorecería o inhibiría su crecimiento.

4 Fases del test de desafío

El test de desafío comprende 4 fases que conducirán a determinar la eficacia de una formulación o tratamiento de conservación para asegurar la seguridad alimentaria de un determinado alimento. (Fig.1).

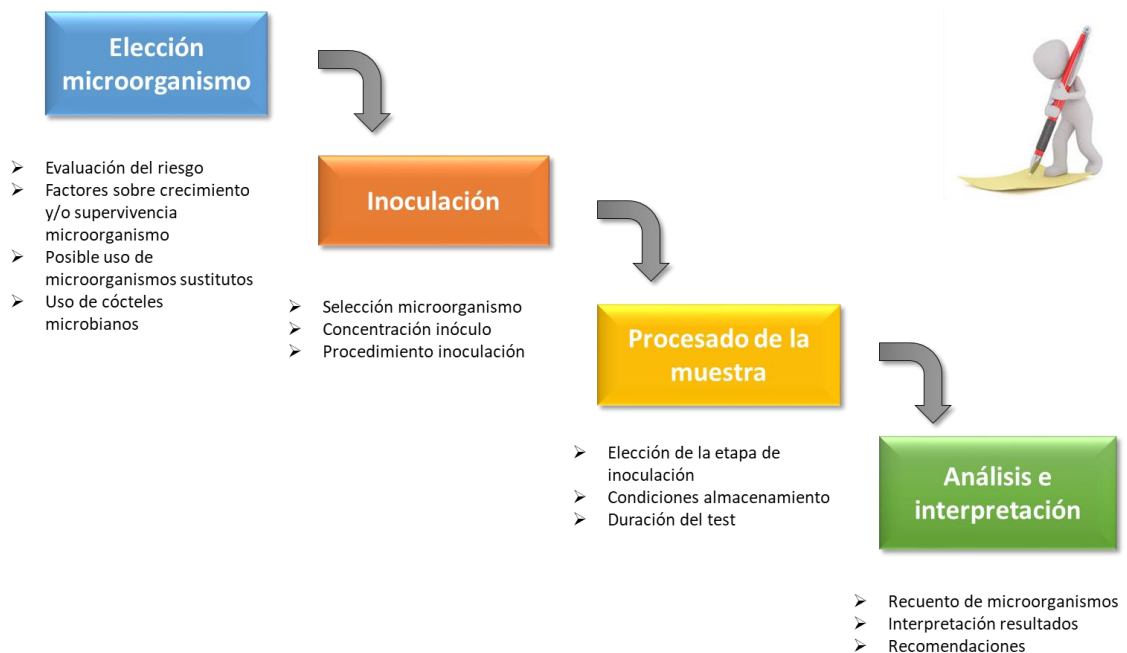


Figura 1. Etapas del test de desafío

4.1 Elección del microorganismo de referencia adecuado

La elección de los microorganismos de referencia debe ser el resultado de una evaluación del riesgo de contaminación de los alimentos y de las características intrínsecas y extrínsecas del alimento. Además, se debe realizar una búsqueda bibliográfica de los microorganismos responsables de episodios de intoxicación alimentaria.

Puesto que la capacidad de un microorganismo para sobrevivir o crecer en un alimento va a depender de **factores intrínsecos** (pH, a_w , nutrientes, potencial redox y flora competitiva) y de **factores extrínsecos** (tiempo y temperatura de almacenamiento, tipo de procesado y tipo de envasado) del alimento, el primer paso es evaluar estas características. Por tanto, antes de la elección del microorganismo de referencia, es necesario el conocimiento de las condiciones mínimas, máximas y óptimas de crecimiento del microorganismo en el alimento. De todas ellas, las más frecuentes son el pH y la actividad de agua (ver **Tabla 1**).

Tabla 1. Condiciones de pH y actividad de agua que permiten el crecimiento de ciertos microorganismos patógenos

MICROORGANISMO	pH	A_w
<i>Campylobacter spp.</i>	4.9 - 9	0.98 - 0.99
<i>Salmonella spp.</i>	3.8 - 9.5	0.94 - 0.99
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	4.8 - 11	0.94 - 0.99
<i>Bacillus cereus</i>	4.3 - 9.3	0.91 - 0.99
<i>Clostridium perfringens</i>	5.5 - 9	0.94 - 0.97
<i>Clostridium botulinum</i>	4.6 - 9	0.94 - 0.99
<i>Listeria monocytogenes</i>	4.4 - 10	0.92 - 0.99
<i>Staphylococcus aureus</i>	4 - 10	0.83 - 0.99

Durante la selección de un microorganismo, es recomendable el uso de cepas que hayan sido aisladas en alimentos similares al que se quiere ensayar (ver **Tabla 2**). El uso de cepas de colecciones de cultivo reconocidas puede ser una solución alternativa cuando no se dispone de aislados naturales. Si se usan cepas provenientes de colección se debe de introducir una etapa de adaptación del microorganismo al alimento.

