



**Universitat**  
de les Illes Balears

# Prácticas de análisis microbiológico. Saniconsult

Javier Sánchez Ramis

## **Memoria del Trabajo de Fin de Máster**

Máster Universitario en Microbiología avanzada (MMAV)

(Especialidad/itinerario de Control microbiológico)

de la

UNIVERSITAT DE LES ILLES BALEARS

Curso Académico: 2016-17

*Fecha: 13/09/2017*

*Nombre Tutor del Trabajo: Antonio Domenech Sánchez*



# ÍNDICE

1. SANICONSULT . . . . .	4
2. INTRODUCCIÓN GENERAL . . . . .	5
3. CONTROL DE AGUAS . . . . .	5
3.1 <i>Pseudomonas aeruginosa</i> . . . . .	6
3.2 Enterococos . . . . .	9
3.3 Coliformes y <i>E. coli</i> . . . . .	11
3.4 Aerobios a 22 °C . . . . .	13
3.5 <i>Clostridium perfringens</i> . . . . .	14
3.6 <i>Legionella spp</i> . . . . .	16
4. CONTROL DE ALIMENTOS . . . . .	18
4.1 Aerobios mesófilos . . . . .	20
4.2 Enterobacterias lactosa positivas . . . . .	20
4.3 <i>Listeria monocytogenes</i> . . . . .	21
4.4 <i>Escherichia coli</i> . . . . .	23
4.5 <i>Salmonella spp.</i> . . . . .	24
4.6 <i>Staphylococcus aureus</i> . . . . .	26
5. ANALISIS DE SUPERFICIES . . . . .	27
6. DEMOSTRACIÓN ANALÍTICA . . . . .	28
6.1 Introducción . . . . .	28
6.2 Metodología . . . . .	29
6.3 Resultados . . . . .	31
6.4 Discusión . . . . .	33
7. BIBLIOGRAFÍA . . . . .	35

## 1. SANICONSULT

Saniconsult Ibérica S.L es una empresa cuya central se encuentra en las Islas Baleares, con delegaciones en República Dominicana y México. Dispone de infraestructura para el análisis de parámetros químicos y microbiológicos, con el fin de ayudar a sus clientes a cumplir las normativas vigentes en cada caso. El análisis microbiológico en combinación con las técnicas de análisis químicas tienen por tanto el objetivo de llevar un control de calidad adecuado y prevenir la contaminación por parte de patógenos infecciosos.

La empresa se fundó en el año 1984 y actualmente su central se ubica en Palma de Mallorca. Está dirigido por un equipo de doctores y especialistas en biología, microbiología y química. Los profesionales a cargo del laboratorio están además autorizados para ejercer impartiendo cursos especialmente enfocados al mantenimiento de buenas condiciones higiénico-sanitarias, así como cursos especializados en la renovación y actualización de las técnicas empleadas para su control. Para ello, el personal de Saniconsult tiene años de experiencia en la divulgación de buenas prácticas e higiene en el mantenimiento de condiciones adecuadas para aguas y alimentos.

Los principales clientes de Saniconsult son cadenas hoteleras, tours operadores del sector turístico, cruceros, residencias de ancianos, colegios o cualquier empresa del sector alimentario interesado en implantar el sistema de autocontrol APPCC (Análisis de Peligros y Puntos Críticos de Control)

Para certificar el cumplimiento del Sistema de Gestión de Calidad, el laboratorio posee la certificación de cumplimiento de la UNE-EN-ISO-9001:2008 en todos los ámbitos de actividad: Laboratorio, Auditoría/Asesoría y Formación. Dicha normativa es de carácter internacional y general, no es una norma dirigida a un producto si no que puede aplicarse a cualquier sector industrial. La norma tiene como objetivo establecer requisitos esenciales para los Sistemas de Gestión de Calidad.

Por último, cabe destacar que el laboratorio donde se realizaron las prácticas está inscrito en el Registro de Centros, Servicios y Establecimientos Sanitarios de la Conselleria de Salut i Consum del Govern de les Illes Balears. Además de inscrito también en el censo de laboratorios del Ministerio de Sanidad, Servicios Sociales e Igualdad para el análisis de aguas de consumo humano.

## 2. INTRODUCCIÓN GENERAL

Todas las pruebas analíticas realizadas en el periodo de prácticas (20 marzo- 29 junio) se siguieron realizando metodologías reconocidas (ISO, US-EPA, US Standard Methods, etc.). Además, durante la estancia se realizaron con regularidad controles de calidad internos y mediante la conexión con otros laboratorios.

Los principales patógenos analizados en el caso de los alimentos están recogidos en el reglamento europeo 2073/2005 del 15 de noviembre y en la modificación 1441/2007 del 5 de diciembre. También se basa en la legislación parcialmente derogada dispuesta en el BOE por el Real Decreto 3484/2000 del 29 de diciembre y modificada por el 135/2010 del 12 de febrero. Estos son *Listeria monocytogenes*, *Salmonella spp.*, *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*. Además, también se analizaron como organismos indicadores los mesófilos y las enterobacterias. Por otra parte, para el análisis de aguas destinadas al consumo humano se hicieron pruebas de detección de los patógenos *Escherichia coli*, *Clostridium perfringens* y *Enterococcus faecalis*, adaptándose al Real Decreto 140/2003. Como organismos indicadores, también se estudiaron los mesófilos y los coliformes totales. En el caso de aguas con peligro de formación de aerosoles es necesario además el control de *Legionella spp.*, el cual se especifica en el Real Decreto 865/2003. Por último, para las aguas de recreo, los principales microorganismos de control fueron *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa* de acuerdo con la legislación del Real Decreto 742/2013, de 27 de septiembre. Así como también se hizo la determinación de Coliformes totales.

## 3. CONTROL DE AGUAS

Las muestras de agua, así como las de alimentos, son registradas en un sistema integral de gestión de laboratorio o LIMS (QUAASS-LAB®), necesario para la documentación de todas las operaciones realizadas en base a la ISO 9000 de gestión de calidad. La mayoría de estas muestras provienen de la isla pero también de Canarias y Andalucía. Estas últimas vienen refrigeradas y controladas por un registro digital continuo de temperatura (DataLogger), el cual permite saber si la temperatura se ha mantenido de forma óptima bajo los 10°C.

Por un lado, el real decreto 742/2013 establece los criterios necesarios para la calidad del agua de las piscinas y requiere del control de *E. coli* y *P. aeruginosa* en el apartado microbiológico. Además del control de turbidez por la parte química, para la cual cada comunidad autónoma puede decidir los límites permitidos. En las muestras de Baleares, el máximo de turbidez permitido se sitúa sobre los 5 UNF, mientras que en Canarias es de 2

UNF. Otros parámetros físico-químicos se analizaron in situ como son el pH, bromo, cloro libre y combinado, ácido isocianúrico, CO<sub>2</sub> y humedad relativa.

De la misma forma, el agua de consumo viene regulada por el Real Decreto 140/2003, de 7 de febrero, y establece criterios distintos a las aguas de recreo. En este caso, se requiere del control de *Escherichia coli*, coliformes totales, *Clostridium perfringens* (incluidas esporas), enterococos y recuento de aerobios mesófilos a 22°C. Los parámetros químicos a analizar dependerán de la procedencia o el uso del agua, pero generalmente requiere del control de unos niveles establecidos de cobre, hierro y amonio. En algunas ocasiones también se requiere del control de parámetros físico-químicos como conductividad, turbidez y color. Las muestras de agua, una vez analizadas y emitido el resultado, son guardadas 5 semanas, tiempo tras el cual son desechadas.

Por último, existe una regulación especial sobre todas aquellas aguas con posibilidad de formar aerosoles, como son las fuentes naturales, spas, bañeras de hidromasaje etc. Las cuales vienen reguladas por el Real Decreto 865/2003 y requieren del control de *Legionella spp.*

### 3.1 *Pseudomonas aeruginosa*

#### *Marco teórico*

*Pseudomonas aeruginosa* es una bacteria aerobia estricta gram negativa, móvil por la presencia de uno o más flagelos polares, oxidasa-positiva y catalasa-positiva (Gustafson *et al.*, 1983). Es un patógeno oportunista cuyo genoma es mucho más grande que el de otros patógenos secuenciados hasta la fecha, con 6,3 millones de pares de bases. El tamaño y la complejidad del genoma posiblemente sea uno de los motivos por los cuales la bacteria presenta una buena adaptabilidad ambiental, pudiendo encontrar dicha bacteria de forma ubicua (Stover *et al.*, 2000). Además, posee una gran diversidad de genes relacionados con el catabolismo, transporte, y eflujo de compuestos orgánicos, siendo capaz de mostrar resistencia contra antibióticos y desinfectantes. Otra característica de *P. aeruginosa* es la capacidad de formación de biofilms, que le permite aún más aumentar su resistencia frente a desinfectantes (Stover *et al.*, 2000).

Por norma general, el control de este microorganismo es importante debido a la presencia en aguas naturales y la potencial presencia en las aguas de consumo o de recreo. Se encuentra frecuentemente en jacuzzis y bañeras de hidromasaje en concentraciones elevadas, en cuyo

caso la ventilación y las altas temperaturas favorecen la proliferación. Cabe destacar que la bacteria es capaz de sobrevivir en entornos pobres de nutrientes e incluso en agua destilada (Favero *et al.*,1971).

La bacteria es responsable de infecciones leves en individuos inmunocompetentes pero también de problemas serios de infección en ambientes hospitalarios o sujetos inmunocomprometidos, a menudo afectados por cepas multirresistentes a antibióticos. Las infecciones causadas pueden ser cutáneas, endocarditis, neumonía, meningitis, foliculitis, otitis del oído externo e infecciones del tracto urinario. Además, existe la posibilidad de actuar como patógeno sobre pacientes de fibrosis quística, donde la formación de biofilms puede llevar a la muerte (Mena, 2009). Por todo lo anterior, no es de extrañar que *P. aeruginosa* tenga un papel importante en el control de aguas. Los procesos de desinfección a menudo no funcionan con la misma eficacia que con otros patógenos presentes en el agua.

Las condiciones a cumplimentar en muestras de agua por lo que se refiere a *Pseudomonas aeruginosa* se recogen en el Boletín Oficial del Estado y viene regulado según el Real Decreto 742/2013 para aguas de recreo. Según la normativa se establece que las aguas deben estar exentas de *P. aeruginosa*, estableciendo por tanto la obligación de ausencia de la bacteria en 100mL de muestra.

### *Aspectos prácticos*

Una opción común para la detección de *P. aeruginosa* es el cumplimiento de la ISO 16266:2008. Para ello, se recomienda filtrar 100 mL de agua a través de membranas de 0,45 µm. Tras esto, se deposita la membrana sobre agar *Pseudomonas* CN y se incuba a 37°C durante 24 horas. Tras la incubación, todas aquellas colonias de color azul-verdoso se toman como presuntas *P. aeruginosa*. Para la confirmación, se toman las colonias presuntivas y se incuba de nuevo 24 horas a 37°C en 5mL de caldo de acetamida para comprobar la producción de amoniaco. Al día siguiente, se puede añadir unas gotas de reactivo de Nessler, tras lo cual se puede ver la formación un precipitado que va desde amarillo a tonos rojos oscuros.

