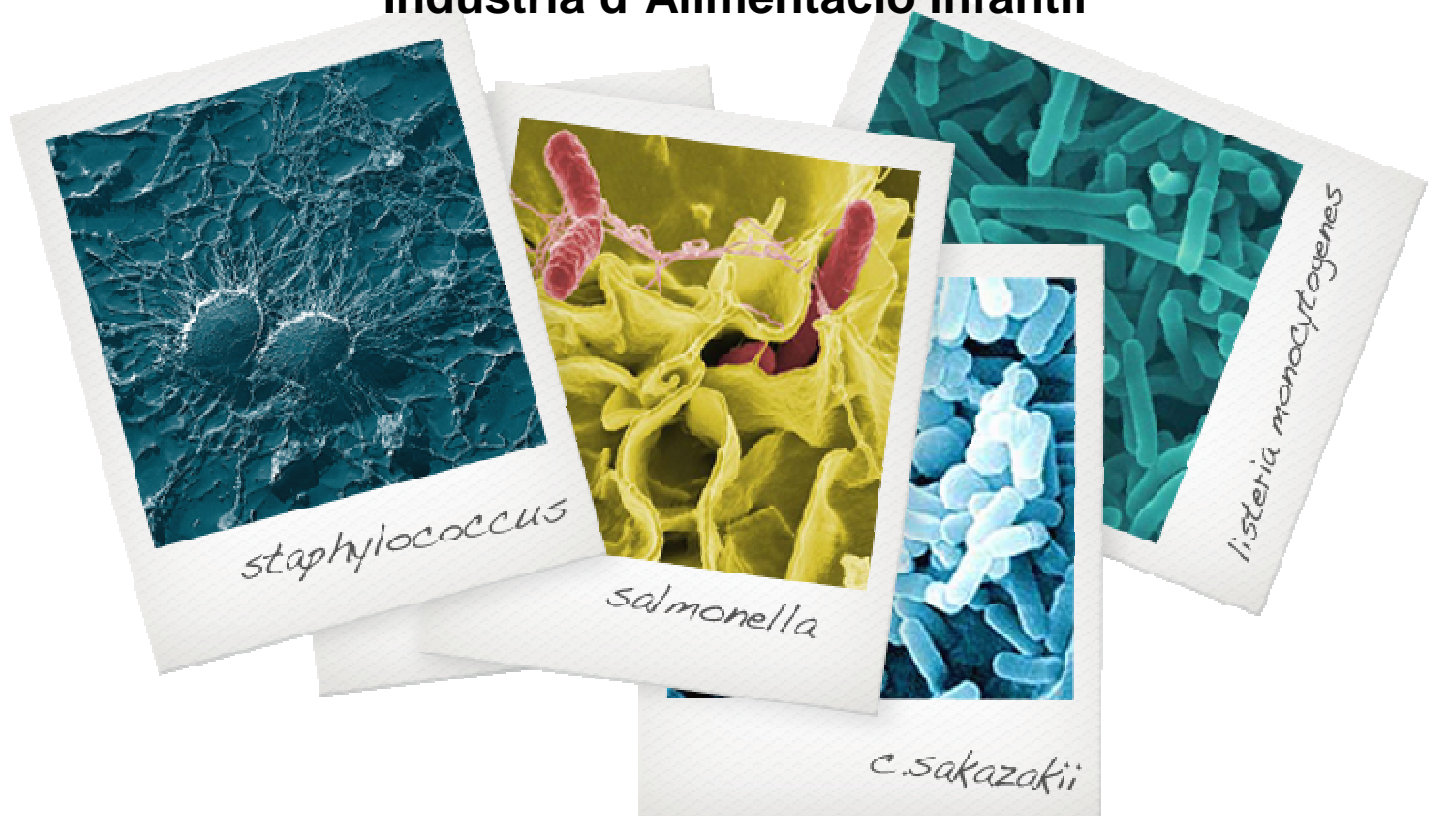




Universitat Autònoma de Barcelona

**Aplicació de protocols de Biologia Molecular
per a la detecció de patògens en la
Indústria d'Alimentació Infantil**



MEMÒRIA PRESENTADA PER Cristina Rodríguez Maturano

**PER ACCEDIR AL GRAU DE DOCTOR DEL PROGRAMA
DE CIÈNCIA ANIMAL I DELS ALIMENTS DE LA FACULTAT DE
VETERINÀRIA DE LA UNIVERSITAT AUTÒNOMA DE BARCELONA**

BELLATERRA, 4 JUNY DEL 2009



FACULTAT DE VETERINÀRIA DE BARCELONA



Universitat Autònoma de Barcelona

**Aplicació de protocols de Biologia Molecular
per a la detecció de patògens en la
Indústria d'Alimentació Infantil**

MEMÒRIA PRESENTADA PER Cristina Rodríguez Maturano

**PER ACCEDIR AL GRAU DE DOCTOR DEL PROGRAMA
DE CIÈNCIA ANIMAL I DELS ALIMENTS DE LA FACULTAT DE
VETERINÀRIA DE LA UNIVERSITAT AUTÒNOMA DE BARCELONA**

BELLATERRA, JUNY DEL 2009



FACULTAT DE VETERINÀRIA DE BARCELONA



Universitat Autònoma de Barcelona

Departament de Ciència Animal i dels Aliments

JOSÉ JUAN RODRÍGUEZ JEREZ, Professor Titular de l'Àrea de Nutrició i Bromatologia del Departament de Ciència Animal i dels Aliments i OLGA FRANCINO MARTÍ, Investigadora del Servei Veterinari de Genètica Molecular del Departament de Ciència Animal i dels Aliments de la Universitat Autònoma de Barcelona,

Informen:

Que la memòria titulada **Aplicació de protocols de Biologia Molecular per a la detecció de patògens en la Indústria d'Alimentació Infantil**, presentada per Cristina Rodríguez i Maturano per a obtenir el grau de doctor per la "Universitat Autònoma de Barcelona", ha estat realitzada sota la seva direcció i considerant-la finalitzada, autoritzen la seva presentació per que sigui jutjada per la comissió corresponent.

I per que consti als efectes oportuns, signen el present certificat a Bellaterra, a 4 de juny del 2.009.

José Juan Rodríguez Jerez

Olga Francino Martí

Als meus pares i germà,
per tot

A Àngel,
per compartir la vida amb mi

AGRAÏMENTS.

Agraeixo al Dr. José Juan Rodríguez Jerez i a la Dra. Olga Francino Martí per donar-me l'oportunitat de realitzar aquesta tesi sota la seva direcció i donar-me el seu suport i la seva bona predisposició en tot moment.

Per a totes aquelles persones que han col.laborat directament i indirecta en l'elaboració d'aquest treball ... el meu sincer agraïment.

ÍNDIX DE CONTINGUTS	
Llista d'Abreviatures i Acrònims.....	xi
Llista de Figures.....	xvii
Llista de Taules.....	xxi
Resum.....	xxix
Resumen.....	xxxiii
Abstract.....	xxxvii
Capítol 1. INTRODUCCIÓ.....	1
1.1. Repercussió mundial de les malalties transmises pels aliments.	5
1.2. Marc Legal en Alimentació Infantil.	6
1.2.1. Fórmules Infantils.	6
1.2.2. Papilles.	10
1.3. La lactància artificial: Fórmules Infantils.	11
1.3.1. L'alimentació durant el primer any de vida.	13
1.3.2. Tipus de Fórmules Infantils.	15
a) Llets d'inici.	15
b) Llets de continuació.	18
c) Llets especials.	19
d) Fórmules 3.	23
1.3.3. Papilles per a Nens.	24

ÍNDIX DE CONTINGUTS	
1.4. Contaminació microbiana en aliments infantils.	26
1.4.1. <i>Salmonella</i> .	26
1.4.2. <i>Listeria monocytogenes</i> .	32
1.4.3. <i>Staphylococcus aureus</i> .	37
1.4.4. <i>Cronobacter sakazakii</i> .	41
1.5. Reconstituïció de les Fórmules Infantils.	47
1.6. Detecció de patògens: Tècniques aplicades actualment en la Indústria Alimentària Infantil.	54
1.7. Tècniques basades en Biologia Molecular.	56
1.8. Principals motius per a implantar la tècnica de PCR en un Laboratori de la Indústria.	64
Capítol 2. OBJECTIUS.....	71
Capítol 3. MATERIAL I MÈTODES.....	75
3.1. Protocol de treball.	77
3.2. Matrius alimentàries estudiades.	80
3.3. Soques de treball.	81
3.4. Inoculacions.	81
3.5. Etapes de Pre-Incubació.	82
3.6. Mètodes d'anàlisi.	86
3.6.1. Anàlisi de <i>Salmonella</i> .	86
3.6.2. Anàlisi de <i>Listeria monocytogenes</i> .	90

ÍNDIX DE CONTINGUTS	
3.6.3. Anàlisi d' <i>Staphylococcus aureus</i> .	91
3.6.4. Anàlisi de <i>Cronobacter sakazakii</i> .	92
3.7. Sistema PCR.	93
3.8. Tractament estadístic.	96
3.9. Criteri de decisió dels resultats.	97
3.10. Estudi preliminar d'extracció del DNA realitzat en Productes Minoritaris per a la detecció de <i>Salmonella</i> per PCR.	97
3.11. Estudi preliminar d'extracció del DNA realitzat en Fórmules Infantils per a la detecció de <i>Listeria monocytogenes</i> per PCR.	99
3.12. Estudi preliminar d'anàlisi per PCR per avaluar la viabilitat de microorganismes patògens en diferents matrius alimentàries.	100
Capítol 4. RESULTATS.....	105
4.1. Resultats de l'optimització dels protocols d'extracció del DNA.	107
4.1.1. Fórmules Infantils.	108
4.1.2. Papilles.	109
4.1.3. Farines.	110
4.1.4. Productes Minoritaris.	111
4.2. Resultats de la validació de <i>Salmonella</i>.	114
4.2.1. <i>Salmonella</i> analitzada de forma individual en Fórmules Infantils i Papilles.	114
4.2.2. <i>Salmonella</i> analitzada de forma agrupada en Fórmules Infantils i Papilles.	119

ÍNDIX DE CONTINGUTS	
4.2.2.1. Resultats sense addició de soja.	120
4.2.2.2. Resultats amb addició de soja.	123
4.2.3. <i>Salmonella</i> analitzada de forma individual en Farines.	127
4.2.4. <i>Salmonella</i> analitzada de forma individual en Productes Minoritaris.	129
4.3. Resultats de la validació de <i>Listeria monocytogenes</i> en Fórmules Infantils.	132
4.4. Resultats de la validació d' <i>Staphylococcus aureus</i>.	137
4.4.1. <i>Staphylococcus aureus</i> en Fórmules Infantils i Papilles.	137
4.4.2. <i>Staphylococcus aureus</i> en Farines.	141
4.5. Resultats de la validació de <i>Cronobacter sakazakii</i> en Fórmules Infantils.	143
4.6. Resultats de l'estudi de viabilitat de microorganismes patògens en Aliments Infantils.	146
4.6.1. <i>Salmonella</i> .	148
4.6.2. <i>Listeria monocytogenes</i> .	149
4.6.3. <i>Staphylococcus aureus</i> .	150
4.6.4. <i>Cronobacter sakazakii</i> .	150
4.7. Revisió dels costos analítics.	151
Capítol 5. DISCUSSIÓ.....	153
5.1. Extracció del DNA.	156

ÍNDIX DE CONTINGUTS	
5.1.1. Fórmules Infantils.	157
5.1.2. Papilles.	158
5.1.3. Farines.	158
5.1.4. Productes Minoritaris.	159
5.2. Comparació de tècniques analítiques.	160
5.2.1. <i>Salmonella</i> .	160
5.2.1.1. Fórmules Infantils i Papilles.	160
5.2.1.2. Farines.	168
5.2.1.3. Productes Minoritaris.	169
5.2.2. <i>Listeria monocytogenes</i> en Fórmules Infantils.	171
5.2.3. <i>Staphylococcus aureus</i> en Fórmules Infantils, Papilles i Farines.	173
5.2.4. <i>Cronobacter sakazakii</i> en Fórmules Infantils.	176
Capítol 6. CONCLUSIONS.....	181
Capítol 7. REFERÈNCIES BIBLIOGRÀFIQUES.....	187
Capítol 8. PUBLICACIONS RELACIONADES.....	203

LLISTA D'ABREVIATURES I ACRÒNIMS	
ABI	Applied Biosystems.
aprox.	Aproximadament.
B.O.E	Butlletí Oficial de l'Estat.
BP	Baird Parker.
CE	Comunitat Europea.
DNA	Àcid Desoxiribonucleic.
AESAN	Agència Espanyola de Seguretat Alimentària i Nutrició.
AFNOR	Associació Francesa de Normalització.
AOAC	Association of Official Agricultural Chemists.
APPCC	Anàlisi de Perills i Punts de Control Crític.
APT	Aigua de Peptona Tamponada.
AR	Antirregurgitació.
CCA	Comitè Científic per a l'Alimentació.
CE	Comunitat Europea.
Ct	Cicle llindar d'amplificació (threshold cycle).
Delta R_(n)	Intensitat de fluorescència.
DNApol	DNA polimerasa.
ECL	<i>Enterobacter cloacae</i> .
EFSA	Autoritat Europea de Seguretat Alimentària.

LLISTA D'ABREVIATURES I ACRÒNIMS	
EMM	Environmental Master Mix.
ESIA	Chromogenic <i>Enterobacter sakazakii</i> Isolation Agar.
ESPGAN	Comitè de Nutrició de la Societat Europea de Gastroenterologia i Nutrició Pediàtrica.
FA	Fórmules adaptades.
FAO	Organització de les Nacions Unides per a l'Agricultura i l'Alimentació.
FH	Fórmules Hipoal.lergèniques o Fórmules Hidrolitzades.
H.A.	Fórmules Hipoantigèniques.
IAC	Internal Amplification Control.
ICMSF	International Commission on Microbiological Specifications for Foods.
ICS	Immuno Concentració de <i>Salmonella</i> .
IDF	International Dairy Federation.
IPC	Control intern d'amplificació (Internal Positive Control).
ISO	International Standard Organisation.
LMO	<i>Listeria monocytogenes</i> .
LST	Lauryl Sulphate Tryptose Broth.
m LST	Lauryl Sulphate Tryptose Broth modificat
MKTTn	Müller-Kauffmann tetratonato novobiocina.

LLISTA D'ABREVIATURES I ACRÒNIMS	
nm	Nanòmetres.
NTC	Control negatiu d'amplificació (Negative Template Control).
OMS	Organització Mundial de la Salut.
PBS	Tampó Fosfat Salí.
PCA	Plate Count Agar.
PCR	Reacció en Cadena de la Polimerasa.
Pol	Polimerases.
RGE	Reflux gastroesofàgic.
RPF	Rabbit Plasma Fibrinogen.
rpm	Revolucions per minut.
RT	Transcriptasa reversa.
RVS	Rappaport Vassiliadis amb soja.
SDS	Sequence Detection System.
SMID2	<i>Salmonella</i> Identificación.
Taq Pol	Taq Polimerasa.
TS	Especificació tècnica.
TSA	Tryptone Soy Agar.
UE	Unió Europea.
ufc	Unitats formadores de colònies.

LLISTA D'ABREVIATURES I ACRÒNIMS	
VIH	Virus de la Immunodeficiència Humana.
WHO	World Health Organization.
XLD	Xilosa, Lisina, Desoxicolat.

Figura	LLISTA DE FIGURES
1	Algoritme de l'ús de les Fórmules Infantils.
2	Creixement del <i>Cronobacter sakazakii</i> en una Fórmula Infantil reconstituïda en relació amb la temperatura ambient.
3	Esquema de treball del sistema VIDAS®.
4	Cicle d'amplificació de la PCR.
5	Mecanisme d'acció de les sondes TaqMan®.
6	Mecanisme d'acció de les Molecular Beacon.
7	Mecanisme d'acció de les sondes FRET.
8	Components de la Màster Mix.
9	Procediment de treball de la PCR a Temps Real.
10	Esquema de treball de les diferents validacions del present estudi.
11	Flux de treball dels assajos de viabilitat.
12	Fotografies de cèl.lules vives de <i>Salmonella</i> mitjançant una càmera digital.
13	Esquema de la metòdica ISO 6579:2002.
14	Esquema de la metòdica ICS-VIDAS®.
15	Esquema de la metòdica LMO2-VIDAS®.
16	Esquema de la metòdica ISO 6888-2:1999.
17	Esquema de la metòdica ISO 22964:2006.
18	Resultats detectats en la Validació de <i>Salmonella</i> en Fórmules Infantils i Papilles analitzada de forma individual.

Figura	LLISTA DE FIGURES
19	Resultats detectats en la Validació de <i>Salmonella</i> en Fórmules Infantils i Papilles analitzats de forma agrupada sense addició de soja.
20	Resultats detectats en la Validació de <i>Salmonella</i> en Fórmules Infantils i Papilles analitzats de forma agrupada amb addició de soja.
21	Resultats detectats en la Validació de <i>Salmonella</i> en Farines.
22	Resultats detectats en la Validació de <i>Salmonella</i> en Productes Minoritaris (seguint el Protocol Minoritari_3).
23	Resultats detectats en la Validació de <i>Listeria monocytogenes</i> en Fórmules Infantils (Protocols Listeria_1, _4 i _5).
24	Resultats detectats en la Validació de l' <i>Staphylococcus aureus</i> en Fórmules Infantils i Papilles.
25	Resultats detectats en la Validació de l' <i>Staphylococcus aureus</i> en Farines.
26	Resultats detectats en la Validació de <i>Cronobacter sakazakii</i> en Fórmules Infantils.

Taula	LLISTA DE TAULES
1	Reglament nº 1441/2007 referent als criteris microbiològics d'higiene en Fórmules Infantils.
2	Reglament nº 1441/2007 referent als criteris microbiològics de seguretat en Fórmules Infantils.
3	Característiques tècniques de la llet de classe «A».
4	Característiques nutricionals de les Llets d'Inici.
5	Característiques nutricionals de les Llets d'Inici (II).
6	Característiques nutricionals de les Llets de Continuació.
7	Característiques nutricionals de les Llets de Continuació (II).
8	Característiques nutricionals de les Llets 3.
9	Espècies de <i>Salmonella</i> .
10	Contaminació per <i>Salmonella</i> .
11	Característiques dels serovars de <i>Salmonella</i> .
12	Espècies de <i>Listeria</i> .
13	Factors que intervenen en la intoxicació per <i>Staphylococcus aureus</i> .
14	Mesures de control d' <i>Staphylococcus aureus</i> .
15	Tipus de contaminació del <i>Cronobacter sakazakii</i> .
16	Focus de contaminació del <i>Cronobacter sakazakii</i> .
17	Alguns brots del <i>Cronobacter sakazakii</i> .
18	Nens exposats a un elevat risc d'infecció pel <i>Cronobacter sakazakii</i> .

Taula	LLISTA DE TAULES
19	Programes educatius per a la reconstitució de les Fórmules Infantils.
20	Reconstitució de les Fórmules Infantils.
21	Recomanacions elaborades pel grup de treball conjunt entre l'OMS i la FAO per a la reconstitució de les Fórmules Infantils.
22	DNA Polimerases utilitzades en el cicle de la PCR.
23	Tipus de PCR a Temps Real.
24	Motius de la realització del pre-enriquiment per PCR.
25	Esquema de les validacions amb els patògens i matrius analitzades en aquest estudi.
26	Esquema de les validacions dels assajos de viabilitat.
27	Esquema de l'anàlisi de les Fórmules Infantils.
28	Esquema de l'anàlisi de les Papilles, Farines i Productes Minoritaris.
29	Quadre-resum dels protocols d'extracció establerts per a cada matriu assajada.
30	Resum dels protocols d'extracció assajats en Fórmules Infantils.
31	Resum dels protocols d'extracció assajats en Papilles.
32	Resum dels protocols d'extracció assajats en Farines.
33	Resum dels protocols d'extracció assajats en Productes Minoritaris.
34	Flux de treball dels diferents protocols d'extracció del DNA assajats en els Productes Minoritaris.

Taula	LLISTA DE TAULES
35	Quadre-resum dels protocols d'extracció establerts per a cada matriu assajada els quals depenen de les matrius i no de l'organisme analitzat.
36	Resultats de les validacions de la <i>Salmonella</i> (analitzada de forma individual) en Fórmules Infantils.
37	Resultats de les validacions de la <i>Salmonella</i> (analitzada de forma individual) en Papilles.
38	Resultats detectats per cada tècnica analítica en l'anàlisi individual de la <i>Salmonella</i> .
39	Resultats del tractament estadístic en l'anàlisi individual de la <i>Salmonella</i> .
40	Resultats de les validacions de la <i>Salmonella</i> (analitzada de forma agrupada sense soja) en Fórmules Infantils.
41	Resultats de les validacions de la <i>Salmonella</i> (analitzada de forma agrupada sense soja) en Papilles.
42	Resultats detectats per cada tècnica analítica en l'anàlisi agrupat sense soja de la <i>Salmonella</i> .
43	Resultats del tractament estadístic en l'anàlisi agrupat sense soja de la <i>Salmonella</i> .
44	Resultats de les validacions de la <i>Salmonella</i> (analitzada de forma agrupada amb soja) en Fórmules Infantils.
45	Resultats de les validacions de la <i>Salmonella</i> (analitzada de forma agrupada amb soja) en Papilles.
46	Resultats detectats per cada tècnica analítica en l'anàlisi agrupat amb soja de la <i>Salmonella</i> .

Taula	LLISTA DE TAULES
47	Resultats del tractament estadístic en l'anàlisi agrupat amb soja de la <i>Salmonella</i> .
48	Resultats de les validacions de la <i>Salmonella</i> en Farines.
49	Resultats en Farines detectats per cada tècnica per a l'anàlisi de la <i>Salmonella</i> .
50	Resultats del tractament estadístic en l'anàlisi de les Farines per a la <i>Salmonella</i> .
51	Resultats de les validacions de la <i>Salmonella</i> en Productes Minoritaris.
52	Resultats en Productes Minoritaris detectats per cada tècnica per a l'anàlisi de la <i>Salmonella</i> .
53	Resultats del tractament estadístic en l'anàlisi dels Productes Minoritaris per a la <i>Salmonella</i> .
54	Resultats de les validacions de la <i>Listeria monocytogenes</i> en Fórmules Infantils.
55	Resultats en Fórmules Infantils detectats per cada tècnica per a l'anàlisi de la <i>Listeria monocytogenes</i> .
56	Resultats del tractament estadístic en l'anàlisi de Fórmules Infantils per a la <i>Listeria monocytogenes</i> .
57	Resultats de les validacions d' <i>Staphylococcus aureus</i> en Fórmules Infantils.
58	Resultats de les validacions d' <i>Staphylococcus aureus</i> en Papilles.
59	Resultats en Fórmules Infantils i Papilles detectats per cada tècnica per a l'anàlisi d' <i>Staphylococcus aureus</i> .
60	Resultats del tractament estadístic en l'anàlisi de Fórmules Infantils i Papilles per a l' <i>Staphylococcus aureus</i> .

Taula	LLISTA DE TAULES
61	Resultats de les validacions d' <i>Staphylococcus aureus</i> en Farines.
62	Resultats en Farines detectats per cada tècnica per a l'anàlisi d' <i>Staphylococcus aureus</i> .
63	Resultats del tractament estadístic en l'anàlisi de Farines per a l' <i>Staphylococcus aureus</i> .
64	Resultats de les validacions del <i>Cronobacter sakazakii</i> en Fórmules Infantils.
65	Resultats en Fórmules Infantils detectats per cada tècnica per a l'anàlisi del <i>Cronobacter sakazakii</i> .
66	Resultats del tractament estadístic en l'anàlisi de Fórmules Infantils pel <i>Cronobacter sakazakii</i> .
67	Taula-resum on es detallen els percentatges de positivitat detectats en les darreres validacions per a cada microorganisme i en cada producte assajat.
68	Resultats obtinguts per les diferents tècniques analítiques en l'estudi de viabilitat de la <i>Salmonella</i> al llarg del temps.
69	Resultats dels Controls Positius de <i>Salmonella</i> al llarg del temps en les diferents modalitats d'anàlisi.
70	Resultats obtinguts per les diferents tècniques analítiques en l'estudi de viabilitat de la <i>Listeria monocytogenes</i> al llarg del temps treballant amb diferents brous d'enriquiment (Fraser Semi i Aigua de Peptona Tamponada).
71	Resultats dels Controls Positius de <i>Listeria monocytogenes</i> al llarg del temps aplicant els diferents mètodes analítics.
72	Resultats obtinguts de l'estudi de viabilitat d' <i>Staphylococcus aureus</i> els dies 1, 7 i 15 de la inoculació.

Taula	LLISTA DE TAULES
73	Resultats dels Controls Positius d' <i>Staphylococcus aureus</i> al llarg del temps fent servir els mètodes ISO i PCR.
74	Resultats obtinguts per les tècniques ISO i PCR durant l'estudi de viabilitat del <i>Cronobacter sakazakii</i> al llarg del temps.
75	Resultats dels Controls Positius del <i>Cronobacter sakazakii</i> al llarg de 15 dies aplicant els mètodes ISO i PCR.
76	Resum dels resultats obtinguts en les validacions de la <i>Salmonella</i> en Fórmules Infantils i Papilles.
77	Resum dels resultats obtinguts en les validacions de la <i>Salmonella</i> en Farines.
78	Resum dels resultats obtinguts en les validacions de la <i>Salmonella</i> en Productes Minoritaris.
79	Resum dels resultats obtinguts en les validacions de la <i>Listeria monocytogenes</i> en Fórmules Infantils.
80	Resum dels resultats obtinguts en les validacions de l' <i>Staphylococcus aureus</i> .
81	Resum dels resultats obtinguts del <i>Cronobacter sakazakii</i> en les validacions de les Fórmules Infantils.

RESUM.

Les crisis sanitàries relacionades amb els aliments han posat en evidència la complexitat del procés de producció i la necessitat d'abordar la seguretat alimentària amb un plantejament global que compregui tota la cadena, des de les fases més primàries de la producció fins al consum, amb la prioritat bàsica de la protecció de la salut de la població.

Els aliments contaminats representen la principal via de transmissió dels microorganismes. Garantir un risc zero en la presència d'algun d'aquests agents no desitjables en un aliment és impossible. No obstant, la producció d'aliments segurs és una responsabilitat compartida entre els fabricants i les autoritats competents.

Actualment l'aplicació en determinades fases de la producció de sistemes d'Anàlisi de Perills i Punts Crítics de Control (APPCC) és un instrument molt valuós per a la millora dels nivells de seguretat alimentària, i els principis en els quals es basa són suficientment flexibles com per poder ser aplicats en tots els tipus d'establiments alimentaris.

Entre els microorganismes d'interès més rellevant en la indústria d'alimentació infantil destaquen:

Salmonella.

Els aliments contaminats representen la principal via de transmissió de *Salmonella*. Durant moltes dècades, ha estat considerada com un perill en les Fórmules Infantils i productes a base de llet. La revisió dels darrers casos de toxicoinfeccions relacionades amb Fórmules Infantils confirmen que es tracta d'un problema de salut pública molt important i que requereix una vigilància constant dels perills durant la fabricació d'aquests productes.

Listeria monocytogenes.

És un bacteri ubiqüitari, àmpliament distribuït a la natura. La probabilitat d'emmalaltir per la ingesta de *Listeria monocytogenes* és més gran en els grups de població vulnerables -persones amb immunodeficiència, persones grans, fetus i nadons - que en la població general.

Staphylococcus aureus.

És un agent bacterià toxigènic que causa brots per la ingesta d'aliments que contenen les enterotoxines estafilocòciques termoestables.

El seu reservori principal són els animals i les persones: Es troba a les fosses nasals i la laringe, a la pell i als cabells.

Cronobacter sakazakii.

Anomenat anteriorment *Enterobacter sakazakii*. És un patògen emergent implicat en casos d'infeccions greus en nounats de fins a 4-6 setmanes d'edat. Té caràcter ubiqüitari i el seu control en sales de processat requereix unes mesures rigoroses d'higiene. No sobreviu al procés de pasteurització, però pot esdevenir una recontaminació del producte en les fases d'envasat i manipulació.

En el Laboratori, la recerca d'aquests gèneres bacterians es pot realitzar mitjançant diferents procediments analítics. En aquest estudi, s'ha utilitzat la Reacció en Cadena de la Polimerasa (PCR) com a mètode ràpid i alternatiu per tal de valorar la seva sensibilitat, especificitat i capacitat de detecció.

El mètode de la PCR a Temps Real pot ser optimitzat i validat internament per a la detecció específica d'aquests microorganismes patògens en els Laboratoris de les Indústries dedicades a la fabricació d'aliments infantils.

En concret, els resultats de les validacions realitzades en aquest estudi recomanen la utilització de la tècnica de PCR en les següents matrius:

- Anàlisi individual de *Salmonella* i *Staphylococcus aureus* en Fórmules Infantils, Papilles i Farines.
- Anàlisi agrupat de *Salmonella* amb soja en Fórmules Infantils i Papilles.
- Anàlisi individual de *Cronobacter sakazakii* en Fórmules Infantils.

No obstant, l'extracció del DNA no sempre ha estat efectiva en totes les matrius ni ha proporcionat una forma correcta d'amplificació per PCR.

Els principals inconvenients han estat en la detecció de la *Salmonella* en Productes Minoritaris i la inhibició que el brou d'enriquiment Fraser Semi provoca en la detecció de la *Listeria monocytogenes* en Fórmules Infantils.

RESUMEN.

Las crisis sanitarias relacionadas con los alimentos han puesto en evidencia la complejidad del proceso de producción y la necesidad de abordar la seguridad alimentaria con un planteamiento global que comprenda toda la cadena, desde las fases más primarias de la producción hasta el consumo, con la prioridad básica de la protección de la salud de la población.

Los alimentos contaminados representan la principal vía de transmisión de los microorganismos. Garantizar un riesgo cero en la presencia de alguno de estos agentes no deseables en un alimento es imposible. No obstante, la producción de alimentos seguros es una responsabilidad compartida entre los fabricantes y las autoridades competentes.

Actualmente la aplicación en determinadas fases de la producción de sistemas de Análisis de Peligros y Puntos Críticos de Control (APPCC) es un instrumento muy valioso para la mejora de los niveles de seguridad alimentaria, y los principios en los cuales se basa son suficientemente flexibles como para poder ser aplicados en todos los tipos de establecimientos alimentarios.

Entre los microorganismos de interés más relevante en la industria de alimentación infantil destacan:

Salmonella.

Los alimentos contaminados representan la principal vía de transmisión de *Salmonella*. Durante muchas décadas, ha sido considerada como un peligro en las Fórmulas Infantiles y productos a base de leche. La revisión de los últimos casos de toxicoinfecciones relacionadas con Fórmulas Infantiles confirma que se trata de un problema de salud pública muy importante y que requiere una vigilancia constante de los peligros durante la fabricación de estos productos.

Listeria monocytogenes.

Es una bacteria ubicua, ampliamente distribuida en la naturaleza. La probabilidad de enfermar por la ingesta de *Listeria monocytogenes* es mayor en los grupos de población vulnerables -personas con inmunodeficiencia, personas mayores, fetos y recién nacidos- que en la población general.

Staphylococcus aureus.

Es un agente bacteriano toxigénico que causa brotes por la ingesta de alimentos que contienen las enterotoxinas estafilocócicas termoestables.

Su reservorio principal son los animales y las personas: Se encuentra en las fosas nasales, la laringe, en la piel y el cabello.

Cronobacter sakazakii.

Llamado anteriormente *Enterobacter sakazakii*. Es un patógeno emergente implicado en casos de infecciones graves en recién nacidos de hasta a 4-6 semanas de edad. Tiene carácter ubicuo y su control en salas de procesamiento requiere medidas rigurosas de higiene. No sobrevive al proceso de pasteurización, pero puede producirse una recontaminación del producto en las fases de envasado y manipulación.

En el Laboratorio, la búsqueda de estos géneros bacterianos se puede realizar mediante diferentes procedimientos analíticos. En este estudio, se ha utilizado la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) como método rápido y alternativo para valorar la sensibilidad, especificidad y capacidad de detección.

El método de la PCR a Tiempo Real puede ser optimizado y validado internamente para la detección específica de estos microorganismos patógenos en los Laboratorios de las Industrias dedicadas a la fabricación de alimentos infantiles.

En concreto, los resultados de las validaciones realizadas en este estudio recomiendan la utilización de la técnica de PCR en las siguientes matrices:

- Análisis individual de *Salmonella* y *Staphylococcus aureus* en Fórmulas Infantiles, Papillas y Harinas.
- Análisis agrupado de *Salmonella* con soja en Fórmulas Infantiles y Papillas.
- Análisis individual de *Cronobacter sakazakii* en Fórmulas Infantiles.

No obstante, la extracción del DNA no siempre ha sido efectiva en todas las matrices ni ha proporcionado una forma correcta de amplificación por PCR.

Los principales inconvenientes se han producido en la detección de la *Salmonella* en Productos Minoritarios y la inhibición que el caldo de enriquecimiento Fraser Semi provoca en la detección de la *Listeria monocytogenes* en Fórmulas Infantiles.

ABSTRACT.

The sanitary attacks related with food have shown the complexity of the productivity process and the necessity to tackle the food safety like a global approach which includes everything from the primary steps of production to the consumption, taking into account that the priority is to protect the health of the population.

The contaminated food is the most important way of transmission of microorganisms. It is impossible to guarantee the zero risk in the presence of one of these undesirable agents in food. However, the production of safety food is a responsibility shared between the producers and the competent authorities.

Nowadays, the application in some steps of the production of the Analysis of Critical Control Points (HACCP) represents an important tool to improve the levels of food safety and the principles are flexible enough to be applied in all kind of food establishment.

Among the most important microorganisms in the Baby Food Industry, we emphasize:

Salmonella.

The contaminated food represents the most important way of transmission of *Salmonella*.

During a lot of decades, *Salmonella* has been considered as a hazard in Infant Formulae and products based on milk. The revision of the latest cases of infections related with Infant Formulae confirms that *Salmonella* is an important problem of public health and it is needed a constant guidance of risks during the production of these products.

Listeria monocytogenes.

It is an ubiquitous microorganism which is widely distributed in Nature. The probability of infection by the consumption of *Listeria monocytogenes* is bigger in the following group of population: People with some immunodeficiency, old people and babies.

Staphylococcus aureus.

It is a toxigenic microorganism which causes a break out by the consumption of food which contains the thermo-stable staphylococcus enterotoxin.

Its most important reserves are animals and persons: We can find it in the nostrils, larynx, skin and hair.

Cronobacter sakazakii.

Named before *Enterobacter sakazakii*. It is an emergent pathogen which has been implicated in serious infections in babies until 4-6 weeks of life.

It is an ubiquitous microorganism that needs to be controlled in the process room which requires important hygienic rules.

Although it doesn't survive the pasteurization treatment, recontamination of the product is possible during the filling and manipulation steps.

In the Laboratory, the search of these pathogen microorganisms can be done by different analytical methods.

In this study, the Polymerase Chain Reaction (PCR) system has been used as a rapid and alternative method in order to evaluate its sensitivity, specificity and capacity of detection.

The Real Time PCR method can be optimized and validated internally to detect specifically these pathogen microorganisms in the Laboratories of Baby Food Industries.

Specifically, the results obtained during this study recommended the use of the PCR technique in the following cases:

- Individual analysis of *Salmonella* and *Staphylococcus aureus* in Infant Formulae, Cereals and Flour.
- Composite Analysis of *Salmonella* with soya protein in Infant Formulae and Cereals for Babies.
- Individual analysis of *Cronobacter sakazakii* in Infant Formulae.

However, the DNA extraction hasn't been effective enough to get the desirable amplification by PCR in all the cases.

The most important problems appeared in the detection of *Salmonella* in Minority Products and the inhibition caused by the enrichment broth Fraser Semi in the detection of *Listeria monocytogenes* in Infant Formulae.

CAPÍTOL 1. INTRODUCCIÓ

Les malalties transmeses pels aliments són una qüestió present en la consciència dels consumidors i que “atrau” els medis de comunicació. No obstant, els casos de toxicoinfeccions alimentàries es produeixen en tots els països i constitueixen una preocupació mundial de salut pública (Anònim. 2007a).

En les darreres dècades, la incidència de les malalties transmeses pels aliments és deguda a diverses raons: l'adaptació microbiana, els canvis en els sistemes de producció d'aliments, noves pràctiques d'alimentació, la tecnologia dels aliments, augment en el comerç internacional, grups de població exposades als riscos i els viatges, canvis en l'estil de vida, en la demografia i el comportament humà. La globalització dels mercats dels aliments ha augmentat el repte de la gestió d'aquests riscos (Anònim. 2007e).

Els aliments representen un dels principals vehicles de transmissió d'organismes patògens i substàncies tòxiques en persones. En alguns casos, els brots de toxicoinfeccions alimentàries no queden enregistrats i, per tant, no s'investiguen. Per a facilitar aquesta tasca, l'Organització Mundial de la Salut (OMS) acaba de presentar pautes destinades a la identificació, investigació i control d'aquests brots des d'una perspectiva multidisciplinària (Chavarrías, M. 2007).

La seguretat dels aliments és un dret del consumidor que la indústria alimentària ha de garantir i les administracions públiques supervisar (Pelayo, M., 2007). Les legislacions dels diferents països de tot el món imposen uns criteris mínims que han d'acomplir-se per evitar que els consumidors pateixin malalties d'origen alimentari (Rodríguez, J.J. 2007).

Aquest dret és prioritari en el cas de la població infantil, ja que el seu organisme és més vulnerable als possibles agents que poden contenir els aliments que se'ls ofereix. Això és degut a què, a més de tenir un major efecte sobre els seus teixits encara en fase de desenvolupament, són més difícils d'eliminar a través d'uns òrgans encara en període de maduresa (Pelayo, M. 2007).

Existeix un risc afegit quan els aliments van adreçats a nadons i molt especialment aquells que presenten baix pes al néixer o estan immunodeprimits. Cal recordar que els preparats infantils no són productes estèrils i es poden contaminar durant la seva reconstitució provocant seriosos problemes de salut. Per tant, cal proporcionar a aquest col·lectiu d'usuaris informació de com preparar-ho correctament per tal de reduir el risc. D'altra banda, la indústria d'alimentació infantil ha de destinar esforços per a reduir la concentració i la prevalença d'aquests microorganismes patògens en les Fórmules Infantils (Anònim. 2005a).

En la mesura del possible, hauran d'aplicar-se només mètodes la fiabilitat dels quals (precisió, reproducibilitat, variació entre Laboratoris i a dins dels mateixos) s'hagi establert estadísticament mitjançant estudis comparatius o realitzats en col·laboració entre diversos Laboratoris. A més, haurà de donar-se preferència als mètodes que s'hagin validat pel producte en qüestió, preferentment en relació als mètodes de referència elaborats per organismes internacionals (Anònim. 1997c).

Les anàlisis microbiològiques tradicionals dels aliments finals tenen seriosos inconvenients, associats bàsicament al temps necessari per a poder obtenir els resultats (Rodríguez, J.J. 2007).

Mitjançant mètodes de PCR (en els que s'amplifiquen seqüències específiques de gèneres o espècies microbianes) es pot identificar de manera precisa la presència d'un microorganisme determinat en l'aliment. Això és important, per exemple, en el cas de microorganismes causants d'alteracions alimentàries o com a confirmació de la presència d'un determinat patògen detectat per microbiologia tradicional ja que, mitjançant tècniques genètiques, aquesta confirmació pot ser més ràpida i sobretot més precisa.

1.1. REPERCUSSIÓ MUNDIAL DE LES MALALTIES TRANSMESSES PELS ALIMENTS.

Des del punt de vista del consumidor cada vegada és més important tenir una garantia total de la seguretat i la qualitat dels aliments. En l'àmbit industrial, la comercialització d'aliments segurs passa per a identificar, el més ràpid possible, els problemes de contaminació (Rodríguez, J.J. 2007).

