

## V WORKSHOP SOBRE MÉTODOS RÁPIDOS Y AUTOMATIZACIÓN EN MICROBIOLOGÍA ALIMENTARIA

Como ya nos hicimos eco, hace unos meses, en las páginas de la revista, el pasado mes de noviembre se celebró en la Facultad de Veterinaria de la Universidad Autónoma de Barcelona el V Workshop sobre Métodos Rápidos y Automatización en Microbiología Alimentaria, con el objetivo de ampliar y difundir los conocimientos teóricos y prácticos sobre métodos innovadores para detectar, contar, aislar y caracterizar rápidamente los microorganismos habituales en los alimentos y el agua. Por su alto grado de interés, recogemos en este número los resúmenes de las principales ponencias presentadas en el marco de este evento, que estuvo dirigido a directores y técnicos de laboratorios e industrias agroalimentarias, inspectores veterinarios, profesionales de empresas de microbiología, profesores y estudiantes de tercer ciclo y de diversas diplomaturas y licenciaturas.

### ULTRASONIDOS PARA LA DETECCIÓN Y EL ANÁLISIS NO INVASIVO DE MICROORGANISMOS EN PRODUCTOS LÁCTEOS

Domingo Terroba, José Ramón Iglesias

[domingo.terroba@capsa.es](mailto:domingo.terroba@capsa.es) / [jose.iglesias@capsa.es](mailto:jose.iglesias@capsa.es)

#### ANTECEDENTES

Existen trabajos que mencionan la utilización de los ultrasonidos para la detección de la degradación de alimentos envasados (Gestrelus et al., 1991), utilizando una técnica ultrasónica de medida por efecto doppler, del "streaming" acústico. Con un concepto distinto, Ahvenainen et al. usaron la ecografía para la detección de microorganismos (Ahvenainen et al, 1989). Este método no es apto para su uso en envases de cartón, ya que los sistemas ecográficos carecen de la sensibilidad adecuada para ello. En una patente del año 1987, M. Nagata et al. describen un método ultrasónico para la detección de microorganismos en productos envasados a través de la medida de transmisión de propagación ultrasónica. Hæggström (1997) fue capaz de mejorar la precisión del sistema de Nagata, detectando contaminaciones en leche y sopa en etapas tempranas de crecimiento, aunque se vio obligado

a utilizar envases modificados para poder sumergirlos en agua.

#### ESTUDIO PRELIMINAR

Se inició primeramente un estudio de muestras en envases de cristal de laboratorio con objeto de determinar la capacidad de detectar una amplia variedad de contaminaciones en leche mediante un dispositivo de medida de transmisión de señales ultrasónicas. Los envases de cristal favorecieron la posibilidad de realizar el control térmico a través de un baño líquido.

Las muestras de leche eran inoculadas y envasadas en botellas de vidrio de 250 ml. Las botellas con las muestras se almacenaban en una nevera para su conservación a 4°C, durante un tiempo siempre inferior a 5 días y hasta su uso para la medida. De forma paralela se inoculaban otras botellas con la misma concentración de microorganismos para poder correlacionar las medidas de propagación ultrasónica con las

medidas de crecimiento bacteriano mediante PCA.

El dispositivo experimental aparece esquematizado en la figura 1. En él podemos apreciar un sistema emisor, un sistema receptor y el baño donde las muestras de leche se mantienen a la temperatura constante de 35°C. El sistema emisor consta de un transductor piezoeléctrico alimentado eléctricamente por un generador de funciones Agilent 33120, que proporciona a dicho transductor trenes de onda de 10 V pico a pico. El sistema receptor está formado por un transductor piezoeléctrico que envía la señal a un osciloscopio Tektronix TDS520. Por último, las señales capturadas se almacenan en un ordenador a través de un software desarrollado para esta aplicación. Los transductores (figura 2) están fabricados en base a un disco piezoeléctrico PZ 27 (Ferroperm) de 20 mm de diámetro. Se les ha dotado de una contramasa de Araldite -Ciba&Geigy- y una línea de retardo de metacrilato. Se realizaron estudios con distintas frecuencias de

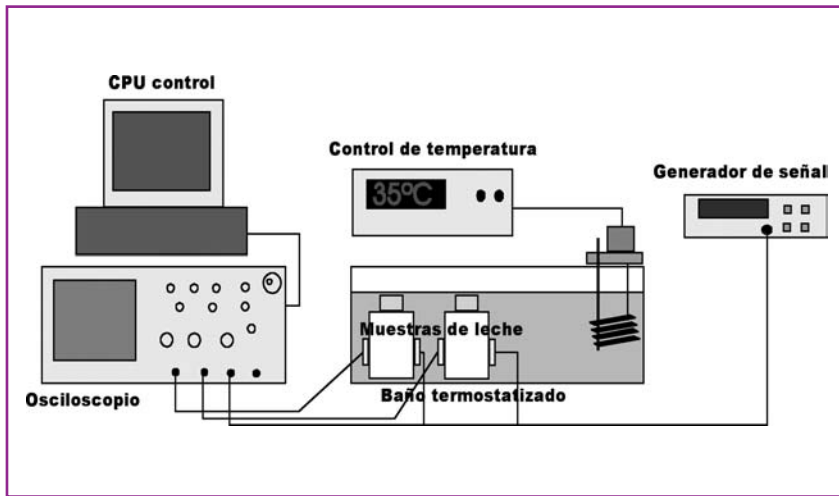


Figura 1.- Esquema de la técnica experimental de medida.

trabajo entre 1 y 4 MHz. El baño termostático dispone de un control de temperatura con una precisión de 0,01°C. Sin embargo, al no estar diseñado el tanque de agua para esta aplicación específica, pueden aparecer gradientes y fluctuaciones de temperatura del orden de la décima de grado. Por ello, se estimó conveniente realizar la medida con una referencia de leche estéril que permita eliminar el error experimental que proviene de los defectos de control de temperatura del baño. Para obtener los parámetros acústicos relevantes de cara a la detección del crecimiento de microorganismos, se adquirieron las señales a través del osciloscopio y se almacenaron en el

ordenador a intervalos de 3 minutos. El estudio de los parámetros acústicos se realiza a través del espectro en frecuencia de la señal adquirida. El módulo y la fase de la transformada proporcionan información de la amplitud de la señal y de la velocidad de propagación, respectivamente.

Las pruebas llevadas a cabo revelaron claramente la presencia microbiana en la leche. La figura 3 muestra las curvas de variación de la velocidad en las cuales se pone de manifiesto la multiplicación de los microorganismos a través del aumento de la diferencia entre la velocidad de propagación desde el comienzo de la incubación a 35°C. El paso de la zona gris a la zona

amarilla podría marcar un posible criterio para considerar como positiva la detección en un ensayo de crecimiento microbiano. En estas curvas aparecen notables diferencias entre unos microorganismos y otros, lo cual puede ser indicativo del inóculo y del tipo de contaminante de la muestra de leche. Se aprecia que la medida ultrasónica de la leche infectada con *Bacillus cereus* es la que pone de manifiesto más precoz y claramente la presencia bacteriana, mientras que la presencia de *Micrococcus*, con un lentísimo crecimiento, se advierte pasadas unas 30 horas y con un leve cambio en la velocidad de propagación. Hay otros aspectos interesantes, como las distintas fases que se aprecian en la detección del crecimiento del *B. subtilis* que podrían estar relacionados con distintos procesos metabólicos.

De esta manera, se estableció la potencialidad de la medida ultrasónica como método de detección de posibles contaminaciones microbianas en la leche durante las etapas iniciales de crecimiento de dichas contaminaciones. Según esto, la detección tiene lugar antes de que se produzcan cambios drásticos en las propiedades físico-químicas de la leche. Otra importante característica del procedimiento de detección ultrasónica de microorganismos es su relativa inespecificidad, mostrándose válido para un amplio espectro de contaminaciones, si bien es cierto que la velocidad de detección no es la misma para los distintos microorganismos. Esto puede proporcionar pistas acerca de la naturaleza del microorganismo principal responsable de una determinada contaminación. Sin embargo, para poder realizar una discriminación entre microbios sería necesario un estudio estadístico mucho más amplio de las posibles contaminaciones. El hecho de que en muchos casos, éstos no se deban a un sólo microorganismo dificulta aún más la discriminación entre ellos. La variación de los distintos parámetros que caracterizan la propagación ultrasónica en leche contaminada parece depender de distintas causas como son el tamaño y número de microorganismos presentes, el tipo de metabolismo y las características del sustrato lácteo en el que crecen.

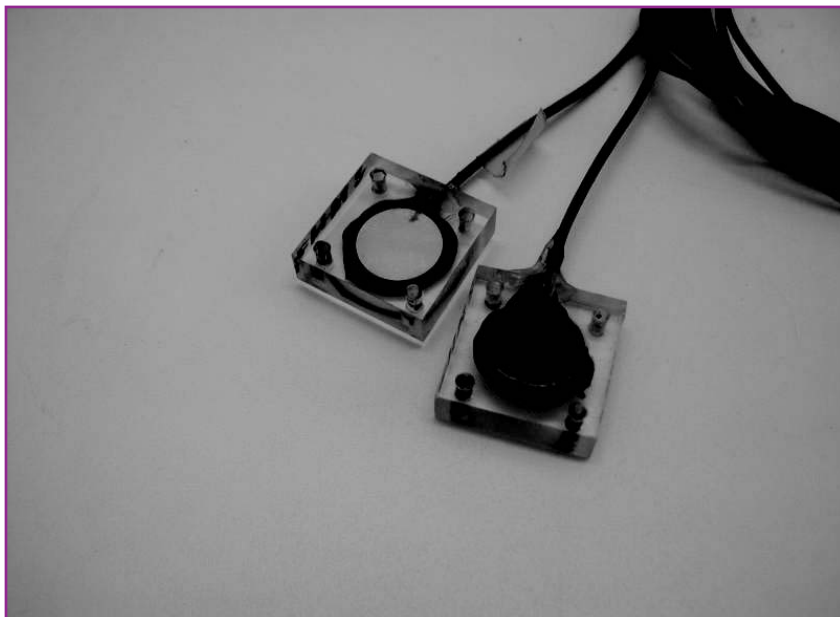


Figura 2.- Vista trasera y delantera de 2 transductores para medidas de transmisión.

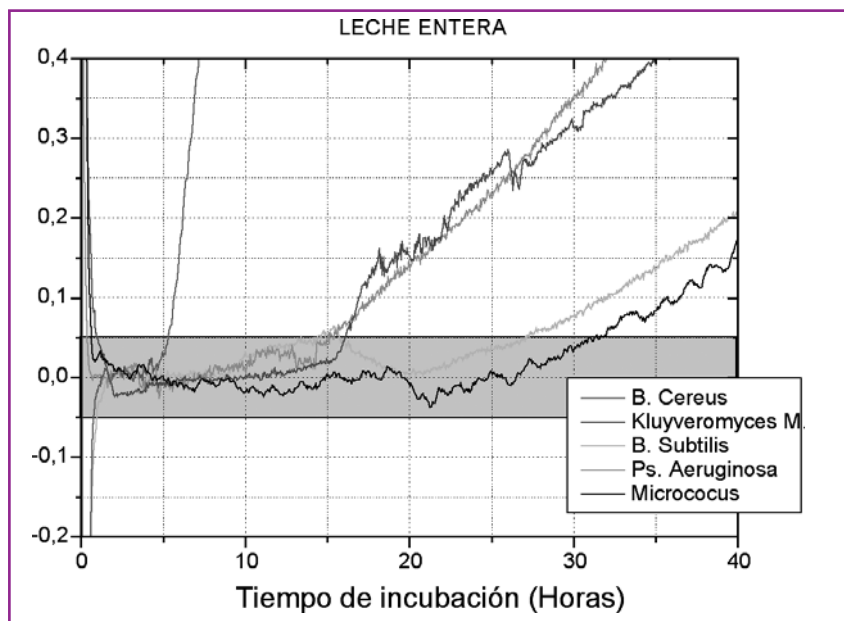


Figura 3.- Velocidad de propagación en leche entera contaminada por distintos microorganismos.

**Control térmico en paquetes laminados de cartón**

Para llevar a cabo las medidas de propagación ultrasónica a través de envases de cartón fue necesario cambiar el sistema de control térmico que pasó de un baño líquido a una estufa. Al igual que el baño de agua, esta cámara se estabilizaba a 35°C. Esto supuso realizar cambios en los propios transductores que ahora habían de incorporar unos discos elásticos de silicona de unos 2 mm de espesor y 40 mm de diámetro, ligeramente convexos, permitiendo una adecuada transmisión de la onda ultrasónica entre estos y el envase. La atenuación de la onda, por otro lado, es un factor especialmente importante en envases con capas de papel, ya que puede dar lugar a la pérdida total de la señal ultrasónica antes de poder ser recibida. Se escogió una frecuencia de trabajo de 1 MHz. En la figura 4 se muestra la variación de temperatura que experimenta el aire del interior de la cámara (rojo) desde que se conecta el sistema de control de temperatura, partiendo de temperatura ambiente. En negro se presenta el calentamiento de la leche en el interior del envase, partiendo también de temperatura ambiente. Se puede apreciar que hay una notable diferencia entre la media hora que tarda la cámara en ponerse a la temperatura de incuba-

ción de 35°C, y las 13-15 horas que tarda la leche en alcanzar dicha temperatura. Esto es debido a las buenas prestaciones que como aislante térmico tienen este tipo de envases. Durante el tiempo que la temperatura va aumentando, también lo hace la velocidad de propagación. Para poder distinguir claramente que las variaciones de velocidad son debidas a la presencia de microorganismos en la leche y no a un cambio en temperatura es deseable alcanzar la temperatura de incubación lo antes posible. Esto

nos obligó a buscar otras formas más eficaces de calentar la leche en el interior del envase, a través de resistencias en contacto directo con los mismos. De esta forma, el tiempo de incubación se vio reducido apreciablemente, según se aprecia en la figura 5.

**Control de la humedad**

A lo largo de numerosos ensayos se pudo comprobar que, a pesar de que la temperatura de la leche en el interior de los envases llegaba a estabilizarse al cabo de un tiempo, la velocidad de propagación de la señal ultrasónica no alcanzaba la estabilización ni tan siquiera después de 2-3 días de medida. Finalmente se descubrió que, a pesar de las capas plásticas externas del envase, el cartón era capaz de intercambiar humedad con el ambiente, siendo este intercambio muy lento. Desafortunadamente, pequeños cambios en el contenido de humedad del envase provocan variaciones en la medida de la amplitud y velocidad de propagación comparables a las producidas por la presencia de microorganismos en la leche. Estos cambios lentos producidos por las variaciones en el contenido de humedad se pueden observar simplemente añadiendo o retirando un recipiente con agua del interior de la estufa. De esta forma, se midió el tiempo

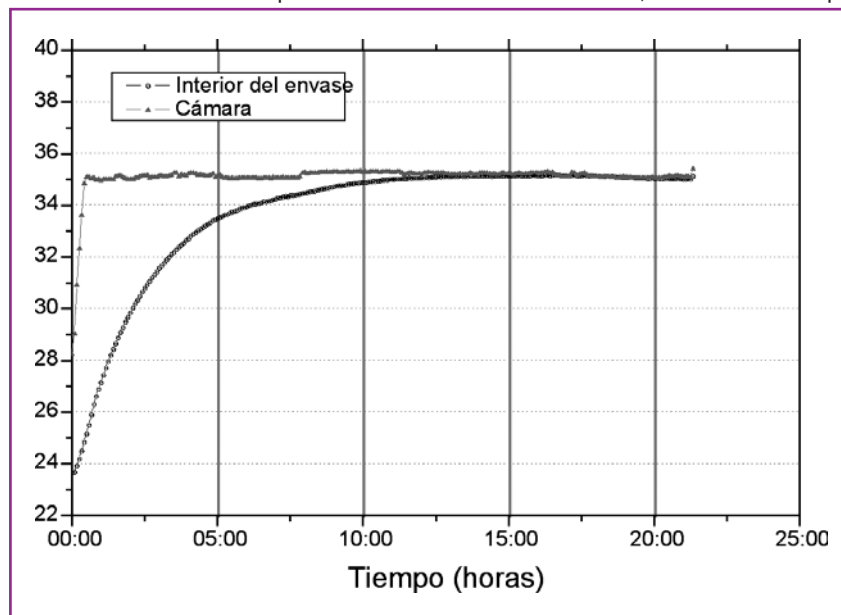
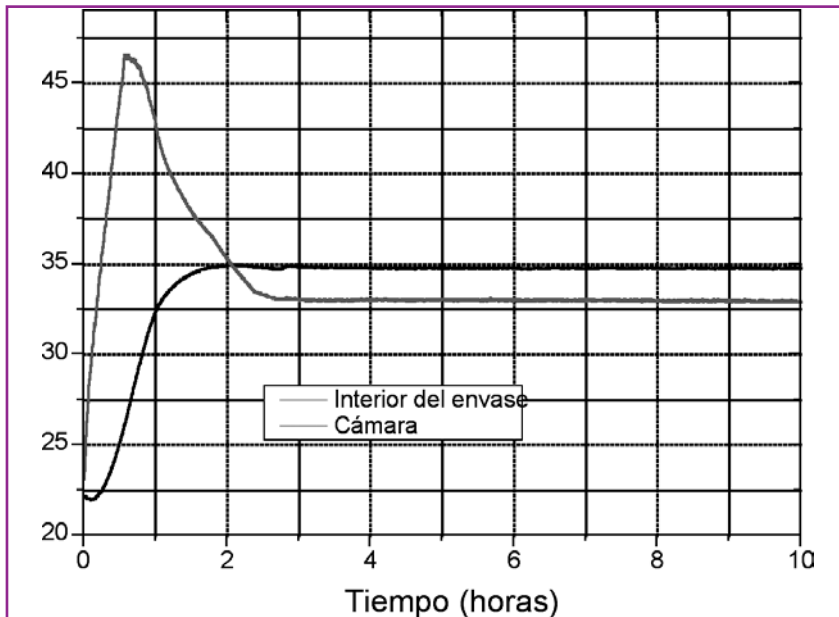


Figura 4.- Curvas de estabilización térmica de la cámara (rojo) y la leche dentro del envase (negro) partiendo de temperatura ambiente.



**Figura 5.-** Temperatura de la cámara (rojo) y de la leche en el interior del envase (negro) utilizando la placa de calentamiento en contacto.

de vuelo de una onda ultrasónica al atravesar una capa del laminado del envase. El resultado aparece en la figura 6 donde se aprecian los cambios evidentes en dicho tiempo al variar las condiciones de humedad, de manera que cuando ésta decrece, también lo hace el tiempo que tarda la señal en atravesar el material. Estos resultados indican la necesidad de realizar no sólo un adecuado control térmico de las muestras de leche, sino también de la humedad ambiente en el lugar donde se realizan los ensayos de detección microbiológica.