En todo el proceso requerido por la ISO 16266:2008 se requiere más de un día para la identificación y confirmación de *Pseudomonas aeruginosa*. Para hacer frente a la gran cantidad de muestras provenientes de piscinas en el laboratorio de Saniconsult y reducir el tiempo de manipulación de cada muestra, se emplea un método alternativo verificado por la ISO 17994:2014 basado en la técnica de NMP. Esta normativa establece los requisitos para la comparación de dos métodos cuantitativos. El uso del método alternativo está apoyado a su vez en estudios de comparación de ambos métodos (Sartory *et al.*, 2015).

El método basado en la utilización de Pseudalert® provee resultados más rápidos (24h) sin necesidad de confirmación. En este caso, durante las prácticas, se realizó la detección de *P. aeruginosa* mediante el reactivo Pseudalert® en combinación con bandejas Quanti-Tray® que aseguran mediante la reglamentación de calidad recogida en la ISO 11133:2014 que la muestra está exenta de *P. aeruginosa* y estima unos resultados fiables de cuantificación de esta bacteria en la muestra.

Para cumplir con el método de detección de *P. aeruginosa* con el método alternativo se toman 100mL de muestra en un recipiente con tiosulfato de sodio en el punto de recogida, con el fin de neutralizar los efectos de los desinfectantes, cloro o bromo. Una vez en el laboratorio, simplemente se añade el contenido de una cápsula de reactivo Pseudalert® (**Figura 1**) junto con dos gotas de solución antiespumante y se agita de modo que quede completamente disuelto en los 100mL de agua. Cuando el reactivo está completamente disuelto, se puede verter la solución en una bandeja Quanti-tray® de 51 pocillos y se sella mediante un sellador automático. Finalmente, se incuban las muestras a  $38^{\circ}\text{C} \pm 0.5^{\circ}\text{C}$  durante 24 horas.



**Figura 1.-** Cápsulas de reactivo Pseudalert® para la utilización en base a 100mL de muestra.

Cabe destacar que existen dos alternativas en la elección de las bandejas Quanti-tray®. Existen las bandejas Quanti-tray® y las bandejas Quanti-tray / 2000®. La diferencia es que las primeras están preparadas para resultados de concentración relativamente bajos (200 UFC/100mL) mientras que las Quanti-tray / 2000® están preparadas para concentraciones más altas (2419 UFC/100mL). Las bandejas para concentraciones más bajas constan de 51 pocillos mientras que las bandejas para concentraciones altas disponen de 41 pocillos además de 48 adicionales más pequeños. Las bandejas para concentraciones bajas son las que se emplean siempre por defecto para la valoración de *Pseudomonas aeruginosa*.

Para realizar las lecturas se toma la bandeja Quanti-tray® y se dispone en una cabina que proporciona un ambiente oscuro y con una fuente de luz ultravioleta (UV) incorporada, de 6 vatios y 365 nm. Se toma como positivo cualquier pocillo que presente fluorescencia tras la exposición a la luz UV. Si algún pocillo no tiene una fluorescencia clara, se puede incubar otras 4 horas tras las cuales el resultado suele ser mucho más claro. La intensidad de la



fluorescencia en ningún caso refleja la concentración de la muestra aunque las muestras con grandes concentraciones de magnesio o calcio pueden dar una fluorescencia blanquecina. A la hora de leer los resultados, las tablas de referencia varían según el tipo de bandeja utilizada, permitiendo la cuantificación en base al número de pocillos positivos.

Cabe destacar el buen uso del método por parte del personal del laboratorio, pues cada día se comprueba el volumen de muestras y la hora estimada de llegada al laboratorio, con el objetivo final de procesar todas las muestras en un periodo corto de tiempo y abrir la estufa de incubación el mínimo número de veces para evitar interferencias. Por otra parte, una estufa de incubación dedicada exclusivamente a la detección de *Pseudomonas aeruginosa* provee al laboratorio la capacidad de interferir de manera mínima en la incubación de las muestras. Este punto es crítico debido a que la especificidad del método se basa en gran medida de la temperatura de incubación.

### 3.2 Enterococos intestinales

#### *Marco teórico*

Los enterococos son bacterias Gram positivas. Forman parte de la flora intestinal humana y animal aunque también se pueden encontrar en el suelo. Son buenos indicadores de contaminación fecal por su capacidad de supervivencia ante condiciones o situaciones donde los coliformes no sobreviven con facilidad. Siendo los enterococos indicadores de contaminación fecal no necesariamente reciente.

Los parámetros a seguir en los niveles de este grupo de bacterias vienen recogidos en varios decretos, pues han de ser examinados en distintas condiciones y para distintas clases de aguas. Por un lado, el Real Decreto 1341/2007, de 11 de octubre, regula la gestión de calidad de las aguas de baño como son las playas, donde los enterococos junto con la presencia de *E. coli* determinan la calidad del agua. Por otro lado, en el laboratorio se controla también el parámetro para aguas de consumo (Real Decreto 140/2003 de 7 de febrero).

Para aguas de consumo, las aguas deben estar exentas de enterococos, permitiendo 0 UFC en 100 mL de muestra. Para aguas de baño, se estipulan niveles de calidad del agua en base a los niveles de enterococos y *E. coli*. Que permiten diferenciar entre distintas calidades de agua, catalogadas como «insuficiente», «suficiente», «buena» o «excelente».

### Aspectos prácticos

Existen diferentes posibilidades para determinar la concentración de enterococos en muestras de agua. El método de filtración por membrana es el más empleado (ISO 7899-2) y dentro de la misma normativa se establece otro posible método de detección mediante la técnica de NMP (ISO 7899-1).

Para el análisis mediante el método de filtración por membrana se utilizan placas de Slanetz Bartley. Este medio inhibe el crecimiento de las bacterias gram negativas por la presencia de azida sódica. Esta sustancia es tóxica y mutagénica, por lo tanto, es peligrosa la inhalación de gases producidos durante la preparación del medio. El medio también contiene TTC (cloruro de trifeniltetrazolio) que se reduce a formazán, un compuesto rojizo que permite detectar a los enterococos. Existe otra metodología por NMP que sigue la ISO 7899: 1-2001, pero requiere también de 48h de incubación. Esta última metodología emplea el medio RHOTE y requiere de confirmación mediante el medio LITSKY.

El método de análisis empleado por Saniconsult es muy similar al utilizado para *Pseudomonas aeruginosa*, basado en un análisis por NMP en medio líquido. Se utiliza de nuevo una bandeja Quanti-tray® que se sella una vez introducidos 100mL de muestra con el reactivo Enterolert®. Este método facilita mucho la labor de análisis puesto que no requiere de medios en placa y el proceso es más corto que por otros medios descritos por la ISO 7899, requiriendo de una incubación de 24 horas respecto a las 48 que requiere el método de filtración por membrana habitual.

Existen dos reactivos para las dos diferentes fuentes de muestras en las que hay necesidad de detectar enterococos, uno para agua de mar y otro para aguas de consumo provenientes de captaciones. Para el uso de ambos reactivos, el proceso es el mismo que para *Pseudomonas aeruginosa*, aunque los resultados deben ser leídos de forma distinta.

En el caso del reactivo empleado para aguas de consumo, se toma como positivo cualquier pocillo con un cambio de color que se produce desde el azul inicial hasta un verde claro. Para agua de mar, se requiere de una fuente de luz UV para detectar fluorescencia, siendo positivos los pocillos donde se presenta fluorescencia por la presencia de enterococos intestinales. El reactivo Enterolert® usa un nutriente indicador que se vuelve fluorescente durante su metabolización. El reactivo se basa en la acción de la  $\beta$ -glucosidasa, que rompe el enlace entre moléculas de  $\beta$ -D-glucósido con 4-metil-umbeliferil (no fluorescente) para la liberación de una partícula fluorescente 4-metil-umbeliferona.

Normalmente, se esperan recuentos altos de enterococos en aguas provenientes de captaciones, con lo cual, directamente se hace uso de las bandejas de Quanti-tray 2000®.

### 3.3 Coliformes totales y *Escherichia coli*

#### Marco teórico

Los coliformes son un grupo de bacterias pertenecientes a la familia *Enterobacteriaceae*. Son gram negativas, no formadoras de esporas. Son bacterias aerobias y facultativas con forma bacilar. Destacan por fermentar lactosa con producción de ácido y gas cuando son incubados 48h a 35 °C. Son útiles como organismo indicador de posibles patógenos.

Las cepas de *E. coli* suelen ser lactosa e indol positivas, aunque algunas no fermentan rápidamente la lactosa, necesitando más tiempo de incubación. Hay una gran diversidad de cepas no patógenas y generalmente incapaces de causar una infección dañina excepto en algunos casos de inmunodepresión. Por otra parte, existen cepas que pueden afectar seriamente la salud si están presentes tanto en alimentos como en aguas de consumo. Existen cepas patógenas que producen diarrea en seres humanos y animales, aunque hay otras que son capaces de producir una toxina denominada Shiga que puede afectar a otras partes del cuerpo. Aquellas cepas patógenas extraintestinales pueden llegar a causar infecciones del tracto urinario e incluso casos de meningitis en niños.

Debido a todo lo anterior, el análisis de calidad del agua exige la ausencia de coliformes en aguas de consumo según el Real Decreto 140/2003, de 7 de febrero. Para piscinas de uso público se requiere de la ausencia de *E. coli* en 100mL de muestra según el Real decreto 742/2003, aunque no se especifica la concentración de coliformes para la determinación de la calidad. Por último, para aguas de baño como playas o zonas costeras superficiales se requiere baja presencia de *E. coli*, según el Real Decreto 1341/2007. Como ya se ha explicado, la concentración de esta bacteria junto con la de enterococos es lo que se emplea para determinar la calidad del agua de las playas.

#### Aspectos prácticos

En este caso se emplea el reactivo Colilert® en combinación con bandejas simples Quanti-tray®. El mismo reactivo permite realizar las pruebas sobre aguas de consumo, piscinas y agua de mar. Es un método simple que nos permite fácilmente y en una sola bandeja determinar por el método del NMP la concentración tanto de coliformes totales como de *E. coli*. El funcionamiento de este reactivo se basa en el uso de dos nutrientes indicadores como fuentes de carbono. Por un lado el nutriente ONPG (orto-nitrofenilgalactopiranosido) sirve para la detección de coliformes por la metabolización de la enzima  $\beta$ -galactosidasa y por otro lado

MUG (4-metilumbiferil- $\beta$ -D-glucorónico) que será metabolizado por la enzima  $\beta$ -glucoronidasa presente únicamente en *E.coli*.