En l'àmbit internacional, s'entén que "el criteri microbiològic" per un aliment defineix "l'acceptabilitat d'un producte o un lot d'un aliment basat en l'absència o presència, o en la quantitat d'un microorganisme, inclòs els paràsits i/o en la quantitat de les seves toxines/metabolits, per unitat o unitats de massa, volum, superfície o lot" (Anònim. 1997c).

Tipus de criteris microbiològics.

a) Normes microbiològiques ("Microbiological standards").

Són criteris microbiològics d'acompliment obligatori ja que estan inclosos en la legislació alimentària. Només els productes alimentaris que compleixin aquests criteris microbiològics es consideren adequats pel consum humà. La llista de microorganismes d'anàlisis obligatòries és cada vegada més gran.

b) Directrius microbiològiques ("Microbiological guidelines").

Són criteris de caràcter voluntari que informen de l'acompliment o no de les bones pràctiques higièniques durant l'elaboració del producte alimentari. És convenient assenyalar que, si bé en algun cas s'incorporen a la legislació alimentària, el seu incompliment no condiciona la comercialització del producte.

c) **Especificacions microbiològiques (“Microbiological specifications”).**

Són criteris de l'àmbit privat que s'inclouen en els contractes de compra-venda de productes alimentaris o dels seus ingredients i la seva obligatorietat o voluntarietat dependrà de les condicions acordades entre venedor i comprador. La llista de microorganismes d'anàlisis obligatòries és cada vegada més gran. En l'actualitat, els estàndars acceptats per a la detecció de microorganismes es basen en el seu cultiu a partir de l'aliment fins arribar al seu aïllament i identificació en medis selectius. És un procés senzill, però que requereix molt de temps. Les anàlisis microbiològiques tradicionals es complementen amb diverses tecnologies ràpides de biologia molecular com la Reacció en Cadena de la Polimerasa (PCR), que permet amplificar fragments específics d'àcid desoxirribonucleic (DNA) dels microorganismes (Rodríguez, J.J. 2007).

1.2. MARC LEGAL EN ALIMENTACIÓ INFANTIL.

1.2.1. Fórmules Infantils.

Legislació espanyola.

Anònim 1.998b, pel qual s'aprova la Reglamentació Tècnic-Sanitària específica dels preparats per a lactants i preparats de continuació (B.O.E. 04.02.1998).

La finalitat d'aquesta Reglamentació és definir el que s'entén per preparats per a lactants i preparats de continuació destinats a nens sans i establir els requisits de composició, etiquetatge, publicitat i informació dels mateixos.

S'entén per:

1. **Lactants:** Els nens que tinguin menys de 12 mesos.
2. **Nens de curta edat:** Els nens entre 1-3 anys d'edat.

3. **Preparats per a lactants:** Són els productes alimentaris destinats a l'alimentació especial dels lactants des del naixement fins els primers 4-6 mesos de vida, i que han de satisfer per sí mateixos les necessitats nutritives d'aquesta categoria de persones.
4. **Preparats de continuació:** Són els productes alimentaris destinats a l'alimentació especial dels lactants de més de 4 mesos d'edat, que constitueix el principal element líquid d'una dieta progressivament diversificada d'aquesta categoria de persones.

Reglament europeu nº 2073/2005 (Anònim. 2005b).

En els capítols 1 i 2 de l'annex I d'aquest Reglament s'estableixen els criteris de seguretat alimentària i d'higiene dels processos relatius als preparats deshidratats per a lactants i els aliments dietètics deshidratats destinats a usos mèdics especials per a lactants menors de 6 mesos. En el punt 2.2 del capítol 2 s'estableix que si en analitzar els preparats deshidratats per a lactants i aliments dietètics deshidratats es detecten Enterobacteris en qualsevol mostra, el lot s'haurà analitzar per a detectar el *Cronobacter sakazakii* i la *Salmonella*.

El 24 de gener de 2007, la Comissió tècnica de perills biològics (Comissió Biohaz) de l'Autoritat Europea de Seguretat Alimentària (EFSA) va emetre un dictamen sobre els Enterobacteris com a indicadors del *Cronobacter sakazakii* i la *Salmonella*.

En el seu dictamen, aquesta Comissió va arribar a la conclusió que no és possible establir una correlació entre els Enterobacteris i la *Salmonella* i de què no existeix una correlació universal entre els Enterobacteris i el *Cronobacter sakazakii*.

No obstant, en casos particulars, pot establir-se alguna correlació entre els Enterobacteris i el *Cronobacter sakazakii*.

Per aquest motiu es va decidir adaptar el Reglament (CE) nº 2073/2005, relativa a les anàlisis de preparats deshidratats per a lactants i aliments dietètics deshidratats, per a detectar sempre la *Salmonella* i el *Cronobacter sakazakii* independentment que es detectin o no Enterobacteris en qualsevol de les mostres.

Reglament europeu nº 1441/2007.

- Publicat el desembre del 2007.
- Modifica el Reglament nº 2073/2005, relatiu als criteris microbiològics aplicables als productes alimentaris.

Aquest Reglament estableix:

1. Criteris microbiològics per a determinats microorganismes i les normes d'aplicació que han d'acomplir les Empreses alimentàries a l'aplicar les mesures d'higiene generals i específiques contemplades en l'article 4 del Reglament (CE) nº 852/2004.
2. Que les Empreses alimentàries vetllaran per a què els productes alimentaris compleixin els criteris microbiològics pertinents establerts en l'annex I d'aquest Reglament.
3. Criteris de seguretat alimentària i criteris d'higiene dels processos relatius als preparats deshidratats per a lactants i els aliments dietètics deshidratats destinats a usos mèdics especials per a lactants menors de 6 mesos.
4. Si a l'analitzar els preparats deshidratats per a lactants i aliments dietètics deshidratats es detecten Enterobacteris, s'haurà d'analitzar el *Cronobacter sakazakii* i la *Salmonella*.

Aquest Reglament estableix les següents anàlisis en les Fórmules Infantils:

Taula 1. Reglament nº 1441/2007 referent als criteris microbiològics d'higiene en Fórmules Infantils.

CRITERIS D'HIGIENE								
Categoría de alimentos	Microorganismos	Plan de muestreo (1)		Límites (2)		Método analítico de referencia (3)	fase en la que se aplica el criterio	Acción en caso de resultados insatisfactorios
		n	c	m	M			
Fórmules Infantils d'inici								
2.29. Preparados deshidratados para lactantes y alimentos dietéticos deshidratados destinados a usos médicos especiales para lactantes menores de seis meses.	Intero bacteriaciones	10	0	Ausencia en 10 g		ISO 21528-1	Final del proceso de fabricación	Mejoras en la higiene de la producción para minimizar la contaminación (7)
2.211. Preparados deshidratados para lactantes y alimentos dietéticos deshidratados destinados a usos médicos especiales para lactantes menores de seis meses	Presencia Bacillus cereus	5	1	50 ufc/g	500 ufc/g	EN/ISO 7932 (18)	final del proceso de fabricación	Mejoras en la higiene de la producción. Prevención de la contaminación. Selección de las materias primas
Fórmules Infantils de continuació								
2.210. Preparados deshidratados de continuació	Intero bacteriaciones	5	0	Ausencia en 10 g		ISO 21528-1	Final del proceso de fabricación	Mejoras en la higiene de la producción para minimizar la contaminación

Taula 2. Reglament nº 1441/2007 referent als criteris microbiològics de seguretat en Fórmules Infantils.

CRITERIS DE SEGURETAT							
Categoría de alimentos	Microorganismos, sus toxinas y metabolitos	Plan de muestreo (1)		Límites (2)		Método analítico de referencia (3)	fase en la que se aplica el criterio
		n	c	m	M		
Fórmules Infantils d'inici							
1.22. Preparados deshidratados para lactantes y alimentos dietéticos deshidratados destinados a usos médicos especiales para lactantes menores de seis meses	Salmonella	30	0	Ausencia en 25 g		EN/ISO 6579	Productos comercializados durante su vida útil
1.24. Preparados deshidratados para lactantes y alimentos dietéticos deshidratados destinados a usos médicos especiales para lactantes menores de seis meses (14)	Enterobacter sakazakii	30	0	Ausencia en 10 g		ISO/TS 22964	Productos comercializados durante su vida útil
Fórmules Infantils de continuació							
1.23. Preparados deshidratados de continuació	Salmonella	30	0	Ausencia en 25 g		EN/ISO 6579	Productos comercializados durante su vida útil

1.2.2. Papilles.

Legislació espanyola.

Anònim. 1998a, pel que s'aprova la Reglamentació Tècnic-Sanitària específica dels Aliments Elaborats a Base de Cereals i Aliments Infantils per a Lactants i Nens de Curta Edat (B.O.E. 07.04.1998).

En el present Reial Decret s'estableixen els requisits de composició i etiquetatge que han d'acomplir els aliments elaborats a base de Cereals i els aliments infantils per a lactants i nens de curta edat.

Els aliments a base de cereals i aliments infantils per a lactants i nens de curta edat són aquells productes alimentaris destinats a una alimentació especial, que satisfan les necessitats específiques dels lactants i nens de curta edat amb bon estat de salut, destinats als lactants durant el període de deslletament i als nens de curta edat, com a complement de la seva dieta i/o per a la seva progressiva adaptació als aliments normals.

Aquests productes alimentaris són:

1. Aliments elaborats a base de Cereals, que es divideixen en les 4 categories següents:
 - a. Cereals simples reconstituïts o que han de reconstituir-se amb llet o un altre líquid alimentari adequat.
 - b. Cereals amb addició d'un altre aliment ric en proteïnes reconstituït o que han de reconstituir-se amb aigua o un altre líquid que no contingui proteïnes.
 - c. Pastes que s'han de coure amb aigua bullint o en d'altres líquids apropiats abans del seu consum.
 - d. Pa de pessic i galetes que poden consumir-se directament o amb l'addició d'aigua, llet o un altre líquid adequat.

2. Aliments infantils diferents dels aliments elaborats a base de Cereals (indicats al punt 1.).

1.3. LA LACTÀNCIA ARTIFICIAL: FÓRMULES INFANTILS.

Com a recomanació pública global, els nens haurien de ser alimentats exclusivament per llet materna fins als 6 mesos de vida fins a assolir un creixement òptim i el desenvolupament i nivell de salut adequats (Anònim. 1997a).

Posteriorment, per a cobrir els requeriments nutricionals, els nens haurien de rebre aliments nutricionals i innocus complementaris adequats mentre continuen amb la llet materna fins almenys els 2 anys d'edat o més (Agget, P.J. 2001).

L'alimentació durant els primers anys de vida és fonamental. A més de proporcionar els nutrients necessaris pel correcte creixement i desenvolupament durant aquesta etapa, en la que a més es consolidaran els costums alimentaris, els aliments poden aportar altres substàncies no tan recomanables, amb un possible efecte negatiu en la seva salut (Anònim. 2002c).

La promoció i protecció de la llet materna és un indicador de qualitat en l'atenció sanitària dels fills; així com també ho és la cura en l'ús dels substituïts de la llet materna. La lactància materna és el mètode més segur d'alimentar un lactant (Anònim. 1981).

A Espanya, les xifres de lactància materna en el moment d'alta de maternitat són al voltant d'un 80%. Segons l'Enquesta Nacional de Salut del 2001, el 60,5% de les mares, a les 6 setmanes, continuen donant el pit als seus fills, xifra que s'ha mantingut gairebé constant en la darrera dècada; als 3 mesos,

ho fan el 42,4%; i als 6 mesos, només el 23,6%. Per tant, un percentatge important de lactants rep com a única o principal font d'alimentació una Fórmula Infantil (Anònim. 2004a).

Els nens que no siguin alimentats amb llet materna i no tinguin accés a bancs de llet materna hauran de rebre un aliment substituït adequat; per exemple, una Fórmula Infantil produïda i preparada d'acord amb els estàndars aplicables (Anònim. 2005a).

Les Fórmules Infantils són el substituït de la llet materna en l'alimentació del lactant la qual representa el millor aliment pel nadó degut al seu equilibri perfecte i adequada biodisponibilitat dels nutrients (García-Onieva, M. 2003).

Cada vegada és més freqüent que els nadons s'alimentin durant els seus primers mesos de vida amb Fórmules Infantils (Hamlym, B. 2002). La comoditat d'aquests productes, no obstant, no ha d'estar renyida amb la preocupació de proporcionar-li aliments de qualitat que, a més d'alimentar-los d'acord a les seves necessitats, garanteixen la innocuïtat del seu consum. Malgrat els avenços realitzats sobre l'adequació i la seguretat de les Fórmules Infantils, queden molts aspectes per resoldre (Pelayo, M. 2007).

S'ha d'estimular a la indústria per que continui investigant en el desenvolupament de fórmules la composició qualitativa i quantitativa de les quals s'aproximi el màxim possible a la llet humana, ja que suposaria una millora significativa en l'alimentació dels lactants (Rodríguez, J.J. 2003).

Actualment, la indústria alimentària fabrica Fórmules Infantils que aconsegueixen un millor creixement i desenvolupament del nadó, la prevenció de deficiències nutricionals subclíniques i un millor desenvolupament de les funcions immunològiques (García-Onieva, M., 2003).

1.3.1. L'alimentació durant el primer any de vida.

En les indicacions alimentàries durant el primer any s'han de considerar no només els requeriments nutritius d'aquesta edat sinó també les característiques de maduració i desenvolupament dels sistemes neuromuscular, gastrointestinal, renal i immunològic, de manera que s'estableixi una transició gradual des de l'alimentació al pit matern fins la dieta mixta habitual del nen gran i de l'adult (Agostoni, C. 2004). S'ha de tenir present que, encara que es tracti d'un noutat amb un pes, mida i nivell psíquic adequat, l'organisme presenta limitacions ja que no està completament desenvolupat (Virgilio, R. 1974). A més, s'uneix el fet que, com a conseqüència del ritme accelerat de creixement, les necessitats nutritives en aquesta etapa són molt altes. Les limitacions que presenta l'organisme sa, però en fase de desenvolupament son les següents (Anònim. 2007e):

a) El sistema digestiu.

El noutat té ronyons immadurs que incrementen la seva grandària i funcionalitat en les primeres setmanes de vida. Aquests òrgans dupliquen el seu pes cap als 6 mesos i el tripliquen cap a l'any d'edat.

La funció renal és òptima quan l'alimentació aporta suficient quantitat d'aigua i una baixa càrrega renal de soluts (substàncies dissoltes en líquid: sals minerals, glucosa...), com és el cas de la llet materna. No obstant, la ingesta de llet de vaca o de Fórmula Infantil incorrectament preparades en els primers mesos de vida, així com de vòmits i/o diarrees persistents, alteren la funció renal.

La capacitat gàstrica del lactant augmenta de 10 a 20 mil.lilitres en el naixement fins a 200 en el primer any, el que li permet consumir menjars més abundants i menys freqüents. La velocitat de buidat és relativament lenta, depenent del volum i la composició del menjar.

El pàncrees no secreta o secreta baixos nivells de determinats enzims necessaris per a realitzar el procés digestiu. El fetge està finalitzant la maduració de moltes funcions, com la capacitat de formar glucosa, de sintetitzar àcids biliars (necessaris per a la digestió dels greixos), etc.

La digestió d'hidrats de carboni té lloc principalment a l'intestí prim. El nou-nat té enzims que li permeten digerir adequadament sucres senzills com la lactosa (sucre de la llet), sacarosa (sucre comú) i alguns oligosacàrids; no obstant té baixos nivells de l'enzim amilasa salival i només un 10% de l'activitat d'amilasa pancreàtica, el que limita la capacitat per a digerir hidrats de carboni complexos abans dels 3-4 mesos d'edat.

La digestió i absorció de proteïnes funcionen eficientment en nou-nats i en prematurs, no obstant, ha d'évitar-se una ingesta excessiva perquè això implica un sobre-esforç renal de conseqüències negatives. La capacitat per a absorbir proteïnes en els primers mesos permet el pas d'immunoglobulines (anticossos que passen de la mare al nadó) de la llet materna, però si s'incorporen proteïnes estranyes (llet de vaca, pa...) amb capacitat antigènica s'augmenta el risc de desenvolupament d'al·lèrgies alimentàries.

La digestió i absorció de greixos és deficient en el nou-nat i en el prematur degut a que l'activitat de determinats enzims pancreàtics i la quantitat de sals biliars són insuficients. Aquesta baixa activitat es compensa especialment per una lipasa específica continguda en la llet materna que s'activa a l'arribar al duodè (porció de l'intestí prim proper a l'estómac), la qual cosa no té lloc quan la llet materna es canvia per una Fórmula Infantil.

b) El sistema nerviós.

Després del naixement es continua desenvolupant. Durant els primers 4 mesos, el cervell augmenta el seu volum a raó de 2 grams al dia.

c) El sistema immunitari.

El nadó no produeix per sí mateix anticossos que li protegeixin enfront a infeccions i contaminacions fins la quarta o sisena setmana de vida. Per això és tan important la llet materna, que li transfereix immunoglobulines a diferència de les Fórmules Adaptades (Anònim. 2007e).

1.3.2. Tipus de Fórmules Infantils.

Les Fórmules Adaptades, dissenyades per a alimentar al lactant amb biberons substituint totalment o parcial a la llet materna, es fabriquen a partir de la llet de vaca i estan concebudes per a nadons sans (amb un pes al néixer superior als 2.500 grams) (Aggett, P.J. 2001). A Europa, les recomanacions sobre la composició de les Fórmules Adaptades estan regulades pel Comitè de Nutrició de la Societat Europea de Gastroenterologia i Nutrició Pediàtrica (ESPGAN) així com també pel Comitè Científic per a l'Alimentació (CCA) de la Unió Europea (UE) (García-Onieva, M. 2003).

a) Llets d'inici.

Són les llets destinades a lactants de 0 a 4-6 mesos en els que la llet ha de cobrir totes les necessitats nutritives pel correcte desenvolupament i representa l'única font d'alimentació del nadó.

La llet de vaca de classe "A" que s'utilitza per a la seva elaboració passa per una sèrie de modificacions per adequar-la al nadó.

Taula 3. Característiques tècniques de la llet de classe "A".

Recompte total:	Màxim 100.000 ufc/ml.	Lactosa:	Mínim 4,5%.
Cèl.lules somàtiques:	Màxim 400.000 ufc/ml.	Extracte sec magre:	Mínim 8,2%.
Matèria greixosa:	Mínim 3,2%.	Estabilitat:	Estable alcohol 75° i a 1 ml fosfat 6,82%.
Proteïnes:	Mínim 2,9%.	Acidesa:	Màxim 16° Dornic.

Els principals canvis es basen en:

- Modificar la concentració de proteïnes per adaptar la relació caseïna-sèrum 80:20 de la llet de vaca a la relació 40:60 de la llet materna i per aconseguir-ho s'ha de disminuir la caseïna i augmentar les proteïnes del sèrum.
- Substituir part del greix làctic per greix vegetal.
- Addicionar lactosa, vitamines i sals minerals.

Els fabricants poden enriquir-les amb altres nutrients com nucleòtids, taurina, carnitina, inositol, etc. Les principals propietats dels factors afegits són:

- Nucleòtids: Milloren la resposta immune i el desenvolupament intestinal.
- Carnitina: Col.labora en el correcte desenvolupament cerebral, en la maduració del sistema nerviós central i en la composició de les membranes cel.lulars.
- Taurina: Col.labora en el desenvolupament de la funció visual i en la maduració del sistema nerviós central.
- Àcid araquidònic i DHA (Docosa-hexaenoico): Interven en el desenvolupament de les membranes cerebrals i la millora cognitiva. A més el DHA té una acció important sobre el desenvolupament de la retina.

La dosificació d'aquests elements està tipificada i estandaritzada en totes les marques comercials, però s'ha de tenir en compte que no tots els nadons tenen les mateixes necessitats En l'etiquetatge és obligatori que estigui indicat si el

producte està enriquit amb ferro, a més de la informació nutricional i les instruccions d'ús de la preparació. Normalment, aquestes llets es presenten en pols. És molt important reconstituir les llets segons les indicacions dels envasos i sempre utilitzar les mesures rasses per evitar situacions de deshidratació o sobrealimentació (Ballabriga, A. 2001). Existeixen d'altres presentacions en forma líquida i preparada pel seu ús. Tenen l'avantatge de mantenir sempre una concentració correcta i la comoditat alhora de preparar el biberó. Aquestes llets s'obtenen directament a partir de la llet de vaca modificada (Barreda, P. 2008).

a.1.) Característiques de les Llets d'Inici.

Taula 4. Característiques nutricionals de les Llets d'Inici (Anònim. 2006b).

Energia:	60-70 kcal/100 ml
Proteïnes:	1,8-3 g/100 kcal

Taula 5. Característiques nutricionals de les Llets d'Inici (II) (Anònim. 2006b).

Components	Característiques
Aminoàcids lliures:	Les Fórmules Infantils contenen alguns aminoàcids lliures, però en menor proporció que en la llet humana.
	La taurina, en concret, ha de ser afegida a les Fórmules d'inici, per existir, en el nounat, un dèficit transitori. En cas d'afegir-se, el contingut serà equivalent a 1,2 mg/100 Kcal.
Hidrats de carboni:	9-14 gr/100 kcal.
Greixos:	Han de proporcionar el 50% de l'energia.
Ferro:	0,3-1,3 mg/100 kcal.
Calci:	50-140 mg/100 kcal.
Fòsfor:	25-90 mg/100 kcal.
Sodi:	20-60 mg/100 kcal.

Les proteïnes de Fórmules Infantils han de tenir un valor biològic no inferior al 85% del valor de la caseïna. La llet de vaca conté un clar predomini de caseïna sobre les proteïnes del sèrum, en una proporció de 80-20.

En les Fórmules Infantils, aquesta relació ha de ser modificada perquè s'assembli a la llet humana madura (Anònim. 2007b).

b) Llets de continuació.

Són les preparacions destinades als lactants a partir del 4-6 mesos fins els 1-3 anys d'edat. Formen part d'una alimentació mixta en la que els nutrients també són aportats per altres aliments que s'introdueixen en la dieta progressivament (fruites, papilles sense gluten, verdures, etc.). Encara que l'alimentació sigui mixta, s'ha de mantenir la ingesta de 500 ml de llet al dia.

En l'etiquetat és obligatori indicar que el producte és adequat únicament per nens majors de 4 mesos i que ha de formar part d'una dieta diversificada, a més de la informació nutricional i les normes per a una correcta preparació (Barreda, P. 2008).

La Fórmula 2 difereix de la Fórmula 1 i de la llet de vaca, fonamentalment, en el seu contingut en proteïnes i ferro i eventualment en greixos, carbohidrats, minerals i vitamines.

Taula 6. Característiques nutricionals de les Llets de Continuació (Anònim. 2006b).

Energia:	60-70 kcal/100 ml
Proteïnes:	1,8-3,5 g/100 kcal

Les proteïnes de la Fórmula 2 han de tenir un valor biològic no inferior al 85% del valor de la caseïna. En aquelles circumstàncies en què l'alimentació complementària tingui un baix contingut proteic (només verdures i fruita), 500 ml d'una Fórmula (amb 3 grams de proteïnes/100 ml) aportarien almenys 15 grams de proteïnes, el que significa un nivell de seguretat pels nens en el primer i segon any.

Taula 7. Característiques nutricionals de les Llets de Continuació (II) (Anònim. 2006b).

Components	Característiques
Hidrats de carboni:	9-14 g/100 kcal. Amb la finalitat d'evitar el costum dels sabors dolços, la quantitat de sacarosa, fructosa o mel no ha de superar el 20% dels carbohidrats.
Greixos:	4-6 g/100 kcal, 2,7-4 g/100 ml.
Ferro:	0,6-2 mg/100 kcal.

En el nostre medi, l'aport de 2 grams/100 ml és molt suficient, ja que l'alimentació complementària aporta abundants proteïnes d'elevat valor biològic procedents de la carn, el peix, les papilles, etc (Anònim. 2007d).

c) **Llets especials.**

Són les preparacions específicament dissenyades per a cobrir les necessitats nutricionals dels lactants i nens amb algun tipus de trastorn fisiològic o metabòlic per absorbir, digerir o metabolitzar determinades substàncies.

Aporten al nen l'energia, vitamines i minerals suficients pel seu desenvolupament. Per a la seva elaboració, se sol partir de Fórmules Infantils convencionals, a les que es realitzen les modificacions necessàries per adaptar-les a cada cas (Barreda, P. 2008).

c.1.) Llets sense lactosa.

Són les Fórmules Infantils derivades de la llet de vaca, en les que la lactosa s'ha substituït per un altre tipus d'hidrat de carboni. Estan indicades per a lactants i nens petits en els que existeix una deficiència de l'enzim lactasa. Això pot passar per una deficiència genètica o com a conseqüència d'una diarrea crònica o aguda (gastroenteritis).

Aquestes Fórmules s'han de prendre durant un període de temps determinat fins que es recuperi l'activitat enzimàtica ja que la lactosa té un efecte beneficiós en l'absorció del calci i magnesi.

En nens de 3 a 5 anys no és necessari la utilització d'aquest tipus de llet ja que es pot substituir la llet habitual per productes làctics com els iogurts o el formatge amb menor contingut en lactosa (Barreda, P. 2008).

c.2.) Fórmules Antirregurgitants (AR).

Les Fórmules AR estan indicades en nadons en els quals és habitual el pas de l'aliment de l'estómac a la boca. A aquest fet se li anomena reflux gastroesofàgic (RGE) o regurgitació si té lloc en nadons. El RGE afecta al 50% dels nadons als 2 mesos d'edat, disminuint fins a un 1% a l'any d'edat, quan ja ha madurat el sistema digestiu.

Aquestes llets són més espesses per tal de reduir el número de refluxos. Els agents espessants utilitzats normalment són el cereal de gra d'algarrofi o el midó precuit. L'arròs s'utilitza amb menys freqüència per ser menys efectiu.

Existeixen Fórmules AR d'inici i de continuació, encara que en nens de 6 mesos la regurgitació ja no és un problema (Barreda, P. 2008).

c.3.) Fórmules de soja i arròs.

Són llets sense lactosa en les que, a més, les proteïnes són d'origen vegetal, no provenen de la llet de vaca sinó de la soja i l'arròs respectivament. Estan enriquides amb ferro, calci i zinc, metionina, L-carnitina i taurina per a completar l'aport de tots els nutrients essencials.

El seu ús està indicat en nens de famílies vegetarianes, nens amb intolerància a la lactosa i nens al·lèrgics a les proteïnes de vaca (Barreda, P. 2008).

c.4.) Fórmules de proteïnes modificades.

Es classifiquen segons el grau d'hidròlisi (Barreda, P. 2008):

a) Fórmules Hipoal·lèrgiques o Fórmules hidrolitzades (FH).

Són llets en les que les proteïnes han experimentat un alt grau d'hidròlisi. Estan indicades en casos en els que existeix una al·lèrgia a les proteïnes de la llet de vaca o en situacions de mala absorció intestinal.

b) Fórmules Hipoantigèniques.

Són llets en les que les proteïnes han sofert un menor grau d'hidròlisi. Estan indicades per a prevenir les reaccions al·lèrgiques per les proteïnes de la llet de vaca (nens amb antecedents).

Sovint es fan servir en nens que presenten diarrees prolongades, vòmits, còlics o èczemes.

c.5.) Fórmules per a prematurs i nounats de baix pes.

Els nens acabats de néixer amb baix pes i prematurs requereixen d'unes condicions nutricionals determinades ja que tenen una reserva de nutrients molt escassa i una funció digestiva i metabòlica immadura.

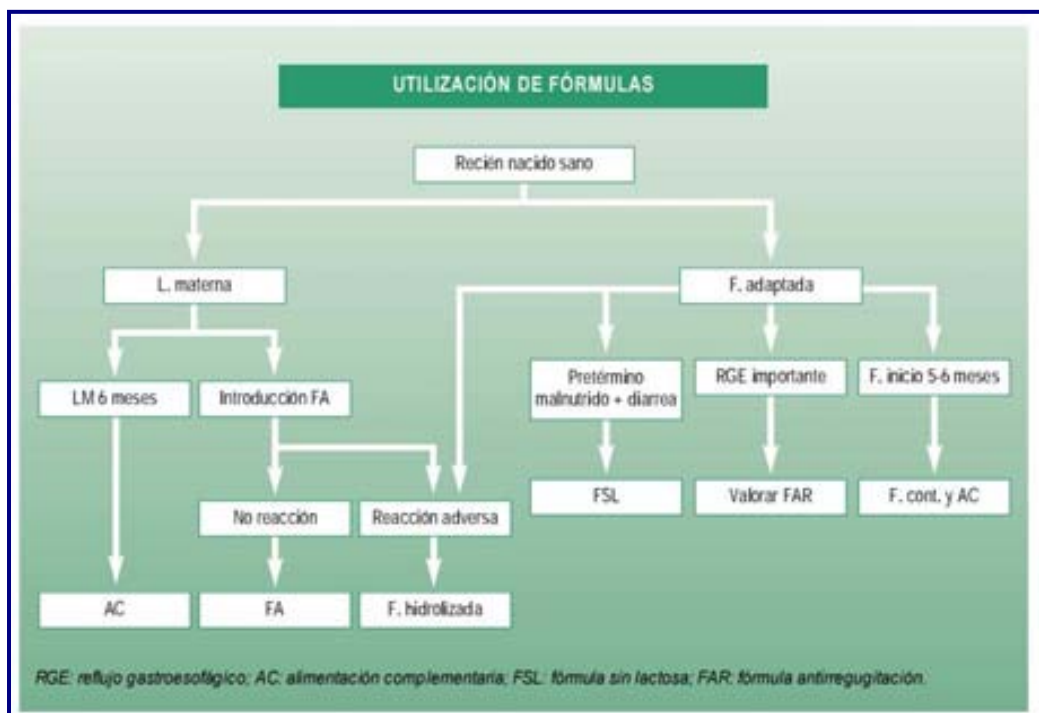
Aquestes llets han d'aportar els nutrients necessaris per a cobrir els requeriments del tercer trimestre de la gestació. Han d'aportar els elements necessaris per a continuar el correcte desenvolupament del sistema nerviós, de la funció digestiva i de la metabòlica. Contenen una barreja de greixos vegetals i làctics i estan enriquides amb ferro.

c.6.) Fórmules aptes en errors metabòlics.

Existeixen determinades malalties metabòliques, degudes al defecte de funcionament d'un enzim determinat, el tractament del qual és únicament dietètic.

Depenent de l'enzim deficitari, s'ha de suprimir en la dieta els nutrients que necessiten aquest enzim deficitari (per exemple, deficiència dels enzims que degraden les proteïnes de vaca o de la soja). Aquestes llets són específiques per cada cas particular i cada patologia i necessiten un estricte control mèdic durant la seva utilització.

Figura 1. Algorisme de l'ús de les Fórmules Infantils.



d) Fórmules 3.

Estan indicades per a ser consumides per nens preescolars i escolars. Per interessos exclusivament comercials, aquestes Fórmules es denominen genèricament “de creixement”; no obstant, no contenen cap element en la seva composició que acceleri el creixement dels nens.

La llet és un aliment nutricionalment de qualitat, que ha de formar part de la dieta de nens i adolescents, fonamentalment per ser el principal vehicle d’aport de calci (Criado, E. 2005).

No existeix cap normativa específica que reguli la composició d’aquestes Fórmules, tal i com succeeix amb les Fórmules d’inici o continuació.

Taula 8. Característiques nutricionals de les Llets 3 (Anònim. 2007d).

Components	Característiques
Proteïnes:	2,3 g/100 ml.
Carbohidrats (lactosa, mel):	8 g/100 ml (46% de les calories).
Greixos:	3,1 g/100 ml. Greix làctic vegetal. Colesterol 5 mg/100 ml.
Ferro:	1,4 mg/100 ml.
Calci:	110 mg/100 ml.
Osmolaritat:	280 mosm/l.

No existeixen raons, des del punt de vista fisiològic i de maduració d’òrgans, tal i com passa amb els lactants de 5-6 mesos, perquè un nen a partir dels 3-4 anys no prengui llet de vaca sencera (Anònim. 2007b).

1.3.3. Papilles per a Nens.

Les Papilles ajuden a diversificar la dieta del nen i poden convertir-se en gustosos plats infantils. Són rics en nutrients i aporten molta fibra, proteïnes i vitamina B.

L'edat d'introducció a la dieta sol ser entre el:

- Tercer-Quart mes per les Papilles sense gluten.
- Sisè-Setè mes per les Papilles amb gluten.

La **celiaquia** és una malaltia intestinal crònica relativament freqüent que provoca malabsorció, degut a l'alteració de la mucosa de l'intestí prim. Es caracteritza per la intolerància al gluten, que són un complex de proteïnes presents al blat, sègol, avena, civada i aliments que continguin aquests grans.

En concret és la gliadina, un dels components del gluten, la substància que resulta tòxica per a persones amb aquesta patologia. A l'introduir aliments amb gluten en la dieta s'inicia la simptomatologia típica: irritabilitat, inapetència, distensió i dolor abdominal, deposicions freqüents sovint acompanyades amb vòmits. Els símptomes intestinals i el retard en el creixement són comuns en aquells nens diagnosticats en els primers anys de vida (Anònim. 2007e).

El mercat ofereix un ampli ventall de Papilles que fa possible elaborar un menú variat (Anònim. 2008e):

a) Arròs.

És un dels primers cereals en introduir-se en la dieta del nen perquè és el més fàcil d'assimilar ja que és pobre en cel.lulosa i els seus grànuls de midó són més petits que els d'altres Papilles.

Nutritivament parlant no és dels millors, sobretot si s'utilitza arròs blanc enlloc d'integral, encara que té propietats antihipertensores i ajuda a combatre els

problemes renals. L'arròs blanc aporta vitamines del grup B, així com també fòsfor i potassi.

b) **Avena.**

Té propietats antiolesterol, regula el nivell de sucre en sang i té un efecte laxant. És remineralitzant i depuratiu i té una bona dosi de vitamina B.

c) **Civada.**

És un cereal que conté molta vitamina PP i E així com també potassi, fòsfor i magnesi.

És remineralitzant i laxant. Es pren en forma de Papilla (barrejada) amb la de blat i resulta molt digestiva pels nens.

d) **Blat de moro.**

Com no té gluten, és un dels primers cereals que es dona al nadó. Conté baixes quantitats de vitamines A, B i C. Té qualitats terapèutiques contra la tensió i el nerviosisme. És un cereal ric en carotens; per tant, és ideal per l'estiu.

e) **Mill.**

És un cereal amb un gra molt petit i està especialment indicat en nens perquè a més del seu sabor suau i neutre conté una bona dosi de fòsfor, magnesi, ferro i vitamines A i B.

f) **Blat.**

Després de l'avena, és un dels cereals més proteics. És ric en vitamines B i E. És útil per a combatre la colitis, molt necessari pel creixement del nen i ajuda a revitalitzar l'organisme.

1.4. CONTAMINACIÓ MICROBIANA EN ALIMENTS INFANTILS.

A continuació s'expliquen les principals característiques dels microorganismes més rellevants en l'àmbit de l'alimentació infantil.

1.4.1. *Salmonella*.

Els bacteris del gènere *Salmonella* són bacils gramnegatius que pertanyen a la família *Enterobacteriaceae* molts dels quals representen importants patògens humans i animals. La salmonel·losi és una malaltia zoonòtica que té una gran varietat de reservoris animals i els aliments contaminats d'origen animal representen la principal via de transmissió de *Salmonella*. Les infeccions per *Salmonella* s'estenen ràpidament pels organismes i es multipliquen en l'intestí des d'on pot infectar altres organismes (Siblei, J. *et al.*, 2003).

Són bacils, no esporulats, habitualment mòbils pels seus flagels peritrics encara que existeixen soques mutants immòbils. El serotip *Salmonella pullorum-gallinarum* és sempre immòbil (Pascual Anderson, M^a. 1992).

La salmonel·losi humana presenta una destacada prevalença tant a nivell mundial com a nivell europeu i nacional i constitueix la causa principal del grup de malalties de transmissió alimentària amb greus conseqüències econòmiques. Aquesta infecció provoca més de la meitat de les toxicoinfeccions que es registren cada any a Espanya (Anònim. 2007b).

a) Característiques bioquímiques.

Aerobis-anaerobis facultatius.

Fermenten la glucosa amb producció d'àcid i gas (excepte *Salmonella typhi*).

No fermenten la lactosa. No obstant, s'han reportat casos de *Salmonella* fermentadores de lactosa com algunes soques dels serotips de *Salmonella virchow* (Aguilar, F. 2008).

Fermenten L-arabinosa, maltosa, D-manitol, D-manosa, L-ramnosa, D-sorbitol, trehalosa, D-xilosa i D-dulcita.

Redueixen nitrats a nitrits.

Oxidasa negatiu i Catalasa positiu.

Indol i Voges-Proskauer negatiu.

Vermell de metilo i citrat de Simmons positiu.

Urea negatiu.

Produeixen SH₂.

b) Taxonomia.

El gènere *Salmonella* es divideix en dues espècies:

Taula 9. Espècies de *Salmonella*.

Espècies de <i>Salmonella</i>	
<i>Salmonella enterica</i>	
<i>Salmonella bongori</i>	

La *Salmonella enterica* es divideix en sis subespècies i moltes de les *Salmonella* pertanyen a la subespècie *Salmonella enterica* subspècie *enterica*.

<i>Salmonella enterica</i> subespècie		
<i>enterica</i>	<i>diarizonae</i>	<i>arizonae</i>
<i>salamae</i>	<i>houtenae</i>	<i>indica</i>

Les espècies de *Salmonella enterica* i *Salmonella bongori* es divideixen en més de 2.400 serovarietats, que estan definides en funció de diferents associacions de factors antigènics somàtics (O) i flagelars (H).

La majoria de les serovarietats aïllades de l'home i dels animals de sang calenta pertanyen a la subespècie *enterica* (subespècie I) i porten un nom, normalment relacionat amb el lloc geogràfic on es va aïllar per primera vegada (Anònim. 2003e).

c) Transmissió.

L'espècie *Salmonella* es troba de forma natural a l'intestí humà i dels animals; per això, les femtes són el focus de contaminació dels aliments i l'aigua. Els aliments implicats més freqüentment en aquesta infecció són els ous crus (maionesa, clara batuda, sopes amb rovell) o poc cuinats, les aus mal cuites i els aliments cuinats que s'hagin deixat sense refrigerar durant diverses hores (Anònim. 2007b).

Taula 10. Contaminació per *Salmonella* (Anònim. 2006a).

Contaminació per <i>Salmonella</i>
<ul style="list-style-type: none"> • Accedeix a àrees del procés de preparació dels aliments. • Pot multiplicar-se en l'aliment degut a què: <ul style="list-style-type: none"> - Les condicions d'emmagatzematge són inadequades. - El cuinat ha estat incorrecte. - S'ha produït algun tipus de contaminació en el moment de preparar l'aliment.
<ul style="list-style-type: none"> • Per contacte directe entre animals infectats i humans i contaminació fecal de l'ambient.

Taula 11. Característiques dels serovars de *Salmonella* (Anònim. 2006a).

Serovar	Consum d'aliments associats a patologies
<i>Salmonella enteritidis</i>	Ous i carn contaminades.
<i>Salmonella typhimurium</i>	Porc, aus i carn bovina contaminades.

Amb tot, en la Unió Europea, els serovars *Salmonella enteritidis* i *Salmonella typhimurium* són els més freqüentment associats a malalties humanes (Anònim. 2002b).

d) Epidemiologia relacionada amb alimentació infantil.

El passat mes d'agost del 2008, es van detectar 29 casos de gastroenteritis lleu, enregistrats en menors d'edat entre els mesos de febrer i juliol del 2008.