**Esquema del prototipo:  
descripción de los elementos**

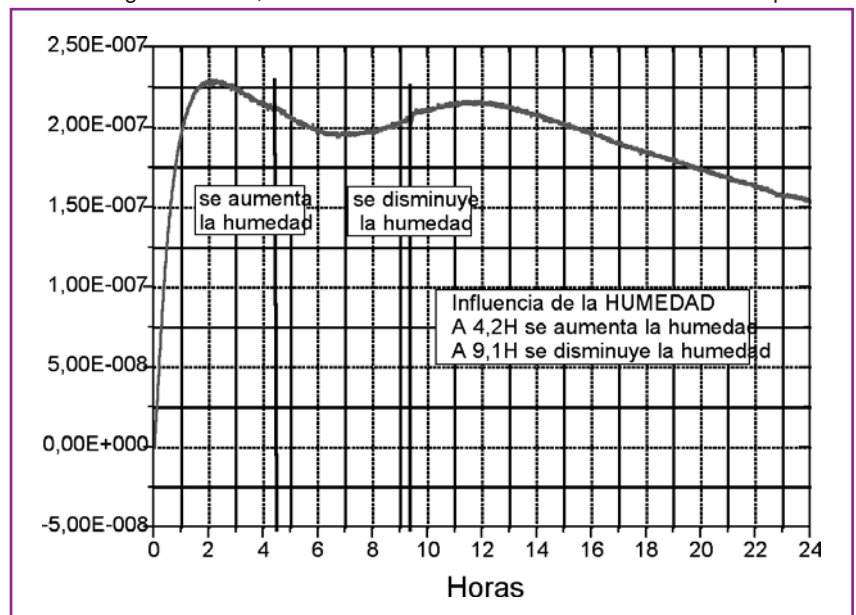
A continuación, se diseñó y desarrolló un prototipo con 8 alojamientos para poder analizar simultáneamente 8 envases. Este prototipo se ha realizado según las especificaciones contempladas en la Patente PCT/ES 03/00287 (Elvira et al., 2003). El cuerpo principal del sistema de medida lo constituye una cámara climatizada en temperatura y humedad (Figura 7) a la cual van sujetos los 8 alojamientos. A dicha cámara han de llegar las conexiones eléctricas pertinentes, tanto para realizar la climatización, como para la transmisión de señales entre los emisores y receptores de ultrasonidos con los sistemas electrónicos de

generación y detección de señales, respectivamente. Asimismo, el sistema dispone de una conexión de agua para llevar a cabo el control de humedad. La climatización se controla a través de dispositivos tipo PID que regulan la temperatura de cada uno de los 8 alojamientos, así como la temperatura y la humedad general de la cámara principal. La electrónica de excitación y recepción de ultrasonidos (Figura 8) la componen un generador de señal Agilent 33120, un osciloscopio

digital Tektronix 220 y un multiplexor de 8 canales de emisión y 8 de recepción desarrollado en la Universidad de Jaén. Este multiplexor, comandado por el ordenador de control vía RS-232, pone en conexión el generador y el osciloscopio con la pareja emisor-receptor de ultrasonidos de cada canal, sucesivamente. Los transductores ultrasónicos, desarrollados en el Instituto de Acústica específicamente para este prototipo, se diseñaron para una frecuencia de trabajo de 800 kHz. Las señales capturadas por el osciloscopio se envían vía GPIB a la CPU de control, donde son tratadas e interpretadas para evaluar el estado de la leche. Todo el proceso de medida viene comandado por la CPU a través de un software desarrollado en LabView, mediante el cual se mide la propagación ultrasónica en los 8 canales sucesivamente, se registran los datos de humedad y temperatura y se obtienen y analizan las señales del osciloscopio. Por último, el algoritmo de interpretación de datos desarrollado, activa una alarma en el caso de que las medidas indiquen un crecimiento microbiano en un determinado paquete.

**Resultados experimentales**

El desarrollo de las pruebas para evaluar el funcionamiento del dispositivo



**Figura 6.-** Variación del tiempo de vuelo de la señal al atravesar una muestra de pared del envase para distintas condiciones de humedad.





Figura 7.- Cámara de medida y cuadro de control de climatización

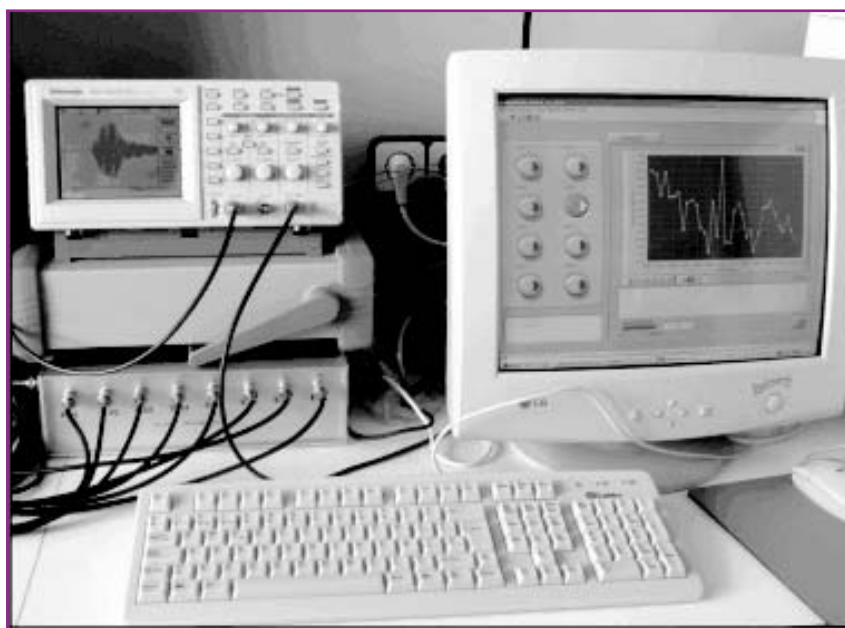


Figura 8.- Electrónica de generación y recepción y CPU de control con el software activo.

consistió en la medida de paquetes de leche recién envasada, estéril, y otros inoculados con distintos microorganismos. Paralelamente se realizaban recuentos microbianos por PCA del inóculo, así como de la leche después de haber sido analizada mediante ultrasonidos, comparándose los resultados del prototipo con dichos recuentos. Se tomaban 8 paquetes de leche de los cuales 6 eran inoculados y 2 se dejaban como estériles. Tras la incubación se procedía al análisis microbiológico (PCA, Bactometer, Promilite

III de Promicol) y físico-químico (pH, acidez y estabilidad al etanol) de las muestras inoculadas.

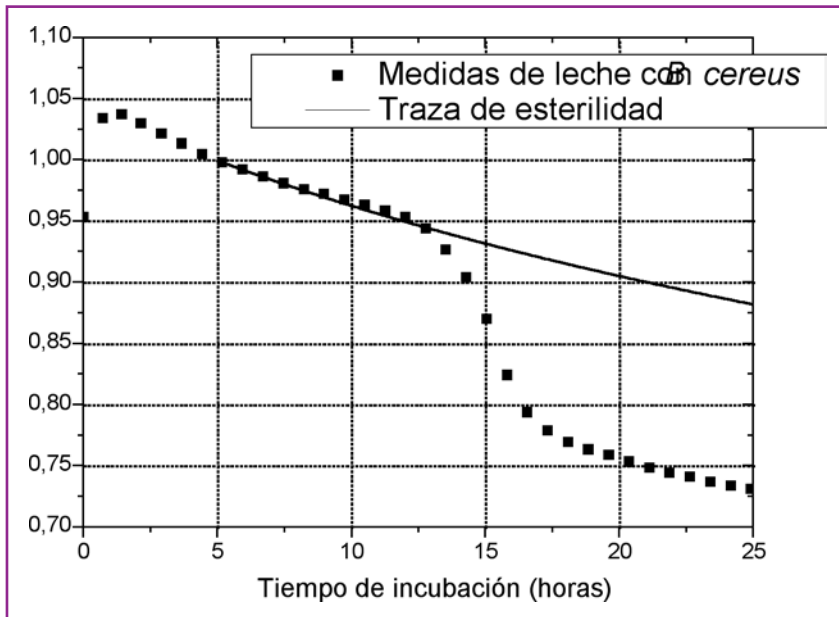
A partir de un conjunto estadísticamente significativo de curvas estériles (amplitud y tiempo de vuelo) pertenecientes a paquetes recién salidos de línea se estableció el comportamiento de la curva de esterilidad de cada envase. Dicha curva alude al trazo que se obtendría en la medida en el caso de que un determinado paquete fuera estéril. Esta curva es calculada para cada paquete (ya que las medi-

das de cada paquete son ligeramente distintas unas de otras) durante las primeras horas de medida, en particular entre la quinta y séptima horas. Hasta la quinta hora entendemos que las variaciones obtenidas en las medidas de los parámetros ultrasónicos responden a la estabilización en temperatura y humedad de los paquetes. En las figuras 9 y 10 se muestran ejemplos de detección de *B. cereus* y *P. vulgaris* atendiendo a la medida de la amplitud de la onda y de su tiempo de vuelo respectivamente. Se han encontrado distintos comportamientos para la amplitud y el tiempo de vuelo para los distintos microorganismos inoculados. Esto muestra que la dependencia entre los parámetros ultrasónicos y el crecimiento microbiano responde a diferentes efectos que dicho crecimiento produce en la leche. Podemos estar hablando de aumento en la viscosidad debido a los productos de desecho del metabolismo, cambio en las propiedades elásticas debidos a cambios en la estructura de las proteínas, e incluso a mejora del acoplamiento transductor-paquete en aquellos casos en los que el crecimiento de bacterias produce gas en abundancia, incrementándose la presión en el interior de los paquetes (los cuales pueden llegar a romperse si no se extraen a tiempo de la cámara de medida). Se pudieron asimismo apreciar similitudes entre especies correspondientes al mismo género.

## CONCLUSIONES

El aumento de la automatización y el control en la industria alimentaria está llevando a la incorporación de numerosos sensores. En muchos casos, se utilizan distintas técnicas de medida que proporcionan información complementaria de los procesos analizados. En este escenario es esperable la aparición de nuevos sistemas de ultrasonidos junto con otras técnicas de análisis (biosensores, sensores ópticos, infrarrojos,...) en las cadenas de producción y control de calidad de alimentos.

En el presente trabajo, se han mostrado algunas posibles aplicaciones de la medida de los parámetros de propa-

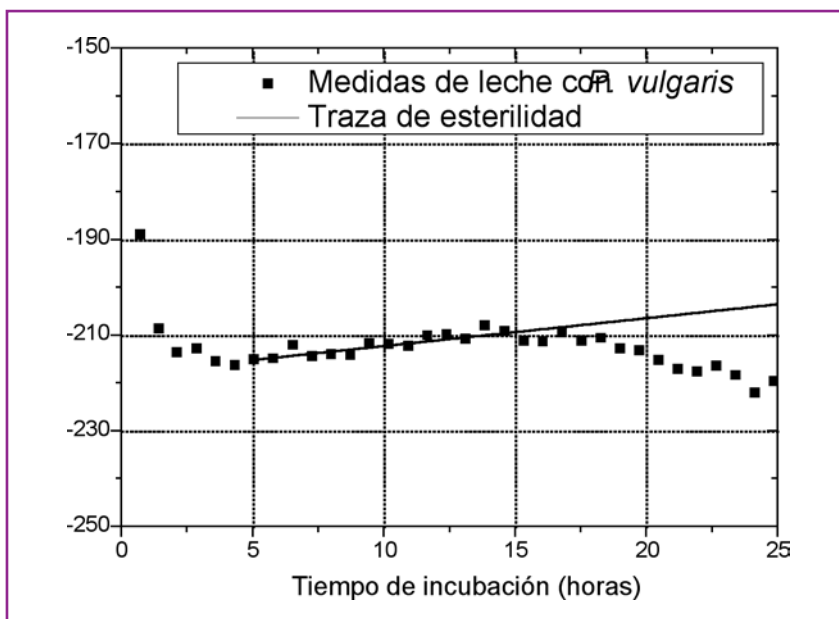


**Figura 9.-** Amplitud de la onda medida en leche inoculada con *B. cereus* (cuadros). A partir de la hora 13 se aprecia una notable diferencia con respecto al comportamiento de la curva de esterilidad (línea continua).

gación ultrasónica al control de procesos de producción de alimentos. Las técnicas ultrasónicas son, en general, muy robustas, pero posiblemente su principal ventaja es la posibilidad de caracterizar materiales de forma no invasiva. Esto hace posible la detección de contaminaciones en leche envasada sin abrir dicho envase o el seguimiento de un proceso fer-

mentativo sin introducir un sensor en el interior del reactor, según se ha descrito. De esta manera se evitan posibles contaminaciones, peligro siempre presente en aquellas técnicas de medida que precisan la extracción de muestras.

Sin embargo, las medidas ultrasónicas suelen ser medidas indirectas, es decir, medidas en las que las magnitu-



**Figura 10.-** Tiempo de vuelo de la onda medida en leche inoculada con *P. vulgaris* (cuadros). A partir de la hora 18 se aprecia una notable diferencia con respecto al comportamiento de la curva de esterilidad (línea continua).

des detectadas se relacionan con alguna característica del medio que es la que realmente nos proporciona la información que se busca. Esta característica pone de manifiesto la carencia en muchos casos de modelos válidos y estudios tanto teóricos como experimentales que permitan relacionar las distintas magnitudes. Por ello es necesario realizar un intenso trabajo en este sentido que aumente las capacidades de las técnicas ultrasónicas para obtener información de los procesos industriales de elaboración de alimentos que pretendan ser inspeccionados mediante ellas.

## Bibliografía

- 1.- Ahvenainen, R, Mattila, T, Wirtanen, G, 1989. Lebensm.-Wiss. Technol. 22, 268-272.
- 2.- Becker, T., Mitzscherling, M., Delgado, A., 2001. Engineering Life Science 1(2), 61-67.
- 3.- Gestrelus, H., Mattila, T., Ahvenainen, R., 1991. Trends in Food Science and Technology 5 (12), 379-383 .
- 4.- Elvira, L., Montero de Espinosa, F., Resa, P., Gómez-Ullate, Y, 2003. Patente Europea PCT/ES 03/00287.
- 5.- Hæggström, E., 1997. Applied Physics Series No. 214. 1-115. Espoo, Finland.
- 6.- Kress-Rogers, E. and Brimelow, C.J.B., 2001. Instrumentation and sensors for the food industry, 2nd ed., pp.355-402. Cambridge, England: Woodhead Publishing Limited.
- 7.- Nagata, M., Kaneoka, T., Imano, S., Matumoto, H., 1987. Fujimori Kogyo Co. Ltd.. EP269815.
- 8.- Rodríguez, A., Canosa, J. & Tojo, J. (2001). J. Chem. Thermodynamics, 33, 1383-1397.
- 9.- Urick, J.R., (1947). Journal of Applied Physics 18, 983-987.
- 10.- Valtz, A., Coquelet, C., Nikitine, C. & Richon, D. (2006). Thermochimica Acta, 443, 251-255.
- 11.- Winder, W.C., Aulik, D.J., Rice, A.C., 1970. American Journal of Enology and Viticulture 21 (1), 1-11.

# MÉTODOS RÁPIDOS Y AUTOMATIZACIÓN EN MICROBIOLOGÍA ALIMENTARIA

Josep Yuste, Daniel Y. C. Fung y Marta Capellas

CER Planta de Tecnología dels Aliments (CeRTA, XIT), Departament de Ciència animal i dels aliments, Facultat de Veterinària, Universitat Autònoma de Barcelona. 08193 Bellaterra, Cerdanyola del Vallès

## RESUMEN

El número de ensayos microbiológicos aumenta año tras año, con grandes progresos en el desarrollo de métodos fáciles de usar y que aseguran rapidez, precisión, sensibilidad y especificidad en la obtención de los resultados, a un coste moderado. Los métodos microbiológicos rápidos y automatizados permiten a los industriales lanzar sus productos más rápidamente al mercado, garantizando su seguridad y su conservación.

Los avances en instrumentación están posibilitando contar las células viables más rápida y eficientemente. El test ELISA/ELFA (*enzyme-linked immunosorbent assay/enzyme-linked fluorescent assay*), el método inmunológico más usado, está totalmente automatizado y consolidado en muchas empresas alimentarias. La detección de ATP se usa actualmente para evaluar en tiempo real la limpieza y la desinfección en la industria alimentaria, con sistemas de bioluminiscencia.

La aplicación de la biología molecular en los alimentos está ganando importancia. El método más usado es la PCR (*polymerase chain reaction*), sobre todo en tiempo real. En el futuro, los biosensores estarán en las líneas de procesamiento de alimentos. Y en este campo, también se trabaja en biochips y microchips.

**Palabras clave:** microbiología alimentaria / métodos rápidos / automatización / patógenos / seguridad / conservación.

## INTRODUCCIÓN

El número de ensayos microbiológicos aumenta año tras año en muchos sectores industriales (alimentación, bebidas, farmacéutica, cosmética, medio ambiente, etc.), con grandes progresos en el desarrollo de métodos fáciles de usar y que aseguran rapidez, precisión, sensibilidad y especificidad en la obtención de los resultados, a un coste moderado. En 2003, se hicieron 1.136,5 millones de ensayos microbiológicos en el mundo, que equivale a casi 2.700 millones de euros. La industria alimentaria es el principal mercado, con un 49%. La de las bebidas representa un 9%. Se prevé que en 2008, el número de ensayos microbiológicos aumentará a 1.505,3 millones (casi 4.150 millones de euros).

Los métodos microbiológicos rápidos y automatizados permiten a los industriales lanzar sus productos más rápidamente al mercado, garantizando su seguridad y su conservación. Puede evitarse lo más rápidamente posible que una materia prima contaminada entre en la cadena alimentaria, y que un producto final en mal estado micro-

biológico salga de la industria. Y puede determinarse si, en los diversos puntos de control crítico, el producto y el ambiente de la industria están en buen estado microbiológico. Estos métodos posibilitan analizar más tipos de alimentos en la industria. Actualmente, se aplican sobre todo a carne, carne de ave, productos lácteos y de la pesca, etc., y se prevé que su uso en frutas y verduras aumentará.

Un 20% de los ensayos microbiológicos hechos en la industria alimentaria es para analizar patógenos, como *Salmonella* spp. y *Escherichia coli* O157:H7. El 80% restante son ensayos rutinarios, como el recuento total, el de coliformes, y el de mohos y levaduras. Durante los próximos años, el porcentaje de ensayos en patógenos aumentará en un 10%, al aplicarse los nuevos criterios y las nuevas normativas, y porque emergen nuevos patógenos. El reparto del número de ensayos microbiológicos en la industria alimentaria es aproximadamente: 33% en América del Norte, 33% en Europa y 33% en el resto del mundo. Durante los próximos diez años, esto cambiará a 25% en América del Norte, 25% en Europa y 50% en el resto del mundo, ya que

otros países (China y otros con economías crecientes) están concienciándose de la importancia de la seguridad alimentaria.

Los principales patógenos de interés para la industria alimentaria son *Salmonella* spp., *Campylobacter* spp., *Clostridium* spp., *Staphylococcus aureus*, *E. coli* y *Listeria monocytogenes*. Cepas de estas bacterias, a veces resistentes a algunos antibióticos, están asociadas a muchas enfermedades de origen alimentario. Otras bacterias y hongos también son importantes, y no hay que olvidar los virus y los protozoos. Actualmente, ante un brote del cual no se sabe la causa, se tiende a pensar, erróneamente, en bacterias u hongos más que en virus o protozoos. Durante los próximos años, aumentará la actividad en los campos de la virología y la parasitología alimentarias. Los virus son difíciles de detectar; puede hacerse mediante biología molecular. Se proponen técnicas como la ultracentrifugación para extraerlos de los alimentos, seguida de la aplicación de la transcriptasa inversa para traducir el ARN vírico a su ADN complementario, y después usar la técnica de la *polymerase chain reaction* (PCR).

## TOMA Y PREPARACIÓN DE MUESTRAS, RECUENTO DE CÉLULAS VIABLES, MINIATURIZACIÓN, GALERÍAS DE IDENTIFICACIÓN

En cuanto a los avances en la toma y la preparación de muestras, hay equipos que recuperan los microorganismos por vibraciones que los hacen pasar al diluyente, sin romper la estructura del alimento. Así, al contener las suspensiones obtenidas muy pocos restos de alimento, no hay interferencia en el recuento en placa y, además, dichas suspensiones pueden usarse en técnicas como la de la bioluminiscencia (análisis de ATP), las enzimáticas (*enzyme-linked immunosorbent assay/enzyme-linked fluorescent assay*, ELISA/ELFA) y las genéticas (PCR).

Los avances en instrumentación relativos a la preparación, la dilución y la sembra de las muestras, están haciendo posible contar las células viables más rápida y eficientemente. Por ejemplo, la miniaturización y la automatización del método del número más probable (NMP), permiten aumentar su eficacia.

En cuanto al recuento total de microorganismos, hay que destacar los métodos que cuentan las células en tiempo real. Es muy importante saber si las células microbianas están vivas o no. Hay tinciones vitales, con colorante muy específicos, para diferenciar las células vivas de las muertas en menos de 1 h. Consisten en atrapar las células en un filtro o una membrana y después tñirlas con un colorante fluorescente, que posibilita su posterior observación directa al microscopio.