De este modo, los coliformes metabolizarán ONPG cambiando la coloración del medio de cada pocillo de incolora a amarillenta. Si en el pocillo hay presencia de *E.coli*, esta bacteria utilizará la enzima  $\beta$ -glucoronidasa para metabolizar MUG lo que producirá fluorescencia. El resto de bacterias, al carecer de estas enzimas, no posee una fuente de carbono para multiplicarse y no puede interferir en el proceso.

La metodología descrita sigue la normativa vigente como método alternativo de la UNE-EN ISO 9308-3:2008 para la detección de coliformes y *E. coli* por el método del NMP. Además de este método, existen muchas opciones a la hora de determinar la concentración de coliformes y *E. coli*. Una de estas opciones es el seguimiento del medio citado en la directiva ISO 9308-1 mediante el uso del agar Chapman TTC, basado en la filtración por membranas de 0,45  $\mu$ m. Para ello, se utiliza la capacidad de fermentar lactosa lo cual produce un viraje del medio de verde a amarillo por la formación de ácido. Este método, requiere de confirmación mediante pruebas de indol y oxidasa, siendo por lo tanto coliformes todas aquellas colonias características oxidasa negativas y *E. coli* todas aquellas que además sean positivas en la prueba de indol.

Actualmente, otra opción común es el uso de un agar cromogénico en lugar del mencionado anteriormente, para ello, se realiza una filtración por membrana de la misma forma, colocando la membrana sobre una placa de CCA. Este medio se basa también en el uso de las enzimas  $\beta$ -glucoronidasa y  $\beta$ -galactosidasa, de manera que todos los coliformes presentarán un color rosa o rojizo por el uso de la enzima  $\beta$ -galactosidasa. Si además poseen la enzima  $\beta$ -glucoronidasa, el medio cromogénico dará un color azulado a la colonia resultando en colonias de color violeta. Por último, la confirmación de *E. coli* se dará gracias a que el medio está provisto de una pequeña cantidad de triptófano, que permite la verificación por la producción de indol al usar el reactivo de Kovacs, que producirá un viraje a un rojo cereza de las colonias de *E. coli*. Esta metodología requiere de 24h de incubación a 37°C y por lo tanto, tanto en funcionamiento como volumen de trabajo, no difiere demasiado del uso del reactivo Colilert®.

En la imagen (**figura 2**), se puede ver el viraje de color al amarillo correspondientes a pocillos con presencia de coliformes. Si sometemos la bandeja a luz UV, podemos ver que los pocillos que emiten fluorescencia serán aquellos donde hay presencia de *E. coli*.



**Figura 2.-** A la izquierda, los resultados obtenidos de una muestra de agua de recreo sin fluorescencia. A la derecha, los mismos resultados sometidos a luz UV.

### 3.4 Control de Aerobios a 22 °C

#### *Marco teórico*

El límite de este parámetro indicador de la calidad del agua es de 100 UFC/mL, tanto en la estación de tratamiento de agua potable (ETAP) como en la red de distribución, donde no se deberían apreciar cambios anómalos. No es indicador de presencia de microorganismos patógenos, pero sirve como indicador del tratamiento y desinfección del agua. Este parámetro no es necesario en caso de aguas de recreo, al tratarse solamente de un parámetro obligado para aguas de consumo, su normativa se recoge en el Real Decreto 140/2003, de 7 de febrero.

#### *Aspectos prácticos*

Para el análisis, se emplea la normativa UNE EN ISO 6222:1999. Para ello, se hacen diluciones seriadas sobre placas de agar PCA. Como el método de siembra es en profundidad, se marca en las placas dilución directa,  $10^{-1}$  y  $10^{-2}$ . En la directa sembramos 1 mL de muestra, en la dilución  $10^{-1}$  sembramos 100  $\mu$ L y en la dilución  $10^{-2}$  sembramos 10  $\mu$ L. Las placas, una vez solidificado el agar, se invierten y se incuban a 22°C durante tres días. Para el recuento se cuentan todas las colonias, sean del color que sean, y se realiza una media para poder expresar los resultados en UFC/mL.

### 3.5 *Clostridium perfringens*

#### Marco teórico

*Clostridium perfringens* es un bacilo gram positivo con capacidad de formar esporas y sin capacidad de movimiento, está presente en ambientes como el intestino de humanos y animales (Bruce, 2003). Es anaerobio puesto que no crecen colonias visibles en placas de agar incubadas en condiciones aerobias, no obstante, *C. perfringens* es más aerotolerante que la mayoría de anaerobios. Puede crecer con tan sólo una pequeña reducción del potencial de oxidación-reducción (McClane, 2003). Otra característica a destacar de *C. perfringens* es la capacidad de soportar altas temperaturas, presentando un crecimiento óptimo entre 43 y 45°C pero siendo capaz de crecer a temperaturas superiores a los 50°. Por otro lado, las esporas son resistentes al calor, a los procesos de desinfección y a los tratamientos de cloración de las aguas (Sartory *et al.*,1998). Todo ello hace de la bacteria un buen indicador de la eficiencia de los sistemas de tratamiento del agua.

Otro motivo por el cual es necesario un control de *C. perfringens* es debido a la capacidad de producción de enterotoxina. La enterotoxina actúa a nivel de los receptores de membrana del intestino delgado alterando la permeabilidad de los canales de calcio y provocando una pérdida masiva de iones y metabolitos. Todo ello provoca un cuadro de diarreas y dolores abdominales, los cuales generalmente tardan menos de un día en desaparecer (Sartory *et al.*,1998).

La normativa para el control de *C. perfringens* viene declarada por el Real decreto 314/2016, de 29 de julio y modifica el real decreto 140/2003 de 7 de febrero. El Real Decreto establece que las aguas deben estar exentas de *C. perfringens*.

#### Aspectos prácticos

El proceso de detección de *C. perfringens* en el laboratorio sigue la ISO 14189:2013 mediante la técnica de filtración en membrana. Para ello, se emplea actualmente el medio TSC (triptosa sulfito cicloserina egg yolk free). Este medio incorpora metabisulfito de sodio y citrato de amonio férrico como indicador de la reducción de sulfito, lo que producirá colonias negras u oscuras en el caso de las colonias de *C. perfringens* y otros clostridios sulfito reductores. También contiene cicloserina, que es un agente inhibitorio, extramadamente selectivo contra anaerobios facultativos (Sartory 1986).

En este caso, en el punto de recogida se toman 100 mL en recipientes que contienen tiosulfato. Una vez en el laboratorio se filtran los 100 mL en una membrana de 0,45 µm y se

deposita mediante unas pinzas estériles sobre una placa de agar TSC con cuidado de no formar burbujas bajo la membrana, lo cual podría proveer oxígeno a las colonias. En estas placas se añade de nuevo agar TSC a  $45 \pm 1^\circ\text{C}$  sobre la membrana hasta dejarla totalmente cubierta. Para evitar el desplazamiento del agar una vez depositado, el protocolo del laboratorio implica dejar las muestras fuera de la estufa unos 10-15 minutos para que el agar solidifique antes de incubarlo. Para la incubación, se depositan las placas en la estufa dentro de una caja de plástico herméticamente cerrada y con un sobre de creación de ambiente anaerobio, a una temperatura de  $44^\circ\text{C}$  y durante 24 horas

Finalmente, al día siguiente al realizar las lecturas, se cuentan las colonias que presentan un aspecto negro por la reducción de sulfito y estas colonias se toman como presuntas *C. perfringens*. Al tratarse de muestras que deberían estar exentas de *C. perfringens*, si el valor de UFC/mL obtenido es muy alto, no se realiza confirmación, lo cual es un punto débil en la identificación del organismo, pues muchos otros clostridios pueden crecer en dicho medio. En caso de obtener placas con muchas colonias, simplemente se alerta al cliente para que tome las medidas de higiene oportunas y se vuelven a tomar muestras pasados 15 días a partir de la corrección.

El laboratorio por lo tanto emplea actualmente el medio TSC sin yema de huevo (egg yolk free), aunque hasta hace poco se empleaba el agar m-CP para la detección de *C. perfringens* en aguas de consumo. El medio se cambió recientemente debido a la regulación de la ISO y los resultados, a menudo con recuperaciones más bajas en comparación con las opciones que ofrece el medio TSC. Otra opción que cabe valorar es el uso de TSC con yema de huevo, un medio por lo tanto muy similar al TSC que se emplea en el laboratorio. El motivo de la elección es que la presencia de yema de huevo en el medio de TSC aumenta la recuperación de otros miembros del género *Clostridium*, como son *C. celatum*, *C. ghoni*, *C. perenne*, *C. sphenoides* y *C. novyi*. En el medio TSC sin yema de huevo *C. celatum* también puede crecer pero lo hace muy pobremente a  $45^\circ\text{C}$ . De este modo, se recomienda el uso de TSC egg yolk free por su especificidad y por ser más barato que el m-CP, además de consumir menos tiempo de manipulación (Watkins et al., 2015).

El m-CP por otra parte es mucho más selectivo, contiene también cicloserina y polimixina B y además incorpora confirmación. Diferencia *C. perfringens* de otros miembros del género por la fermentación de sacarosa, la falta de beta-D-glucosidasa y la producción de ácido fosfatasa. La expresión de ácido fosfatasa es altamente característica de *C. perfringens* sobre otras especies sulfitorreductoras del género *Clostridium* y fue añadido dentro de la prueba confirmativa en el año 2013 en la ISO 14189:2013 (Watkins et al., 2015). Un método común es hacer las confirmaciones utilizando la expresión de ácido fosfatasa a partir de las placas

de TSC, aunque para ello, se requiere de un pase a un medio no selectivo de enriquecimiento con el fin de recuperar las colonias. De no hacerse el paso anterior, las colonias negras podrían dar como resultado un falso positivo en el test de expresión de ácido fosfatasa.

En el medio TSC empleado, si se requiere, también se puede realizar la confirmación de *C. perfringens* en medio Buffered motility nitrate (MN) y lactosa gelatina (LG). El test por lo tanto consta de 2 tubos y 4 pruebas (motilidad, reducción de nitrato, fermentación de lactosa y licuefacción de gelatina). Las colonias confirmadas de *C. perfringens* serán MNLG= - + + +.

### 3.6 *Legionella spp.*

#### Marco teórico

*Legionella spp.* es un género de bacterias gram negativo, aerobio e incapaz de formar esporas. El control sobre esta bacteria es crucial debido a su potencial patogénesis, en especial por la especie *Legionella pneumophila* (Mcdade, 1977).