Aquest fet va implicar la retirada de cinc lots de Fórmula Infantil (d'una determinada marca comercial) el consum de la qual podria estar relacionada amb aquests casos. Les investigacions determinaren que la contaminació va ser deguda per la *Salmonella enterica* serotip *Kedougou*, detectada pel Centre Nacional d'Epidemiologia.

Entre el gener i l'abril del 2005, 104 nens (amb edats inferiors als 12 mesos) van patir una infecció de *Salmonella agona* a França. Finalment, 38 d'ells (que representa un 37%) van haver de ser hospitalitzats.

- La investigació es va adreçar a investigar els possibles vehicles d'infecció. 23 nens van prendre Fórmules Infantils d'un mateix fabricant 1 setmana abans de presentar la malaltia.
- Durant la investigació de les condicions ambientals de la zona productiva de la fàbrica, van ser aïllades 7 mostres de *Salmonella agona*.

Entre el 1985 i el 2000, es van detectar 5 brots més de salmonel·losi que van afectar aproximadament 150 nens i que van ser associats a les Fórmules Infantils (Anònim. 2005a).

e) [Mesures preventives per a evitar la contaminació.](#)

La implementació de mesures preventives en els productes deshidratats amb *Salmonella* provenen des de fa 30 ó 40 anys (Anònim. 1997b).

El control de les mesures es basen en 4 principis (Anònim. 2005a):

1. Evitar l'entrada de la *Salmonella* en el procés productiu i especialment en les zones d'assecat a l'emplenat considerades àrees d'elevada criticitat.
2. Evitar la multiplicació de la *Salmonella* en el cas de què entri.
3. Disseny higiènic de les sales de treball i equipaments que intervenen en el procés productiu.
4. Utilització d'ingredients lliures de *Salmonella*.

Punt de control 1

Prevenir l'entrada del patogen en les àrees d'elevada higiene basat en la implementació d'un disseny apropiat basat en les bones pràctiques d'higiene.

Aquesta prevenció està principalment basada en la separació de les zones més crítiques de la resta de la fàbrica.

Aquesta prevenció requereix d'una separació física (mitjançant parets) i la creació de punts d'accés molt bé controlats. A més, aquest control ha d'estar recolzat per uns procediments de treball que minimitzin l'entrada de patògens, com podria representar el canvi de roba per part del personal a l'entrada a les sales més crítiques.

Aquesta separació de sales es pot veure complementada per una sèrie de mesures addicionals com:

- Utilització d'aire filtrat extern.
- La creació de sobrepressió ja que l'elevada pressió d'aire comporta que el moviment de l'aire sigui cap a fora de les sales d'elevada higiene (Anònim. 2005a).

Punt de control 2

Evitar la multiplicació de la *Salmonella* és possible reduint la disponibilitat d'aigua, especialment durant els procediments de neteja humida, en les sales d'elevada criticitat.

La presència d'aigua, en aquests casos, representa un increment considerable de la *Salmonella* en l'ambient de les sales productives i per tant significa un risc molt important de recontaminació del producte (Anònim. 2005a).

Punt de control 3

Un altre element important és el disseny higiènic de les àrees de procés (parets, finestres, etc.) i dels equipaments, permetent un manteniment amb un elevat estat d'higiene.

Aquests elements són un punt clau en la ràpida erradicació i prevenció dels patògens (Anònim. 2005a).

Punt de control 4

L'efectivitat de les mesures preventives es poden verificar a través de la implementació d'un programa de mostreig d'ambient i superfícies en contacte amb el producte (Anònim. 2002a).

Aquests programes estan destinats a erradicar la *Salmonella* i estan recolzats per programes per a detectar les *Enterobacteriaceae* que són uns excel.lents indicadors, que proporcionen una informació molt valuosa i permeten una ràpida correcció de situacions en què hi ha un lleuger increment dels seus nivells i que podrien donar lloc a problemes amb *Salmonella*. Cal destacar que nivells baixos d'*Enterobacteriaceae* no són garantia de l'absència de *Salmonella* i per aquesta raó els programes de recerca d'*Enterobacteriaceae* i *Salmonella* cal que hi vagin en paral.lel (Anònim. 2005a).

Aquests programes, si estan correctament dissenyats, permetran la detecció de la presència de *Salmonella* en les àrees més crítiques, i si es detecta en etapes inicials, permetrà l'aplicació ràpida de mesures correctives per a eliminar els patògens. Aquests programes han d'estar complementats amb un correcte anàlisi del producte acabat segons les normatives vigents. L'experiència pràctica demostra que és possible controlar la *Samonella* en els processos ambientals. Sota aquestes condicions, el risc de recontaminació és extremadament baix i és possible manipular els productes en unes condicions

microbiològiques molt controlades i acomplir requisits com absència de 60 mostres *Samonella* en 25 grams tal i com recomana el Codex Alimentarius. Ha estat demostrat que les identificacions de patògens de forma inicial permeten reduir significativament els brots (Anònim. 2005a).

f) **Simptomatologia.**

La salmonel·losi humana normalment es caracteritza per la presència de febre, dolor abdominal, nàusees i sovint van acompanyats de vòmits. Aquests símptomes, en algunes ocasions, són auto-limitants en els darrers dies de la infecció (Anònim. 2006a).

No obstant, aquests símptomes es poden manifestar des de 8 fins a 36 hores. L'hospitalització es recomana si persisteix la febre elevada o la diarrea, ja que aquesta malaltia produeix elevada deshidratació, causada per l'elevada pèrdua de líquids (Anònim. 2007e).

En aquests casos, així com també quan la *Salmonella* provoca septicèmia, és imprescindible l'administració d'antimicrobians. La salmonel·losi també està associada amb seqüeles cròniques i de llarg termini, com per exemple l'artritis (Anònim. 2006a).

1.4.2. *Listeria monocytogenes.*

Gènere bacterià que pertany al "Grup de bacils no esporulats grampositius" juntament amb altres gèneres com (Mandel, G. L *et al.*, 1995):

- | | |
|--------------------------|--------------------------|
| 1. <i>Listeria.</i> | 4. <i>Renibacterium.</i> |
| 2. <i>Lactobacillus.</i> | 5. <i>Kurthia.</i> |
| 3. <i>Brochothrix.</i> | 6. <i>Cariophanon.</i> |

El gènere *Listeria* inclou 6 espècies.

Taula 12. Espècies de *Listeria*.

Espècies de <i>Listeria</i>	
<i>Listeria monocytogenes</i>	<i>Listeria ivanovii</i>
<i>Listeria grayi</i>	<i>Listeria seligeri</i>
<i>Listeria innocua</i>	<i>Listeria welshimeri</i>

Només l'espècie *Listeria monocytogenes* causa malaltia en humans. Ha estat reconeguda com a patògen d'origen alimentari des de 1.980 (Scheu, P. *et al.*, 1999).

a) Característiques bioquímiques.

Bacil curt grampositiu amb els extrems arrodonits.

Es presenta aïllat, en parelles, cadenes curtes o agrupat en forma de "V".

Catalasa positiu.

No esporulat, mòbil i anaerobi facultatiu.

La mobilitat és deguda als seus flagels peritrics (mitjançant un llançament ràpid combinat amb salts i rotació) i es manifesta millor a 20-25°C.

Medeix entre 0,5-2 µm de llarg per 0,2-0,5 µm de gruix. Sovint pot adoptar forma de coc-bacil.

No esporulat, mòbil per flagels peritrics i anaerobi facultatiu.

Creix bé a temperatures de refrigeració (30-37°C) i a valors de pH entre 5-9 (el seu pH òptim és de 7,5).

És un bacteri psicotròfic, encara que a 4-5°C el seu creixement és més lent.

Perquè es destrueixi són necessaris 70°C aplicats durant 2-3 minuts sempre que temperatura/temps arribi fins el centre del producte (Hudson, J.A. 1993a).

Fermenta, sense producció de gas, la glucosa, esculina, maltosa i ramnosa.

Produeix hemolisina beta (característica relacionada amb la seva patogenicitat).

b) Transmissió.

La infecció té lloc pel consum d'aliments contaminats, productes làctics, carns i vegetals (Scheu, P. *et al.* 1999).

Des de fa poc, *Listeria monocytogenes* no apareixia en persones pels sistemes de producció i conservació dels aliments. Quan en els aliments hi ha una càrrega elevada de microorganismes alterants, com *Lactobacillus* o *Pseudomonas*, aquests competeixen per l'espai i els nutrients dels aliments, amb la qual cosa *Listeria* difícilment podrà desenvolupar-se fins a uns nivells elevats (Hudson, J.A. 1993b)

Per una altra banda, aquest microorganisme posseeix una temperatura òptima de creixement entre 30-35°C; però es podria multiplicar a temperatures de refrigeració. En aquest últim cas, necessita d'altres condicions. Per exemple, pot multiplicar-se a temperatures de 4°C (un frigorífic domèstic a l'estiu està a una temperatura de 8°C o més), però només si l'aliment no és àcid, ja que quan el pH és inferior a 4,5 (iogurts, formatges i molts embotits) el bacteri no pot multiplicar-se a aquestes baixes temperatures.

En aliments àcids i mantinguts en refrigeració, encara que a elevada temperatura (8°C) són necessaris 15 dies per assolir nivells de risc; pel contrari, si es trenca la cadena de fred i no es refrigeren, en 5 dies ja s'arribarien a nivells de risc.

Si l'acidesa del producte és menor (pH=6) a 15°C s'assoleixen nivells de risc en 14 hores, a 8°C en 40 hores i a 4°C en més de 3 dies.

La relació dels diferents elements conservants d'un aliment és bàsica per a prevenir el desenvolupament d'aquest microorganisme. D'entre tots ells, només la temperatura pot ser controlada pel consumidor, encara que es pugui llegir que *Listeria monocytogenes* es pot multiplicar en refrigeració, la relació d'acidesa, sal, temperatura i microorganismes alterants competidors fa que

mantenint les condicions de refrigeració estrictes disminueixi significativament el risc (Rodríguez, J.J. 2007).

c) **Epidemiologia relacionada amb alimentació infantil.**

Listeria monocytogenes ha estat considerada normalment com un patogen oportunista que apareix normalment en dones embarassades, nens, nounats o de forma ocasional en aquelles persones que es troben en alguna situació de risc; és a dir, que pateixen alguna malaltia de disminueix la resposta immune. El grup de major risc, a Espanya, és el de la gent gran (Rodríguez, J.J. 2007).

En dones embarassades provoca malalties amb una simptomatologia semblant a una grip, febre, dolor muscular, mal de cap o sense símptomes. A més pot ser la causant d'avortaments espontanis, pèrdua durant el naixement, septicèmia i meningitis. El 2003, la taxa d'incidència va ser de 0,33 casos/100.000 habitants i l'objectiu pel 2.010 és de 0,25 casos/100.000 habitants (Anònim. 2004b).

d) **Mesures preventives per a evitar la contaminació.**

A l'igual que d'altres microorganismes, *Listeria monocytogenes* és un microorganisme amb capacitat per a formar biofilms (Herald, P.J. 1988). Aquest microorganisme produeix unes substàncies que s'adhereixen a la superfície, especialment si és d'acer inoxidable. Cal destacar que tant a la indústria alimentària com a nivell domèstic l'acer inoxidable és molt utilitzat i s'ha generalitzat el seu ús. Quan la *Listeria* sp. arriba a adherir-se a les superfícies es converteix en focus potencial de disseminació, essent llavors difícil la seva eliminació (Carpentier, B. 1993).

L'únic sistema de prevenció és una adequada neteja, que fa que s'eliminin els residus orgànics que aporten nutrients al microorganisme, i la desinfecció, la

qual cosa contribueix a destruir-los. Per a garantir l'eliminació seria necessari avaluar prèviament l'eficàcia dels diferents desinfectants amb la finalitat última d'assegurar l'eliminació (Rodríguez, J.J. 2007).

En un estudi realitzat s'ha apreciat que en l'àmbit industrial primer es produeix una contaminació de les superfícies d'acer inoxidable, especialment de les màquines de picat o de tall. Quan es contaminen aquestes àrees, el microorganisme passa a totes les unitats del producte que utilitzen aquestes superfícies. Posteriorment, com es mantindran en càmeres de refrigeració, es produeix una contaminació de les mateixes, quedant el microorganisme adherit en el terra i les parets de la càmera; indicant que el nivell de contaminació és elevat.

Per a l'eliminació, s'ha de garantir l'absència del microorganisme en les superfícies durant un període de temps llarg (LeChevalier, M.W. 1998).

Per altra banda, assegurar la inexistència del microorganisme en els aliments és gairebé impossible, ja que el microorganisme es manté actiu en superfícies durant llargs períodes de temps (Gill, C.O. 1989).

Per a reduir el risc és important prevenir l'adhesió a les superfícies (neteja i desinfecció freqüent i eficaç) i refrigerar sempre els aliments per evitar la seva proliferació (Rodríguez, J.J. 2007).

e) **Simptomatologia.**

Inclou meningoencefalitis, septicèmia i elevada probabilitat d'avortament en dones embarassades.

És una opinió generalitzada que la *Listeria* sp. no és excessivament patògena, que malgrat ser present en l'aliment és un microorganisme que no provoca quadres clínics massa greus. No obstant, hi ha treballs en la bibliografia que

assenyalen que el nombre d'afectats no és despreciable i que a més és responsable d'una elevada mortalitat (Rodríguez, J.J. 2007).

1.4.3. *Staphylococcus aureus*.

És una espècie bacteriana que pertany a la família *Micrococcaceae*.

El gènere *Staphylococcus aureus* està ubicat juntament amb els gèneres: *Micrococcus*, *Planococcus* i *Stomatococcus*.

Integrada per formes cocàcees de 0,8-1 µm de diàmetre, que es divideixen en més d'un pla per la qual cosa s'agrupen de forma irregular en penjoll.

Són grampositius i immòbils.

Aerobi i anaerobi facultatiu.

Es troba a la pell i fosses nasals de les persones sanes.

És capaç de créixer en presència d'un 10% de sal comú.

Realitza la fermentació làctica.

Catalasa i coagulasa positiu

És una espècie molt sensible a la calor i als desinfectants. En general, la presència d'un número elevat d'*Staphylococcus aureus* en un aliment reflexa higiene defectuosa per la mala manipulació.

Pot ocórrer que no es detecti *Staphylococcus aureus* en un aliment, que el número detectat sigui petit i que, no obstant, existeixi una quantitat detectable suficient d'enterotoxina estafilocòcica. En aquest cas, els bacteris que van originar la toxina han anat disminuint en número i fins i tot han desaparegut, mentre que la toxina per la seva major resistència roman a l'aliment.

La gran majoria de les soques produeixen un grup d'enzims i citotoxines que inclouen 4 hemolisines (alfa, beta, gamma i delta), nucleases, proteases, lipases, hialuronidases i col.lagenases. La principal funció d'aquestes proteïnes és convertir els teixits de l'hoste en nutrients requerits pel desenvolupament bacterià (Pascual Anderson, M^a. 1992).

a) Transmissió.

Es troba de forma natural en la nostra pell, nas, boca i mans i són un focus d'infecció especialment important en els talls, ferides infectades i infeccions bucal. Creixen ràpidament en aliments humits i rics en proteïnes no adequadament refrigerats.

S'ha detectat la presència d'*Staphylococcus aureus* en aliments que van provocar intoxicació i gastroenteritis infantil en nens per contenir alguna de les seves enterotoxines. Aquests episodis de diarrees representen una greu amenaça pel desenvolupament del nen ja que poden provocar profundes alteracions de l'equilibri àcid-base i de recuperació llarga (Virgilio R. *et al.* 1974). Al voltant del 75% dels brots d'intoxicació per *Staphylococcus aureus* es presenten com a conseqüència d'una dolenta refrigeració (Anònim. 2007e).

La causa principal d'aquesta forma de toxicoinfecció alimentària són els aliments cuinats, manipulats per portadors d'*Staphylococcus aureus* (entre el 30 i el 40% de les persones sanes són portadores). Són poc probables els brots d'intoxicació estafilocòcica deguts a la llet crua o a la pasteuritzada, però la llet i els productes lactis crus, com crema i formatge, han causat brots en molts països (en aquests casos solen ser una excepció ja que el microorganisme ha pogut procedir de vaques malaltes per mastitis) (Pascual Anderson, M^a. 1992).

b) Epidemiologia relacionada amb alimentació infantil.

La quantitat necessària suficient de toxina perquè s'origini la malaltia ha de ser al voltant de 10^6 ufc/g. Perquè es produeixi un brot és necessària la contaminació, però per sí mateix no és suficient ja que s'han de donar les condicions de temps i temperatura que permetin que el bacteri es multipliqui.

Taula 13. Factors que intervenen en l'intoxicació per *Staphylococcus aureus*.

Intoxicació per <i>Staphylococcus aureus</i>
1. En l'entorn de la producció, processat o preparació de l'aliment ha d'haver una font productora d'una soca toxicogènica d' <i>Staphylococcus aureus</i> .
2. El microorganisme ha de transferir-se des d'aquesta font a l'aliment.
3. L'aliment ha de contaminar-se amb una elevada quantitat d' <i>Staphylococcus aureus</i> per gram.
4. El microorganisme ha de sobreviure en l'aliment; no sobrepassar-se en el seu creixement, ni inhibir pels microorganismes competitiu, ni ha de destruir-se pel calor, pH baix, ni cap altra condició adversa, abans de què pugui produir-se l'enterotoxina.
5. Una vegada que l'aliment ha estat contaminat, ha de permetre el desenvolupament d' <i>Staphylococcus aureus</i> .
6. L'aliment contaminat ha de romandre en el rang de temperatures que afavoreixin el creixement d' <i>Staphylococcus aureus</i> un temps suficient perquè aquest microorganisme es multipliqui i origini una enterotoxina.
7. Ha d'ingerir-se una quantitat suficient d'aliment (que porta l'enterotoxina) per a superar el llindar de sensibilitat a l'enterotoxina de les persones que prenen aquest aliment.

c) **Mesures preventives per a evitar la contaminació.**

El bacteri es destrueix fàcilment amb la calor, encara que les seves toxines resisteixen a temperatures fins a 100°C (excepte si es manté a aquesta temperatura durant 30 minuts). Per a prevenir aquesta intoxicació, és fonamental mantenir una bona higiene personal, protegint bé les ferides.

La intoxicació d'origen alimentari més freqüent la produeix la ingesta de la toxina, que apareix pel creixement, en els aliments, de determinades soques d'*Staphylococcus aureus* (Dinges, M. 2000). Es tracta d'una enterotoxina que provoca gastroenteritis al poc temps de ser consumida (de 2-4 hores) amb vòmits, diarrea i inflamació de la mucosa gàstrica i intestinal. Malgrat la seva àmplia distribució i la facilitat amb la qual arriben als aliments, els seus efectes són aguts, però desapareixen ràpidament (Murray, P.R. 1995).

Taula 14. Mesures de control d'*Staphylococcus aureus* (Anònim. 2008a).

Intoxicació per <i>Staphylococcus aureus</i>	
1.	Manipular el menys possible els aliments cuinats. S'ha de tenir especial cura amb els aliments cuinats calents ja que preferentment s'hauran de refredar a 18°C quan s'hagin de manipular posteriorment.
2.	Les persones amb lesions cutànies no han de manipular els aliments. Degut a l'elevat percentatge de portadors nasals humans, tots els operaris hauran de fer servir guants d'un sol ús, mascaretes i còfies.
3.	Quan els aliments hagin de conservar-se és imprescindible un tractament tèrmic adequat, seguit d'una ràpida refrigeració a 10°C o menys.
4.	S'ha de minimitzar la contaminació creuada dels aliments cuinats amb els crus i amb les superfícies, equipaments i utensilis bruts.

Staphylococcus aureus és un microorganisme molt resistent a les condicions ambientals i extremadament difícil d'erradicar, i converteix als manipuladors d'aliments en els principals agents de la seva ràpida extensió.

El fred impedeix que el bacteri formi la toxina que desencadena la infecció bacteriana en humans (Anònim. 2007e).

d) Simptomatologia.

La intoxicació, que cursa amb vòmits, diarrees i espasmes intestinals, està produïda per una toxina que forma el bacteri en l'aliment. En ocasions, se senten escalfreds i marejos. El període d'incubació és curt (2-4 hores). Els símptomes poden aparèixer als pocs minuts o diverses hores després d'ingerir el producte contaminat (Anònim. 2007e).

1.4.4. *Cronobacter sakazakii*.

El *Cronobacter sakazakii* anomenat anteriorment *Enterobacter sakazakii*, és un bacil gramnegatiu que no forma espores (Anònim. 2004c).

Recentment, l'*Enterobacter sakazakii* ha estat reclassificat juntament amb 6 espècies molt afins en un nou gènere anomenat *Cronobacter*, que pertany a la família *Enterobacteriaceae*. Aquestes noves espècies són:

<i>Cronobacter sakazakii</i>	<i>Cronobacter muytjensii</i>
<i>Cronobacter turicensis</i>	<i>Cronobacter dublinensis</i>
<i>Cronobacter malonaticus</i>	Genomoespecie I

les quals han estat relacionades amb casos clínics d'infecció en nadons (Anònim. 2008a).

Representa la causa principal d'infeccions invasives amb una elevada taxa de mort en nounats. Aquestes infeccions estan associades a la presència d'aquest microorganisme en les Fórmules comercials per alimentar els nadons (Anònim. 2001).

L'*Enterobacter sakazakii*, abans anomenat *Enterobacter cloacae* (ECL) groc-pigmentat, va ser nomenat com a única espècie el 1980. Aquesta reclassificació està basada en les diferències respecte a l'ECL en la producció de pigment groc i les reaccions bioquímiques. És un microorganisme altament termotolerant del qual no es coneix el seu hàbitat natural ni el seu reservori. Tampoc es coneix la dosi infectiva (Anònim. 2004c).

Es tracta d'un microorganisme aerobi i anaerobi facultatiu que no produeix espores i fermenta la lactosa a 35°C en 48 hores.

a) Transmissió.

Existeixen 2 rutes per les quals el *Cronobacter sakazakii* pot contaminar les Fórmules Infantils:

Taula 15. Tipus de contaminació del *Cronobacter sakazakii* (Anònim. 2008a).

Tipus de contaminació del <i>Cronobacter sakazakii</i>
<ul style="list-style-type: none"> • Intrínseca: Per ingredients contaminats afegits després del procés d'assecat o a partir de l'ambient de producció, després de l'assecat i abans de l'envasat.
<ul style="list-style-type: none"> • Externa: Durant la reconstitució i manipulació de la Fórmula Infantil; per exemple utilitzant utensilis que no s'han netejat correctament.

El microorganisme ha estat detectat en les Fórmules preparades; tant a l'ambient com a la Fórmula Infantil un cop oberta. Els metges alerten del potencial risc d'infecció associat a l'ús d'una Fórmula deshidratada no estèril en les unitats de cura dels nounats als hospitals (Baiguini, A. 2005).

El *Cronobacter sakazakii* representa un risc per a la salut dels nounats. Aquest bacteri és un patogen oportunista que provoca meningitis, enterocolitis necrotitzant i sèpsia en nens prematurs o immunodeprimits (Van Acker, J. 2001). Els nadons amb menys de 28 dies són considerats d'alt risc (Conde, A. 2007).

Taula 16. Focus de contaminació del *Cronobacter sakazakii*.

Focus de contaminació del <i>Cronobacter sakazakii</i>
<ul style="list-style-type: none"> • Entre el 50-80% dels casos, les Fórmules Infantils en pols han estat la font i el vehicle de la malaltia induïda pel <i>Cronobacter sakazakii</i>.
<ul style="list-style-type: none"> • Entre el 20-50% dels casos, les Fórmules Infantils són el vehicle, però la font d'origen ha estat la manca d'higiene durant la reconstitució i manipulació.

L'elevada taxa de mortalitat (40–80%), la perillositat de les infeccions que provoca en infants i els coneixements actuals sobre la seva ecologia i patogenicitat impliquen una revisió dels coneixements microbiològics sobre patògens transmesos pels aliments (Nazarowec-White, M. *et al.* 1997b).

b) Epidemiologia relacionada amb alimentació infantil.

S'ha informat de casos d'infeccions per *Cronobacter sakazakii* derivades de Fórmules Infantils contaminades només en un cert número de països desenvolupats (Clark, NC. 1990). Probablement aquests casos no són reportats en tots els països. *Cronobacter sakazakii* ha estat identificat com l'agent causal d'infeccions invasives severes en nadons. Els nounats amb menys de 2 mesos d'edat representen el grup de major risc (Derzelle, S. *et al.* 2006).

Taula 17. Alguns brots del *Cronobacter sakazakii*.

Alguns brots provocats pel <i>Cronobacter sakazakii</i>
• Juliol, 2004: Mor un nounat prematur a Nova Zelanda.
• Octubre-Desembre, 2004: 1 brot on hi ha implicats 9 casos d'infecció, 4 malalts i 2 morts a França.
• 2006: Infecció nosocomial on van estar involucrats 2 nadons a l'Índia
• 2007: Cas d'un nadó a Espanya que presentava bacterièmia i que s'alimentava de llet materna i Fórmula Infantil.

La incidència general de la malaltia sembla ser baixa. En els pocs brots investigats, es va observar que les taxes de mortalitat eren d'un 20% i en d'altres fins a un 50% (Stoll, B. 2004).

Entre els nens, els que semblen estar més exposats al risc d'una infecció són:

Taula 18. Nens exposats a un elevat risc d'infecció pel *Cronobacter sakazakii*.

Els nens més exposats al risc d'una infecció pel <i>Cronobacter sakazakii</i> són
• Nounats (en els seus primers 28 dies), particularment el prematurs.
• Nascuts amb baix pes o els compromesos immunològics.
• Els nens amb mares infectades amb el Virus de la Immunodeficiència Humana (VIH).

Aquests grups de risc representen un assumpte de molta preocupació en els països en vies de desenvolupament on el percentatge d'aquests nounats és

superior que el dels països desenvolupats. Les elevades temperatures de l'ambient i la manca de refrigeració en els llocs on s'emmagatzemen aquestes Fórmules rehidratades també poden augmentar el risc ja que permeten el ràpid creixement del microorganisme una vegada reconstituïdes (Anònim. 2005c).

En els darrers temps, s'està observant un canvi de costums de les famílies les quals administren Fórmules Infantils de Continuació (indicades per a nens majors de 6 mesos) a nadons per sota d'aquesta edat i aquesta informació és rellevant pels neonats (de 28 dies o menys) i nens per sota dels 2 mesos d'edat que són els que s'han descrit com els més vulnerables a una possible contaminació pel *Cronobacter sakazakii* (Anònim. 2008a).

El *Cronobacter sakazakii* només està legislat en Fórmules d'Inici; per tant, en Fórmules de Continuació no s'analitza i es podria donar el cas que nadons susceptibles o immunocompromesos prenguessin aquest tipus de llet en pols i fossin infectats pel *Cronobacter sakazakii*.

Les raons per les quals els pares administren Fórmules Infantils de Continuació en nadons per sota dels 6 mesos són principalment:

- 23% la fan servir perquè tenen un fill més gran i unifiquen Fórmules.
- 22% ho han fet aconsellats pel metge.
- 20% creien que amb les Fórmules de Continuació proporcionen més nutrients al seu fill.
- 18% el nen es quedava amb gana després de prendre la Fórmula Infantil d'Inici.

El *Cronobacter sakazakii* ha provocat la mort del 40-80% dels nadons infectats i ha estat associat a la presa de Fórmules Infantils comercials. Dels 46 casos analitzats per infecció invasiva del *Cronobacter sakazakii*, s'han definit una sèrie de factors de risc i una guia de prevenció i tractament: 12 nadons van patir bacterièmia, 33 meningitis i 1 va tenir una infecció del tracte urinari. De les Fórmules Infantils mostrejades, 15 dels 22 casos (un 68%) van donar

Cronobacter sakazakii positiu i en 13 casos la soca aïllada de la clínica i de la Fórmula Infantil van ser indistingibles (Anònim. 2006a).

El primer cas de meningitis neonatal causada pel *Cronobacter sakazakii* va ser declarat el 1.961. Promogut per posteriors casos d'infecció pel *Cronobacter sakazakii* en nounats i l'increment en el número de nounats en les unitats de cures intensives alimentats per Fórmula Infantil deshidratades van alertar d'aquest microorganisme a les unitats sanitàries, les quals van posar interès en prendre mesures per a eliminar aquest microorganisme o controlar el seu creixement en les Fórmula Infantil deshidratades, controlant els ambients i les àrees de preparació en els hospitals (Fein, S.B. 1999).

S'han fet avenços en la taxonomia i classificació del *Cronobacter sakazakii*, els mètodes de detecció i aïllament, resistència a antibiòtics, etiologia clínica i patogenicitat. S'ha revisat els ambients, el processat dels aliments, la tolerància del patogen a l'estrès ambiental, el seu comportament en les Fórmules deshidratades i s'han estudiat els riscos associats a la seva presència (Gurtler, J.B. *et al.* 2005).

La meningitis produïda pel *Cronobacter sakazakii* ha estat tractada amb ampicil.lina i gentamicina o ampicil.lina i cloramfenicol. No obstant, una revisió de la bibliografia suggereix que l'increment en les resistències als antibiòtics s'ha de tenir en consideració i per això s'han desenvolupat noves cefalosporines en combinació amb un segon agent com els aminoglucòsids (Weir, E. 2002).

c) **Mesures preventives per a evitar la contaminació.**

Segons les especificacions microbiològiques aconsellades en el Codex, en el cas de les Fórmules Infantils en pols, es permet aproximadament de 1-10 bacteris coliformes per gram; el *Cronobacter sakazakii* pertany al grup dels coliformes. Per altra banda, el Reglament europeu n^o 1441/2007 estableix

l'anàlisi, per cada lot de producte fabricat de Fórmula Infantil d'Inici, de 30 mostres i en totes elles el resultat ha de ser d'Absència de 10 grams.

Mentre aquest límit pot ajudar a reduir el número de brots, en realitat, no aporta un nivell d'innocuitat suficient ja que s'han observat brots que han estat causats per Formules Infantils amb concentracions de *Cronobacter sakazakii* inferiors a aquest límit (Anònim. 2005a).

Punt de Control 1

Encara que la tecnologia disponible no sembla permetre la producció de Fórmules Infantils en pols estèrils, s'ha recomanat a la indústria una millora en la innocuitat d'aquests aliments (Anònim. 2001).

Aquest microorganisme ha estat trobat en baixes concentracions en les Fórmules comercials i en l'ambient de les fàbriques productores d'aquestes Fórmules Infantils. En molts casos, la contaminació no ha superat 1 unitat formadora de colònia per 100 grams (Derzelle, S. *et al.* 2006).

Es creu que una reducció significativa en la freqüència de contaminació de la Fórmula Infantil; per exemple, a través de la reducció del nivell d'Enterobacteris en el lloc de producció, podria reduir significativament el risc d'aquesta malaltia.

Punt de Control 2

S'estima que la inclusió d'un pas letal, per exemple, l'ús d'aigua calenta (70-90°C) durant la reconstitució de la Fórmula Infantil en pols, així com la disminució del temps d'espera des de la reconstitució fins alimentar els nens reduiria significativament el risc existent (Nazarowec-Whhite, M. 1997a).

Una combinació d'aquestes mesures preventives tindria un major impacte. Encara que es pugui pensar que el *Cronobacter sakazakii* no es pugui trobar en el subministrament d'aigua potable en els països desenvolupats seria possible que això passés en els països que tenen aigua potable de qualitat pobre (Anònim. 2005c).

d) Simptomatologia.

El *Cronobacter sakazakii* present en les Fórmules Infantils en pols ha originat brots de sepsis, meningitis o enterocolitis, especialment en nens menors de 2 anys. Els nadons que han sobreviscut a la malaltia van experimentar algunes complicacions de llarga durada i desordres neurològics (Anònim. 2005c).

El símptoma més freqüent d'infecció neonatal del *Cronobacter sakazakii* és la meningitis que es desenvolupa amb menys d'1 setmana de vida . Les complicacions com atacs i inflamacions en el cervell comporten un 40% de mortalitat. La septicèmia i l'enterocolitis necrotitzant també estan associades a les infeccions per *Cronobacter sakazakii* (Derzelle, S. *et al.* 2006).

En la majoria dels casos, s'han produït anomalies degut a la massiva invasió d'aquest bacteri. Aquests canvis inclouen: Canvis quítics, abscessos, col.lecció de fluids, dilatació de les pupil.les i ventricles infartats causats per la invasió. S'ha de fer un seguiment dels símptomes ja que podria aparèixer algun cas d'hidrocefàlia (Weir, E. 2002).

1.5. RECONSTITUCIÓ DE LES FÓRMULES INFANTILS.

Per extreure la seguretat en relació a la contaminació bacteriana, es precisa aplicar normes estrictes que garanteixin l'absència de bacteris de les Fórmules Infantils en pols (Anònim. 1994).

Encara que les Fórmules líquides estèrils ja preparades pel consum poden constituir una alternativa segura que eviti la contaminació intrínseca del producte i disminueixi la possibilitat de contaminació que pot produir-se durant la preparació del biberó, existeixen d'altres consideracions (Moreno, J.M. 2005).

Per una banda, el tractament amb calor pot modificar de forma important la biodisponibilitat d'alguns nutrients; per altra, tenen un preu més elevat, precisen de més espai pel seu emmagatzematge i fan difícil la modificació en la seva concentració per canviar la seva densitat calòrica. A més, només es disposa de presentacions líquides en les Fórmules per a prematurs i en preparats d'inici i continuació; però no en les Fórmules especials (Anònim. 2004c).

Les Fórmules Infantils en pols no són estèrils i poden convertir-se en un medi idoni per la supervivència bacteriana (Anònim. 2003a). Llargs períodes d'emmagatzematge a temperatura ambient poden incrementar la quantitat de bacteris presents. Seria necessari que personal amb formació prepari les Fórmules Infantils sota tècniques asèptiques i seguint unes instruccions precises. (Weir, E. 2002).

Un cop reconstituït el producte, s'ha d'administrar immediatament o bé refrigerar-lo no sobrepasant les 24 hores (Anònim. 2008a).

També seria necessari unificar criteris en les recomanacions adreçades als pares pel que respecta a la preparació i manipulació dels biberons, com passa amb l'aigua amb la qual es prepara el biberó, el temps d'ebullició, etc. Encara que es disposen de llets líquides, aptes pel seu consum immediat, les Fórmules en pols per a reconstituir amb aigua són les més utilitzades. Per aquesta raó és important que, a la mateixa vegada que es desenvolupin estratègies per augmentar la prevalença i la durada de la lactància materna, s'intenti minimitzar els riscos associats a la lactància artificial (Anònim. 2004c).

S'han descrit infeccions greus en nounats i lactants vulnerables relacionats amb la contaminació de les Fórmules Infantils en pols (Molifa, J.A. 2001).

D'entre tots els gèrmens contaminats, adquireix especial rellevància el *Cronobacter sakazakii*. Per aquest motiu, la OMS/FAO i la Societat Europea de Gastroenterologia, Hepatologia i Nutrició Pediàtriques han elaborat una sèrie de recomanacions sobre la preparació i manipulació d'aquestes Fórmules en pols, dirigides tant als fabricants de Fórmules Infantils, com a les institucions en les quals s'utilitzen aquests productes i els pares que preparen aquests biberons a casa (Anònim. 2004c).

Els programes educatius orientats als consumidors, a les persones a càrrec de la cura infantil en la llar, estructures de salut i el personal de la salut, han de fer entendre als consumidors (Renfrew, M.J. 2003):

Taula 19. Programes educatius per a la reconstitució de les Fórmules Infantils (Anònim, 2005c).

Programes educatius
• La importància de la informació continguda en les etiquetes dels productes.
• Que segueixin les instruccions dels productes.
• Que s'informin abans de triar un producte.

El número de complicacions greus derivades de la ruptura de les pràctiques d'una correcta reconstitució de les Fórmules Infantils és molt baix. En tots els estudis revisats (Anònim. 2004c) s'ha trobat que es feien errors en la reconstitució, especialment concentrant les solucions encara que també es va observar que una de les mares diluïa la Fórmula en excés.

Les recomanacions de la FAO per les Fórmules Infantils estableixen que el contingut màxim d'organismes coliformes ha de ser de <3 unitats formadores de colònies per gram (ufc/g).

Encara que l'OMS, en el seu codi sobre la publicitat dels substituïts de la llet materna del 1.981, va establir com a objectius "contribuir a proporcionar una

nutrició adequada i segura pels lactants mitjançant la protecció i promoció de la llet materna” i “mitjançant l’ús adequat dels substituïts de la llet materna, quan fossin necessaris ...” (article 1); l’any 2.000, al Regne Unit només un 9% de les mares primerenques que van assistir a classes de preparació pel part i que havien decidit donar el biberó al seu nadó des del naixement mitjançant lactància artificial, van rebre informació de com preparar un biberó (Anònim. 2004c).

Una enquesta realitzada entre més de 1.000 mares norteamericanes va demostrar que:

Taula 20. Reconstitució de les Fórmules Infantils (Anònim. 2004c).

Mala Praxis en la reconstitució de les Fórmules Infantils
<ul style="list-style-type: none"> • 3% de les mares diluïen o concentraven les Fórmules.
<ul style="list-style-type: none"> • 0,15% deixaven les Fórmules, ja reconstituïdes, a temperatura ambient més de 2 hores.
<ul style="list-style-type: none"> • 35% afegien un altre tipus de component diferent a la llet en pols al biberó abans dels 5 mesos d’edat.

El *Cronobacter sakazakii* pot trobar-se a qualsevol lloc on es produeixi llet en pols, però també a l’ambient de la pròpia llar i la cuina que és el lloc on normalment es reconstitueixen les Fórmules Infantils (Pérez-Choliz, V. 2003).

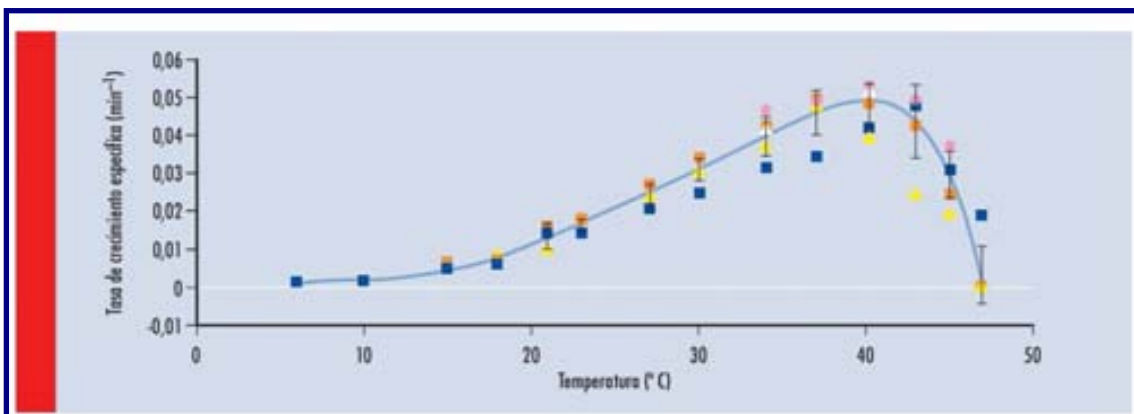
Una quantitat baixa d’unitats formadores de colònies en la Fórmula reconstituïda pot tenir repercussions importants, per la facilitat de multiplicar-se abans que la Fórmula reconstituïda es consumeixi (Anònim. 2004c).