En general, se recomienda el uso de combinaciones de microorganismos (cócteles microbianos) siempre que no exista ningún antagonismo mutuo, que podría afectar al comportamiento de las cepas individuales. El uso de un cóctel microbiano es la aproximación más realista, teniendo en cuenta sus limitaciones (competencia entre ellas, uso de medios selectivos, ...).

En caso de realizar los ensayos en instalaciones industriales, donde la realización del ensayo podría ser un foco de contaminación cruzada con patógenos, se recomienda el uso de microorganismos sustitutos no patógenos (también conocidos por su término en inglés microorganismos *surrogate*), pero que tengan un comportamiento similar al microorganismo patógeno de referencia (**Tabla 3**). La elección de los microorganismos sustitutos debe ser lo más cuidadosa posible con el objeto de obtener resultados significativos.

Tabla 2. Microorganismos patógenos usados en test de desafío.

CATEGORÍA DE ALIMENTO	MICROORGANISMO/S OBJETIVO/S
Salsas	<i>Salmonellae, S. aureus</i>
Productos lácteos	<i>Salmonellae, S. aureus, C. botulinum, E. coli enterohemorrágico, L. monocytogenes</i>
Productos de confitería	<i>Salmonellae</i>
Carnes cocidas o secas	<i>C. botulinum, C. perfringens, L. monocytogenes, Salmonellae, S. aureus, E. coli enterohemorrágico</i>
Pescados y mariscos	<i>B. cereus, C. botulinum, L. monocytogenes, Salmonellae, Shigella spp., S. aureus, Vibrio spp.</i>
Frutas y vegetales	<i>B. cereus, C. botulinum, E. coli enterohemorrágico, L. monocytogenes, Salmonellae, Shigella spp., Y. enterocolitica</i>
Cereales y derivados	<i>B. cereus, C. botulinum, Salmonellae, S. aureus</i>

Tabla 3. Ejemplos de microorganismos sustitutos usados en seguridad alimentaria

MICROORGANISMO PATÓGENOS	MICROORGANISMO SURROGATE
<i>L. monocytogenes</i>	<i>L. innocua</i> ATCC 33090 y M1;
<i>E. coli O157:H7</i>	<i>E. coli</i> K12 y ATCC 25922
<i>Salmonella</i> Enteriditis	<i>E. coli</i> K12, <i>E. faecium</i> NRRL B-2354
<i>Salmonella</i> Typhimurium	<i>Salmonella</i> Typhimurium LT2
<i>Clostridium botulinum</i>	<i>Clostridium sporogenes</i> PA 3679
<i>Bacillus anthracis</i>	<i>B. cereus</i> y <i>B. subtilis</i>

La elección del sustituto debe estar basado en las siguientes características:

- Ausencia de patogenicidad
- Que tengan características de crecimiento/supervivencia similares a las del patógeno objetivo cuando se exponen al mismo alimento (p.e. pH, humedad, temperatura, ...)
- Genéticamente estable para garantizar la reproducibilidad de los resultados independientemente del laboratorio o del momento del experimento
- Susceptibilidad al estrés y al daño similar a la del patógeno objetivo.

Además, es importante seleccionar los microorganismos sustitutos apropiados en función del tipo de estudio (p.ej. validación proceso conservación, tipo de envasado, ...) y del alimento involucrado.

La búsqueda del microorganismo sustituto se puede realizar mediante revisión bibliográfica (por ejemplo, búsqueda de artículos científicos que hagan referencia a este tipo de microorganismos en nuestro alimento) o mediante evaluación empírica (evaluación experimental de diferentes microorganismos no patógenos que se comporten de manera similar al microorganismo de referencia en el alimento). La evaluación empírica es mucho más costosa (tiempo y dinero) y no está al alcance de todos los laboratorios.