El mecanismo de transmisión de *Legionella pneumophila* es siempre por vía respiratoria a través de inhalación de aerosoles de aguas contaminadas. Esta bacteria es el agente causal de la fiebre de Pontiac y la enfermedad del legionario, que cursa con un cuadro grave de neumonía. Es un patógeno potencial intracelular, normalmente de hábitats acuáticos como lagos o estanques, aunque también puede colonizar sistemas de abastecimiento de aguas u otros sistemas que requieren de agua para su funcionamiento como son las torres de refrigeración (Linares-Rodríguez, 2005). Si no se sigue un mantenimiento en este tipo de ambientes, debido al estancamiento del agua se puede acumular materia orgánica y nutrientes. En estos ambientes se espera la proliferación de amebas y esto último servir de huésped para *Legionella pneumophila*, que proliferará hasta alcanzar concentraciones suficientes para infectar al ser humano. La bacteria es capaz de evitar la fusión del fagolisosoma y se replica dentro de los macrófagos alveolares y las células epiteliales (Linares-Rodríguez, 2005)

La enfermedad del legionario puede ser difícil de diagnosticar puesto que presenta unos síntomas muy similares a otros tipos de neumonía como son fiebre, dolor de cabeza, tos y dolor muscular. Por otra parte, *Legionella pneumophila* no siempre provoca cuadros de neumonía tan graves sino que normalmente afecta causando otra enfermedad, la Fiebre de



Pontiac, una infección leve que produce dolor muscular y fiebre, sin neumonía asociada y con una duración inferior a una semana (Mcdade, 1977)

La regulación sobre *Legionella spp.* viene recogida en el BOE por el Real Decreto 865/2003, donde se estipula un límite de 100 UFC/L para todos los sistemas con peligro de formación de aerosoles y para cualquier miembro del género. Una de las características más notables de *L. pneumophila* sobre el resto de miembros del género es su requerimiento de L-cisteína para el crecimiento, característica que se aprovecha para el aislamiento primario.

### *Aspectos prácticos*

Para la toma de muestras, se toma 1L de muestra de agua y se inactivan los biocidas con tiosulfato de sodio. Si se encuentra algún punto interesante en el sistema donde pueda haber formación de biofilms, se toma una muestra utilizando un hisopo y este se incluye dentro del recipiente con 1L de muestra.

Normalmente, debido al volumen recibido de este tipo de muestras al laboratorio, el proceso de análisis se hace antes de 24 horas después de la llegada de la muestra al laboratorio, pero no siempre es posible. Por ello, el protocolo requerido para el cumplimiento del Real Decreto, estipula un límite de 48 horas entre la toma de la muestra y su procesamiento.

A partir de aquí, siempre que el cliente no solicite un análisis por QPCR, se inicia el proceso de análisis mediante la normativa ISO 11731:2008. La normativa se divide en dos partes según el tipo de muestra a analizar. La primera parte (11731-1:2008) se utiliza para aguas tratadas y no tratadas, y permite cuantificar la concentración de la muestra sin importar la flora acompañante que pueda haber en la muestra. Las condiciones para poder aplicar la parte 2 de la ISO, que no requiere de tratamiento térmico, es que las muestras contengan una baja concentración de flora acompañante y *Legionella*. Debido a que se trata de aguas tratadas (grifo, ducha, piscinas, jacuzzis, etc.) se asume que la muestra no debería tener tanta flora acompañante como para aplicar la normativa ISO 11731-1:2008.

El procedimiento de aislamiento de *Legionella pneumophila* empieza con la obtención de 2mL de muestra directamente del recipiente para posteriormente sembrar sobre BCYE. Por otro lado, se filtra el litro de muestra sobre unas membranas de 0,45 µm, tras lo cual con unas pinzas estériles se introduce la membrana en tubos cónicos con 20 mL de agua desionizada previamente autoclavada. Después, las distintas muestras son sometidas a unos 3 minutos

en sonicador con el objetivo de desprender las bacterias de la membrana filtrada. Tras este proceso, las muestras son guardadas en un refrigerador a 4°C a la espera de siembra.

Cuando se tiene un volumen de 6 o 13 muestras de *Legionella* se realiza el sembrado. Para ello, se siembra 1 mL de muestra sin filtrar en agar BCYE y por otro lado 0,5mL de muestra filtrada en GVPC y 0,1mL en GVPC. Este último siendo tratado 5 minutos con ácido (pH 2.2 ±0.1). Tras esto, se incuba en ambiente capnófilo a 37°C, creado con sobres de producción de CO<sub>2</sub> en cajas de plástico herméticas.

Las muestras se incuban durante 10 días realizando 3 revisiones para ver si hay colonias sospechosas, que aparecen con coloración azulada o pálida y a menudo se quedan pegadas si se tocan con el asa de siembra. Si tenemos colonias sospechosas, se realiza un pase a placas BCY sin L-cisteína en su composición. Si crece en BCYE pero no crece en BCY se confirmaría que se trata del género *Legionella*. El medio ácido sirve de orientación debido a que *Legionella* es resistente al ácido, y aquellas colonias sospechosas deberían verse en las placas con colonias sometidas a este tratamiento.

Por último se realiza un serotipado de las colonias positivas mediante la aglutinación en látex. *Legionella pneumophila* tiene 14 serogrupos, de los cuales el primero es con el que se asocia más patogenicidad y más casos de enfermedad. Los otros serotipos (2-14) también pueden causarla, pero es mucho más raro. (Yu, 2002). La prueba de aglutinación en látex se basa en partículas de látex azul sensibilizadas con anticuerpo de conejo reactivo a antígenos específicos de los distintos grupos de *Legionella*. En el laboratorio se empleó el *Legionella Latex Test* de Thermofisher, que permite distinguir entre el primer serotipo y los otros 13.

#### **4. CONTROL DE ALIMENTOS**

El procesamiento de las muestras de alimentos tiene varias etapas en común para los distintos parámetros microbiológicos, puesto que la muestra debe ser homogeneizada. Para ello, primero se prepara la balanza incorporada en el diluidor automático (BabyGravimat®) y se comprueba mediante una pesa de peso conocido la estabilidad del aparato. Posteriormente, al diluidor se le acoplan las bolsas de agua de peptona tamponada y de Caldo Fraser.

Generalmente, se siguen tres líneas de procesamiento:

**-Agua de peptona tamponada (TPW):** Se prepara una dilución 1/10 obteniendo un total de 100mL de muestra. Sobre esta dilución se hacen las siembras posteriores de aerobios mesófilos, enterobacterias, *E. coli* y *S. aureus*

**-Caldo Fraser:** Se prepara una dilución 1/10 obteniendo un total de 250mL de muestra (225g de Caldo Fraser y 25g de muestra). Este medio se emplea como enriquecimiento de *Listeria*.

**-One broth Salmonella:** Se prepara la dilución 1/10 obteniendo un total de 250mL de muestra y en este caso se emplea como enriquecimiento de *Salmonella*.

El diluidor automático emplea una bolsa estéril donde se depositan los gramos de muestra necesarios y donde se genera la dilución. Después, la dilución en la bolsa es sometida a homogeneización mediante Stomacher. Con la homogeneización completada se puede sembrar en las placas correspondientes a cada determinación.

Teniendo en cuenta que sembramos en profundidad en la mayoría de casos, 1 mL de la bolsa estéril de dilución 1/10 sería la dilución  $10^{-1}$ . Si queremos hacer diluciones a partir de esta, deberemos pipetear 1mL en un tubo de peptona de 9mL previamente preparados y autoclavados. Con tal de ahorrar algo de material y facilitar el trabajo se siembran de forma que la dilución -1 viene de la dilución madre, la dilución -2 se prepararía con 0,1 mL de la misma dilución madre. Para más diluciones sí que haría falta utilizar otro tubo de peptona, con el cual podríamos sembrar hasta la dilución -4.

Algo a tener en cuenta, es que la existencia de una enorme variedad de alimentos exige de una documentación y unos parámetros microbiológicos de control que vienen regulados por distintos Reales Decretos en el Boletín Oficial del Estado. Por lo tanto, cada tipo de alimento requiere de un control específico que vendrá dado por los posibles patógenos que pueden influir en la salud humana. De forma general, el Real Decreto 2073/2005 del 15 de noviembre sienta las bases del análisis, cuyo anexo se encuentra modificado por el 1441/2007 del 5 de diciembre. También se basa en la legislación dispuesta en el BOE por el Real Decreto 135/2010 que deroga parcialmente a la 3483/2000 del 29 de diciembre. Una vez analizadas las muestras, se guardan en cámara a 4°C durante 2 semanas, tiempo tras el cual se desechan en contenedores de residuos.

## 4.1 Aerobios mesófilos

### Marco teórico

Dado que todos los patógenos presentes en alimentos son mesófilos, el análisis de este parámetro nos puede indicar una posible presencia de los mismos. Este parámetro permite también juzgar la calidad y funcionamiento general del establecimiento del cual procede el autocontrol, pudiendo alertar de posibles fallos en el proceso de elaboración sin necesidad directa de detección de un patógeno.

### Aspectos prácticos

La siembra de aerobios se realiza en profundidad en placas de 90mm con unos 12-15mL de agar PCA. Para ello generalmente se preparan las diluciones  $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$  y  $10^{-3}$  aunque para frutas, ensaladas y zumos se requiere de la preparación de una dilución  $10^{-4}$  y no se realiza la dilución  $10^{-1}$ . Esto es debido a que en este tipo de alimentos sin cocción previa, se espera una mayor carga de aerobios. Una vez realizada la siembra, se incuban de forma invertida las placas a 30°C durante 48h.

La metodología empleada sigue la normativa de la ISO 4833:2014 para recuento de microorganismos aerobios mesófilos en alimentos. Las diluciones seriadas, por otra parte, se realizan acorde a la ISO 6887-1:2017, normativa que regula la preparación de muestras de ensayo, suspensión inicial y diluciones decimales para el examen microbiológico.

Tras las 24h de incubación las placas se leen teniendo en cuenta aquellas diluciones que presentan entre 30 y 300 UFC. Las colonias deberían presentar un aspecto de color pálido o crema, aunque pueden tener algunos tonos más rojizos.

## 4.2 Enterobacterias lactosa positivas

### Marco teórico

El grupo Coli-aerogenes o Enterobacteriaceae lactosa positivos son bacterias capaces de fermentar lactosa con producción de ácido y gas en un periodo de 48 horas a una temperatura de entre 30 y 37 °C. Son bacilos gram negativos, aerobios y anaerobios facultativos sin capacidad de formar esporas. Dentro del grupo se incluyen los géneros *Escherichia*, *Enterobacter*, *Klebsiella* y *Citrobacter*.

De un modo similar al recuento de aerobios mesófilos, el recuento de enterobacterias lactosa positivas se puede utilizar como indicador de contaminación fecal e higiene general de

fabricación o procesamiento de alimentos preparados. Un recuento elevado puede señalar una elaboración inadecuada o contaminación tras el cocinado.

### Aspectos prácticos

La siembra de Enterobacterias se hace de forma paralela a la de aerobios mesófilos y la metodología es similar. En este caso, la siembra siempre se realiza sobre las diluciones  $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$  y  $10^{-3}$ . En este caso, las placas son de VRBL y se incuban a 37°C durante 24 horas tras la siembra en profundidad y la solidificación del agar de acuerdo con la normativa ISO 4832:2006.

