

VII

MICROBIOLOGÍA PREDICTIVA Y EL SISTEMA ARICPC. INTRODUCCIÓN AL MODELAMIENTO DE DATOS

Prof. Dr. D. GONZALO ZURERA COSANO
Universidad de Córdoba

MICROBIOLOGÍA PREDICTIVA Y EL SISTEMA ARICPC. INTRODUCCIÓN AL MODELAMIENTO DE DATOS

Prof. Dr. D. GONZALO ZURERA COSANO

Una de las bases de la microbiología de alimentos es el estudio del crecimiento bacteriano en función del medio que le rodea (el alimento). Cada uno de los factores intrínsecos de un alimento influye sobre el desarrollo microbiano y hace que favorezca el desarrollo de unos microorganismos en detrimento de otros. Teóricamente el gran número de factores que interviene podría ser cuantificado por lo que se podría establecer si ese alimento en cuestión es o no un posible medio adecuado para que se desarrollen gérmenes patógenos. Si consideramos la cantidad de alimentos diferentes que existen llegaríamos a la conclusión de que sería una tarea enorme recoger todos los datos sobre la relación de cada factor con cada microorganismo (Buchanan, 1991). Por suerte los factores determinantes que predominan en el crecimiento de microorganismos son solo unos pocos, entre los que destacan pH, a_w y temperatura (Pooni y Mead., 1984). Si se puede derivar la respuesta de los microorganismos a estas variables se podría estimar su posible desarrollo en los alimentos. Esta es la base de la subdisciplina que se está desarrollando dentro de la microbiología de alimentos, la microbiología predictiva. (Buchanan, 1991).

La microbiología predictiva pretende relacionar cada factor determinante con el crecimiento o supervivencia de los microorganismos.

Según Roberts y Jarvis (1983) la microbiología predictiva comprende el estudio de la respuesta de crecimiento de microorganismos que crecen en los alimentos frente a factores que les afectan y a partir de estos datos predecir lo que sucederá en el almacenamiento. Esto supone el conocimiento detallado de la ecología de los microorganismos en los alimentos durante el almacenamiento, para poder predecir su desarrollo en diversas condiciones. El concepto es similar al Análisis de Riesgos y Control de Puntos Críticos (ARICPC), donde el conocimiento detallado del proceso permite una reducción significativa en el número de pruebas bacteriológicas a realizar (McMeekin y Olley, 1986).

El modelamiento matemático (“modelling”) aporta conocimientos y técnicas para las decisiones día a día en el control de la cadena de producción como complemento del Sistema de Análisis de Riesgos y Control de Puntos Críticos (ARICPC) (Cole, 1991). El desarrollo de los modelos predictivos permitirá a los productores predecir la vida media y seguridad de los productos en una determinada etapa y hacer que los científicos puedan usar condiciones inhibitorias y preventivas (Bratchell et al., 1990).

Los comienzos de estos estudios se remontan a 1960 pero ha sido en la década de los 80 cuando ha comenzado su auge (Quevedo, 1992).

Los primeros trabajos de modelamiento de datos en microbiología se hicieron en fermentaciones industriales, donde se desarrolló una serie de ecuaciones como la que introdujo Monod en 1949, (citado por Buchanan, 1992) para describir el impacto de las variables en el rendimiento. Las condiciones en que se basan estos modelos son diferentes a las que rodean los procesos de alteración del alimento, pues por ejemplo consideran que se parte de una fase estacionaria en el crecimiento microbiano. Desde hace tiempo se tiene interés en conocer en qué medida diferentes factores afectan el crecimiento bacteriano o la producción de toxinas (Farber, 1986). Este interés ha llevado a la necesidad de buscar técnicas de modelamiento de datos para explicarlas.

Ya en la década de los 90, algunos gobiernos muestran interés en financiar y sostener este tipo de investigaciones e incluso la industria realiza estudios al respecto. La OMS también ha mostrado su interés en la microbiología predictiva y pone énfasis en que sería interesante que se realizaran estudios del modelamiento predictivo en alimentos tradicionales, alimentos de venta ambulante, y alimentos caseros en países en desarrollo para obtener más información sobre el desarrollo de gérmenes patógenos en los alimentos (Quevedo, 1992).