Encara que el reservori de la infecció no es coneix bé, és probable que els aliments no siguin els únics implicats en l’aparició de casos. Per aquest motiu han de considerar-se altres factors com les condicions d’higiene general i neteja. *Cronobacter sakazakii* és un microorganisme amb una elevada capacitat de formar biofilms en superfícies. A 10°C manifesta una elevada activitat cel.lular, de forma que després de 5 hores a aquesta temperatura poden evidenciar-se elevats nivells de contaminació. A temperatura ambient

(entre 20 i 25°C) és capaç de duplicar-se cada 40 minuts, el que dóna una idea de la seva capacitat de contaminació (Lai, K.K. 2001).

Aquestes dades indiquen que el vehicle de transmissió és més aviat de tipus ambiental. En aquests casos, l'aire és un dels vehicles de disseminació més importants. Una pauta d'actuació és la recerca de superfícies humides donat que el microorganisme difícilment creixerà en absència d'aigua (Kandhai, M.C. 2004).

Figura 2. Creixement del *Cronobacter sakazakii* en una Fórmula Infantil reconstituïda en relació amb la temperatura ambient (Anònim. 2004c).



El *Cronobacter sakazakii* és relativament resistent a la calor, de tal forma que per a la seva inactivació es necessiten temperatures superiors als 60°C (Himmelright, I. 2002). Aquest fet fa possible que les Fórmules líquides (sotmeses en la seva elaboració a temperatures superiors) estiguin lliures de gèrmens; no obstant, si s'escalfa una Fórmula en pols ja reconstituïda per sobre dels 80°C pot alterar-se el valor nutricional (Anònim. 2004c).

Recomanacions.

Les recomanacions que va elaborar el grup de treball conjunt entre l'OMS i la FAO es resumeixen en:

Taula 21. Recomanacions elaborades pel grup de treball conjunt entre l'OMS i la FAO per a la reconstituïció de les Fórmules Infantils (Anònim. 2004c).

Recomanacions
1. S'ha d'advertir que les Fórmules Infantils en pols no són productes estèrils i que poden estar contaminats amb patògens perillosos per a la salut.
2. Quan sigui possible i raonable, és preferible l'ús de Fórmules Infantils en presentació líquida o Fórmules que hagin sobrepassat un punt efectiu en el procediment de descontaminació (per exemple, bullir l'aigua amb la qual es prepara el biberó).
3. S'han de desenvolupar protocols de preparació, manipulació i ús de les Fórmules Infantils amb la finalitat de minimitzar riscos.
4. S'ha d'animar a la Indústria a desenvolupar un ampli ventall de Fórmules estèrils.
5. S'ha d'exigir a la indústria que redueixi la prevalença i concentració de <i>Cronobacter sakazakii</i> tant en el producte final com en els medis de producció.
6. Buscar la manera de detectar qde forma eficaç aquest i d'altres gèrmens en les Fórmules Infantils en pols.
7. Promoure el coneixement més precís de les característiques del <i>Cronobacter sakazakii</i> amb l'objectiu de reduir els seus nivells en la Fórmula ja reconstituïda.

Es poden establir recomanacions a tres nivells (Anònim. 2004c).

Nivell 1: Pels fabricants de les Fórmules Infantils

- Continuar amb l'esforç rigorós per part dels fabricants, per a minimitzar el contingut bacterià de les Fórmules Infantils en pols, les quals, tot i estar implicades en l'aparició d'aquest microorganisme, presenten una càrrega microbiana molt baixa; no obstant, no són productes estèrils ja que estan sotmesos a processos d'escalfament, però a temperatures no massa elevades (Anònim. 1977).

Nivell 2: Per a l'elaboració de les Fórmules reconstituïdes en institucions (hospitals, clíniques o similars)

Espais físics adequats.

- Separats de les zones on es realitza l'atenció directa als pacients.

- Dedicats exclusivament a la preparació de Fórmules Infantils d'una forma asèptica.
- Material de recobriment de parets, terra i sostres que garanteixin el bon control sanitari.

Equipaments.

- Han d'acomplir amb totes les regulacions sanitàries vigents.
- Protocols estrictes de manteniment dels equips utilitzats en la reconstitució de les Fórmules en pols.
- Refrigeradors adequats.
- Utilització de material d'un sol ús (tetines, biberons) sempre que sigui possible.
- Utilitzar només aigua esterilitzada per a la reconstitució.

Personal.

- Experimentat i qualificat en la preparació de Fórmules Infantils.
- Vestuari adequat.
- Acomplir les pràctiques de bona higiene personal.

Preparació i manipulació de les Fórmules.

- Han d'existir protocols clars de preparació i manipulació de les Fórmules Infantils en l'hospital.
- En la preparació de les Fórmules, ha de seguir-se una tècnica asèptica.
- És aconsellable l'ús de Fórmules líquides (estèrils) en les plantes de maternitat per a neonats sans.
- La llet ja reconstituïda hauria de mantenir-se a una temperatura igual o inferior a 4°C durant un període no superior a 30 hores. Les Fórmules han d'escalfar-se només immediatament abans de la seva utilització.
- Si la Fórmula necessita estar a temperatura ambient durant un període llarg, no ha de romandre reconstituïda més de 4 hores.

Nivell 3: Preparació en el domicili

- L'ideal és reconstituir la Fórmula abans de cada presa.
- El que sobri d'una presa, s'ha de rebutjar (i no reaprofitar).
- La Fórmula reconstituïda no ha de guardar-se en un termo o dispositiu similar. Com alternativa, guardar l'aigua calenta en el termo i barrejar amb la Fórmula en pols just abans de la seva administració.
- Els nivells de detecció actuals permeten que aquests productes arribin al mercat lliure d'aquest microorganisme; tot i que no succeeix el mateix amb l'entorn domèstic. Cal destacar que en les superfícies de les cuines, un dels microorganismes que més es detecten són els *Enterobacter cloacae* i el *Cronobacter sakazakii*, especialment en les superfícies humides dels lavabos i de les cuines. D'aquí la importància de mantenir unes mesures preventives adequades, tant en l'àmbit domèstic com l'hospitalari (Anònim, 1977).

L'adopció d'aquestes recomanacions són importants donat que les Fórmules Infantils no són productes estèrils i la reconstitució de les mateixes ha de realitzar-se en unes bones condicions higièniques i amb personal expert que conegui les bones pràctiques de preparació (Drudy, D. *et al.* 2006).

1.6. DETECCIÓ DE PATÒGENS: TÈCNiques APLICADES ACTUALMENT EN LA INDÚSTRIA ALIMENTÀRIA INFANTIL.

Actualment els mètodes validats més habituals en la indústria alimentària infantil per a la detecció de patògens són la tècnica ISO i el sistema VIDAS®.

El mètode ISO és una tècnica que es fonamenta bàsicament en el pre-enriquiment de la mostra en medis líquids selectius i la posterior detecció de colònies sospitoses en medis de cultiu sòlids. Les anàlisis microbiològiques tradicionals dels aliments tenen seriosos inconvenients, associats bàsicament

al temps necessari per a poder obtenir els resultats (Rodríguez, J.J. 2007) i també al fet que són mètodes més laboriosos que requereixen de més dedicació per part del personal així com també que requereixen de proves confirmatives de les colònies sospitoses crescudes en placa.

El sistema VIDAS[®] és un mètode d'anàlisi ràpid, fiable, sensible i automatitzat basat en l'immunoassaig que permet detectar, mitjançant concentracions i rentats successius de la mostra, la presència del microorganisme que s'està analitzant. L'assaig immunoenzimàtic es basa en el reconeixement antígen-anticos i detecta específicament els antígens de determinats microorganismes (Anònim. 2007c).

Aquest sistema consta d'un conus d'un únic ús (en blau en la figura següent) que representa la fase sòlida i el sistema de pipeteig i el cartutx (en taronja) que conté el reactiu. El sistema de detecció final té lloc per una reacció de fluorescència mesurada a 450 nm (Anònim. 2007c).

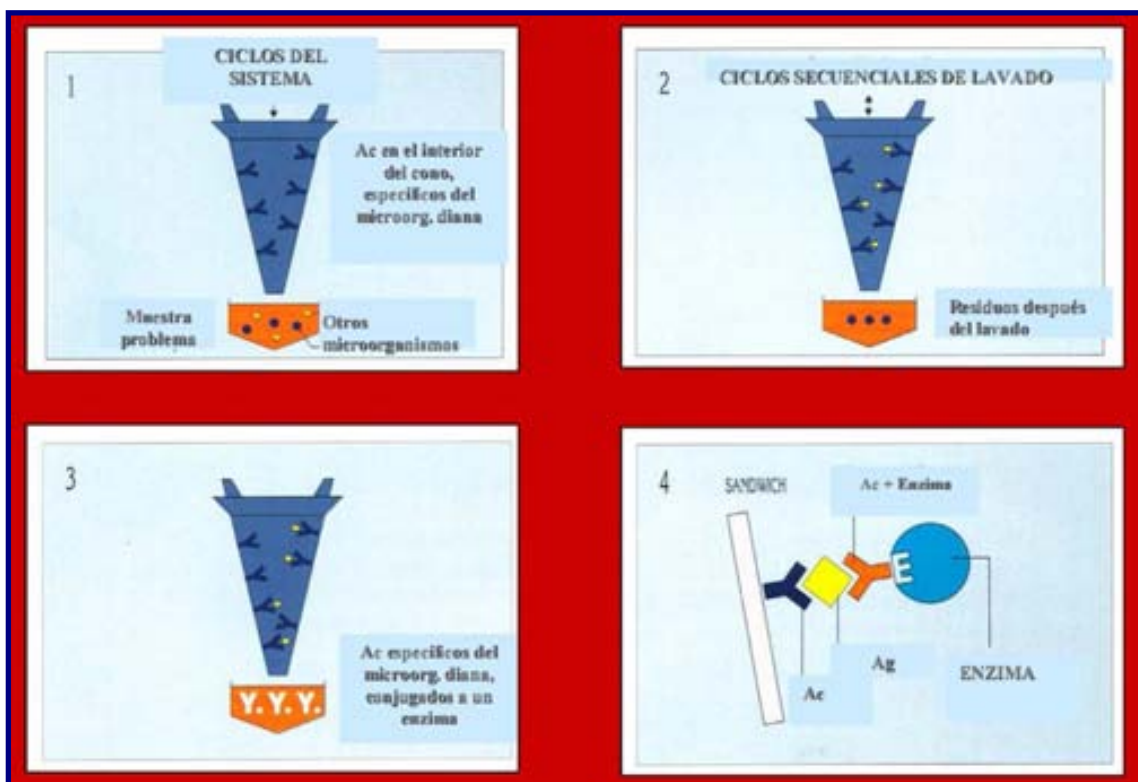


Figura 3. Esquema de treball del sistema VIDAS[®].

1.7. TÈCNIQUES BASADES EN BIOLOGIA MOLECULAR.

En aquest treball intercomparatiu de tècniques s'han utilitzat mètodes clàssics o tradicionals (ISO), immunològics (VIDAS[®]) i tècniques basades en l'amplificació del DNA (PCR). Donat que l'aplicació d'aquest últim sistema és molt novedós en els Laboratoris de les Indústries, a continuació s'expliquen les característiques més importants.

La **PCR (Reacció en Cadena de la Polimerasa)** es una tècnica de Biologia Molecular que permet amplificar exponencialment i de forma molt específica una seqüència determinada de DNA.

Aquesta tècnica es fonamenta en la propietat natural de les DNA polimerasa (DNA pol) per a replicar (copiar) cadenes de DNA, per a la qual cosa s'utilitzen cicles d'elevades i baixes temperatures alternant-se per a separar les cadenes de DNA acabades de formar després de la fase de replicació i, a continuació, deixar que tornin a unir-se a polimerases perquè tornin a duplicar-les a partir d'una seqüència que actua com a cebador ("primer").

Inicialment la tècnica era lenta ja que les polimerases es desnaturalitzaven al realitzar els canvis de temperatura i era necessari afegir noves polimerases en cada cicle. Donat que les temperatures del cicle (94°C en alguns moments) suposen la immediata desnaturalització de tota la proteïna, s'utilitzen DNAPol termostables, extretes de microorganismes adaptats a viure a aquestes temperatures, restrictives per a la majoria dels éssers vius (Moretti, T. 1998).

Aquests microorganismes són:

Taula 22. DNA Polimerases utilitzades en el cicle de la PCR.

DNApolimerases termorresistents
• <i>Thermus aquaticus</i> (polimerasa Taq).
• <i>Pyrococcus furiosus</i> (Pfu).
• <i>Thermococcus litoralis</i> (Vent).
• <i>Thermus thermophilus</i> (Tth).

Generalment s'utilitzen barreges de polimerases molt processives (Taq) amb altres amb correcció d'errors (Pfu, Vent) (Holland, P.M. 1991).

Tot el procés de la PCR està automatitzat mitjançant un aparell anomenat termociclador.

1.7.1. Cicle d'amplificació.

La PCR bàsica consta d'un primer pas d'escalfament a 94-95°C durant 5-10 minuts, en el qual s'activa la DNA polimerasa, en cas de necessitar-lo.

En aquest pas també s'evita la unió inespecífica dels cebadors (també denominats primers) al DNA motllo.

Posteriorment hi ha un perfil tèrmic (desnaturalització, hibridació i extensió) que es repeteix un nombre determinat de cicles depenent del fragment que es vol amplificar (Berg, J.M. 2008):

a) Desnaturalització.

La desnaturalització consisteix en l'escalfament a 95°C per tal de separar les cadenes del DNA motllo. La temperatura a la qual es decideix realitzar la desnaturalització depèn, per exemple, de la proporció de G+C que tingui el fragment, com també de la longitud del mateix. Generalment és de 94-95°C.

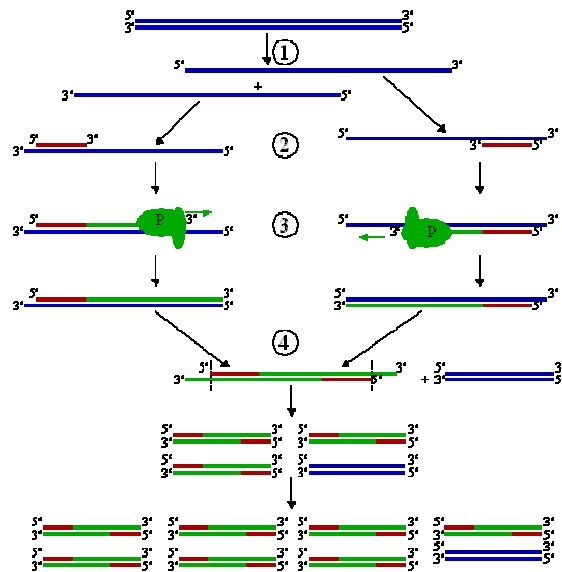
b) Unió del cebador.

La hibridació consisteix en la unió dels cebadors a les regions complementàries en el DNA motllo. Els cebadors delimiten la regió que serà amplificada en la PCR. La temperatura d'hibridació (45-65°C) proporciona l'especificitat de l'amplificació.

c) Extensió de la cadena.

L'extensió de la cadena (60-72°C) consisteix en la síntesi a partir del cebador i per complementarietat de la nova cadena de DNA per la DNapol.

Figura 4. Cicle d'amplificació de la PCR.



El fragment diana es duplica en cada cicle de la PCR obtenint-se una amplificació exponencial de la seqüència d'interès al final de la reacció (2^n).

1.7.2. PCR a Temps Real.

A la PCR a Temps Real, els processos d'amplificació i detecció es produeixen de forma simultània en el mateix vial tancat sense necessitat de cap acció posterior.

A més, mitjançant la detecció per fluorescència, es pot mesurar durant l'amplificació la quantitat de DNA sintetitzat en cada moment (temps real) ja que l'emissió de fluorescència produïda a la reacció és proporcional a la quantitat de DNA sintetitzat. Això permet conèixer i enregistrar en tot moment la cinètica de la reacció d'amplificació (Ke, D. 2000).

Els termocicladors per a dur a terme la PCR a Temps Real incorporen un lector de fluorescència i estan dissenyats per a poder mesurar, en qualsevol moment, la fluorescència emesa en cada un dels vials on es realitzi l'amplificació (Mackay, I.M. 2002).

Taula 23. Tipus de PCR a Temps Real.

Els sistemes de detecció en la PCR a temps real es basen en dos tipus de química:
a) Agents intercalants.
b) Sondes específiques marcades amb fluorocroms.

a) Sistemes de detecció: Agents intercalants.

Són fluorocroms que augmenten notablement l'emissió de fluorescència quan s'uneixen al DNA de doble hèlix.

El més utilitzat en la PCR a Temps Real és el SYBR Green I (Díaz, S. 2008).

Avantatges
L'increment de DNA, en cada cicle, es reflexa en un augment proporcional de la fluorescència emesa. Aquest sistema permet l'optimització de les condicions de la reacció de forma senzilla i a més, és més econòmic que les sondes específiques.
Inconvenients
El principal inconvenient dels agents intercalants és la seva baixa especificitat degut a què s'uneixen de forma indistinta a productes generats inespecíficament o a dímers de cebadors, molt freqüents en la PCR.
Recomanacions
Per a millorar l'especificitat s'han d'utilitzar condicions de reaccions òptimes i una selecció acurada dels cebadors per a disminuir el risc de formació de dímers.
A més, és recomanable iniciar la reacció de síntesi de DNA a temperatures elevades (hot-start PCR), la qual cosa disminueix de forma notable del risc d'amplificacions inespecífiques.
Es poden fer servir polimerases recombinants modificades que només funcionen després de ser activades a temperatures elevades o anticossos que bloquegin el centre actiu de la polimerasa fins que la reacció assoleixi temperatures elevades en les que els anticossos es desnaturalitzen alliberant la polimerasa i permetent la seva activitat.

Cada fragment amplificat té una Temperatura de melting o de separació de les cadenes (T_m) característica, que és la temperatura a la que el 50% del DNA de la molècula està desnaturalitzada, i que depèn sobretot de la seva longitud i la composició de bases (González, M. 2008).

L'aplicació d'una corba de dissociació al final de l'amplificació permet comprovar, encara que no sempre amb absoluta garantia, l'especificitat dels fragments detectats en la PCR.

b) Sistemes de detecció: Sondes d'hibridació específiques.

Les sondes estan marcades amb 2 tipus de fluorocroms (donador/acceptor) entre els quals hi ha una transferència d'energia fluorescent. El procés es basa en la transferència d'energia mitjançant ressonància (FRET) entre les dues molècules. Tenen una elevada especificitat.

Les més utilitzades són les sondes:

- b.1) D'hidròlisi, denominades també sondes TaqMan®.
- b.2) D'hibridació, Molecular beacons.
- b.3) D'hibridació, Sondes FRET.

b.1.) Sondes d'hidròlisi (TaqMan®).

Són oligonucleòtids marcats amb:

L'extrem 5':	Un fluorocrom donador que emet fluorescència al ser excitat ("Reporter").
L'extrem 3':	Un acceptor que absorbeix la fluorescència alliberada pel donador ("Quencher").

Perquè aquest fenomen tingui lloc:

Les molècules donadora i acceptora han d'estar espacialment properes.

L'espectre d'emissió de la 1ª molècula s'ha de solapar amb l'espectre d'absorció de la 2ª.

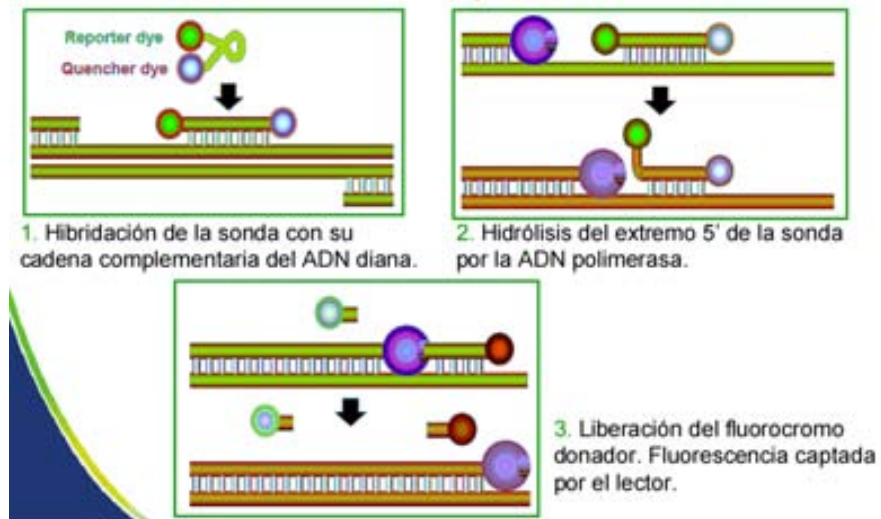


Figura 5. Mecanisme d'acció de les sondes TaqMan® (Anònim. 2006c).

- Mentre la sonda està intacta, la fluorescència emesa pel donador "Reporter" (en verd) és absorbida per l'acceptor "Quencher" (en blau).
- Durant l'amplificació del DNA diana, la sonda s'hibrida amb la seva cadena complementària.
- Al desplaçar-se al llarg de la cadena, en la seva acció de síntesi, la DNA polimerasa, que té activitat 5' exonucleasa (en lila), hidrolitza l'extrem lliure 5' de la sonda produint-se l'alliberament del fluorocrom donador "Reporter". Com el donador "Reporter" i l'acceptor "Quencher" estan, ara, físicament allunyats, la fluorescència emesa pel primer (en verd) és captada pel lector de l'equip de PCR.

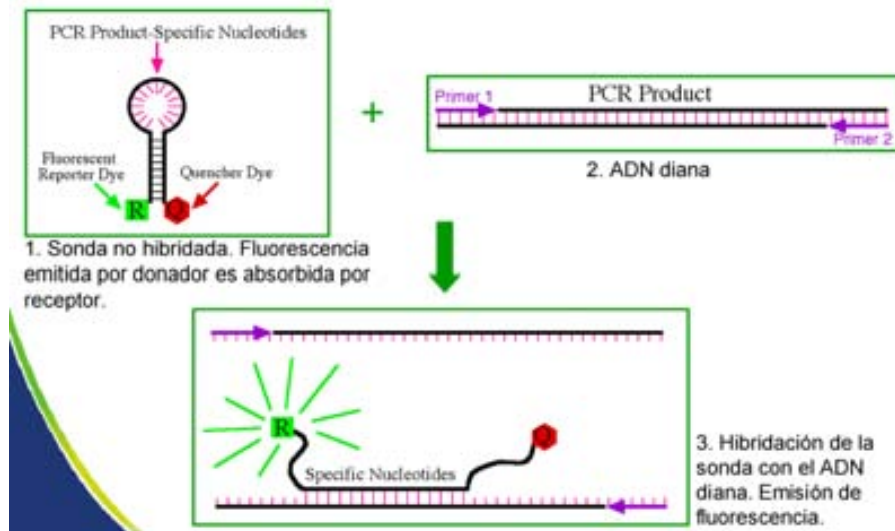
Per tant, el Kit TaqMan® utilitza l'activitat 5'nucleasa de la Taq polimerasa la qual hidrolitza una sonda interna fluorogènica que serveix per a monitoritzar l'amplificació del gen diana (en el cas que hi sigui present en la mostra) (Applied Biosystems, 2006).

b.2.) Molecular Beacons.

Són sondes semblants a les anteriors (Mata, A.I. 2007):

L'extrem 5':	Molècula donadora.
L'extrem 3':	Molècula acceptora.

Figura 6. Mecanisme d'acció de les Molecular Beacon.



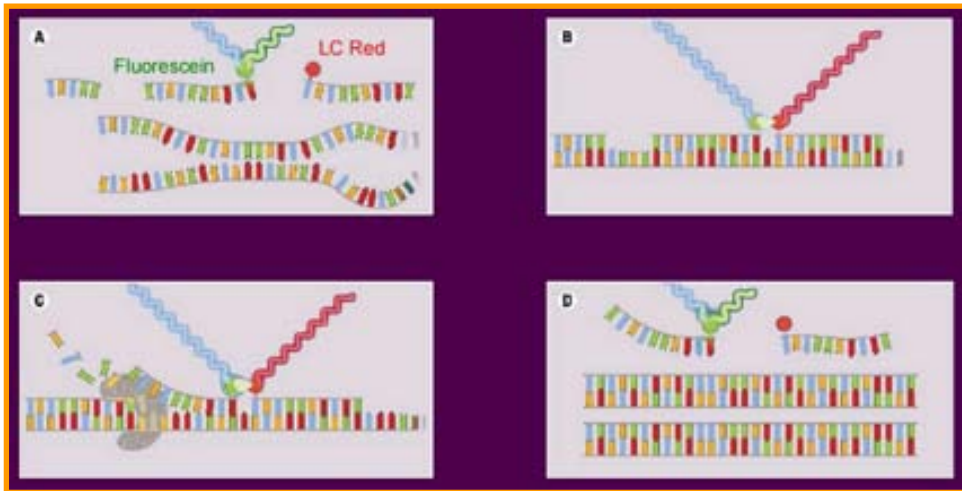
- Presenten una estructura secundària en forma de nansa, en la que resideix la seqüència d'unió específica amb el DNA diana.
- Els extrems romanen plegats quan la sonda no està hibridada la qual cosa comporta que el donador i l'acceptor estiguin molt aprop un de l'altre.
- En aquesta conformació, la fluorescència emesa pel donador és absorbida per l'acceptor i no és captada pel lector de l'equip. No obstant, a l'hibridar amb el DNA diana la sonda s'obre, allunyant-se donador i acceptor, permetent ser detectada la fluorescència emesa pel primer (Tyagi, S. 1996).

b.3.) Sondes FRET.

El sistema està format per dues sondes que s'uneixen a seqüències adjacents al DNA diana:

L'extrem 5':	Molècula acceptora.
L'extrem 3':	Molècula donadora.

Figura 7. Mecanisme d'acció de les sondes FRET.



Quan les sondes estan híbrides, els dos fluorocroms estan propers entre sí. Al ser excitats, el donador transfereix la seva energia a l'acceptor que, a la mateixa vegada, emet la fluorescència que detecta el lector de l'equip.

Avantatges
<ul style="list-style-type: none"> ▪ La utilització de sondes garanteix l'especificitat de la detecció. ▪ Permet identificar polimorfismes o mutacions puntuals.

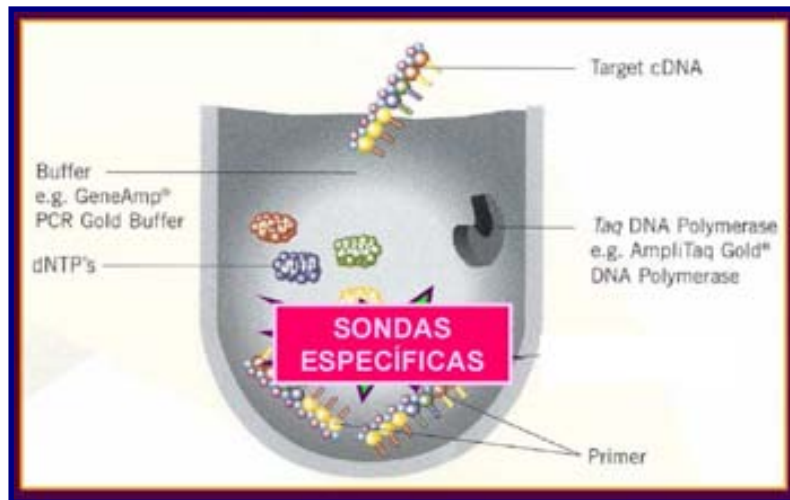
Inconvenients
<ul style="list-style-type: none"> ▪ El seu cost és més elevat que les sondes SYBR Green.

En tots aquests sistemes, l'increment de DNA en cada cicle correspon a un augment d'híbridació de les sondes, la qual cosa comporta un augment en la mateixa proporció de fluorescència emesa.

c) Components de la PCR a Temps Real.

Barreja "Màster Mix"	
<ul style="list-style-type: none"> ▪ Taq DNApol. ▪ Nucleòtids: dNTP's + dUTP (Uracil-N-glucosilasa). ▪ Mg²⁺. 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Tampó. ▪ Cebadors (primers): Forward i Reverse. ▪ Sondes d'híbridació específiques. ▪ Mostra (que conté el DNA que es vol estudiar).

Figura 8. Components de la Màster Mix.



d) Protocol de treball de la PCR a Temps Real.

Protocol de treball (Anònim. 2006c)	
1.	Purificació: Consisteix en l'extracció de DNA a partir de la mostra de partida.
2.	Preparació de la solució d'amplificació que conté: Màster Mix + Primers + sonda + DNA.
3.	Realització de la PCR a Temps Real: Amplificació + Detecció de DNA.
4.	Lectura dels resultats: <ul style="list-style-type: none"> - Qualitatiu: Necessita interpretació de les corbes. - Quantitatiu: Requereix realitzar una comparació amb la corba patró.

1.8. PRINCIPALS MOTIUS PER A IMPLANTAR LA TÈCNICA DE PCR EN UN LABORATORI DE LA INDÚSTRIA.

Els mètodes de detecció tradicionals i la posterior identificació dels patògens són complexos i lents, perquè la mínima dosi infectiva de microorganismes com *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes* i *Salmonella* són molt baixos i la detecció clínica en nivells de contaminació significatius generalment requereix

de l'amplificació de l'organisme en el Laboratori durant diversos dies (Alan, J. *et al.* 2006).

Els mètodes per a la detecció de *Salmonella* són laboriosos, requereixen de molt de temps i no són prou específics. Els mètodes estàndars utilitzats per la *Salmonella* requereixen d'un pre-enriquiment en Aigua de Peptona Tamponada, medis selectius com el brou Rappaport-Vassiliadis i el brou Müller-Kauffmann tetracionat/novobiocina, que posteriorment cal emplaçar en agars selectius que caldran confirmar amb tests bioquímics. El procés sencer dura com a mínim 3 dies. El diagnòstic ràpid, econòmic i automatitzat dels patògens implicats en brots alimentaris representa un dels objectius principals a assolir en la indústria i en salut pública. Degut a aquestes necessitats, la PCR s'ha convertit en una eina molt útil en el diagnòstic microbiològic durant la darrera dècada per a la detecció de patògens en aliments (Petra, F. *et al.* 2006).

Els mètodes de detecció ràpida (com és el cas de la PCR a Temps Real) representen una important eina microbiològica de diagnòstic. Els kits de PCR disponibles comercialment garanteixen l'amplificació in vitro del DNA del patògen en qüestió. No obstant, l'anàlisi per PCR es pot veure limitat per la presència de substàncies inhibidores en les mostres. Aquestes substàncies poden interferir en la lisi de les cèl.lules o poden inactivar la DNApol; per tant, durant l'extracció del DNA cal eliminar aquestes substàncies (Alvarez, J. *et al.* 2004). És essencial que, abans de la implantació d'un nou mètode de diagnòstic, en la rutina d'un Laboratori de Control de Qualitat, es treballi amb els procediments analítics i es valori si són realment robustos, eficaços i consistents en les matrius específiques que es volen validar i si cal introduir o no alguna modificació en el protocol original que garanteixi la seva especificitat i sensibilitat.

Per aconseguir un mètode PCR el més eficient possible per a l'anàlisi en rutina de les mostres alimentàries, cal que els procediments siguin senzills i ràpids. Molts mètodes per a preparar les mostres, com l'extracció del DNA, són laboriosos i cars i no proporcionen els resultats desitjats. A més, hi ha la

necessitat de què la preparació de la mostra s'optimitzi per a otorgar avantatges a l'anàlisi per PCR en comparació a d'altres mètodes per tal d'implantar-ho en la rutina del Laboratori (Kawasaki, S. 2001).

La realització del pre-enriquiment abans de fer l'anàlisi per PCR es realitza amb diferents motius (Miint, M.S. 2006).

Taula 24. Motius de la realització del pre-enriquiment per PCR (Löfström, C. *et al.*, 2004).

Realització del pre-enriquiment en la PCR
▪ Dilució dels inhibidors de la PCR que inclou substàncies en la mateixa matriu alimentària.
▪ Multiplicació del microorganisme diana en concentracions detectables.
▪ Dilució de les cèl.lules mortes.
▪ Possibilitat d'aïllar el microorganisme diana per tests complementaris a l'anàlisi

S'han descrit diversos mètodes de detecció per PCR en aliments, però molts d'ells no s'han aplicat en aliments naturalment contaminats. L'adopció de nous mètodes requereix la validació amb mostres artificialment contaminades i la comparació dels resultats amb mètodes de referència que requereixen de medis de cultiu selectius (tant brous com aïllaments en plaques) (Hein, I. 2006).

Els assajos per PCR utilitzen un format de càrrega de plaques de 96 pouets que permeten analitzar un elevat nombre de mostres de forma ràpida utilitzant reactius estàndars de PCR i uns termocicladors que faciliten les condicions per a assajar diversos microorganismes diana en la mateixa placa (Löfström, C. *et al.* 2004).

Aquesta tecnologia i la utilització de reactius preparats comercialment faciliten la estandarització dels mètodes entre Laboratoris. L'eliminació de manipulació de productes de PCR post-amplificació en la PCR a Temps Real pot també

reduir casos de contaminació creuada i reduir la possibilitat d'obtenir resultats falsos positius (Sails, A.D. *et al.* 2003).

Un grup d'experts internacionals del European Committee for Standardization han establert protocols de detecció de patògens associats als aliments per PCR (Anònim. 2004c).

Els mètodes estandaritzats basats en PCR poden ser optimitzats obtenint una elevada especificitat, probabilitat de detecció i robustesa (incloent un Internal Amplification Control, IAC), disminuir la possibilitat de contaminació i una interpretació senzilla dels resultats que faciliten la seva aplicació. En la segona generació de metodologies de PCR, la PCR a Temps Real té la potencialitat d'acomplir aquests criteris mitjançant la combinació entre l'amplificació i la detecció en un mateix pas i en un tub tancat de reacció (Malorni, B. *et al.* 2004).

1.8.1. Exigències de l'equip de PCR.

Els principals requeriments van ser els següents:

- Que es tracti d'un sistema operatiu obert.
- No presenti limitació en la detecció de nous patògens.
- No estar lligat a les expectatives i/o interessos de la casa comercial.
- Permeti fer un seguiment més estret dels microorganismes emergents i tenir millor capacitat de reacció enfront alertes alimentàries.
- Permeti l'ús de kits i reactius d'altres cases comercials.

Altres aspectes importants que s'han tingut en compte per conèixer millor la tècnica de PCR i l'equip de detecció han estat:

a) Conèixer el procediment analític.

- Estudiar les etapes de què consta la tècnica. En la mesura del possible cal que el procediment sigui senzill i ràpid.

- Comprovar que no implica la utilització de reactius tòxics o de complexa manipulació.

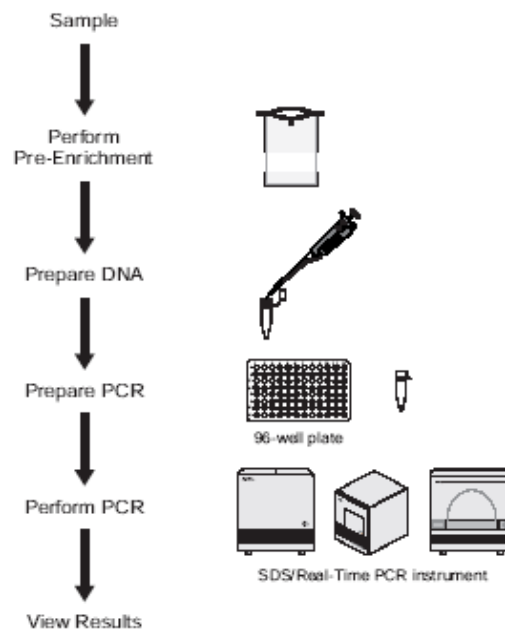


Figura 9. Procediment de treball de la PCR a Temps Real.

b) **Contactar amb altres usuaris de l'equip i visites a altres Laboratoris.**

- Conèixer la seva experiència amb la tècnica de PCR.
- Quins equips disposaven.
- Conèixer el flux de treball i distribució òptima de les sales de treball per tal d'evitar les contaminacions creuades.

1.8.2. Principals motius per a canviar de tècnica.

a) **Incrementar la capacitat analítica del Laboratori.**

- En les Indústries Alimentàries, s'intenta optimitzar al màxim l'operativa dels Laboratoris per tal de processar el major nombre de mostres possibles dins de la jornada laboral.
- Comparant 2 tècniques ràpides i alternatives com són el sistema VIDAS® i la tècnica de PCR, s'ha comprovat un increment de la

capacitat analítica passant de 120 mostres diàries, processades pel VIDAS[®], a 180 mostres per la PCR, el que significa un increment de 60 mostres diàries.

b) Disposar d'un procediment més versàtil.

- El protocol de les 24 hores del sistema VIDAS[®] inclou incubacions llargues (d'unes 5-6 hores) per a detectar la *Salmonella* i aquest fet provoca una limitació important per l'horari de feina dels Laboratoris que treballin a 2 torns de matí i tarda.
- El sistema de la PCR no presenta tantes limitacions per processar les mostres ja que no inclou incubacions llargues dins del seu protocol analític (el temps d'incubació màxim és de 10 minuts).

c) Augmentar la sensibilitat.

- El sistema de PCR permet detectar, en inici, fins a 1 sola molècula de DNA del microorganisme analitzat (cal tenir en compte que, durant la pre-incubació, el bacteri, si és viu, es multiplicarà i es trobarà, a la mostra, en concentracions més detectables) la qual cosa suposa un increment en el grau de fiabilitat dels resultats i així evitar els falsos negatius.

d) Incrementar l'especificitat.

- El fonament de la PCR minimitza les possibles interferències d'altres microorganismes que podrien donar falsos positius (com per exemple Enterobacteris afins a la *Salmonella*).

CAPÍTOL 2. OBJECTIUS

L'objectiu d'aquest treball ha estat la validació d'un sistema de PCR a Temps Real per a la detecció de microorganismes patògens i la seva posterior implantació en la Indústria Alimentària. Els microorganismes que s'han assajat en el present estudi (*Salmonella*, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* i *Cronobacter sakazakii*) són d'interès degut a la seva patogenicitat en nadons i nens de curta edat raó per la qual estan legislats a la Indústria de l'Alimentació Infantil.

Els **objectius generals** han estat els següents:

1. Implantar la tècnica de PCR en la detecció de microorganismes patògens.
2. Aplicar el procediment analític més eficaç en la rutina de treball dels Laboratoris de les Indústries.

Els **objectius específics** han estat:

- 1.a) Estudiar les característiques i el comportament, enfront el procediment analític, de diferents productes infantils i les matèries primeres que s'utilitzen per a la seva fabricació.
- 1.b) Provar diferents mètodes i medis de cultiu per avaluar l'eficàcia de cada tècnica per a la detecció de microorganismes patògens d'interès en la indústria d'alimentació infantil: *Salmonella*, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* i *Cronobacter sakazakii*.
- 1.c) Avaluar la sensibilitat, especificitat i repetibilitat entre els mètodes assajats mitjançant assajos de validació interna segons la ISO 16140:2003.
- 1.d) Estudiar la correlació i el nivell de significació estadística entre els protocols analítics sotmesos a estudi.
- 2.a) Minimitzar el temps necessari per a obtenir els resultats.
- 2.b) Incrementar la capacitat analítica dels Laboratoris.