Tras 24h se pueden leer los resultados y no todas las colonias se darán como Enterobacterias lactosa positivas. A pesar de que las sales biliares y el cristal violeta del medio inhiben bacterias gram positivas, el crecimiento de *P. aeruginosa* es posible, presentando una buena tasa de crecimiento y colonias relativamente grandes de color beige o transparente. Las colonias a contar serán aquellas rojas o violetas con halos del mismo color por la presencia en el medio de rojo neutro como indicador de pH.

### 4.3 *Listeria monocytogenes*

#### Marco teórico

*Listeria monocytogenes* es un bacilo gram positivo facultativo. Es móvil por la posesión de flagelo y constituye una de las causas principales de mortalidad debido a intoxicaciones por alimentos. De las 6 especies del género que son: *L. grayi*, *L. innocua*, *L. ivanovii*, *L. seeligeri* y *L. welshimeri* tan sólo *L. monocytogenes* y *L. ivanovii* se consideran patógenos, aunque en el caso de *L. ivanovii* se asocia más a infecciones de rumiantes y muy raramente de humanos. (Michel *et al.*, 2005). De *L. monocytogenes* se conocen 13 serotipos que son 1/2a, 1/2b, 1/2c, 3a, 3b, 3c, 4a, 4ab, 4b, 4c, 4d, 4e, y 7. De los 13 serotipos, son los 1/2a, 1/2b, y 4b los que se asocian a la mayoría de infecciones (Doumith *et al.*, 2005)

Es una bacteria resistente a una amplia gama de medios. Presenta halotolerancia y puede sobrevivir y multiplicarse a temperaturas por debajo de 1°C, lo cual no es habitual en la mayoría de patógenos. Otra característica propia de *L. monocytogenes* es su ubicuidad en el ambiente ya que es posible encontrarla en zonas húmedas, suelo y vegetación en descomposición. (Hamon *et al.*, 2006)

*L. monocytogenes* tiene dos variedades de patología en caso de infección. Tras la infección, puede contraerse una patología gastrointestinal o por otra parte contraer la forma invasiva de infección, la cual puede causar septicemia y meningitis. La mortalidad es alta en caso de contraer la forma invasiva de la enfermedad, en la cual se calcula que un índice de mortalidad del 15 al 30%. Además, no se conoce con seguridad la dosis infecciosa de *L. monocytogenes* puesto que varía respecto a la susceptibilidad del huésped y la cepa de la bacteria. El tiempo de incubación de la gastroenteritis es corto, pudiendo aparecer los síntomas desde pocas horas después de la ingesta hasta 3 días después. En cambio, el tiempo de incubación de la forma invasiva es mucho más largo, siendo de 3 días hasta 3 meses después, donde aparecen síntomas como dolor de cabeza, confusión y convulsiones (Cossart, 2008).

La patogénesis de *L. monocytogenes* viene dada por su capacidad de sobrevivir y crecer en células humanas, incluyendo fagocitos (Hamon *et al.*, 2006). Su virulencia se basa en una serie de factores de virulencia que incluyen la hemolisina (listerolisina O), dos fosfolipasas y una proteína (ActA) que permite la movilidad de la bacteria de manera intracelular. Además, posee dos proteínas de superficie (InlA y InlB) requeridas en la infección de distintos tipos de células mediante el reconocimiento de diferentes receptores en la célula huésped.

Para el control de *Listeria monocytogenes* la legislación decreta que en productos como helados, comida preparada y todo tipo de productos cárnicos cocinados se requiere de ausencia de *L. monocytogenes*. Para otro tipo de productos el límite legal se establece en 100 UFC/g. Cabe destacar que en el laboratorio la mayoría de análisis se realizan por presencia o ausencia, dado que en la mayoría de casos, se añade algún producto preparado tras la cocción, lo cual implica la necesidad de cumplir con la ausencia de la bacteria en el alimento.

### Aspectos prácticos

Existen dos variantes en el procesamiento sobre la detección de *Listeria monocytogenes*. Por un lado, para productos cárnicos y alimentos preparados se exige la ausencia de la bacteria, mientras que para otros productos se establece un límite de 100 UFC/g de alimento. Para ambos casos, se sigue la ISO 11290:2017, que permite la detección y enumeración de *Listeria monocytogenes* y *Listeria spp.*

Cuando el alimento debe estar ausente de *L. monocytogenes* se incuba el Caldo de Fraser preparado en el paso anterior durante 24 horas a 30°C para realizar el enriquecimiento. Una vez pasadas las 24 horas se toman 100 µL y se siembran por diseminación con un Asa de Digrafsky en placas de agar cromogénico selectivo para *Listeria* (medio ALOA). En el caso

de analizar un alimento con límite de 100 UFC/g no se requiere el paso de enriquecimiento, por lo cual se plaquea directamente.

El medio ALOA en ambos casos se incuba 48h a 30°C. El medio contiene cloruro de litio, deftazidima, polimixina, ácido nalidíxico y ciclohexamida para dar selectividad al medio. Actúa detectando el enzima  $\beta$ -glucosidasa, que es común en todas las especies de *Listeria* y provocando un viraje de las colonias a color azul. Además, contiene sustrato Lipasa C que provoca la formación de un halo blanco opaco característico a las colonias de *Listeria monocytogenes*. Este medio requiere confirmación, puesto que hay otra bacteria del género que pueden confundirse con el patógeno, siendo inocua para humanos como es el caso de *Listeria ivanovii*.

Tras la incubación, se detectan aquellas colonias características de *Listeria monocytogenes* por la presencia un halo blanco alrededor de las colonias. Finalmente, si existe una colonia característica, se realiza una confirmación mediante un API de 12 test de una colonia aislada. El API (Microbact™ *Listeria* 12L) contiene un primer test de esculina, la cual puede ser hidrolizada y virar de verde a negro o quedar de color verde. También contiene otros 10 pocillos de diferentes azúcares junto con un indicador (púrpura de bromocresol) que virará a color verde por la acidificación si el azúcar es metabolizado, estos azúcares son: manitol, xilosa, arabitol, ribosa, ramnosa, trehalosa, tagatosa, glucosa-1-fosfato, metil-D-glucosa y Metil-D-Manosa. Finalmente, el test API contiene una prueba de hemólisis de glóbulos rojos, en la cual si hay hemólisis las células se lisarán y esto se manifestará de forma que el pocillo quedará de marrón oscuro. Por lo contrario, si el test de hemólisis resulta negativo, los pocillos quedarán con las células intactas en el fondo. El reactivo de hemólisis se almacena de forma que se añade una gota cuando va a ser utilizado, y no está presente en la galería hasta su adición como los otros test. Los resultados del API pueden leerse tras 24 horas de incubación a 35°C.

#### 4.4 *Escherichia coli*

##### *Marco teórico*

En alimentos, su presencia es detectada como testimonio de falta de higiene en el proceso de elaboración. En el marco de los límites legales en alimentos, se estipula según la legislación vigente que se permite una cierta presencia de la bacteria en carnes picadas o separadas mecánicamente y otros productos crudos como hortalizas o zumas de frutas. Los límites en estos casos permiten un máximo de 2 de 5 muestras en las cuales haya una presencia de más 100 UFC/g siempre en cuando nunca se superen las 1000 UFC/g. En muestras cocinadas, por otra parte, no se permite en ningún caso la presencia de *E. coli*.

### Aspectos prácticos

Para la determinación de *Escherichia coli* se utiliza la normativa UNE-ISO 16649:2013. La normativa ISO implica el uso de agar TBX cromogénico. Este agar contiene el sustrato X- $\beta$ -glucurónico, el cual es utilizado por la enzima  $\beta$ -glucoronidasa de *E. coli* si la bacteria está presente en la muestra. El uso del sustrato cromogénico libera un cromógeno de color azul verdoso dando el mismo color a las colonias.

El método de siembra es por agotamiento, utilizando un asa calibrada de 10  $\mu$ L directamente de la dilución madre de TPW, que se encuentra en dilución  $10^{-1}$ . El medio se incuba con las placas de manera invertida a 44°C durante 24h. Esto último junto a que *E. coli* es el único coliforme que posee la enzima  $\beta$ -glucoronidasa hace que las colonias de color azul-verde no requieran de confirmación para la determinación.

### 4.5 *Salmonella* spp.

#### Marco teórico

Son bacilos gram negativos, oxidasa negativos y catalasa positivos. Existen diversas especies dentro del género, entre las cuales *Salmonella entérica* subsp *enterica* es la más patogénica. Dentro de la especie se distinguen distintos serotipos, siendo los serotipo Enteritidis y Typhimurium a los que se asocia a más casos de hospitalización (Braden, 2006). Una característica útil para el serotipado pueden ser los distintos antígenos de superficie que presentan, siendo estos el antígeno O somático, el antígeno H flagelar y la envoltura Vi. Estos factores de virulencia pueden modificar en gran medida la capacidad de invadir las células del epitelio y replicarse en su interior (García, 1999)

El control sobre *Salmonella* spp. se realiza por su patogenicidad y por su relativa común abundancia en reservorios como animales de granja o domésticos. La infección a partir de dichos reservorios es de gran facilidad a través de alimentos contaminados por los deshechos de un animal o persona infectados. Una vez producida la invasión del epitelio intestinal, tras 6-48 horas pueden aparecer los síntomas, que pueden ser náuseas, vómitos, diarrea, dolor abdominal o dolores de cabeza que duran entre 3-8 días. (Finlay, 1994)

Para la aprobación de las medidas sanitarias pertinentes, se exige una ausencia del microorganismo en 25g de muestra de alimentos. Este requisito viene dado para alimentos preparados, crudos y todos aquellos alimentos a los que se les añada algo no sometido a tratamiento térmico tras ser cocinados



### Aspectos prácticos

El análisis de Salmonella siempre se realiza indicando presencia o ausencia mediante la normativa UNE-EN ISO 6579:2017. Esta metodología requiere de un paso de preenriquecimiento en agua de peptona tamponada durante  $18h \pm 2h$ , tras ello, requiere de un enriquecimiento de 24 horas antes de poder ser aislado en agar XLD y otro agar secundario. Todo el proceso de determinación puede durar por lo tanto algo menos de tres días de procesamiento. Para acelerar la determinación, en Saniconsult se emplea un método horizontal con el fin de evitar el paso de preenriquecimiento. Dicha metodología, está validada por la ISO 17994:2014, cumple por lo tanto con los requisitos necesarios para usarse como método alternativo y acorta de esta manera el procesamiento de las muestras en un día.

El método realizado por Saniconsult se basa en un enriquecimiento mediante ONE-Broth-Salmonella Oxoid™. Tras la recepción de la muestra, se realiza una dilución 1/10 utilizando un diluidor automático, la dilución contiene 25g de muestra y 225mL de la solución ONE-Broth Salmonella. El caldo de cultivo se incuba durante 20 horas a 37°C

El medio nutritivo y selectivo ONE-Broth-Salmonella Oxoid™ permite obtener una buena recuperación de Salmonella en tan sólo 16-20 horas de incubación, sin requerir de un segundo medio de enriquecimiento. Tiene en su composición peptona y extracto de levadura, además de agentes inhibitorios como el antibiótico Novobiocina para evitar el crecimiento de flora acompañante como *Proteus spp.* y *Pseudomonas spp.* .

