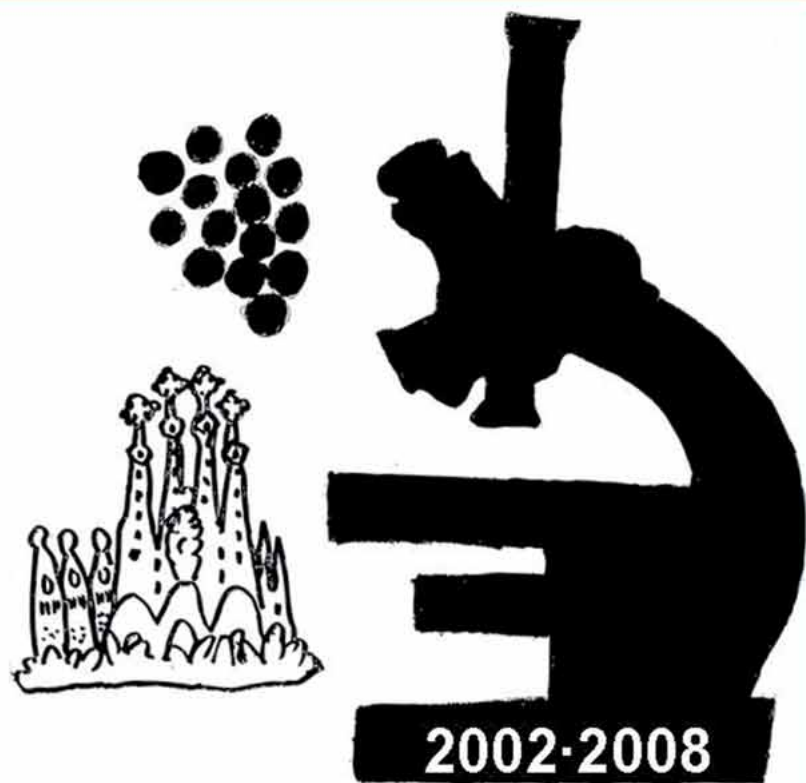


Alimentaria

CONGRESOS

VII WORKSHOP

MÉTODOS RÁPIDOS
Y AUTOMATIZACIÓN
EN MICROBIOLOGÍA
ALIMENTARIA



ORGANIZADO:

UAB

Universitat Autònoma
de Barcelona



XaRTA

Xarxa de Referència
en Tecnologia dels Aliments
de la Generalitat de Catalunya



IT
XARXA DE CENTRES
DE SUPORT
A LA INNOVACIÓ
TECNOLÒGICA



Alimentaria CONGRESOS

NORMAS PARA LOS AUTORES

DIRECTOR GENERAL:
Alfonso López de la Carrera

DIRECTOR CIENTÍFICO:
Dr. Enrique Benítez

DIRECTOR DE PRODUCCIÓN:
C.M. Gallego
produccion@eypasa.com

REDACTORA JEFE:
Alicia Díaz (Redactora Jefe)
redaccion@eypasa.com

SID-Alimentaria:
Henar Prado
legislacion@eypasa.com

DISEÑO Y MAQUETACIÓN:
Lucimagen
lucimagen@lucimagen.com

ADMINISTRACIÓN:
M^a Ángeles Teruel
M^a Teresa Martínez
informacion@eypasa.com

ISSN: 1989-1512

EDITA:



(Ediciones y Publicaciones Alimentarias, S.A.)
C/ Santa Engracia, 90, 4^o - 28010 Madrid
Tels. +34 91 446 96 59
Telefax: +34 91 593 37 44

ALIMENTARIA CONGRESOS considerará para su publicación todos aquellos trabajos de carácter técnico y científico relacionados con la tecnología, la elaboración y el control de los alimentos.

INSTRUCCIONES PARA LA PUBLICACIÓN DE ORIGINALES:

Exclusivamente podrán remitirse para su publicación trabajos que no hayan sido editados previamente en otras publicaciones, de cualquier naturaleza o contenido editorial.

El texto podrá ser redactado en español o en inglés.

Las referencias bibliográficas se incluirán al final del texto, ordenadas según el orden de aparición o de cita en el texto, con numeración correlativa. La cita o llamada se hará presentando el número entre paréntesis.

Para cada referencia bibliográfica se detallará el nombre del autor o autores, el título del artículo o capítulo, nombre de la revista, libro o publicación, el nº del volumen, nº de la primera y última página y año de la publicación.

El documento digital del trabajo debe ser guardado en formato .doc de Microsoft Word (u otro tratamiento de texto) sin incorporar gráficos, esquemas, diseños o imágenes que serán guardadas aparte. En ningún caso se admitirán trabajos en otras aplicaciones ofimáticas como Power Point, Excell, etc.

Las tablas, fotografías y gráficos se adjuntarán en un documento distinto del texto, en formato JPEG, EPS, TIFF o BMP, con una resolución de 300 ppp (dpi). No se publicarán posters sino un resumen en texto de ellos. La extensión máxima de los resúmenes de comunicaciones orales y de posters (incluyendo texto e imágenes) será de una página y los resúmenes de ponencias y conferencias estará comprendida entre una y tres páginas incluyendo fotografías, cuadros, gráficas o cualquier otro elemento que no sea texto. Siendo el tipo de fuente utilizada la Times New Roman con un tamaño 11, márgenes superior e inferior a 2,5 cm. y derecho e izquierdo a 3 cm., interlineado sencillo y espaciado anterior y posterior a 0 pto.

Los autores, deberán aparecer al menos con su nombre, cargo, lugar de trabajo y dirección de correo electrónico siendo optativa la aparición de dirección postal y teléfono.

Los trabajos deben ser remitidos a la organización del congreso, jornada o simposio que centralizará, aprobará y remitirá conjuntamente los trabajos a la redacción de Alimentaria congresos.

El autor concede expresamente todos los permisos y derechos necesarios para la publicación de los trabajos por él remitidos y que sean aceptados para su publicación, que podrá ser impresa o digital así como para su traducción, distribución, comunicación pública, o cualquier otra forma que Eypasa pueda considerar oportuna.

Los autores quedan autorizados para la reproducción total o parcial de sus trabajos en la forma en que sean maquetados, compuestos y publicados por Alimentaria Congresos y Alimentaria, sin ningún tipo de restricción o limitación con la única condición de citar la procedencia.

NOTA: La empresa editora declina toda responsabilidad sobre el contenido de los artículos originales, cuya total responsabilidad es de sus correspondientes autores y de los comités organizadores de los congresos, jornadas o simposios recogidos en la presente publicación. Todos los derechos reservados.

www.revistaalimentaria.es

www.eypasa.com

www.sid-alimentaria.com



ÍNDICE

- RAPID METHODS AND AUTOMATION IN MICROBIOLOGY 25 YEARS OF DEVELOPMENTS AND PREDICTIONS	4
- DO METHODS USED IN FOOD MICROBIOLOGY SATISFY ACTUAL NEEDS FOR FOOD SAFETY IMPLEMENTATION?	7
- LA POLYMERASE CHAIN REACTION (PCR)	9
- TRANSGÉNICOS, NUTRIGENÉTICA Y NUTRIGENÓMICA EN ALIMENTACIÓN	11
- IMPLEMENTACIÓN DEL SISTEMA TEMPO EN LA RUTINA DEL LABORATORIO DE CONTROL DE CALIDAD GRUPO GALLINA BLANCA – STAR	13
- THE AOAC INTERNATIONAL RAPID METHODS VALIDATION PROCESS	15
- APLICACIÓN DE LA MICROBIOLOGÍA PREDICTIVA EN LA INDUSTRIA ALIMENTARIA	17
- PRODUCCIÓN DE ANTICUERPOS MONOCLONALES (AcM) Y SU APLICACIÓN EN EL ANÁLISIS DE ALERGENOS Y MICOTOXINAS	20
- VALIDACIÓN DE MÉTODOS MICROBIOLÓGICOS ALTERNATIVOS	24
- LA TECNOLOGÍA TRANSCRIPCIÓN REVERSA - PCR PERMITE UNA DETECCIÓN MÁS RÁPIDA DE LISTERIA	29
- EVALUATION OF THE USE OF THE RAPIDCHEK® SELECT™ SALMONELLA SYSTEM FOR IN NPIP ENVIRONMENTAL SAMPLES	30
- BBL™ CAMPY-CEFEX AGAR	31



RAPID METHODS AND AUTOMATION IN MICROBIOLOGY 25 YEARS OF DEVELOPMENTS AND PREDICTIONS

Daniel Y. C. Fung

Department of Animal Sciences and Industry
 Kansas State University
 dfung@ksu.edu

Rapid methods and automation in microbiology is a dynamic area in applied microbiology dealing with the study of improved methods in the isolation, early detection, characterization, and enumeration of microorganisms and their products in clinical, pharmaceutical, food, industrial, and environmental samples. In the past 25 years this field has emerged into an important sub-division of the general field of applied microbiology and is gaining momentum nationally and internationally as an area of research and application to monitor the numbers, kinds, and metabolites of microorganisms related to food spoilage, food preservation, food fermentation, food safety, and foodborne pathogens.

Medical microbiologists started to be involved with rapid methods around mid-1960's and started to accelerate in the 1970's and continue developments in the 80's, 90's and up to the present day. Other disciplines such as Food, Pharmaceutical, Environmental, and Food Microbiology were lagging about 10 years behind. Many symposia and conferences were held nationally and internationally to discuss the developments in this important applied microbiology topics. The current Rapid Methods and Automation in Food Microbiology Workshop in Barcelona, Spain is an example of such an effort to provide updated information and constructive discussions on this topic.

ADVANCES IN VIABLE CELL COUNTS AND SAMPLE PREPARATION.— The number of living organisms in the product, on the surface of manufacturing environment and the air of processing plants is very important for the food science and industry. Colony forming units (CFU) is the standard way to express the microbial loads. In the past 25 years several ingenious systems in “massaging” or “pulsifying” the solid or liquid samples were developed so that the samples are homogeneously distributed in a disposable bag after 1 to 2 minutes of operation. Typically one ml (after dilutions) is pla-

ced into melted agar to encourage microorganisms to grow into discrete colonies for counting (CFU/ml). These colonies can be isolated and further identified as pathogenic or non pathogenic organisms. In the past 25 years, convenient systems such as nutrient housed in films (Petrifilm), mechanical instrument to spread a sample over the surface of a preformed agar plate (Spiral plater), trapping microorganisms on a bacteriological membrane and look for growth of target microorganisms on selective and non-selective culture media (Isogrid), non-thermal Pectin-Ca gel system (Micrology, Inc.), etc. greatly help to reduce labor time in performing viable cell count. The 3 or 5 tube Most Probable Number (MPN) system has been in use for more than 100 years in water testing and food testing but the procedure is very labor intensive and utilizes large amounts of test tubes and media. In 2007 a completely mechanized, automated, and hands-off 16 tube, three dilution MPN system named TEMPO by bioMerieux is being marketed for ease of operation of this tedious but yet powerful MPN viable cell count procedure used in Public Health, Pharmaceutical and Food laboratories around the world. Results indicated that TEMPO provided equivalent data compared with standard viable cell count methods. This author predicts that TEMPO will be very successful in food and water microbiology in the near and far future.

As a guide the following **FUNG scale on viable cell counts** has been developed:

- 0 to 2 log CFU/ g, ml, or cm²
 - ▶▶ Low count, no concern
- 3 to 4 log CFU/ g, ml, or cm²
 - ▶▶ Intermediate count, slight concern
- 5 to 6 log CFU/ g, ml, or cm²
 - ▶▶ High count, definite concern
- 7 log CFU/ g, ml, or cm²
 - ▶▶ Index of Spoilage, serious concern
- 8 log CFU/ g, ml, or cm²
 - ▶▶ Odor, unacceptable
- 9 log CFU/ g, ml, or cm²
 - ▶▶ Slime, highly unacceptable
- 10 log CFU/ g, ml, or cm²
 - ▶▶ Discard immediately

This scale is for general microbial population of food and water. No food pathogens are allowed (e.g. *Salmonella*,

Listeria monocytogenes, *Escherichia coli* O157:H7, *Campylobacter jejuni*, etc.) especially in cooked ready-to-eat foods.

AIR SAMPLES AND SURFACE SAMPLES— The Food industry also needs to ascertain the air quality as well as surfaces for product manufacturing, storage, and transportation. An active air sampling instrument can “suck” a known volume of air and deposit it on an agar surface (impaction) or trapped it in liquid (impingement) to obtain CFU/ m³ or ml. A variety of swabs, tapes, sponges, contact agar methods have been developed to obtain surface count of Food manufacturing environment.

FUNG SCALE – for air and surface samples:

- 0-100 CFU/m³
 - ▶▶ Acceptable count
- 100-300 CFU/m³
 - ▶▶ Intermediate count
- >300 CFU/m³
 - ▶▶ Too high, need corrective action needed

Note: In Singapore >500 CFU/m³ is not allowed in food plants.

Total Counts for Food Contact Surfaces such as forks, knives, dishes, spoons, chopping blocks, table tops, glass for drinking water, etc.

- 0-10 CFU/cm²
 - ▶▶ Acceptable count
- 10-100 CFU/cm²
 - ▶▶ Intermediate count
- >100 CFU/cm²
 - ▶▶ Too high, corrective actions needed

AEROBIC, ANAEROBIC, AND “REAL TIME” VIABLE CELL COUNTS— By use of the correct gaseous environment or suitable reducing compounds one can obtain aerobic, anaerobic, facultative anaerobic microbial counts of products. Typically microbial counts were obtained in 24 to 48 hours. Several methods have been developed and tested in recent years that can provide “real” time viable cell counts such as the use of “Vital” stains (Acridine Orange) to report living cells under the microscope to count

fluorescing viable cells or measuring ATP of micro-colonies trapped in a special membranes. These real time test can give viable cell counts in about 1 to 4 hours.

A simple Fung Double Tube system using appropriate agar and incubation conditions has been developed and tested in Hawaii recreational waters in 2007 that can provide a *Clostridium perfringens* count for water testing in 6 hours.

The *Fung/Fujioka scale* for beach water in Hawaii, USA based on single sample concentrations (CFU/ml) of *Clostridium perfringens* using the Fung Double Tube (FDT) methods is as follows:

ADVANCES IN MINIATURIZATION AND DIAGNOSTIC KITS— Identification of normal flora, spoilage organisms, clinical and foodborne pathogens, starter cultures, etc. in many specimens is an important part of food microbiology. In the past 25 years many miniaturized diagnostic kits have been developed and widely used to conveniently introduce the pure cultures into the system and obtain reliable identification in as short as 2 to 4 hrs. Some systems can handle several or even hundreds of isolates at the same time. These diagnostic kits no doubt saved many lives by rapidly, accurately, and conveniently identifying pathogens so that treatments can be made correctly and rapidly. Fung is a pioneer in the development of these type of system starting at around 1970's. There are about 20 miniaturized systems on the market to identify pathogens ranging from enterics (*Salmonella*, *Shigella*, *Proteus*, *Enterobacter*, etc.) to non-fermentors, anaerobes, gram positives, and even yeasts and molds.

ADVANCES IN IMMUNOLOGICAL TESTINGS.— Antigen and antibody reaction has been used for decades for detecting and characterizing microorganisms and their components in medical and diagnostic microbiology. This is the bases for serotyping bacteria such as *Salmonella*, *Escherichia coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes*, etc. Both polyclonal antibodies and monoclonal antibodies have been used extensively in applied food microbiology. The most popular format is the "Sandwiched" ELISA test. Recently some companies have automated the entire ELISA procedure and can

complete an assay from 45 minutes to 2 hours after overnight incubation of the sample with suspect target organisms. Lateral Flow Technology (similar to pregnancy test with three detection areas on a small unit) offers a simple and rapid test for target pathogens (e.g. *E. coli* O157) after overnight incubation of food or allergens (e.g. wheat gluten) The entire procedure takes only about 10 minutes with very little training necessary. A truly innovative development in applied microbiology is the immuno-magnetic separation (IMS) system. Very homogenize paramagnetic beads have been developed which can be coated with a variety of molecules such as antibodies, antigens, DNA, etc. to capture target cells such as *E. coli* O157, *Listeria*, *Cryptosporidium*, *Giardia*, etc. These beads can then be immobilized, captured and concentrated by a magnet stationed outside a test tube. After clean-up, the beads with the captured target molecules or organisms can be plated on agar for cultivation or used in ELISA, Polymerase Chain Reaction (PCR), microarray technologies, biochips, etc. for detection of target organisms. Currently many diagnostic systems (ELISA test, PCR, etc.) are combining an IMS step to reduce incubation time and increase sensitivity of the entire protocol. Using the Pathatrix system of capturing circulating enriched meat samples by IMS Fung's laboratory can detect *E. coli* O157:H7 in 5.25 hours from the time of enriching the meat sample to the time of ELISA results of the presence or absence of the pathogen.

ADVANCES IN INSTRUMENTATION AND BIOMASS MEASUREMENTS— Instruments can be used to automatically monitor changes (such as ATP levels, specific enzymes, pH, electrical impedance, conductance, capacitance, turbidity, color, heat, radioactive carbon dioxide, etc.) of a population (pathogens or non-pathogens) growth kinetic and dynamics in a liquid and semi-solid sample. It is important to note that for the information to be useful, these parameters must be related to viable cell count of the same sample series. In general, the larger the number of viable cells in the sample, the shorter the detection time of these systems. A scatter gram is then plotted and used for further comparison of unk-

known samples. The assumption is that as the number of microorganisms increases in the sample, these physical, biophysical, and biochemical events will also increase accordingly. When a sample has 5 log or 6 log organisms/ml, detection time can be achieved in about 4 hrs. Some instruments can handle hundreds of samples at the same time.