Posterior al crecimiento de las colonias en medio selectivo, la identificación con galerías que se basan en reacciones debidas al metabolismo microbiano, también ha avanzado considerablemente. Inicialmente, estos métodos se desarrollaron para enterobacterias, pero actualmente también están disponibles para identificar, entre otros, bacterias Gram-positivas, como *L. monocytogenes* y *S. aureus*, y mohos y levaduras. En algunos casos, permiten identificar en muy poco tiempo (2-4 h).

## MÉTODOS INMUNOLÓGICOS

Los métodos inmunológicos, con el uso de anticuerpos monoclonales y policlonales, se aplican desde hace décadas, y se están automatizando y usando cada vez más. La técnica más popular es el test ELISA/ELFA, ya totalmente automatizada y consolidada en muchas industrias alimentarias. Actualmente, existen sistemas que permiten analizar una muestra, previamente incubada durante toda la noche, en 45 a 120 min. Ahora, se intenta aumentar su sensibilidad ( $10^4$ - $10^5$  organismos) y acortar su duración (8 h en total), sobre todo la de la fase de incubación. Otra mejora de esta técnica es la combinación de la inmunocaptura con el test ELISA.

Es difícil separar y concentrar eficazmente las células diana; siempre se requiere un paso de enriquecimiento. Hoy en día, éste es un gran inconveniente para el microbiólogo de alimentos. Por ello, es importante desarrollar tecnologías como la separación inmunomagnética, la filtración, la centrifugación y la atracción electrostática, porque pueden acortar la duración del análisis, sobre todo la de la fase de enriquecimiento (se puede ahorrar, al menos, 1 día), y así se identifican las células más rápidamente. Además, para aprovechar al máximo el potencial de nuevas tecnologías de análisis como los biosensores, los biochips y los microchips, es necesario encontrar sistemas óptimos para separar y concentrar los organismos diana, para que la señal sea correcta y los resultados no sean erróneos.

La captura inmunomagnética es una innovación en la que se usan partículas metálicas recubiertas de anticuerpos específicos para un determinado microorganismo. Así, las células del microorganismo que se quiere identificar se aíslan en una suspensión que después puede utilizarse para sembrar placas, o hibridar con sondas genéticas, o hacer el test de la PCR o ELISA/ELFA. Por ejemplo, se propone un sistema que combina la separación inmunomagnética y el test ELISA, que permite detectar *E. coli* O157:H7 en 5 h y 15 min, el tiempo más corto actualmente: 4 h y 30 min de enriquecimiento + 30 min (circulando) de inmunocaptura + 15 min de ELISA. Se intenta acortar el enriquecimiento a 3 h,

con la ayuda de la enzima oxirasa, para que el proceso dure menos de 4 h en total.

## INSTRUMENTACIÓN, MEDIDAS DE BIOMASA

Otro grupo de técnicas rápidas lo constituyen los instrumentos que miden señales originadas por el crecimiento microbiano. Estas señales son, por ejemplo, el ATP, algunas enzimas específicas, el pH, el potencial redox, la conductancia, la impedancia y la capacidad eléctrica, el calor y el CO<sub>2</sub>. Existen equipos en que la medida de alguna de estas señales, como el CO<sub>2</sub>, el pH, el potencial redox y los grupos amino libres, es por detección colorimétrica. Algunos de estos sistemas son fáciles de usar, permiten analizar muchas muestras a la vez, y están diseñados para determinar indirectamente los recuentos totales, de coliformes, *Escherichia coli*, bacterias acidolácticas, mohos y levaduras, y de muestras ambientales y de superficies. La prueba de la catalasa, las placas de contacto, y los métodos automatizados basados en impedancia y óptica, facilitan al industrial el control de la higiene. También existen muy diversos dispositivos, que contienen unos reactivos, y un escobillón o un material absorbente, basados en bioluminiscencia, colorimetría o inmunología, que proporcionan resultados muy rápidamente (10 min). Hoy en día, requieren un preenriquecimiento para alcanzar 106 organismos, pero ahora se está aumentando su sensibilidad. Los dispositivos inmunológicos se utilizan en la industria alimentaria para detectar patógenos, y también sus toxinas.

La detección de ATP de cualquier origen se usa actualmente para evaluar en tiempo real la limpieza y la desinfección en la industria alimentaria (utensilios, equipos, instalaciones), con sistemas de bioluminiscencia muy sencillos y de lectura inmediata, que encuentran su aplicación en el Análisis de Peligros y Puntos de Control Crítico (APPCC), y mejoran su eficacia.

La capacidad de muchas bacterias marinas de emitir luz (bioluminiscencia), combinada con los métodos de genética molecular, permite obtener microorganismos patógenos bioluminiscentes. Estos microorganismos recombinantes, cuan-



do se inoculan en los alimentos, pueden utilizarse para estudiar el metabolismo, la resistencia a tratamientos letales y subletales, y la formación de biopelículas. A partir de estos estudios, pueden establecerse modelos predictivos que consideren las interacciones microbianas que se producen en los alimentos.

También existen métodos que permiten acortar el tiempo de detección de mohos y micotoxinas en los alimentos, como la determinación del ergosterol, un componente de la pared celular de la mayoría de mohos. El análisis es por cromatografía en capa fina, previa extracción con hexanol, y la cantidad de ergosterol es un indicador del crecimiento fúngico y la presencia de micotoxinas. Si hay que identificar los géneros y las especies presentes en los alimentos, puede hacerse con el test de la PCR o ELISA/ELFA.

## MÉTODOS GENÉTICOS

Todos los métodos mencionados hasta el momento miden características fenotípicas de las células. Las genotípicas, sin embargo, son mucho más estables y, cada vez, existen más sistemas de identificación genética. Los primeros en aparecer usaban sondas para hibridar secuencias de ADN de las bacterias. Actualmente, se utilizan sondas que hibridan el ARN, con la ventaja que existen más copias de éste en la célula, y la detección es más fácil. El método más usado es la PCR, que amplifica secuencias de ADN del microorganismo. Para detectarlo e identificarlo, posteriormente, cada vez más, se aplican técnicas de fluorescencia que permiten obtener resultados en tiempo real. Hay que considerar que estos métodos pueden detectar el ADN de microorganismos no viables presentes en los alimentos, aunque esto pierde importancia al ser necesario un enriquecimiento previo de la muestra. Muchos laboratorios e industrias agroalimentarias están incorporando métodos genéticos (sobre todo la PCR), ya que son específicos, rápidos y, pese a su sofisticación, fáciles de usar. La aplicación de la biología molecular a los alimentos está ganando importancia, y aumentará todavía más en un futuro próximo, para detectar e identificar rápidamente el material genético de muy diversos organismos diana: bacterias, mohos, levaduras, virus, parásitos e, incluso, organismos superiores.

## BIOSENSORES, BIOCHIPS Y MICROCHIPS

El último grupo de técnicas es el de los biosensores, esencialmente formados por moléculas o grupos de moléculas acoplados a un material (transductor) que permite reconocer una señal. Pueden diseñarse para detectar patógenos como *Salmonella* spp., *Campylobacter* spp., *E. coli* O157:H7, *Clostridium* spp. etc., incorporando, por ejemplo y como más habituales, las enzimas (catalasa u otras), los anticuerpos o las moléculas de ADN apropiados. También puede analizarse la actividad microbiana detectando el ATP, el oxígeno, el hidrógeno u otros metabolitos; o los cambios de pH, conductancia, impedancia, capacidad o microcalorimetría. Pero la tecnología disponible todavía no permite usarlos para detectar en tiempo real en el alimento ya que, por una parte, es necesario preparar la muestra para que no queden restos de alimento que interfieran en el sensor y, por otra, hay que multiplicar las células. En algunos casos, los biosensores no permiten saber si el microorganismo es viable, sino que tan sólo detectan su presencia. En el futuro, los biosensores estarán en las líneas de procesado de alimentos, ejerciendo su función dentro de los programas de APPCC.

Se trabaja en biochips y microchips que permiten detectar los genes de patógenos por hibridación, poniéndolo de manifiesto con colorantes específicos. Puede obtenerse la reacción con el patógeno muy rápidamente y, además, se puede trabajar con diversos patógenos a la vez (análisis de 10 genes específicos de cada uno de 10 patógenos distintos en un solo chip y, pronto, de 100 patógenos). Existirán microchips que, rápida y simultáneamente, detectarán todos los patógenos importantes y, a la vez, contarán las células viables; todo en una misma unidad, un mismo análisis, casi instantáneamente.

## EL CONSUMIDOR, LOS MÉTODOS RÁPIDOS Y EL FUTURO

Están diseñándose sistemas de alerta en los envases alimentarios y tests de aler-

ta para detectar rápidamente organismos alteradores y patógenos. Serán herramientas útiles para el consumidor, que podrá darse cuenta de la peligrosidad o el estado de un alimento. Conviene que, además, el test indique las condiciones adecuadas de cocción y almacenamiento para garantizar la seguridad y la conservación del alimento. Por y para todo ello, habrá que educar y preparar muy bien al consumidor. Estos diseños se basan en sensores o códigos de barras con reactivos que detectan los organismos; o por cambios de color (entre otros), las variaciones de pH o la presencia de determinados compuestos sintetizados por los microorganismos (CO<sub>2</sub>, amoníaco, sulfuro de hidrógeno y otros). En el caso de los códigos de barras, podrá saberse el grado de deterioro del alimento según el número de barras que cambie de color. También se propone la incorporación de anticuerpos en el envase para detectar los organismos automáticamente con el test ELISA. Así, el consumidor podrá examinar los alimentos y los envases en su casa.

## Bibliografía

- 1.- Anónimo. 2004. Fung's forecast on rapid & automated methods: where are we now? Food Safety Magazine, agosto-septiembre: 24-31, 60.
- 2.- Capellas, M., D. Y. C. Fung y J. Yuste. 2005. Mètodes ràpids i automatització en microbiologia alimentària. Veterinaris, 84: 16-17.
- 3.- Fung, D. Y. C. 1992. Historical development of rapid methods and automation in microbiology. Journal of Rapid Methods and Automation in Microbiology, 1: 1-14.
- 4.- Fung, D. Y. C. 2002. Rapid methods and automation in microbiology. Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety, 1: 3-22.
- 5.- Gourley, P. L. 2005. Brief overview of biomicro-nanotechnologies. Biotechnology Progress, 21: 2-10.
- 6.- Hanna, S. E., C. J. Connor y H. H. Wang. 2005. Real-time polymerase chain reaction for the food microbiologist: technologies, applications, and limitations. Journal of Food Science, 70: R49-R53.
- 7.- Tortorello, M. L. y S. M. Gendel. 1997. Food microbiological analysis. New technologies. Marcel Dekker, Nova York, Nova York.
- 8.- Yuste, J., M. Capellas y D. Y. C. Fung. 2006. Métodos rápidos y automatización en microbiología alimentaria. Actas del V workshop MRAMA. Universitat Autònoma de Barcelona, Bellaterra (Cerdanyola del Vallès).

# RECENT TRENDS IN FOOD MICROBIOLOGY AT EUROPEAN LEVEL

Cécile Lahellec (F)

Honorary Research Director. French Food Safety Agency (AFSSA)  
cecile.lahellec@club-internet.fr

**A** long time ago ( i.e more than 40 years), the European Community began to “re-model” its face. Brain storming meetings took the first place in order to reach harmonization in different fields.

Due to different factors, including the cultural diversities, existing regulations, that represented, of course, a big challenge and it was the case, especially in the field of Food Safety .

That is the reason why this morning, I would like to share with you a few data and comments concerning the changes which, during the past decade especially, re-modelled Food Safety at a European level . That is very important for us as Food microbiology and techniques are fundamental for the implementation of the new regulations .

In order to do so, we shall begin by a few historical data; we shall remember the creation of the European Food Safety Authority, have a look at the main European regulations; then, before trying to draw some conclusions, we shall speak about the incidence of new regulations for the laboratories .

## A FEW “HISTORICAL” DATA

Probably, everybody remembers the creation of the Common Agricultural Policy; it happened in 1962 and was the consequence of the obvious necessity to build a regulated frame in order to regulate the trade . It seems of interest to mention that, from 1964 to a recent period, there were 17 sectorial directives; the differences in the approach of member states were not neglectible! Concerning the expertise, it was carried on by different groups with different approaches, even in the same country.

An important date has now to be mentioned:

12 January 2000, David BYRNE, nominated to the European

Commission in 1999, serving as Commissioner with responsibility to Health and Consumer Protection, presented what has been called the “White Paper”. It was originated from the “Green Paper” published in 1997; its purpose was to reach the highest level of Food Safety in Europe.

In order to do so, it was considered as necessary to set up an important program of new regulations taking the “ New Approach”, from farm to fork into account and to create a Food Safety Authority, in order to harmonise the expertise of the European scientific community.

The publication of “The Food Law” (regulation (EC) n° 178/2002, applicable from January 2005) was the consequence of the presentation of “The White Paper”.

The main objectives of the “Food law” were as follows:

- Improvement of the Community sectorial legislation.
- Improvement of the control of their implementation.
- Improvement of the consumer’s information.

All those improvements should result in a large simplification.

The general principles took into account:

- The “Risk Analysis” and precaution principle.
- The duties resulting from the international trade.
- The safety prescriptions.
- The responsibility which is given to the professionals.
- The traceability.
- The existence of an “Alert system”.
- The Emergency measures which have to be taken.

And reference was made to the European Food Safety Authority for a common expertise.

All steps had to be considered from the primary production, industry of animal feed, veterinary pharmacy till further processing plants, all types of foods and all places including importations, exportations.

## THE EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY (EFSA)

The main objective of the creation of EFSA presented in the “White Paper” was to reach the broadest acceptance of Risk Assessment which is essential to ensure that the action is appropriate and rapid, that may cancel the diversities in the approaches of different member states.

Presently, EFSA is located in Parma (It). Of course, national agencies participate to the evaluation works carried out at the Community level but the collaboration between EFSA and national agencies is still under construction.

## THE MAIN EUROPEAN NEW REGULATIONS

Following the “Food Law” publication, a set of new regulations has been prepared which is called “**Hygiene Package**”, including:

- General hygiene rules for all types of foods.
- Specific regulations for foods of animal origin.

And, in addition, specific regulations for animal feed have been prepared.

- General hygiene rules are provided in the regulation (EC)n 852/2004.

The main statement is surely represented by The Good Hygiene Practices.

The guides are written by professionals, for professionals, expertised and validated by the administrations. In fact, it is an excellent tool to justify the manufacturing hygiene practices taken by professionals.

The regulation (EC) n°853/2004 gives the specific rules for foods of animal origin.

It concerns: The approval of plants.

- Safety marks; identification.
- Information of the Food chain.

And annexes concerning the sectorial

activities (i.e bovine slaughtering, dairy products processing...).

The regulation (EC) n°183/2005 concerns specific rules for animal feed.

And gives procedures based on HACCP, rules of traceability and financial guarantees; of course, it includes general and specific hygiene rules.

Moreover, some other regulations concern official controls, inspections.

In that context, the regulation (EC) n°882/2004 is related to:

- Harmonisation of procedures and instructions.
- Frequency of inspections based on Risk Analysis.
- Approvals.

While the regulation( EC) n°854/ 2004 gives:

- Specific rules for the organisation of official controls for foods of animal origin.
- Practical conditions of the official controls in processing plants, further-processing plants, shelfish, seafood, raw milk and dairy products.

It introduces the notion of pilot progress in the context of national measures.

As **CONCLUSIONS** concerning the new regulations, we can say they show a simplification of European legislation an harmonisation between Member States.

Moreover it is easier to read as there is a clear separation between the missions of professionals and those of official controls.

## THE INCIDENCE OF RECENT REGULATIONS FOR THE LABORATORIES

**As a consequence of those mentioned regulations, and in order to evaluate the acceptability of the process as well as the safety of food products, it was necessary to set up MICROBIOLOGICAL CRITERIA.**

Till recently, a lot of microbiological criteria did exist in the different European countries and most of them concerned food of animal origin.

NOW, HARMONISED CRITERIA HAVE BEEN SET UP AT A EUROPEAN LEVEL.

(Regulation (EC) n°2073/2005 of the Commission 15 November 2005).

## OBJECTIVES

The main objective of the new microbiological criteria is to validate and verify the procedures based on HACCP and other measures to control hygiene but Microbiological criteria have also to define the acceptability of the products and also to set up microbiological safety criteria.

All operators of the food chain have to refer to those criteria which include:

- SAMPLING.
- ANALYSIS.
- CORRECTIVE MEASURES.

Consequently, it is necessary to set up application measures which include:

The sampling plan, including the number of samples to be tested.

The microbiological limits.

The methods of analysis and eventually uncertainty measurement.

It is also necessary TO TAKE MEASURES CONCERNING FOODS AS WELL AS THE CRITICAL CONTROL POINTS TO WHICH THOSE CRITERIA HAVE TO BE APPLIED OR MEASURES TO BE TAKEN WHEN THOSE CRITERIA ARE NOT OBSERVED .

Those measures concern especially:

The control of raw materials.

The control of hygiene.

The control of temperature and shelf life of a given food.

So, we can see that the changes are fundamental. In order to reach a good harmonisation, the regulation (EC) n° 882/2004 of the European Parliament requests from Member States OFFICIAL CONTROLS, regularly performed in connection with the RISK and with an APPROVED FREQUENCY.

THOSE CONTROLS MUST BE APPLIED AT APPROPRIATE POINTS OF PRODUCTION, FURTHER-PROCESSING AND DISTRIBUTION.

Even before the creation of EFSA, some recommendations had been proposed by the Scientific Committee which was preparing the new microbiological criteria: 23 September 1999, the Scientific Committee for veterinary measures in terms of Public Health has underlined the importance of setting microbiological criteria based on a formal RISK ASSESSMENT.

They have to take PUBLIC HEALTH under consideration.

It was of course a great challenge to adopt common views among the Member States and the recommendations which are presented hereafter are, of course, the result of a consensus. So, a recommendation for *Listeria monocytogenes* (less than 100/g) has been approved on 22 June 2004 by the Scientific Committee for Human Nutrition.

The opinion on *Vibrio vulnificus* and *Vibrio parahaemolyticus* of 19 and 20 September 2001 is that there is no justification to set up specific criteria.

On 30/31 January 2002, it was recognised that conventional indicators are not suitable to demonstrate the possible contamination by the Norwalk virus.

It was also recommended to use *E.coli* instead of fecal coliforms.

- 27 February 2002: a special recommendation for gelatine says that a microbiological criteria must be mandatory for *Salmonella* only.
- 21/ 22 January 2003, foods in which the presence of VTEC represent a risk for Public Health have been identified.
- 26/ 27 March 2003: criteria applicable to coagulase positive *Staphylococcus* and staphylococcal enterotoxins in cheese, raw milk Have to be revised.
- 14/15 April 2003: recommendation for *Salmonella*: it is necessary to look for when a problem of Public Health does appear.
- 9 September 2004: (group BIOLOGICAL HAZARD of EFSA): most problems for baby foods concern *Salmonella* and *Enterobacter sakazakii*. However, routinely, Enterobacteriaceae can be used for monitoring.

IN THAT CONTEXT, IT IS IMPORTANT TO KEEP IN MIND THE FACT THAT HARMONISATION OF CRITERIA INCLUDES HARMONISATION OF METHODS OF ANALYSIS.

In Food Microbiology, European standards are set up by CEN (Comité Européen de Normalisation) which works in connection with ISO (International Standardisation Organisation), according to what is called the "Vienna Agreement".

However, for a long time in Europe, standards were set up in different pla-

ces by different groups and CEN standards were not always recognised...

But, something very important happened in 2006, i.e A MANDATE FOR STANDARDISATION HAS BEEN ADDRESSED BY EC TO CEN IN THE FIELD OF METHODS OF ANALYSIS OF FOODSTUFFS CONCERNING HYGIENE. It will finance collaborative studies to fully validate the set of 15 CEN/ISO reference methods.