Tras el enriquecimiento, la muestra puede ser sembrada en el agar, y se usan dos tipos de medios: XLD (Xilosa Lisina Desoxicolato) y Brilliance Salmonella Oxoid™ en placas divididas físicamente en dos mitades con un medio a cada lado. La siembra se realiza por agotamiento en ambos y se incuba 48h a 37°C. En el agar XLD Salmonella presenta colonias negras o rojas con un centro negro, debido a la fermentación de xilosa y a la formación de un precipitado negro por la producción de H<sub>2</sub>S. Algunos otros microorganismos pueden fermentar Xilosa del medio, pero Salmonella además puede descarboxilar la lisina, alcalinizando el medio y resultando en un color igual al que dejaría un organismo no fermentador de Xilosa.

El otro agar, el agar Brilliance Salmonella contiguo al XLD, provoca un viraje del medio desde un color blanco rosado a un violeta claro en caso de Salmonella. Este medio es más selectivo que el anterior, ya que además de novobiocina contiene cefsulodina que al igual que el One broth, intenta evitar el crecimiento de flora acompañante como sería *Proteus spp.* y *Pseudomonas spp.* El antibiótico cefsulodina es muy efectivo contra *Pseudomonas aeruginosa* y *Staphylococcus aureus*, pero no presenta demasiada actividad contra otras bacterias.

Finalmente, para confirmar la presencia de Salmonella, se hace una prueba de aglutinación en látex (Oxoid™ Salmonella Rapid Test) compuestas por partículas de látex sensibilizadas con anticuerpos polivalentes a Salmonella (IgG de conejo).

#### 4.6 *Staphylococcus aureus*

##### *Marco teórico*

*Staphylococcus aureus* es una bacteria miembro de la familia Micrococcaceae. Es un coco gram positivo con capacidad para formar biofilms. Se diferencia del resto de estafilococos por tener una pigmentación dorada en las colonias, además de dar positivo en el test de coagulasa, en la fermentación de manitol y el test de desoxiribonucleasa.

Se trata de un microorganismo presente en una gran parte de la población formando parte de la microbiota normal de la piel, colonizando el 30-50% de la población adulta sana. De estos últimos, un 10-20% poseen este microorganismo como colonización persistente (Lowy, F. 1998). Es importante el control de este microorganismo por la fácil transmisión que puede haber mediante la manipulación de alimentos. Una vez colonizado el alimento, la bacteria puede producir una enterotoxina responsable de la contaminación alimentaria, la cual, a pesar de haber sido sometida a tratamiento térmico, puede perdurar pese a la ausencia de la bacteria.

La gravedad de los síntomas producidos depende en mayor medida de la cantidad de alimento ingerido y la cantidad de toxina presente. Estos síntomas pueden ser vómitos, diarrea y dolor abdominal. Las bacterias ingeridas no tienen la capacidad de producir la toxina y esta suele ser eliminada tras 24 horas desde la aparición de los síntomas. (Lowy, F. 1998).

Para cumplir con la normativa se estipulan límites de 100 UFC/g, siendo recomendable no encontrar valores de 10 UFC/g en cualquier alimento, cocinado o crudo.

##### *Aspectos prácticos*

Habitualmente para el análisis y determinación de *S. aureus* se sigue la normativa ISO 6888:2000, haciendo uso del agar Baird Parker. Para ello, tras la preparación de la dilución madre de TPW, se siembran 100µL en superficie sobre el agar Baird Parker. Después, se incuba a 37°C durante 24 horas con las placas invertidas.

El agar Baird Parker es un medio parcialmente selectivo que discrimina a los estafilococos mediante la capacidad de reducir telurito a telurio y detectar la lecitinasa a partir de la lecitina de huevo, para ello, es necesaria la adición del suplemento de yema de huevo. Tras la incubación, los estafilococos coagulasa positivos habrán reducido el telurito del medio y presentarán colonias oscuras o negras con un halo de coloración. Para asegurar la determinación y presencia de *S. aureus* en la muestra, hace falta una confirmación, habitualmente realizada mediante pruebas basadas en la enzima coagulasa de la bacteria.

En Saniconsult, se emplea actualmente una modificación del protocolo descrito, en este caso, la modificación del protocolo se contempla de manera directa en la misma ISO 6888:2000, formando parte de la segunda parte de la normativa (ISO 6888-2:2000). En este caso se emplea el agar Baird Parker RPF, un medio muy similar al anterior, pero que se utiliza junto con un complemento de plasma de conejo para poner de manifiesto la presencia de *S. aureus* sin necesidad de confirmación. En este medio, se reemplaza la emulsión de yema de huevo por fibrinógeno bovino y plasma de conejo, además de un inhibidor de tripsina para evitar la fibrinólisis. En el medio Baird Parker RPF se pone de manifiesto la actividad de la coagulasa y para ello, el fibrinógeno bovino, el plasma de conejo y el inhibidor de tripsina son añadidos al medio de manera previa a la siembra. El aspecto de las colonias es quizás algo más oscuro que en el método habitual, aunque puede haber colonias de *S. aureus* sin oscurecimiento de la colonia. Para el recuento de las colonias, se pueden contar como *S. aureus* todas aquellas colonias que presenten un halo opaco a su alrededor, presentando o no necesariamente el oscurecimiento.

## **5. ANÁLISIS DE SUPERFICIES DEL LABORATORIO**

Una vez por semana, en el laboratorio se realiza control de superficies con el fin de verificar el correcto funcionamiento del laboratorio y asegurar que el nivel de higiene es el adecuado.

Para realizar el control de las superficies de la campana de bioseguridad, se utilizan placas RODAC y PCA. Se dejan abiertas de forma invertida tras un periodo de esterilización con luz UV y se incuban a 37°C durante 24h, periodo tras el cual no debería de haber crecimiento.

Por otro lado, se realiza un control del proceso de esterilización de los autoclaves del laboratorio. Este control implica asegurar que tras el proceso de esterilización del material, estos quedan exentos de cualquier tipo de bacteria, incluidas las esporas. Para el control de esterilidad, se emplean indicadores biológicos contenidos en tubos de plástico (Bionova® BT20). Los tubos contienen una población de esporas de *Geobacillus stearothermophilus* ATC

7953 embebidas en una tira de papel. Además de un medio indicador de crecimiento de color púrpura contenido en una ampolla de vidrio en el interior del tubo. Para realizar el control, cada semana se incorpora uno de los tubos en el autoclave junto a material pendiente de esterilizar (usualmente la rampa de filtración). Para asegurar la esterilización, el tubo se pega con cinta de autoclave a la parte más alta del material a esterilizar y se inicia el proceso. Tras la esterilización, se rompe el vidrio que contiene el indicador de crecimiento y se incuba a 80°C durante 24 horas junto con un control positivo sin tratamiento de esterilización. Se considera correcto si al día siguiente hay crecimiento en el control positivo (indicador de color verde) y no hay crecimiento en el tubo sometido a esterilización (color violeta-púrpura)

## 6. DEMOSTRACIÓN ANALÍTICA

### 6.1 Introducción

En el periodo de prácticas que fue desde el 20 marzo hasta el 29 junio se realizaron alrededor de 3000 determinaciones analíticas de *Pseudomonas aeruginosa* en distintas fuentes de muestreo. Durante este periodo, el 11,84% de las muestras dieron resultados de presencia de *Pseudomonas aeruginosa*.

La bacteria, ya descrita anteriormente, presenta una gran capacidad de supervivencia en distintos tipos de medios, incluyendo agua destilada y agua tratada con niveles de cloro residual <1 mg/L (Marco *et al.*, 2016). Debido a esto, aguas como las de piscinas, bañeras de hidromasaje o jacuzzis están frecuentemente asociadas a patologías producidas por *P. aeruginosa*.

Para el control de la bacteria en aguas de recreo como jacuzzis, spas, piscinas y bañeras de hidromasaje se emplea usualmente cloro como agente antimicrobiano. También, se asocian niveles de pH anormales al crecimiento o ausencia de la bacteria (Price *et al.*, 1988). En una primera etapa, el cloro reacciona con el material orgánico y metales del agua formando complejos sin poder desinfectante, estos complejos junto los que se forman al reaccionar con iones nitrato forman lo que se conoce como cloro combinado. El cloro libre, por otro lado se presenta en forma de hipoclorito y ácido hipocloroso, con capacidad de desinfección (Reilly, 1983).

Los límites de los parámetros estudiados se recogen en el Real Decreto 742/2013, el mismo donde se establecen los criterios físicos y químicos adecuados para la salud pública, siempre que el agua de recreo sea de uso comunitario. Así mismo se establece que el pH debe tener un valor entre 6,5 y 8, la concentración de cloro libre debería ser menor de 2 mg/L y por último,

el cloro combinado tiene que ser igual o menor a 0,6mg/L. Además, se especifica que se ha de realizar un control diario de dichos parámetros por parte del establecimiento responsable.

Existen otras opciones para la desinfección de aguas de recreo además del cloro. Una opción aparentemente viable es la tecnología de campos electromagnéticos, con capacidad de evitar la formación de biofilms de *Pseudomonas aeruginosa*. Este tipo de tecnología ha sido investigada por Guida *et al.*, 2016 utilizando el producto Quantum FreeBioenergy© (QFBE). En el estudio realizado por Guida, se analizaron nueve piscinas monitorizadas y con niveles de cloro acordes a la normativa de Nápoles. Estos estudios no encontraron correlación entre los niveles de cloro libre y la presencia de *P. aeruginosa*, sugiriendo que es necesario el uso de un control alternativo para evitar infecciones por parte de esta bacteria. En el presente estudio se intenta demostrar una relación directa entre la presencia de esta bacteria y los niveles de cloro libre del agua. En contraste con el estudio realizado por Guida en 2016, el presente estudio cuenta con un número de muestras mucho mayor. De esta forma, se intenta contrastar la afirmación de la necesidad de un método alternativo para la desinfección de aguas de recreo.

Para el análisis de la influencia del pH, cloro combinado y cloro libre residual se han utilizado aquellos datos cuya medida de turbidez está dentro de los límites permitidos, puesto que la turbidez puede influir drásticamente sobre el efecto antimicrobiano (Reilly, 1983) Aquellas muestras con una turbidez superior a 2 UNF fueron descartadas con tal de evitar la influencia de la turbidez sobre la presencia o ausencia de la bacteria.

### Objetivos específicos

1. Comparar el nivel de cloro libre entre presencia o ausencia de *P. aeruginosa*
2. Comparar el nivel de Cloro combinado entre presencia o ausencia de *P. aeruginosa*
3. Comparar el pH frente a presencia o ausencia de *P. aeruginosa*
4. Demostrar la asociación/independencia entre el cloro libre y el cloro combinado respecto a la presencia de *P. aeruginosa*.