CAPÍTOL 3. MATERIAL I MÈTODES

3.1. PROTOCOL DE TREBALL.

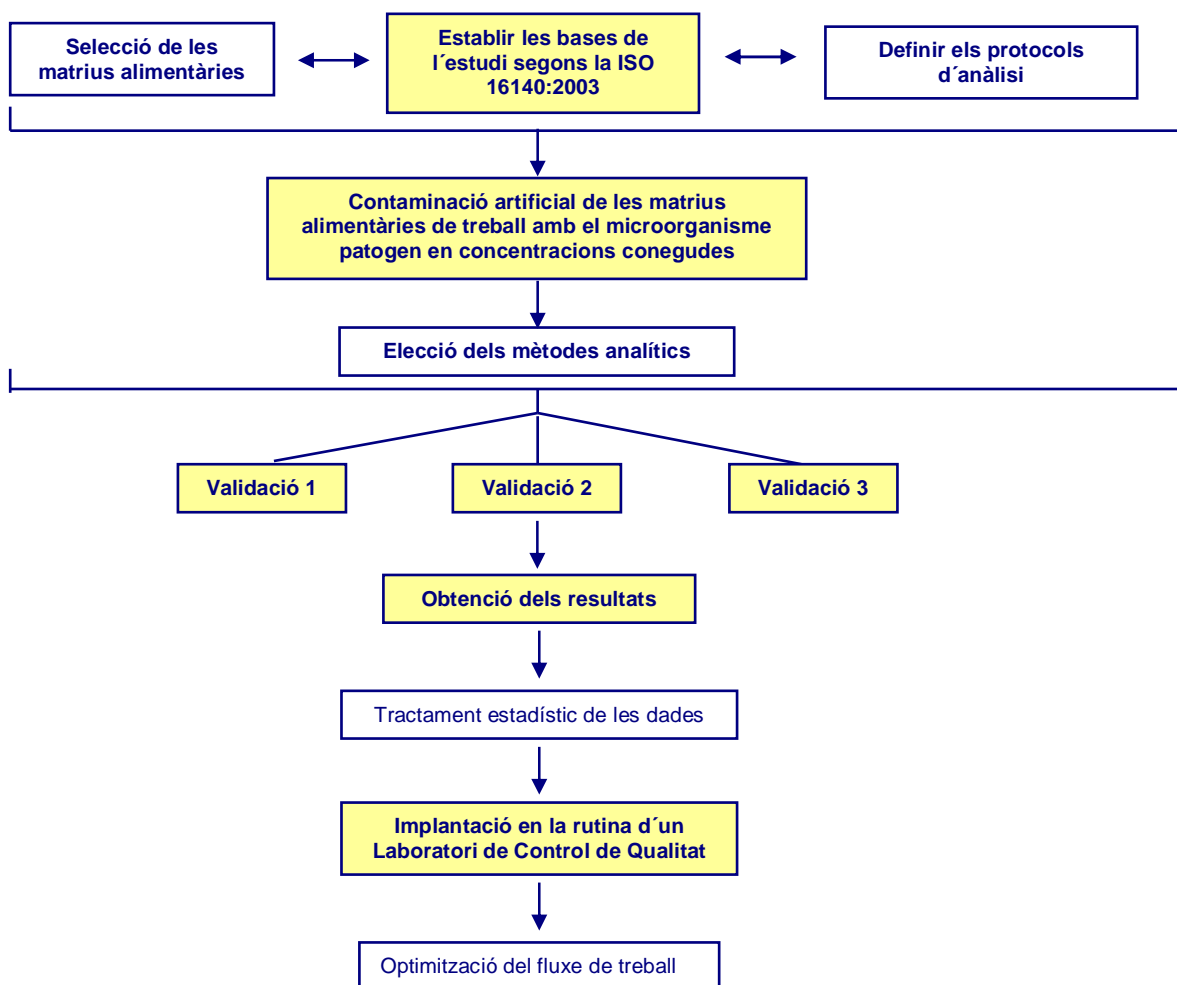
En la taula següent es detallen els microorganismes patògens amb els quals s'ha treballat al llarg de les validacions presentades en aquest estudi. També es presenten les matrius alimentàries assajades i les tècniques analítiques avaluades en cada cas.

Taula 25. Esquema de les validacions amb els patògens i matrius analitzades en aquest estudi.

Microorganisme	Mostres analitzades	Matrius assajades	Tècniques avaluades
Salmonella (Anàlisi individual)	72	Fórmules Infantils	<ul style="list-style-type: none"> ○ Mètode ISO 6579. ○ Sistema ICS-VIDAS[®] de bioMérieux (França). ○ PCR: TaqMan[®] <i>Salmonella enterica</i> Detection Kit.
	96	Papilles	
	96	Farines	
	96	Productes Minoritaris	
Salmonella (Anàlisi agrupat SENSE soja)	36	Fórmules Infantils	<ul style="list-style-type: none"> ○ Mètode ISO 6579. ○ PCR: TaqMan[®] <i>Salmonella enterica</i> Detection Kit.
	48	Papilles	
Salmonella (Anàlisi agrupat AMB soja)	36	Fórmules Infantils	
	48	Papilles	
Listeria monocytogenes	36	Fórmules Infantils	<ul style="list-style-type: none"> ○ Sistema LMO2-VIDAS[®] de bioMérieux (França). ○ PCR: TaqMan[®] <i>Listeria monocytogenes</i> Detection Kit.
Staphylococcus aureus	27	Fórmules Infantils	<ul style="list-style-type: none"> ○ Mètode ISO 6888-2. ○ PCR: TaqMan[®] <i>Staphylococcus aureus</i> Detection Kit.
	36	Papilles	
	18	Farines	
Cronobacter sakazakii	36	Fórmules Infantils	<ul style="list-style-type: none"> ○ Mètode ISO 22694. ○ PCR: TaqMan[®] <i>Cronobacter sakazakii</i> Detection Kit.

S'ha avaluat l'efecte d'addicionar **proteïna de soja** en les mostres agrupades ja que, en un estudi previ, es va comprovar que les Fórmules Infantils que contenien soja en la seva composició detectaven millor la *Salmonella* que les Fórmules Infantils que no contenien aquest ingredient (Rodríguez, J.J. 2007). Per tant, es va comprovar que la soja estimulava en certa manera **el creixement bacterià**. L'objectiu és estudiar amb diferents Fórmules Infantils si els percentatges de detecció de positius de les tècniques ISO i PCR varien en funció de la presència o no de proteïna de soja en les mostres agrupades analitzades.

Figura 10. Esquema de treball de les diferents validacions del present estudi.



Per a elaborar els fluxos de treball (taules 25 i 26), s'ha pres com a referència la ISO 16140:2003 per a la validació de mètodes microbiològics. S'han tingut en compte propietats analítiques com el límit de detecció i els efectes de la

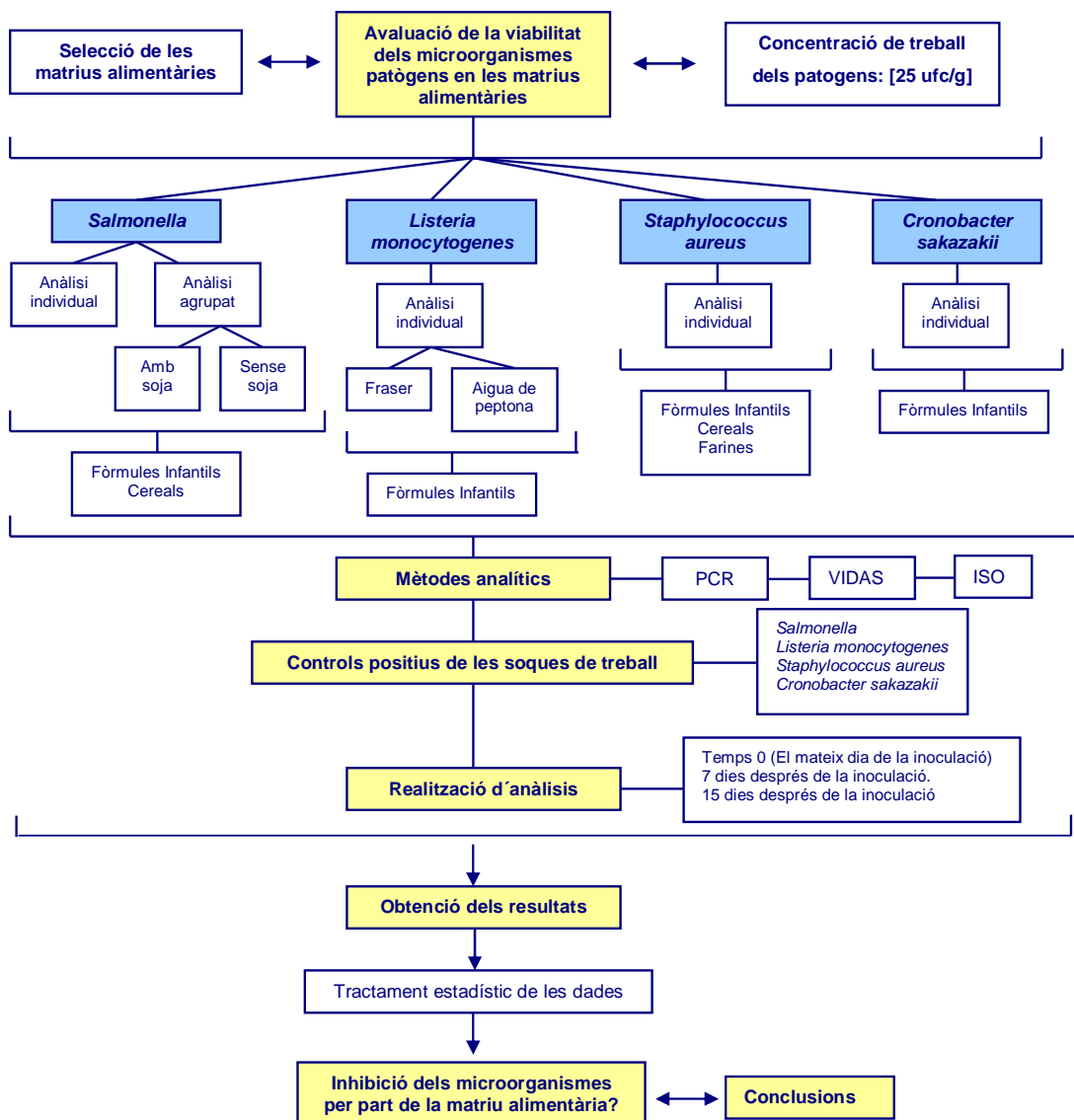
matriu per a elaborar aquest pla de treball. En primer lloc, s'han triat les matrius alimentàries d'estudi per a cada microorganisme i s'han escollit les tècniques per a cada assaig. Finalment, en el cas d'obtenir resultats òptims, caldrà estudiar com introduir aquest nou sistema en la rutina de treball del Laboratori de la Indústria, així com preveure un pla de formació intern al personal del Laboratori que treballarà amb aquesta tècnica.

Al llarg dels estudis de validació, s'ha detectat un elevat nombre de mostres artificialment inoculades no detectades per cap tècnica analítica. Amb l'objectiu d'investigar les causes d'aquesta baixa detecció, s'ha realitzat un estudi de viabilitat (apartat 4.6.) per tal d'intentar determinar si la baixa positivitat ha estat deguda a què els patògens s'han vist inhibits per les matrius alimentàries on havien estat inoculats.

Taula 26. Esquema de les validacions dels assajos de viabilitat.

Positivitat	Tipus d'anàlisi	Matriu	Tècniques avaluades
<i>Salmonella</i>	Individual	Fórmules Infantils	<ul style="list-style-type: none"> ○ Mètode ISO 6579. ○ TaqMan[®] <i>Salmonella enterica</i> Detection Kit.
		Papilles	
	Agrupat amb i sense soja	Fórmules Infantils	
		Papilles	
<i>Listeria monocytogenes</i>	Individual (Brou Fraser i Aigua de Peptona Tamponada)	Fórmules Infantils	<ul style="list-style-type: none"> ○ Sistema LMO2-VIDAS[®] de bioMérieux (França). ○ TaqMan[®] <i>Listeria monocytogenes</i> Detection Kit.
<i>Staphylococcus aureus</i>	Individual	Fórmules Infantils	<ul style="list-style-type: none"> ○ Mètode ISO 6888-2. ○ TaqMan[®] <i>Staphylococcus aureus</i> Detection Kit.
		Papilles	
		Farines	
<i>Cronobacter sakazakii</i>	Individual	Fórmules Infantils	<ul style="list-style-type: none"> ○ Mètode ISO 22694. ○ TaqMan[®] <i>Cronobacter sakazakii</i> Detection Kit.

Figura 11. Flux de treball dels assajos de viabilitat.



3.2. Matrius alimentàries estudiades.

S'ha realitzat un estudi experimental amb diferents varietats de productes infantils i amb d'altres matèries primeres que s'utilitzen per a la seva fabricació.

Productes
Fórmules Infantils: Inclou Fórmules d'inici i Fórmules especials.
Papilles amb diferent composició nutricional (amb mel, sense gluten, amb hortalisses, principalment).
Farines que representen més del 90% de la composició dels Papilles.
Productes Minoritaris: Són aquells que formen part de la Fórmula final del producte acabat (Fórmules Infantils i Papilles) en un percentatge inferior a l'1%.

3.3. SOQUES DE TREBALL.

Les soques inoculades i les concentracions de treball, durant aquest estudi, han estat les següents:

Soques de treball	Concentracions de treball (ufc/g)			
<i>Salmonella typhimurium</i> ATCC 13311	0	1-5	5-10	25
<i>Listeria monocytogenes</i> CECT 935				
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538P				
<i>Cronobacter sakazakii</i> ATCC BAA 894				

Cada microorganisme s'ha estudiat en unes matrius en concret (i no en d'altres) tenint en compte les directrius de:

- La Legislació espanyola.
- La Reglamentació europea.
- Pla de Control de les Indústries Alimentàries.

3.4. INOCULACIONS.

Les inoculacions de les soques de treball s'han realitzat segons es descriu en els passos següents:

- 0,5 ml d'aigua destil·lada estèril han estat transferits a un tub liofilitzat, homogeneïtzat i incubat a temperatura ambient durant 2 hores aproximadament.
- Després d'aquest temps, 1 ml del microorganisme reconstituït s'inocula en un tub que conté 9 ml d'aigua de peptona tamponada estèril.
- Després de la incubació d'aquest tub inoculat durant 24 hores a 37°C, s'utilitzen 10 µl per a inocular un nou tub amb 9 ml d'aigua de peptona tamponada estèril el qual també s'incuba a 37°C durant 24 hores.
- El nivell d'inoculació es calcula mitjançant un Microscopi d'Epifluorescència Directa utilitzant un Live-Dead[®] Kit (Invitrogen) que té un màxim d'excitació entre 480-490 nm.

Aquest mètode ha estat seleccionat perquè la preparació sigui ràpida i senzilla i perquè permet discriminar específicament cèl.lules vives i danyades.

Per a millorar-lo, s'ha utilitzat un Microscopi de Fluorescència Olympus BX 51 (Olympus, Tokio, Japó), determinant un recompte precís mitjançant la captura d'imatge i la posterior anàlisi amb el software Analysis 3.2. (veure Figura 12). Aquest sistema permet determinar nivells de contaminació propers a 1 microorganisme per mil.lilitre.

Les inoculacions dels microorganismes s'han realitzat en la bossa d'stomacher que conté els grams corresponents de producte deshidratat (en pols) i s'ha mantingut tancada a temperatura ambient fins el moment del seu anàlisi.



Figura 12. Aquestes fotografies han estat fetes a cèl.lules vives de *Salmonella* mitjançant una càmera digital Olympus DP-50 incorporada al microscopi i les anàlisis de les imatges han estat realitzades mitjançant un Soft Imaging SystemTM (analysis GMBH, Alemanya) també incorporat a un sistema informàtic connectat al microscopi.

3.5. ETAPA DE PRE-INCUBACIÓ.

En les taules següents es detallen els grams de producte, el volum de reconstituent així com la temperatura i temps d'incubació per a realitzar les pre-
incubacions de les diferents matrius assajades per cada microorganisme tenint en compte les indicacions que estableixen les respectives normes ISO.

a) Fórmules Infantils.

Taula 27. Esquema de l'anàlisi de les Fórmules Infantils.

Microorganisme	grams de treball	reconstituent (*)	Incubació	
			Temperatura (°C)	Temps (hores)
<i>Salmonella</i> individual	25	225 ml d'aigua de peptona tamponada	37 ± 0,3	18 ± 2
<i>Salmonella</i> agrupada SENSE SOJA	125	1.125 ml d'aigua de peptona tamponada		
<i>Salmonella</i> agrupada AMB SOJA		1.125 ml d'aigua de peptona tamponada + 6,25 grams de proteïna de soja		
<i>Listeria monocytogenes</i>	25	225 ml de brou Fraser Semi	30 ± 1	24 - 26
<i>Staphylococcus aureus</i>	10	90 ml d'aigua de peptona tamponada	37 ± 1	18 - 24
<i>Cronobacter sakazakii</i>				18 ± 2

(*) Consideracions generals.

- Per a optimitzar l'anàlisi en les matrius de Papilles i Farines, s'ha preparat la dilució 1:10 (10 grams de producte + 90 ml d'aigua de peptona) en bosses d'estomacher amb filtre per tal de retenir part dels residus de partida del producte i així poder pipetejar un pre-enriquiment més lliure de partícules, la qual cosa afavorirà l'extracció del DNA de la mostra.
- Amb les matrius de Fórmules Infantils i Productes Minoritaris s'ha treballat amb bosses d'estomacher sense filtre perquè les matrius de partida no presenten tantes restes de producte que afectin a l'extracció del DNA.

- Els reconstituents del producte (aigua de peptona i Fraser Semi) han estat preparats comercialment (bioMérieux-França).
- Les matrius alimentàries i els reconstituents s'introdueixen en una bossa d'stomacher.
- Aquestes bosses s'agiten en un stomacher durant 1-2 minuts aproximadament per a garantir una correcta homogenització de la mostra.

b) Papilles, Farines i Productes Minoritaris.

Taula 28. Esquema de l'anàlisi de les Papilles, Farines i Productes Minoritaris.

Microorganisme	grams de treball	reconstituent (*)	Incubació	
			Temperatura (°C)	Temps (hores)
<i>Salmonella</i>	30	270 ml d'aigua de peptona tamponada	37 ± 0,3	18 ± 2
<i>Salmonella</i> agrupada SENSE SOJA	150	1.350 ml d'aigua de peptona tamponada		
<i>Salmonella</i> agrupada AMB SOJA		1.350 ml d'aigua de peptona tamponada + 7,5 grams de proteïna de soja		
<i>Staphylococcus aureus</i>	10	90 ml d'aigua de peptona tamponada	37 ± 1	18 - 24

S'anomena **mostra agrupada** al conjunt de 5 pesades de producte en una sola mostra.

- En el cas de les **Fórmules Infantils**, s'han ajuntat 5 pesades de 25 grams en una sola bossa d'stomacher de gran tamany sense filtre que conté un total de 125 grams de producte.

Els 25 grams pesats de Fórmula Infantil estan establerts a la Reglamentació europea.

A aquesta mostra agrupada de 125 grams se li ha afegit 9 vegades el volum de diluent; és a dir 1.125 ml d'aigua de peptona que representa la dilució 1:10.

- Per les **Papilles**, s'han agrupat 5 pesades de 30 grams en una bossa d'estomacher de gran tamany amb filtre que conté un total de 150 grams de producte.

Els 30 grams pesats de Papilles estan establerts a la Legislació espanyola.

A aquesta mostra agrupada de 150 grams se li ha afegit 9 vegades el volum de diluent; és a dir 1.350 ml d'aigua de peptona que representa la dilució 1:10.

- S'han fet agrupacions de 5 en 5 (i no amb d'altres números) ja que el 5 és un múltiple de 30 que correspon al nombre total d'anàlisis que estableix la Reglamentació europea per les Fórmules Infantils i la Legislació espanyola per les Papilles que s'ha d'analitzar en cada lot de producte abans de comercialitzar-lo. Per tant, 30 mostres agrupades de 5 en 5 suposa l'anàlisi d'un total de 6 mostres agrupades per lot.
- Donat que s'han agrupat 5 mostres en 1, s'ha treballat amb la quantitat proporcional d'enriquiment (mostra obtinguda després de la incubació) per a fer l'extracció del DNA, és a dir, enlloc de treballar amb 1 ml, que és el volum d'enriquiment extret per a 1 sola pesada de producte (25 grams en Fórmules Infantils i 30 grams de Papilla); s'han extret 5 ml que és volum corresponent a 5 pesades (125 grams en Fórmules Infantils i 150 grams de Papilla).

Pel que fa a la quantitat de proteïna de soja a addicionar, es va estudiar, en un assaig previ, diferents percentatges de proteïna de soja (des de l'1% fins el 10%) en la mostra agrupada (Rodríguez, J.J. 2007). Es va observar que amb un 5% de proteïna de soja hi havia suficient com per detectar de manera efectiva la *Salmonella* en la mostra agrupada. Per tant, la **quantitat de proteïna de soja** a afegir va quedar establerta de la següent manera:

- 1,25 grams de proteïna de soja per cada 25 grams de Fórmula Infantil. Equival a 6,25 grams en una mostra agrupada de 125 grams de producte.
- 1,5 grams de soja en 30 grams de Papilla. Correspon a 7,5 grams de proteïna en una mostra agrupada de 150 grams.

3.6. MÈTODES D'ANÀLISI.

Mesures preventives.

Aplicades en les anàlisis individuals i agrupades de mostres.

Per tal d'evitar contaminacions creuades entre mostres (especialment a través de l'ambient) s'han aplicat les següents **mesures preventives**:

<ul style="list-style-type: none"> ▪ Utilitzar pressió positiva a les sales. 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Treballar dins de cabines de flux laminar.
<ul style="list-style-type: none"> ▪ Treballar amb escovillons estèrils. 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Emprar guants sense talc.
<ul style="list-style-type: none"> ▪ Fer servir puntes de pipeta amb filtres. 	

3.6.1. Anàlisi de *Salmonella*

3.6.1.1. ISO 6579:2002 (Anònim. 2003d).

Després de la pre-incubació en aigua de peptona, es transfereix, segons s'indica en aquesta normativa ISO:

- 100 µl de la mostra pre-incubada a 1 tub que conté 10 ml de medi Rappaport Vassiliadis amb soja (RVS) (de la casa comercial bioMérieux, França).
- 1 ml de la mostra pre-incubada a 1 tub que conté 10 ml del brou Müller-Kauffmann tetratonato novobiocina (MKTTn) (de la casa comercial bioMérieux, França).

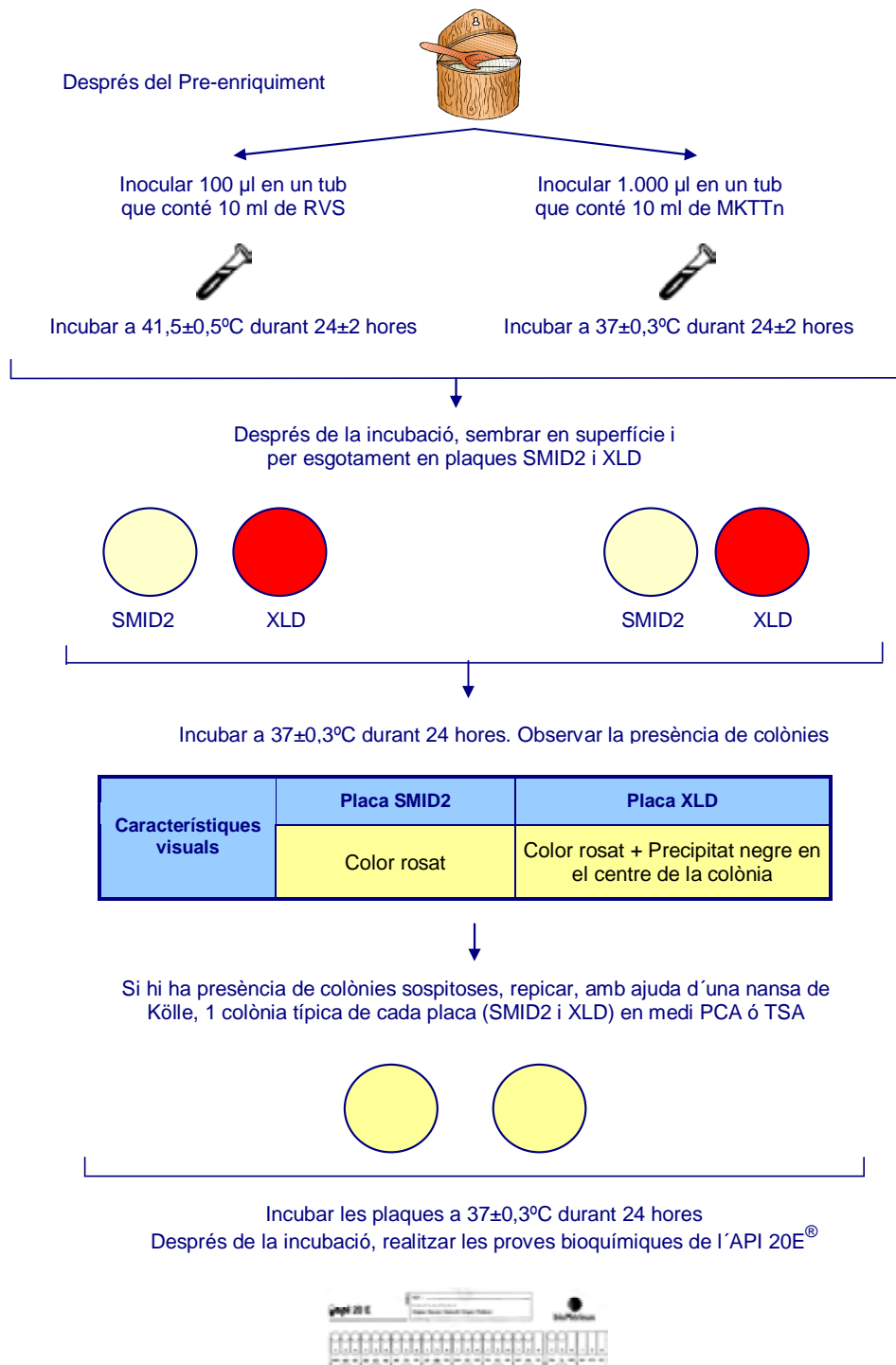
Els tubs s'incuben durant 24±2 hores a les següents temperatures:

a) RVS: a 41,5±0,5°C.

b) MKTTn: 37±0,3°C.

Després de la incubació, i amb l'ajuda d'una nansa de Kölle, a partir de cada tub (RVS i MKTTn), se sembra en superfície, en plaques amb medi SMID2[®] (Salmonella Identificación) i XLD[®] (Xilosa, Lisina, Desoxicolat) (de la casa comercial bioMérieux, França). Les plaques s'incuben a 37±0,3°C durant 24 hores. Les confirmacions s'han realitzat mitjançant les galeries API-20 E[®] (bioMérieux-França).

Figura 13. Esquema de la metòdica ISO 6579:2002 (Anònim, 2003d).



3.6.1.2. Mètode ICS-VIDAS® (bioMérieux, França).

Procediment d'Inmuno-concentració de *Salmonella* (ICS).

1. Després de la incubació amb aigua de peptona, es deposita en el pouet obert (número 4) del cartutx ICS, 800 µl del brou de pre-enriquiment en aigua de peptona.
2. Es col.loca, amb precaució, en el VIDAS®, el conus i el cartutx.

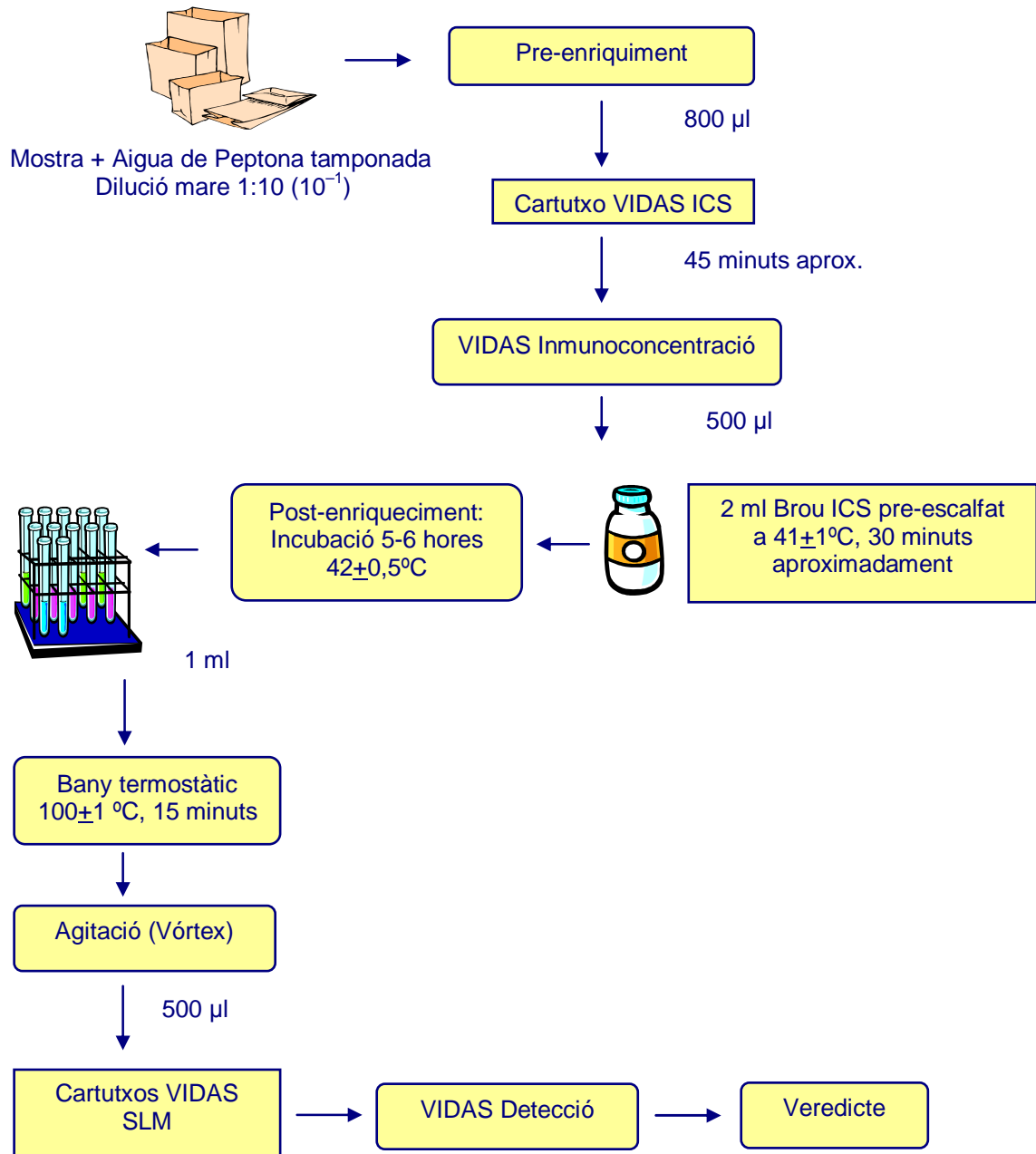
Post-enriquiment.

3. Pre-escalfar els vials que contenen brou ICS en una estufa a $41\pm 1^{\circ}\text{C}$ durant 30 minuts aproximadament.
4. Pipetejar la quantitat total (aproximadament 500 µl) del pouet número 1 del cartutx ICS i introduir-lo en un vial de cultiu ICS (de 2 ml aproximadament).
5. Incubar el vial de cultiu durant 5–6 hores a $42\pm 0,5^{\circ}\text{C}$ per a estimular la formació de flagels.
6. Després de la incubació, traspasar, amb ajuda de una micropipeta, 1 ml del vial de cultiu ICS a un tub d'assaig tancat, no necessàriament estèril.
7. Tancar els tubs i escalfar a $100\pm 1^{\circ}\text{C}$ durant 15 minuts aproximadament, en un bany termostàtic.

Procediment de Detecció.

8. Pipetejar 500 µl del tub (termitzat) i introduir-los en el pouet número 1 del cartutx SLM.
9. Posar, amb precaució, en el VIDAS®, el conus i el cartutx.
10. Al finalitzar el cicle (45 minuts aproximadament), s'obté el veredict de la mostra.

Figura 14. Esquema de la metòdica ICS-VIDAS®.



3.6.1.3. Kit de PCR avaluat.

S'ha avaluat el kit TaqMan® PCR *Salmonella* amplification/detection kit d'Applied Biosystems amb un equip Applied Biosystems HT7900 i Applied Biosystems 7300 PCR System.

Després del pre-enriquiment es procedeix a l'extracció del DNA i la detecció del microorganisme per amplificació del seu DNA per PCR.

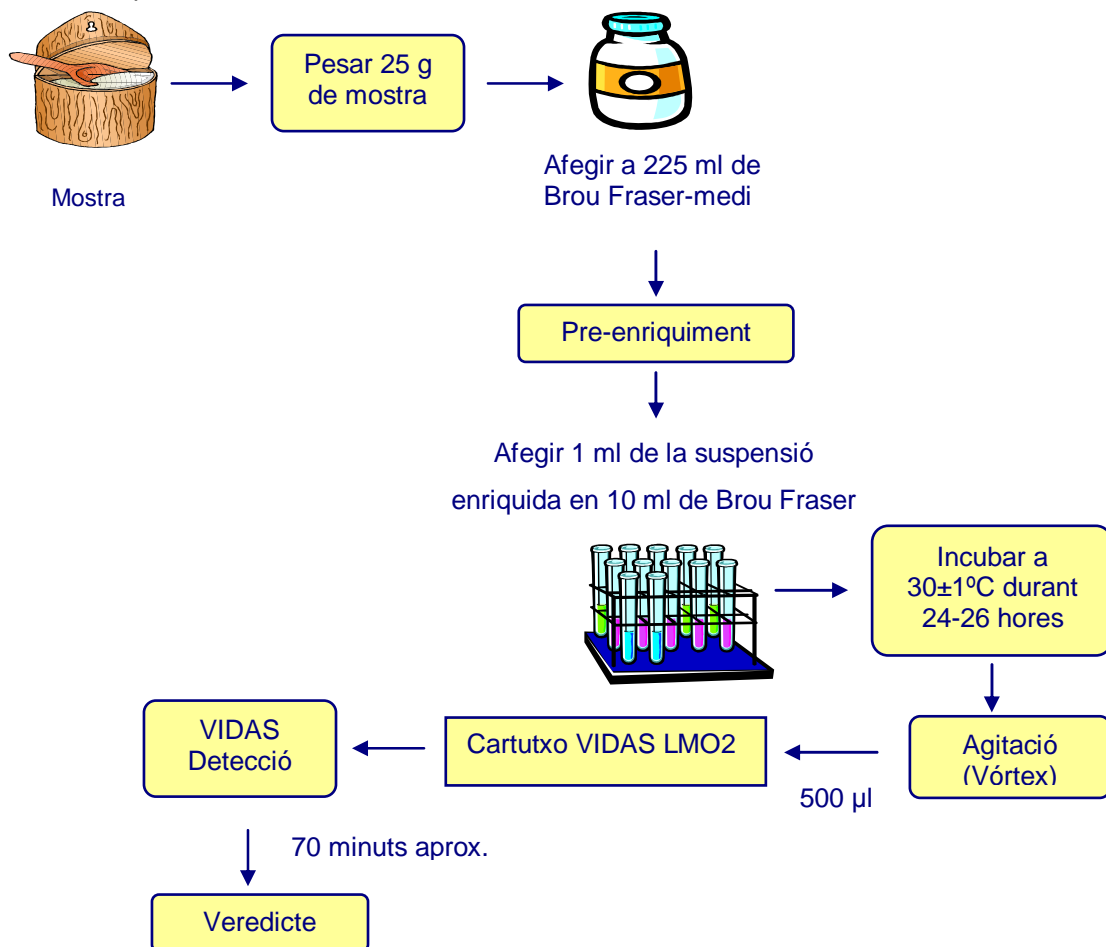
3.6.2. Anàlisi de *Listeria monocytogenes*

3.6.2.1. Mètode LMO2-VIDAS® (bioMérieux, França).

Partint de la pre-incubació en brou Fraser Semi, cal afegir 1 ml d'aquest pre-enriquiment a un tub que conté 10 ml de brou Fraser.

Incubar els tubs a $30\pm 1^{\circ}\text{C}$ durant 24-26 hores i després de la incubació, pipetejar 500 µl de la mostra en un cartutx LMO2.

Figura 15. Esquema de la metòdica LMO2-VIDAS®.



3.6.2.2. Kit de PCR avaluat.

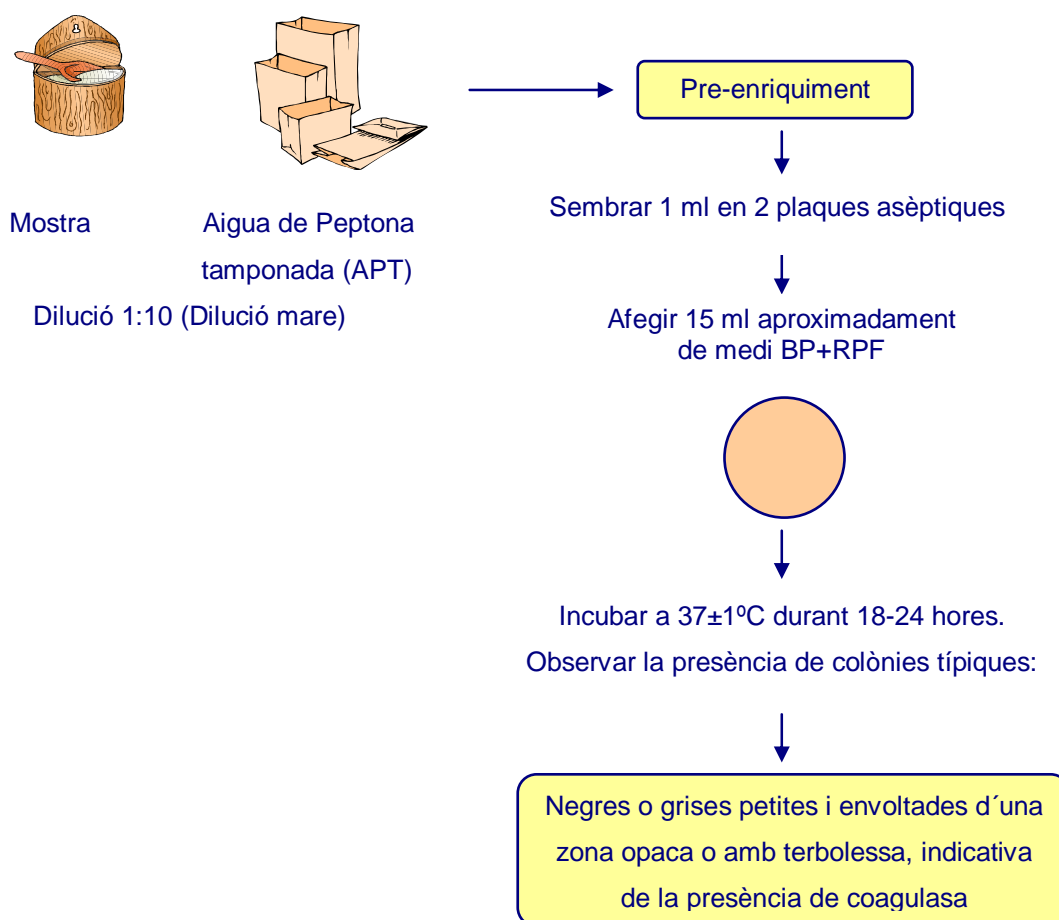
S'ha avaluat el kit TaqMan® PCR *Listeria monocytogenes* amplification/detection kit d'Applied Biosystems amb un equip Applied Biosystems 7300 PCR System.

3.6.3. Anàlisi d'*Staphylococcus aureus*

3.6.3.1. Mètode ISO 6888-2:1999 (Anònim. 1999).

En aquest cas, segons el que es descriu en el protocol de treball ISO, no es realitza pre-incubació prèvia de la mostra sinó que s'inocula directament en la placa que conté el medi de cultiu (Baird Parker+RPF).

Figura 16. Esquema de la metòdica ISO 6888-2:1999.