ADVANCES IN GENETIC TESTINGS— Phenotypic expression of cells are subject to growth conditions such as temperature, pH, nutrient availability, oxidation-reduction potentials, etc. Genotypic characteristics of a cell is far more stable. Hybridization of DNA and RNA by known probes has been used for more than 30 years. More recently Polymerase Chain Reaction (PCR) is now an accepted method to detect viruses, bacteria and even yeast and molds by amplification of the target DNA and detecting the target PCR products. By use of reverse transcriptase, target RNA can also be amplified and detected. After a DNA (double stranded) molecule is denatured by heat (e.g. 95C), proper primers will anneal to target sequences of the single stranded DNA of the target organism, for example *Salmonella* at a lower temperature (e.g. 37C). A polymerase (TAQ) will extend the primer at a higher temperature (e.g. 70C) and complete the addition of complement bases to the single stranded denatured DNA. After one thermal cycle one piece of DNA will become two pieces. After 21 and 31 cycles one piece will become 1 million and 1 billion copies, respectively. At the beginning PCR products are detected by gel electrophoresis. Now ingenious ways to detect either the occurrence of the PCR procedure by fluorescent probes or special dyes, or by actually reporting the presence of the PCR products by molecular beacon. Since these methods generate fluorescence, the PCR reaction can be monitored over time and provide "real-time" PCR results. Some systems can monitor 4 different targets in the same sample (multiplexing). These methods are now standardized and easy to use and interpret.

To further characterize closely related organisms, detail analysis of the DNA molecule can be made by obtaining the patterns of DNA of specific organisms by pulse field gel electrophoresis (DNA fin-

ger-printing) or by “Riboprinting” of the ribosomal genes in the specific DNA fragment. Since different bacteria exhibit different patterns (e. g. *Salmonella* versus *E. coli*) and even the same species can exhibit different patterns (e. g. *Listeria monocytogenes* has 49 distinct patterns), these information can be used to compare closely related organisms for accurate identification of target pathogens (such as comparing different patterns of *E. coli* O157:H7 isolated from different sources in an outbreak) for epidemiological investigations.

ADVANCES IN BIOSENSOR, MICROCHIPS, AND NANOTECHNOLOGY. – Biosensor is an exciting field in applied microbiology. The basic idea is simple but the actual operation is quite complex and involves much instrumentation. Basically, a biosensor is a molecule or a group of molecules of biological origin attached to a signal recognition material. When an analyte comes in contact with the biosensor the interaction will initiate a recognition signal which can be reported in an instrument. Many types of biosensors have been developed. Sometime whole cells can be used as biosensors. Analytes detected include toxins, specific pathogens, carbohydrates, insecticides and herbicides, ATP, antibiotics, etc. The recognition signals used include electrochemical (e.g. potentiometry, voltage changes, conductance and impedance, light addressable, etc.), optical (such as UV, bioluminescence, chemiluminescence, fluorescence, laser scattering, reflection and refraction of light, surface plasmon resonance, polarized light, etc.) and miscellaneous transducers (such as piezoelectric crystals, thermistor, acoustic waves, quartz crystal, etc.).

Recently, much attention has been directed to “biochips” and “microchips” developments to detect a great variety of molecules including foodborne pathogens. Due to the advancement in miniaturization technology as many as 50,000 individual spots (e. g. DNA microarrays) with each spot containing millions of copies of a specific DNA probe can be immobilized on a specialized microscope slide. Fluorescent labeled targets can be hybridized to these spots and be detected. Biochips can also be designed to detect all kinds of foodborne pathogens

by imprinting a variety of antibodies or DNA molecules against specific pathogens on the chip for the simultaneous detection of pathogens such as *Salmonella*, *Listeria*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, etc. The market value is estimated to be as high as \$5 billion at this moment. This technology is especially important in the rapidly developing field of proteomics and genomics which require massive amount of data to generate valuable information. Nanotechnology is starting to make major advances in pure and applied sciences, including Food Science and Applied Microbiology.

TESTING TRENDS AND PREDICTIONS– There is no question that many microbiological tests are being conducted nationally and internationally in agricultural and food products, environmental samples, medical specimens, and water samples. The most popular tests are total viable cell count, coliform/*E. coli* count and yeast and mold counts. A large number of tests are also performed on pathogens such as *Salmonella*, *Listeria* and *Listeria monocytogenes*, *E. coli* O157:H7, *Staphylococcus aureus*, *Campylobacter* and other organisms. According to reliable sources in 1998, the worldwide microbiological tests was estimated to be 755 million tests with a market value of US\$1 billion. The projection is that in 2008 the number of tests will be about 1.5 billion tests with a market value of US\$5 billion. In 2007 about one third of the tests are being performed in North America (USA and Canada), another third in Europe, and the last third in the Rest of the World. This author predicts in twenty year the Rest of the World will perform 50 % of the tests with North America and Europe performing 25% each. This is due to rapid economic developments and food and health safety concerns of the world in the years to ahead.

PREDICTION OF THE FUTURE– The following are the ten predictions made by the author in 1995. Many predictions have been correct in 2007. (+) is a good prediction. (?) is an uncertain prediction.

1. Viable cell counts will still be used in the next 25 years. (+)
2. Real-time monitoring of hygiene will be in place. (+).
3. PCR, Ribotyping, and genetic tests will become reality in food laboratories. (+)
4. ELISA and immunological tests will be completely automated and widely used. (+)
5. Dipstick technology will provide rapid answers. (+)
6. Biosensors will be in place for Hazard Analysis Critical Control Point programs. (?)
7. Biochips, microchips, and nanotechnology will greatly advance in the field. (+)
8. Effective separation, concentration of target cells will assist rapid identification. (+)
9. A microbiological alert system will be in food and other packages. (?)
10. Consumers will have rapid alert kits for pathogens at home. (?)

In conclusion, it is safe to say that the field of rapid method and automation in microbiology will continue to grow in numbers and kinds of tests to be done in the future due to the increase concern on food safety and public health. The future looks very bright for the field of rapid methods and automation in microbiology. The potential is great and many exciting developments will certainly unfold in the near and far future in Food Microbiology and other applied microbiology areas.

REFERENCES–

- Fung, D. Y. C. 2002. Rapid Methods and Automation in Microbiology. Comprehensive Reviews in Food

Pollution category	FDT (CFU/10 ml)	Extrapolated FDT (CFU/100 ml)	Scale of beach pollution
I	0	<10 CFU	Uncontaminated
II	1-10 CFU	10-100 CFU	Non-point contamination
III	11-50 CFU	110-500 CFU	Sewage contamination
IV	>50 CFU	>500 CFU	Elevated Sewage

Contamination

Science and Food Safety. Inaugural Issue, Vol 1(1), 3-22 (www.ift.org).

- Fung, D. Y. C., R. Fujioka, K. Vijayavel, D. Sato, and D. Bishop. 2007. Evaluation of Fung Double Tube for Clostridium perfringens and Easyphage Test for F-Specific RNA Coliphages as Rapid Screening Tests for Fecal Contamination in Recreational Waters in Hawaii. Journal of Rapid Methods and Automation in Microbiology, Vol 15(3), 217-229.

BIOGRAPHIC DETAILS— Daniel Y. C. Fung, M.S.P.H., Ph.D., is a Professor of Food Science at Kansas State University (KSU). He is the Founder and Director of the world renowned International Workshop of Rapid Methods and Automation in Microbiology since 1981 at KSU. He has published more than 800 papers and is a Fellow of American Academy of Microbiology, Institute of Food Technologists and International Academy of Food Science and

Technology. In 2006 he was honored as Universitiy Distinguished Professor at Universitat Autònoma de Barcelona, Spain. In 2007 he completed 33 Ph.D. and 67 M.S. degree students as the Major Professor. In 2007 he won the Inaugural Outstanding Educator in Food Safety Award given by Food Safety Magazine and ConAgra Foods and presented at the 2007 International Association for Food Protection Annual meeting in Florida.

DO METHODS USED IN FOOD MICROBIOLOGY SATISFY ACTUAL NEEDS FOR FOOD SAFETY IMPLEMENTATION?

Cécile Lahellec

Agencia Francesa para la
Seguridad Alimentaria (AFSSA)
cécile.lahellec@club-internet.fr

VII WORKSHOP MRAMA . BARCELONA. 25 NOVEMBER 2008

During the past decades, something like a tornado could be observed in the sky of Food Safety . Happily, while that topic became more and more important for the consumers as well as for public authorities and industrials , a lot of efforts to find new microbiological methods adapted to the new needs were developed.

However , due to the important demands in Food Safety ,one is allowed to ask itself the following question: do methods used in Food microbiology satisfy actual needs for Food Safety implementation ?

In order to answer that question, at least partly, I would like to share with you a few data concerning at first the analysis methods used in Food microbiology for products analysis and their evolution during the past decades ; then , we shall examine briefly the needs for Food safety implementation . Finally , we'll try to answer the question Do methods used in Food microbiology satisfy actual needs for Food safety implementation? and draw a few conclusions

METHODS USED IN FOOD MICROBIOLOGY –

I-1- GENERAL ASPECTS

Classically, methods used in Food microbiology are divided into two groups :

- Qualitative methods, based on the isolation, identification and characterization of presumed pathogenic microorganisms

- Quantitative methods based on the enumeration of microorganisms on agar or in liquid medium, using the most probable number technique .

During a long period , methods used in Food microbiology were based exclusively on the use of culture media . However, from a few decades, following their development in medical microbiology, alternative methods have been initiated in the field of Food microbiology and, as you probably know, the “father” of those new, rapid methods is Dr Fung who, as you know, is the keynote speaker and Major lecturer of this workshop .

At the moment , one is able to find a lot of microbiological kits on the market to identify, characterize or enumerate microorganisms and it is somewhat hard to choose and decide the best method for a given purpose or according to the type of laboratory .

As you probably know, during a long time, some legal requirements limited the use of alternative methods . However, we shall see that the situation has somewhat changed by now and we can classify methods used in Food microbiology into the following ones :

- *Reference methods*, which are complete expertise methods; they are used especially in the case of discordance in the results obtained by two laboratories; their main advantage is their international recognition (ISO, CEN); till recently they were based exclusively on classical principles .

- *Routine methods* (in France at least), which are reference simplified methods; in a first step, those methods are experimental and published for two years; the comments of users during that period are used for their revision and homologation .

- *Alternative validated methods* you will study during the present workshop: they allow to analyse and estimate for one category of product the same value as that given by the reference method; moreover, they have to answer one or more of the following criteria: rapidity, facility to perform, analytical characteristics .

- *Internal methods* which are used in some laboratories; that is the reason why a standard concerning specifically intralaboratory validation of internal methods has been developed.

- *Sectorial methods*, whose opportunity is examined in different groups of ISO, for example concerning canned products.

I-2- THE METHODS USED MAY BE DIFFERENT ACCORDING TO THE MISSIONS OF LABORATORIES.

Public and (in some cases) private laboratories

In France and in most countries , microbiological food controls have to answer to different purposes :

- Official controls which are realized using standard reference methods
- Auto-controls : they are performed using reference or alternative methods

- Expertises in case of disagreement between laboratories which are performed using reference methods
- Analyses performed in case of foodborne outbreaks : in that case, internal methods are used systematically but, simultaneously, reference or validated methods are undertaken in order to obtain a confirmation .

Private laboratories of Food industries

In those laboratories, the analyses depend mostly of the applications for which they are requested : quality control, production lines, end-products, environment, cleaning, HACCP or quality assurance . In that context, different types of methods may be used ; the choice may vary according to the objective .

For a long time, only the results obtained when using standard methods were officially recognized but it is obvious that standard methods do not always answer industrial needs , but we have also to mention that the diversity of alternative methods is such that it is very difficult to decide which method must be used and that is true, even for industrials involved in standardization works .

Happily, validation of alternative methods has been considered quite early in different countries but the situation can be considered as clear only from the publication of the EC regulation 2073/ 15 December 2005 concerning microbiological criteria "Test results are dependent on the analytical method used and, therefore, a given reference method should be associated with each microbiological criterion. However, Food business operators should have the possibility to use analytical methods other than the reference methods in particular more rapid methods as long as the use of these alternative methods provide equivalent results. "

Moreover, the use of new principles can now be introduced in standard methods, as it was decided 4 years ago during a joined meeting of ISO /TC34/ SC9 and CEN/TC275/WG6:

- 1- Each time a standard method is being revised, the possibility of using new technologies, including PCR, must be examined by comparing results with those obtained when using the official conventional method.
- 2- For a given microorganism, in order to complete the existing method, , the development of standardized methods

based on new technologies can be proposed when the purpose to be obtained (for example pathogenicity level) makes it necessary .

- 3- When new technologies , including PCR, are used as alternative methods, they must be validated against the reference method. "

So, after a long period , we have now to recognize that innovation has found its place in Food microbiology.

However,one additional and important point must not be forgotten: we have to include in the word "method" a lot of parameters including sampling , transport and preparation of the sample, preenrichment, enrichment and measurement uncertainty ..which I did not develop in this first part.

II- THE METHODS USED IN FOOD MICROBIOLOGY MUST ANSWER TO NEW NEEDS .

Of course , as we have seen , official and industrial controls have been existing for a long time and the HACCP method has been introduced in different industries, from many decades now, with the wish of industrials to get a production as safe as possible .

However, there were very important differences in the way the controls were organized and the relationship between Food and the consumer'health was not considered as obvious, except in a few cases of foodborne outbreaks .

For a long time, this relationship has been underestimated; then, the problem of BSE, the recognition of Food as responsible of listeriosis outbreaks... has lead to an overestimation which conducted the authorities to undertake a lot of efforts to protect the consumers (what I above mentioned as a tornado).

When we look at the new world of Food safety,this evolution appears as a consequence of a long period during which a lot of work has been realized in different fields: setting up regulations in different countries, introduction and implementation of the HACCP concept in different industries and, what is also wonderful, all efforts done in the purpose of setting up new techniques, more rapid, cheaper and easy to handle... It looks somewhat as if somebody had to prepare a piece of work and, if that purpose, a lot of people, belonging to different groups, knew they had to participate to that purpose, each group

working without knowing the work being done in different parts of the world .

So, very important changes have appeared at the beginning of the new millennium. From 1998, different national agencies for Food safety were created and, in December 1998, a meeting of all those agencies was held in Paris in order to exchange ideas, concepts and projects in the field of Risk analysis .

On January 12, 2000, David Byrne , acting as EC Commissioner for Health and Consumer protection, presented the "White paper" which gave new orientations and directives to **ensure Food safety protection in all countries of EU** . He proposed to prepare a coherent set of rules in order to modernize the legislation and to reinforce controls from farm to table . Moreover , he recommended the creation of an independent Authority to give independent scientific advices and provide a clear communication on risks .

Following the presentation of the White Paper, on 28 January 2002, the European Parliament and Council adopted the regulation EC 178/2002 laying down general principles and requirements of the Food Law. The objectives were as follows:

- achieve effective control systems;
- prepare international relations with third countries;
- work in relation with the European Food Safety Authority in order to insure a science based risk management.

So, the White paper outlined a radical revision of the EU's food hygiene rules . The hygiene package aims to harmonise and simplify very detailed hygiene requirements scattered over 17 directives. Finally , it includes five regulations which can be considered as the basis of the controls which have to be realized from farm to fork in order to establish the traceability of products and ensure Food safety for the consumers.

Of course, the Food law is only the basis of the regulation; later, subsequent regulations providing additional details have been set up, including microbiological criteria for foodstuffs (Commission Regulation EC N° 2073/2005 updated by Commission Regulation 1441/2007) and also Implementation measures including provision methods for food and chain information .

One key aspect of the new legislation is that all food and feed business operators will have principal responsibility for insu-

ring that food placed on the EU market meets the required food standards.

That may appear as a quite impossible challenge. However, we have to take progress into account and look at what is really done "in the field".

I think the first perception we may have when looking at the new regulations is to wonder how to implement the requirements in terms of sampling, analyzing, interpreting the results in order to ensure Food safety. Another question is: how to be sure that the controls set up and realized by laboratories are in conformity with the official requirements.

One part of the answer is surely given in the necessity for each group of producers to propose a Guide of good hygiene practices. Those guides whose main purpose is to avoid any problem of Food safety describe the way in which the HACCP concept is implemented and must be submitted by the administration for agreement.

In those guides, the critical points are defined as well as number of samples to be examined, the nature of the samples, the microbiological methods used...in that context, the sentence included in the regulation concerning the microbiological

method above mentioned is very important as it gives the possibility of using alternative methods instead of reference standard methods, when they have been validated by an accepted protocol. That represents really a very important improvement compared to the situation a few years ago.

FINALLY, III- CAN WE ANSWER THE QUESTION "DO METHODS USED IN FOOD MICROBIOLOGY SATISFY ACTUAL NEEDS FOR FOOD SAFETY IMPLEMENTATION"?

When trying to summarize and draw a few conclusions, we observe a lot of improvements which help to satisfy the needs but, at the same time, we must confess that the situation is not perfect and that difficulties remain.

Among the improvements, we can mention that rapid and alternative methods allow to analyse a far higher number in a given period of time than classical ones. Presently, the alternative methods can be used currently subject to their validation.

- Molecular methods allow to help a lot in the traceability approach.
- At the same time (I did not develop this aspect today), we have to recognize

that efforts have been done in the field of interpretation of the results, including measurement uncertainty, through the work of standardization groups (one meeting should be held in Valencia next year)

We have by now, the advantage of Internet communication...

Concerning the difficulties, we can say that, even if rapid, alternative methods allow to examine a higher number of samples than the standard ones within the same period of time, we must consider the analysis of a sufficient number of samples will always be insufficient, at least for financial reasons.

- The choice of a method, even for a given objective, will always remain a difficult one. Among the difficulties, we must not forget the eventuality of finding higher positive results than when using a standard method.

But, finally, even if it is realistic to wait for new improvements, my opinion is that, objectively, we can answer that methods used in Food microbiology are presently on the right way to satisfy actual needs in Food safety implementation. The "tornado" had surely profitable consequences...