Los países que han demostrado particular interés por el modelamiento predictivo han sido EE.UU., el Reino Unido, y algunos países de la CEE, incluida España (Proyectos CYCYT, ALI 90-126-E; ALI 93-0327; ALI 93-0239; ALI 93-0216; ALI 94-0079 y AMB 94-0352-CO₂-O₂). Gobiernos, organizaciones de investigación e industrias están trabajando ya sea independientemente o en conjunto para generar bases de datos en el desarrollo de sistemas para que la información sea asequible para un amplio rango de usuarios (McMeekin y Olley, 1993).

Un gran inconveniente que tiene el sistema de modelamientos predictivos es la gran cantidad de datos que precisa y el coste económico que ello conlleva.

Sin embargo si se calculan los costes producidos por las enfermedades transmitidas por los alimentos los costes de investigación se relativizan. Así por ejemplo, se calcula que puede haber costado del orden de medio millón de dólares (unos 65 millones de pesetas) la base de datos de *Listeria monocytogenes* creada por Buchanan (McMeekin y Olley, 1993), mientras que el coste económico producido por intoxicaciones es mucho más alto: en el Reino Unido se estimó en 1988 que las intoxicaciones producidas por *Salmonella* tuvieron un coste de 18.144.000 libras (3.773.952.000.- ptas., aproximadamente). En Australia estimaron que se ahorra un 20% de costes con la prevención de la alteración de los alimentos. (McMeekin y Olley, 1993).

MODELAMIENTO DE DATOS

Un requisito lógico e imprescindible para la confección de un modelo matemático adecuado es la obtención de datos apropiados que describan los efectos de diferentes factores en el desarrollo bacteriano.

La estrategia a seguir para la confección de un modelo predictivo de crecimiento bacteriano consta según Roberts y Jarvis (1980) de las siguientes fases:

1.- DISEÑO: elección de los parámetros y confección de un plan de combinación de estos parámetros.

Es necesario establecer las variables en las que se basará el experimento, si existen o no relaciones entre ellas, el rango en que oscilarían, la cantidad de datos necesarios, el modelo experimental usado y cual será la medición de las respuestas.

El diseño dependerá de lo que se pretenda estudiar, no es el mismo si se quiere modelar la producción de una toxina que la duración del tiempo de adaptación de un microorganismo patógeno en un alimento.

Al desarrollar un modelo predictivo en el crecimiento bacteriano se intenta describir la tasa de crecimiento en función de una serie de variables independientes, tal que si tienen n variables independientes se está modelando una respuesta en superficie de n dimensiones. Draper (1988) describe 14 puntos para el diseño adecuado de una respuesta en superficie.

En cuanto a la cantidad de datos, es necesario que existe un mayor número de curvas que parámetros a estimar. McMeekin y Olley (1993) aconsejan del orden de 10-15 curvas por cada variable independiente.

2.- ACUMULACIÓN DE DATOS: La aproximación al modelamiento se ha desarrollado usando curvas de crecimiento. Es importante que se realice suficiente cantidad de recuentos para describir toda la curva. Valores a tiempos iguales son apropiados. La experiencia en Gran Bretaña dice que 10 puntos no son suficientes y calculan rutinariamente 20 puntos por cada curva.

3.- AJUSTE DE LA CURVA: Si se representa el logaritmo del recuento bacteriano frente al tiempo, se obtiene una curva sigmoideal. Se observa una primera fase, la fase de adaptación de las células al nuevo ambiente, donde la tasa de crecimiento aumenta, luego le sigue la fase exponencial donde la tasa de crecimiento es constante, las células se reproducen lo más rápido que pueden y llegan a una tercera fase donde la tasa de crecimiento es cero para luego pasar a ser negativa en la fase de declive o muerte.