ONE OTHER IMPORTANT FACT CONCERNS THE COMMUNITY REFERENCE LABORATORIES WHICH HAVE TO USE THE STANDARDS RECOMMENDED BY CEN.

Another decision seems also to be of most importance:

The Draft IDF/ISO, version 3, April 2006. THE PROTOCOL FOR THE ESTABLISHMENT OF PRECISION CHARACTERISTICS OF QUANTITATIVE METHODS BY INTER-LABORATORY STUDIES FOR THE EUROPEAN MANDATE IN MICROBIOLOGY, TOGETHER WITH EN ISO 16140.

Recently, a new working group (WG3) has been created under ISO TC34/SC9: its purpose is to standardise the validation of microbiological methods, especially EN/ISO 16140 (for intra-laboratories validation, validation between 2 or 3 laboratories, verification of methods for accreditation, for reference laboratories).

## CONCLUSIONS

---

A lot of work has been done from the day of the presentation of the "White Paper" by David BYRNE, 12 January 2000.

The result may be considered as an important revolution in the field of Food Safety in order to afford the consumers the highest safety level.

The approach is complete, ambitious and should lead to a lot of improvements in different sectors, including the laboratories, their ways of thinking and working. However, a lot of work remains to be done in terms of harmonisation in different fields.

One more question:

**There are so many Member States  
May Europe be considered as a "laboratory for the world"?**  
**AT LEAST, THE CHANGES FROM  
2000 ARE SPECTACULAR.**



# SPANISH RAPID METHODS AND AUTOMATION IN FOOD MICROBIOLOGY: A STAR IS BORN

Daniel Y. C. Fung

Professor of Food Science, Kansas State University, Manhattan, Kansas,  
USA and Distinguished Professor of Veterinary School of Universitat Autònoma de Barcelona, Spain

In the history of Arts and Science once in a while something important happens and that development will have an impact for a long time in a particular field and location. Such is the case of the Spanish Rapid Methods and Automation in Food Microbiology organized by Dr. Josep Yuste and Dra. Marta Capellas at the Universitat Autònoma de Barcelona (UAB), Spain, a university with about 50,000 students. Yuste visited my laboratory as a post-doc fellow with a NATO grant in 2000 and immediately immersed in several successful research projects which resulted in several Journal publications. More importantly, he observed and assisted in the World renowned Kansas State University (KSU) International Workshop on Rapid Methods and Automation in Microbiology in Summer of 2000. After he completed the nine month post-doc training, he returned home to UAB to continue his career as a food microbiologist. The experiences he had at the KSU impressed him so much that he decided to start a workshop similar to the one held at KSU since 1980. In 2002, he worked diligently and followed many of the strategies of the KSU workshop and decided to start his own workshop in Barcelona with the cooperation of Marta Capellas as the co-director. He invited me to be the Key-note speaker as well as the principal lecturer in this 4 day workshop which they named "Métodos Rápidos y Automatización en Microbiología Alimentaria". The first workshop occurred in November, 2002.

It was a great success with about 200 scientists and students who attended the 4 day workshop. After the first successful workshop, Yuste and Capellas continued the series in 2003, 2004, 2005 and 2006 averaging about 200 participants per workshop. I was fortunate enough to be the key-note speaker of the budding workshop series in all these workshops. Our scientific interactions and friendships developed rapidly

and positively. At the 25th Quarter Century Celebration of the KSU workshop in 2005, I appointed both Yuste and Capellas as "Quarter Century Fellow" to Manhattan, Kansas and they presented a delightful lecture in the celebration.

What makes this Spanish Workshop a success?

## EXCELLENT LECTURES AND PRESENTATIONS

Yuste and Capellas not only invited me as the key-note speaker and principal lecturer in the workshop, they invited many outstanding scientists at their own university and other institutions to present world class lectures. I gave six lectures during the workshop and used my 2002 article "Fung, D. Y. C. 2002. Rapid Methods and Automation in Microbiology" as the key article to develop the six lectures. These lectures were delivered in English and simultaneously translated into Spanish by a team of truly excellent translators to the participants. They also invited Dr. Cécile Lahellec, one of the most respected microbiologists in Europe and the former Director of Food Hygiene of Paris and Associate Director of the French Agricultural Experiment Station in Ploufragan to give the opening lecture in this workshop series concerning the current status of microbiological developments in Europe and international harmonization of microbiological methods.

I was truly honored that at the end of the 2006 workshop, the Dean of the Veterinary School presented to me the prestigious title of "Distinguished Professor" of Veterinary School of UAB due to my contributions to this workshop series. I was the first scientist so honored at UAB. It was one of the highest honors of my long career in Microbiology since 1969.

Besides these academic lectures, the co-directors invited outstanding experts

from major companies to present the theories and applications of the cutting edge diagnostic kits, instruments, and systems for rapid detection, enumeration, and characterization of all kinds of microbes in food science. These were not "sales" talks but rather scientific expositions of the newest systems in the world in rapid methods and automation in Microbiology. As a scientist working in the field for more than 30 years, I can attest to the fact that the standard of the Spanish workshop is second to none in intellectual presentation as well as practical implications of the methods in the field.

## PRACTICAL EXPERIENCES

The majority of the participants attended the two day lectures but a smaller group of participants took part in the day long intensive practical experience of the newest and best diagnostic systems and instrumentation. Many of the systems were tested in a spacious and well equipped laboratory with the assistance of company representatives and special assistants. The participants were also involved in "rotations" of specific systems throughout the day. It was a long day but many important concepts and actual contact of valuable systems were made. I even spend about an hour each day to demonstrate some of my unique developments in applied microbiology such as the Fung Double tube, Fung-Yu Tube, adhesive tape method, miniaturized microbiology technologies, etc. to the group. It was a most enjoyable interaction for all concerned.

## EXCELLENT MANUAL AND HANDOUTS

Yuste and Capellas spent inordinate amount of time in constructing a world class Rapid Microbiology Manual for

the Workshop (198 pages!!). Most of the information were presented in English but many were also presented in Spanish. I have seen many Manuals like this in my traveling and lecturing, and I consider this one of the best. As a matter of fact, I held the Manual up high in the first day of the workshop and said: "Just getting this valuable Manual is worth your while to come to this workshop". Commercial companies also provided the participants with new and valuable handouts.

## FACILITIES, ENVIRONMENT AND CAMARADERIE

---

UAB is located in a lovely wooded area just outside of Barcelona. The campus is full of students, faculty members, and visitors involved in many educational activities. The campus is tranquil and very orderly. The dinner facilities were great, and transportation was efficient and easily assessable. One of the most enjoyable activities during the workshop is the random distribution of souvenir from Kansas State University. Each year, I sent a big box of all kinds of "goodies" to the Spanish workshop and at the end of the workshop I would open the box and start throwing T-shirts, pens, medallions, and even folding chairs to the participants. It was truly a joyful event. We all enjoy that activity greatly. Along with Yuste and Capellas, I also sign each certificate myself. On the first day we were strangers but at the end of the workshop we were all great friends. We lined up outside of the Veterinary School each year and had a picture taken to remember the lovely workshop in Barcelona.

So, indeed, a star is borne in Rapid Methods and Automation in Food Microbiology in Spain. I am sure it will last for at least 25 more years. I will come as long as I am able and will always bless this new star to shine brightly in the field of Microbiology in Europe and in the World.

This article was written to introduce the history and activities of the Spanish workshop. Further scientific information can be obtained through:

Dr. Josep Yuste and Dra. Marta

Capellas, at Centre Especial de Recerca Planta de Tecnologia dels Aliments (CeRTA, XIT), Departament de Ciència Animal i dels Aliments, Facultat de Veterinària, Universitat Autònoma de Barcelona; e-mails: josep.yuste@uab.cat, marta.capellas@uab.cat; and Dr. Daniel Y. C. Fung, 207 Call Hall, Department of Animal Sciences and Industry, Kansas State University, Manhattan, Kansas 66506, USA; e-mail: dfung@ksu.edu.

## References

- 1.- Fung, Daniel Y. C. 2002. Rapid Methods and Automation in Microbiology. Inaugural Issue of Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety, vol. 1 issue 1, pages 3 to 22.

(Electronic version through [www.ift.org](http://www.ift.org) or contact Fung at [dfung@ksu.edu](mailto:dfung@ksu.edu))

# SEGURIDAD Y CALIDAD AGROALIMENTARIAS CON MICROSISTEMAS

L. Fonseca, C. Cané

Centro Nacional de Microelectrónica, Campus UAB, Bellaterra 08193  
 luis.fonseca@cnm.es

## INTRODUCCIÓN

La comunidad agroalimentaria recurre hoy día a análisis de laboratorio bien aceptados por su excelente precisión, pero que adolecen de flexibilidad, son costosos y se dilatan en el tiempo. La combinación de técnicas de *micro* y *nanofabricación*, biotecnología y herramientas avanzadas de comunicaciones y tratamiento de datos abren la puerta a un nuevo tipo de instrumentación ventajoso, de menor tamaño, más económico, más rápido y más autónomo. Inmunosensores, chips de ADN, sistemas portátiles multisensores... incrementarán su importancia en un futuro próximo si se benefician de la introducción de las micro y nanotecnologías. Esta batería de nuevos dispositivos y sistemas serán útiles en la detección de contaminación de origen natural (micotoxinas, hongos toxigénicos, bacterias patógenas) y artificial (antibióticos, plaguicidas), así como pueden ayudar a determinar el estado de conservación de los alimentos a lo largo de la cadena alimentaria.

## ¿QUÉ SON LOS MICROSISTEMAS?

Los microsistemas, conocidos como MEMS en gran parte del mundo, son sistemas miniaturizados, es decir, una colección de elementos que interactúan apropiadamente entre ellos mismos y con el entorno. En el caso más general, puede distinguirse dentro de un microsistema la existencia de sensores, unidades de procesamiento y actuadores (Figura 1). Estos elementos son diferentes tipos de chip, fabricados de forma parecida, y en factorías similares, a los microprocesadores y las memorias de nuestros ordenadores. De hecho, para fabricar microsistemas se ha de com-

plementar las técnicas habituales de fabricación microelectrónica con procesos de micromecanizado del silicio que son los que permiten definir en este material membranas y partes móviles susceptibles de interactuar con el entorno, de acuerdo con diferentes principios de transducción que se ven favorecidos por factores de escala que aparecen al pasar del mundo macro al micro. Conviene destacar que los microsistemas se benefician igualmente de la economía de escala típico de los productos microelectrónicos: aunque las instalaciones y los procesos necesarios son muy costosos, todo está preparado para procesar simultáneamente decenas de obleas de silicio, conteniendo cada una centenares de chips, de forma que el coste por unidad puede ser arbitrariamente bajo si se acom-

ten grandes volúmenes de producción.

Una pequeña disgresión con respecto a la, a veces, engañosa cuestión del tamaño. Un chip lo podemos sostener en la punta de los dedos, pero un sistema basado en chips es obviamente más grande. De la misma manera que un ordenador es más grande que el microprocesador que contiene, un instrumento de medida fabricado alrededor de un microsistema es, en su conjunto, más grande que los sensores miniaturizados que pueda albergar. En cualquier caso, la ventaja en tamaño final de estos sistemas continua siendo importante ya que estos instrumentos suelen ser portables. Podríamos decir que al pasar del chip al sistema pasamos de la punta de los dedos a la palma de la mano.

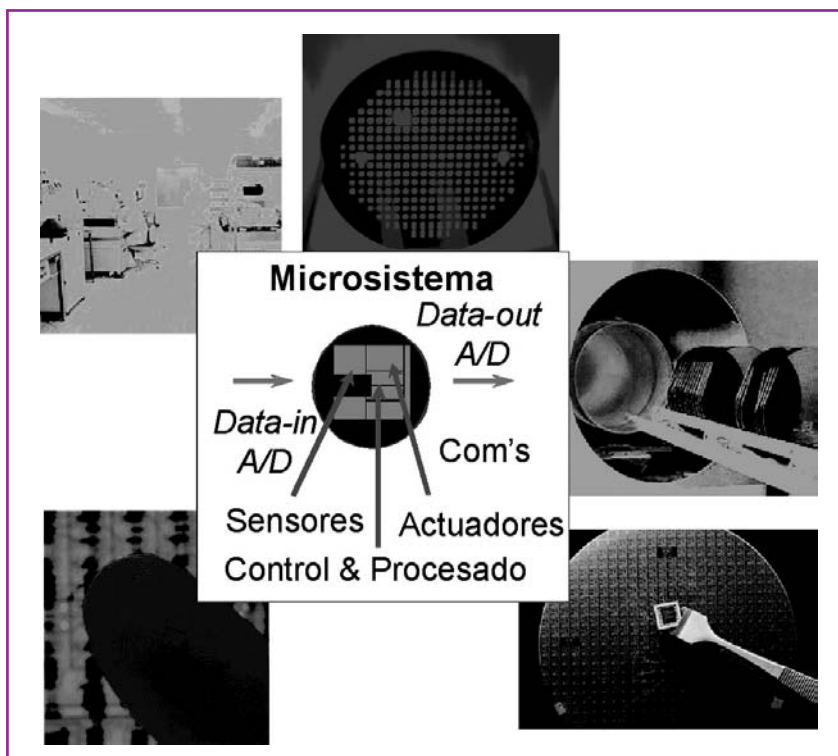


Figura 1.- La combinación de técnicas estándar microelectrónicas con técnicas de micromecanización del silicio hacen posible la fabricación de sensores y actuadores miniaturizados y de bajo coste con los que pueden diseñarse sistemas inteligentes de pequeño tamaño que interactúen con el entorno.

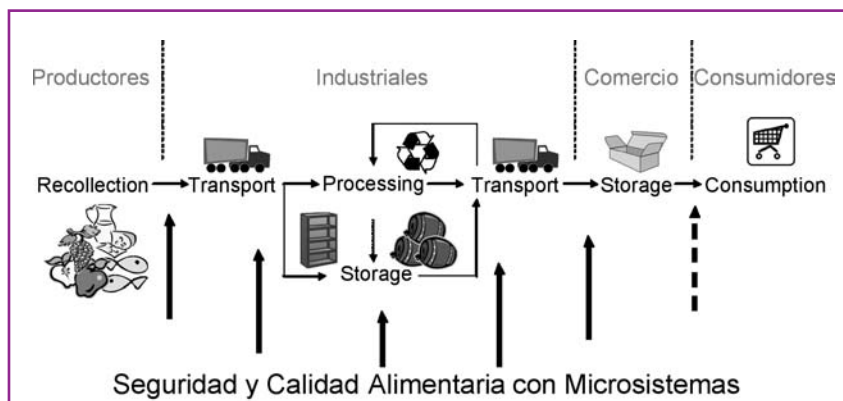


Figura 2.- Instrumentos de pequeño tamaño basados en microistemas multisensores que permitan una monitorización automática y en continuo pueden extender el control a lo largo de la cadena alimentaria más allá incluso del concepto de trazabilidad.

## UN SISTEMA DE SEGURIDAD Y CALIDAD ALIMENTARIA BASADO EN LAS TECNOLOGÍAS DE LA INFORMACIÓN

¿Por qué mezclar microtecnologías y el control de los alimentos? ¿Qué aportan las tecnologías de la información a la seguridad y calidad alimentarias? Es bien sabido que las crisis alimentarias del siglo pasado han obligado a un replanteamiento de la seguridad alimentaria que ha comportado asumir nuevos conceptos y aproximaciones a diferentes niveles. Por ejemplo, a nivel de agencias de regulación se ha impulsado el análisis de riesgos (evaluación, gestión y comunicación de riesgos), y a nivel de producción se ha potenciado el concepto de 'Buenas Prácticas' y el Análisis de Peligros y Puntos Críticos de Control (APPCC). Este tipo de aproximaciones son, de hecho, sistemas de control basados en la información y, por tanto, susceptibles de beneficiarse de las tecnologías más punteras de lo que se conoce como Sociedad de la Información. Es más, las soluciones actuales para garantizar la seguridad y calidad alimentaria se basan en análisis costosos y nada rápidos que tienen lugar en laboratorios cada vez más centralizados y que precisan un personal altamente cualificado. Las alternativas microtecnológicas con sus dimensiones más pequeñas, aportan portabilidad y proximidad al producto, una respuesta más rápida y un menor consumo de reactivos. Como ya se ha dicho, su

coste puede ser bajo. Además, estas soluciones se articulan en torno a una señal eléctrica (después de la oportuna transducción física, química o biológica) que puede ser fácilmente procesado y transmitido, permitiendo un funcionamiento más autónomo, sin la necesidad de un operario experto, o incluso sin el concurso de operario alguno, abriendo la puerta a soluciones en red y ubicuas. Un sistema de seguridad y calidad alimentaria basada en la información no solo nos ha de permitir hacer mejor lo que hicimos en el pasado, sino que nos debe ayudar a afrontar los nuevos retos sociales y económicos que están incrementando las situaciones de riesgo asociadas a los alimentos y a su consumo. En la nueva economía global el origen del alimento es más diverso y la consiguiente cadena logística transnacional se hace más compleja: la distancia entre produc-

tores y consumidores crece mientras que los tiempos de entrega se acortan. También la logística doméstica merece más atención ya que el gusto actual favorece alimentos menos procesados y las distancias que recorremos para realizar nuestras compras aumentan. Sin olvidar que en las poblaciones modernas (y envejecidas) crecen los desórdenes inmunológicos incrementándose el riesgo de reacciones adversas a los alimentos. En este contexto (origen diverso de los alimentos, multiplicación de riesgos y acortamiento de los tiempos de respuesta) los microistemas rápidos, baratos y autónomos pueden ayudar a proteger la cadena alimentaria con una armadura blanda de información (Figura 2).

## EL PROYECTO GOODFOOD

GoodFood es un Proyecto Integrado Europeo. Estos proyectos fueron introducidos por la Comisión Europea durante el 6º Programa Marco de Investigación en un intento de aumentar la masa crítica y multidisciplinaridad, así como fomentar aproximaciones orientadas a la aplicación de resultados. En consecuencia, los Proyectos Europeos son proyectos realmente grandes. En particular, GoodFood se coordina desde el Centro Nacional de Microelectrónica (CNM-CSIC) e involucra a 29 socios de 10 países diferentes. Aproximadamente, una tercera parte de estos

Objetivo genérico	Producto	Objetivos priorizados
Antibióticos	Leche y derivados	Betalactámicos, cloranfenicoles, tetraciclinas y sulfonamidas
Pesticidas	Fruta y derivados	2,4,6-Triclorofenol, Simazina, Atrazina y Clozolinato
Micotoxinas	Fruta y derivados	Aflatoxina, Ocratoxina, Patulina
Hongos toxigénicos	Fruta	Aspergillus, Penicillium expansus
Patógenos	Leche y derivados	Listeria y Salmonela
Calidad	Pescado / Vino	Compuestos Orgánicos Volátiles TMA, DMA, TVB -N, NH <sub>3</sub>
Logística	Fruta climatérica	Etileno, NH <sub>3</sub>
Ambiente Inteligente	Uvas y vino	Parámetros ambientales y de desarrollo de la vid Parámetros del vino en barricas y botellas

Tabla 1.- Campos de aplicación y objetivos cubiertos por GoodFood en los diferentes escenarios propuestos.