### 6.2 Metodología

Como variables independientes se han empleado los niveles de cloro libre, cloro combinado y pH mientras que la variable dependiente ha sido la presencia o ausencia de *Pseudomonas aeruginosa*. Para determinar la existencia de diferencias significativas de una determinada

variable cuantitativa (variable independiente o factor principal) en dos niveles de la variable cualitativa (variable dependiente) se utilizaron test de comparación de medias. El supuesto de independencia se comprueba en el diseño de estudio con una adecuada manipulación de las muestras, evitando en todo momento la contaminación de una a otra con facilidad gracias a la simple metodología de laboratorio.

Para usar el test de comparación de medias adecuado y concluir si las medias son distintas o no, se comprobó antes si los datos cumplían normalidad y homogeneidad de varianzas. Para realizar lo anterior se ha empleado el programa estadístico R y Rstudio versión 3.1.1.

El análisis de datos incluye 3055 muestras, entre las cuales hay valores de recuento que van desde 1 UFC/100mL hasta 250 UFC/100mL, siendo ambos valores el límite detectable con la metodología empleada. Debido a que el rango de medida puede no ser cierto para valores mayores a 250 UFC/100mL, se tomaron todos los recuentos como presencia/ausencia de *Pseudomonas aeruginosa* en la muestra y por lo tanto no se tuvo en cuenta el valor real de recuento. La variable dependiente, entonces, se trató como una variable cualitativa.

Para apoyar la hipótesis de la eficiencia del cloro y demostrar la asociación/independencia del cloro libre y combinado sobre la presencia de *P. aeruginosa* se realizó un test  $\chi^2$ . Este test es empleado para determinar la asociación o independencia de dos variables cualitativas, comparando los resultados observados con resultados teóricos calculados bajo el supuesto de que las variables fuesen independientes entre sí. Si los resultados observados difieren significativamente de los resultados teóricos, es posible rechazar la independencia de ambas variables y afirmar que existe asociación entre ellas. Por el contrario, si los resultados no difieren entre los valores esperados y observados se confirma que las variables son independientes.

Para ello, se calcularon tablas de contingencia (**tabla 1 y 2**) por rangos para el cloro libre y el cloro combinado. En la realización de las tablas de contingencia se emplearon rangos de 0,5 mg/L de cloro combinado (3 rangos) y rangos de 1 mg/L de cloro libre (5 rangos) de modo que las tablas de contingencia contuvieran los datos de cloro libre y cloro combinado como una variable cualitativa.

**Tabla 1.- Cloro libre. Frecuencias observadas y esperadas (entre paréntesis)**

	Rangos de cloro libre					TOTAL
	De 0 a 1	De 1 a 2	De 2 a 3	De 3 a 4	De 4 a 5	
<b>Pseudomonas aeruginosa</b>						
Presencia	160 (136,71)	143 (152,35)	23 (28,76)	7 (15,13)	5 (5,05)	338
Ausencia	111(134,29)	159 (149,65)	34 (28,24)	23 (14,87)	5 (4,95)	332
<b>TOTAL</b>	<b>271</b>	<b>302</b>	<b>57</b>	<b>30</b>	<b>10</b>	<b>670</b>

**Tabla 2.- Cloro combinado. Frecuencias observadas y esperadas (entre paréntesis)**

	Rangos de cloro combinado			TOTAL
	De 0 a 0,5	De 0,5 a 1	De 1 a 1,5	
<b>Pseudomonas aeruginosa</b>				
Presencia	287 (282)	21 (25)	8 (9)	316
Ausencia	278 (282)	29 (25)	10 (9)	317
<b>TOTAL</b>	<b>565</b>	<b>50</b>	<b>18</b>	<b>633</b>

### 6.3 Resultados

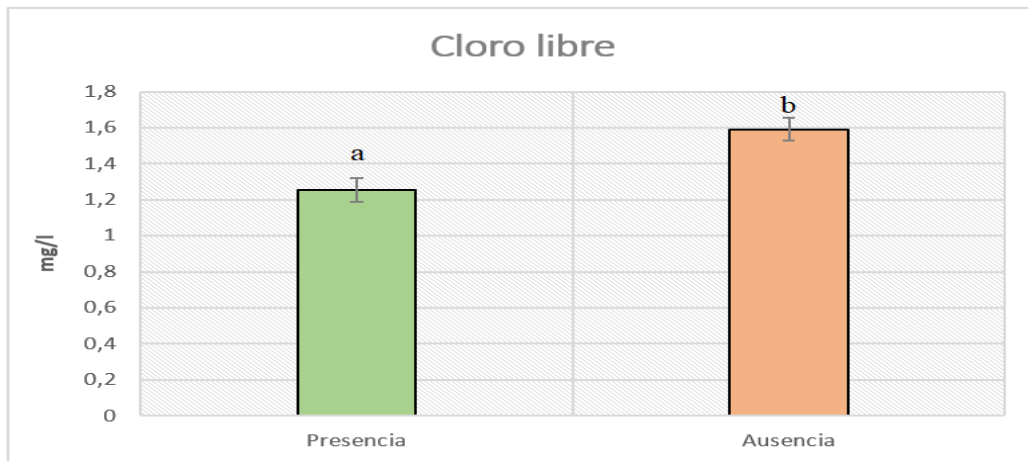
Al aplicar el test de normalidad Shapiro-Wilk sobre las tres variables dependientes por separado (**tabla 3**), no se obtuvo distribución normal para ninguna de las tres variables dependientes ( $p < 0,05$ ), pero al aplicar el test de Bartlett se obtuvo homogeneidad de varianzas ( $p > 0,05$ ). Por tanto, se recurrió al test de comparación de medias no paramétrico Wilcoxon-Mann-Whitney que detectó diferencias significativas entre la presencia y ausencia de *P. aeruginosa* ( $p < 0,05$ ) en el caso de la variable cloro libre, pero no para el cloro combinado ni tampoco para el pH.

Sobre las tres variables dependientes por separado, se intentó realizar una transformación logarítmica, una opción viable con el fin de evitar realizar test no paramétricos y poder hacer test paramétricos, en este caso un test de la t de Student. Para realizar la transformación logarítmica se empleó la fórmula  $Y' = \log(Y+1)$  para el cloro libre y el cloro combinado, y simplemente  $Y' = \log(Y)$  para el pH. Al realizar la transformación logarítmica, se obtuvo heterogeneidad de varianzas y no se obtuvo normalidad en los test de Bartlett y Shapiro-Wilk respectivamente. En casos como estos, algunos autores defienden que no debería aplicarse el test Wilcoxon-Mann-Whitney. Debido a esto, se realizó en el caso de las tres variables dependientes el test no paramétrico de Wilcoxon-Mann-Whitney sin transformación logarítmica.

**Tabla 3.- Resultados de los test de normalidad, Bartlett y Wilcoxon-Mann-Whitney**

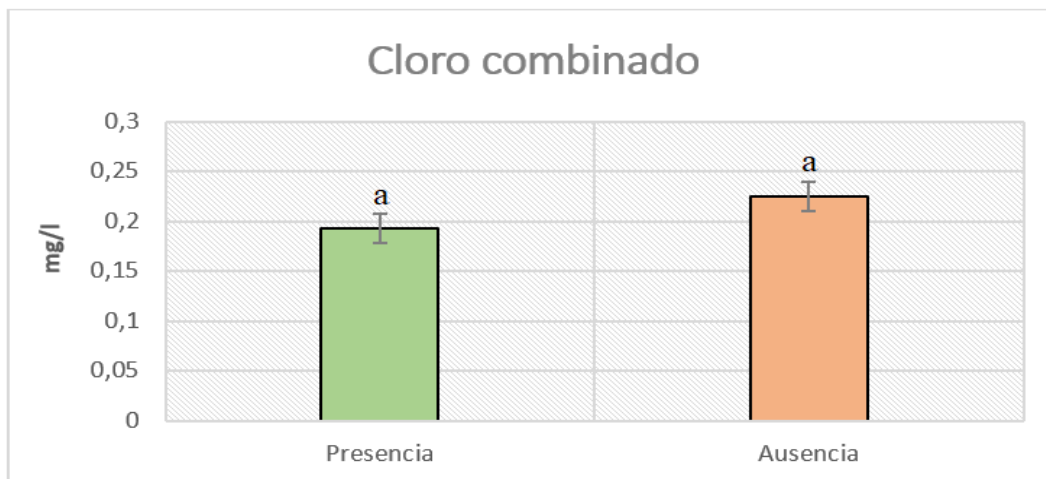
		Cloro libre	Cloro combinado	pH
<b>Shapiro-Wilk</b>	Presencia	<2,2E-16	2,20E-06	2,67E-04
	Ausencia	2,00E-06	4,20E-06	7,88E-04
<b>Bartlett</b>		0,6772	0,1974	0,2172
<b>U-Mann</b>		2,35E-05	0,3396	0,4978
<b>Valor de <math>\chi^2</math></b>		20,311	1,644	-

A continuación (**figura 3**) se muestra la comparación de las medias del cloro libre en muestras de presencia y ausencia de *P. aeruginosa*, expresadas en mg/L, con un valor máximo de 13,2 mg/L y un mínimo de 0,02 mg/L. Se encontraron diferencias significativas en el test de U-Mann-Whitney (**tabla 3**)



**Figura 3.-** Resultados de cloro libre en aguas de recreo, expresadas en mg/L. Letras distintas entre las columnas indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ )

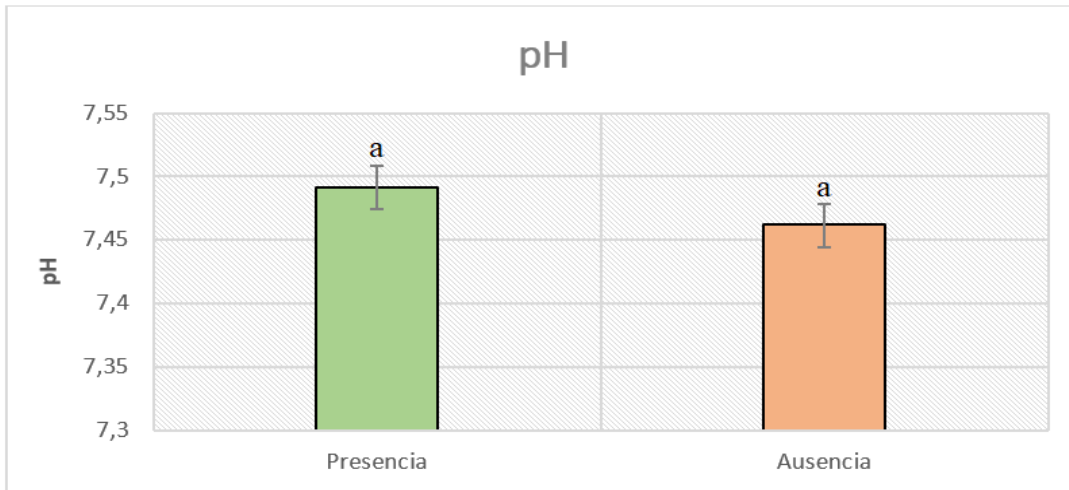
En relación al cloro combinado (**figura 4**), el valor máximo se situó en 1,45 mg/L y el mínimo en 0. Para esta comparación, no se encontraron diferencias significativas entre las medias.