Si consideramos la ecuación de Gompertz como un ejemplo sencillo de ajuste de curvas:

$$\text{Gompertz} = L(t) = A + C * e^{-e^{-B * (t-M)}}$$

Donde:

$L(t) = \log$. Del número de bacterias en el tiempo t (en horas) $\{\log(\text{cfu/ml})\}$

$A =$ número de bacterias (asíntota) cuando el tiempo disminuye indefinidamente (por ejemplo, nivel inicial de bacterias) $\{\log(\text{cfu/ml})\}$

$C =$ Cantidad de crecimiento (asintótico) que ocurre cuando el tiempo aumenta indefinidamente $\{\log(\text{cfu/ml})\}$

$M =$ tiempo en el que el valor absoluto de crecimiento es máximo (hr.)

$B =$ Tasa relativa de crecimiento a M $\{\log(\text{cfu/ml})/\text{hr}\}$

Este ajuste a la curva debe posibilitar la definición de los parámetros necesarios para el modeling (B, M, C, A) en el caso de la función de Gompertz, buscando para su estimación la diferencia mínima de los mínimos cuadrados. Deben existir suficientes puntos de recuentos donde la pendiente de la línea cambia (superior e inferior). Si no se tienen suficientes puntos se obtendrá una estimación muy pobre de la pendiente máxima que se utilizará en el siguiente paso del modelamiento. Expresiones de la respuesta de crecimiento (tiempo de generación, tiempo de adaptación, ...) se pueden calcular a partir de los parámetros de Gompertz.

Tasa excepcional de crecimiento

$$\text{EGR} = b * c / e \{\log(\text{cfu/ml})/\text{hr}\}$$

Tiempo de generación

$$GT=(\text{LOG}2)^* e/ B*C \{ \text{Hr} \}$$

4.- MODELAMIENTO: Existen diferentes aproximaciones al “modelling”. Si se genera un número suficiente de curvas de crecimiento de buena calidad, y estas curvas incluyen condiciones cercanas a los límites de crecimiento con pH, temperatura, y actividad agua, una polinomial cuadrática sería adecuada para modelar los parámetros derivados de ajustar la curva de crecimiento, por ejemplo, en la ecuación de Gompertz; pero esto sería un simple ajuste de datos a una curva. Es necesario encontrar una ecuación con al menos parte mecánica, o sea, que tenga su origen en una realidad biológica.

No es posible dar un número exacto de curvas que se necesitan, a veces un buen modelo, que describe la variación del 90%, se puede lograr con 30-35 curvas. En otras ocasiones se necesitan más.

5.- VALIDACIÓN: Habiendo obtenido un modelo que parece adecuado, se lo enfrenta a datos experimentales, por ejemplo, valores predictivos para respuestas de crecimiento son comparados con aquellos que en ese momento se obtienen en el laboratorio. Este modelo, aún pareciendo bueno necesita su validación comprando las respuestas de crecimiento conocidas (tiempos de generación, tasa de crecimiento, densidad máxima, etc. que han sido publicadas en la literatura científica) con los valores generados por el modelo en las mismas condiciones. En algunos casos la coincidencia es excelente, otras veces, la literatura no tiene muchos ejemplos. Los modelos derivados de medios de laboratorios coinciden bien con las respuestas de crecimiento del microorganismo en el alimento. Si la correlación entre los parámetros de crecimiento predictivos y reales del alimento es pobre, deben existir otros factores que influyen sobre el crecimiento. Zwietering y cols. (1994) han realizado un estudio reciente sobre la validación de los modelos y transformaciones que se realizan a los datos.

6.- PREDICCIÓN: Solo después que el modelo haya sido validado, ya sea basándose en la literatura que incluye varios ejemplos de crecimiento en alimentos con amplio rango de propiedades, o por estudios de inoculación en paquetes, puede tenerse la garantía de que el modelo puede ser usado en predicciones (FLAIR , 1993).