LA POLYMERASE CHAIN REACTION (PCR)

Armand Sánchez Bonastre

Departamento de Ciencia Animal
y de los Alimentos
Universitat Autònoma de Barcelona
armand.sanchez@uab.cat

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 rea-

lizarse 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 está 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 amplificando. 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.

BIBLIOGRAFÍA—

- Ausubel FM, Brent R, Kingston RE, Moore DD, Seidman JG, Smith JA and Struhl K. Current Protocols in Molecular Biology. Hoboken, NJ: Wiley, 2005.
- Bell A.S. and Lisa C. Ranford-Cartwright. Real-time quantitative PCR in parasitology. Trends in Parasitology, 2002, 18:8:338-342.
- Bohaychuk VM, Gensler GE, McFall ME, King RK and Renter DG. A real-time PCR assay for the detection of Salmonella in a wide variety of food and food-animal matrices. J Food Prot. 2007, 70(5):1080-1087.
- Bustin S.A.. A PCR guide for clinical scientists. Clinical Applications of PCR edited by Y.M.D. Lo. Humana Press, 1998.
- Bustin SA and Nolan T. Pitfalls of quantitative real-time reverse transcription polymerase chain reaction. J Biomol Tech 2004, 15: 155–166.
- Cai HY, Archambault M, Gyles CL and 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.
- Edwards K, Logan J. and Saunders N. Real-time PCR: an Essential Guide. Norfolk, UK: Horizon Bioscience, 2004.
- Johnson J.R.. Development of polymerase chain reaction-based assays for bacterial gene detection. Journal of Microbiological Methods, 2000, 41:3:201-209.
- Jordan J.. Real-time detection of PCR products and microbiology. New technologies for life sciences: A Trends Guide, 2000, 2000:6:61-66.
- Justé A, Thomma BP and Lievens B. Recent advances in molecular techniques to study microbial communities in food-associated matrices and processes. Food Microbiol. 2008 25(6):745-61
- Klein D.. Quantification using real-time PCR technology: applications and limitations. Trends in Molecular Medicine, 2002, 8:6:257-260.
- Lambertz ST, Nilsson C, Hallanvuo S and Lindblad M. Real-time PCR method for detection of pathogenic Yersinia enterocolitica in food. Appl Environ Microbiol. 2008, 74(19):6060-6067.
- Lie Y.S., Christos J Petropoulos. Advances in quantitative PCR technology: 5' nuclease assays. Current Opinion in Biotechnology 1998, 9:43-48.
- Liu D. Preparation of Listeria monocytogenes specimens for molecular detection and identification. Int J Food Microbiol. 2008, 122(3):229-242.
- Ludwig W. Nucleic acid techniques in bacterial systematics and identification. Int J Food Microbiol. 2007, 120(3):225-236.
- Mackay I.M. Real-time PCR in the microbiology laboratory. Clin Microbiol Infect. 2004, Mar;10(3):190-212.
- Mackay I.M. Real-Time PCR in Microbiology: From Diagnosis to Characterization. 2007, Caister Academic Press. ISBN: 978-1-904455-18-9.
- Mackay J. Introduction to kinetic (real-time) PCR. Methods Mol. Biol. 2007. 353: 167-176.
- Mackay J., Landt O. Real-time fluorescent chemistries. Methods Mol. Biol. 2007. 353: 237-261.
- 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. 2003 May 25;83(1):39-48.
- Malorny B, Löfström C, Wagner M, Krämer N and Hoorfar J. Enumeration of salmonella bacteria in food and feed samples by real-time PCR for quantitative microbial risk assessment. Appl Environ Microbiol. 2008, 74(5):1299-304.
- Maurer, John (Ed.) PCR Methods in Foods. Series: Food Microbiology and Food Safety. 2006, VIII, 148 p. Springer. ISBN: 978-0-387-28264-0.
- 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.
- Niessen L. PCR-based diagnosis and quantification of mycotoxin producing fungi. Int J Food Microbiol. 2007, 119(1-2):38-46.
- Peirson SN., Butler JN. Quantitative polymerase chain reaction. Methods Mol. Biol. 2007. 362:349-362.
- Peters I.R., Helps, C.R. and Day, M.J.. Real-time RT-PCR: considerations for efficient and sensitive assay design. J. Immunol. Methods. 2004 Mar;286(1-2):203-17.
- Rasooly A and Herold KE. Food microbial pathogen detection and analysis using DNA microarray technologies. Foodborne Pathog Dis. 2008, 5(4):531-550.
- Sandhya S, Chen W and Mulchandani A. Molecular beacons: a real-time polymerase chain reaction assay for detecting Escherichia coli from fresh produce and water. Anal Chim Acta. 2008 May 5;614(2):208-212.
- Settanni L, Corsetti A. The use of multiplex PCR to detect and differentiate food- and beverage-associated microorganisms: a review. J. Microbiol. Methods. 2007 69(1): 1-22.

TRANSGÉNICOS, NUTRIGENÉTICA Y NUTRIGENÓMICA EN ALIMENTACIÓN

Daniel Ramón Vidal ^{1,2}

¹Instituto de Agroquímica y Tecnología de Alimentos (IATA)
Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC)
daniel.ramon@iata.csic.es
²Biópolis, SL

EL EMPLEO DIRECTO DE LA GENÉTICA EN LA AGROLIMENTACIÓN: MEJORA GENÉTICA DE LOS ALIMENTOS— La comunidad científica

entiende por biotecnología el uso de un organismo vivo con un propósito industrial. Biotecnología de alimentos no es más que el uso de seres vivos en la producción de alimentos, lo que incluye toda la alimentación, porque todo cuanto comemos son, o han sido, seres vivos, ya sean animales, vegetales, o alimentos o bebidas fermentadas por un microorganismo. Pero el consumidor, sobre todo el europeo, tiene una per-

cepción distinta de lo que es y entiende que éste término hace referencia a la aplicación de la genética en la alimentación. En otras palabras, los consumidores europeos entienden por biotecnología de alimentos "poner genes en su sopa".

Hay que recordar a los consumidores que la genética se ha aplicado en la alimentación desde que comenzó la agricultura y la ganadería. Desde entonces el hombre ha

mejorado empíricamente el genoma de las variedades vegetales comestibles, las razas animales y los fermentos. Esta mejora se ha fundamentado en la aparición de mutantes espontáneos, la variabilidad natural, y la aplicación del cruce sexual o hibridación. De esta forma se han obtenido variedades de trigo con espigas incapaces de dispersar sus semillas en la naturaleza, pero capaces de generar unas harinas panaderas con inmejorable aptitud tecnológica, o patatas comestibles al contener niveles mínimos de alcaloides tóxicos. Desde hace treinta años los científicos aíslan en el laboratorio fragmentos concretos que portan genes determinados. Esos genes se pueden variar en el tubo de ensayo y se pueden reintroducir en el organismo natural o en uno distinto generando un transgénico. Al global de estas técnicas las llamamos ingeniería genética y cuando se aplica en el diseño de un alimento surgen los llamados alimentos transgénicos. Hoy se comercializan muchos alimentos transgénicos en todo el mundo, sobre todo en Estados Unidos, Australia, Canadá y China. Los más conocidos son la soja resistente al herbicida glifosato y el maíz Bt aunque existen muchos más. Son de gran importancia los que hacen referencia a la mejora nutricional de los alimentos. Desde algunas organizaciones ecologistas se acusa a los alimentos transgénicos de ser un veneno para la salud y el medioambiente. No es cierto. Desde hace más de quince años, FAO, OCDE y OMS han establecido grupos de trabajo para evaluar la seguridad para el consumidor de los alimentos transgénicos. Se ha llevado a cabo una evaluación de riesgos sanitarios de todos los alimentos transgénicos comercializados atendiendo al contenido nutricional, la posible presencia de alérgenos y el nivel de toxicidad. Son los alimentos más evaluados de la historia de la alimentación y no disponemos de un dato científico que indique que representen un riesgo para la salud del consumidor superior al que implica la ingestión del alimento convencional correspondiente. Este hecho ha sido puesto de manifiesto por la OMS en su página de internet. Es interesante destacar que tras la publicación de esta decisión dichos grupos han variado su estrategia y apenas hablan de los riesgos sanitarios de los transgénicos pero sí de los riesgos ambientales. Ahí las cosas son menos claras porque hay una falta de metodologías para analizar este

tipo de riesgos que afectan tanto a las plantas transgénicas como a las convencionales. Aun así debemos afirmar con contundencia que existen tres posibles riesgos: la transferencia de los genes exógenos desde la variedad transgénica a variedades silvestres, la pérdida de biodiversidad y los efectos dañinos que ciertas plantas transgénicas resistentes a insectos pueden tener sobre poblaciones de insectos distintos de aquellos contra los que protegen. Todos estos riesgos ya existen con las variedades convencionales. Por ello, la cuestión clave es conocer si el empleo de transgénicos acelerará la aparición de estos riesgos. Parece que no, siempre que se mantengan y mejoren las normas de evaluación que empleamos actualmente con las plantas transgénicas. Finalmente debemos considerar los riesgos económicos. El 90% de los agricultores que utilizaron semillas transgénicas en el 2006 eran agricultores pobres de países en desarrollo. Una realidad muy lejana del estereotipo que hace de lo transgénico un negocio en manos de pocas compañías multinacionales. Pero conviene debatir acerca de la opinión del consumidor sobre los transgénicos. En general, y destacando la falta de formación e información en biotecnología de nuestra sociedad, así como la constante presencia de los grupos en contra en los medios de comunicación, los perciben como algo peligroso. Por ello resulta importante la divulgación de los datos reales que desde la Ciencia tenemos de estos productos.

LAS NUEVAS APLICACIONES DE LA GENÉTICA EN LA AGROALIMENTACIÓN: NUTRIGENÉTICA Y NUTRIGENÓMICA— En el año 2003 se hizo pública la secuencia que conforma nuestro genoma, el genoma humano. Somos poco más de 23.000 genes interactuando con el ambiente. Pero lo que somos no depende de nuestro color de piel, ni de nuestro credo político o religioso; está escrito en ese alfabeto molecular y se traduce en función de nuestro ambiente físico o cultural. Es evidente el impacto de la genómica en nuestra vida cotidiana y ello ha dado lugar a la aparición de dos nuevas disciplinas científicas: la nutrigenética y la nutrigenómica. Por nutrigenética entendemos la disciplina científica que estudia el efecto de las variaciones genéticas entre individuos en la interacción dieta y enfermedad. Por nutrigenómica

aquella que estudia el efecto de los nutrientes de los alimentos sobre la expresión de nuestros genes. Con su empleo empezamos a entender como se va a definir en el futuro una alimentación a la carta en función de lo que podríamos llamar "pasaporte genético". Puede que a muchos les aterre, pero quizás no lo vean tan grave si piensan en la ventaja que para un recién nacido puede suponer que sus padres sean informados sobre una posible mutación en su genoma que le predisponga a desarrollar una enfermedad cardiovascular si su alimentación no es adecuada.

Es claro el enorme potencial que el conocimiento del genoma humano puede tener en las pautas de alimentación, pero no será menor el que tenga la secuenciación de los genomas de otros organismos vivos de interés agroalimentario. Hasta ahora se han secuenciado totalmente más de quinientos genomas distintos y hay más de setecientos proyectos de secuenciación en marcha. Algunos de ellos se refieren a animales, plantas o microorganismos de relevancia alimentaria, como por ejemplo el arroz, la levadura panadera, la bacteria *Bifidobacterium bifidum* (usada en muchos productos probióticos) o patógenos responsables de toxoinfecciones alimentarias como *Escherichia coli*. El conocimiento de los genes que componen el genoma de estos organismos permite conocer sus genes clave para así definir estrategias de mejora por genética clásica (la llamada mejora asistida por marcadores) o por ingeniería genética, desarrollar mecanismos de defensa frente a su patogenicidad, o descubrir nuevas funciones fisiológicas con impacto nutricional. La secuenciación de genomas ha sido hasta ahora una técnica costosa en tiempo y dinero. Hace apenas un año se describió una nueva técnica de secuenciación basada en el empleo de nanomateriales. Dicha técnica se denomina pirosecuenciación y permite secuenciar genomas de forma masiva en mucho menos tiempo y a un menor costo. Por ejemplo, la tecnología clásica de secuenciación aplicada en un laboratorio convencional tardaba en secuenciar el genoma de una bacteria láctica un tiempo variable entre uno y tres años. Con la tecnología de pirosecuenciación es posible hacerlo en tan sólo ocho horas y por un precio en costo de materiales diez veces menor al de la tecnología convencional. Sin duda la piro-

secuenciación va a revolucionar la secuenciación de genomas y también de los llamados metagenomas. Con este último sustantivo se hace referencia a la secuenciación de DNA extraído de un ecosistema, de forma que a partir de los datos de secuencia es posible inferir los organismos presentes en dicho nicho ecológico. Su aplicación en alimentación y nutrición es más próxima de lo que muchos imaginan. Por ejemplo, recientemente se han llevado a cabo proyectos de secuenciación masiva en voluntarios humanos, determinándose que más de trece mil cepas bacterianas distintas pueblan nuestro tracto digestivo. También mediante el empleo de metagenómica se han detectado diferencias en la composición de la flora microbiana del tracto

digestivo de individuos obesos. Son los primeros resultados de una tecnología potente que permitirá conocer aspectos nuevos de nuestra fisiología y su relación con la alimentación.

Podemos concluir por todo lo expuesto que el futuro de la genética en la alimentación es importante. La época en que los tecnólogos de alimentos eran expertos en el manejo de las tuberías de las instalaciones industriales ha quedado lejos. La nueva tecnología de alimentos precisa de nuevos profesionales que entiendan la importancia de la biotecnología y la genética y también puedan discutir sobre conocimientos de otros campos del saber como la farmacología, la nutrición, el control automático de sistemas o las nanotecnologías.

BIBLIOGRAFÍA—

- 1.- Fedoroff N. (2004). Mendel in the kitchen. Joseph Henry Press, Washington.
- 2.- Pafundo S, Agrimonti C, Maestri E, Marmiroli N. (2007). Applicability of SCAR markers to food genomics: olive oil traceability. J. Agric. Food Chem. 55:6052-6059.
- 3.- Turnbaugh PJ, Ley RE, Mahowald MA, Magrini V, Mardis ER, Gordon JI. (2006). An obesity-associated gut microbiome with increased capacity for energy harvest. Nature 444:1027-1031.
- 4.- Withee J, Dearfield KL. (2007). Genomics-based food-borne pathogen testing and diagnostics: possibilities for the U.S. Department of Agriculture's Food Safety and Inspection Service. Environ. Mol. Mutagen. 48:363-368.

IMPLEMENTACIÓN DEL SISTEMA TEMPO EN LA RUTINA DEL LABORATORIO DE CONTROL DE CALIDAD GRUPO GALLINA BLANCA – STAR

Josep-Julà Antón García

Grupo Gallina Blanca – Star
janton@gallinablanca.com

OBJETIVO— compartir la experiencia de la implementación del sistema Tempo de BioMérieux en el laboratorio de Control de Calidad de Gallina Blanca – Star en la fábrica de Sant Joan Despí y de esta manera proporcionar elementos de juicio que ayuden en la toma de decisiones similares.

EMPECEMOS CENTRANDO EL ENTORNO EN EL QUE SE HA LLEVADO A CABO ESTA IMPLEMENTACIÓN— La fábrica del Grupo Gallina Blanca – Star en Sant Joan Despí en la actualidad está dedicada a al elaboración de caldos, sopas, sazoadores, platos preparados y salsas deshidratados por mezclado de ingredientes deshidratados y envasado en múltiples formatos. La planta, sus procesos y su sistema de calidad y seguridad alimentaria se encuentran certificados por los estándares de British Retail Consortium e International Food Standard.

La complejidad viene dada por la extensa gama de referencias de productos acabados (unos 400) para lo cual es necesario emplear alrededor de 60 materias primas de 200 proveedores diferentes. Disponemos de un laboratorio de control de la calidad reconocido por el

Departamento de Agricultura, Ganadería y Pesca de la Generalitat como capacitado para la realización de controles de calidad sensoriales, microbiológicos y físico-químicos. Centrando en los controles microbiológicos, el repertorio incluye presencia/ausencia de *Salmonella* y *Listeria*, y el recuento de flora total aerobia, coliformes totales, *Escherichia coli*, enterobacterias, *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus*, *Clostridia*, mohos, levaduras.

Dentro de una fábrica toman especial relevancia las técnicas rápidas microbiológicas, en nuestro caso básicamente por la necesidad de reducir al máximo el tiempo de espera de dictamen para la aceptación/rechazo de las materias primas. Esta preocupación ha llevado a tomar iniciativas como la incorporación de un equipo MiniVidas BioMérieux para la determinación de presencia/ausencia de patógenos (*Salmonella* y *Listeria*) desde 2001, y diferentes alternativas para obtener el recuento de indicadores de calidad: Malthus 2000 (de 1991 a 2002), Bactometer BioMérieux (de 2002 a 2006) y Tempo BioMérieux a partir de 2006.

Bactometer BioMérieux, al igual que Malthus 2000, presentaban un claro inconveniente en nuestro caso: para poder obtener un recuento era necesario realizar una calibración que depende

fuertemente de la matriz, por lo tanto es inabordable para una planta con tanta variación. De esta manera, solamente permiten utilizar un criterio pasa/no pasa basado en un tiempo sin señal de crecimiento. Este criterio obviamente se debe fijar con un margen de seguridad muy alto, por lo que solamente permite descartar niveles de contaminación muy bajos. En el resto de casos (sobre un 15-20% en el caso de Gallina Blanca) es necesario repetir la determinación mediante el método tradicional. Como consecuencia, en una determinada proporción de muestras se gana tiempo, pero en el resto de los casos se pierde.