3.6.3.2. Kit de PCR avaluat.

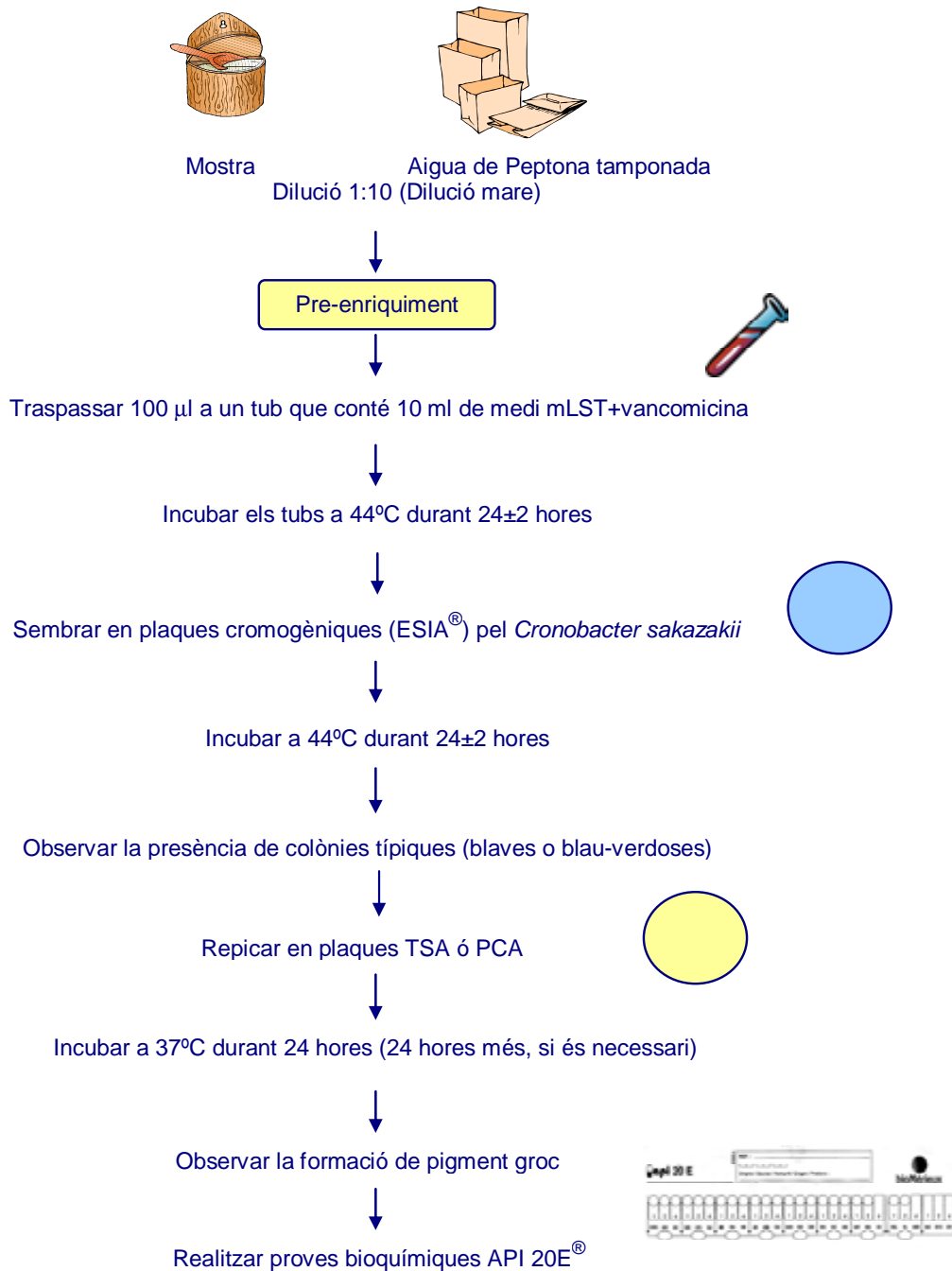
S'ha avaluat el kit TaqMan[®] PCR *Staphylococcus aureus* amplification/detection kit d'Applied Biosystems amb un equip Applied Biosystems 7300 PCR System.

3.6.4. Anàlisi de *Cronobacter sakazakii*

3.6.4.1. Mètode ISO 22964:2006 (Anònim. 2006d).

Aquest mètode consta d'una pre-incubació inicial amb aigua de peptona seguit d'una incubació selectiva en medi modificat (m)LST (Lauryl Sulphate Tryptose Broth) amb vancomicina per tal d'afavorir el creixement d'aquest microorganisme de forma selectiva.

Figura 17. Esquema de la metòdica ISO 22964:2006.



Degut a l'elevat risc per a la salut associat al *Cronobacter sakazakii*, la ISO ha elaborat una especificació tècnica anomenada TS 22964:2006 (Anònim, 2006d), en la qual es defineix un mètode per a la detecció del *Enterobacter sakazakii* (actual *Cronobacter sakazakii*) en les Fórmules Infantils.

Aquest mètode està basat en l'enriquiment en aigua de peptona tamponada, un enriquiment modificat anomenat mLST i sembrar finalment en plaques cromogèniques anomenades ESIA®.

La identificació inclou:

- L'observació de pigment groc en les colònies sospitoses de *Cronobacter sakazakii* en medi TSA (o PCA) a 25°C.
- Confirmació de l'espècie per les característiques bioquímiques.

El procediment de detecció i confirmació pot necessitar de 5-7 dies perquè estigui complert (Derzelle, S. *et al.* 2006).

3.6.4.2. Kit de PCR avaluat.

S'ha avaluat el kit TaqMan® PCR *Cronobacter sakazakii* amplification/detection kit d'Applied Biosystems amb un equip Applied Biosystems 7300 PCR System.

3.7. SISTEMA PCR.

a) Protocol d'extracció del DNA.

En aquest estudi, s'aplica el **protocol estàndar** d'extracció de DNA amb el reactiu PrepMan Ultra (Applied Biosystems). El procediment és el següent:

1. Es parteix del brou pre-incubat, descrit en l'apartat 3.5., i que és específic segons el patògen analitzat.

2. De cada bossa d'estomacher que conté aquest pre-enriquiment, es transfereix 1 ml a un eppendorf de 1,5-2 ml de capacitat amb tancament de rosca.
3. Centrifugar els eppendorfs a 13.000 rpm durant 3 minuts.
4. Eliminar el sobrenedant.
5. Afegir 100 µl de PrepMan Ultra.
6. Homogeneïtzar vigorosament amb ajuda d'un agitador.
7. Escalfar en un bloc tèrmic a 100°C durant 10 minuts.
8. Després de la incubació, es tornen a homogeneïtzar les mostres.
9. Centrifugar a 13.000 rpm durant 3 minuts.
10. Preparar la dilució 1:10 de treball:
 - 10.1 Agafar 10 µl del sobrenedant (obtingut en el pas 9.).
 - 10.2. Afegir 90 µl d'aigua estèril.
 - 10.3. Homogeneïtzar.

D'aquesta dilució 1:10, s'utilitzaran 12 µl per a realitzar l'amplificació per PCR.

b) Optimització del protocol d'extracció de DNA. Aplicació a diferents matrius.

A part del protocol estàndar, s'han introduït i/o modificat etapes per tal d'optimitzar l'extracció del DNA en matrius que han presentat inhibició per PCR.

Les principals modificacions introduïdes han estat:

- a) Pre-centrifugacions addicionals.
- b) Incrementar el volum del reactiu d'extracció del DNA (PrepMan).
- c) Treballar amb una bateria de dilucions de la mostra de treball.

Els protocols d'extracció de DNA modificats per a cada matriu alimentària han estat els següents:

Matriu alimentària	Protocol d'extracció del DNA
Fórmules Infantils:	Estàndar + 100 µl de PrepMan.
Papilles:	Estàndar + 400 µl de PrepMan.
Farines:	Centrifugació inicial prèvia + 400 µl de PrepMan.
Productes minoritaris:	S'han assajat l'efecte de diferents variables: a) Rentats amb tampó PBS. b) Centrifugacions addicionals. c) Treballar amb diferents dilucions del sobrenedant. d) Filtració amb columnes Microcon.

L'efectivitat d'aquestes modificacions es detallen en el capítol de "Resultats".

c) Reacció de PCR.

La placa de PCR es carrega amb els següents components:

18 µl de la Barreja Màster Mix (MM) formada per:
- 15 µl d'Environmental Màster Mix (2 x EMM).
- 3 µl de l'assaig diana (10 x TAM).
12 µl de Mostra:
- Obtinguda en el pas 10 de l'apartat anterior.

Per tant, el volum final de treball, en cada pouet, és de 30 µl (18 µl de Màster Mix + 12 µl de mostra) i cada pouet representa 1 mostra. A més, en cada pouet s'afegeix un control positiu d'amplificació (IPC, Internal Positive Control) per a verificar que la reacció de la PCR ha tingut lloc i no s'ha produït cap problema d'inhibició.

d) Condicions de PCR.

A continuació es detallen les característiques de la reacció de PCR dins de l'equip de Real Time.

Etapa 1:	95°C durant 10 minuts per a activar la Taq polimerasa.
Etapa 2:	95°C durant 15 segons i 60°C durant 1 minut (45 cicles).

Els paràmetres estudiats han estat els següents:

- **Delta R_(n):** Representa la intensitat de fluorescència de la mostra respecte a un valor de referència.
- **C_(T):** Cicle en el qual la intensitat de fluorescència supera el llindar establert. Superar el llindar significa que la mostra és positiva; és a dir, que s'ha detectat la presència del patògen que s'estava investigant.

e) Anàlisi de les dades.

Els resultats de l'amplificació per PCR s'han analitzat amb el software SDS 2.1 (Sequence Detection System, d'Applied Biosystems). L'amplificació del control intern positiu (IPC) cal que sigui visible en totes les mostres per a validar que la mostra es pot amplificar per PCR i no presenta inhibició degut a les característiques de les matrius originals analitzades.

3.8. TRACTAMENT ESTADÍSTIC.

Pel tractament estadístic d'aquest estudi, s'ha utilitzat el software SPSS (SPSS version 14.0 for Windows). S'ha treballat amb el test estadístic de la "Xi-quadrat" i amb 1 grau de llibertat amb la finalitat de trobar diferències significatives respecte als valors positius detectats per les tècniques analítiques avaluades. El nivell de significació aplicat ha estat de $p < 0.05$.

3.9. CRITERI DE DECISIÓ DELS RESULTATS.

Els resultats detectats durant les validacions realitzades en el present treball han estat avaluats segons el següent criteri:

- ✓ **Mostra Positiva:** Si una mostra, artificialment inoculada, és detectada per alguna de les tècniques d'anàlisi, la mostra s'ha considerat com a positiva.
- ✓ **Mostra Negativa:** Si una mostra, artificialment inoculada, no ha estat detectada per **cap tècnica analítica**, la mostra s'ha considerat com a negativa (malgrat haver estat inoculada inicialment).

3.10. ESTUDI PRELIMINAR D'EXTRACCIÓ DEL DNA REALITZAT EN PRODUCTES MINORITARIS PER A LA DETECCIÓ DE *Salmonella* PER PCR.

A continuació es mostren els diferents protocols d'extracció del DNA que s'han assajat en els productes minoritaris per tal de reduir els casos d'inhibició per PCR.

Un **producte minoritari** és aquell que forma part de la fórmula final del producte acabat (Fórmules Infantils i Papilles) en un percentatge inferior a l'1%.

El kit de PCR de la *Salmonella* és el primer amb el qual s'ha treballat pels següents motius:

- Quan es van començar les validacions, era l'únic kit disponible comercialment.
- S'analitza majoritàriament en els productes minoritaris.

S'ha assajat amb 400 µl de PrepMan donat que el pellet, després del primer pas de centrifugació, era molt prominent.

A la taula que es presenta a continuació, el que s'anomena com a dilució **1:10**, **1:20** i **1:50** són les dilucions preparades a partir del sobrenedant obtingut en l'últim pas de l'extracció del DNA.

Aquestes dilucions són les que es van carregar a la placa de PCR pel seu posterior anàlisi. El que es vol és estudiar quina dilució és capaç de minimitzar els efectes inhibitoris de la matriu sense deixar de detectar la presència del patogen inoculat.

Protocols	Etapa adicional	Dilucions carregades en la placa de PCR		
Minoritari_1	No	1:10	1:20	1:50
Minoritari_2	2 rentats amb tampó PBS (1x)			
Minoritari_3	Centrifugació a 2.000 rpm, 3 minuts			
Minoritari_4	Filtració en columnes Microcon			

S'han introduït etapes addicionals amb l'objectiu de minimitzar les substàncies inhibidores de la PCR, presents en la matriu, com són:

- Treballar amb diferents dilucions de treball.
- Fer rentats amb el tampó PBS.
- Incloure un pas extra de centrifugació.
- Filtrar amb columnes Microcon.

En els protocols presentats en la taula anterior, s'ha treballat amb diferents tipus de productes minoritaris.

Els trets en comú dels 4 assajos han estat que s'ha pesat 30 grams de cada minoritari als quals s'ha afegit 270 ml d'aigua de peptona tamponada formant el que s'anomena com a dilució 1:10. Aquesta dilució s'ha incubat durant 18±2 hores a 37±0,3°C.

En tots els casos, el volum de PrepMan utilitzat ha estat de 400 µl.

ESTUDI PRELIMINAR D'EXTRACCIÓ DEL DNA REALITZAT EN FÓRMULES INFANTILS PER A LA DETECCIÓ DE *Listeria monocytogenes* PER PCR.

Seguidament es mostren els diferents protocols d'extracció del DNA assajats en les Fórmules Infantils per tal de reduir la inhibició que provoca el brou d'enriquiment Fraser Semi i el brou Fraser en la reacció de PCR per a la detecció de la *Listeria monocytogenes*.

Protocols	Etapa adicional
Listeria_1	No
Listeria_4	TSB+Extractede llevat
Listeria_5	2 rentats amb tampó PBS (1x)

En tots els casos, s'ha treballat amb 25 grams de Fórmula Infantil a la qual s'ha afegit 225 ml de brou Fraser Semi. Aquesta dilució s'ha sotmès a una primera pre-incubació durant 24-26 hores a $30\pm 1^{\circ}\text{C}$. Després de la incubació, s'han introduït unes etapes alternatives en el protocol d'extracció amb l'objectiu de minimitzar les substàncies inhibidores de la PCR.

Aquestes etapes són les següents:

- El protocol [Listeria_1](#) representa el protocol que estableix la norma ISO: Primer s'incuba amb brou Fraser Semi i després en brou Fraser.
- Enlloc d'inocular el primer medi d'enriquiment Fraser Semi en el segon medi Fraser (que representa la segona etapa d'enriquiment establerta a la tècnica ISO), s'ha substituït aquest brou Fraser pel medi TSB+ Extracte de llevat. És el protocol [Listeria_4](#).

En aquest protocol s'ha valorat l'efecte del medi TSB+Extracte de llevat ja que en la bibliografia s'han descrit bons resultats de recuperació de *Listeria monocytogenes* (Salas, D. 2007).

c) Després de les 2 etapes d'enriquiment (primer amb brou Fraser Semi i segon amb brou Fraser), s'introdueixen rentats amb el tampó PBS. És el protocol [Listeria_5](#).

Per tant, l'objectiu es comparar el mètode ISO (Listeria_1) amb els altres 2 protocols alternatius (Listeria_4 i _5) que introdueixen alguna modificació per tal de valorar la seva capacitat de minimitzar els efectes inhibidors dels brous Fraser (Semi i normal) envers la reacció de PCR.

A partir d'aquests 3 protocols, s'ha realitzat l'extracció del DNA i el volum de PrepMan Ultra que s'ha afegit ha estat de 100 µl donat que era suficient pel pellet obtingut després de centrifugar la mostra.

3.11. ESTUDI PRELIMINAR D'ANÀLISI PER PCR PER AVALUAR LA VIABILITAT DE MICROORGANISMES PATÒGENS EN DIFERENTS MÀTRIS ALIMENTÀRIES.

A continuació es detallen els microorganismes dels quals s'ha estudiat la seva viabilitat al llarg del temps un cop inoculats en les matrius alimentàries que s'indiquen en cada cas.

La inoculació s'ha fet a temps zero (dia 1) en la matriu deshidratada i s'ha mantingut en aquesta situació a temperatura ambient fins passats 7 i 15 dies de la inoculació que és quan la mostra s'ha reconstituït amb el diluent corresponent segons el microorganisme a investigar (*Salmonella*, *Staphylococcus aureus* i *Cronobacter sakazakii* amb Aigua de Peptona Tamponada i *Listeria monocytogenes* amb Fraser Semi).

Un cop reconstituïda la mostra, s'ha iniciat l'anàlisi, amb les tècniques que s'indiquen a la taula següent, per a conèixer si el microorganisme és viable o no i si la tècnica, era per tant, capaç de detectar-lo.

En aquest estudi només s'ha treballat amb la concentració de microorganisme de [25 ufc/g] pel següent motiu: garantir que, després de la pre-incubació, hi hagi quantitat suficient de microorganisme com per ser detectat ja que en aquest estudi no s'està valorant la sensibilitat i capacitat de detecció del mètode sinó la viabilitat del microorganisme al llarg del temps.

Pel cas concret de la *Salmonella*, s'ha inclòs l'estudi amb mostres agrupades, amb l'objectiu de saber si la tècnica analítica seria capaç de detectar igualment la presència de *Salmonella*. Només s'ha assajat per la *Salmonella* perquè és, amb diferència, el patògen que origina major nombre d'anàlisis en comparació amb els altres microorganismes estudiats.

Microorganismes estudiats (*)	Matrius (**)	Tipus d'anàlisi	Periodicitat
<i>Salmonella</i>	Fórmules Infantils i Papilles	Individual	Dia 1 (El mateix dia de l'inoculació)
		Agrupat sense soja	
		Agrupat amb soja	
<i>Listeria monocytogenes</i>	Fórmules Infantils	Individual	Dies 7 i 15 (Després de la inoculació)
<i>Staphylococcus aureus</i>	Fórmules Infantils, Papilles i Farines		
<i>Cronobacter sakazakii</i>	Fórmules Infantils		

(*) Les mateixes soques utilitzades al llarg d'aquest estudi.

(**) Les mateixes matrius utilitzades durant les validacions.

Pel cas de *Listeria monocytogenes*, els protocols avaluats han estat els següents:

- **Protocol de 24 hores:** Només assajat per la PCR ja que aquesta modalitat d'anàlisi no està validada pel VIDAS®. Consta d'una única incubació, durant 24-26 hores a 30±1°C, en Brou Fraser Semi (tal i com indica la ISO).
- **Protocol de 48 hores:** Avaluat per les tècniques VIDAS® i PCR. Consta d'una primera incubació durant 24-26 hores a 30±1°C en Brou Fraser Semi

seguit d'una segona incubació durant 24-26 hores a $30\pm 1^{\circ}\text{C}$ en Brou Fraser.

- Aigua de peptona tamponada com a a medi de pre-enriquiment. Només s'ha avaluat el mètode de PCR perquè el sistema VIDAS[®] només està validat per a utilitzar el brou Fraser Semi com a medi de pre-enriquiment.

CAPÍTOL 4. RESULTATS

4.1. RESULTATS DE L'OPTIMITZACIÓ DELS PROTOCOLS D'EXTRACCIÓ DEL DNA

En aplicar el protocol estàndar d'extracció del DNA en les matrius alimentàries estudiades, s'han observat diferents comportaments de les mateixes que han obligat a introduir etapes alternatives i/o addicionals amb l'objectiu d'eliminar les restes d'inhibidors propis de cada matriu per tal d'obtenir bons resultats d'amplificació per PCR.

En principi, s'aplica el mateix procés d'extracció del DNA per a tots els patògens. Qualsevol tipus de modificació d'aquest protocol és degut al comportament de la mostra i no del microorganisme analitzat.

Les principals dificultats observades han estat:

- Formació d'un **anell de greix** considerable degut a la composició de les Fórmules Infantils.
- Formació d'un **pellet prominent** (part inferior de l'ependorff format després de la centrifugació ràpida) degut a què els residus de la matriu de partida eren considerables; com és el cas de les Farines.
- **Coloracions intenses** d'algunes matrius (groguenques i marronoses, principalment) degudes a colorants i pigments, sobretot en els Productes minoritaris.

S'ha començat a treballar amb el kit comercial de PCR de la *Salmonella* ja que representa el microorganisme que provoca més alarma en els consumidors i les autoritats sanitàries així com també genera major nombre d'anàlisis en els Laboratoris.

Totes les validacions s'han realitzat per triplicat per tal d'avaluar la repetibilitat dels assajos i s'ha decidit que amb 3 proves seria suficient per avaluar la significació dels resultats.

Taula 29. Quadre-resum dels protocols d'extracció establerts per a cada matriu assajada:

Anàlisi	Matrius	Protocol d'extracció
<i>Salmonella</i> individual i <i>Salmonella</i> agrupada amb i sense soja	Fórmules Infantils	Estàndar + 100 µl de PrepMan.
	Papilles	Estàndar + 400 µl de PrepMan.
<i>Salmonella</i> individual	Farines	Centrifugació prèvia de 2.000 rpm durant 3 minuts + Protocol Estàndar + 400 µl de PrepMan.
	Productes minoritaris	
<i>Listeria monocytogens</i>	Fórmules Infantils	S'ha avaluat l'eficàcia de 3 protocols: <ul style="list-style-type: none"> ▪ Estàndar + 100 µl de PrepMan. ▪ Substitució del brou Fraser Semi pel medi TBS+Extracte de llevat. ▪ Brou Fraser Semi + 2 rentats amb tampó PBS (1x).
<i>Staphylococcus aureus</i>	Fórmules Infantils	Estàndar + 100 µl de PrepMan.
	Papilles	Estàndar + 400 µl de PrepMan.
	Farines	Centrifugació prèvia de 2.000 rpm durant 3 minuts + Protocol estàndar + 400 µl de PrepMan.
<i>Cronobacter sakazakii</i>	Fórmules Infantils	Estàndar + 100 µl de PrepMan.

Seguidament es descriuen els protocols d'extracció que s'han aplicat per a cada matriu i les modificacions introduïdes en cada cas fins obtenir un protocol òptim d'extracció del DNA:

4.1.1. Fórmules Infantils

El primer protocol assajat ha estat l'estàndar; és a dir, el recomanat per la casa que comercialitza els kits i que es descriu a "Material i Mètodes". En aquest cas, el volum del reactiu PrepMan Ultra (a partir d'ara, PrepMan) assajat ha estat de 100 µl.

S'observa que després del primer pas de centrifugació es forma, en la part superior de l'eppendorf, un anell de greix molt prominent que cal retirar amb un escovilló estèril perquè sinó es dificulta l'extracció ja que és un anell molt dens i que fa augmentar la turbidesa del sobrenedant, la qual interfereix en la lectura de la mostra dins de l'equip de PCR.

En aquestes proves s'ha inclòs un tipus de Fórmula Infantil que conté espessant en la qual és necessari afegir 400 µl de PrepMan per a poder obtenir suficient sobrenedant per a continuar amb l'extracció. Augmentant el volum de reactiu a l'extracció es va eliminar la inhibició de la polimerasa en la reacció de PCR.

Taula 30. Resum dels protocols d'extracció assajats en Fórmules Infantils.

Fórmula Infantil	Protocols	
	Estàndar + 100 µl de PrepMan	Estàndar + 400 µl de PrepMan
Sense espessant	√	No analitzat
Amb espessant	Inhibició	√

4.1.2. Papilles

En **primer lloc** s'ha assajat el protocol estàndar, però després del primer pas de centrifugació, s'observa que es forma un pellet considerable; per tant, es decideix treballar amb 2 variables:

1. Aplicar el protocol estàndar afegint 400 µl de PrepMan tal i com s'havia assajat en les Fórmules Infantils amb espessant.
2. Realitzar una centrifugació prèvia de 2.000 rpm durant 3 minuts i recuperar el sobrenedant resultant sobre el qual s'aplica el protocol estàndar amb 100 µl de PrepMan.

Aplicant els 2 protocols s'han obtingut bons resultats d'amplificació per PCR.

Taula 31. Resum dels protocols d'extracció assajats en Papilles.

Matriu	Protocols	
	Estàndar + 400 µl de PrepMan	Centrifugació a 2.000 rpm durant 3 minuts + Estàndar + 100 µl de PrepMan
Papilles	√	√

4.1.3. Farines

Després del primer pas de centrifugació del protocol estàndar s'observa la formació d'un pellet molt considerable, ja que les Farines presenten moltes impureses de partida. Es decideix incloure 2 modificacions:

- a) Aplicar el protocol estàndar amb 600 µl de PrepMan (ja que el protocol dels Papilles amb 400 µl no és suficient).
- b) Realitzar una centrifugació prèvia de 2.000 rpm durant 3 minuts. Després de la centrifugació, es recupera el sobrenedant sobre el qual s'aplica el protocol estàndar amb 400 µl de PrepMan.

Els resultats d'amplificació per PCR són millors introduint el pas previ de centrifugació (protocol b).

Taula 32. Resum dels protocols d'extracció assajats en Farines.

Matriu	Protocols		
	Estàndar + 400 µl PrepMan	Estàndar + 600 µl PrepMan	Centrifugació a 2.000 rpm durant 3 minuts + Estàndar + 400 µl de PrepMan
Farines	Inhibició		√

4.1.4. Productes Minoritaris

S'observa que les matrius tenen unes coloracions molt intenses (groguenques i/o marronoses principalment). Per evitar que la coloració interfereixi en el resultat final de PCR, s'apliquen diferents protocols d'extracció descrits a "Material i Mètodes".

Les principals modificacions introduïdes, per tal de minimitzar els efectes inhibitoris de les matrius, han estat les següents:

- Diluir les mostres abans i després de la pre-incubació. La pre-incubació és una etapa de l'anàlisi de la *Salmonella* que s'ha de realitzar obligatòriament perquè així està establert en la normativa ISO 6579:2002.
- Fer rentats amb tampó PBS.
- Incloure centrifugacions extremes (de 2.000 rpm durant 3 minuts).
- Fer rentats de la mostra amb columnes de filtració "Microcon".

A continuació es presenten els resultats dels diferents protocols d'extracció del DNA en Productes Minoritaris.

Taula 33. Resum dels protocols d'extracció assajats en Productes Minoritaris.

Protocols Minoritari	Variables assajades	Resultats obtinguts per PCR (duplicats)	
_1	Dilucions de les mostres de treball abans i després de la pre-incubació	Negatiu	Error de mètode
_2	2 rentats amb tampó PBS (1x)		
_3	Centrifugació a 2.000 rpm, 3 minuts		
_4	Filtració en columnes Microcon		

Els resultats “**Error de mètode**” (tant en les mostres com en els Internal Positive Control, IPC) s’interpreten com que s’han produït errors durant la reacció de PCR i per tant, no es poden validar els resultats.

Taula 34. Flux de treball dels diferents protocols d’extracció del DNA assajats en els Productes Minoritaris.

Protocol Minoritari	Protocol d’extracció del DNA			
	Dilucions de les mostres	Rentats amb tampó PBS	Centrifugació a 2.000 rpm 3 min + Estàndar + 400 µl PrepMan	Filtració amb columnes Microcon
_1	Inhibició	No analitzat		
_2	No analitzat	Inhibició	No analitzat	
_3	No analitzat		Inhibició	No analitzat
_4	No analitzat			Inhibició

Minoritari_1: Dilucions de les mostres.

Degut als resultats obtinguts poc concloents; es decideix que en els següents protocols s’inclouran més dilucions de treball partint del sobrenedant obtingut en l’últim pas d’extracció del DNA.

S’observa que, a mida que es dilueix més la mostra, apareixen menys “Errors de mètode”; per tant, hi ha característiques intrínseques en la matriu del minoritari que inhibeixen la reacció de PCR.

Tot i que treballant amb mostres més diluïdes s’obtenen alguns resultats “Negatius”; hi ha d’altres productes l’extracció dels quals encara s’ha de millorar perquè continuen donant “Errors de mètode”.

Minoritari_2: Rentats amb tampó PBS.

Els minoritaris, que havien donat problemes amb mostres més diluïdes (1:20 i 1:50), encara provoquen inhibició malgrat els rentats amb el tampó de PBS.

Es decideix incloure un pas addicional de centrifugació tal i com s’havia aplicat amb la matriu de “Farines”.

Minoritari_3: Centrifugació a 2.000 rpm 3 min + Estàndar + 400 µl PrepMan.

La centrifugació addicional sembla minimitzar els efectes inhibidors d’alguns dels minoritaris assajats.

Per molts d’aquests productes minoritaris, un protocol efectiu sembla ser:

- Incloure la centrifugació extra de la mostra (2.000 rpm durant 3 minuts).
- Recollir el sobrenedant.
- Amb aquest sobrenedant, es realitza l’extracció del DNA.

Minoritari_4: Filtració amb columnes Microcon.

Treballar amb les columnes Microcon no és massa efectiu perquè no acaben d’eliminar els “Errors de mètode”; per tant, no s’inclourà aquest pas addicional; degut també a què:

- Són complexes de manipular.
- S’allarga el procés d’extracció.
- S’encareix el protocol d’anàlisi.

Després d’avaluar els resultats obtinguts, se selecciona el **protocol d’extracció de Minoritari_3** per a fer la validació ja que sembla, a priori, el més efectiu.

Taula 35. Quadre-resum dels protocols d’extracció establerts per a cada matriu assajada els quals depenen de les matrius i no de l’organisme analitzat.

Matrius	Protocols d’extracció
Fórmules Infantils	Estàndar + 100 µl de PrepMan.
Papilles	Estàndar + 400 µl de PrepMan.
Farines	Centrifugació prèvia de 2.000 rpm durant 3 minuts + Estàndar + 400 µl de PrepMan.
Productes minoritaris	

4.2. RESULTATS DE LA VALIDACIÓ DE LA *Salmonella*

4.2.1. *Salmonella* ANALITZADA DE FORMA INDIVIDUAL EN FÓRMULES INFANTILS I PAPILLES

De tota la varietat de productes disponibles en el mercat, s'han seleccionat 3 tipus de Fórmules Infantils i 4 tipus de Papilles tenint en compte la seva composició nutricional i coloració.

S'han aplicat els protocols d'extracció del DNA validats en l'apartat anterior i que s'ha comprovat que proporcionen bons resultats d'amplificació per PCR.

<i>Salmonella</i> (Anàlisi individual)			
Matrius	Matrius analitzades	Selecció de matrius segons	Total mostres de treball
Fórmules Infantils	3	Composició nutricional	72
Papilles	4	Composició nutricional i coloració	96

RESULTATS.

a) RESULTATS ESPERATS I DETECTATS EN CADA VALIDACIÓ I MARIU ALIMENTÀRIA.

En les taules següents (36 i 37) apareixen els resultats de les 3 validacions de la *Salmonella* analitzada de forma individual en Fórmules Infantils i Papilles.

En Fórmules Infantils, cada validació està formada per **24** mostres, de les quals **18** estan inoculades (Positius esperats) i **6** no ho estan (Negatius esperats); mentre que en Papilles cada validació consta de **32** mostres, de les quals **24** mostres estan inoculades (Positius esperats) i **8** no ho estan (Negatius

esperats). En el total de les 3 validacions, s'han analitzat **72** mostres de Fórmules Infantils i **96** de Papilles.

És important recordar que **una mostra es considera positiva** si és detectada com a positiva per almenys una de les tècniques assajades. En cas contrari, malgrat que la mostra hagi estat inicialment inoculada, es considera negativa.

Taula 36. Resultats de les validacions de la *Salmonella* (analitzada de forma individual) en Fórmules Infantils.

Salmonella (Anàlisi individual)					
Validació	Fórmules Infantils				
	Mostres analitzades	Resultats esperats		Resultats detectats	
		Positius	Negatius	Positius	Negatius
1	24	18	6	18	6
2	24	18	6	18	6
3	24	18	6	16	8
Total Mostres	72	54	18	52	20
	Grau de Positivitat	Detectats: 96,3%		No Detectats: 3,7%	

Taula 37. Resultats de les validacions de la *Salmonella* (analitzada de forma individual) en Papilles.

Salmonella (Anàlisi individual)					
Validació	Papilles				
	Mostres analitzades	Resultats esperats		Resultats detectats	
		Positius	Negatius	Positius	Negatius
1	32	24	8	24	8
2	32	24	8	23	9
3	32	24	8	14	18
Total Mostres	96	72	24	61	35
	Grau de Positivitat	Detectats: 84,7%		No Detectats: 15,3%	

Tenint en compte aquest criteri, en el total de les 3 validacions, de les **54** mostres inoculades de Fórmules Infantils (Positius esperats) **52** han estat

detectades com a positives per alguna de les 3 tècniques analítiques (Positius detectats) mentre que en Papilles de les **72** mostres inoculades artificialment (Positius esperats), només han estat detectades **61** mostres positives (Positius detectats).

Es presenta una situació de menor positivitat de l'esperada. En concret, la positivitat en **Fórmules Infantils** és del **96,3%** mentre que en **Papilles** és del **84,7%**. Degut a la menor detecció de positius, especialment en la tercera validació, es presenta, al final d'aquest capítol, un estudi de viabilitat dels microorganismes patògens en les matrius alimentàries de treball per tal d'estudiar les possibles causes de la baixa positivitat.

b) RESULTATS DETECTATS PER CADA TÈCNICA ANALÍTICA.

Com es pot veure en la taula 38, i posteriorment representat de forma gràfica, tant en Fórmules Infantils com en Papilles la tècnica que detecta més positius és la **PCR**, seguit dels mètodes ISO i VIDAS®.

Taula 38. Resultats detectats per cada tècnica analítica en l'anàlisi individual de la *Salmonella*.

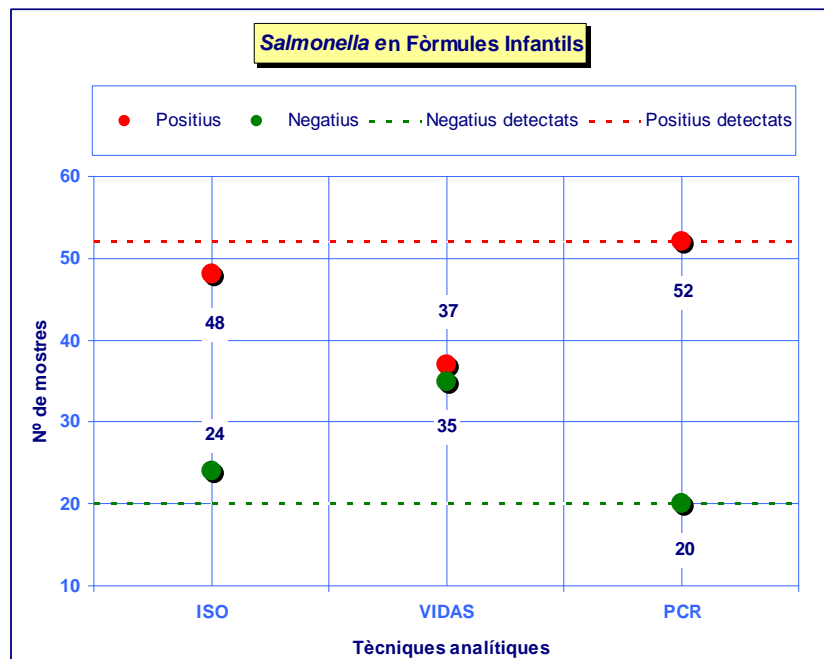
Salmonella (Anàlisi individual)						
Matriu alimentària (nº de mostres analitzades)	Fórmules Infantils (72 mostres)			Papilles (96 mostres)		
Tècniques avaluades	ISO	VIDAS®	PCR	ISO	VIDAS®	PCR
Positius detectats per alguna de les 3 tècniques	52			61		
Positius detectats per cada tècnica	48 (92,3%)	37 (71,2%)	52 (100%)	41 (67,2%)	33 (54,1%)	61 (100%)
Mostres NO detectades per cap de les 3 tècniques (<u>Negatius detectats</u>)	20			35		
Negatius detectats per cada tècnica	24 (120%)	35 (175%)	20 (100%)	55 (157,1%)	63 (180%)	35 (100%)

La PCR detecta el 100% de mostres positives en Fórmules Infantils i en Papilles, mentre que la ISO i el VIDAS[®] detecten més positius en Fórmules Infantils que en Papilles. En concret, el mètode ISO detecta un 92,3% en Fórmules Infantils i un 67,2% en Papilles mentre que el VIDAS[®] detecta un 71,2% en Fórmules Infantils i un 54,1% en Papilles.

En les següents gràfiques (Figura 18) apareixen representats els resultats detectats en Fórmules Infantils i en Papilles. La línia vermella discontinua (- - -) representa els positius detectats per alguna de les 3 tècniques analítiques assajades (ISO, VIDAS[®] i PCR); que en les Fórmules Infantils és de **52** i en les Papilles de **61**. La línia verda discontinua (- - -) representa els negatius detectats; que en les Fórmules Infantils és de **20** i en les Papilles és de **35**. Prenent com a referència aquestes 2 línees, apareixen els resultats positius (●) i negatius (●) detectats per cada tècnica analítica.

El que s'observa és que tant en Fórmules Infantils com en Papilles la tècnica que s'aproxima més als valors detectats (línees discontinues) és la PCR (de fet aquesta tècnica detecta totes les mostres positives).

Li segueixen el mètode ISO (amb 48 positius en Fórmules Infantils i 41 positius en Papilles) i finalment el VIDAS[®] (amb 37 positius en Fórmules Infantils i 33 positius en Papilles).



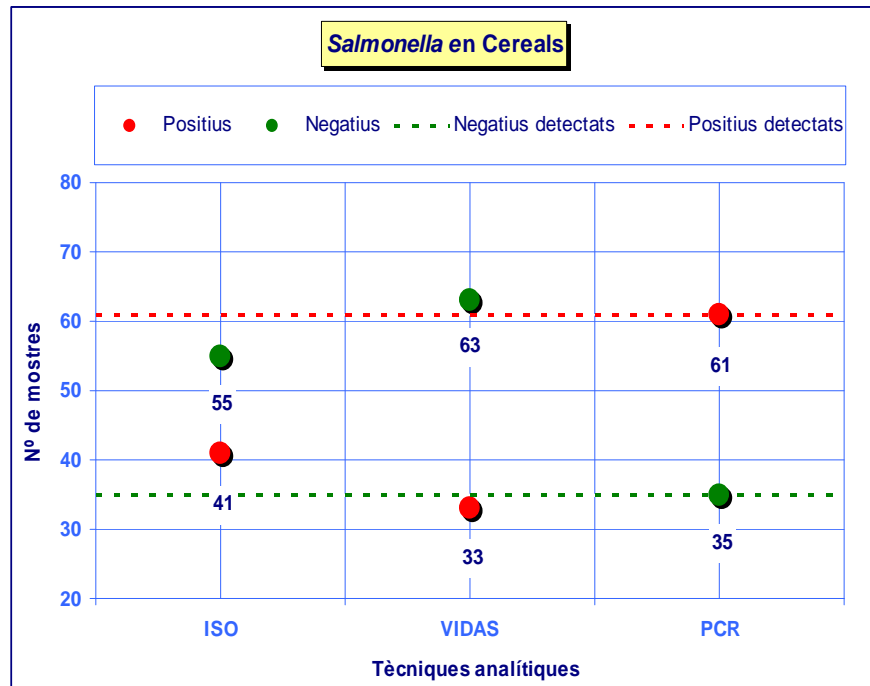


Figura 18. Resultats detectats en la Validació de *Salmonella* en Fórmules Infantils i Papilles analitzada de forma individual.

En la taula 39 es presenten els resultats del tractament estadístic en Fórmules Infantils i Papilles. El mètode ISO presenta diferències significatives en l’anàlisi de Papilles mentre que el mètode VIDAS[®] presenta diferències significativament estadístiques tant en Fórmules Infantils com en Papilles.

Taula 39. Resultats del tractament estadístic en l’anàlisi individual de la *Salmonella*.