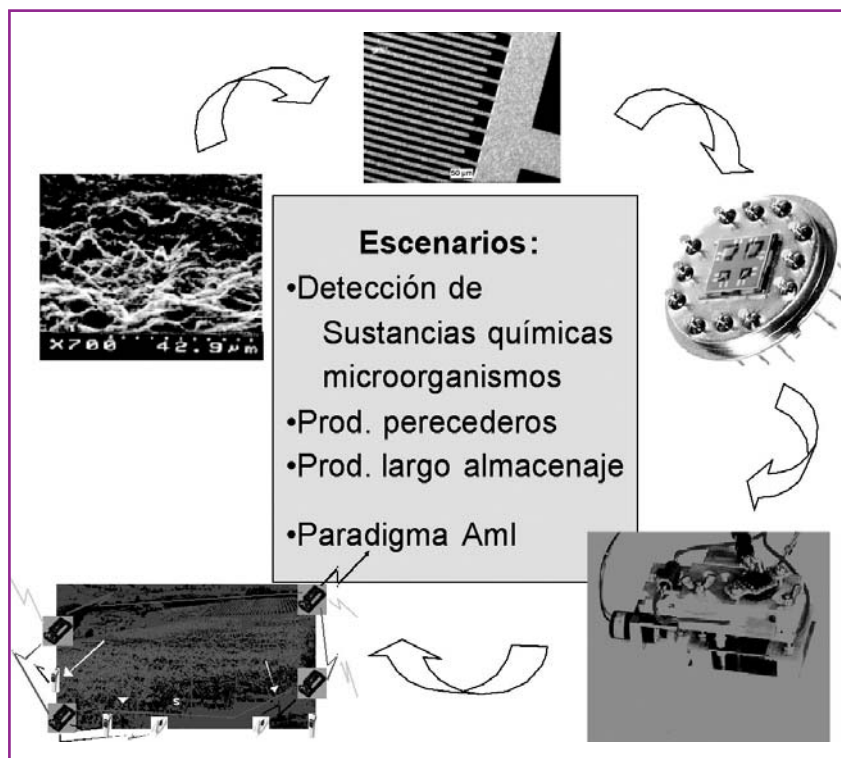


socios son empresas (desde PYMES hasta grandes compañías, desde proveedores de tecnología hasta usuarios finales), otra tercera parte son centros de investigación y el último tercio corresponde a universidades. Un gran consorcio, en definitiva, que aglutina un amplio abanico de visiones y experiencia.

Más en detalle, en el proyecto GoodFood se trabaja en la detección de antibióticos, plaguicidas y micotoxinas, así como de hongos responsables de estas toxinas y bacterias patógenas. Se investiga, igualmente, en calidad alimentaria, logística y, finalmente, en el desarrollo de soluciones de Inteligencia Ambiental. Los demostradores en los que se trabaja están pensados para ser aplicados a tres grupos básicos de alimentos: leche y derivados, fruta, zumos y vino, y, por último, pescado. Para cubrir este amplio escenario de aplicación los socios del proyecto están investigando en materiales, estructuras, dispositivos, sistemas y redes (Figura 3). A pesar de no agotar, obviamente, todas las posibilidades, los grupos de alimentos mencionados fueron escogidos para fijar unos objetivos representativos para los demostradores. En cualquier caso, la casuística cubierta es suficientemente amplia como para poder transferir algunas de estas soluciones a otros grupos de alimentos (pasar del pescado a la carne, por ejemplo) con los mínimos ajustes necesarios. Así mismo, aunque el proyecto se centra en la seguridad y calidad alimentaria, soluciones similares pueden resultar útiles en la detección de fraudes, en el análisis de materias primas, o en el control de procesos dentro de la industria transformadora de alimentos.

## APLICACIONES PARA LA SEGURIDAD ALIMENTARIA

A continuación, se describen algunas de las actividades enmarcadas en los diferentes escenarios descritos con anterioridad. En el caso de detección de antibióticos se persigue un instrumento del tamaño de una 'caja de



**Figura 3.-** En el proyecto GoodFood tienen lugar tareas de I+D a diferentes niveles (materiales, estructuras, dispositivos, sistemas y redes) para su aplicación en diferentes escenarios de interés en el campo agroalimentario.

zapatos', multicanal (que permita la detección simultánea de diferentes antibióticos) basado en un inmunosensor y en detección por fluorescencia. De esta forma, nos encontramos con bioquímica en el corazón del instrumento (la reacción inmunológica) y microtecnología todo alrededor: en el láser usado para excitar los marcadores fluorescentes, en la microcámara para detectar la fluorescencia, en la red de difracción necesaria para acoplar y desacoplar la luz incidente y saliente de la zona de medida, y en el sistema microfluídico que ha de guiar la muestra con ayuda de micropartículas magnéticas.

La detección de plaguicidas y micotoxinas es otro objetivo del proyecto GoodFood. Para ello también se recurre al mismo principio de inmunosensado, pero, en esta ocasión, se busca un mecanismo de detección que no sea óptico para así conseguir un instrumento aún menos voluminoso y más robusto. Los anticuerpos empleados para los distintos inmunosensores mencionados son de origen comercial, pero también se ha dado el caso de que, dentro del consorcio, se ha desarrollado algún anticuerpo novedo-

so. También se está estudiando el diseño de receptores artificiales que jueguen un papel similar para evitar la problemática asociada a los anticuerpos de origen animal.

Las micotoxinas las producen hongos toxigénicos y, de esta forma, nos movemos hacia otro escenario de detección, el de microorganismos vivos. Aparte de los hongos, también se está detrás de la detección rápida de determinadas bacterias patógenas, como la *Salmonella* y la *Listeria*. La aproximación en estos casos es la identificación de la huella genética de estos organismos mediante los chips de ADN. En otro ejemplo de multidisciplinaridad, hay grupos trabajando para reducir el tamaño de la plataforma multisensora, donde la reacción de hibridación del material genético debe verificarse y para que este fenómeno pueda ser puesto de manifiesto sin recorrer a sistemas ópticos. Por otro lado, otros grupos trabajan en la determinación de los fragmentos de ADN apropiados para cada caso y en simplificar y acortar los protocolos previos a la necesaria reacción de la PCR para la amplificación del material genético.

## APLICACIONES PARA LA CALIDAD ALIMENTARIA

Más allá de la seguridad alimentaria, los microsistemas también pueden tener una incidencia positiva en el campo de la calidad de los alimentos. La determinación del punto de madurez de la fruta o de la frescura del pescado pueden ser buenos ejemplos. Lo que se persigue, en este caso, es fabricar sistemas cromatográficos miniaturizados y compactos, tanto para gases como para líquidos. Detrás de la microcolumna de separación se pueden disponer diferentes microsensores para la identificación de sustancias. En el caso de análisis de muestras líquidas podrían ser micro o nanoelectrodos. En el caso de gases, podrían ser sensores de óxidos metálicos (sensores químicos basados en el cambio de resistencia eléctrica de una capa al reaccionar con determinados gases a temperaturas de unas pocas centenas de grados; fabricarlos sobre microestructuras bien aisladas térmicamente permite calentar localmente una pequeña cantidad de material sin desperdiciar energía) o micropalanca debidamente funcionalizadas (estructuras micromecanizadas que resuenan a una frecuencia alta que cambia apreciablemente si la masa de la palanca se ve incrementada por la adsorción de moléculas de gas). De esta manera, se podrían analizar determinados constituyentes de la leche, o los gases desprendidos por la fruta o el pescado, o, incluso, combinando ambos sistemas se podría analizar tanto la fase líquida como la gaseosa del vino, que tiene tanto una química líquida rica como una mezcla compleja de aromas.

## APLICACIONES EN EL CAMPO DE LA LOGÍSTICA

El escenario logístico contemplado en el proyecto se centra en la conservación y transporte de fruta climatérica (manzanas, por ejemplo). En el primer caso, un fotómetro de infrarrojo, multicanal y miniaturizado permitirá controlar dentro de las cámaras de conservación los gases relacionados con el estado de la fruta, como por ejemplo, el etileno, que está directamente relaciona-

do con su punto de madurez. En el caso del transporte se están desarrollando tarjetas flexibles de radiofrecuencia (RFID) y su correspondiente lector. El paso adelante es integrar en estas tarjetas capacidad de sensar temperatura, humedad, intensidad de luz y, muy especialmente, gases.

## MÁS ALLÁ DE LOS SENSORES INDIVIDUALES

Inteligencia Ambiental es un concepto complejo acuñado en Europa hace pocos años en el campo de las tecnologías de la Sociedad de la Información. Para simplificar nos referiremos en lo que sigue a lo que es su implementación física: redes inalámbricas de sensores. Una de estas redes autoorganizables (en cuanto al camino que sigue la información entre los distintos nodos) de sensores se ha desplegado en una viña con el propósito de monitorizar parámetros de interés, tanto ambientales como de las propias plantas: temperatura, humedad del terreno a dos profundidades, insolación, diámetro de rama... Esta información se recoge en campo y se transmite a una unidad central de control donde es agregada, mostrada de forma práctica para un usuario no entrenado, y almacenada en bases de datos. Esta información permite extraer un conocimiento útil del estado de la viña a nivel muy local (estrés hídrico, crecimiento vegetativo, predicción de ataques de hongos a partir de la evolución histórica de temperatura y humedad...), permitiendo a los productores tratar diferentes zonas de forma diferenciada ahorrando recursos (agua, plaguicidas...) y posibilitando una cosecha selectiva.

Como conclusión general, los microsistemas pueden jugar un papel importante en la industria agroalimentaria. Un buen número de tecnologías, ya puestas a prueba en otras aplicaciones, pueden adaptarse a este campo. Nuestro objetivo es abundar en la investigación necesaria a nivel de materiales, dispositivos y sistemas con el fin de obtener demostradores tecnológicos aptos para su prueba en condiciones reales

## Bibliografía

- 1.- Información adicional sobre los microsistemas y sobre el proyecto GoodFood puede consultarse en [www.goodfood-project.org](http://www.goodfood-project.org). El estado de las actividades del proyecto puede seguirse en [www.goodfood-project.org/www/Newsletter](http://www.goodfood-project.org/www/Newsletter). Las publicaciones derivadas de estas actividades se encuentran recogidas en [www.goodfood-project.org/www/Results](http://www.goodfood-project.org/www/Results).

# LA POLYMERASE CHAIN REACTION (PCR)

Dr. Armand Sánchez Bonastre

Dpto. de Ciencia Animal y de los Alimentos. Facultad de Veterinaria.  
Universidad Autónoma de Barcelona. armand.sanchez@uab.es

La reacción en cadena de la polimerasa (conocida como PCR por sus siglas en inglés, *Polymerase Chain Reaction*) es un método de análisis de ácidos nucleicos, desarrollado por Kary Mullis a mediados de los años 80, para producir grandes cantidades de un fragmento específico de ADN de secuencia y longitud definida a partir de una pequeña cantidad de material inicial. La técnica permite amplificar selectivamente una molécula de ADN o ARN varios millones de veces en pocas horas. Mediante la PCR podemos realizar la detección y análisis de secuencias específicas de un gen sin necesidad de aislarlo previamente por técnicas de clonación de ADN. Los análisis pueden realizarse a partir de unas pocas células o de una mínima cantidad de muestra biológica sin la necesidad de aislar previamente grandes cantidades de ácidos nucleicos.

La PCR ha revolucionado el campo del diagnóstico molecular y se ha convertido en una técnica de rutina en el ámbito de la genética, la microbiología y la biotecnología.

## PRINCIPIOS BÁSICOS DE LA PCR

La PCR se fundamenta en la amplificación enzimática de un fragmento de ADN flanqueado por dos secuencias de oligonucleótidos que hibridan en la cadena complementaria de la molécula molde que se va a amplificar (cebadores o "primers") y que son utilizados por una ADN polimerasa termoresistente (generalmente, se emplea la de la bacteria termófila *Thermus Aquaticus*, capaz de crecer a elevadas temperaturas) para copiar la secuencia de la misma.

La reacción es un proceso que consta de 3 etapas (repetidas unas 30-35 veces): desnaturalización, hibridación de los cebadores y extensión de los mismos.

**Desnaturalización:** Para que pueda iniciarse la reacción es preciso que las moléculas de ADN molde se encuentren en forma de cadena simple. Esto se consigue calentando a temperaturas de 90 a 95°C para que produzca la rotura de los enlaces puente de hidrógeno intercatenarios y la separación de ambas cadenas. Para asegurar la completa separación de la doble cadena del ADN esta temperatura debe mantenerse unos minutos. Si el ADN solo se desnaturaliza parcialmente, éste tenderá a renaturalizarse muy rápidamente dificultándose una eficiente hibridación de los primers y la posterior extensión de los mismos.

**Hibridación:** Una vez que el ADN está desnaturalizado se disminuye la temperatura de la reacción hasta un rango comprendido entre los 40 y los 60°C para que se pueda producir la hibridación específica de los cebadores a las secuencias flanqueantes del fragmento que se desea amplificar. Esta etapa se denomina también fase de "annealing" y la temperatura a la que se realiza debe establecerse para cada reacción en función de la longitud de los cebadores y su secuencia (temperaturas inferiores a la óptima nos producirán hibridaciones inespecíficas de los cebadores y temperaturas superiores nos dificultarán la eficiencia de la misma).

**Extensión:** Durante esta etapa la ADN polimerasa termoresistente incorpora nucleótidos en el extremo 3' del cebador utilizando como molde la cadena de ADN previamente desnaturalizada. La temperatura a la que se realiza esta etapa de la reacción suele ser de 72°C ya que es la temperatura a la que la *Taq polimerasa* alcanza su máxima actividad. Normalmente una extensión de 20 segundos es suficiente para fragmentos menores de 500 pares de bases, y 40 segundos para fragmentos por encima de 1.2Kb.

Al finalizar cada uno de los ciclos el número de copias obtenidas se duplica y después de 20 ciclos ya tenemos aproximadamente 1 millón de copias

de cada una de las moléculas molde iniciales de ADN.

La técnica puede usarse para la amplificación de moléculas de ARN si previamente se realiza una copia de las mismas mediante la enzima transcriptasa reversa. De este modo podemos realizar estudios sobre moléculas de ARNm o bien la podemos aplicar para la detección de virus ARN.

La elección de los cebadores y el tamaño del fragmento amplificado es de gran importancia para el resultado final. En pruebas de diagnóstico el tamaño del fragmento amplificado no debe superar los 100-150 pares de bases de ADN si partimos de muestras que puedan haber sufrido una degradación de los ácidos nucleicos y la elección de los cebadores debe realizarse para fragmentos específicos de la diana que queramos amplificar para evitar falsos positivos.

Una vez realizada la amplificación, se procede a la identificación de la secuencia obtenida mediante electroforesis, hibridación con sondas complementarias o técnicas de análisis de polimorfismos.

El análisis por PCR puede ser de dos tipos: cualitativo (detección de la presencia o ausencia de un fragmento de ADN determinado) o cuantitativo (detección de la cantidad de un fragmento de ADN determinado).

## ANÁLISIS CUALITATIVO DE ADN MEDIANTE PCR

Este tipo de análisis se suele realizar cuando tan sólo es necesario conocer la presencia o ausencia de alguna secuencia específica de ADN o ARN, como por ejemplo la detección de la presencia de un patógeno en una muestra. El análisis del producto amplificado suele realizarse mediante electroforesis en gel o capilar y su visualización por tinción en bromuro de etidio o por detección fluorescente si previamente hemos utilizado uno de los cebadores marcado con algún tipo de fluorescencia.

En algunos análisis resulta necesario identificar la secuencia del producto amplificado y el producto de la PCR debe ser sometido a un análisis específico (secuenciación, digestión con enzimas de restricción, etc.).

## ANÁLISIS CUANTITATIVO DE ADN MEDIANTE PCR

La PCR convencional no es una técnica cuantitativa ya que la amplificación exponencial del ADN molde no se mantiene constante especialmente en los últimos ciclos de la reacción.

Para poder realizar estimas cuantitativas se han desarrollado técnicas de PCR en "tiempo real" (PCR cuantitativa) en las que es posible determinar la fase exponencial de la amplificación y poder extrapolar de forma cuantitativa la cantidad de molde inicial que se esta amplificando.

La metodología de PCR cuantitativa facilita, además, la automatización y no suele requerir el procesamiento ulterior del producto amplificado, lo que reduce el riesgo de contaminación.

En la actualidad, existen en el mercado varios equipos y protocolos para la realización de esta técnica. Desde el punto de vista de la detección del producto amplificado en cada ciclo, existen tres métodos principales de análisis de PCR cuantitativa basados en técnicas de fluorescencia y que se diferencian en el tipo de detección de los productos de PCR. Estos métodos son: el que emplea una sonda con doble marcado fluorescente (TaqMan®) específica de la secuencia amplificada, los basados en el uso de dos sondas que hibridan de forma adyacente en el fragmento que amplificamos y, por último, el que utiliza una sustancia intercalante que se une a la doble cadena de ADN denominado SYBR Green I y produce emisión de fluorescencia.

El método más difundido es el que emplea sondas TaqMan®. Este método se basa en la actividad 5'-exonucleasa de la Taq polimerasa y en la amplificación mediante PCR de una determinada secuencia diana en presencia de una sonda fluorescente específica (sonda TaqMan®) que hibrida con la secuencia diana que estamos amplifi-

cando. La sonda TaqMan®, de un tamaño aproximado de 20-30 bases, tiene unido un fluorocromo en posición 5' y un segundo fluorocromo que actúa por interferencia con el primero como amortiguador de fluorescencia en posición 3'. Además, esta sonda está fosforilada en 3' para evitar su extensión durante la reacción de PCR. Si la secuencia diana está presente en la muestra, la sonda TaqMan hibridará específicamente con ella, situándose entre los dos cebadores. Cuando se produce la etapa de extensión en la reacción de PCR, la actividad 5'-exonucleasa de la Taq polimerasa degrada a la sonda TaqMan liberando el fluorocromo que, al quedar separado del amortiguador, emitirá una señal que puede ser captada por el sistema óptico del equipo. Este proceso de degradación de la sonda tiene lugar en cada uno de los ciclos y es directamente proporcional al número de moléculas que están siendo extendidas en cada uno de ellos que podemos visualizar por el incremento de la señal de fluorescencia.

Además, la Taq polimerasa no digiere la sonda libre sino únicamente la hibridada, por lo que la cantidad de señal fluorescente emitida es proporcional a la cantidad de producto acumulado. La medición de la intensidad de fluorescencia se realiza de forma continua lo que nos proporciona una información dinámica en tiempo real del proceso. El sistema de detección permite establecer el ciclo umbral (Ct-cycle threshold), ciclo de la PCR a partir del cual la cantidad de fluorescencia emitida alcanza el nivel de detección que hayamos fijado, lo que a su vez se correlaciona directamente con la cantidad de ADN molde de la muestra analizada. La cuantificación del número de copias de una muestra se realiza mediante la comparación de la Ct de la muestra problema con la Ct de una serie de diluciones de una muestra control positiva. La cuantificación de la muestra control positiva permite establecer una curva estándar que refleja el número de copias y el número de ciclo en el que ha sido realizada la detección de forma objetiva y reproducible.

Cuando se realiza la cuantificación de una muestra problema, el ciclo umbral

de su detección se lleva a la curva estándar lo que permite conocer el número de copias de la secuencia diana existente en la muestra analizada.

El método de PCR cuantitativa basado en la química por hibridación de sondas, emplea dos sondas secuencia-específicas que hibridan en regiones adyacentes espaciadas entre uno y cinco nucleótidos. Una sonda está marcada con un fluorocromo emisor en posición 3' y la otra sonda está marcada con un fluorocromo aceptor en su extremo 5'. Esta sonda además tiene bloqueado su extremo 3' con un grupo fosfato para evitar su extensión. Sólo cuando las dos sondas han hibridado y están próximas se origina una emisión de fluorescencia por el fluorocromo aceptor cuya intensidad aumenta proporcionalmente a la cantidad de secuencia diana formada en la reacción de PCR. Esta metodología se diferencia de la química de sondas TaqMan® en que no se requiere la hidrólisis de sonda para la emisión de fluorescencia.

El tercer tipo de detección de los productos específicos de PCR de la secuencia molde consiste en la utilización del agente intercalante SYBR Green I. Esta sustancia se une específicamente a la doble hélice de las moléculas de ADN formadas en cada ciclo de la reacción de PCR produciendo la emisión de fluorescencia. De esta forma, la señal fluorescente se incrementa en función de la cantidad de producto amplificado. La ventaja de esta opción es que no se precisa la síntesis de sondas fluorescentes específicas para cada tipo de detección, aunque su inconveniente reside en su inespecificidad ya que se detecta fluorescencia para todos los productos de ADN de doble cadena presentes en la reacción (incluyendo los dímeros de cebador que suelen producirse en la mayor parte de reacciones de PCR).