Coincidiendo con un momento en el que se revisan los costes y cargas de estructura de nuestra fábrica, BioMérieux inicia el proceso de desarrollo de un nuevo sistema destinado a reemplazar Bactometer, y basa su proyecto en conocer y dar satisfacción a las necesidades de los clientes. Obviamente los clientes de Bactometer expresamos nuestras necesidades enfocadas a mejorar las limitaciones actuales: obtener un recuento validado con respecto a los métodos oficiales salvando la necesidad de calibraciones por tipo de matriz, o mejor aún, sin tener que efectuar calibraciones, y que además pueda ser realizado por personal no especialista a un coste competitivo (ya puestos.....)

Conocer las expectativas de los clientes es fácil, pero para dar satisfacción han sido necesarios grandes esfuerzos cuyo resultado ha dado lugar al sistema Tempo. El sistema Tempo BioMérieux se basa en recuento por la técnica del NMP de 48 pocillos (16 x 3 volúmenes diferentes) miniaturizados e integrados en una tarjeta de incubación, con un único protocolo de trabajo para todos los parámetros disponibles:

1. Preparación de la muestra en una bolsa estéril provista de un filtro específico;
2. Inoculación/rehidratación del medio de cultivo específico no selectivo para recuento total de aerobios (TVC), selectivo para coliformes totales (TC), *Escherichia coli* (EC) y enterobacterias (EB) a la dilución establecida;
3. Llenado y sellado de las tarjetas en equipo automatizado;
4. Incubación de las tarjetas a la temperatura y tiempo correspondientes;
5. Lectura por fluorescencia de los pocillos con crecimiento positivo de las tarjetas en equipo automatizado, con cálculo del resultado expresado en ufc/g según tabla NMP y dilución empleada.

El medio específico utilizado incluye en su formulación un compuesto fluorescente, la 4-metil umbeliferona (4-MU). Para TVC y EC, la 4-MU se encuentra ligada a un sustrato enzimático, no fluorescente. La actividad bacteriana produce la hidrólisis de este sustrato y se libera la 4-MU, produciendo fluorescencia en los pocillos que son por lo tanto contabilizados como positivos y los no fluorescentes, negativos. En cambio, para TC y EB el medio contiene 4-MU libre a pH=7, presentando

fluorescencia inicialmente. En este caso, la acidificación del medio a causa de la actividad bacteriana es la que provoca la extinción de la fluorescencia ya que deja de serlo a pH inferior a 6. Así, los pocillos que presentan fluorescencia son negativos, y los que no presentan fluorescencia, positivos.

El rango de lectura es ya de por sí bastante amplio y varía según la dilución empleada, pero también puede ser ampliado en caso necesario encadenando dos o tres tarjetas, es decir, utilizando 48, 96 o 144 pocillos (Tabla 1)

Los métodos Tempo han sido validados por AFNOR como métodos rápidos alternativos con respecto al método tradicional equivalente mediante la norma NF EN ISO 16140 (octubre 2003) en productos para alimentación humana y de animales de compañía, con excepción de bebidas, leche cruda y piensos (Tabla 2).

La linealidad y exactitud de los métodos alternativos Tempo son equivalentes a las de los métodos tradicionales en general, con una mejor reproducibilidad (con una tarjeta por parámetro, basta).

La selectividad (TC, EC, EB) de los métodos alternativos Tempo son equivalentes a la de los métodos tradicionales, mostrando una mejor recuperación para EC. Además de verificar las prestaciones de linealidad y exactitud, también se evalúan las ventajas de índole práctico de los diferentes métodos:

- Reducción del plazo de obtención de resultados para TVC y EB.
- Importante reducción del tiempo de trabajo, considerando que además no es necesaria la preparación de medios y materiales, no es necesario preparar un

banco de diluciones ni inocular y tratar una serie de placas o tubos, no se realiza la lectura e interpretación de colonias placa a placa, el tratamiento de resultados está integrado en la lectura, y se reduce enormemente la limpieza de material.

- Espacio de trabajo necesario menor que por la técnica tradicional.
- Espacio de consumibles y espacio de incubación mucho menores que por la técnica tradicional.
- Formación analistas en menos de un día.
- Reducción del tratamiento de residuos.
- Mantenimiento reducido (kit mensual para verificación de la lectura de fluorescencia).
- Completa trazabilidad al identificarse desde el principio la muestra con la tarjeta y el vial utilizados por lector de código de barras y comunicación vía Wifi entre la estación de llenado y la de lectura.

Todos los compromisos tomados por BioMérieux con respecto a las necesidades planteadas por sus clientes fueron por lo tanto resueltas. Queda la última, ya puestos que fuese económicamente competitiva. En este punto es necesario revisar los costes internos que suponen las tareas y medios no necesarios con el sistema Tempo para compararlos con el coste de los consumibles, la amortización y el mantenimiento del equipo, pero sí se puede aportar un dato importante: un solo analista entrenado puede realizar 500 determinaciones Tempo en su jornada de trabajo.

En el caso del laboratorio de control de calidad de Gallina Blanca se valoraron todos estos elementos y se tomó finalmente la decisión de implementar el sistema Tempo en junio de 2006.

La implementación fue planificada cuidadosamente, ya que obviamente su éxito iba a contribuir a una reducción de los recursos humanos necesarios en control de calidad y dependía en gran medida de

Dilución	1 tarjeta	2 tarjetas	3 tarjetas
1/40	10-49.000 ufc/g	5-62.000	3-69.000
1/400	100-490.000 ufc/g	50-620.000	30-690.000
1/4000	1.000-4.900.000 ufc/g	500-6.200.000	300-6.900.000

Tabla 1.-

Método Tempo	Método tradicional	Validación AFNOR	Incubación	Procesado
TVC	EN ISO 4833 7 Febrero 2003	BIO 12/15 – 09/05	40 h / 72 h	4 min / 14 min
TC	EN ISO 4832 7 Febrero 2003	BIO 12/17 – 12/05	24 h / 24 h	4 min / 10 min
EC	NF ISO 16649-2 7 Julio 2001	BIO 12/13 – 02/05	24 h / 24 h	4 min / 11 min
EB	NF ISO 21528-2 / Diciembre 2004	BIO 12/21 – 12/06	24 h / 72 h	4 min / 19 min

Tabla 2.-



la aceptación por parte de las personas directamente implicadas.

Para ello se realizó una primera presentación del sistema al equipo de analistas unos días antes de la llegada del equipo, exponiendo todas las nuevas aportaciones con total transparencia, es decir, transmitiendo explicando el principio de trabajo novedoso, la sencillez de tareas que iba a comportar, eliminando o reduciendo substancialmente aquellas más tediosas, pero también que el nuevo método de trabajo iba a transformar totalmente la rutina de trabajo y que iba a comportar además una reducción de la carga de trabajo.

La formación se realizó inmediatamente después de la preparación y entrega del equipo teniendo en cuenta que se trata de un equipo de analistas con experiencia en trabajo en laboratorio de control microbiológico de alimentos, de formación interna y reactivo a los cambios.

En los primeros días tan solo se encuentran pequeños problemas:

- Habitación a la rutina de tareas (lectura de tubo y placa, inoculación, agitación).

- Confusiones en las lecturas de tarjetas antes de tiempo (códigos de colores).
- Pérdida de lecturas de tarjetas cuando ha pasado el periodo máximo (habitación al sistema de semáforos de advertencia en Tempo Reader).

El resultado global de la implementación es que en tan solo 2 semanas el equipo Tempo estaba totalmente integrado en la rutina de trabajo del laboratorio, cuando por experiencias previas con el mismo equipo de analistas, jamás se disminuía de un periodo de adaptación de 4-5 semanas en el mejor de los casos.

A las ventajas establecidas para el sistema Tempo BioMérieux en los protocolos de validación de métodos alternativos citados anteriormente, en el caso particular del laboratorio de control de calidad en la fábrica de Gallina Blanca se deben añadir unas cuantas:

- Robustez del sistema informático.
- Eliminación de las repeticiones de resultados "no pasa".
- No necesario consultar colonias.
- Mayor confianza en los resultados obtenidos

A su vez, también se presentan algunas limitaciones:

- Reducción de sensibilidad para TC y EB en muestras fuertemente coloreadas, especialmente en tonos marrones (caramelo, champiñón, cacao) hasta el punto de ser inviable la determinación.
- Aparición de resultados inválidos para muestras con elevado contenido en grasas, como en el caso de bacon, probablemente debido a la separación de la grasa.
- Necesidad de compaginar método Tempo y método tradicional ya que el repertorio de indicadores disponibles es por el momento reducido. El desarrollo de nuevos proyectos está lógicamente ligado a la viabilidad comercial para BioMérieux y a su vez a la significación del indicador para la industria. En el momento de redacción de esta ponencia es inminente el lanzamiento de kit para el recuento de *Staphylococcus aureus* y de bacterias acidolácticas, y está en desarrollo el recuento de mohos.

THE AOAC INTERNATIONAL RAPID METHODS VALIDATION PROCESS

Zerlinde B. Johnson

AOAC Research Institute
zjohnson@aoac.org

This presentation will describe the method validation and consensus programs that AOAC International and AOAC Research Institute offers. The method approval process is described as well as the publication and certification documents. This presentation also includes a survey of the approved *Official Methods of Analysis*SM methods and approved *Performance Tested Methods*SM methods. Please check the website for an updated list of approved *Performance Tested Methods*SM methods. AOAC member have free access to all approved *Official Methods of Analysis*SM methods on the AOAC website (www.aoac.org).

AOAC International is a non-profit organization with international membership. The organization was established in 1874 to review, validate and publish analytical methods. Next year, 2009, will be our 125th Anniversary. We are best known in

the food and agriculture communities for validating and publishing the Official Methods of Analysis book; also known as the big red book of methods. Most recently AOAC has done many validations for the rapid microbiology methods for the US government. The *Official Methods of Analysis*SM methods are defensible in many courts worldwide.

The AOAC Research Institute is a smaller, sister non-profit organization of AOAC International which was founded in 1991. The AOAC Research Institute administers the *Performance Tested Methods*SM program, which provides an independent third-party review of proprietary test kit performance claims. The AOAC Research Institute has staff with industry experience; which ensure that the validations are conducted with scientifically-sound validation study designs.

AOAC has scientific members worldwide which we use as independent scientific volunteer experts to help regulatory or trade issues centered on the performan-

ce parameters of analytical methods in use. AOAC has lead efforts to set acceptance criteria for target analytes such as *B. anthracis* and other biological threat agents as well as drug residues in commodities.

AOAC has three validation programs for the evaluation and certification of analytical methods. The AOAC INTERNATIONAL administers the *Official Methods of Analysis*SM program; which is denoted by the blue logo. The AOAC Research Institute administers the *Performance Tested Methods*SM program; which is denoted by the green logo and the approved methods are denoted by the black certification logo. The combination of the two programs is called the harmonized program.

The AOAC expert reviewers and methods committees for both the *Official Methods of Analysis*SM and *Performance Tested Methods*SM program follow the microbiology and chemistry guidelines cited here. Both microbiology guidelines (AOAC & ISO 16140) are under revision and it is anti-

anticipated that AOAC would approve the revised ISO 16140 for the validation of microbiological methods.

OMA PROGRAM— The *Official Methods of Analysis*SM method validation program consists of a two phase validation: 1) pre-collaborative study and 2) the collaborative study. Quantitative collaborative studies require a minimum of eight laboratories and qualitative collaborative studies require a minimum of ten laboratories. The validation study data is reviewed by the appropriate methods committee and general referee. The approximate time from start of a method validation to an approved first action *Official Methods of Analysis*SM status is twelve to eighteen months.

The first phase of the *Official Methods of Analysis*SM method validation study design is the pre-collaborative study. Data for the inclusivity, exclusivity, method comparison of 15-20 foods with an appropriate reference method (USDA, FDA, ISO or other) is collected in the pre-collaborative study. The second phase of the *Official Methods of Analysis*SM method validation study design is the collaborative study. Data on the method comparison of six foods with an appropriate reference method (USDA, FDA, ISO or other) is collected from eight to ten laboratories during the collaborative study.

The method comparison study is an important parameter in a method evaluation. It must be noted that a method can not be validated for a claim of all foods. For qualitative pre-collaborative and *Performance Tested Methods*SM studies require 20 replicates at each inoculation level with five control samples OR 20 replicates of naturally contaminated samples. The collaborative study requires six replicates at each inoculation level and six control samples per laboratory. Fractional positive results must be obtained for *Official Methods of Analysis*SM and *Performance Tested Methods*SM consideration; that means 5-15 positive samples. For quantitative studies five replicates at three inoculation levels and five controls or three lots of naturally contaminated foods are required. For *Official Methods of Analysis*SM and *Performance Tested Methods*SM approval the candidate method must perform equal to or better than the reference method.

The AOAC Research Institute administers the *Performance Tested Methods*SM program which evaluates proprietary microbiology and chemistry test kits for their performance claims. The validation is comprised of a two part validation study design with an internal study and independent study. The validation study report is reviewed by two Expert Reviewers and the General Referee; all reviewers must unanimously agree to grant the candidate method *Performance Tested Methods*SM certification. Once the method has been *Performance Tested Methods*SM approved the test kit manufacturer is licensed to use the AOAC *Performance Tested Methods*SM certification mark with the kits specific certificate number on marketing advertisements and packaging for one year increments. *Each Performance Tested Methods*SM method is reviewed annually for modifications. Validation time can be less than six months depending on the readiness of the company. The AOAC Research Institute offers a consulting package where our project managers draft the validation study design. All *Performance Tested Methods*SM methods are published on the AOAC website and are continually updated. Please visit the website for the list of approved methods <http://www.aoac.org/testkits/testedmethods.html>.

Foods", "Select Foods", "Individual Foods" and/or "Environmental Surfaces". To claim a "Variety of Foods" data must be collected from two foods per food groups for a total of ten foods. To claim "Groups of Foods" data must be collected from several foods in the particular the food group. To claim "Select Foods" data must be collected from each food which is being claimed. To claim an "Individual Food" data must be collected from the specific food. To claim "Environmental Surfaces" data must be collected from one or more surfaces. A method may also be evaluated for a claim from pure and/or mixed cultures.

The food categories are as follows: 1) meat products; 2) poultry products; 3) fish & seafood products; 4) dairy products; 5) chocolate & bakery products; 6) animal feeds; 7) pasta and miscellaneous (dressings, spices, mayonnaise, eggs/egg derivatives, cereals and rice). The environmental surfaces are as follows: 1) stainless steel; 2) food-grade painted surfaces; 3)

ceramic, glass or other earthen-glazed material; 4) cast iron; 5) plastic; 6) rubber; 7) sealed concrete; 8) wood and 9) air filter material.

The internal study for the *Performance Tested Methods*SM program is conducted by the test kit manufacturer. The test kit manufacturer collects data on inclusivity, exclusivity, method comparison to an appropriate reference method, ruggedness, stability and lot-to-lot variation of the test kit.

The independent study is conducted by a laboratory that is contracted by the AOAC Research Institute. The independent study is intended to verify the internal study data; therefore, a portion of the internal method comparison matrices are required.

The AOAC Research Institute has several laboratories that have experience conducting AOAC validations. All new independent laboratories are required to attend the Microbiology Validation Workshop hosted by the AOAC Research Institute. Bids are gathered from independent laboratories and laboratory is contracted by the AOAC Research Institute on behalf of the test kit manufacturer. The independent study report is submitted to the AOAC Research Institute.

The *Performance Tested Methods*SM program requires that the General Referee review and approve all testing protocols and validation study reports. In addition to the General Referee, two other experts review the validation study reports for *Performance Tested Methods*SM approval. Many of our expert reviewers are outside of the US.

The test kit manufacturer compiles the internal study data and the independent study data into one report and submits it to the AOAC Research Institute. The expert reviewers provide comments on the report and the test kit user guide for the test kit manufacturer to consider. The study report and user guide is revised according to the reviewers' comments. The test kit is granted *Performance Tested Methods*SM certification when the reviewers reach consensus.

When a test kit is approved as a *Performance Tested Method*SM manufacturer reviews and approves of all certification documents (certificate, certification mark, website entry and study reports) prior to the use of the certification mark. The manufacturer publishes an arti-

cle in the AOAC magazine *Inside Laboratory Management* and the study report is published in the Journal of AOAC INTERNATIONAL. The test kit is listed on the AOAC validated methods website which includes links to the certificate and the study report. The ability for users to download the certification documentation for each validated method makes it very useful to end users and accredited laboratories which must have documentation on the methods they employ. Lastly, all approved test kits undergo an annual review to ensure that the test kits have not been changed since the original validation. Should changes in the approved method be identified, a method modification maybe necessary to retain the *Performance Tested Methods*SM status. Test kits that do not renew their certification are removed from the list of AOAC validated methods.

This is an example of a *Certificate of Performance Tested*SM status.

The AOAC Harmonized program is administered by the AOAC Research Institute, mainly because the method enters the

validation process through the PTM program. An approved *Performance Tested Methods*SM is equivalent to the OMA pre-collaborative study. The advantage to this program is that the manufacturer obtains the *Performance Tested Methods*SM certification mark before continuing onto the collaborative study to obtain an *Official Method of Analysis*SM first action status.

The AOAC Harmonized program consists of four phases: 1) AOAC Research Institute Consulting for the drafting of the validation protocols; 2) *Performance Tested Methods*SM study; 3) *The Official Methods of Analysis*SM collaborative study and 4) *Official Methods of Analysis*SM approval. The outcomes are two AOAC approvals (*Performance Tested Methods*SM and *Official Methods of Analysis*SM), two published studies in the Journal of AOAC INTERNATIONAL and the use of the AOAC Research Institute *Performance Tested Methods*SM certification mark.