Un **modelo matemático** se puede representar por la fórmula:

$$y = \alpha + \beta * x_1 + \gamma * x_2 + \varepsilon$$

donde:

y es la variable dependiente o de respuesta. En el caso de modelos cinéticos de crecimiento esta sería la tasa o duración de algún proceso de crecimiento microbiano.

α , β y γ son los parámetros que se calculan a partir de los datos y se ajustan minimizando las diferencias entre los valores predictivos y los observados.

x_1 , x_2 son las variables independientes, también llamadas explicativas o predictoras (temperatura, pH, sal, etc), las cuales se fijan en el experimento, y serían las que explicarían la magnitud de la respuesta del microorganismo observada.

ε es el error, o sea, la diferencia entre el valor observado y el predicho (McMeekin y Olley, 1993).

El modelo se formula describiendo una relación conocida o asumida entre la variable independiente y las variables de respuesta o dependientes, pero son los parámetros de la ecuación los que cuantifican la relación. Los parámetros son constantes para unas condiciones dadas y se calculan a partir de los datos obtenidos de forma que se ajusten a ellos lo más posible. La forma usual de valorar la estimación de los parámetros es a través de minimizar los valores residuales. (McMeekin y Olley, 1993). Un modelo predictivo pretende estimar tanto los parámetros como los valores residuales.

Para cualquier sistema se asume que existe una representación matemática o física precisa de todos los fenómenos que ocurren en el sistema. En muchas situaciones sin embargo, a priori no se conoce cual es el modelo y es lo primero que el investigador debe establecer (Iyengar, 1984).

El modelo debe ser lo más abstracto posible pero seguir siendo predictivo. En otras palabras, un modelo es algo que imita bien y resalta los factores relevantes del sistema en consideración. La “bondad” de un modelo se mide por la exactitud con la cual el modelo puede predecir las características del sistema. (Iyengar, 1984).

TIPOS DE MODELOS

Podría considerarse que existen dos tipos de modelos matemáticos según su finalidad, el tipo de bacteria que se pretenda modelar y su repercusión en la alteración del alimento o en su seguridad: un grupo sería el de los modelos probabilísticos que predicen la probabilidad de que ocurra un hecho y otro sería

el de los modelos cinéticos, que son los más útiles y que predicen la concentración microbiana según esté afectada por diversos factores (Buchanan, 1992).

El primer grupo, los **modelos probabilísticos**, se utiliza más con microorganismos cuya sola presencia constituye un riesgo (por ejemplo las esporas del *Clostridium*) y el segundo grupo, los **modelos cinéticos**, en aquellos microorganismos que no se consideran patógenos hasta un cierto nivel de crecimiento o no alteran la calidad hasta que no llegan a un cierto límite. (Buchanan, 1992).

Uno de los factores limitantes de estos modelos es el determinar cual es el error probabilístico real que se debería aceptar, sobre todo en casos en los que produzcan intoxicaciones fatales. Otra dificultad es establecer cual es el nivel de esporas iniciales en un producto y su traducción para establecer una vida media segura a un producto. Estos problemas se están resolviendo integrando los dos modelos probabilísticos y de cinética. Genigorgis y cols. En 1991, (referido por Buchanan, 1992) calcularon la probabilidad de germinación que condujera a la producción de la toxina.

Los modelos cinéticos de crecimiento predicen parámetros como el tiempo de adaptación y la tasa de crecimiento microbiano teniendo en cuenta los varios factores que la influyen. Muchos factores afectan a los alimentos aunque en realidad solo unos pocos influyen fuertemente sobre el crecimiento microbiano; estos son la temperatura, el pH y la actividad del agua.

Se habla de modelos lineales y no lineales. Esta linealidad se refiere a la relación entre los parámetros por los que una ecuación tal como:

$$y = \alpha + \beta^* x + \gamma^* x^2$$

Si bien es curvilínea, es una regresión lineal. La diferencia entre utilizar un modelo lineal o no lineal estriba en la forma de ajustar los datos y en las propiedades que tienen las estimaciones una vez ajustadas. (McMeekin y Olley, 1993).