La realización de estas técnicas de PCR en tiempo real requiere disponer de un equipo que disponga de un sistema de detección de fluorescencia. Existen, actualmente, en el mercado distintas alternativas cuyo coste suele estar relacionado con los niveles de sensibilidad y capacidad de análisis de muestras de los mismos.



## Bibliografía:

- 1.- Ausubel FM, Brent R, Kingston RE, Moore DD, Seidman JG, Smith JA, and Struhl K. *Current Protocols in Molecular Biology*. Hoboken, NJ: Wiley, 2005.
- 2.- Bell A.S. and Lisa C. Ranford-Cartwright. *Real-time quantitative PCR in parasitology*. *Trends in Parasitology*, 2002, 18:8:338-342.
- 3.- Bustin S.A.. *A PCR guide for clinical scientists*. *Clinical Applications of PCR* edited by Y.M.D. Lo. Humana Press, 1998.
- 4.- Bustin SA and Nolan T. Pitfalls of quantitative real-time reversetranscription polymerase chain reaction. *J Biomol Tech* 2004, 15: 155–166.
- 5.- Cai HY, Archambault M, Gyles CL, Prescott JF. *Molecular genetic methods in the veterinary clinical bacteriology laboratory: current usage and future applications*. *Anim Health Res Rev*. 2003 Dec;4(2):73-93.
- 6.- Edwards K, Logan J, and Saunders N. *Real-time PCR: an Essential Guide*. Norfolk, UK: Horizon Bioscience, 2004.
- 7.- Johnson J.R.. *Development of polymerase chain reaction-based assays for bacterial gene detection*. *Journal of Microbiological Methods*, 2000, 41:3:201-209.
- 8.- Jordan J.. *Real-time detection of PCR products and microbiology*. *New technologies for life sciences: A Trends Guide*, 2000, 2000:6:61-66.
- 9.- Klein D.. *Quantification using real-time PCR technology: applications and limitations*. *Trends in Molecular Medicine*, 2002, 8:6:257-260.
- 10.- Lie Y.S., Christos J Petropoulos. *Advances in quantitative PCR technology: 5' nuclease assays*. *Current Opinion in Biotechnology* 1998, 9:43-48.
- 11.- Mackay I.M. *Real-time PCR in the microbiology laboratory*. *Clin Microbiol Infect*. 2004, Mar;10(3):190-212.
- 12.- Malorny B, Tassios PT, Radstrom P, Cook N, Wagner M, Hoorfar J. *Standardization of diagnostic PCR for the detection of foodborne pathogens*. *Anim Health Res Rev*.
- 13.- McKillip J.L., Drake M. *Real-time nucleic acid-based detection methods for pathogenic bacteria in food*. *J Food Prot*. 2004, Apr;67(4):823-32.
- 14.- Peters, I.R., Helps, C.R., Day, M.J., 2004. *Real-time RT-PCR: considerations for efficient and sensitive assay design*. *J. Immunol. Methods* 286 (1-2), 203–217.
- 15.- 2003, Dec;4(2):73-93.
- 16.- Taylor G.R., W Peter Logan. *The polymerase chain reaction: new variations on an old theme*. *Current Opinion in Biotechnology* 1995, 6:24-29.

# LOS ALIMENTOS TRANSGÉNICOS: GENERALIDADES Y DETECCIÓN

Dr. Daniel Ramón Vidal / Dr. José Vicente Gil Ponce

daniel.ramon@uv.es / giljv@iata.csic.es

## BIOTECNOLOGÍA DE ALIMENTOS: EL JUEGO ANCESTRAL DE LA GENÉTICA Y LA ALIMENTACIÓN

Muchas son las voces que actualmente hablan sobre la comercialización de los alimentos transgénicos. Se cuestiona, en primer lugar, su seguridad sanitaria y medioambiental y también su impacto sobre la economía de los países en desarrollo. La respuesta a estas cuestiones, lejos de ser unánime, parece polarizada en dos frentes bien diferenciados: los que se oponen a cualquier tipo de alimento transgénico por ser negativos en prácticamente todos los aspectos posibles y los que defienden su seguridad y su papel en el futuro de la agricultura mundial. En medio de este debate, aparecen confusos términos como *biotecnología*, *ingeniería genética* o el propio *alimento transgénico*, que conviene clarificar si se quiere tener una opinión bien fundamentada. Desde la Ciencia, la Biotecnología es el empleo, con fines industriales, de organismos vivos completos o de algunas de sus biomoléculas. Así, utilizar un cultivo del hongo *Penicillium chrysogenum* para obtener un frasco de penicilina, un cultivo de la bacteria *Lactobacillus delbrueckii* para fabricar un yogur o el gen de la bacteria del suelo *Bacillus thuringiensis* para generar una planta resistente a una plaga son ejemplos claros de lo que los científicos entienden por Biotecnología. El ciudadano europeo piensa, sin embargo, que la biotecnología es tan sólo la modificación genética de los alimentos, es decir, poner genes en su sopa, lo que unido a las fuertes campañas en contra de la comercialización de los alimentos transgénicos ha provocado que tanto estos alimentos como todo tipo de

biotecnología tengan una percepción social claramente negativa. Todo esto es posible, en gran medida, gracias al alto grado de desinformación y de desconocimiento de la biotecnología del ciudadano medio, algo tremendamente complejo de solucionar a corto o medio plazo. No obstante, si se empieza explicando que la genética y la alimentación han ido de la mano desde los albores de la civilización y que, además, gracias a los mejoradores genéticos de los últimos 12.000 años disponemos de la variedad actual de alimentos, quizás esta percepción negativa comience a cambiar (1).

En efecto, desde entonces el hombre ha mejorado genéticamente las razas de animales de consumo, las variedades vegetales comestibles o los microorganismos responsables de la producción de alimentos y bebidas fermentadas (2). Lo ha hecho de forma empírica, utilizando distintas técnicas genéticas entre las que destacan la hibridación, también llamada cruce sexual, y la variabilidad natural generada por la aparición de mutantes espontáneos. Muy poco de lo que comemos se ha librado de estas mejoras, quizás tan sólo algunas especies animales que se cazan o pescan en estado salvaje. El resto, por muy "natural" o "ecológico" que a algunos les parezca, no está exento de modificación genética dirigida por parte del hombre. Es fácil entenderlo con un par de ejemplos. El primero se refiere al uso de la hibridación, donde se cruzan al azar los genomas de dos progenitores intentando buscar en la descendencia una combinación de genes más adecuada. Un ejemplo hace referencia a las variedades de trigo con las que se producen hoy en día el pan y las pastas alimenticias. Se obtuvieron por un trabajo de siglos que incluyó mutaciones y sucesivos cruces, al extremo que en la actualidad podemos definirlos como puzzles genéticos en los que, a diferencia de

las especies progenitoras de trigo, donde había dos copias de cada cromosoma como en la especie humana, las actuales tienen seis (3). La segunda se refiere al uso de la mutación en la mejora de alimentos. En esta técnica un gen de entre los varios miles de genes de un genoma muta al azar y como consecuencia aparece un nuevo mutante con una característica de interés. Este fue el caso de las coles. Hace unos cuantos miles de años, un ancestro de las mismas mutó en un gen que controlaba el tamaño de las yemas terminales y como consecuencia apareció un monstruo en el que las mismas habían aumentado de forma descontrolada. Un agricultor lo vio, le pareció atractivo, lo cultivó y llegó hasta nuestros días con el nombre de col. De forma similar, aunque en mutaciones en genes distintos, surgieron las coliflores, el brócoli o las coles de Bruselas. Coles y panes son sólo dos de los miles de ejemplos del empleo de la genética en la alimentación.

De esta forma totalmente empírica, y no por ello menos eficaz, funcionó la tecnología de alimentos durante siglos hasta que, a finales del siglo XIX, Mendel estableció las bases de la herencia. Hace tan sólo treinta años, la genética ha ofrecido a la alimentación una nueva herramienta con la que mejorar nuestros alimentos. Se denomina ingeniería genética y en ella ya no se hibridan o mutan miles de genes al azar. Se trabaja con genes aislados en el laboratorio que están perfectamente identificados a nivel molecular. Estos genes se introducen en el genoma deseado generando los organismos que llamamos transgénicos. Por eso, cuando en el diseño de un alimento empleamos la ingeniería genética se producen los alimentos transgénicos (4). Esta denominación es la habitual en los países castellanoparlantes, aunque en los países anglófonos y francófonos se habla de ellos como alimentos

modificados genéticamente. Nada demasiado nuevo desde la tecnología de alimentos, ya que sigue siendo aplicar genética en la alimentación.

## ¿QUÉ TIENE DE NUEVO UN ALIMENTO TRANSGÉNICO?

Como se deduce de lo expuesto en los párrafos anteriores, la diferencia entre un alimento transgénico y otro convencional sólo es tecnológica, ya que se basa en la técnica genética utilizada en su diseño: ingeniería genética frente al cruce sexual o mutagénesis. En muchas ocasiones, se ha hecho una simplificación excesiva de este hecho por parte de algunos defensores de esta nueva tecnología que concluyen que, al no hacerse nada nuevo, sobran evaluaciones e información. Por el contrario, otros autores, aun reconociendo esta mínima diferencia tecnológica, hablan de las consecuencias que la misma acarrea.

En primer lugar, tal y como antes se indicó, en el diseño de un alimento transgénico la direccionalidad se impone al azar, ya que no se mutan ni mezclan genes en una ruleta genética. Se selecciona uno, se disecciona molecularmente y se trabaja con él. Con ello, podemos afirmar que el conocimiento de lo genéticamente variado en el caso de un alimento transgénico es muy superior al que tenemos de las modificaciones introducidas en el resto de alimentos. Por ejemplo, al generar un cruce sexual el producto resultante presenta cambios en su genoma que pueden evaluarse entre el 30 y el 50% con respecto a los genomas de los parentales. Por el contrario, al generar una planta transgénica estos cambios no superan un valor del 0.1% con respecto a la variedad convencional.

En segundo lugar, en el diseño de un alimento transgénico se obtienen los resultados de una forma mucho más rápida, lo que es de importancia radical para las compañías agroalimentarias. Por ejemplo, un programa de mejora de melón comercial que implique introducir tres características de

relevancia agroalimentaria es un proyecto a tres años por ingeniería genética y a diez por tecnologías convencionales. Es necesario aclarar que el hecho de obtener antes el desarrollo no implica necesariamente que este llegue antes al mercado. Como discutiremos posteriormente, todos los alimentos transgénicos deben ser evaluados sanitaria y toxicológicamente antes de obtener el permiso de comercialización y estos trabajos suelen llevar una media de siete años.

Finalmente, al construir un alimento transgénico es posible saltar la barrera de especie. Todos los organismos vivos tienen el mismo material hereditario: el DNA. En el laboratorio es imposible mutar una pera hasta obtener un plátano o cruzar sexualmente estas dos frutas porque son sexualmente incompatibles. Pero nada impide transferir un gen del genoma de un plátano al genoma de una pera porque ambos están hechos del mismo DNA. Esta diferencia tiene claras repercusiones éticas. Por ejemplo, un hipotético vegetal transgénico que porte un gen de un animal puede ser un problema para un vegetariano de dieta estricta. De la misma forma, aquellos consumidores que profesan una religión con limitaciones alimentarias, por ejemplo, la ingesta de carne de cerdo, no querrán tomar un alimento transgénico que contenga un gen proveniente del genoma de este animal. La solución a este problema debe pasar por el etiquetado correcto de estos alimentos.

## PRODUCCIÓN Y DETECCIÓN DE ORGANISMOS TRANSGÉNICOS

La generación de organismos transgénicos se puede simplificar en tres etapas básicas, con independencia que se trate de un animal, una planta o un microorganismo. En primer lugar, hay que aislar el gen o genes a introducir a partir del organismo donador y conocer todo lo posible acerca de él y sus implicaciones fisiológicas. Esta prime-

ra etapa implica, generalmente, clonar el gen de interés en un vector adecuado que servirá para introducirlo en el organismo receptor. La segunda etapa del proceso consiste en conseguir que nuestro gen se introduzca y exprese en el organismo receptor. A este evento se le llama transformación y existen numerosas técnicas que van desde el uso de pulsos eléctricos para abrir poros en las membranas de los microorganismos por los que se puede introducir el vector, el uso de la capacidad infectiva de virus o de bacterias especializadas en introducir fragmentos de su DNA en el huésped, el bombardeo con partículas impregnadas con ADN o la microinyección del mismo directamente en el núcleo de la célula a transformar. Por último, y si hemos tenido éxito en las dos etapas anteriores, sólo nos quedaría conseguir regenerar organismos transgénicos viables y estables a partir de los que hayan sido transformados con éxito y evaluar el efecto de dicha transformación para seleccionar aquellos individuos que presenten las características que se perseguían. La dificultad y rapidez para conseguir culminar las tres etapas puede variar enormemente en función de la naturaleza del organismo receptor o del sistema de transformación empleado, desde unos pocos meses hasta varios años de trabajo.

La nueva legislación europea referente al etiquetado y trazabilidad de alimentos transgénicos obliga a disponer de métodos eficaces y validados para detectar y cuantificar la presencia de ingredientes provenientes de organismos transgénicos en los alimentos. La cuantificación es imprescindible debido a que la legislación establece, en el caso de contaminación involuntaria, un umbral por encima del cual es obligatorio etiquetar. Actualmente, existen laboratorios especializados capaces de realizar esta tarea y certificar la presencia de ingrediente transgénico así como su cantidad. Para ello, se utiliza generalmente la técnica de amplificación de secuencias concretas de DNA mediante la reacción en cadena de la polimerasa, conocida como PCR por sus siglas en inglés o la detección inmunológica de la proteína recombinante.

## TRANSGÉNICOS EN EL MERCADO

Para entender la problemática de los alimentos transgénicos es necesario conocer los productos que ya están en el mercado y los que están próximos a llegar. En todo el mundo, hasta la fecha, se ha autorizado la comercialización de unos 80 alimentos transgénicos. La mayoría se venden en Estados Unidos, Australia y Canadá. Se calcula que hay más de 500 en últimas fases de experimentación o de solicitud del permiso de comercialización. De ellos, en la UE sólo unos pocos productos habían recibido el permiso de comercialización hasta octubre del año 2003, que se reducen a variedades de soja, maíz o colza con tolerancia a herbicidas o a plagas.

Se han desarrollado alimentos transgénicos de origen animal, vegetal o fermentado. Un gran porcentaje se han obtenido en laboratorios de compañías privadas, pero otros lo han sido en los de organismos públicos de investigación. Contrariamente a lo que se piensa, no todos benefician a los primeros eslabones de la cadena agroalimentaria, es decir, a las compañías de semillas y a los agricultores. Algunos favorecen a las industrias de transformación, otros al consumidor e incluso algunos a los profesionales del sector evitando enfermedades profesionales. Por ello, es conveniente analizar algunos ejemplos que enumeramos a continuación.

Un porcentaje muy elevado de los transgénicos en agroalimentación se ha dirigido a construir plantas transgénicas que resisten el ataque por distintos parásitos como viroides, virus, bacterias, hongos o insectos. Para ello, se ha trabajado con variedades de claro interés agronómico en países desarrollados como son el maíz, la patata, la soja o el tomate. En ellas, es posible eliminar el uso de plaguicidas, ya que la propia planta es resistente al ataque merced al gen introducido, reduciéndose considerablemente el uso de estos productos y su posible impacto negativo en el medio ambiente. El ejemplo más conocido es el maíz transgénico autorizado en la UE en cuyo genoma se ha introducido un gen proveniente de la bacteria del suelo

*Bacillus thuringiensis* que sintetiza una proteína que destruye el estómago del taladro, una de las plagas más importantes de este cultivo. La mejora de productividad mediante el empleo de estas variedades, denominadas Bt, se sitúa entre el 10 y el 20% y, además, con su empleo no es necesario utilizar insecticidas. Todo ello explica el amplio uso de este producto transgénico en la agricultura americana. En nuestro país se ha plantado, fundamentalmente en Aragón, con unos resultados similares a los obtenidos en Estados Unidos (5). Hay otras muchas variedades vegetales transgénicas que resisten plagas y algunas de ellas ya disfrutaban de la autorización para la comercialización en Estados Unidos. De particular relevancia es el caso de la generación de resistencia a virus, ya que, a diferencia de los insecticidas, fungicidas o antibióticos, no existen compuestos antivirales efectivos, por lo que la generación de transgénicos es una solución única (6).

Otro gran grupo de vegetales transgénicos presenta resistencia a herbicidas. Es el representado por la llamada soja transgénica autorizada en la UE. El cultivo de este vegetal, como el de muchos otros, tiene el inconveniente del crecimiento conjunto de malas hierbas que, al competir con la soja por los nutrientes del suelo, producen descensos importantes en la producción. Por ello, se trata de eliminar las malas hierbas, lo que es factible mediante el uso de herbicidas. Ahora bien, de la misma forma que el herbicida acaba con la mala hierba elimina también la soja que es sensible a dicho compuesto. Para solventar este problema, se han obtenido variedades transgénicas de soja que contienen en su genoma un gen proveniente del genoma de la petunia que da resistencia al herbicida (7). De esta forma es posible tratar la plantación transgénica con el herbicida y eliminar sólo las malas hierbas. Los aumentos de producción por el uso de esta estrategia se sitúan en torno al 20%, por lo que el uso de semillas de soja transgénica alcanzó el año pasado porcentajes de mercado del 56% en Estados Unidos y del 96% en Argentina, dos de los mayores productores mundiales.

Otros desarrollos transgénicos se han dirigido a mejorar las propiedades físicas o químicas en los alimentos. Existen tomates transgénicos que retrasan su ablandamiento y puede almacenarse durante largos periodos (8) y también se han desarrollado patatas transgénicas con cambios en los contenidos de almidón, lo que repercute en su capacidad de retener aceite durante la fritura (9). Hay plantas transgénicas de girasol o colza con cambios en los contenidos de ácidos grasos saturados u ovejas en las que se ha expresado el gen de la lactoalbúmina humana de forma que producen leche con una composición bioquímica distinta (10). Recientemente, se han generado vacas transgénicas que tienen modificados los niveles de distintas caseínas, de forma que su leche tiene propiedades funcionales nuevas (11). Incluso en el campo de los alimentos y bebidas fermentadas se han generado bacterias lácticas que acortan los tiempos de maduración de los quesos (12) o levaduras vínicas que incrementan el aroma afrutado (13) o evitan problemas de filtrabilidad (14) en el proceso de vinificación. Algunos de estos desarrollos ya han sido evaluados y otros lo están siendo ahora. En cualquier caso, son alimentos transgénicos para el futuro inmediato. Pero el objetivo clave para el futuro es mejorar las propiedades nutricionales de los alimentos mediante ingeniería genética, algo que a buen seguro el consumidor percibirá positivamente al implicar una mejora de su salud. Ya se han conseguido logros importantes. Se han desarrollado vegetales transgénicos denominados vacunas orales que inmunizan contra enfermedades infecciosas. Por ejemplo, se ha desarrollado una variedad de patata transgénica que contiene el gen que codifica una subunidad de la toxina del cólera y es capaz de inmunizar contra esta enfermedad (15). Hay muchas más, tanto en vegetales (16) como en bacterias ácido lácticas productoras de derivados lácteos (17), e incluso algunos de ellos han sido ensayados con éxito en voluntarios humanos (18). También se ha investigado la mejora en composición vitamínica de los alimentos. Ya se han conseguido variedades de arroz transgénico con un alto



contenido en provitamina A capaces de solventar los problemas de avitaminosis en zonas del sudeste asiático donde este cereal es la base de la dieta (19), se han generado fresas transgénicas con contenidos elevados de vitamina C (20) o tomates con distintas proporciones de tocoferoles (21). Incluso se han conseguido levaduras panaderas que obvian problemas de alergenicidad (22) o levaduras vínicas que producen vinos con más contenido de agentes con un posible efecto cardiosaludable (23). Son más alimentos transgénicos para el futuro.