The methods are evaluated for the following performance indicators: Inclusivity rate; Exclusivity rate; Sensitivity rate;

Specificity rate; False Positive rate; False Negative rate; Repeatability; Reproducibility; Method Agreement or McNemar's Chi-Square; Limit of Detection or Limit of Quantitation and Relative Standard Deviation.

Approved *Official Methods of Analysis*SM methods are published in three places: 1) in the *Official Methods of Analysis*SM of AOAC INTERNATIONAL "the big red book of methods"; 2) in the Journal of AOAC INTERNATIONAL and 3) in the U.S. Code of Federal Regulations. The approved *Performance Tested Methods*SM methods are also published in three places: 1) in the Journal of AOAC INTERNATIONAL; 2) in the AOAC magazine *Inside Laboratory Management* and 3) on the AOAC validated methods website.

The following slides are meant to provide a survey of the approved *Performance Tested Methods*SM methods. The survey is not all inclusive, but is intended to provide a snap-shot of the current approved kits. Please visit the AOACRI website to find a current listing of the approved methods. <http://www.aoac.org/testkits/testedmethods.html>.

APLICACIÓN DE LA MICROBIOLOGÍA PREDICTIVA EN LA INDUSTRIA ALIMENTARIA

Montserrat Vila Brugalla

SAICA Entitat de Control, SL
mvila.brugalla@gmail.com

En esta charla se hace una breve introducción teórica a la microbiología predictiva (historia, clasificación de modelos, utilización en el APPCC); en su segunda mitad se muestra su aplicación mediante ejemplos usando el software COMBASE de libre acceso en la red.

1. INTRODUCCIÓN A LA MICROBIOLOGÍA PREDICTIVA—

EL REGLAMENTO (CE) n° 2073/2005

El Reglamento (CE) de la Comisión de 15 de noviembre de 2005, relativo a los **critérios** microbiológicos aplicables a los productos alimenticios, establece una serie de criterios para algunos alimentos y tipos de microorganismos que, de forma complementaria a las normas nacionales, implican un nuevo enfoque, dado que

introduce **conceptos dinámicos** relacionados con los controles de producción, la vida útil del alimento, el uso que se va a hacer del mismo, así como el riesgo asociado al microorganismo a controlar.

Artículo n° 5, sobre normas específicas para las pruebas y la toma de muestras: "Se autorizará el uso de métodos analíticos alternativos cuando los métodos estén validados con respecto al método de referencia establecido en el anexo I y si se utiliza un método registrado, certificado por terceros conforme al protocolo de la norma EN/ISO 16140 u otros protocolos similares internacionalmente aceptados.

Si el explotador de la empresa alimentaria deseara utilizar métodos analíticos distintos a los validados y certificados tal como se ha descrito en el párrafo anterior, los métodos deberán validarse conforme a protocolos internacionalmente aceptados y su uso deberá ser autorizado por la autoridad competente."

Artículo 3, punto 2, sobre condiciones generales y **Anexo II**:

"Cuando sea necesario, los explotadores de las empresas alimentarias responsables de la fabricación del producto realizarán estudios conforme a lo dispuesto en el anexo II para investigar el cumplimiento de los criterios a lo largo de toda la vida útil. Esto es aplicable especialmente a los alimentos listos para el consumo que puedan permitir el desarrollo de Listeria monocytogenes y puedan suponer un riesgo para la salud pública en relación con dicha bacteria."

"Cuando sea necesario, basándose en los estudios antes mencionados, el explotador de la empresa alimentaria realizará estudios complementarios, entre los que pueden incluirse los siguientes:

- elaboración de modelos matemáticos de pronóstico establecidos para el alimento de que se trate, utilizando factores críticos de crecimiento o supervivencia aplicables a los microorganismos

mos en cuestión presentes en el producto,

- *pruebas para investigar la capacidad que tiene el microorganismo en cuestión, adecuadamente inoculado, para crecer o sobrevivir en el producto en diferentes condiciones de almacenamiento razonablemente previsibles,*
- *estudios para evaluar el crecimiento o supervivencia de los microorganismos en cuestión que puedan estar presentes en el producto durante su vida útil en condiciones razonablemente previsibles de distribución, almacenamiento y utilización."*

DEFINICIÓN

"Every model is wrong. The question is, how much wrong still useful it can be" (Box and Draper)

El término **Microbiología Predictiva** surgió al aplicar una serie de técnicas matemáticas y estadísticas a la Microbiología que permitían predecir la respuesta de una población microbiana a partir de observaciones previas. Whiting (1995) la describe como el **campo de estudio que combina elementos de microbiología, matemáticas y estadística para desarrollar modelos que describan y predigan matemáticamente el crecimiento o muerte de microorganismos, cuando se les somete a condiciones ambientales específicas.**

Hoy en día, la Microbiología Predictiva se engloba dentro de la emergente **Ecología Microbiana Cuantitativa**, que comprende todas aquellas técnicas que permiten cuantificar un proceso microbiológico en un ecosistema. El interés generado en esta área ha conducido a la rápida creación de una subespecialidad en microbiología alimentaria caracterizada por su interdisciplinariedad: microbiólogos, tecnólogos alimentarios, matemáticos, estadísticos o ingenieros colaboran compartiendo ideas, conceptos, técnicas matemáticas y bases de datos para generar y validar más modelos y más efectivos.

En Microbiología Alimentaria, los modelos predictivos constituyen un método rápido, relativamente económico y no invasivo para la determinación objetiva de la calidad de los alimentos. Se adopta generalmente un punto de vista reduccionista y las respuestas de los microorganismos son medidas bajo condiciones controladas. Los resultados se resumen en forma de ecuaciones matemáticas que, por interpolación, pueden predecir respues-

tas en condiciones nuevas, no testadas anteriormente.

HISTORIA

La posibilidad de predecir el comportamiento microbiano en los alimentos no es nueva, y ya se pueden encontrar referencias al uso de la microbiología predictiva en literatura de los años 1920, cuando Esty y Meyer (1922) establecieron la metodología predictiva para un enlatado seguro de alimentos bajos en acidez con respecto al *C. botulinum*. La industria conservera adoptó el concepto de las 12 reducciones decimales propuesto por ellos (12D). En sus trabajos presentaron numerosas combinaciones de tiempo y temperatura capaces de causar 12 D en *C. botulinum*. Estos valores D eran predecidos a partir de modelos matemáticos. En los años 1930, Scott (1937) escribió sobre el efecto de la temperatura sobre el crecimiento de microorganismos en musculatura de buey. En la introducción de su artículo demuestra entender perfectamente el uso potencial del conocimiento de la cinética del crecimiento microbiano para predecir la vida útil y la seguridad de los alimentos. Tras esos primeros años, el uso de modelos matemáticos en microbiología alimentaria se ha extendido hallándose bien establecidos en procesos productivos de fermentación de alimentos y conservación mediante tratamientos térmicos.

Durante los años 1960 y 1970, se desarrollaron dos líneas de investigación distintas en microbiología predictiva:

- El control de la alteración del pescado, (Spencer and Baines, 1964).
- La prevención del botulismo y otras intoxicaciones microbianas. El grupo de Genigeorgis en la Universidad de California buscó en el trabajo de otros investigadores combinaciones de factores que podrían prevenir el crecimiento de patógenos y la formación de toxinas. Modelizaron la reducción decimal del recuento microbiano como consecuencia de factores intrínsecos y extrínsecos de la comida, como la temperatura, el pH, la concentración de NaCl, etc. La reducción decimal fue entonces relacionada con la probabilidad de crecimiento bacteriano o de producción de toxina. Estos estudios desarrollaron los llamados **modelos probabilísticos**, basados en un cálculo de probabilidades: de iniciación de crecimiento de un microorganismo o de producción de una toxina

na a partir de una célula. (Genigeorgis 1993).

Pero no fue hasta los años 1980 cuando surgió un nuevo interés en la microbiología predictiva, debido a tres causas principales (Buchanan, 1993):

- La disponibilidad de ordenadores cada vez más potentes.
- El incremento de la demanda por parte de los consumidores de alimentos más frescos, menos procesados. Esto ha resultado en la aplicación de sistemas de preservación multi-barrera en los que la combinación de varios factores, más que la acción individual de cada uno de ellos controla la alteración del alimento. En estos casos, los modelos matemáticos ayudan a tratar cuantitativamente la interacción entre múltiples factores.
- La imposibilidad, tanto científica como económica, de tener la información microbiológica cuantitativa de todos los alimentos presentes en el mercado necesaria para la toma de decisiones sobre la seguridad de los productos alimentarios. Esta limitación esta siendo compensada por la identificación de un número limitado de factores clave responsables en gran parte del comportamiento de los microorganismos en la comida. A través de la cuantificación sistemática y la comprensión del impacto de estos factores en sistemas modelo y productos prototipo, es posible generar modelos efectivos que estimen el comportamiento microbiano en un rango amplio de productos.

En este contexto, uno de los factores clave que ha contribuido al rápido progreso de la microbiología predictiva en los últimos años ha sido la identificación de modelos que describen las curvas del crecimiento bacteriano. Se trata de los llamados **modelos cinéticos** que, bajo condiciones ambientales determinadas, describen curvas sigmoideas mediante parámetros con significado biológico como la duración de la fase de latencia (λ), la velocidad máxima de crecimiento (μ_{max}) o la densidad máxima de población (y_{max}), entre otros. El recuento de microorganismos puede llegar a presentar una fase de decrecimiento o declivio, que normalmente no es considerada por estos modelos.

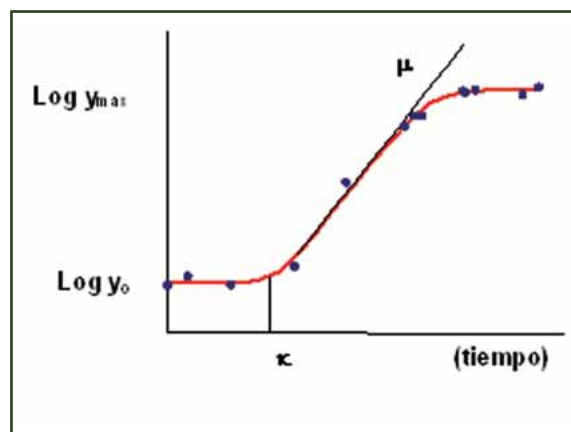
Pero los modelos deben de ser usados con cautela. En su fase de desarrollo es necesario ser especialmente cuidadoso

con las etapas de validación, y realizar un muestreo control de forma paralela (Campden & Chorleywood Food Research Association, 1997). Los que son escépticos con la microbiología predictiva tienen argumentos en la variabilidad que presenta el crecimiento microbiano, causada tanto por factores intrínsecos como extrínsecos. Conviene tener en cuenta que los experimentos basados en condiciones laborales pueden no reflejar el comportamiento de los microorganismos en los alimentos. La flora microbiana de un alimento es un sistema complejo: las interacciones microbianas pueden cambiar con variaciones de temperatura y las condiciones fisiológicas previas del microorganismo pueden afectar su comportamiento en el nuevo ambiente. Esto plantea un dilema en los que quieren aplicar la microbiología predictiva al crecimiento microbiano en los alimentos: o se trabaja con modelos complejos, que tienen en cuenta las propiedades conocidas del sistema, o se hacen ciertas simplificaciones justificables biológicamente, modelizando medidas relativamente simples en función de pocas variables ambientales. Esta segunda aproximación ha conducido a estimaciones útiles de la respuesta de los microorganismos en un amplio margen de alimentos y circunstancias relativas tanto a la microbiología como en la industria alimentaria (Baranyi y Roberts, 1995).

CLASIFICACIÓN DE MODELOS

Diferentes esquemas han sido propuestos para categorizar los modelos predictivos. A continuación se describen cuatro de ellas, que no son excluyentes entre sí.

Fig 1.- Parámetros clásicos del crecimiento bacteriano (Baranyi y Pin, 2001)



Según el **suceso microbiológico** que describen, encontramos:

- Modelos de crecimiento: Modelan el crecimiento de la población microbiana.
- Modelos de inactivación: Modelan la destrucción microbiana o la inactivación de sus toxinas.

En función de la **aproximación matemática** usada, se dividen en:

- Modelos probabilísticos: La variable en estudio es la probabilidad de inicio de crecimiento de una célula, o la probabilidad de producción de una toxina.
- Modelos cinéticos: Las variables son una serie de parámetros de la cinética microbiana y sus transformaciones.

La **metodología** usada en su creación los divide en:

- Modelos empíricos: Derivan de una perspectiva esencialmente pragmática. Simplemente describen los datos mediante una expresión matemática adecuada; por eso, a menudo dan poca o ninguna información del proceso subyacente.
- Modelos mecanicistas: También llamados deterministas, se construyen desde una base teórica y, si son correctamente formulados, pueden permitir la interpretación de la respuesta modelada en términos de fenómenos y procesos conocidos.

El **número y tipos de variables** que incluyen, los diferencian en:

- Modelos primarios: Describen los cambios en el recuento microbiano o en otras respuestas microbianas en el tiempo. El modelo puede cuantificar las unidades formadoras de colonias por ml, la formación de toxina, o los niveles de sustrato (que son medidas directas de la respuesta), o absorbancia o impedancia (que son medidas indirectas de la respuesta). Una ecuación o función matemática describe el cambio en la respuesta en el tiempo dadas unas condiciones ambientales determinadas. Son ejemplos de modelos primarios la curva de crecimiento exponencial, la función de Gompertz, y la inactivación térmica de primer orden.

- Modelos secundarios: Describen el impacto de

las variables ambientales como la temperatura, el pH o la a_w en las características de crecimiento o supervivencia del microorganismo. Ejemplos de modelos secundarios son la relación de Arrhenius o el modelo de la raíz cuadrada.

- Modelos terciarios: Son resultado de la incorporación de modelos primarios, secundarios o una combinación de ambos en aplicaciones informáticas y sistemas expertos. Estos programas pueden calcular la respuesta microbiana a condiciones ambientales que fluctúan, comparar el efecto de diferentes condiciones o contrastar el comportamiento de varios microorganismos. Un ejemplo de modelo terciario es el llamado Pathogen Modelling Program, creado por USDA.

MICROBIOLOGÍA PREDICTIVA Y APPCC

Muchos microbiólogos y responsables del control de calidad en las industrias alimentarias intuyen que los modelos predictivos publicados tienen un gran potencial de uso, pero desconocen cómo aplicar un modelo particular a sus procesos y productos. La generación de modelos predictivos con programas informáticos accesibles (user-friendly) potenciará en el futuro su aplicación.

En el diseño e implantación de sistemas APPCC, los modelos de Microbiología Predictiva constituyen una buena herramienta para:

- La toma de decisiones respecto a la valoración del riesgo asociado a cada peligro detectado.
- La toma de decisiones respecto a la determinación de PCC, aportando información para responder a cuestiones que aparecen en el árbol de decisión respecto a probabilidad de ocurrencia de un peligro, o el nivel aceptable/inaceptable de un peligro.
- El establecimiento de límites críticos. Decidir respecto al destino de un producto que se ha desviado de un límite crítico..
- Valorar la seguridad de un producto tras un cambio en la formulación o procesamiento sin necesidad de realizar análisis laboratoriales.

Los modelos predictivos proporcionan ayuda a los equipos APPCC en la toma de decisiones sobre la seguridad durante la producción de alimentos. En algunos casos pueden ser inexactos a causa de la

falta de conocimiento de las propiedades físicas, químicas o microbiológicas del alimento, de forma que habrá que realizar igualmente pruebas de laboratorio para validar los PCC. Aun así, **aportan información objetiva que permite realizar un análisis de peligros completo, no limitado únicamente a valoraciones cualitativas basadas en juicios subjetivos o en la experiencia personal de los microbiólogos integrantes del equipo APPCC.**

2. APLICACIÓN DE LA MICROBIOLOGÍA PREDICTIVA: COMBASE ([HTTP://WWW.COMBASE.CC/](http://www.combase.cc/))—

COMBASE es una iniciativa fruto de la colaboración entre la [Food Standards Agency](#) y el [Institute of Food Research](#) en el Reino Unido: el [USDA Agricultural Research Service](#) y su [Eastern Regional Research Center](#) de los Estados Unidos; y el [Australian Food Safety Centre of Excellence](#).

Su propósito es elaborar herramientas predictivas sobre las respuestas de los microorganismos en los alimentos, de libre uso en software disponible en la web. La base de datos ComBase (accesible via el *ComBase Browser*) consiste en miles de curvas de crecimiento e inactivación que han sido reunidas a partir de instituciones de investigación y publicaciones. Son la base para los numerosos modelos microbianos presentados en el

ComBase Predictor, una herramienta muy útil tanto para la industria (en el desarrollo de nuevas tecnologías manteniendo la seguridad de los alimentos) y administración (estableciendo nuevos límites microbiológicos), como a nivel académico (tanto en docencia como en investigación).

BIBLIOGRAFÍA— • Baranyi, J. Roberts, T.A., McClure, P.J. (1993): A non-autonomous differential equation to model bacterial growth. *Food Microbiology*, 10, 43-59.

• Baranyi, J. Roberts, T.A. (1994): A dynamic approach to predicting bacterial growth in food. *International Journal of Food Microbiology*, 23, 277-294.

• Baranyi, J. Roberts, T.A. (1995): Mathematics of predictive food microbiology. *International Journal of Food Microbiology*, 26, 199-218.

• Baranyi, J., Pin, C. (2001): Primer curso teórico-práctico en Microbiología Predictiva de Alimentos. Facultad de Veterinaria, Universidad Complutense de Madrid.

• Buchanan, R.L. (1993): Predictive food microbiology. *Trends in Food Science and Technology* Vol 4: 6-11.

• Buchanan, R.L., Whitting, R.C. (1996): Risk assessment and predictive microbiology. *Journal of Food Protection*, 1996 supplement, 31-36.