Desde el punto de vista del modelling se llama modelos a aquellas funciones que tienen base mecánica o al menos parte de ella. Por ejemplo, el desarrollado por Baranyi y Roberts (1993), Schoofield y cols. (1984). Arrhenius (Broughall et al., 1983), Bělahrádek (McMeekin y Olley, 1993).

Varios modelos intentan predecir el crecimiento bacteriano con respecto a la temperatura. Los más conocidos son los siguientes:

1. Modelo Arrhenius no lineal (Broughall, et al., 1983).
2. Funciones sigmoidales (McMeekin, y Olley, 1993; Zwietering, et al., 1990).
3. Modelo Raíz cuadrada (Ratkowsky et al., 1983).
4. Modelo de formas polinómicas (Gibson y Roberts, 1986 a y b).

5. Modelo de Hinselwood (Zwietering, et al., 1990).
6. Modelo Arrhenius lineal (Davey, 1991).
7. Modelo Schoofield y cols. (Schoofield, et al., 1981).
8. Modelo Nuevo (Duh y Schaffner, 1993).
9. Modelo hiperbólico (Davey, 1991).
10. Modelo dinámico de Van Impe (Van Impe et al., 1992)
11. Modelo dinámico de Baranyi (Baranyi et al., 1993 a, b y c, Baranyi y Roberts 1993).
12. Función que relaciona la asíntota superior con la temperatura (Zwietering et al., 1991).

APLICACIONES

El ARICPC y la microbiología predictiva son conceptos complementarios donde la microbiología predictiva puede aportar un uso más poderoso del ARICPC al establecer objetivamente y cuantitativamente los efectos de cada fase del proceso con la calidad y seguridad del alimento (McMeekin y Olley, 1993). Estos autores establecen una comparación entre la definición de la ARICPC por el ICMSF (1991) y la definición de los estudios de la microbiología predictiva en los alimentos.

La definición de ARICPC establece que:

1. Análisis de riesgos: identificación del riesgo y establecimiento de la severidad en varias fases del procesado del alimento, distribución, almacenaje y uso.
2. Control de puntos críticos: puntos donde se debe ejercer el control para prevenir el riesgo o minimizarlo.
3. Especificación de los criterios para los factores intrínsecos, extrínsecos o de procesamiento para asegurar que el control se ha realizado.
4. Establecimiento de un sistema de monitorización de los puntos de control para responder rápidamente a situaciones no deseadas.

Para la microbiología predictiva se establecen los siguientes puntos equivalentes:

1. Identificar el germen responsable (alterante o patógeno).
2. Entender la ecología del germen y cuales son sus fuentes como así también la probabilidad de contaminación y los efectos del procesado, distribución, almacenamiento, etc., con números.
3. Comparar la información obtenida con los conceptos de aceptación o rechazo del proceso o para indicar la vida media que le queda al producto.

4. Incorporar la información en un equipo de moritorización para indicar la extensión de la proliferación microbiana (McMeekin y Olley, 1993).

La bondad de un modelo se mide por la exactitud con la cual el modelo puede predecir las características del sistema.

¿Cómo se sabe cuál es el mejor modelo?

El mejor ajuste no significa el mejor modelo (Baranyi, comunicación personal). El mejor modelo será aquel que prediga mejor los valores reales.

No siempre una ecuación sola es la que mejor se ajusta y predice los parámetros (μ , λ y A). Zwietering et al. (1994) hallaron para sus datos tres ecuaciones diferentes para cada uno de estos parámetros.

Los modelos predictivos se han desarrollado basándose en experimentos utilizando medios de cultivos o directamente productos alimenticios. Medios de cultivos como infusión cerebro-corazón (Buchanan, et al., 1993), triptosa agr (Buchanan y Klawitter, 1990), agar nutritivo (Ratkowsky, et al., 1983), etc.