El proceso de elecci3n de un determinado microorganismo para la realizaci3n de un test de desaf3o queda resumido en la **Figura 2**.

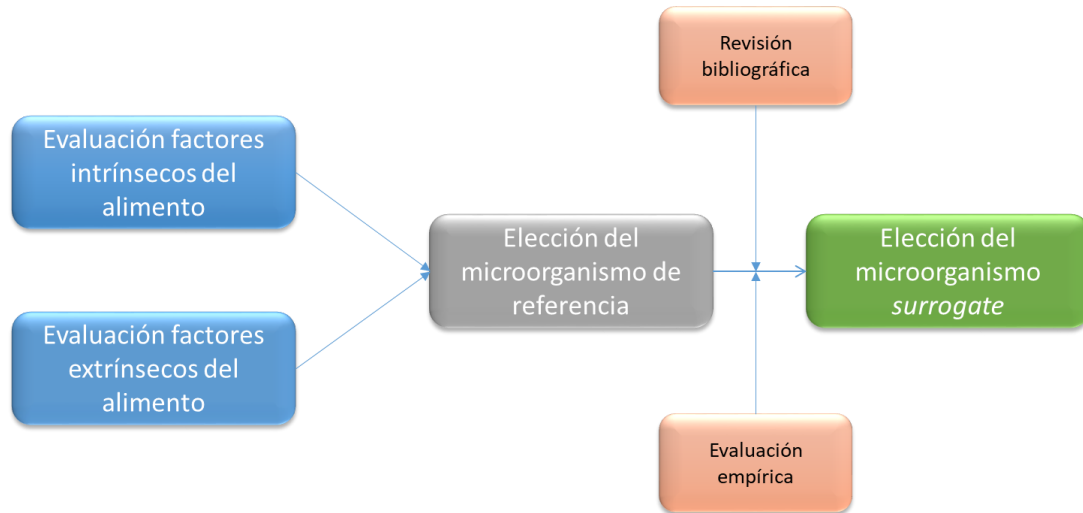


Figura 2. Etapas en la elecci3n de un microorganismo para realizar un test de desaf3o

Caso pr3ctico

Se quiere evaluar la seguridad alimentaria de una conserva de esp3rragos (tratada t3rmicamente tras el envasado) durante su vida 3til. En un principio, 3qu3 microorganismos elegir3as para realizar el estudio? Las caracter3sticas f3sico-qu3micas del esp3rrago: pH 5.0 - 5.6 y $a_w > 0.97$.

En primer lugar, se debe averiguar las caracter3sticas f3sico-qu3micas del alimento y que puedan afectar al crecimiento de los microorganismos. Como se quiere evaluar la seguridad alimentaria del producto, descartar3amos los microorganismos alteradores, centr3ndonos en microorganismos pat3genos. A partir de los valores de pH y actividad de agua del esp3rrago se pod3a utilizar cualquiera de los microorganismos de la Tabla 1. Por tanto, en un principio, las caracter3sticas f3sico-qu3micas (factores intr3nicos) del alimento no nos permite elegir qu3 tipo de microorganismo usar en el estudio. As3 que debemos fijarnos en las condiciones de envasado y almacenamiento (factores extr3nicos). Como es una conserva, habr3 ausencia de ox3geno dentro de ella. Por tanto, debemos buscar aquellos microorganismos que pueden crecer en ese alimento (pH y a_w) en condiciones anaerobias y que resistan tratamientos t3rmicos elevados. Como se observa en la Tabla 2, *Clostridium botulinum* es el microorganismo pat3geno m3s conveniente, ya que puede crecer en condiciones anaerobias y sus esporas pueden resistir tratamientos t3rmicos elevados. Sin embargo, dado que su empleo pod3a suponer un foco de contaminaci3n cruzada en la industria, se propone utilizar el microorganismo sustituto *Clostridium sporogenes* PA 3679 (Tabla 3).

4.2 Inoculación del alimento

Una vez definido el microorganismo de referencia adecuado, comienza la fase de preparación del microorganismo e inoculación del alimento (ver **Figura 3**).