• Buchanan, R.L., Whiting, R.C., Damert, W.C. (1997): When is simple good enough: a comparison of the Gompertz, Baranyi, and three-

phase linear models for fitting bacterial growth curves. *Food Microbiology*, 14: 313-326

• Campden & Chorleywood Food Research Association (1997): Evaluation of Shelf Life for Chilled Foods. Technical Manual nº 28

• Garthright, W.E. (1991): Refinements in the prediction of microbial growth curves. *Food Microbiology*, 8, 239-248.

• Genigeorgis, C. (1993): Avances en microbiología de los alimentos: significado para los problemas de salud alimentaria de la microbiología predictiva. Simposium conmemorativo del Bicentenario de la Facultad de Veterinaria, Universidad Complutense, Madrid.

• Elliot, P. (1996): Predictive microbiology and HACCP. *Journal of Food Protection*, 1996 supplement, 48-53.

• Man C.M.D. et al (1994). Shelf life valuation of foods. Chapman & Hall

• McMeekin, T.A. et al (1993): Predictive microbiology: Theory and Application. Research Studies Press, LTD

• Ratkowsky, D.A., Olley, J., McMeekin, T.A., and Ball, A.. (1982): Relationship between temperature and growth rate of bacterial cultures. *Journal of Bacteriology*, 149, 1-5.

• Ross, T. i McMeekin, T.A. (1994): Predictive Microbiology. Review paper. *International Journal of Food Microbiology*, 23: 241-264.

• Zweitering, M.H., Jongenburger, I., Rombouts, F.M., van't Riet, K. (1990): Modelling of the bacterial growth curve. *Applied and Environmental Microbiology*, 56, 1875-1881.

PRODUCCIÓN DE ANTICUERPOS MONOCLONALES (AcM) Y SU APLICACIÓN EN EL ANÁLISIS DE ALERGENOS Y MICOTOXINAS

Cristina Romero Gonzalo

INGENASA (Inmunología y Genética Aplicada, SA)
cromero@ingenasa.es

1. INTRODUCCIÓN— La entrada en vigor Directiva Europea 2003/89/EC, que obliga a declarar en el etiquetado de los alimentos los ingredientes causantes de la mayoría de las alergias e intolerancias, y su última modificación (Directiva 2007/68/CE), implican la necesidad de llevar a cabo un autocontrol por parte de las industrias agroalimentarias, así como por los responsables del control oficial y técnicos en el manipulado de los alimentos.

Para poder asegurar este autocontrol, es necesario disponer de los métodos y sis-

temas analíticos adecuados, que puedan ser utilizados tanto por las empresas como por los laboratorios, y que permitan identificar de forma rigurosa los ingredientes, componentes y aditivos de los alimentos durante todo el proceso de producción de los mismos.

De igual forma, las Directivas y Reglamentos relativos al muestreo y análisis de toxinas procedentes de *Fusarium* y *Aspergillus*, establecen los límites máximos aceptables de estos tóxicos en diversas matrices alimentarias y piensos animales. Para el cumplimiento de dichos límites, es indispensable llevar a cabo las correspondientes analíticas, que permitan asegurar a las empresas agroalimentarias un adecuado

control de calidad de sus productos.

De entre todos los sistemas existentes actualmente en el mercado, son los ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assays), los que reúnen las características necesarias para llevar a cabo la monitorización de todo el proceso de fabricación y distribución del producto alimentario de forma rápida y eficaz. Dichas características son las siguientes: alta sensibilidad, posibilidad de aplicación en un amplio rango de matrices, facilidad de uso, rapidez y robustez de resultados.

Los ensayos ELISA están basados en el uso de Anticuerpos conjugados con enzimas. En la mayor parte de los casos estos anticuerpos son Monoclonales,

por lo que el objetivo del presente artículo es explicar cómo se lleva a cabo la producción de dichos anticuerpos monoclonales, y cómo se pueden aplicar posteriormente en el análisis de alérgenos y micotoxinas en alimentos.

2. PRODUCCIÓN DE ANTICUERPOS MONOCLONALES—

Definición de Anticuerpo Monoclonal

Los anticuerpos son producidos por el organismo como respuesta a la entrada de un antígeno en el mismo. Dicha respuesta es policlonal: distintos clones de linfocitos B generan una amplia variedad de anticuerpos, los cuales reconocen diferentes epítomos del mismo antígeno con objeto de potenciar la efectividad del Sistema Inmune.

Se define como Anticuerpo Monoclonal aquel que es producido por un mismo clon de Linfocito B y que reconoce la misma región (determinante antigénico) de un antígeno en concreto.

Formación de hibridomas

El primer paso para llevar a cabo la producción de AcM es la inmunización de un ratón, a partir del cual se extrae el bazo con objeto de obtener los Linfocitos B del mismo. Dichos linfocitos presentan una vida media en cultivo extremadamente corta, por lo que, paralelamente a la inmunización del animal, se realiza un cultivo de células de mieloma, cuya principal característica es presentar una proliferación indefinida en cultivo.

La posterior fusión de las células de mieloma y de los linfocitos B da lugar a la formación de los HIBRIDOMAS (células que conservan ambas características: producción de anticuerpos y vida media indefinida en cultivo).

Aislamiento de hibridomas

El rendimiento de la fusión mencionada en el punto anterior no es del 100%; por ello, tras la misma, se obtiene una mezcla de células (linfocitos B + células de mieloma + hibridomas). La corta vida media de los Linfocitos B en cultivo hace que desaparezcan por sí solos. Para separar los hibridomas de las células de mieloma se preseleccionan células de mieloma deficientes en HGPRT (una enzima que participa en la síntesis de purinas a partir de hipoxantina). En con-

diciones normales, la célula sobrevive gracias a la utilización de una ruta alternativa para la síntesis de las purinas. En el momento del aislamiento, se cultiva la mezcla de células en medio HAT (hipoxantina/aminopterina/timidina), que fuerza a las células a seguir la ruta de la hipoxantina, provocando la muerte de las células de mieloma, ya que éstas carecen de la enzima necesaria para llevar a cabo la síntesis. De esta forma, tras la eliminación de los Linfocitos B y de las células de mieloma, se logra aislar los hibridomas de forma eficaz.

Selección de hibridomas

Del aislamiento de la fase anterior se obtienen diversos hibridomas, que por tanto, producen anticuerpos policlonales. Dentro de este pool de hibridomas, para seleccionar los que produzcan anticuerpos monoclonales, se realizan diluciones seriadas hasta obtener colonias que produzcan un solo tipo de anticuerpo. A continuación es necesario llevar a cabo el análisis de los anticuerpos producidos (dicho análisis se realiza normalmente por ELISA), para confirmar que se trata de los anticuerpos de interés. El último paso en esta fase sería la clonación de los hibridomas productores del AcM en cuestión.

Producción de los AcM

Una vez que se dispone de los hibridomas seleccionados, la producción de los anticuerpos a partir de los mismos se puede realizar de dos maneras:

- In Vivo: inyectando los hibridomas de nuevo en ratones. Dichos hibridomas producen tumores en el ratón, los cuales segregan un líquido muy rico en anticuerpos (líquido ascítico).
- In Vitro: mediante el uso de cultivos celulares. En la actualidad tiende a utilizarse esta segunda técnica para minimizar en lo posible el uso de animales.

Como último paso es necesario realizar una purificación de los Anticuerpos así obtenidos (mediante columna de inunoafinidad o mediante precipitación).

3. APLICACIONES DE LOS AcM— La versatilidad de los anticuerpos permite que puedan diseñarse frente a prácticamente cualquier estructura química, por lo que presentan numerosas aplicaciones, entre las que podemos destacar:

Diagnóstico

- Detección de hormonas, vitaminas y citoquinas.
- Monitorización de drogas.
- Detección de enfermedades infecciosas.
- Detección de alérgenos, marcadores tumorales, etc.

Biosensores

Los biosensores son instrumentos analíticos formados por un material biológico inmovilizado, en contacto con un sistema transductor adecuado que convierte la señal bioquímica en una señal eléctrica cuantificable. Se aplican en la detección y cuantificación de moléculas orgánicas o inorgánicas (metales pesados, gases tóxicos, etc.).

Terapia

- Tratamiento de enfermedades infecciosas.
- Tratamiento de enfermedades autoinmunes.
- Tratamiento del cáncer.
- Para evitar rechazo tras los trasplantes.

4. VENTAJAS DE LOS ANTICUERPOS MONOCLONALES FRENTE A LOS POLICLONALES—

- Mayor homogeneidad en los resultados, ya que todos los anticuerpos son exactamente iguales.
- Mayor reproducibilidad de sus efectos, en base a su mayor homogeneidad.
- Mayor capacidad potencial para seleccionar los de mejor afinidad.
- Mayor especificidad, puesto que todos reconocen la misma región (determinante antigénico).

5. APLICACIONES EN EL ANÁLISIS DE ALÉRGENOS—

En el caso de la detección de alérgenos, los AcM se diseñan frente a proteínas diana con alta capacidad alérgica, térmicamente estables y representativas del total del contenido proteico del alimento. Por ello, en el caso de los ensayos de INGENASA para el análisis de alérgenos, las proteínas seleccionadas son las que figuran en la Tabla 1, permitiendo los siguientes Límites de Detección.

Un caso práctico: el análisis de gluten

El ensayo diseñado para la determinación de proteínas de gluten en muestras

ALÉRGENO	PROTEÍNAS DETECTADAS	LÍMITE DE DETECCIÓN (ppm)
Gluten	Gliadinas, secalinas y hordeínas	3.0
Crustáceo	Tropomiosina	0.05
Huevo	Ovoalbúmina y ovomucoide	1.0
Leche (suero)	b-lactoglobulina	0.1
Leche	Caseína (Alpha S1 y Alpha S2)	0.27
Cacahuete	Ara h1 y Ara h2	1.0
Semilla de sésamo	Albúmina 2S	1.0
Soja	Inhibidor de Tripsina de Soja Proteína de Harina de Soja	2.5
Almendra	Proteína de Almendra	0.5
Avellana	Proteína de Avellana	0.5
Semilla de Mostaza	Proteína de Semilla de Mostaza Blanca y Mostaza Negra	1.0

Tabla 1.- Ejemplos de aplicación de los AcM en el diseño de ensayos para el análisis de alérgenos.

alimentarias está basado en el uso del Anticuerpo Monoclonal R5. Dicho anticuerpo ha sido aprobado como Método Tipo I por la Comisión de CODEX ALIMENTARIUS, y es el exigido por la FACE, SMAP y resto de Asociaciones de Celíacos Europeas para ser usado por los laboratorios acreditados en este tipo de analítica.

Fundamento técnico

El ensayo es un ELISA sándwich de doble anticuerpo (DAS), cuya base técnica puede resumirse en el siguiente esquema (Figura 1).

Interpretación de resultados

El procedimiento descrito en la Figura 1 se lleva a cabo tanto con los estándares como con las muestras. A partir de dichos estándares (5), se realiza la representación gráfica de la Densidad Óptica (DO) frente a concentración (ng/mL), obteniendo la siguiente gráfica (Figura 2).

A continuación, interpolando en la curva los valores de DO de las muestras, se obtienen directamente sus correspondientes valores de concentración en ng/mL. Para expresar estos valores en partes por millón (ppm), es necesario aplicar la siguiente fórmula:

$$ppm = (C \times D \times 2 \times 40) / 1000$$

Donde:

C: es la concentración de gliadina de la muestra determinada en la curva

D: es el factor de dilución de la muestra (25, 50, 100, 200, 400, 800, etc).

2: factor que se aplica para convertir gliadina en gluten.

40: factor que se aplica porque 0.25g de alimento son extraídos con 10 ml de solución de extracción

1/1000: factor que procede de la conversión de ng/ml en ppm

6. APLICACIONES EN EL ANÁLISIS DE MICOTOXINAS

Las micotoxinas son metabolitos secundarios producidos por diversos tipos de hongos. Son altamente tóxicas y se generan en gran variedad de mercancías. En la tabla que figura a continuación (Tabla 2) se indican los tipos de alimentos en los que pueden generarse las distintas micotoxinas; qué variedades de hongos y en qué condiciones se producen; y cuáles son los principales riesgos para la salud en cada caso:

a. Dificultades en el análisis de micotoxinas

Las principales dificultades a las que hay que hacer frente a la hora

de llevar a cabo el análisis de micotoxinas son las siguientes:

- Son muy estables a tratamientos térmicos, por lo que su eliminación es difícil.
- Suelen aparecer con bajos niveles de contaminación, por lo que es necesario disponer de ensayos con Límites de Detección adecuados.
- Aun siendo similares, cada tipo de Micotoxina presenta una estructura distinta, por lo que es necesario diseñar anticuerpos específicos para cada una de ellas.
- Suelen estar distribuidas de manera muy heterogénea en el alimento, por lo que es fundamental aplicar un adecuado protocolo de muestreo (el cual figura estandarizado en la legislación); y homogeneizar la muestra lo máximo posible antes de llevar a cabo la extracción.

b. Fundamento técnico del ensayo

El ensayo es un ELISA de competición, cuya base técnica puede resumirse en el siguiente esquema (Figura 3).

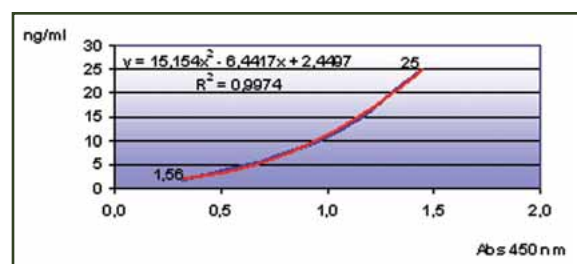
c. Interpretación de resultados

A partir de los valores de DO de las

Fig 1.- ELISA DAS para el análisis de gluten.



Fig 2.- Ejemplo de curva estándar para el análisis de gluten.



	DON	A FLATOXINAS	FUMONISINA	OCRATOXINA A	ZEARALENONA
ALIMENTO	Grano	Piense, maíz, nueces, frutos secos y leche	Maíz	Maíz, uvas, café	Grano
HONGO	Varias especies de <i>Fusarium</i>	<i>Aspergillus</i> spp	<i>Fusarium verticillioides</i>	<i>Pendillium verrucosum</i> & <i>Aspergillus ochraceus</i>	<i>Fusarium graminearum</i>
CONDICIONES EN LAS QUE SE GENERA	Temperaturas suaves y humedad	Calor y ambiente seco	Humedad durante la cosecha	Clima templado y humedad	Temperaturas suaves
RIESGOS PARA LA SALUD	• Inmunosupresivo • Desórdenes sanguíneos y de la piel • Hemorragias internas	• Cáncer • Daños en hígado y riñón	• Carcinogénico • Daños en hígado, riñón y pulmones	• Carcinogénico • Daños en hígado y riñón • Teratogénico	• Carcinogénico • Edema en cerebro y pulmones • Daño en hígado, bazo y riñones

Tabla 2.- Características principales de las micotoxinas.

muestras, estándares y control negativo, se determina el cálculo del % de Absorbancia Máxima aplicando la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Abs Máx.} = \frac{\text{DO (Estándar/Muestra)}}{\text{DO (Control Negativo)}} \times 100$$

El cálculo del % de Abs Máxima se lleva a cabo para homogeneizar los diferentes resultados del ensayo. Mientras que los

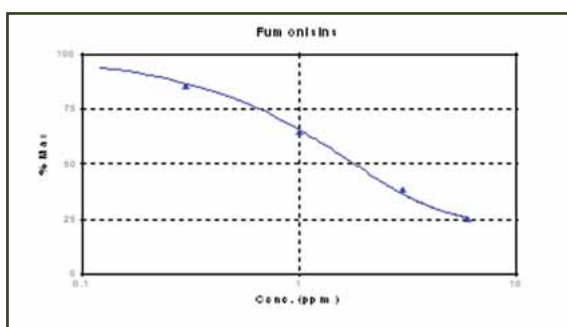
valores de DO del Control Negativo, Estándares y Muestras pueden diferir de un análisis a otro (por ligeras variaciones en las condiciones del ensayo), la relación % Abs Máxima para cada Estándar debe permanecer constante.

A continuación se representa gráficamente los valores de %Abs Máx de los estándares frente a su concentración, de forma que, interpolando en la curva los % Abs Máx de las muestras, se obtienen directamente sus correspondientes concentraciones (ver Figura 4).

Fig 3.- ELISA de competición para análisis de micotoxinas.



Fig 4.- Ejemplo de curva estándar para la Fumonisina.



d. Regulación de los límites de detección de micotoxinas por la Unión Europea

La Unión Europea tiene actualmente los límites de detección más estrictos a nivel mundial en lo que a presencia de micotoxinas se refiere. En la

Tabla 4 se muestran los valores de sensibilidad de los ensayos ELISA para las distintas micotoxinas, en comparación con los límites de detección exigidos por la legislación. Estos altos valores de sensibilidad, se logran gracias al uso de los Anticuerpos Monoclonales.

CONCLUSIÓN— Tras lo expuesto en el presente artículo, se puede concluir que el uso de Anticuerpos (Monoclonales) en el diseño de ensayos ELISA para el análisis de alérgenos y micotoxinas les confiere unas propiedades de sensibilidad y especificidad que hace que sean los más utilizados tanto por Laboratorios Especializados como por Empresas Agroalimentarias.

BIBLIOGRAFÍA— • DIRECTIVA 2003/89/CE DEL PARLAMENTO EUROPEO Y DEL CONSEJO de 10 de noviembre de 2003 por la que se modifica la Directiva 2000/13/CE en lo que respecta a la indicación de los ingredientes presentes en los productos alimenticios.