Salmonella (Anàlisi individual)						
Tècnica	Fórmules Infantils			Papilles		
	Xi-Quadrat	Graus de Llibertat	Significació	Xi-Quadrat	Graus de Llibertat	Significació
ISO	1,11	1,00	0,29	17,99	1,00	0,00
VIDAS[®]	15,58	1,00	0,00	35,25	1,00	0,00
PCR	0,00	1,00	1,00	0,00	1,00	1,00

**4.2.2. Salmonella ANALITZADA DE FORMA AGRUPADA
EN FÓRMULES INFANTILS I PAPILLES**

S'ha treballat amb **84 mostres** agrupades amb i sense addició de soja de les quals **36** són Fórmules Infantils i **48** són Papilles.

Salmonella (Anàlisi agrupat AMB i SENSE soja)				
Matrius	Matrius analitzades	Selecció de matrius segons	Total mostres de treball	Variable assajada
Fórmules Infantils	3	Composició nutricional	36	Addició o no de <u>proteïna de soja</u>
Papilles	4	Composició nutricional i coloració	48	

BENEFICIS DE LA PROTEÏNA DE SOJA.

S'ha avaluat l'efecte d'addicionar proteïna de soja ja que, en la bibliografia, es descriu com un component que **estimula el creixement bacterià**.

Per tal que una substància sigui considerada com a prebiòtic ha d'acomplir els requisits següents (Robertfroid, M.B. 2000):

- Ser d'origen vegetal.
- Formar part d'un conjunt molt heterogeni de molècules complexes.
- No ser digerida pels enzims digestius.
- Ser parcialment fermentada pels bacteris del colon.
- Ser osmòticament actives.

4.2.2.1. RESULTATS SENSE ADDICIÓ DE SOJA.

a) RESULTATS ESPERATS I DETECTATS EN CADA VALIDACIÓ I MATRIU ALIMENTÀRIA.

En les taules 40 i 41, es mostren els resultats de les 3 validacions de la *Salmonella* analitzada de forma **agrupada sense adicionar soja** en Fórmules Infantils i Papilles.

Taula 40. Resultats de les validacions de la *Salmonella* (analitzada de forma agrupada sense soja) en Fórmules Infantils.

Salmonella (Anàlisi agrupat SENSE soja)					
Validació	Fórmules Infantils				
	Mostres analitzades	Resultats esperats		Resultats detectats	
		Positiu	Negatiu	Positiu	Negatiu
1	12	9	3	12	0
2	12	9	3	10	2
3	12	9	3	5	7
Total Mostres	36	27	9	27	9
	Grau de Positivitat	Detectats: 100%		No Detectats: 0%	

Taula 41. Resultats de les validacions de la *Salmonella* (analitzada de forma agrupada sense soja) en Papilles.

Salmonella (Anàlisi agrupat SENSE soja)					
Validació	Papilles				
	Mostres analitzades	Resultats esperats		Resultats detectats	
		Positiu	Negatiu	Positiu	Negatiu
1	16	12	4	8	8
2	16	12	4	8	8
3	16	12	4	3	13
Total Mostres	48	36	12	19	29
	Grau de Positivitat	Detectats: 52,8%		No Detectats: 47,2%	

Segons les taules anteriors, en les Fórmules Infantils, cada validació està formada per **12** mostres (**9** inoculades i **3** no inoculades); mentre que en Papilles consta de **16** mostres (**12** inoculades i **4** no inoculades). En el total s'ha treballat amb **36** mostres de Fórmules Infantils i **48** de Papilles.

En Fórmules infantils s'han detectat **27** mostres positives, però no corresponen a les 27 mostres inoculades: 22 de les mostres estaven inoculades, però 5 de les mostres detectades com a positives no estaven inoculades, pel que es poden considerar com a falsos positius (detectats tant per ISO com per PCR), possiblement deguts a contaminació per la manipulació d'un nombre més gran de mostres. En Papilles, de les **36** mostres positives esperades, només han estat detectades **19** mostres (el **52,8%**) per alguna de les 2 tècniques analítiques.

b) RESULTATS DETECTATS PER CADA TÈCNICA ANALÍTICA.

Taula 42. Resultats detectats per cada tècnica analítica en l'anàlisi agrupat sense soja de la *Salmonella*.

Salmonella (Anàlisi agrupat SENSE soja)				
Matriu alimentària (nº de mostres analitzades)	Fórmules Infantils (36 mostres)		Papilles (48 mostres)	
Tècniques avaluades	ISO	PCR	ISO	PCR
<u>Positius detectats</u> per alguna de les 2 tècniques	27		19	
Positius detectats per cada tècnica	8 (29,6%)	22 (81,5%)	13 (68,4%)	17 (89,5%)
Mostres NO detectades per cap de les 2 tècniques (<u>Negatius detectats</u>)	9		29	
Negatius detectats per cada tècnica	19 (211,1%)	5 (55,6%)	35 (120,7%)	31 (106,9%)

Tant en Fórmules Infantils com en Papilles la tècnica que detecta més positius és la **PCR** la qual detecta el 81,5% en Fórmules Infantils i el 89,5% en Papilles mentre que la ISO detecta més Papilles (68,4%) que en Fórmules Infantils (29,6%).

En les següents gràfiques apareixen representats els resultats en Fórmules Infantils i en Papilles respecte als valors detectats.

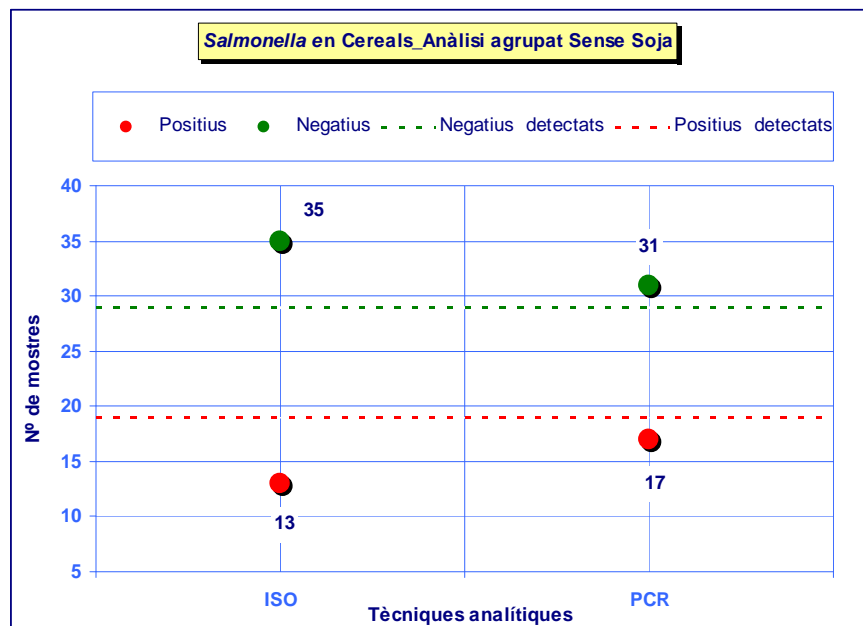
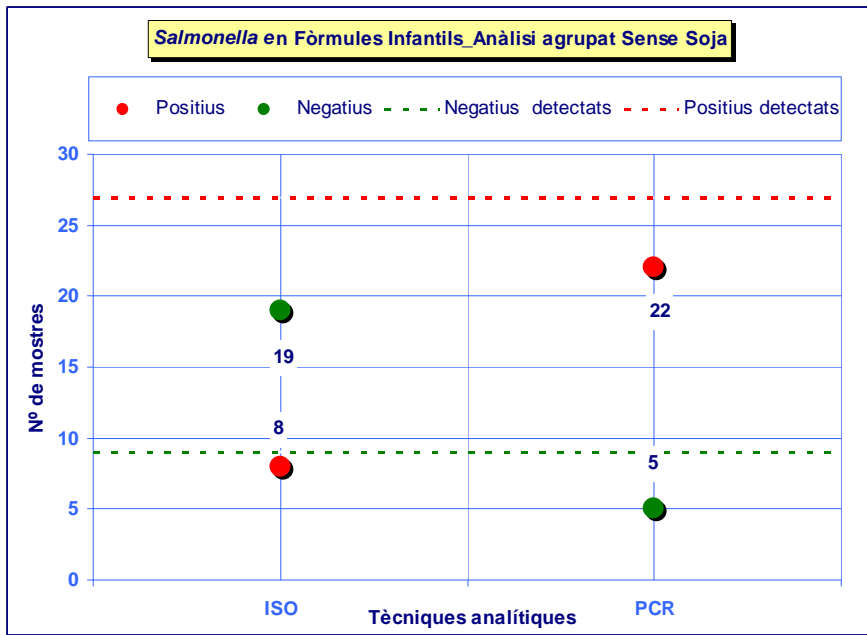


Figura 19. Resultats detectats en la Validació de *Salmonella* en Fórmules Infantils i Papilles analitzats de forma agrupada sense addició de soja.

Només s’han detectat diferències significatives en l’anàlisi de Fórmules Infantils per la tècnica ISO ja que només ha detectat el 29,6% de les mostres positives.

Taula 43. Resultats del tractament estadístic en l’anàlisi agrupat sense soja de la *Salmonella*.

Salmonella (Anàlisi agrupat SENSE soja)						
Tècnica	Fórmules Infantils			Papilles		
	Xi-Quadrat	Graus de Llibertat	Significació	Xi-Quadrat	Graus de Llibertat	Significació
ISO	33,3	1,00	0,00	3,14	1,00	0,08
PCR	0,15	1,00	0,70	0,35	1,00	0,55

4.2.2.2. RESULTATS **AMB ADDICIÓ DE SOJA.**

a) RESULTATS ESPERATS I DETECTATS EN CADA VALIDACIÓ I MATRIU ALIMENTÀRIA.

A continuació es presenten els resultats obtinguts en les 3 validacions de la *Salmonella* analitzada de forma **agrupada addicionant soja**. S’ha treballat amb els mateixos tipus de Fórmules Infantils i Papilles assajats en l’apartat anterior.

Tal i com es presenta en les taules següents (44 i 45), de les **27** mostres inoculades en Fórmules Infantils, només **10** s’han detectat com a positives mentre que en Papilles, de les **36** mostres inoculades artificialment, han estat detectades **5** com a positives per alguna de les 2 tècniques analítiques.

Taula 44. Resultats de les validacions de la *Salmonella* (analitzada de forma agrupada amb soja) en Fórmules Infantils.

Salmonella (Anàlisi agrupat AMB soja)					
Validació	Fórmules Infantils				
	Mostres analitzades	Resultats esperats		Resultats detectats	
		Positiu	Negatiu	Positiu	Negatiu
1	12	9	3	3	9
2	12	9	3	0	12
3	12	9	3	7	5
Total Mostres	36	27	9	10	26
	Grau de Positivitat	Detectats: 37%		No Detectats: 63%	

Taula 45. Resultats de les validacions de la *Salmonella* (analitzada de forma agrupada amb soja) en Papilles.

Salmonella (Anàlisi agrupat AMB soja)					
Validació	Papilles				
	Mostres analitzades	Resultats esperats		Resultats detectats	
		Positiu	Negatiu	Positiu	Negatiu
1	16	12	4	0	16
2	16	12	4	4	12
3	16	12	4	1	15
Total Mostres	48	36	12	5	43
	Grau de Positivitat	Detectats: 13,9%		No Detectats: 86,1%	

Tant en Fórmules Infantils com en Papilles es presenta una situació de baixa positivitat. En **Fórmules Infantils**, es detecta el **37%** de les mostres positives mentre que en **Papilles**, el **13,9%**.

b) RESULTATS DETECTATS PER CADA TÈCNICA ANALÍTICA.

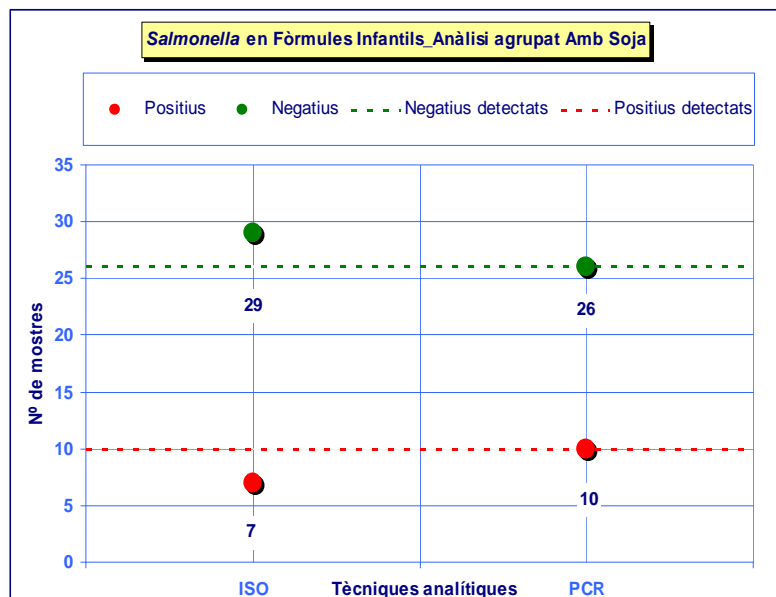
Com es pot veure en la taula següent en:

- Fórmules Infantils, la tècnica que detecta totes les mostres positives és la **PCR** mentre que el mètode **ISO** detecta el 70% de mostres positives.
- Papilles, tant la tècnica **ISO** com la **PCR** detecten tots els positius inoculats.

Taula 46. Resultats detectats per cada tècnica analítica en l'anàlisi agrupat amb soja de la *Salmonella*.

Salmonella (Anàlisi agrupat AMB soja)				
Matriu alimentària (nº de mostres analitzades)	Fórmules Infantils (36 mostres)		Papilles (48 mostres)	
Tècniques avaluades	ISO	PCR	ISO	PCR
Positius detectats per alguna de les 2 tècniques	10		5	
Positius detectats per cada tècnica	7 (70%)	10 (100%)	5 (100%)	5 (100%)
Mostres NO detectades per cap de les 2 tècniques (<u>Negatius detectats</u>)	26		43	
Negatius detectats per cada tècnica	29 (111,5%)	26 (100%)	43 (100%)	43 (100%)

Gràficament s'observa que en Fórmules Infantils, la tècnica que detecta com a positives més mostres inoculades és la PCR mentre que el mètode ISO només detecta 7 positius. En Papilles, tant la ISO com la PCR detecten com a positives només 5 de les mostres inoculades.



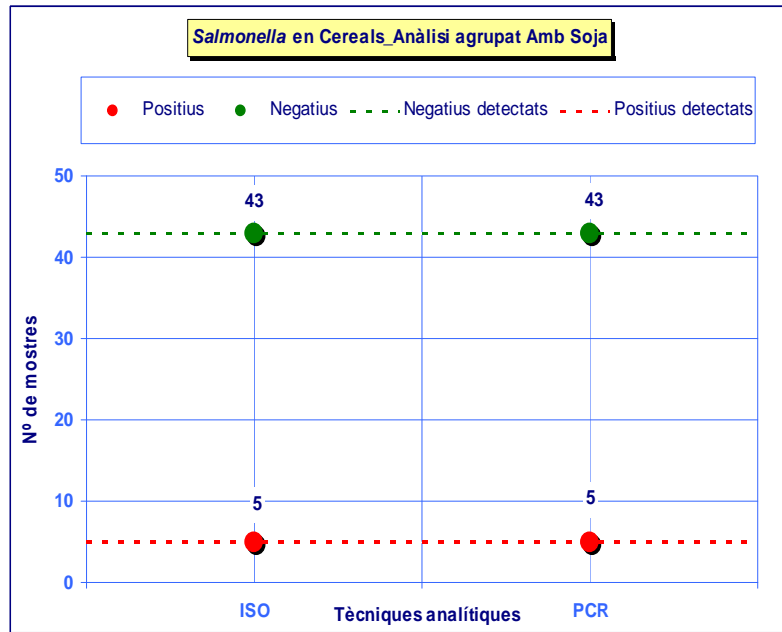


Figura 20. Resultats detectats en la Validació de *Salmonella* en Fórmules Infantils i Papilles analitzats de forma agrupada amb addició de soja.

Tenint en compte les mostres positives detectades pels 2 mètodes (ISO i PCR), cap de les 2 tècniques presenten diferències significatives, però és important considerar el baix nivell de positivitat observat en general (37% en Fórmules Infantils i 13,9% en Papilles).

Taula 47. Resultats del tractament estadístic en l'anàlisi agrupat amb soja de la *Salmonella*.

Salmonella (Anàlisi agrupat AMB soja)						
Tècnica	Fórmules Infantils			Papilles		
	Xi-Quadrat	Graus de Llibertat	Significació	Xi-Quadrat	Graus de Llibertat	Significació
ISO	1,25	1,00	0,26	0,00	1,00	1,00
PCR	0,00	1,00	1,00	0,00	1,00	1,00

4.2.3. *Salmonella* ANALITZADA DE FORMA INDIVIDUAL EN FARINES

S'han seleccionat 4 varietats de Farines tenint en compte:

- El percentatge que la Farina representa en la fórmula final del producte acabat (Papilla). S'han triat principalment aquelles farines que representen més del 50% en el producte final.
- La composició nutricional i la coloració de la Farina.

Salmonella en Farines			
Matrius	Matrius analitzades	Selecció de matrius segons	Total mostres de treball
Farines	4	Percentatge en la Papilla, composició nutricional i coloració	96

a) RESULTATS ESPERATS I DETECTATS EN CADA VALIDACIÓ.

A continuació es presenten els resultats obtinguts en les 3 validacions de la *Salmonella* analitzada de forma individual en la matriu de Farines.

Taula 48. Resultats de les validacions de la *Salmonella* en Farines.

Salmonella en Farines					
Validació	Número de mostres	Valors esperats		Valors detectats	
		Positius	Negatius	Positius	Negatius
1	32	24	8	24	8
2	32	24	8	22	10
3	32	24	8	22	10
Total Mostres	96	72	24	68	28

S'ha treballat amb 96 mostres. Cada validació consta de **32** mostres (**24** inoculades i **8** no inoculades). Del total de **72** mostres inoculades, s'han detectat **68** com a positives per alguna de les 3 tècniques analítiques. En aquest cas s'ha detectat el **94,4%** de les mostres inoculades artificialment.

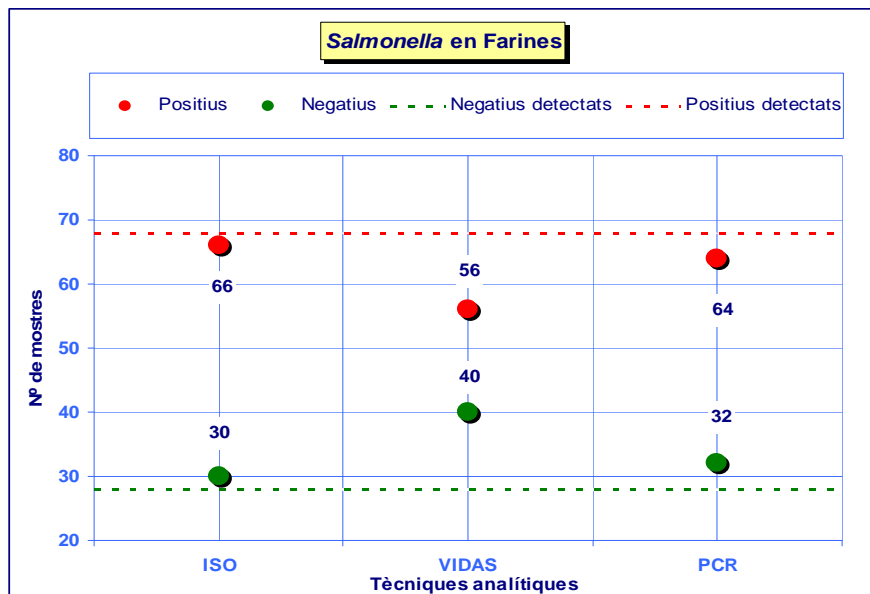
b) RESULTATS DETECTATS PER CADA TÈCNICA ANALÍTICA.

Segons les dades de la taula següent i posteriorment representat de forma gràfica (Figura 21), la tècnica que detecta el major nombre de mostres positives és la tècnica **ISO** (97,1%) seguit de la PCR (94,1%) i el VIDAS® (82,4%).

Taula 49. Resultats en Farines detectats per cada tècnica per a l'anàlisi de la *Salmonella*.

Salmonella			
Matriu alimentària (nº de mostres analitzades)	Farines (96 mostres)		
Tècniques avaluades	ISO	VIDAS®	PCR
Positius detectats per alguna de les 3 tècniques	68		
Positius detectats per cada tècnica	66 (97,1%)	56 (82,4%)	64 (94,1%)
Mostres NO detectades per cap de les 3 tècniques (Negatiu detectats)	28		
Negatiu detectats per cada tècnica	30 (107,1%)	40 (142,9%)	32 (114,3%)

Figura. 21. Resultats detectats en la Validació de *Salmonella* en Farines.



Només la tècnica VIDAS[®] presenta diferències significatives.

Taula 50. Resultats del tractament estadístic en l'anàlisi de les Farines per a la *Salmonella*.

Salmonella en Farines			
Tècnica	Xi-Quadrat	Graus de Llibertat	Significació
ISO	0,20	1,00	0,65
VIDAS[®]	7,26	1,00	0,01
PCR	0,81	1,00	0,37

4.2.4. Salmonella ANALITZADA DE FORMA INDIVIDUAL EN PRODUCTES MINORITARIS

Per a seleccionar els Productes Minoritaris, s'ha tingut en compte la seva composició i coloració ja que, durant les proves d'optimització dels protocols d'extracció del DNA, s'ha comprovat que són aquestes les propietats que afecten negativament l'extracció del DNA i la seva posterior detecció en l'equip de PCR.

RESULTATS.

a) RESULTATS ESPERATS I DETECTATS EN CADA VALIDACIÓ APLICANT EL PROTOCOL MINORITARI_3.

En la taula següent es mostren els resultats de les validacions de la *Salmonella* en els Productes Minoritaris seguint el protocol Minoritari_3 (en el qual s'inclou una centrifugació prèvia de 2.000 rpm durant 3 minuts).

Taula 51. Resultats de les validacions de la *Salmonella* en Productes Minoritaris.

Salmonella en Productes Minoritaris					
Validació	Número de mostres	Valors esperats		Valors detectats	
		Positiu	Negatiu	Positiu	Negatiu
1	32	24	8	2	30
2	32	24	8	17	15
3	32	24	8	18	14
Total Mostres	96	72	24	37	59

S'ha treballat amb un total de **96 mostres**. Cada validació està formada per **32** (**24** inoculades i **8** no inoculades). En el total de les **72** mostres inoculades, només s'han detectat **37** el que significa un percentatge de detecció del **51,4%**.

b) RESULTATS DETECTATS PER CADA TÈCNICA ANALÍTICA.

Taula 52. Resultats en Productes Minoritaris detectats per cada tècnica per a l'anàlisi de la *Salmonella*.

Salmonella			
Matriu alimentària (nº de mostres analitzades)	Productes Minoritaris (96 mostres)		
Tècniques avaluades	ISO	VIDAS®	PCR
<u>Positiu detectats</u> per alguna de les 3 tècniques	37		
Positiu detectats per cada tècnica	34 (91,9%)	24 (64,9%)	29 (78,4%)
Mostres NO detectades com a positiva per cap de les 3 tècniques (<u>Negatiu detectats</u>)	59		
Negatiu detectats per cada tècnica	62 (105,1%)	72 (122%)	67 (113,6%)

Atenent a les dades de la taula anterior, s'observa que la tècnica que detecta més positius és el mètode **ISO** (91,9%) seguit de la tècnica de PCR (78,4%) i finalment el mètode VIDAS[®] (64,9%).

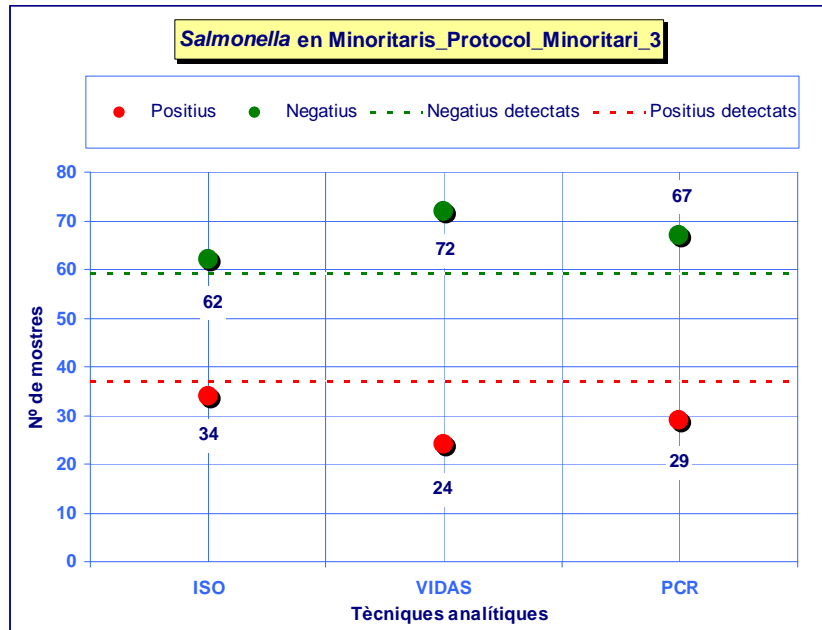


Figura 22. Resultats detectats en la Validació de *Salmonella* en Productes Minoritaris (seguint el Protocol Minoritari_3).

Només s'han detectat diferències significatives amb el mètode VIDAS[®].

Taula 53. Resultats del tractament estadístic en l'anàlisi dels Productes Minoritaris per a la *Salmonella*.

Salmonella en Productes Minoritaris			
Tècnica	Xi-Quadrat	Graus de Llibertat	Significació
ISO	0,40	1,00	0,53
VIDAS[®]	7,43	1,00	0,01
PCR	2,81	1,00	0,09

4.3. RESULTATS DE LA VALIDACIÓ DE *Listeria monocytogenes* EN FÓRMULES INFANTILS

S'ha treballat amb **172 mostres** repartides en els 3 protocols descrits a "Material i Mètodes": Listeria_1, _4 i _5. Les modificacions de protocol es refereixen bàsicament al medi de pre-enriquiment, ja que es detecta un efecte d'inhibició del medi Fraser sobre la PCR.

RESULTATS.

a) RESULTATS ESPERATS I DETECTATS EN CADA VALIDACIÓ SEGUINT EL PROTOCOLS LISTERIA_1, _4 i _5.

En la taula següent es mostren els resultats de les 3 validacions aplicant els protocols Listeria_1, _4 i _5.

Les principals característiques de cada protocol s'indiquen en la taula següent.

(**) La tercera validació del Protocol Listeria_4 consta, de manera excepcional, de **16** mostres donat que es va produir un error humà durant la preparació de l'assaig i 8 mostres es van deixar sense inocular.

Listeria monocytogenes en Fórmules Infantils															
Validació	Listeria_1					Listeria_4					Listeria_5				
	Mostres analitzades (*)	Resultats esperats		Resultats detectats		Mostres analitzades (*)	Resultats esperats		Resultats detectats		Mostres analitzades (*)	Resultats esperats		Resultats detectats	
		Positiu	Negatiu	Positiu	Negatiu		Positiu	Negatiu	Positiu	Negatiu		Positiu	Negatiu	Positiu	Negatiu
1	24	18	6	15	9	24	18	6	12	12	12	9	3	8	4
2	24	18	6	17	7	24	18	6	12	12	12	9	3	8	4
3	24	18	6	16	8	16 ^(*)	10	6	8	8	12	9	3	9	3
Total Mostres	72	54	18	48	24	64	46	18	32	32	36	27	9	25	11
	Grau de Positivitat	Detectats: 88,9%		No Detectats: 11,1%		Grau de Positivitat	Detectats: 69,6%		No Detectats: 30,4%		Grau de Positivitat	Detectats: 92,6%		No Detectats: 7,4%	

Taula 54. Resultats de les validacions de la *Listeria monocytogenes* en Fórmules Infantils.

(*) En els 3 protocols, s'ha treballat amb els mateixos tipus de Fórmules Infantils.

A la vista d'aquests resultats, aplicant el Protocol Listeria_4, es presenta una nova situació de baixa positivitat (69,6%). Per aquesta raó, la *Listeria monocytogenes* també s'ha inclòs en l'estudi de viabilitat dels microorganismes patògens en Fórmules Infantils (al final d'aquest capítol) per tal d'estudiar el perquè de la baixa positivitat obtinguda.

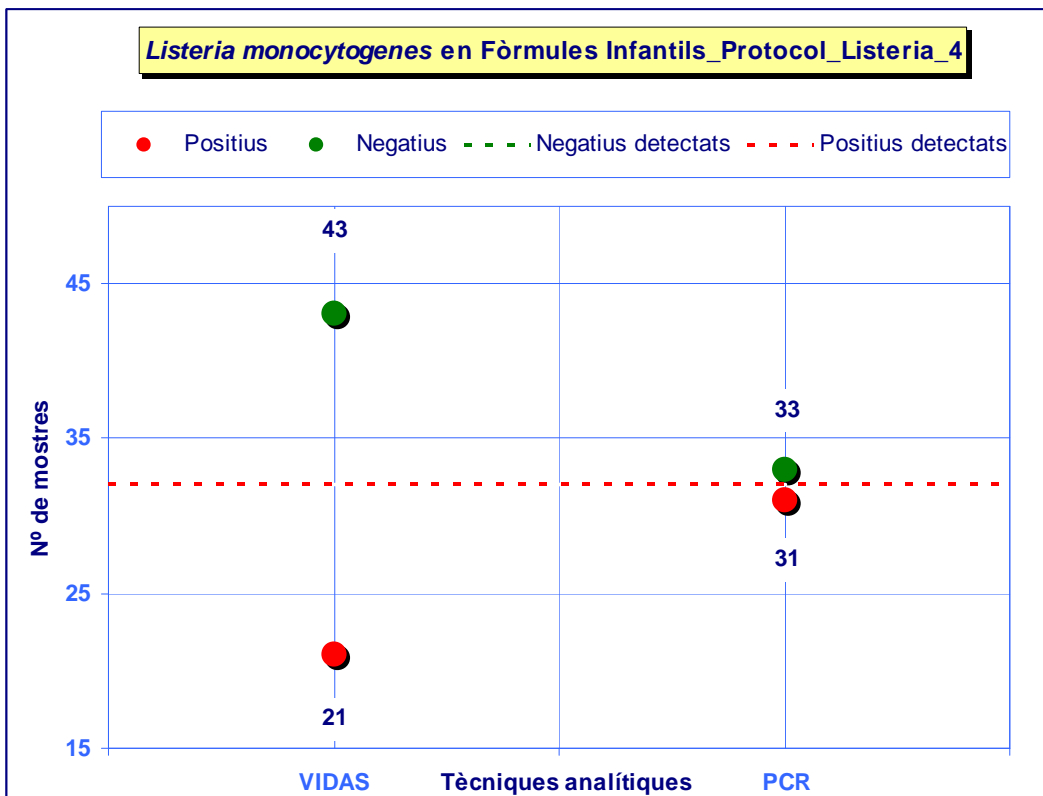
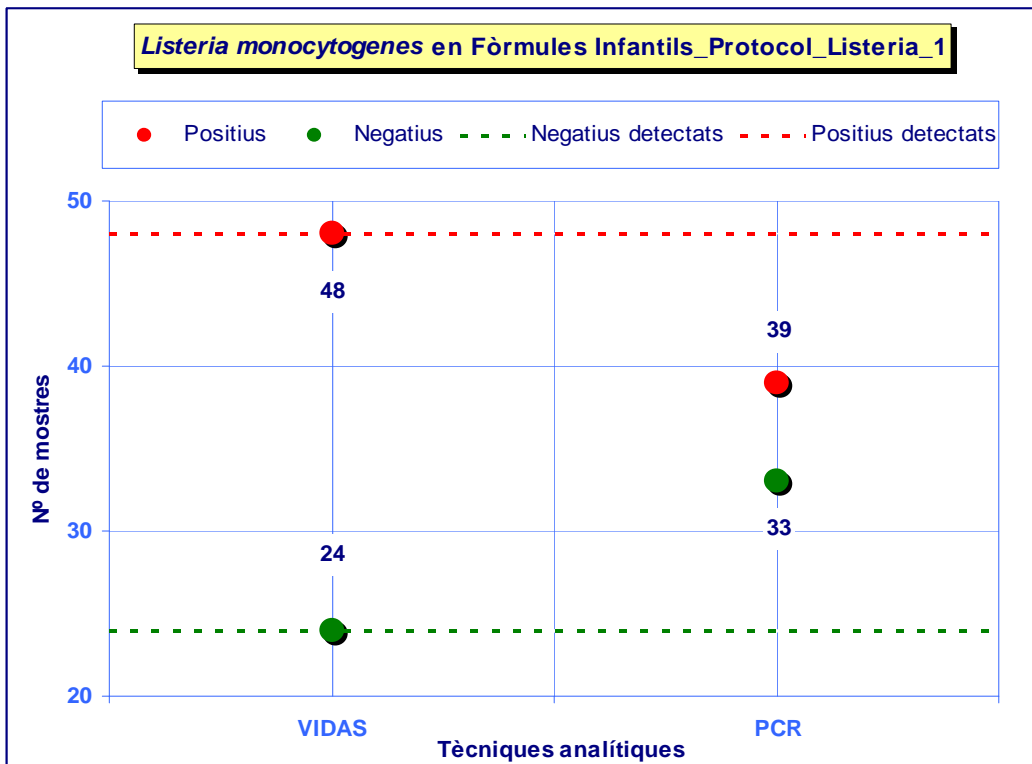
b) RESULTATS DETECTATS PER CADA TÈCNICA ANALÍTICA.

En la taula següent s'observa que en els protocols Listeria_1 i_5, el VIDAS® detecta totes les mostres positives mentre que la PCR detecta el 81,3% i 48% respectivament. Per altra banda, en el protocol Listeria_4, la PCR detecta el 96,9% de mostres positives mentre que el VIDAS® només detecta 65,6%.

Taula 55. Resultats en Fórmules Infantils detectats per cada tècnica per a l'anàlisi de la *Listeria monocytogenes*.

Listeria monocytogenes en Fórmules Infantils						
Protocol (Nº de mostres analitzades)	Listeria_1 (72 mostres)		Listeria_4 (64 mostres)		Listeria_5 (36 mostres)	
Tècniques avaluades	VIDAS®	PCR	VIDAS®	PCR	VIDAS®	PCR
Positius detectats per alguna de les 2 tècniques	48		32		25	
Positius detectats per cada tècnica	48 (100%)	39 (81,3%)	21 (65,6%)	31 (96,9%)	25 (100%)	12 (48%)
Mostres NO detectades per cap de les 2 tècniques (Negatius detectats)	24		32		11	
Negatius detectats per cada tècnica	24 (100%)	33 (137,5%)	43 (134,4%)	33 (103,1%)	11 (100%)	24 (218,2%)

En les següents gràfiques apareixen representats els resultats detectats mitjançant els 3 Protocols (Listeria_1, _4 i_5) en Fórmules Infantils.



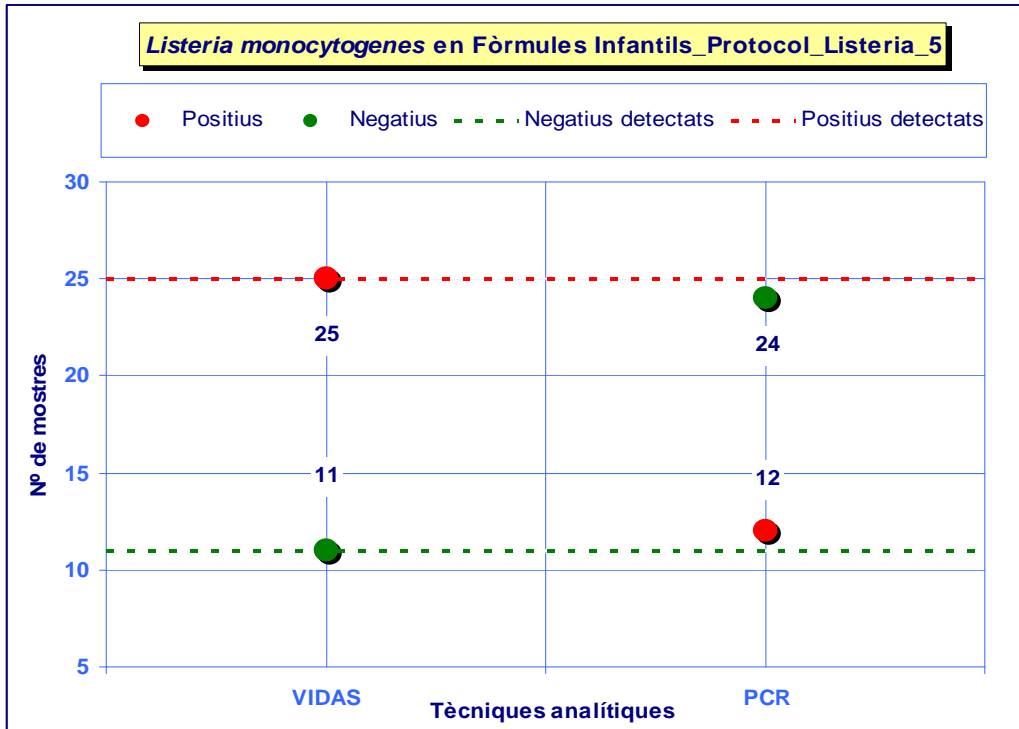


Figura 23. Resultats detectats en la Validació de *Listeria monocytogenes* en Fòrmules Infantils (Protocols Listeria_1, _4 i _5).

Mitjançant la tècnica VIDAS[®] s’han detectat diferències significatives seguint el protocol d’extracció Listeria_4 mentre que per PCR s’han detectat diferències significatives amb els protocols Listeria_1 i Listeria_5.

Taula 56. Resultats del tractament estadístic en l’anàlisi de Fòrmules Infantils per a la *Listeria monocytogenes*.

<i>Listeria monocytogenes</i> en Fòrmules Infantils									
Protocol	Listeria_1			Listeria_4			Listeria_5		
	Xi-Quadrat	Graus de Llibertat	Significació	Xi-Quadrat	Graus de Llibertat	Significació	Xi-Quadrat	Graus de Llibertat	Significació
VIDAS [®]	0,00	1,00	1,00	7,56	0,00	0,01	0,00	1,00	1,00
PCR	5,06	1,00	0,02	0,06	1,00	0,80	22,12	1,00	0,00

4.4. RESULTATS DE LA VALIDACIÓ D' *Staphylococcus aureus*

4.4.1. *Staphylococcus aureus* EN FÓRMULES INFANTILS I PAPILLES

Aquesta validació consta de **63 mostres** (27 Fórmules Infantils i 36 Papilles). L'estudi s'ha realitzat tenint en compte els següents aspectes:

<i>Staphylococcus aureus</i>			
Matrius	Matrius analitzades	Selecció de matrius segons	Total mostres de treball
Fórmules Infantils	3	Composició nutricional	27
Papilles	4	Composició nutricional i coloració	36

a) RESULTATS ESPERATS I DETECTATS EN CADA VALIDACIÓ I MATRIU ALIMENTÀRIA.

En les taules següents apareixen els resultats de les 3 validacions d' *Staphylococcus aureus* en Fórmules Infantils i Papilles.

Taula 57. Resultats de les validacions d' *Staphylococcus aureus* en Fórmules Infantils.

<i>Staphylococcus aureus</i>					
Validació	Fórmules Infantils				
	Mostres analitzades	Resultats esperats		Resultats detectats	
		Positiu	Negatiu	Positiu	Negatiu
1	9	6	3	2	7
2	9	6	3	3	6
3	9	6	3	2	7
Total Mostres	27	18	9	7	20
	Grau de Positivitat	Detectats: 38,9%		No Detectats: 61,1%	

Taula 58. Resultats de les validacions d'*Staphylococcus aureus* en Papilles.