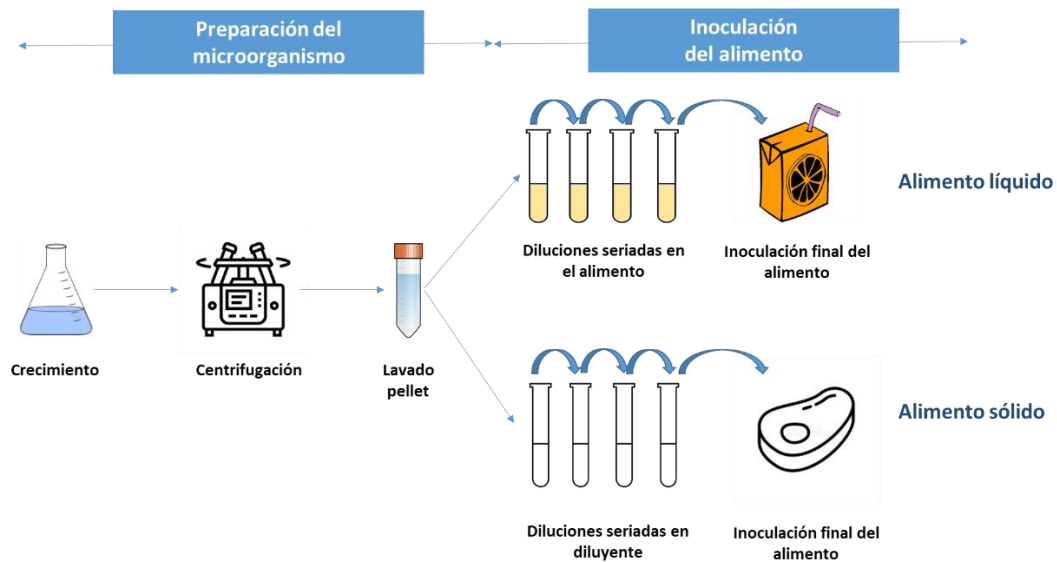


Figura 3. Preparación del microorganismo e inoculación del alimento

La **preparación del inóculo** antes de la inoculación es un paso fundamental en el protocolo del test de desafío. La preparación va a depender del microorganismo y de la naturaleza del alimento. En general, los cultivos se centrifugan y los sedimentos celulares (pellet) se lavan minuciosamente para evitar la transferencia de cualquier compuesto del medio de crecimiento a la matriz alimentaria durante la inoculación (**Figura 3**). Para alimentos líquidos, el pellet lavado se resuspende en un volumen del mismo alimento, y cualquier dilución posterior se realiza en el mismo alimento. La inoculación del producto puede entonces realizarse sin alteración de las características intrínsecas del producto. En el caso de alimentos sólidos, el pellet se resuspende en un diluyente apropiado (p.e. agua peptonada), que será el mismo para realizar las diluciones necesarias. A continuación, la inoculación del producto se lleva a cabo utilizando el mínimo volumen posible de inóculo para garantizar que sus características principales no se vean afectadas.

Un método alternativo de preparación del inóculo implica la recuperación de células microbianas a partir de placas de césped preparadas a partir de cultivos de 24-48 h. Siguiendo este protocolo, las placas de césped se siembran con el microorganismo y se incuban en condiciones óptimas de crecimiento. A continuación, se recuperan las células o esporas, se resuspenden y se diluyen con el diluyente adecuado.



Por otra parte, la **concentración de inóculo** por unidad de peso o volumen de un producto deben ser lo más realista posible y estar ajustadas al propósito del ensayo:

- Si el objetivo de los ensayos es evaluar la seguridad y estabilidad de un producto durante un período específico, entonces las concentraciones iniciales de inóculo deben estar entre 100 y 1000 ufc/g o mL del producto. Concentraciones inferiores a 100 células pueden estar por debajo de los límites de detección en muchas metodologías de muestreo empleadas, lo que supone incorrectamente que el producto es seguro y estable, cuando no lo es.
- El uso de niveles de inóculo superiores a 1000 ufc/g o mL se aplica a aquellos ensayos que buscan determinar reducciones logarítmicas microbianas tras la aplicación de un estrés específico (calentamiento, irradiación, ...). En estos casos, las concentraciones de inóculo pueden llegar hasta 10^8 ufc/g o mL, dependiendo del nivel de reducción logarítmica que se quiere demostrar.

La **elección del método de inoculación** es otro parámetro importante en el diseño de los test de desafío. Una inoculación es correcta si ésta no afecta a ninguna de las propiedades intrínsecas o extrínsecas del producto. Por tanto, se deberían incluir análisis de las características intrínsecas del alimento (pH, a_w , humedad, ...) antes y después de la inoculación. El fin último siempre debe ser usar el mínimo volumen posible de inóculo para minimizar posibles variaciones en las características del producto.