## LOS RIESGOS

Con frecuencia, aunque con una falta absoluta de pruebas, se acusa a los alimentos transgénicos de ser un veneno para la salud y el medioambiente. Desde la seguridad alimentaria, las cosas se perciben de otra manera. Desde hace más de quince años, organismos internacionales como la FAO, la OCDE o la OMS han establecido grupos de trabajo para evaluar la seguridad para el consumidor de los alimentos transgénicos, estableciendo un sistema de trabajo donde se da prioridad a la elaboración de principios científicos de evaluación. En todos los alimentos transgénicos que han obtenido el permiso de comercialización se ha llevado a cabo una evaluación de riesgos sanitarios atendiendo al contenido nutricional, la posible presencia de alérgenos y el nivel de toxicidad (24). Podemos afirmar, sin miedo a equivocarnos, que ningún alimento en la historia ha sido evaluado como estos. El resultado es que no existe un solo dato científico que indique que dichos alimentos, por el hecho de ser transgénicos, representen un riesgo para la salud del consumidor superior al que implica la ingestión del alimento convencional correspondiente (25), algo que recientemente ha sido puesto de manifiesto por la OMS en su página de Internet (<http://www.who.int/fsf/GMfood/>). La afirmación de la OMS establece un nuevo marco, ya que el ciudadano deberá elegir quién le merece mayor credibilidad en seguridad alimentaria: la OMS o las organi-

zaciones ecologistas. Es interesante destacar que, tras la publicación de esta decisión, los grupos ecologistas han variado sus estrategias y apenas hablan ya de riesgos sanitarios cargando las tintas en los riesgos ambientales.

Es en esa parcela donde las cosas son, desde el punto de vista científico, menos claras, ya que hay una falta de metodologías para analizar riesgos medioambientales, tanto de las plantas transgénicas como de las convencionales (26). Desde los sectores que se oponen a la transgenia se aducen posibles transferencias de los genes exógenos desde la variedad transgénica a variedades silvestres. Sin duda sucederán, ya que esta transferencia se produce frecuentemente en la naturaleza siempre que exista compatibilidad sexual y presión selectiva. Por ello, en Europa la transferencia de genes del maíz transgénico es improbable y probable si utilizamos soja transgénica (27). Pero no olvidemos que ese riesgo también se da y se dará con cualquier variedad vegetal resistente a una plaga que haya sido generada por cruce sexual o mutagénesis. Otro posible riesgo medioambiental es la pérdida de biodiversidad agrícola asociada al cultivo de plantas transgénicas. Nada nuevo en agricultura, pues padecemos este problema desde que el hombre decidió cultivar. El freno racional a este problema, venga de las transgénicas, venga de las convencionales, es potenciar los bancos de germoplasma y las colecciones de cultivo. Un último riesgo medioambiental es el referente a los efectos dañinos que ciertas plantas transgénicas resistentes a insectos pueden tener sobre poblaciones de otros insectos distintos de aquellos contra los que protegen. Es una posibilidad que, en el caso de los transgénicos, a diferencia de las variedades convencionales, antes de conceder el permiso de comercialización se obliga a analizar.

En resumen, no se percibe la aparición de nuevos posible riesgos ambientales por el uso de las variedades transgénicas. Son los mismos de la agricultura convencional, aunque en este caso se intentan determinar a priori mediante la realización de libera-

ciones controladas al medio ambiente de las que ya se llevan realizadas decenas de miles en todo el mundo (28). La pregunta clave es, por lo tanto, ¿acelerará el empleo de transgénicos la aparición de estos riesgos? La respuesta desde la ciencia es que siempre que se mantengan las normas estrictas de evaluación que empleamos actualmente parece poco probable.

## LOS BENEFICIOS

¿Para qué sirven los alimentos transgénicos? Los grupos que se oponen a este nuevo tipo de alimentos lanzan esta pregunta en la UE. Ante la triste realidad de la moratoria que se dio en Europa en los últimos años, sólo se puede comercializar un maíz resistente a un insecto y una soja resistente a un herbicida, variedades que tan sólo benefician a los productores y no a los consumidores. Sin embargo, hemos visto que puede haber mucho más y de extrema utilidad. Pero no sólo para nosotros sino sobre todo para los países del Tercer Mundo (29-30). De ello se han aprovechado muchas empresas del sector agroalimentario y algunos biotecnólogos entusiastas que, sin ruborizarse, afirman que los alimentos transgénicos acabarán con el problema del hambre en el mundo. Este problema tiene solución hoy en día al producirse la suficiente cantidad de alimentos para que nadie pase hambre, pero, por desgracia, el reparto de excedentes alimentarios es un problema social y político sin solución. Por ello, sin esas medidas de poco valen los transgénicos. Resulta particularmente lamentable que algunas compañías del sector hayan hecho uso de este mensaje cuando ninguna de ellas trabaja en los cultivos que plantan y comen los habitantes de los países con problemas nutricionales y de abastecimiento. Pero si esas medidas se toman, los alimentos transgénicos pueden ser el complemento ideal. En esta filosofía se enmarcan los esfuerzos de algunos países del Tercer Mundo como China, India o Kenia financiando investigación pública sobre alimentos transgénicos. Ya hay desarrollos: patatas con mejor conteni-

do proteico (31), papayas con incrementos de productividad (32) o boniatos resistentes al ataque de virus que acaban con la cosecha en algunos países africanos. ¿Tenemos derecho a prohibirles solucionar sus problemas en base a unos posibles riesgos que, hasta ahora, a pesar de las miles de evaluaciones realizadas, no se han detectado? Aún a sabiendas de que pueda interpretarse como reaccionario por parte de algunos, debemos recordar que resulta penosa la actitud de alguna afamada organización ecologista cuando gira la vista a otro lado frente a todas estas evidencias.

## EL FUTURO

A pesar de que las campañas contrarias a la comercialización de los alimentos transgénicos se mantienen en las mismas posiciones desde hace más diez años, las evidencias científicas tan solo se han acumulado en un lado de la balanza, en el de demostrar la seguridad de estos productos. Además, los muchos años de cultivo, comercialización y consumo en países como Estados Unidos, Canadá o Australia suponen una sólida confirmación de que todos los miedos y peligros que se esgrimieron desde el principio carecen del fundamento que desde entonces ya les negaba la comunidad científica y de que el único camino válido, era entonces y lo sigue siendo ahora, la evaluación caso por caso y riesgo por riesgo.

Como ha ocurrido siempre en la historia de la ciencia y la tecnología, la verdad y el progreso acaban imponiéndose al fundamentalismo y la sinrazón. Nada está exento de riesgo y por ello nunca se puede bajar la guardia, pero de nada sirve partir de posiciones prejuizadas e inamovibles y las soluciones siempre pasan por atender a evaluaciones exhaustivas y avalar las conclusiones y las decisiones que de ellas se deriven con argumentos científicos contrastables. En el futuro próximo nos espera una avalancha de nuevos alimentos transgénicos en los que el consumidor encontrará ventajas para su salud o para sus sentidos. Sin duda la percepción social de los transgénicos en Europa se verá profunda-

mente alterada cuando los ciudadanos puedan encontrarle la utilidad a estos productos, tal y como ocurrió, ya hace décadas, cuando empezaron a producirse vacunas o insulina transgénica que representaban claras ventajas económicas y sanitarias y que ni en su origen ni en la actualidad han generado el más mínimo revuelo social.

## Bibliografía:

- 1.- Daniel Ramón. Los genes que comemos. Algar, 1999, Alzira.
- 2.- Jared Diamond. "Evolution, consequences and future of plant and animal domestication". *Nature* 418, 2002, págs 700-707.
- 3.- Moshe Feldman, Ernest Sears. "Los recursos genéticos del trigo silvestre" *Investigación y Ciencia*, Marzo 1981, págs 50-61.
- 4.- Daniel Ramón, María Dolores Calvo. "Debate en torno a la comercialización de los alimentos transgénicos". *Arbor* 661 2001, págs 171-186.
- 5.- Graham Brookes. "The farm level impact of using Bt maize in Spain". *Crop Biotechnology Science* 3, 2003, 1-16.
- 6.- Marcel Prins. "Broad virus resistance in transgenic plants". *Trends in Biotechnology* 21, 2003, págs 373-375.
- 7.- Dilip Shah, Robert Horsch, Harry Klee, Ganesh Kishore, Jill Winter, Nilgun Tumer, Cathy Hironajka, Patricia Sanders, Charles Gasser, Serdar Aykent, Ned Siegel, Stephen Rogers, Robert Fraley. "Engineering herbicide tolerance in transgenic plants". *Science* 233, 1986, págs 478-481.
- 8.- Raymond Sheehy, Matthew Kramer, William Hiatt. "Reduction of polygalacturonase activity in tomato fruit by antisense RNA". *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 85, 1988, págs 8805-8809.
- 9.- Richard Visser, Evert Jacobsen. "Towards modifying plants for altered starch content and composition". *Trends in Biotechnology* 11, 1993, págs 63-68.
- 10.- Anthony Kinney. "Designer oils for better nutrition". *Nature Biotechnology* 14, 1996, pág 946.
- 11.- Brigid Brophy, Grant Smolenski, Thomas Wheeler, David Wells, Phil L'Huillier, Götz Laible. "Cloned transgenic cattle produce milk with higher levels of b-casein and k-casein". *Nature Biotechnology* 21, 2003, págs 157-162.
- 12.- Pascale de Ruyter, Oscar Kuipers, Wilco Meijer, Willem de Vos. "Food-grade controlled lysis of *Lactococcus lactis* for accelerated cheese ripening". *Nature Biotechnology* 15, 1997, págs 976-979.
- 13.- Paloma Sánchez-Torres, Luis González-Candelas, Daniel Ramón. "Expression in a wine yeast strain of the *Aspergillus niger* abfB gene". *FEMS Microbiology Letters* 145, 1996, págs 189-194.
- 14.- Luis González-Candelas, Alejandro Cortell, Daniel Ramón. "Construction of a recombinant wine yeast strain expressing a fungal pectate lyase gene". *FEMS Microbiology Letters* 126, 1995, págs 263-270.
- 15.- Takeshi Arakawa, Daniel Chong, William Langridge. "Efficacy of a food plant-based oral cholera toxin B subunit vaccine". *Nature Biotechnology* 16, 1998, págs 292-297.
- 16.- Amanda Walmsley, Charle Arntzen. "Plant cell factories and mucosal vaccines". *Current Opinion in Biotechnology* 14, 2003, págs 145-150.
- 17.- Karen Robinson, Lisa Chamberlain, Karin Schofield, Jeremy Wells, Richard LePage. "Oral vaccination of mice against tetanus with recombinant *Lactococcus lactis*". *Nature Biotechnology* 15, 1997, págs 653-657.
- 18.- Carol Tacket, Hugh Mason, Genevieve Losonsky, John Clements, Myron Levine, Charles Arntzen. "Immunogenicity in humans of a recombinant bacterial antigen delivered in a transgenic potato". *Nature Medicine* 5, 1998, págs 607-609.
- 19.- Xudong Ye, Salim Al-Babili, Andreas Klöti, Jing Zhang, Paola Lucca, Peter Beyer, Ingo Potrykus. "Engineering provitamin A (b-carotene) biosynthetic pathway into (carotenoid-free) rice endosperm". *Science*, 2000, págs 303-305.
- 20.- Fernando Agius, Rocío González-Lamothe, José Luis Caballero, Juan Muñoz-Blanco, Miguel Angel Botella, Victoriano Valpuesta. "Engineering increased vitamin C levels in plants by overexpression of a D-galacturonic acid

reductase". *Nature Biotechnology* 21, 2003, págs 177-181.

21.- David Shintani, Dean Della Penna. "Elevating the vitamin E content of plants through metabolic engineering". *Science* 282, 1998, págs 2098-2100.

22.- Francisca Rández-Gil, Pascual Sanz, José Antonio Prieto. "Engineering baker's yeast: room for improvement". *Trends in Biotechnology* 17, 1999, págs 237-244.

23.- Luis González-Candelas, José Vicente Gil, Rosa Lamuela-Raventós, Daniel Ramón. "The use of transgenic yeasts expressing a gene encoding a glycosyl-hydrolase as a tool to increase resveratrol content in wine". *International Journal of Food Microbiology*, 59,2000, págs 179-183.

24.- Karl Heinz Engel, Gary Takeoka, Roy Teranishi. *Genetically modified foods: safety aspects*. ACS Symposium Series, 1995, Washington.

25.- Daniel Ramón. "Genetically modified foods: a case of information or misinformation". *International Microbiology* 3, 2000, págs 1-2.

26.- Daniel Ramón, Fernando González-Candelas. "Els aliments transgènics: reflexions científiques i socials". *Mètode* 24, 2000, págs 8-9.

27.- Fernando Nuez, Juan José Ruiz. "¿Constituyen los cultivos transgénicos un riesgo para el hombre o el medio ambiente?" *Phytoma* 91, 1997, págs 7-16.

28.- Clive James. *Global review of commercialized transgenic crops*. ISAAA, 2002, Ithaca.

29.- Jikung Huang, Carl Pray, Scott Rozelle. "Enhancing the crops to feed the poor". *Nature* 418, 2002, págs 678-684.

30.- Robert Paarlberg. "The real threat to GM crops in poor countries: consumer and policy resistance to GM foods in rich countries". *Food Policy* 27, 2002, págs 247-250.

31.- Subhra Chakraborty, Niranjana Chakraborty, Asis Datta. "Increased nutritive value of transgenic potato by expressing a nonallergenic seed albumin gene from *Amaranthus hypochondriacus*". *Proceedings of the National Academy of Science USA* 97, 2000, págs 3724-3729.

32.- Juan Manuel De la Fuente, Verónica Ramírez-Rodríguez, José Luis Cabrera-Ponce,

Luis Herrera-Estrella. "Aluminium tolerance in transgenic plants by alteration of citrate synthesis". *Science* 276, 1997, págs 1566-1568.

# VALIDACIÓN DE UN MÉTODO INMUNOLÓGICO PARA MICROBIOLOGÍA ALIMENTARIA

Dra. Estefanía Escartín

SPM CONTROLER. Santa Maria 40-42, 08340-Vilassar de Mar  
Tel. 937502392, fax 937597143, e-mail: estefania@spmcontroler.es

## RESUMEN

En un estudio de validación de métodos microbiológicos ausencia/presencia es muy importante, tanto el diseño experimental, como el cálculo estadístico posterior de los resultados para poder evaluar los parámetros necesarios (selectividad, sensibilidad, especificidad, eficacia y límite de detección). En esta publicación se expondrán los resultados obtenidos en la validación de la investigación de *Salmonella spp.* y *Listeria monocytogenes* en muestras de alimentos mediante sistemas ELFA.

## INTRODUCCIÓN

Para poder realizar una validación adecuada de un método analítico, en primer lugar, hay que decidir el modelo estadístico a seguir para evaluar los resultados obtenidos.

Existen diversos tipos de distribuciones para conocer la disposición espacial de elementos en una población (muestras) y el número de elementos que contenga dicha población (analitos).

Los modelos estadísticos existentes permiten establecer distribuciones de probabilidad y su selección depende del tipo de variable que se pretenda manejar:

- Para variables discretas, se aplican la distribución de Poisson, la binomial y la binomial negativa.
- Para variables continuas se aplica la distribución normal (no útil para medidas microbiológicas).

Una característica que define a las distribuciones de variables discretas es que la media y la varianza no son independientes la una de la otra, mientras que ésta es una característica de la distribución normal.

Para evaluar datos microbiológicos no podremos utilizar nunca una distribución normal, ya que es el modelo al que se adaptan la mayoría de las variables continuas como medidas de volumen, de masa, etc.

En cambio, la distribución de Poisson es uno de los modelos fundamentales en el análisis estadístico de datos microbiológicos. Está basado en una

distribución espacial totalmente aleatoria de los elementos que la forma, no existiendo ningún tipo de interferencias entre ellos. Podemos asumir que, al tomar una submuestra y homogeneizarla 1/10 con el medio líquido correspondiente, obtendremos una distribución aleatoria según Poisson, en la que la media y la varianza son iguales ( $S^2 = x$ ).

Pero, en la naturaleza, la distribución de los microorganismos no es perfectamente homogénea sino que interactúan entre ellos y forman agrupaciones. Esta distribución se conoce como distribución de agrupamiento y se la denomina distribución binomial negativa, en la que la varianza es mayor que la media ( $S^2 > x$ ). Así, podemos asumir que los microorganismos en una muestra de alimentos seguirán una distribución binomial negativa, y que a partir de aquí tomaremos las diferentes submuestras para el análisis.

## SISTEMÁTICA DE LA VALIDACIÓN

### *Evaluación de los factores que influyen en los resultados*

Antes de empezar a diseñar la validación, hemos de comprobar que los posibles factores que pueden afectar al resultado final, están controlados. Dicha evaluación y las medidas adoptadas para controlar estos factores se presentan en la tabla 1.

### *Definición de los parámetros a estudiar en función del tipo de método y de los criterios de aceptación "a priori"*

En métodos microbiológicos tipo ausencia/presencia (detectado/ no detectado), los parámetros a estudiar serán los siguientes:

#### **SELECTIVIDAD**

Capacidad de un método microbiológico para inhibir el crecimiento de microorganismos no esperados.

Un método para determinar la selectividad es el estudio de la inhibición de microorganismos.

#### **SENSIBILIDAD, ESPECIFICIDAD Y EFICACIA**

**Sensibilidad:** proporción de muestras que contienen el microorganismo investigado y responden positivamente al método.

**Especificidad:** proporción de muestras que no contienen el microorganismo investigado y responden negativamente al método.

**Eficacia:** Es un parámetro general y único que indica la fracción de muestras atribuidas correctamente. Es el cociente entre la suma de verdaderos positivos y verdaderos negativos y el total de muestras analizadas.

Los tres parámetros se determinan en una misma experiencia. Para ello, se analiza un número de muestras no inferior a 30. Para cada muestra debe existir un valor de referencia, que se establecerá adicionando una concentración conocida del microor-



Método de análisis	Factor	Medida adoptada para minimizar su influencia en el ensayo	
ALIMENTOS: Ausencia/presencia	Medios de cultivo	Control proveedores y control calidad interno	
	Homogeneización (diluidor y stomacher)	Verificación diaria y Calibración periódica del diluidor	
	Temperatura de incubación (estufa)	Control en continuo de la temperatura y Calibración de uniformidad y estabilidad periódica	
	Obtención resultado	Recuento visual	Control de calidad interno: recuentos cruzados entre analistas
		Mini-VIDAS	Verificación periódica equipo y control consumibles
		Confirmación	Control consumibles y medios

Tabla 1.-

ganismo investigado a muestras negativas. En el estudio se deben incluir, aproximadamente, un 50% de muestras positivas y un 50% de muestras negativas. El estudio debe ser ciego, la persona que prepare las muestras no debe intervenir en ninguna etapa del procedimiento analítico. Antes de realizar los cálculos, se deben confirmar tanto las desviaciones positivas como las negativas. La confirmación consiste en identificar hasta un nivel suficiente los microorganismos aislados que han dado lugar al resultado positivo.

Así, a efectos del método de estudio:

- Las desviaciones positivas confirmadas se consideran verdaderos positivos. Las no confirmadas serán falsos positivos.
- Las desviaciones negativas no confirmadas se considerarán verdaderos negativos. Las desviaciones negativas confirmadas serán falsos negativos.
- Los verdaderos positivos serán la suma de CP y DP confirmadas.
- Los verdaderos negativos serán la suma de CN y DN no confirmadas.

Finalmente, se determinarán los parámetros de validación aplicando las siguientes fórmulas:

• Sensibilidad: 
$$S = \frac{VP}{VP + FN}$$

• Especificidad: 
$$E = \frac{VN}{VN + FP}$$

• Eficacia: 
$$Ef = \frac{VP + VN}{N}$$

Siendo: VP: el número de verdaderos positivos detectados por el método de estudio.