**Figura 4.-** Resultados de cloro combinado en aguas de recreo, expresadas en mg/L. Letras distintas entre las columnas indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ )

Por último, los valores de pH (**figura 5**) tuvieron un máximo de 8,35 y un mínimo de 6,51. Tampoco se encontraron diferencias significativas entre las medias de los datos del pH.





**Figura 5.-** Resultados de pH en aguas de recreo, expresadas en mg/L. Letras distintas entre las columnas indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ )

Respecto al análisis mediante el test  $\chi^2$ , se obtuvo un valor de 1,644 para el cloro combinado con 2 grados de libertad. Por otro lado, en el caso del cloro libre, se obtuvo un valor de 20,311 con 4 grados de libertad. Estos valores se obtuvieron calculando la diferencia entre frecuencia observada y esperada dividida por la raíz cuadrada de la frecuencia esperada. Tras esto, se sumó el cuadrado de todos los residuos estandarizados obteniendo el valor del  $\chi^2$  total.

Utilizando una tabla de distribución de  $\chi^2$  se pudo comprobar que para los grados de libertad seleccionados se demuestra asociación entre presencia y ausencia de la bacteria con el cloro libre. En el caso del cloro combinado, el estadístico no permite descartar independencia, quedando en este caso la hipótesis nula.

En último lugar, como resultado de los análisis, se calcularon los porcentajes de incidencia respecto a las distintas zonas de muestreo (**tabla 4**).

**Tabla 4.-** Incidencia de *P. aeruginosa* en los distintos tipos de muestreo

	Muestras totales	Presencia	Incidencia (%)
<b>Piscina exterior</b>	2255	178	7,89
<b>Piscina cubierta</b>	320	52	16,25
<b>Bañera hidromasaje</b>	324	29	8,95
<b>Jacuzzi</b>	157	18	11,46

## 6.4 Discusión

Las diferencias significativas entre el cloro libre y la presencia de *P. aeruginosa* sugieren que otras tecnologías como el QFBE no son realmente necesarias si se sigue la normativa

establecida y se mantienen los controles rutinarios de cloro libre residual. El uso del desinfectante debería ser suficiente para evitar la colonización por parte de *P. aeruginosa* en aguas de recreo. De la misma forma, la relación entre el cloro combinado y la incidencia de la bacteria no parece estar relacionado, ya que el cloro combinado no tiene poder desinfectante y no parece interferir con la acción de cloro libre a las concentraciones estudiadas. Cabe destacar que el uso de cloro a niveles subóptimos puede llevar a la selección de cepas multiresistentes, por lo tanto, se acentúa la importancia del control rutinario de los niveles de cloro con el fin de evitar este tipo de problemática (Shrivastava, 2004).

El pH también puede afectar a la eficiencia de cloración, siendo menos eficiente cuando el pH es superior a 8 (Seyfried *et al.*,1980). En el presente estudio no se encuentran diferencias significativas entre presencia o ausencia y pH. Se debe prestar especial atención a que los niveles de las piscinas del estudio siempre se sitúan entre 6,5 y 8. A niveles de pH superiores, podría verse una incidencia mayor en los resultados según la bibliografía citada.

Apoyando la hipótesis anterior, los resultados de las pruebas de  $\chi^2$  demuestran la asociación del cloro libre sobre la presencia de la bacteria, siendo efectiva la desinfección con cloro. Por otro lado, sobre los niveles estudiados de cloro combinado, no se demuestra la asociación de este compuesto y la incidencia de *P. aeruginosa*, por lo tanto, existe independencia entre ambos parámetros. Este parámetro, aporta validez al estudio realizado de forma que los resultados son similares entre los distintos análisis estadísticos empleados, en este caso en forma de variables cualitativas frente al uso de variables cuantitativas en la comparación de medias empleadas mediante el test de Wilcoxon-Mann-Whitney.

Algunos autores defienden la interferencia entre el cloro combinado a niveles por encima de la legislación y la capacidad de desinfección del cloro libre (Rice *et al.*, 2012; Seyfried *et al.*,1980). Sería interesante en el futuro comprobar esta relación con muestras por encima de los 0,6 mg/L de cloro combinado, que es el valor máximo permitido por la ley. Para poder realizar este estudio, las muestras deberían presentar normalidad y homogeneidad de varianzas. Si cumpliesen dichos supuestos se podría realizar un test paramétrico ANOVA de dos factores comparando distintos rangos de cloro libre para únicamente muestras que contengan un nivel de cloro combinado mayor a 0,6 mg/L. El motivo de no haber realizado este tipo de test es que los resultados de las bandejas Quanti-tray® detectan un máximo de 250 UFC/100mL, siendo necesario diluir la muestra para obtener resultados mayores. Normalmente, el laboratorio no realiza las diluciones debido a que se comunica directamente con el cliente para que se realice lo más pronto posible la desinfección y la mejora de las condiciones higiénico-sanitarias. Al tener como máximo ese valor, muchas muestras quedan con el valor de 250 UFC/100mL y eso influye sobre la normalidad de los datos.

## 7. Bibliografía

BRADEN, Christopher R. Salmonella enterica serotype Enteritidis and eggs: a national epidemic in the United States. *Clinical Infectious Diseases*, 2006, vol. 43, no 4, p. 512-517.

COSSART, Pascale; TOLEDO-ARANA, Alejandro. Listeria monocytogenes, a unique model in infection biology: an overview. *Microbes and Infection*, 2008, vol. 10, no 9, p. 1041-1050.

DOUMITH, Michel, et al. Multicenter validation of a multiplex PCR assay for differentiating the major Listeria monocytogenes serovars 1/2a, 1/2b, 1/2c, and 4b: toward an international standard. *Journal of food protection*, 2005, vol. 68, no 12, p. 2648-2650.

FAVERO, M. S., et al. Pseudomonas aeruginosa: growth in distilled water from hospitals. *Science*, 1971, vol. 173, no 3999, p. 836-838.

FINLAY, B. B. Molecular and cellular mechanisms of Salmonella pathogenesis. En *Bacterial Pathogenesis of Plants and Animals*. Springer Berlin Heidelberg, 1994. p. 163-185.

GARCIA-DEL PORTILLO, FRANCISCO, et al. Molecular and cellular biology of Salmonella pathogenesis. *Microbial Foodborne Diseases: Mechanisms of Pathogenesis and Toxin Synthesis*, 1999, p. 3-49.

GUIDA, Marco, et al. Pseudomonas aeruginosa in swimming pool water: evidences and perspectives for a new control strategy. *International journal of environmental research and public health*, 2016, vol. 13, no 9, p. 919.

GUSTAFSON, Tracy L., et al. Pseudomonas folliculitis: an outbreak and review. *Reviews of infectious diseases*, 1983, vol. 5, no 1, p. 1-8.

HAMON, Mélanie; BIERNE, Hélène; COSSART, Pascale. Listeria monocytogenes: a multifaceted model. *Nature reviews. Microbiology*, 2006, vol. 4, no 6, p. 423.

LINARES-RODRÍGUEZ, Juan Francisco; MARTÍNEZ-MENÉNDEZ, José Luis. Resistencia a los antimicrobianos y virulencia bacteriana. *Enfermedades infecciosas y microbiología clinica*, 2005, vol. 23, no 2, p. 86-93.

LOWY, Franklin D. Staphylococcus aureus infections. *New England journal of medicine*, 1998, vol. 339, no 8, p. 520-532.

MCCLANE, Bruce A. Clostridium perfringens. *FOOD SCIENCE AND TECHNOLOGY-NEW YORK-MARCEL DEKKER-*, 2003, p. 91-104.

MCDADE, Joseph E., et al. Legionnaires' disease: isolation of a bacterium and demonstration of its role in other respiratory disease. *New England Journal of Medicine*, 1977, vol. 297, no 22, p. 1197-1203.

MENA, Kristina D.; GERBA, Charles P. Risk assessment of Pseudomonas aeruginosa in water. En *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology Vol 201*. Springer US, 2009. p. 71-115.

PRICE, D.; AHEARN, D. G. Incidence and persistence of Pseudomonas aeruginosa in whirlpools. *Journal of clinical microbiology*, 1988, vol. 26, no 9, p. 1650-1654.

REILLY, J. Kevin; KIPPIN, Joyce S. Relationship of bacterial counts with turbidity and free chlorine in two distribution systems. *Journal (American Water Works Association)*, 1983, p. 309-312.

RICE, Scott A., et al. A risk assessment of *Pseudomonas aeruginosa* in swimming pools: a review. *Journal of water and health*, 2012, vol. 10, no 2, p. 181-196.

SARTORY, D. P. Membrane filtration enumeration of faecal clostridia and *Clostridium perfringens* in water. *Water Research*, 1986, vol. 20, no 10, p. 1255-1260.

SARTORY, D. P., et al. Evaluation of two media for the membrane filtration enumeration of *Clostridium perfringens* from water. *Letters in applied microbiology*, 1998, vol. 27, no 6, p. 323-327.

SARTORY, David P., et al. Evaluation of the Pseudalert®/Quanti-Tray® MPN Test for the Rapid Enumeration of *Pseudomonas aeruginosa* in Swimming Pool and Spa Pool Waters. *Current microbiology*, 2015, vol. 71, no 6, p. 699-705.

SEYFRIED, Patricia L.; FRASER, David J. Persistence of *Pseudomonas aeruginosa* in chlorinated swimming pools. *Canadian Journal of Microbiology*, 1980, vol. 26, no 3, p. 350-355.

SHRIVASTAVA, Richa, et al. Suboptimal chlorine treatment of drinking water leads to selection of multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa*. *Ecotoxicology and environmental safety*, 2004, vol. 58, no 2, p. 277-283.

STOVER, C. K., et al. Complete genome sequence of *Pseudomonas aeruginosa* PA01, an opportunistic pathogen. *Nature*, 2000, vol. 406, no 6799, p. 959.

WATKINS, J.; SARTORY, D. P. Evaluation of a membrane filtration method for the rapid enumeration of confirmed *Clostridium perfringens* from water. *Letters in applied microbiology*, 2015, vol. 60, no 4, p. 367-371.

YU, Victor L., et al. Distribution of *Legionella* species and serogroups isolated by culture in patients with sporadic community-acquired legionellosis: an international collaborative survey. *The Journal of infectious diseases*, 2002, vol. 186, no 1, p. 127-128.