Se debe garantizar una distribución uniforme del inóculo en el alimento que minimice la variabilidad en el muestreo y por tanto del resultado final. Por ejemplo, en alimentos envasados, puede resultar complejo la inoculación del alimento. Una alternativa sería la inoculación del alimento previa al envasado.

La inoculación con volúmenes muy pequeños de inóculo de alimentos líquidos no presenta ningún problema. Para alimentos sólidos, por ejemplo, arroz, una alternativa sería el rociado de este con un aerosol contaminado con el microorganismo de referencia, teniendo las precauciones necesarias.

La elección de en qué **etapa del procesado del alimento** inocular con el microorganismo va a depender del objetivo del test de desafío. Si el objeto es evaluar el efecto de un cambio de las condiciones de tratamiento (variación del tiempo o la temperatura de un tratamiento térmico) o del tipo de tecnología de conservación (por ejemplo, la sustitución de un tratamiento térmico por un tratamiento por pulsos eléctricos de alta intensidad), el alimento se inocularía justo antes del tratamiento y se evaluaría el efecto del tratamiento. Pero si el objetivo es, por ejemplo, evaluar una posible contaminación durante el embolsado de verduras, se inocularía tras el proceso de higienización y antes del envasado y se evaluaría durante su vida útil.



Caso práctico

Se desea demostrar que el proceso de pasterización por altas presiones hidrostáticas de un batido de leche y frutas alcanza 5 ciclos logarítmicos de muerte del patógeno de referencia. El microorganismo es un aislado del propio alimento. Indica en qué etapa del proceso se debería hacer la inoculación, cómo se realizaría la inoculación y la concentración que inocularías inicialmente del mismo.

Recordemos que el procesado por Altas Presiones se realiza en alimentos ya envasados. Por tanto, se realizaría la inoculación del batido justo antes del cierre del envase. Para ello, en un recipiente se inocularía el batido con el microorganismo. Como se quiere comprobar si se alcanza 5 ciclos de inactivación, la concentración del alimento inoculado debería ser superior 10^7 ufc/mL. Para evitar la variación de las características intrínsecas del alimento, las diluciones del inocula previas a la incorporación al alimento, se realizaría con el mismo alimento, en nuestro caso, el batido. Una vez inoculado, se agita el batido para que tenga una concentración uniforme de microorganismo. Llenaríamos las botellas y las someteríamos al tratamiento de presiones hidrostáticas

4.3 Procesado de la muestra

Una vez realizada la inoculación, es necesario continuar con el procesado del alimento en las condiciones habituales. En el caso de que el alimento pueda contener otra flora bacteriana propia además de la inoculada, se recomienda utilizar también un control sin inocular. A partir de este momento, comenzará en sí el test de desafío.

El almacenamiento del producto inoculado durante este tiempo debe simular las condiciones a las que es probable que el producto esté expuesto en condiciones normales de almacenamiento. Se recomienda estudiar condiciones alejadas de las condiciones óptimas porque puede ocurrir que, en ciertas ocasiones, en la vida real, no se cumplan las condiciones óptimas (p.ej. temperatura de frigoríficos de los consumidores).

La **duración de los test de desafío** dependerá del objetivo del test y de la vida útil actual, deseada o prevista del producto. El test debe cubrir todo este período y también incluir un margen más allá de este tiempo para contemplar la posibilidad de que los consumidores almacenen el producto más allá de su vida útil recomendada.



Caso práctico

Especifica dónde realizar la inoculación de un producto cárnico fermentado-curado con el objeto de evaluar un cambio en las condiciones del proceso de curación y cómo realizarías el procesado de la muestra.

Hay que recordar que las etapas principales del procesado de ese tipo de alimento son: picado, amasado, embutido y secado. La inoculación del producto se realizaría durante el amasado/mezclado antes de la embutición. Se tendría que hacer dos fabricaciones, una sin inocular (control) y otra inoculada. El blanco es importante porque, al ser un alimento fermentado, habrá una flora natural que podría distorsionar los resultados. Tras el mezclado, el producto (control e inoculado) se amasará, embutirá y secará.