Se han realizado modelos a partir de productos como carnes y productos cárnicos (Nderu y Genigeorgis, 1975; Rödel et al., 1976; Daud et al., 1978; Jarvis y Patel, 1979; Pooni y Mead, 1984; Zurera Cosano et al., 1988; Zandoni, et al., 1993), leche (Bin, et al., 1991; Griffiths y Philips, 1988; Muir y Philips, 1984), vegetales (Guerzoni et al., 1992; Marchetti et al., 1992; Russel et al., 1992), salsas (Zandoni et al., 1993) y pescado (Charm et al., 1972; James y Olley, 1971; Olley y Ratkowsky, 1973).

Los microorganismos sobre los que se han realizado modelos predictivos son muchos, entre ellos los más estudiados fueron; *Clostridium botulinum* (Baker y Genigeorgis, 1990; Gibson et al., 1987, Gibson y Roberts, 1982; Jarvis y Patel, 1979; Roberts et al., 1981, a, b, c, 1982, Roberts y Ingram, 1973, Roberts y Jarvis, 1983); *Clostridium perfringens* (Yip y Genigeorgis, 1981); *Listeria monocytogenes* (Saguy 1992; Buchanan y Philips, 1990, Buchanan y Klawitter, 1990), *Yersinia enterocolitica* (Adams et al., 1991; Sutherland y Bayliss, 1994; Little et al., 1994); *Staphylococcus* (Buchanan, et al. 1993 b, Genigeorgis et al., 1971 a, b; Nderu y Genigeorgis et al., 1975); *Salmonella* (Broughall et al., 1983, Broughall y Brown, 1984, Genigeorgis et al., 1977, Gibson et al., 1988); *Aeromonas hydrophila* (Guerzoni et al., 1992; Palumbo et al., 1992); *E. coli* (McClure y Roberts, 1987); *Bacillus cereus* (Raevouri y Genigeorgis, 1975); *Pseudomonas* (Membré y Burlot, 1994); psicrófilos (Stannard y Williams, 1985), bacterias acidolácticas (Zurera Cosano et al., 1988; Nicolai et al., 1993) y levaduras (Gardini et al., 1990).

Se han desarrollado varios programas para modelamiento de datos como es el de BUCHANAN, BARANYI, MICROMODEL, CUPPER, SINFIT, cuyo uso es restringido para trabajos de investigación.

La exactitud de la predicción se ve afectada en diferentes grados por numerosos factores como el diseño adecuado, que incluye las especificaciones adecuadas del sistema, sus alrededores y líneas limítrofes y también la identificación y definición de individuos y las interrelaciones de factores endógenos y exógenos, algunos de los cuales pueden ser variables dependientes y otras independientes.

Cuando no se tiene cierta información fundamental para la construcción de un modelo se acepta una serie de premisas, las cuales harán que las conclusiones que se elaboren con dicho modelo estén influenciadas por estas premisas. Por lo tanto premisas falsas llevan a conclusiones erróneas.

Otros beneficios del modelling son:

- El diseño de experimentos de laboratorio con resultados valiosos.
- Evaluación de resultados experimentales conflictivos.
- Ofrecer explicación a diferentes resultados.

Si se ejecuta adecuadamente, un modelo sería mucho más eficiente que un proceso teórico o experimental individual.

Farber (1986) menciona como limitación de la información obtenida por los modelos predictivos:

1. No se deben realizar predicciones o extrapolaciones fuera de límites del experimento.
2. Los experimentos realizados en medios de cultivos no deberían ser usados para predecir el crecimiento o la producción de toxinas en alimentos. (Genigeorgis et al., 1971 b; Raevouri and Genigeorgis 1975).
3. No se puede realizar aseveraciones que no podrá crecer o no producirá una toxina en un determinado alimento. Pequeñas variaciones del alimento pueden producir un aumento o disminución de la probabilidad de crecimiento o producción de la toxina, por lo que solo se puede asegurar con certeza el efecto relativo que producirá la combinación de tratamientos (Roberts et al., 1981 c).

Bibliografía.

Está a disposición del que esté interesado.