- DIRECTIVA 2007/68/CE DE LA COMISIÓN de 27 de noviembre de 2007 que modifica el anexo III bis de la Directiva 2000/13/CE del Parlamento Europeo y del Consejo por lo que se refiere a determinados ingredientes alimentarios.
- REGLAMENTO (CE) No 683/2004 DE LA COMISIÓN de 13 de abril de 2004 que modifica el Reglamento (CE) no 466/2001 por lo que respecta a las aflatoxinas y a la ocratoxina A en los alimentos destinados a lactantes y niños de corta edad.
- DIRECTIVA 2005/38/CE DE LA COMISIÓN de 6 de junio de 2005 por la que se establecen los métodos de muestreo y de análisis para el control oficial del contenido de toxinas de *Fusarium* en los productos alimenticios.
- REGLAMENTO (CE) No 1126/2007 DE LA COMISIÓN de 28 de septiembre de 2007 que modifica el Reglamento (CE) no 1881/2006 por

	DON (ppb)	AFLA TOT (ppb)	AFLA B ₁ (ppb)	AFLA M ₁ (ppb)	ZEARAL (ppb)	FUMON (ppb)
LÍM DETECC. DEL ENSAYO	110	1.8	0.5	0.002	10	200
RANGO DE CUANTIFIC.	200 - 2500	2 - 80	0.5 - 5	0.005 - 0.1	20 - 1000	300 - 6000
REGULACIÓN UE (*)	200 - 1750	4 - 10	0.1 - 5	0.025 - 0.05	20 - 200	200 - 2000

Tabla 3.- Sensibilidad de los ensayos en comparación con la legislación. (*) Los Límites varían en función del alimento. El Límite más estricto suele coincidir con el correspondiente al de los alimentos infantiles

el que se fija el contenido máximo de determinados contaminantes en los productos alimenticios por lo que se refiere a las toxinas de Fusarium en el maíz y los productos del maíz

• Cecilia E. Coto. "Curso de Conocimiento Científico Experimental: los Anticuerpos Monoclonales". Revista Electrónica del Dpto.

de Química Biológica, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires, Argentina.

• Enrique Méndez, Carmen Vela, Ulrike Immer and Frederik W. Janssen. "Report of a collaborative trial to investigate the performance of the R5 enzyme linked immunoassay to determine gliadin in gluten-free food".

European Journal of Gastroenterology & Hepatology 2005, 17:1053-1063

• REPORT OF THE TWENTY-SEVENTH SESSION OF THE CODEX COMMITTEE ON METHODS OF ANALYSIS AND SAMPLING. Budapest, Hungary 15 - 19 May 2006.

• "Transia Plate Total Aflatoxin Technical File". Biocontrol, Ltd.

VALIDACIÓN DE MÉTODOS MICROBIOLÓGICOS ALTERNATIVOS

David Tomás Fornés

ainia.centro tecnológico
dtomas@ainia.es

1.- INTRODUCCIÓN— El empleo de métodos alternativos supone considerables ventajas frente a los métodos convencionales o de referencia, como son la rapidez, automatización, interpretación de resultados, etc. No obstante, pueden darse situaciones que limitan su uso en determinadas condiciones o presentan limitaciones que deben ser evaluadas en cada caso particular, debiendo demostrarse que estos métodos permiten obtener resultados equivalentes al método de referencia y que presenta ventajas frente al mismo.

Estos métodos alternativos para el análisis microbiológico de alimentos ya es en la actualidad una realidad siendo ampliamente empleados tanto por laboratorios de autocontrol como en laboratorios de control oficial de alimentos. En este sentido, el actual Reglamento relativo a los criterios microbiológicos aplicables a los productos alimenticios (Reglamento (CE) nº 2073/2005 de 15 de noviembre de 2005, DOCE L 338 22/12/05) recoge en su considerando 24 que "los explotadores de las empresas alimentarias pueden usar métodos analíticos diferentes a los métodos de referencia, en particular métodos más rápidos, siempre que estos métodos alternativos produzcan resultados equivalentes" y posteriormente incluye en el artículo 5 punto 5 que "Se autorizará el uso de métodos alternativos cuando los métodos estén validados con respecto al método de referencia establecido en el Anexo I y si se utiliza un método registrado, certificado por terceros conforme al protocolo de la norma EN/ISO 16140 u otros protocolos similares internacionalmente aceptados".

Así pues, existen referencias legislativas

que reconocen el empleo de los mismos si bien con limitaciones como la necesidad de evidenciar la validez de estos métodos empleando un procedimiento claramente establecido así como, en el caso de métodos registrados, la necesaria certificación de terceros que avalen esta validez de forma independiente, como puede ser los certificados de validación emitidos por AFNOR (www.afnor.fr) MicroVal (www.microval.org) NordVal (www.nmkl.org) o AOAC (www.aoac.org). También la Norma ISO 17025:2005 que establece los requisitos generales para la competencia de los laboratorios de ensayo y calibración, indica en su apartado 5.4.5.2 que "se deben validar los métodos no normalizados, los métodos diseñados/desarrollados internamente, los métodos normalizados utilizados fuera de su campo de aplicación previsto y las ampliaciones y modificaciones de los métodos normalizados con el fin de comprobar que son apropiados para el uso previsto". Dicha validación puede haber sido realizada previamente por el organismo que ha desarrollado el método, por el laboratorio o bien por organismos de certificación.

Así pues, un requisito imprescindible para poder emplear estos métodos y lograr su reconocimiento (lo que en muchos casos limita su implantación) es la necesaria validación del mismo. Esta validación debe ser contemplada desde dos perspectivas diferentes:

• **Validación inicial o completa**, realizada con un protocolo extenso en el que se contempla una primera fase de validación por parte de un laboratorio experto y una segunda fase que incluye la realización de un ejercicio colaborativo con la participación de varios laboratorios, y que utiliza un diseño de expe-

riencias y unos criterios de evaluación de resultados preestablecidos y reconocidos internacionalmente (como por ejemplo los recogidos en la Norma UNE EN ISO 16140:2003)

• **Validación interna o verificación** por parte del laboratorio de control que va a utilizar el método alternativo, que consiste básicamente en comprobar que el laboratorio es capaz de cumplir con los requisitos de funcionamiento del método previamente establecidos en las condiciones habituales de trabajo.

2.- DEFINICIONES—

Validación: Confirmación mediante el examen y la aportación de evidencias objetivas que demuestren el cumplimiento de ciertos requisitos para el uso específico previsto (ISO 17025 apdo. 5.4.5.1).

Eficacia relativa: Grado de concordancia entre la respuesta obtenida por el método a validar y el valor verdadero obtenido en muestras idénticas.

Desviación positiva: Se produce cuando el método a validar da un resultado positivo y el valor de referencia es negativo. Una desviación positiva se convierte en un **falso positivo** cuando se puede demostrar que el resultado verdadero es negativo.

Desviación negativa: Se produce cuando el método a validar da un resultado negativo y el valor de referencia es positivo. Una desviación positiva se convierte en un **falso negativo** cuando se puede demostrar que el resultado verdadero es positivo.

Sensibilidad relativa: Capacidad del método a validar de detectar el microorganismo cuando está presente en la muestra a analizar o no diferir de manera significativa del valor de referencia (<30%).

Especificidad relativa: Capacidad del método a validar para no detectar el analito cuando no es detectado por el método de referencia.

Nivel de detección: Menor número de microorganismos que puede detectarse en una muestra

Inclusividad: Capacidad para detectar el analito entre un amplio grupo de cepas diana.

Exclusividad: Ausencia de interferencia en el método de un grupo de cepas no diana.

Linealidad: Aptitud del método para dar resultados que están en proporción con la cantidad de microorganismos presentes en la muestra.

Exactitud relativa: Grado de concordancia entre un resultado de análisis y el valor de referencia aceptado.

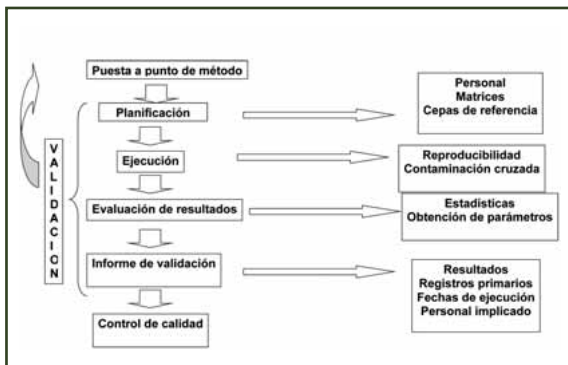
Límite de cuantificación: La menor cantidad de microorganismos que puede ser medido con una precisión y exactitud definidas.

Repetibilidad: Realización de los ensayos en las mismas condiciones (mismo analista, equipos, medios de cultivo...).

Reproducibilidad: Realización de los ensayos en las condiciones más diversas (distinto analista, equipos, días, medios de cultivo...).

3.- VALIDACIÓN DE MÉTODOS ALTERNATIVOS—Fig 1.

Fig 1.-



Carnes y producto cárnicos	Pescados y mariscos
Aves de corral	Frutas y verduras
Productos lácteos	Chocolate/productos panadería
Otros productos (especias, salsas, huevos, pastas, cereales, bebidas)	Alimentación animal

Tabla 1.-

3.1.- MATRICES

Lo ideal es trabajar con muestras naturalmente contaminadas o al menos que tengan una distribución lo más amplia posible.

Si no es posible trabajar con alimentos contaminados naturalmente se debe recurrir a la contaminación artificial. Los niveles de contaminación deben permitir simular el comportamiento de muestras naturales.

En el caso de alimentos, se deben estudiar 5 categorías de alimentos. Este número puede reducirse si el método se aplica a un ámbito restringido. (Puede consultarse en Anexo B de la Norma UNE-EN ISO 16140:2003) (Tabla 1).

Una validación completa debería incluir al menos 60 resultados por cada categoría de alimentos, siendo deseable que un 50% estén contaminados y otro 50% negativos pero con contaminación natural.

3.2.- PREPARACIÓN DE INÓCULOS

Como se ha indicado anteriormente, la utilización de muestras para el estudio de validación debe ser por orden de preferencia:

- Muestras naturalmente contaminadas
 - Muestras contaminadas por mezcla (a partir de otras muestras contaminadas)
 - Muestras contaminadas artificialmente con microorganismos diana.
- En caso de no disponer de muestras naturalmente contaminadas y sea necesario contaminar artificialmente con cepas

Fig 2a.-

$$RSD \text{ real} = \frac{S}{\bar{X}}$$

Fig 2b.-

$$RSD \text{ teórico} = \frac{1}{\sqrt{\bar{X}}}$$

de referencia (www.cect.org) o cepas salvajes aisladas del mismo tipo de productos que se van a analizar (las cuales deben ser previamente caracterizadas). Se debe asegurar que el inóculo es homogéneo y de una concentración conocida. Para ello se puede establecer la concentración del mismo mediante siembra de 5-10 replicados en medios óptimos no selectivos.

La homogeneidad puede considerarse adecuada si la desviación estándar de la reproducibilidad (RSD) es inferior o igual a la de una distribución ideal de Poisson según las siguientes fórmulas (Fig 2a y Fig 2b).

También pueden utilizarse material de referencia certificado con una concentración y pureza conocida comercializado en diversos formatos por diferentes organismos y empresas (Health Protection Agency <http://www.hpa.org.uk/>, LABAQUA <http://www.labaqua.com/> o MicroBiologics <http://www.microbiologics.com/>)

3.3.- ESQUEMAS DE VALIDACIÓN POR COMPARACIÓN FRENTE AL MÉTODO DE REFERENCIA

Duplicación de muestras cuando ambos métodos tienen una primera etapa común Fig 3.

Duplicación de muestras cuando ambos métodos tienen diferentes etapas iniciales Fig 4.

4.- VALIDACIÓN DE MÉTODOS CUALITATIVOS— Parámetros a evaluar en la validación Fig 5.

Fig 3.-

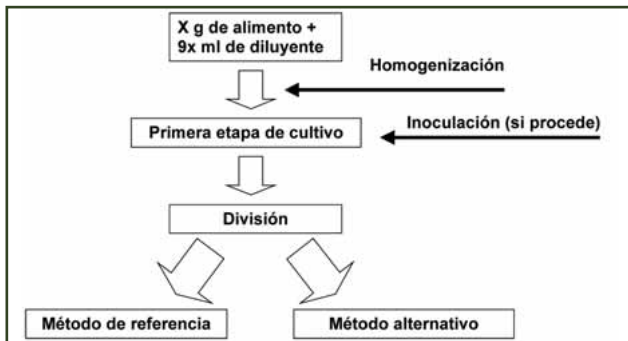


Fig 4.-



Fig 5.-

Métodos cualitativos (presencia/ausencia)

- Especificidad
- Sensibilidad
- Eficacia
- Desviación positiva y negativa
- Limite de detección
- Inclusividad y exclusividad

4.1.- RENDIMIENTO DEL MÉTODO

Se deben analizar al menos 60 muestras por cada método y categoría de alimentos, las cuales, idealmente, debe estar contaminadas en una proporción del 50%.

A partir de los resultados obtenidos con ambos métodos se construye la siguiente tabla Fig 6.

Con los datos obtenidos se estiman los parámetros que caracterizan el rendimiento del método.

- EFICACIA RELATIVA (AC) Fig 7a.
- ESPECIFICIDAD RELATIVA (SP) Fig 7b.
- SENSIBILIDAD RELATIVA (SE): Fig 7c.

16140:2003).

4.2.- NIVEL DE DETECCIÓN RELATIVA

4.2.1.- Estimación del nivel de inóculo Fig 8.

4.2.2.- Estimación de la concentración de microorganismos en la muestra Fig 9.

4.2.3.- Resultados obtenidos
Resultados a concentración de 13 ufc/25g Fig 10.

Resultados a concentración de 3 ufc/25g Fig 11.

Resultados muestras negativas Fig 12.

4.2.4.- Conclusión

El límite de detección para la técnica de PCR es inferior a 3 ufc/25g

4.3.- INCLUSIVIDAD Y EXCLUSIVIDAD

Consiste en evaluar la detección de 30 (50) cepas diana y 30 cepas no diana sin estimar el efecto matriz.

El nivel de concentración de cepas diana debe ser de aproximadamente 10 veces el nivel de detección.

Para muestras no diana se inoculará al nivel habitualmente esperable en función del tipo de microorganismo.

4.4.- ESTUDIO INTERLABORATORIO

Su objetivo es determinar la variabilidad de los resultados obtenidos por diversos laboratorios empleando muestras idénticas y comparando los resultados.

Se debe contar con la participación de al menos 10 laboratorios que tengan resultados no discrepantes

En el interlaboratorios se emplean 3 niveles de contaminación (negativo, ligeramente superior al límite de detección y 10 veces superior a este valor), asegurando la homogeneidad y estabilidad de las muestras.

En cada laboratorio se analizan 8 replicados de cada nivel de contaminación con los dos métodos (método de referencia y método alternativo)

Fig 6.-

RESPUESTA	VALOR REF POSITIVO (R+)	VALOR REF POSITIVO (R-)
METODO A VALIDAR POSITIVO (A+)	+/+ CONCORDANCIA POSITIVA (PA)	-/+ DESVIACION POSITIVA (PD)
METODO A VALIDAR NEGATIVO (A-)	+/- DESVIACION NEGATIVA (ND)	-/- CONCORDANCIA NEGATIVA (NA)

Fig 7a.-

$$AC = \frac{(PA+NA)}{(NA+PA+ND+PD)} \times 100$$

Fig 7b.-

$$SP = \frac{NA}{(NA+PD)} \times 100$$

Fig 7c.-

$$SE = \frac{PA}{(PA+ND)} \times 100$$

Fig 9.-

Cepa	Nivel alto	Nivel bajo
CECT 4141	1,915 ufc/25g	0,383 ufc/25g
Salvaje heces	2,630 ufc/25g	0,526 ufc/25g
Salvaje heces	2,880 ufc/25g	0,576 ufc/25g
S. hadar	3,275 ufc/25g	0,655 ufc/25g
Salvaje heces	2,585 ufc/25g	0,517 ufc/25g
TOTAL	13 ufc/25g	3 ufc/25g

Fig 8.-

Cepa	Placa1	Placa2	Placa3	Placa4	Placa5	PROMEDIO	DESVEST	RDS	1,2RSDteor
CECT 4141	75	80	85	70	73	76,6	5,94	0,08	0,14
Salvaje heces	96	125	104	91	110	105,2	13,26	0,13	0,12
Salvaje heces	107	111	122	110	126	115,2	8,29	0,07	0,11
S. hadar	126	122	132	135	140	131	7,14	0,05	0,10
Salvaje heces	112	85	100	98	122	103,4	14,14	0,14	0,12

Fig 10.-

	Negativos	Positivos	Total
Método referencia	0	6	6
Método PCR2	0	6	6

Fig 11.-

	Negativos	Positivos	Total
Método referencia	4	2	6
Método PCR2	0	6	6

Fig 12.-

	Negativos	Positivos	Total
Método referencia	6	0	6
Método PCR2	6	0	6

El número total de resultados a evaluar es de 480 (240 por cada método)

5.- MÉTODOS CUANTITATIVOS- Parámetros a evaluar en la validación Fig 13.

5.1.- PRECISIÓN

A partir de muestras con diferentes 5 niveles diferentes de concentración, realizar 5 replicas de cada muestra (mínimo 2, e idealmente 10) en condiciones de reproducibilidad y estimar RSD, comparándolo con el del método de referencia o bien

con el valor RSD teórico.

La precisión del método es aceptable si es inferior o no se desvía en más de un 30% de la del método de referencia o la RSD teórica para cada nivel de inóculo.

El cálculo de la incertidumbre mediante la desviación estándar de la reproducibilidad también puede permitir realizar una estimación de la precisión del método. Para ello es necesaria la realización de análisis por duplicado en condiciones de reproducibilidad de al menos 10 muestras por grupo de alimentos y posteriormente evaluar la diferencia entre ellos con la fórmula (ISO/TS 19036:2006) Fig 14. Donde YiA e YiB son respectivamente los recuentos de los duplicados de cada muestra el log ufc/g y n el número total de muestras analizadas.