4.4 Análisis de las muestras e interpretación de resultados

Concluidas las fases anteriores, es hora de analizar la cantidad de microorganismo que ha sobrevivido en el alimento durante todo el periodo de almacenamiento mediante técnicas convencionales de cultivo (ej: recuento en placa). El plan de muestreo dependerá de la duración del ensayo. En los estudios de validación de las condiciones de tratamiento (p.e., pasteurización), el muestreo sería antes y después del tratamiento. Si el estudio incluye el almacenamiento del alimento, el muestreo debe incluir:

- un análisis a tiempo cero, es decir, un análisis inmediatamente después de la inoculación del producto, para verificar los niveles de inóculo y permitir el cálculo de las diferencias logarítmicas en el número de microorganismos durante el almacenamiento.
- dependiendo de si la duración de la prueba de desafío se mide en días, semanas o meses, el plan de muestreo debe cubrir puntos de tiempo representativos durante el almacenamiento. Cuando los productos tienen una vida útil corta medida en días, se requiere el muestreo diario, mientras que una duración más prolongada del ensayo puede requerir el muestreo una o dos veces por semana.
- se requiere un mínimo de cinco a siete puntos en una prueba de desafío para obtener una representación precisa del comportamiento del microorganismo durante el almacenamiento.
- los resultados del análisis de la muestra también se pueden utilizar como indicador de la duración del test. No tiene sentido seguir tomando muestras de un producto cuando los niveles de inóculo ya han alcanzado las 10^8 ufc/g o mL.

La replicación es un factor importante que contribuye a la validez de la prueba. Lo ideal es que se analicen muestras por duplicado o por triplicado en cada punto de muestreo, mientras que se recomienda que la prueba se repita dos o tres veces en pruebas independientes (es decir, realizadas en momentos diferentes, utilizando inóculos frescos e idealmente realizadas por personal diferente) en casos en los que se requiere un alto grado de certeza.



La interpretación de los resultados de una prueba de provocación debe implicar el uso de todos los conjuntos de datos obtenidos (crecimiento microbiano, cambio en las propiedades fisicoquímicas y otras propiedades intrínsecas/extrínsecas del producto, controles positivos y negativo), de modo que se logre una evaluación integral de la seguridad microbiológica del alimento.

Caso práctico

Diseña el plan de muestreo de un test de desafío con Salmonella en un producto cárnico fermentado-curado con el objeto evaluar el proceso de curación.

Tras el procesado (tiempo 0), y posteriormente cada semana, se realizará el control microbiológico y físico-químico (para evaluar si la adición de la *Salmonella* modifica el proceso de fermentación) de cada muestra (blanco e inoculado), al menos, por duplicado hasta el fin del tiempo de secado. Este ensayo (inoculación y secado) se debería realizar por triplicado.

5 Cierre

A lo largo de este objeto de aprendizaje hemos revisado la importancia de realizar un test de desafío para poder garantizar la seguridad alimentaria de una determinada formulación/tratamiento de conservación de alimentos. También se ha definido la metodología para que puedas diseñar tu propio test de desafío para un caso concreto. Además, a través de la resolución de los casos prácticos propuestos has podido verificar si serías capaz de aplicar la metodología propuesta a la resolución de diferentes situaciones que se pueden plantear durante tu actividad académica o profesional. Si has sido capaz de resolverlos, estás totalmente preparado/a para enfrentarte al mundo real. Si no... tendrás que volver a leer (ahora con más calma) el artículo, y consultar la bibliografía complementaria para profundizar más o encontrar más ejemplos.

6 Bibliografía

Hu, M., Gurtler. Selection of Surrogate Bacteria for Use in Food Safety Challenge Studies: A Review. *Journal of Food Protection*, Vol. 80, No. 9, 2017, 1506–1536.

Jay JM. 1996. Modern food microbiology. 5th ed. New York: Chapman & Hall.

Komitopoulou, E. Microbiological challenge testing of foods. *Food and Beverage Stability and Shelf Life*. Woodhead Publishing Series in Food Science, Technology and Nutrition. 2011.

Microbiological Challenge Testing. COMPREHENSIVE REVIEWS IN FOOD SCIENCE AND FOOD SAFETY—Vol. 2 (Supplement), 2003.

Notermans S, Veld P, Wijtzes T, Mead GC. 1993. A user's guide to microbiological challenge testing for ensuring the safety and stability of food products. *Food Microbiol* 10(2):145-57.

Spanu, C., Scarano, C., Ibba, M., Pala, C., Spanu, V., De Santis, E. Microbiological challenge testing for *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat food: a practical approach. *Italian Journal of Food Safety*, Vol. 3, 2014, 4518.