VN: el número de verdaderos negativos detectados por el método de estudio.

FP: el número de falsos positivos obtenidos por el método de estudio.

FN: el número de falsos negativos obtenidos por el método de estudio.

N: el número total de muestras estudiadas.

Criterio de aceptación: se aceptará que un método presente una sensibilidad, especificidad y eficacia igual o superior al 90%.

**LÍMITE DE DETECCIÓN**

El límite de detección de un método microbiológico es el número más bajo de microorganismos cultivables que debe existir en una muestra para poder obtener un resultado positivo con una determinada probabilidad.

Asumiendo una distribución de Poisson, se puede calcular qué concentración de microorganismos es necesaria para obtener un resultado positivo con una determinada probabilidad. Para ello, se parte de la fórmula que expresa la probabilidad de registrar un resultado positivo en una distribución de Poisson:

$$p(+) = 1 - e^{-m}$$

Despejando m en la anterior fórmula tenemos:

$$m = -Ln(1 - p(+))$$

Siendo: p(+): la probabilidad de encontrar un resultado positivo.  
e: la base de los logaritmos naturales.

m: el número medio de microorganismos por porción analítica.

Aplicando la fórmula, es posible construir la tabla 2, que indica para cada probabilidad esperada, qué concentración media m se requiere:

Es decir, para tener una probabilidad del 95% de obtener un resultado positivo en una técnica microbiológica cualitativa, se requiere un recuento mínimo de 3 UFC/porción analizada. Si lo que interesa es una probabilidad mayor, del 99%, el recuento medio debe ser 5 UFC/porción analizada.

A la hora de seleccionar las concentraciones de microorganismos con las que se va a trabajar en el estudio del límite de detección de un método, hay que tener en cuenta esta distribución de probabilidades, ya que si se trabaja con concentraciones muy bajas. Es posible obtener resultados negativos en una porción elevada y achacarlos a una falta de sensibilidad del método.

En el caso de que lo que interese conocer sean las probabilidades que existen de obtener un número determinado de muestras positivas cuando se parte de un determinado recuento medio y se

p(+)	0.50	0.55	0.60	0.65	0.70	0.75	0.80	0.85	0.90	0.95	0.99
m	0.69	0.80	0.92	1.05	1.20	1.39	1.61	1.90	2.30	3.00	4.61

Tabla 2.- Concentración media m requerida para cada probabilidad esperada.

analiza un número determinado de submuestras, el modelo más adecuado para este caso es el binomial negativo, mediante la siguiente fórmula:

$$p(x) = \left( \frac{A!}{x! \cdot (A-x)!} \right) \cdot (p(\text{neg}))^{A-x} \cdot (1-p(\text{neg}))^x$$

Siendo: A: número de submuestras analizadas.

x: número de muestras analizadas con resultado positivo.

A - x: número de muestras analizadas con resultado negativo.

p(x): probabilidad de obtener x resultados positivos.

p(neg): probabilidad de obtener un resultado negativo.

Así, por ejemplo, partiendo de una muestra con un recuento medio de 5 UFC/porción analizada y estudiando 20 submuestras, vamos a calcular la probabilidad de obtener 18 resultados positivos:

$$p(\text{neg}) = e^{-5} = 0.0067$$

$$p(18) = \left( \frac{20!}{18! \cdot (20-18)!} \right) \cdot (0.0067)^{20-18} \cdot (1-0.0067)^{18} = 0.00756$$

Con esta fórmula podemos calcular sucesivamente la probabilidad de obtener todos los resultados positivos, sólo 19, sólo 18, etc.:

- 20 resultados positivos de 20 analizadas: 0.874.
- 19 resultados positivos de 20 analizadas: 0.119.
- 18 resultados positivos de 20 analizadas: 0.00756.

Por tanto, si se analizan 20 muestras con un recuento medio de 5 UFC/porción, se tiene una probabilidad de 0.993 (0.874+0.119) de obtener 20 o 19 muestras positivas. El resto de posibles resultados tienen una probabilidad tan baja de suceder que asumiendo que la distribución binomial es real, estos resultados serían debidos a una falta de sensibilidad del método.

**Diseño del estudio del límite de detección:** Se utilizarán muestras reales con una concentración conocida del microorganismo a determinar. Para ello, se seleccionarán diferentes tipos de muestras en función de los microorganismos que se van a investigar y el alcance del método en estudio. Previamente, se analizan las muestras

para confirmar que son negativas al microorganismo en estudio, seleccionando 20 muestras. A continuación, se inoculan las muestras: se toma una porción de la muestra y a cada una se le añade el inóculo previamente preparado. El inóculo consistirá en una dilución de un cultivo puro del microorganismo a estudiar, y se inoculará un volumen suficiente para obtener entre 1-10 UFC/porción analizada. Para conocer la concentración real del inóculo se hará un recuento de la dilución utilizada del inóculo, utilizando una placa no selectiva (PCA) y la técnica de siembra en superficie. En este recuento se realizarán 3 replicados.

Tras la inoculación, se homogeniza la porción a analizar: líquidos mediante agitación fuerte y sólidos añadiendo el diluyente y homogenizando en el stomacher, según se indica en el PNT del método en estudio. Finalmente, se procede a aplicar el método y se registran los resultados obtenidos.

**Criterio de aceptación:** el número de muestras positivas debe corresponder al esperado, teniendo en cuenta el inóculo empleado, y el número de muestras analizado y asumiendo una probabilidad del 95%. El límite de detección será el correspondiente al inóculo empleado. Así, por ejemplo, si inoculamos 20 muestras diversas con 5 UFC/porción muestra analizada y como resultado obtenemos 19 ó 20 muestras positivas podemos decir que el límite de detección será 5 UFC/porción muestra analizada. En el caso de que no se cumpla el porcentaje de positivos, se preparará otra serie de muestras inoculadas con diluciones menores, que garanticen un recuento más elevado. El intervalo de dilución siguiente es conveniente que tenga el valor más bajo entre 2 ó 3 veces el valor superior del intervalo anterior (20 - 50 UFC/porción muestra analizada en este caso).

### **Elección de muestras con matriz representativa y de la flora acompañante**

En el presente estudio se pretendía validar el método para alimentos en general, y se escogieron las matrices que más se analizan en nuestro laboratorio. Se utilizaron 9 matrices diferentes

de alimentos de procedencias distintas. Estos alimentos se autoclavarón y se analizaron adicionándolos con cepas no diana y diana a tres niveles de concentración diferentes: 1-10 UFC/25g, 20-50 UFC/25 g y 150-1500 UFC/g. Los alimentos fueron procesados en tres días diferentes y por tres analistas diferentes, obteniendo un total de 162 resultados, la mitad positivos y la otra mitad negativos.

Además de la cepa diana, se adicionaron diferentes cepas de distribución común en alimentos, a concentraciones similares a las de la cepa diana, para simular la flora acompañante de los alimentos. Las muestras codificadas como -004, -005, -006, -013, -014, -015, -016, -017 y -018 se adicionaron con el microorganismo diana (muestras positivas) y todas las cepas restantes, mientras que las codificadas como -001, -002, -003, -007, -008, -009, -010, -011 y -012 se adicionaron con todas las cepas menos con el microorganismo diana (muestras negativas).

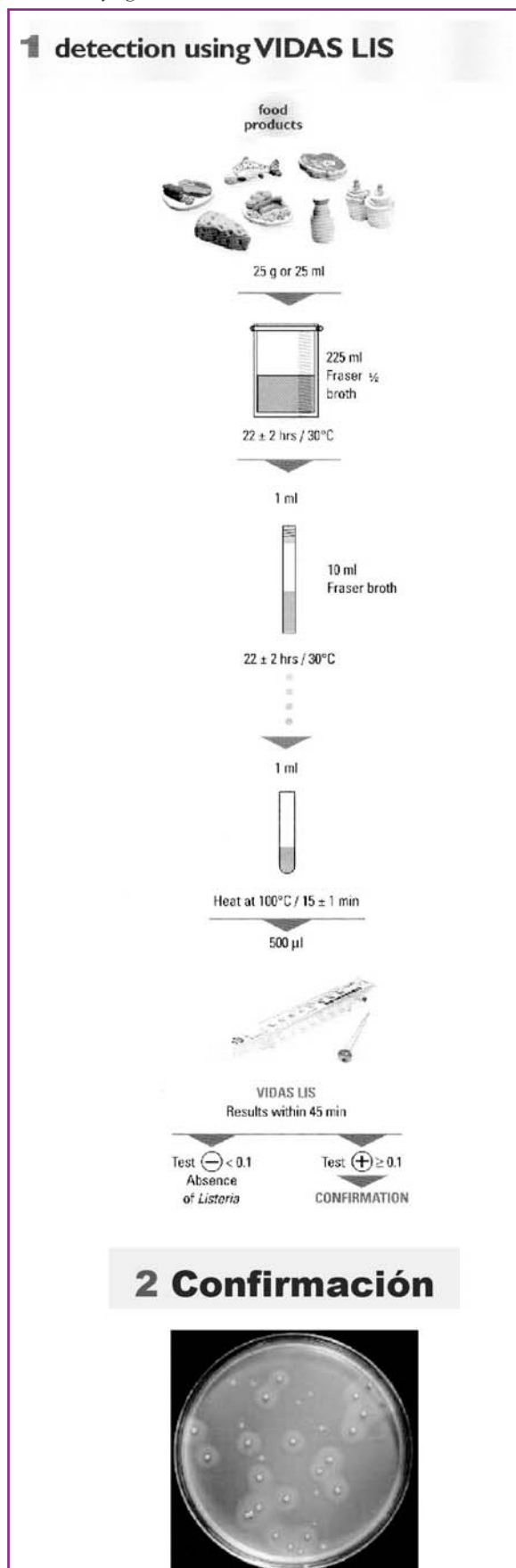
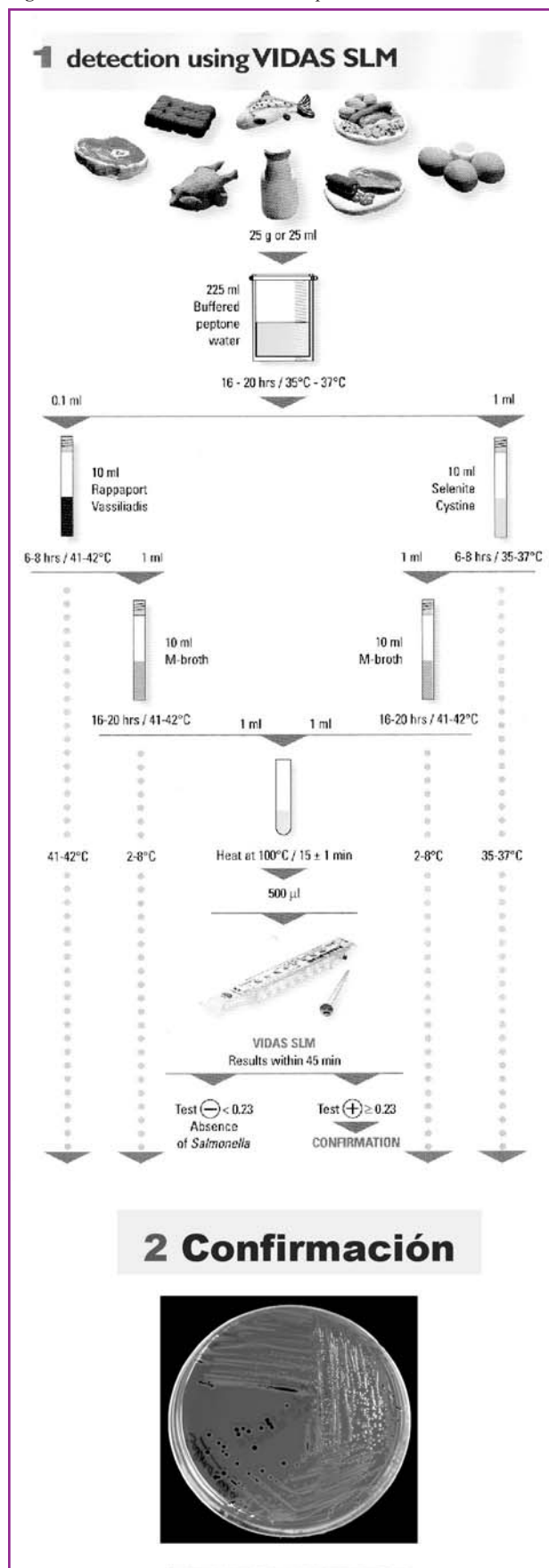
A continuación se describen brevemente las matrices utilizadas en el presente estudio:

- Salchichas de carne picada de cerdo (producto cárnico a base de carne distinta a la de ave de corral, destinado a su consumo cocinado).
- Postre lácteo (yogurt pasteurizado natural azucarado).
- Ensalada de lentejas (comida preparada con ingredientes sometidos a tratamiento térmico).
- Salsa mahonesa.
- Ensalada (comida preparada envasada a base de vegetales crudos).
- Pechugas de pollo sin piel (producto a base de carne de ave de corral destinado a su consumo cocido).
- Tarta de crema y manzana (producto de pastelería envasado).
- Menestra de verduras (producto ultra congelado a base de verduras).
- Filetes de pescado sin piel (merluza ultracongelada).

## **RESULTADOS OBTENIDOS**

A continuación, se presenta el esquema de los métodos analíticos a validar, para la detección de *Salmonella* spp. y *Listeria monocytogenes* mediante ELFA (figura 1).

Figura 1.- Métodos analíticos a validar para la detección de *Salmonella* spp. y *Listeria monocytogenes* mediante ELFA.



Resultado método en estudio	Resultado de referencia	
	Positivo	Negativo
Positivo	Concordancia positiva (CP): 81+/81 dopadas= 81	Desviación positiva (DP): 0-/81 dopadas= 0
Negativo	Desviación negativa (DN): 0+/81 autoclavadas= 0	Concordancia negativa (CN): 81-/81 autoclavadas= 81

Tabla 3.-

**Salmonella spp método ELFA**

**SELECTIVIDAD**

Se comprobó la selectividad del método al detectar *Salmonella* frente al resto de microorganismos, y sobre todo, frente a otras enterobacterias como *Escherichia coli*, *Shigella sonnei* y *Klebsiella pneumoniae*. Además, todas las muestras negativas contenían todas las cepas menos *Salmonella*. Todas las muestras dopadas con *Salmonella* y el resto de cepas interferentes dieron positivo, mientras que todas las muestras dopadas con todas las cepas interferentes menos *Salmonella* dieron negativo, por lo que podemos decir que el método de detección mediante ELFA es muy selectivo.

**SENSIBILIDAD, ESPECIFICIDAD Y EFICACIA**

Una vez obtenidos los resultados se recogen en una tabla de datos como la tabla 3.

VP: el número de verdaderos positivos detectados por el método de estudio = 81.

VN: el número de verdaderos negativos detectados por el método de estudio = 81.

FP: el número de falsos positivos obtenidos por el método de estudio = 0.

FN: el número de falsos negativos obtenidos por el método de estudio = 0.

N: el número total de muestras estudiadas = 162.

Finalmente se determinan los parámetros de validación aplicando las siguientes fórmulas:

• Sensibilidad:  $S = \frac{VP}{VP + FN} = 1$

• Especificidad:  $E = \frac{VN}{VN + FP} = 1$

• Eficacia:  $Ef = \frac{VP + VN}{N} = 1$

En el presente estudio de validación hemos obtenido una sensibilidad del 100%, una especificidad del 100% y una eficacia del 100%.

**LÍMITE DE DETECCIÓN**

Para el estudio de este parámetro, se utilizarán las muestras dopadas a nivel muy bajo, en este estudio  $\leq 3$  UFC/g. Se han analizado 27 muestras con un recuento medio de 3 UFC/25g, por lo que, si las muestras siguen una distribución binomial negativa, se tiene una probabilidad de 0.9568 (0.2519+0.3563+0.2427+0.1060) de obtener 24, 25, 26 o 27 muestras positivas. Así, en el presente estudio en el que hemos analizado 27 muestras con 3 UFC/25g y como resultado hemos obtenido 27 muestras positivas, podemos concluir que el límite de detección es de 3 UFC/25g.

**Listeria monocytogenes método ELFA**

**SELECTIVIDAD**

Se comprobó la selectividad del método al detectar *Listeria monocytogenes* frente al resto de microorganismos y,

sobre todo, frente a otras especies como *Listeria innocua* y *Listeria ivanovii*. Todas las muestras dopadas con todas las cepas interferentes, menos *Listeria monocytogenes* (incluyendo *L. innocua* y *L. ivanovii*), dieron negativo, por lo que podemos decir que el método de detección mediante ELFA es muy selectivo.

**SENSIBILIDAD, ESPECIFICIDAD Y EFICACIA**

Una vez obtenidos los resultados se recogen en una tabla de datos como la tabla 4.

VP: el número de verdaderos positivos detectados por el método de estudio = 75.

VN: el número de verdaderos negativos detectados por el método de estudio = 81.

FP: el número de falsos positivos obtenidos por el método de estudio = 0.

FN: el número de falsos negativos obtenidos por el método de estudio = 6.

N: el número total de muestras estudiadas = 162.

Finalmente, se determinan los parámetros de validación aplicando las siguientes fórmulas:

• Sensibilidad:  $S = \frac{VP}{VP + FN} = 0.926$

• Especificidad:  $E = \frac{VN}{VN + FP} = 1$

• Eficacia:  $Ef = \frac{VP + VN}{N} = 0.963$

Resultado método en estudio	Resultado de referencia	
	Positivo	Negativo
Positivo	Concordancia positiva (CP): 75+/81 dopadas= 75	Desviación positiva (DP): 6-/81 dopadas= 6
Negativo	Desviación negativa (DN): 0+/81 autoclavadas= 0	Concordancia negativa (CN): 81-/81 autoclavadas= 81

Tabla 4.-



En el presente estudio de validación, hemos obtenido una sensibilidad del 93%, una especificidad del 100% y una eficacia del 96%.

#### LÍMITE DE DETECCIÓN

Se han analizado 27 muestras con un recuento medio de 3 UFC/25g, por lo que si las muestras siguen una distribución binomial negativa, se tiene una probabilidad de 0.9568 ( $0.2519+0.3563+0.2427+0.1060$ ) de obtener 24, 25, 26 o 27 muestras positivas. Así en el presente estudio en el que hemos analizado 27 muestras con 3 UFC/25g y, como resultado, hemos obtenido 27 muestras positivas, podemos concluir que el límite de detección es de 3 UFC/25g.

9.- MITTATEKNIIKAN KESKUS. CENTRE FOR METROLOGY AND ACREDITATION. Publication J3/2002. Seppo I. Niemelä: Uncertainty of quantitative determinations derived by cultivation of microorganisms. Helsinki 2002.

10.- Decisión de la Comisión de 12 de agosto de 2002 por la que se aplica la Directiva 96/23/CE del Consejo en cuanto al funcionamiento de los métodos analíticos y la interpretación de los resultados.

## Bibliografía

1.- ISO 1995. Guide to the expression of uncertainty in measurement. First Edition corrected and reprinted in 1995. International Organization for Standardization, Geneva.

2.- ILAC-G17:2002. Introducing the concept of uncertainty of measurement in testing in association with the application of the standard ISO/IEC 17025.

3.- EA-04/14. The selection and use of reference materials. ISO 2000. Water Quality – Criteria for the establishment of equivalence between microbiological methods. ISO/TC 147/SC 4/WG 12 N34, ISO WD 1799.

4.- ISO/TR 13843:2000. Calidad del agua: guía para la validación de métodos microbiológicos.

5.- ISO/FDIS 16140:2000. Microbiología de los alimentos para consumo humano y animal: protocolo para la validación de métodos alternativos.

6.- ISO/DIS 17994. Calidad del agua: criterios para el establecimiento de la equivalencia entre métodos microbiológicos.

7.- ISO 17994. Criterios generales para el establecimiento de equivalencias entre dos métodos microbiológicos.

8.- AOAC INTERNATIONAL: Qualitative and quantitative microbiology guidelines for methods validation.