5.2.- EXACTITUD Y LINEALIDAD

Se requiere trabajar con 5 niveles diferentes del analito, preferiblemente contaminada naturalmente, para establecer una curva de calibración. Cada muestra se analiza por duplicado como mínimo e idealmente de 5 a 10 replicas, lo que supone que se analizan un mínimo de 10 mediciones e idealmente de 25 a 50 medidas con el método alternativo a evaluar.

Si se dispone de valores de referencia (ver 3.2) es posible determinar la exactitud del método. En caso de que no se disponga de dichos valores, se analizan las mismas submuestras con el método de referencia, en cuyo caso estimaremos la exactitud relativa.

Representar un gráfico donde el eje y se representan los resultados obtenidos con el método alternativo (en valor logarítmico) y en el eje x el valor obtenido con el método de referencia (o con el material de referencia utilizado). En base a este gráfico se obtiene una estimación del método de regresión Fig 15.

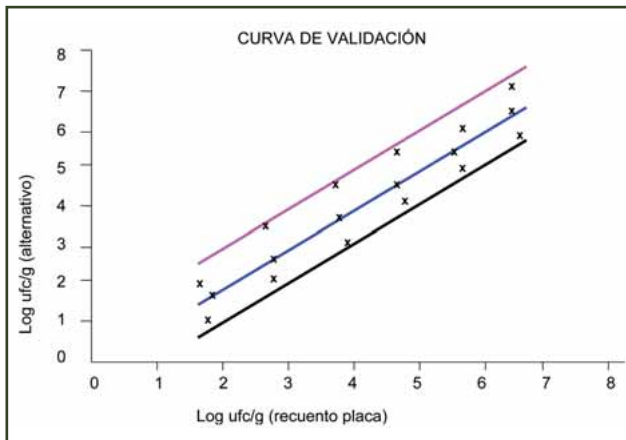
Fig 13.-

- Métodos cuantitativos**
- Precisión
 - Exactitud
 - Linealidad
 - Desviación positiva y negativa
 - Límite de cuantificación

Fig 14.-

$$S_R = \sqrt{\sum_{i=1}^n \frac{(y_{iA} - y_{iB})^2}{2n}}$$

Fig 15.-



A partir de la recta de calibración se estudia el ajuste de la ecuación de la recta: $y = a + bx$, donde no solo debe estudiarse el coeficiente de correlación sino también el ajuste de la ordenada en el origen (a) que debe ser teóricamente nula en el modelo ideal y de la pendiente (b) que debe ser igual a 1.

Las desviaciones de estos valores pueden estimarse mediante modelos de regresión lineal ortogonal o de mínimos cuadrados y la F de Snedecor.

5.3.- LIMITE DE CUANTIFICACIÓN

El límite de cuantificación puede estimarse mediante el análisis de diluciones (1:2 a 1:10) de bajas concentraciones de microorganismos.

Podremos establecer el límite de cuantificación en aquel valor donde la precisión del método se desvía entre un 30% y 50% con respecto a la precisión teórica del método.

También se puede estimar a través del cálculo de la estimación de la dispersión en el Límite de crítico o del ruido de fondo (S0) o blanco (analizando al menos 6 muestras sin el microorganismo diana) y a través de este se fija el límite de cuantificación $LQ = 10S0$ que, según AOAC equivale al nivel donde el coeficiente de variación es inferior al 10% ($CV = Sr/X < 10$).

5.4.- ESPECIFICIDAD Y SELECTIVIDAD

Consiste en evaluar, al igual que se ha realizado en el punto 4.1 y 4.3, mediante el análisis por duplicado de cepas diana positivas y negativas y la comparación entre el valor obtenido con el método de referencia y con el método alternativo

5.5.- INTERLABORATORIO

Tiene como objetivo determinar comparativamente las características de rendimiento (exactitud y precisión) del método alternativo frente al método de referencia.

Deben participar al menos 8 laboratorios que aporten datos no discrepantes.

Se preparan tres concentraciones de microorganismos así como controles negativos, analizando cada laboratorio 4 submuestras en cada nivel de forma que 2 se miden con el método de referencia y otras 2 con el método alternativo.

En total para cada nivel se requieren 96 resultados.

6.- VALIDACIÓN INTERNA O VERIFICACIÓN – El laboratorio que finalmente va a utilizar el método alternativo debe evaluar la adecuación del método de forma que pueda garantizar que se cumplen con los requisitos del mismo en las condiciones reales de uso, considerando de forma particular la influencia de:

- Matrices habitualmente empleadas por el laboratorio.
- Microorganismos diana y flora interfiriente.
- Analistas que ejecutan los ensayos.
- Equipos y condiciones ambientales.
- Medios de cultivo y reactivos.

En este sentido, y siempre que se disponga de una validación previa (tal y como se ha descrito anteriormente) no es necesario que el laboratorio realice de nuevo una validación sino que compruebe que en condiciones reales, el rendimiento del método es adecuado.

Para ello podemos partir de los valores que caracterizan al método que deben venir descritos previamente (bien en el certificado de validación del método en su caso o en los datos científicos publicados que garanticen la validez del mismo). Dichos valores deben ser considerados como una referencia puesto que en muchas ocasiones son demasiado amplios como para ser utilizados como un control de calidad interno, por lo que

deben revisarse para poder establecer si suponen una referencia adecuada para que el laboratorio verifique su cumplimiento.

La verificación debe ser planificada en función de las características particulares de aplicación del método, siendo de especial interés **el empleo de matrices** que habitualmente vaya a analizar el laboratorio. Estas matrices han podido ser previamente estudiadas durante la validación del método o, como sucede en muchos casos, ser matrices que no han sido evaluadas, por lo que puede que el método alternativo aunque disponga de un estudio de validación previo, no sea adecuado para el uso específico que va a hacer de él el laboratorio de control.

6.1.- MÉTODOS CUALITATIVOS– La verificación puede consistir en comprobar que se puede lograr un adecuado **límite de detección** con las matrices habitualmente empleadas.

Para ello no es necesario realizar diluciones sino únicamente verificar que se puede detectar una concentración de microorganismos igual o inferior a la que se ha obtenido en la validación del método.

La preparación del inóculo se puede realizar como se ha descrito en el punto 3.2. Dicho inóculo se aplica a las matrices a evaluar, empleando 10 replicados. Al menos el 50% de las muestras analizadas deben ser detectadas para poder considerar que el límite de detección relativa es el adecuado.

6.2.- MÉTODOS CUANTITATIVOS– Debe verificarse que el **rendimiento del método** (exactitud y precisión) es el adecuado.

Para ello puede utilizarse los criterios establecidos anteriormente, estimando la **precisión** a partir del análisis por duplicado 10 muestras de cada una de las matrices habitualmente analizadas en el laboratorio y estimando sus valores acorde a la fórmula incluida en 5.1 y comprobando que su valor es igual o inferior al valor de referencia.

Debe considerarse que dicho valor de referencia ha sido obtenido en condiciones de reproducibilidad con datos procedentes de varios laboratorios, mientras que en este caso solo se ha empleado los valores de nuestro laboratorio, por lo que debe ponerse el máximo énfasis

Fig 16a.-

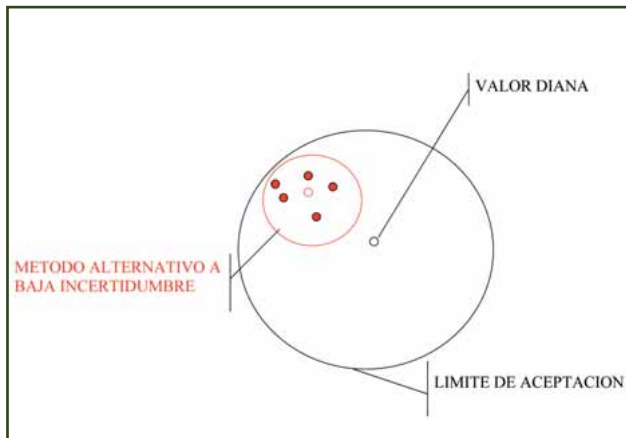
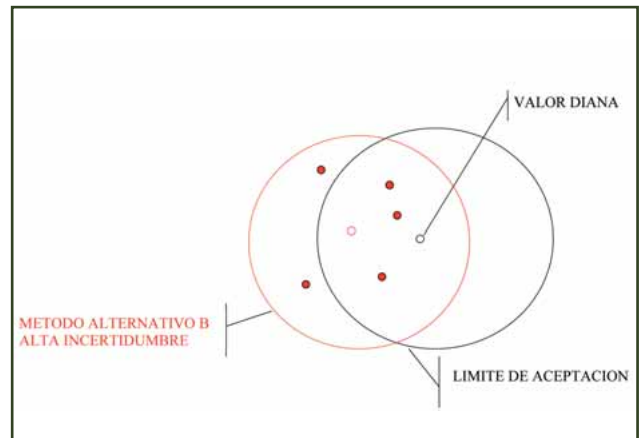


Fig 16b.-



sis de aplicar las condiciones más diversas posibles (diferentes analistas, equipos, lotes de medios de cultivo...).

La **exactitud** puede estimarse mediante la comparación de los valores de *t*-student tabulados para una distribución de Poisson y la *t*-student obtenidos por la media de las diferencias entre el valor de referencia y el obtenido en las diversas réplicas analizadas con el método alternativo.

No obstante este enfoque está siendo modificado dado que pueden producirse casos en los que se aprecien diferencias estadísticamente significativas que indican que la exactitud de un método no es la adecuada y sin embargo desde el punto de vista microbiológico, dicho método es válido e incluso mejor que

otros, como se puede observar en los siguientes esquemas Fig 16a y Fig 16b.

Aunque el método A es más exacto y preciso que el B, sin embargo el método A presenta diferencias estadísticas frente al valor de referencia mientras que el método B no presenta diferencias estadísticas.

7.- INFORME DE VALIDACIÓN— Finalmente, en todos los casos es importante elaborar un informe de validación, además de conservar los datos primarios a partir de los cuales se han realizado estas validaciones.

Este informe de validación debe incluir (siempre que proceda) los siguientes datos:

- Nombre del laboratorio.
- Fechas de realización del ensayo.

- Número, tipo y procedencia de las muestras utilizadas.
- Resultados de los ensayos de selectividad.
- Número y nombre de cepas diana y no diana utilizadas.
- Resultados de los ensayos de amplificación.
- Resultados de los ensayos de sensibilidad.
- Información sobre la robustez del método.
- Información sobre los controles de calidad utilizados.
- Información sobre los equipos utilizados.
- Cualquier otra observación sobre las desviaciones surgidas durante el estudio de validación.

LA TECNOLOGÍA TRANSCRIPCIÓN REVERSA - PCR PERMITE UNA DETECCIÓN MÁS RÁPIDA DE LISTERIA

Oxoid, SA (parte de Thermo Fisher Scientific, Inc)
DuPont Qualicon, ESL Bldg 400, PO Box 80400,
Wilmington, DE, 19880-0400 E.E.U.U., www.qualicon.com

PARA CONTROLAR EL RIESGO DE LISTERIOSIS ES NECESARIA LA DETECCIÓN TEMPRANA— La mayoría de los productores de alimentos y, básicamente, todos los fabricantes de carnes preparadas efectúan determinaciones ambientales de *Listeria*.

El hecho de efectuar análisis ambientales normalmente permite a los fabricantes detectar los problemas con mayor rapidez y tomar las medidas correctoras necesarias antes de efectuar pruebas a los pro-

ductos. Otra ventaja es que incluso en una situación muy desfavorable con alta presencia de *Listeria*, solo aproximadamente el 10% de los productos envasados tendrá una contaminación de nivel detectable. Por lo tanto, un mayor número de productos envasados deberían ser analizados para que se pudiera detectar la contaminación antes de liberar el producto para su distribución. Lo ideal es que los resultados estén dispo-



nibles en menos de ocho horas, para que los problemas que surjan puedan abordarse durante el mismo turno en que se toman las muestras y puedan tomarse

medidas correctoras el mismo día.

UN USO INNOVADOR DE TECNOLOGÍA COMPROBADA, LA TRANSCRIPCIÓN REVERSA PCR

La nueva determinación genética, que emplea la transcripción reversa-PCR para detectar todas las especies de *Listeria* presentes en las superficies ambientales, permite disponer de los resultados ocho horas después del muestreo.

De manera muy parecida a lo que ocurre con el ADN, las bacterias poseen secuencias específicas de ARN que son únicas de un organismo diana. Aunque cada célula bacteriana tiene una o tal vez unas pocas moléculas de ADN, normalmente puede contener miles de moléculas de ARN.

La transcripción reversa-PCR se emplea para sintetizar inicialmente al ADN com-

plementario de las cadenas de ARN. El proceso luego continúa con la amplificación estándar de ADN y la detección. El inmenso número de fragmentos de ARN presentes al inicio de la PCR conduce a un aumento notable de la sensibilidad frente a otros métodos de detección. De hecho, la transcripción reversa-PCR puede detectar especies de *Listeria* presentes en concentraciones extremadamente bajas (< 10 UFC/ml, excepto *L. grayi* en < 50 UFC/ml).

Más importante aún, es el hecho de que con la transcripción reversa-PCR las muestras no necesitan el enriquecimiento habitual de uno o dos días en un caldo nutritivo. En cambio, las células de *Listeria* se resucitan por calentamiento en la solución tampón donde se recogen durante unas pocas horas, lo que proporciona al proceso un «despegue ini-

cial» y facilita la obtención de los resultados en apenas ocho horas. El kit de obtención de muestras, que también contiene guantes estériles, puede enviarse por separado del kit de análisis, lo que facilita el muestreo en muchos sitios y el envío al laboratorio central para las pruebas.

No se necesita ninguna habilidad especial y las tabletas de PCR eliminan los pasos adicionales de pipeteo necesarios para la extracción manual del ARN. Además, se obtienen respuestas de «sí o no» claras y fiables que prácticamente eliminan la necesidad de que expertos interpreten los resultados.

El sistema BAX® para determinar en 8 horas *Listeria* ha sido certificado por AOAC-RI como Método de rendimiento comprobado (Performance Tested Method) n°. 030801

EVALUATION OF THE USE OF THE RAPIDCHEK® SELECT™ SALMONELLA SYSTEM FOR IN NPIP ENVIRONMENTAL SAMPLES

Strategic Diagnostics, Inc

INTRODUCTION— The National Poultry Improvement Plan (NPIP) is a cooperative Federal-State-Industry program developed for controlling certain poultry diseases.

NPIP samples tend to be high in background flora, and there several issues with available rapid methods including high false positive rates which are encountered with these sample types. For this reason only a handful of rapid methods are officially approved by the NPIP technical committee. For the most part, these methods are complicated and costly, so the vast majority of NPIP testing is performed with cultural methods. The RapidChek® SELECT™ *Salmonella* system offers a simple, yet highly specific solution for these sample types.

Two proprietary media have been uniquely formulated to allow maximum selection of the target while inhibiting closely related bacteria, facilitating optimal productivity. The RapidChek® SELECT™ media has been supplemented with a cocktail of antibiotics and specific phage which prevent the growth of cross reactors. This is a patented media tech-

nology and a novel approach to the enrichment of *Salmonella* in complex matrices. This novel media combined with a newly optimized lateral flow strip, allows the best recovery and detection of *Salmonella* spp.

AIM— To evaluate the use of the RapidChek® SELECT™ for the recovery and detection of *Salmonella* spp in NPIP samples.

EXPERIMENTAL PROTOCOL— Three inde-



pendent NPIP approved laboratories evaluated the SELECT™ product on routinely submitted chicken house environmental swab samples. A side-by-side

		RapidChek Select		
		+	-	Total
All Culture	+	90	2**	92
	-	10*	269	279
	Total	100	271	371

* Apparent RapidChek Select False Positive samples.

** This could also be due to Salmonella distribution between NPIP samples and RapidChek Select samples.

Tabla 2.- Comparison between the RapidChek® Select™ Salmonella Strip Test and Microbiological Culture.

comparison was run with the test kit method and standard NPIP culture methods.

RESULTS– False positive and false negative are based on discrepancy between strip results and culture confirmation from secondary media.

DISCUSSION AND CONCLUSIONS– Based on these data, it is concluded that the RapidChek® SELECTTM product works well for NPIP samples. As evident from the data, the RapidChek® SELECTTM correlated well with the NPIP approved cultural methods. RapidChek® SELECTTM provide and

easy to use cost effective method for the recovery of Salmonella species from these high burden samples.

PARA CONSULTAS TÉCNICAS: – Bioser, SA. c/ Tarragona, 106; 08015 Barcelona. Tel: 932264477; fax: 932267979; e-mail: bioseronline@bioser.com, tecnico@bioser.com; www.bioser.com.

Lab	Total Sample N°	NPIP Method		RapidCheck Method					
		Pos	Neg	Reported Pos	Confirmed Pos	Confirmed Neg	FP	FN	Accuracy
1	184	42	142	69	60	124	9	0	95%
2	97	8	89	8	7	90	1	0	99%
3	90	21	69	23	23	67	0	0	100%
Total	371	71	300	100	90	281	10	0	98%

Table 1.- Results of Side-by-Side Method. Comparison by three independent NPIP labs.

BBL™ CAMPY-CEFEX AGAR



Becton Dickinson, SA

- Esta fórmula Campy-Cefex Agar fue adoptada por el "National Advisory Committee on Microbiological Criteria



Producto	N° Catálogo	Unidades
BBL™ Campy Cefex Agar	215221	20 placas
BBL™ Campy Cefex Agar	292487	100 placas

- for Foods" para el aislamiento de Campylobacter en cadáveres de pollos para consumo.
- Con Cefoperazona y Cicloheximida, como agentes selectivos.

- Reduce la carga de trabajo y mejora la recuperación con respecto a otros medios como el mCCDA, Karmali, Campy Line y otros medios similares.