Staphylococcus aureus					
Validació	Papilles				
	Mostres analitzades	Resultats esperats		Resultats detectats	
		Positiu	Negatiu	Positiu	Negatiu
1	12	8	4	2	10
2	12	8	4	6	6
3	12	8	4	3	9
Total Mostres	36	24	12	11	25
	Grau de Positivitat	Detectats: 45,8%		No Detectats: 54,2%	

En Fórmules Infantils, cada validació està formada per **9** mostres (**6** inoculades i **3** no inoculades) i en Papilles cada validació consta de **12** mostres, de les quals **8** estan inoculades i **4** no ho estan.

S'observa que en les dues matrius, es detecten menys mostres positives del que seria esperable. En el total de les 3 validacions, de les **18** mostres inoculades de Fórmules Infantils només **7** han estat detectades com a positives per alguna de les 2 tècniques analítiques (el que suposa un percentatge de detecció del **38,9%**) mentre que en Papilles de les **24** mostres inoculades només **11** mostres han estat detectades (**45,8%** de mostres positives detectades).

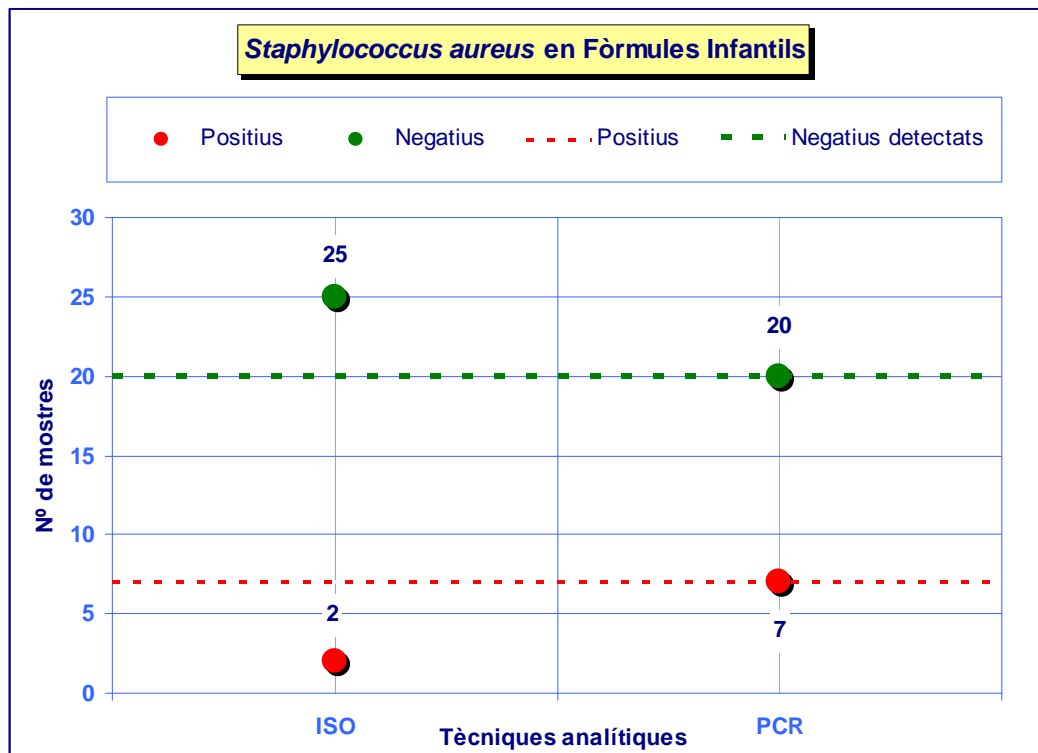
b) RESULTATS DETECTATS PER CADA TÈCNICA ANALÍTICA.

En la taula següent, s'observa que en Fórmules Infantils i Papilles, la tècnica que detecta més positius és la **PCR** (100%), mentre que la ISO detecta un 28,6% en Fórmules Infantils i un 27,3% en Papilles.

Taula 59. Resultats en Fórmules Infantils i Papilles detectats per cada tècnica per a l'anàlisi d'*Staphylococcus aureus*.

Staphylococcus aureus				
Matriu alimentària (nº de mostres analitzades)	Fórmules Infantils (27 mostres)		Papilles (36 mostres)	
Tècniques avaluades	ISO	PCR	ISO	PCR
<u>Positius detectats</u> per alguna de les 2 tècniques	7		11	
Positius detectats per cada tècnica	2 (28,6%)	7 (100%)	3 (27,3%)	11 (100%)
Mostres NO detectades per cap de les 2 tècniques (<u>Negatius detectats</u>)	20		25	
Negatius detectats per cada tècnica	25 (125%)	20 (100%)	33 (132%)	25 (100%)

En les gràfiques següents apareixen representats els resultats detectats en Fórmules Infantils i en Papilles.



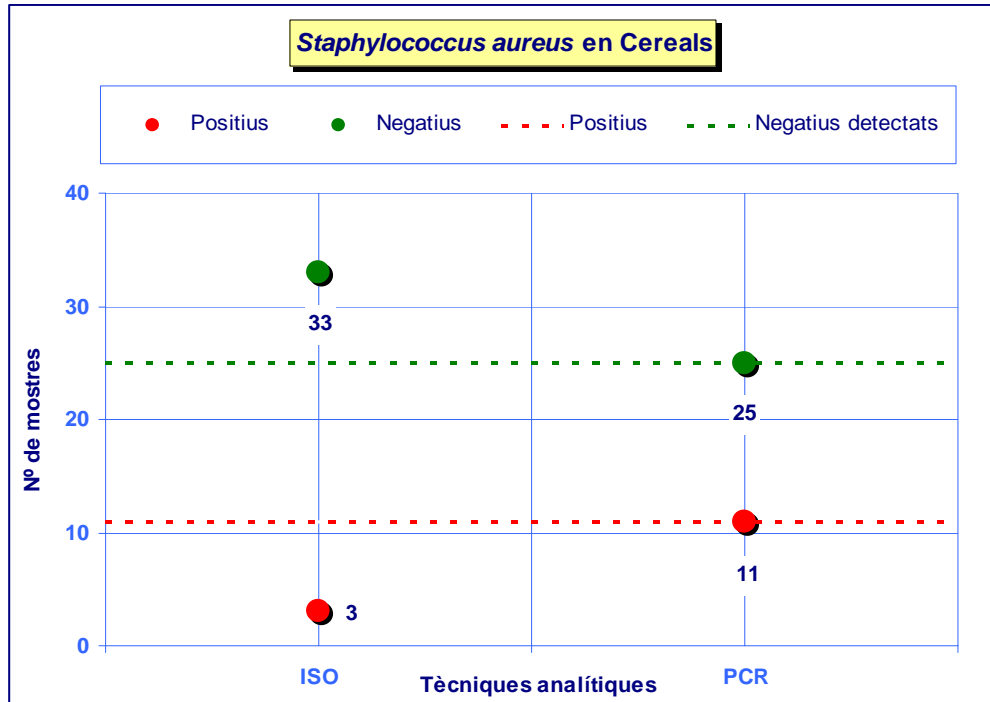


Figura 24. Resultats detectats en la Validació d’*Staphylococcus aureus* en Fórmules Infantils i Papilles.

La tècnica ISO presenta diferències significatives en Fórmules Infantils i en Papilles.

Taula 60. Resultats del tractament estadístic en l’anàlisi de Fórmules Infantils i Papilles per a l’*Staphylococcus aureus*.

Staphylococcus aureus						
Tècnica	Fórmules Infantils			Papilles		
	Xi-Quadrat	Graus de Llibertat	Significació	Xi-Quadrat	Graus de Llibertat	Significació
ISO	4,82	1,00	0,03	8,38	1,00	0,00
PCR	0,00	1,00	1,00	0,00	1,00	1,00

4.4.2. *Staphylococcus aureus* EN FARINES

S'han seleccionat 2 tipus de Farines que formen part de manera majoritària (>90%) en la fórmula final de les Papilles. En total, s'ha treballat amb **18 mostres**.

<i>Staphylococcus aureus</i>			
Matrius	Matrius analitzades	Selecció de matrius segons	Total mostres de treball
Farines	2	Les que formen part de manera majoritària (>90%) en la fórmula final de la Papilla com a producte acabat	18

RESULTATS.

a) RESULTATS ESPERATS I DETECTATS EN CADA VALIDACIÓ I MATRIU ALIMENTÀRIA.

En la taula 61, es mostren els resultats de les validacions d' *Staphylococcus aureus* en Farines. Cada validació consta de **6** mostres, de les quals **4** estan inoculades i **2** no ho estan.

Taula 61. Resultats de les validacions d' *Staphylococcus aureus* en Farines.

<i>Staphylococcus aureus</i> en Farines					
Validació	Número de mostres	Valors esperats		Valors detectats	
		Positiu	Negatiu	Positiu	Negatiu
1	6	4	2	2	4
2	6	4	2	3	3
3	6	4	2	2	4
Total Mostres	18	12	6	7	11

De les **12** mostres inoculades només **7** han estat detectades com a positives per alguna de les 2 tècniques analítiques (ISO i PCR) el que representa una positivitat del **58,3%**.

b) RESULTATS DETECTATS PER CADA TÈCNICA ANALÍTICA.

Segons les dades següents, la tècnica que detecta més positius és la **PCR** la qual detecta el 100% de les mostres positives mentre que la ISO detecta un 57,1%.

Taula 62. Resultats en Farines detectats per cada tècnica per a l'anàlisi d'*Staphylococcus aureus*.

Staphylococcus aureus		
Matriu alimentària (nº de mostres analitzades)	Farines (18 mostres)	
Tècniques avaluades	ISO	PCR
Positius detectats per alguna de les 2 tècniques	7	
Positius detectats per cada tècnica	4 (57,1%)	7 (100%)
Mostres NO detectades per cap de les 2 tècniques (Negatius detectats)	11	
Negatius detectats per cada tècnica	14 (127,3%)	11 (100%)

Com es pot veure en la següent representació gràfica (Figura 25), la tècnica que s'aproxima més als valors detectats (**7**) és la PCR.

Segons les dades de la taula 63, no s'han detectat diferències significatives per cap de les 2 tècniques avaluades (ISO i PCR) tot i que el valor de significació del mètode ISO és molt baix.

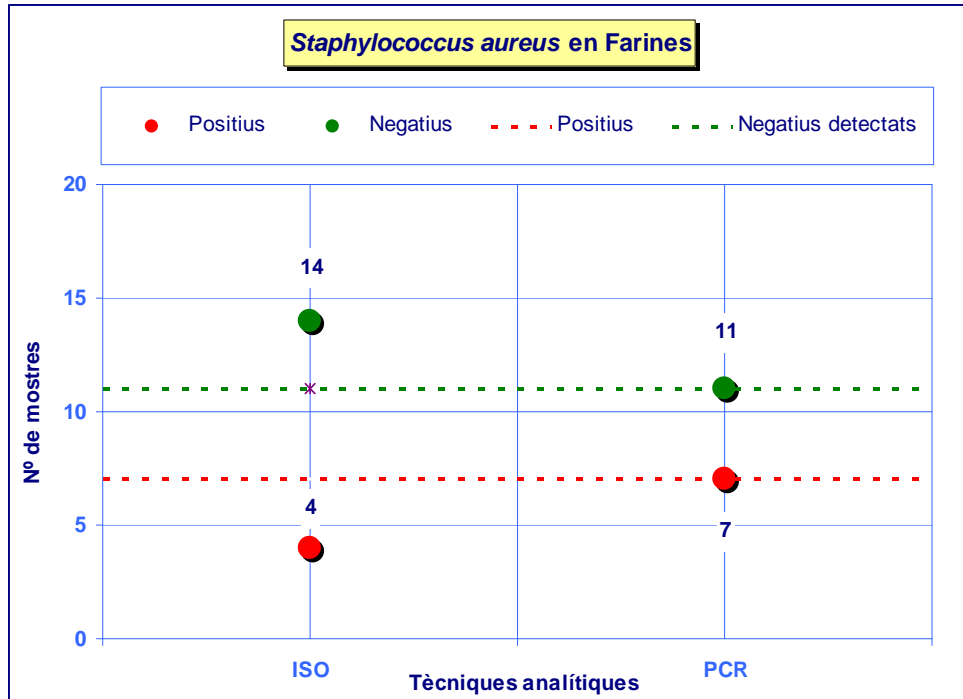


Figura 25. Resultats detectats en la Validació d’*Staphylococcus aureus* en Farines.

Taula 63. Resultats del tractament estadístic en l’anàlisi de Farines per a l’*Staphylococcus aureus*.

<i>Staphylococcus aureus</i> en Farines			
Tècnica	Xi-Quadrat	Graus de Llibertat	Significació
ISO	2,10	1,00	0,15
PCR	0,00	1,00	1,00

4.5. RESULTATS DE LA VALIDACIÓ DE *Cronobacter sakazakii* EN FÓRMULES INFANTILS

En aquest últim apartat, s’ha treballat amb les mateixes Fórmules Infantils estudiades al llarg de les darreres validacions. L’estudi s’ha realitzat seguint el següent esquema:

Cronobacter sakazakii			
Matrius	Matrius analitzades	Selecció de matrius segons	Total mostres de treball
Fórmules Infantils	3	Composició nutricional	36

RESULTATS.

a) RESULTATS ESPERATS I DETECTATS EN CADA VALIDACIÓ I MATRIU ALIMENTÀRIA.

A continuació apareixen els resultats de les validacions del *Cronobacter sakazakii* en Fórmules Infantils.

Taula 64. Resultats de les validacions del *Cronobacter sakazakii* en Fórmules Infantils.

Cronobacter sakazakii en Fórmules Infantils					
Validació	Número de mostres	Valors esperats		Valors detectats	
		Positius	Negatius	Positius	Negatius
1	12	9	3	7	5
2	12	9	3	8	4
3	12	9	3	9	3
Total Mostres	36	27	9	24	12

Cada validació està formada per **12** mostres (**9** inoculades i **3** no inoculades). En el total de les 3 validacions, de les **27** mostres inoculades només **24** han estat detectades com a positives per alguna de les 2 tècniques analítiques (ISO i/o PCR). En aquest cas, la positivitat ha estat del **88,9%**.

b) RESULTATS DETECTATS PER CADA TÈCNICA ANALÍTICA.

Segons les dades que es mostren en la taula 65, les tècniques ISO i PCR detecten totes les mostres positives; per tant, presenten un 100% d'eficiència en la detecció.

Taula 65. Resultats en Fórmules Infantils detectats per cada tècnica per a l'anàlisi del *Cronobacter sakazakii*.

<i>Cronobacter sakazakii</i>		
Matriu alimentària (nº de mostres analitzades)	Fórmules Infantils (36 mostres)	
Tècniques avaluades	ISO	PCR
Positius detectats per alguna de les 2 tècniques	24	
Positius detectats per cada tècnica	24 (100%)	24 (100%)
Mostres NO detectades per cap de les 2 tècniques (Negatius detectats)	12	
Negatius detectats per cada tècnica	12 (100%)	12 (100%)

A continuació apareixen representats gràficament els resultats detectats per cada tècnica. Els mètodes ISO i PCR detecten el 100% de les mostres positives.

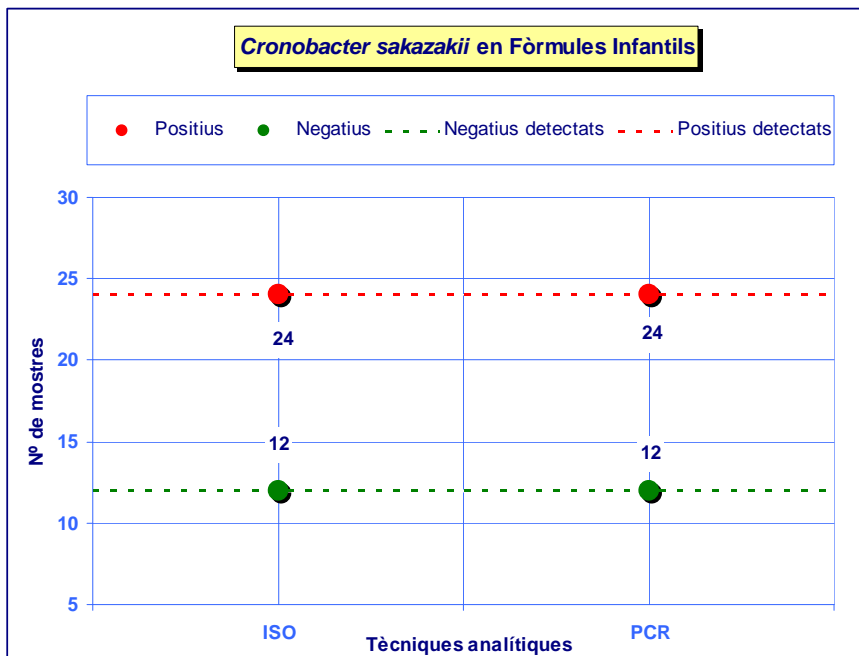


Figura 26. Resultats detectats en la Validació de *Cronobacter sakazakii* en Fórmules Infantils.

No s'han detectat diferències significatives per les tècniques ISO i PCR.

Taula 66. Resultats del tractament estadístic en l'anàlisi de Fórmules Infantils pel *Cronobacter sakazakii*.

<i>Cronobacter sakazakii</i> en Fórmules Infantils			
Tècnica	Xi-Quadrat	Graus de Llibertat	Significació
ISO	0,00	1,00	1,00
PCR	0,00	1,00	1,00

4.6. RESULTATS DE L'ESTUDI DE VIABILITAT DELS MICROORGANISMES PATÒGENS EN ALIMENTS INFANTILS

Degut a l'elevat nombre de mostres positives (artificialment inoculades) no detectades per cap tècnica analítica al llarg de les validacions presentades anteriorment (apartats 4.2 al 4.5), s'ha dissenyat un assaig per tal d'investigar les causes d'aquesta baixa positivitat. La interpretació dels resultats intentarà determinar si la causa ha estat deguda a què el creixement dels patògens ha estat inhibit un cop inoculats en les matrius alimentàries corresponents.

Taula 67. Taula-resum on es detallen els percentatges de positivitat detectats en les darreres validacions per a cada microorganisme i en cada producte assajat.

Microorganismes	Tipus d'anàlisi	Fórmules Infantils	Papilles	Farines
<i>Salmonella</i>	Individual	96,3	84,7	94,4
	Agrupat	100	52,8	NA
	Agrupat + soja	37	13,9	NA
<i>Listeria monocytogenes</i>	Listeria_1	88,9	NA	NA
	Listeria_4	69,6	NA	NA
	Listeria_5	92,6	NA	NA
<i>Staphylococcus aureus</i>	Individual	38,9	45,8	58,3
<i>Cronobacter sakazakii</i>	Individual	88,9	NA	NA

NA: No analitzat.

Per aquest estudi, s'han analitzat un total de **135 mostres** que inclouen els patògens: *Salmonella*, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* i *Cronobacter sakazakii* en diferents matrius de Fórmules Infantils, Papilles i Farines.

Pel cas concret de la *Salmonella* s'ha inclòs l'estudi de l'anàlisi amb mostres individuals i agrupades. L'objectiu és avaluar si hi ha diferències significatives pel fet de treballar amb mostres agrupades. De demostrar que es detecta igual treballant amb mostres individuals que agrupades, significaria una reducció de temps i cost d'anàlisi important pels Laboratoris de les Indústries.

Les tècniques analítiques han estat les mateixes que les utilitzades en les validacions anteriors així com també s'han aplicat els protocols d'extracció del DNA optimitzats, per a cada matriu, i que s'han establert a l'inici del present capítol (apartat 4.1).

S'han inclòs **controls positius** que són mostres que només contenen el bacteri sense cap tipus de matriu acompanyant. Aquestes mostres s'han mantingut en les mateixes condicions que els productes inoculats artificialment; és a dir, dins d'una bossa d'stomacher (sense cap reconstituent) a temperatura ambient i només s'han reconstituït just abans de fer l'anàlisi.

Aquesta avaluació s'ha realitzat per triplicat en 3 dies diferents: **dia 1** (és el mateix dia de la inoculació); **dia 7** (al cap de 7 dies de la inoculació) i **dia 15** (passats 15 dies de la inoculació). En aquest estudi, totes les mostres estaven inoculades; per tant, esperaríem detectar com a positives totes les mostres analitzades.

4.6.1. Salmonella

Taula 68. Resultats obtinguts per les diferents tècniques analítiques en l'estudi de viabilitat de la *Salmonella* al llarg del temps.

Anàlisi de <i>Salmonella</i>		Fórmules Infantils			Papilles		
		Positius esperats	Positius detectats		Positius esperats	Positius detectats	
Tipus anàlisi	Dia d'anàlisi		ISO	PCR		ISO	PCR
Individual	1	3	3	3	4	4	4
	7	3	1	1	4	1	1
	15	3	1	2	4	1	1
Agrupat sense soja	1	3	3	3	4	1	1
	7	3	3	3	4	3	4
	15	3	3	3	4	4	4
Agrupat amb soja	1	3	3	3	4	4	4
	7	3	3	3	4	4	4
	15	3	1	1	4	0	0

Taula 69. Resultats dels Controls Positius de *Salmonella* al llarg del temps en les diferents modalitats d'anàlisi.

Controls Positius de <i>Salmonella</i>			
Tipus d'anàlisi	Dia d'anàlisi	ISO	PCR
Individual	1	Positiu	
	7		
	15		
Agrupat sense soja	1		
	7		
	15		
Agrupat amb soja	1		
	7		
	15		

4.6.2. *Listeria monocytogenes*

Taula 70. Resultats obtinguts per les diferents tècniques analítiques en l'estudi de viabilitat de la *Listeria monocytogenes* al llarg del temps treballant amb diferents brous d'enriquiment (Brou Fraser Semi i Aigua de Peptona Tamponada).

Anàlisi amb:	Brou Fraser Semi					Aigua de Peptona Tamponada	
	Protocol 24 hores		Protocol 48 hores			Positius esperats	Positius detectats
	Positius esperats	Positius detectats	Positius esperats	Positius detectats			
PCR		PCR		VIDAS®			
1	3	1	3	2	1	3	2
7	3	0	3	0	0	3	0
15	3	0	3	0	0	3	1

Taula 71. Resultats dels Controls Positius de *Listeria monocytogenes* al llarg del temps aplicant els diferents mètodes analítics.

Controls Positius de <i>Listeria monocytogenes</i>			
Dia d'anàlisi	Brou Fraser Semi		Aigua de Peptona Tamponada
	VIDAS®	PCR	PCR
1	Positiu		Negatiu
7			Positiu
15			Positiu

4.6.3. *Staphylococcus aureus*

Taula 72. Resultats obtinguts de l'estudi de viabilitat d'*Staphylococcus aureus* els dies 1, 7 i 15 de la inoculació.

Viabilitat al llarg del temps	Fórmules Infantils			Papilles			Farines		
	Positius esperats	Positius detectats		Positius esperats	Positius detectats		Positius esperats	Positius detectats	
		ISO	PCR		ISO	PCR		ISO	PCR
Dia inoculació									
1	3	0	2	4	0	2	2	0	0
7	3	2	3	4	1	3	2	1	2
15	3	0	2	4	0	0	2	0	1

Taula 73. Resultats dels Controls Positius d'*Staphylococcus aureus* al llarg del temps fent servir els mètodes ISO i PCR.

Controls Positius de <i>Staphylococcus aureus</i>		
Dia d'anàlisi	ISO	PCR
1	Negatiu	Negatiu
7		Positiu
15		

Com es pot observar la detecció es negativa per ISO en tots els casos, i només el dia 1 per PCR.

4.6.4. *Cronobacter sakazakii*

Taula 74. Resultats obtinguts per les tècniques ISO i PCR durant l'estudi de viabilitat del *Cronobacter sakazakii* al llarg del temps.

Viabilitat al llarg del temps		ISO	PCR
Dia d'anàlisi	Positius esperats	Positius detectats	
1	3	3	3
7	3		
15	3		

Taula 75. Resultats dels Controls Positius del *Cronobacter sakazakii* llarg de 15 dies aplicant els mètodes ISO i PCR.

Controls Positius de <i>Cronobacter sakazakii</i>		
Dia d'anàlisi	ISO	PCR
1	Positiu	
7		
15		

4.7. REVISIÓ DELS COSTOS ANALÍTICS.

En els Laboratoris de les Indústries, abans d'implantar una nova tècnica, és important avaluar quina és la sensibilitat del mètode, la rapidesa en l'obtenció dels resultats; però també el càlcul del preu de l'anàlisi.

Com es pot veure a continuació, tenint en compte només el **cost dels reactius**, el VIDAS[®] és lleugerament més econòmic que la PCR (0,52 €) mentre que si es té en compte el temps que dedica el personal en fer l'anàlisi i l'amortització dels equips, la PCR té un preu més reduït que el VIDAS[®] (en concret 6,64 € més econòmic en cada anàlisi de *Salmonella* per PCR).

Preus tenint en compte	Només cost dels reactius	Cost dels reactius, treball del personal i amortització de l'equip
1 anàlisi de <i>Salmonella</i>		
VIDAS [®]	6,44 €	24,75 €
PCR	6,96 €	18,11 €

CAPÍTOL 5. DISCUSSIÓ

Al llarg d'aquest estudi s'han realitzat proves per avaluar la sensibilitat i repetibilitat de diferents mètodes analítics per a detectar la presència de microorganismes patògens d'interès en la Indústria d'Alimentació Infantil. Els mètodes comparats han estat: Tradicional (ISO), Immunològic (VIDAS[®]) i Real-Time PCR, amb l'objectiu final de validar internament el sistema de Real-Time PCR i implantar aquesta tècnica en la rutina del Laboratori de la Indústria Alimentària.

Aquestes tècniques representen mètodes d'anàlisi per a la detecció de patògens; no obstant, el mètode de la PCR permet l'obtenció dels resultats dies abans que els mètodes tradicionals de sembra en placa i/o immunològics (Rodríguez-Lázaro, D. 2003). Per tant, la PCR pot reduir el temps i la dedicació del personal en l'anàlisi de patògens en els aliments la qual cosa es tradueix en un increment de la capacitat analítica dels Laboratoris. En aquest sentit la **tècnica de PCR** representa un mètode d'screening molt útil per a la detecció de patògens d'interès en la Indústria d'Alimentació Infantil.

Un altre punt important d'aquest estudi ha estat comprovar internament que els kits comercials de PCR detecten els patògens en les matrius alimentàries que hi ha al mercat. Aquests kits garanteixen l'amplificació in vitro del DNA del patògen, però també s'ha de verificar in vivo que no hi ha problemes de detecció en les mostres de rutina.

En la bibliografia es descriu que els mètodes de preparació de les mostres poden contribuir de múltiples formes a la fiabilitat de la detecció del microorganisme diana. Si l'eficiència de recuperació del microorganisme és baixa podria ocasionar un elevat nombre de falsos negatius (Anònim. 2008b), amb el subseqüent risc per la salut dels consumidors. A més, l'anàlisi es pot veure limitat per la presència de substàncies inhibidores en les mostres, les quals poden interferir en la lisi de les cèl·lules i inactivar la DNA polimerasa. Per tant, durant l'extracció del DNA cal eliminar aquestes substàncies (Alvarez, J. *et al.* 2004).

Els **principals avantatges** de treballar amb la tècnica de PCR a Temps Real en el Laboratori de la Indústria han estat els següents:

- La formació dels analistes és relativament ràpida i senzilla ja que es tracta de procediments sistemàtics i rutinaris.
- La fàcil interpretació dels resultats ja que darrera de cada resultat de “Positiu” i/o “Negatiu” emès per l’equip de PCR hi ha tota una informació addicional de gràfiques i altres paràmetres relacionats amb l’amplificació per PCR, que ajuden a interpretar els resultats finals. Amb l’objectiu de garantir que la reacció de PCR hagi tingut lloc, cada resultat inclou un IPC (Internal Positive Control: control de què la reacció ha tingut lloc) el qual sempre ha de ser visible.
- Possibilitat d’analitzar més d’un patogen en una mateixa placa de PCR tot i que aquesta opció no és exclusiva del sistema PCR ja que d’altres tècniques com el VIDAS[®] permeten analitzar, en una mateixa bateria d’anàlisis, més d’un patogen.

5.1. EXTRACCIÓ DEL DNA.

Partint del protocol d’extracció del DNA establert per la casa comercial dels kits utilitzats (Applied Biosystems) s’ha estudiat com afecten les característiques intrínseques de composició i/o coloració de les diferents matrius analitzades en la reacció de PCR ja que es tenia la sospita que aquests factors podrien interferir en la detecció final.

Fruit d’aquests assajos ha estat possible fixar, en alguns casos, els **protocols d’extracció del DNA** els quals varien en funció de la matriu alimentària.

5.1.1. Fórmules Infantils.

Els resultats obtinguts de les proves preliminars, on es van distingir 2 tipus principals de Fórmules Infantils (normal i amb espessant), ens van obligar a establir un protocol d'extracció diferent per a cada tipus de producte.

El primer procediment que es va avaluar va ser el protocol estàndar d'extracció del DNA (Anònim. 2006c) treballant amb un volum de 100 µl del reactiu PrepMan.

Donat que, en les Fórmules Infantils d'Inici el contingut de greix és d'aproximadament 3,7 grams per 100 grams (Hernández, M. 2001), després del primer pas de centrifugació s'observa la formació d'un anell de greix molt prominent que cal retirar manualment amb un escovilló estèril per a continuar amb el protocol estàndar.

L'inconvenient del greix és que provoca terbolesa en la mostra la qual cosa pot afectar negativament la lectura per fluorescència dins de l'equip ja que l'exactitud i la precisió dels aparells de PCR a Temps Real es veuen afectats (Díaz, S. 2008).

Després de retirar l'excés de greix de la mostra, es va comprovar que el protocol estàndar d'extracció funciona correctament. No obstant, les Fórmules Infantils que contenen espessant en la seva composició encara presenten problemes en l'extracció ja que amb els 100 µl del reactiu PrepMan no hi ha suficient per obtenir prou sobrenedant. Va ser necessari incrementar el volum de reactiu d'extracció PrepMan per obtenir prou sobrenedant per a continuar amb l'extracció. Finalment, es va comprovar que, afegint un volum total de 400 µl de PrepMan a aquest tipus de Fórmula Infantil amb espessant, es podia continuar amb el protocol estàndar de forma satisfactòria.

5.1.2. Papilles.

Les Papilles són un producte que contenen més interferències intrínseques que les Fórmules Infantils. Estan formats per farines hidrolitzades de diverses llavors que poden contenir o no gluten (Martínez, A. 2000). El problema radica en què a mida que augmenta la quantitat d'interferències del producte de partida, s'obté menys sobrenedant (o aquest presenta residus). Per aquest motiu es va decidir estudiar l'efectivitat de 2 procediments de treball diferents:

- a) Aplicar el Protocol estàndar d'extracció i treballar amb un volum de 400 µl de PrepMan (seguint el protocol de les Fórmules Infantils amb espessant).
- b) Incloure, en el primer pas d'extracció del DNA, una centrifugació addicional de 2.000 rpm durant 3 minuts. Després d'aquesta centrifugació es recupera el sobrenedant, el qual està més lliure de partícules, i sobre aquest s'aplica el protocol estàndar amb 100 µl de PrepMan.

Els resultats dels 2 protocols (a i b) van funcionar correctament i es va poder obtenir prou sobrenedant sense terbolesa per carregar la placa de PCR. No obstant, es va optar per treballar amb el mètode a) després de valorar econòmicament el cost de personal en realitzar un protocol més llarg (que inclou una centrifugació extra) i el perill d'incrementar les contaminacions creuades en afegir un pas addicional de centrifugació.

5.1.3. Farines.

Donat que les Farines tenen en la seva composició un elevat percentatge de proteïnes que li donen una major capacitat per absorbir líquids (Anònim. 2008e) i representen la matèria primera amb la qual es fabriquen les Papilles, era esperable que la quantitat d'interferències fossin majors que en el cas de les Papilles.

Per aquest motiu es van provar els protocols a) i b) descrits a “Papilles”. Els resultats demostraren que s’ha d’incloure obligatòriament la centrifugació extra (protocol a) i el volum de PrepMan s’ha d’augmentar fins els 400 µl (protocol b) donat que la quantitat de pellet és considerablement més gran que el format en les Papilles i la dificultat per obtenir prou sobrenedant és major.

Un cop incorporats aquests canvis es podia prosseguir de manera correcta amb l’extracció del DNA seguint el protocol estàndar.

5.1.4. Productes Minoritaris.

Els Productes Minoritaris no provoquen tants problemes de residus sinó més relacionats amb la seva composició i/o coloració. Les seves estructures químiques poden inhibir els sistemes de detecció a l’interaccionar amb compostos de la reacció enzimàtica i algunes coloracions intenses interfereixen en la lectura per fluorescència en l’equip de PCR (Díaz, S. 2008).

Tot i les modificacions introduïdes i les variables assajades en el protocol d’extracció (que inclouen principalment rentats amb tampó PBS, centrifugacions addicionals i filtració amb columnes Microcon), encara s’observa inhibició dels IPC (Internal Positive Control) i de les mostres d’anàlisi.

Per aquesta raó, malgrat que el protocol d’extracció no està optimitzat al 100%, es decideix realitzar els assajos de validació aplicant el protocol que presenta un major rendiment que, en aquest cas, és el Minoritari_3 que inclou una centrifugació de 2.000 rpm durant 3 minuts per a continuar posteriorment amb el protocol estàndar.

5.2. COMPARACIÓ DE TÈCNIQUES ANALÍTIQUES.

Els Laboratoris de les Indústries analitzen la presència de microorganismes patògens en els seus productes abans de què aquests arribin al mercat i garanteixin la protecció de la salut humana (Anònim. 2007b), però dins d'un termini de temps raonable (com poden ser unes 48 hores aproximadament) per a satisfer, precisament, les necessitats d'abastiment dels mercats i perquè la vida útil d'alguns d'aquests productes així ho exigeixen.

Sense perdre de vista aquests requeriments, s'ha avaluat l'aplicació de la tècnica de PCR com a mètode ràpid i alternatiu a les tècniques tradicionals per a detectar microorganismes patògens en aliments infantils.

5.2.1. *Salmonella*.

Les Fórmules Infantils no són productes estèrils i poden ser contaminats per organismes bacterians com la *Salmonella* (Anònim. 2003b). Les dades sobre toxiinfeccions alimentàries demostren que la *Salmonella* és un dels patògens "número u" responsable de malalties transmiseses pels aliments (Rodríguez, J.J. 2007). És per aquest motiu que les Indústries estan instaurant controls en tots els nivells (Laboratoris i els seus mètodes d'anàlisi) per tal de controlar la seva possible presència.

5.2.1.1. Fórmules Infantils i Papilles.

Durant la validació de la *Salmonella* s'ha treballat amb mostres individuals i agrupades ja que, de demostrar-se l'efectivitat d'aquestes últimes, significaria:

- Incrementar la capacitat analítica i càrrega de treball dels Laboratoris.
- Rapidesa en l'obtenció dels resultats.
- Disminuir el cost de l'anàlisi.

En l'anàlisi agrupat, s'ha avaluat l'efecte d'addicionar **proteïna de soja** a les mostres d'anàlisi. Aquest component està considerat com un aliment funcional, **prebiòtic** que produeix efectes beneficiosos estimulants selectivament el creixement i/o activitat d'un o més tipus de bacteris en el colon, els quals tenen a la mateixa vegada la propietat d'eleva el potencial de salut de l'hoste (Robertfroid, M.B. 2000). Cal destacar que la norma ISO 6579:2002 utilitza un brou selectiu d'enriquiment anomenat Rappaport Vassiliadis que també conté soja en la seva composició (Anònim. 2003d) i a més en la bibliografia es descriu la soja com un component que estimula el creixement bacterià (Salas, D. 2007).

S'ha avaluat l'anàlisi agrupat de patògens ja que la norma ISO de la *Salmonella* (Anònim, 2003d) permet l'agrupació de la mostra: en el seu protocol d'anàlisi, fa referència a treballar amb X grams de producte i afegir 9X mil.lilitres del diluent corresponent. A més en l'apartat 9 del "Procedimiento" es detalla: "Con la finalidad de reducir la carga de trabajo cuando haya de analizarse más de una porción para análisis de 25 gramos de un determinado lote de alimento y, cuando exista evidencia de que su mezcla (juntando las porciones para análisis) no afecta al resultado de ese alimento en particular, las porciones de análisis pueden ser mezcladas. Por ejemplo, si deben analizarse 10 porciones de análisis de 25 gramos, se combinan las 10 unidades para constituir una porción para análisis compuesta de 250 gramos y se añaden 2,25 litros de caldo de pre-enriquecimiento..." (Anònim. 2003d).

A continuació es mostren els percentatges de detecció de cada tècnica (ISO, VIDAS® i PCR) segons la modalitat d'anàlisi. Aquestes dades es poden consultar, amb més detall, en el Capítol 4 de Resultats.

Taula. 76. Resum dels resultats obtinguts en les validacions de la *Salmonella* en Fórmules Infantils i Papilles.

Matrius	Modalitat d'anàlisi	(%) de detecció de cada tècnica	Tècniques que presenten diferències significatives
Fórmules Infantils	Individual	<ul style="list-style-type: none"> ▪ PCR (100) ▪ ISO (92,3) ▪ VIDAS® (71,2) 	VIDAS®
Papilles		<ul style="list-style-type: none"> ▪ PCR (100) ▪ ISO (67,2) ▪ VIDAS® (54,1) 	ISO VIDAS®
Fórmules Infantils	Agrupat Sense Soja	<ul style="list-style-type: none"> ▪ PCR (81,5) ▪ ISO (29,6) 	ISO
Papilles		<ul style="list-style-type: none"> ▪ PCR (89,5) ▪ ISO (68,4) 	Cap
Fórmules Infantils	Agrupat Amb Soja	<ul style="list-style-type: none"> ▪ PCR (100) ▪ ISO (70) 	Cap
Papilles		<ul style="list-style-type: none"> ▪ PCR (100) ▪ ISO (100) 	

Segons aquests percentatges de detecció s'observa que, mitjançant la tècnica de **PCR** no es detecta, en cap cas, diferències significatives respecte als resultats positius esperats. Cal destacar que la PCR presenta els nivells de detecció més elevats (comparat amb les altres tècniques avaluades) tant en Fórmules Infantils com en Papilles i en les 3 modalitats d'anàlisi (individual, agrupat sense soja i agrupat amb soja). Els únics casos en què es detecta per sota del 100% de positivitat és mitjançant l'anàlisi agrupat sense soja, tant en Fórmules Infantils (81,5%) com en Papilles (89,5%) tot i que no es detecten diferències estadísticament significatives.

Aquests resultats suggereixen que afegir soja a les mostres agrupades, afavoreix la detecció de positius per PCR; en concret un 18,5% més en Fórmules Infantils i un 10,5% més en Papilles. És important destacar que no s'ha detectat cap mostra amb *Salmonella* no viable (fals positiu) i això podria ser degut a què durant el pre-enriquiment de la mostra s'afavoreix el

creixement i la multiplicació de la *Salmonella* que és viable (Anònim. 2003d). Per tant, després de la incubació la probabilitat d'extreure una alíquota per l'extracció del DNA, que contingui *Salmonella* no viable és despreciable.

Pel que fa al mètode **ISO**, es detecten diferències significatives en Fórmules Infantils analitzades de forma agrupada sense soja i en Papilles analitzades de forma individual. En primer lloc, pel que fa a l'anàlisi agrupat, tant en Fórmules Infantils com en Papilles, es recomana l'addició de soja a la mostra ja que els percentatges de detecció són més elevats en mostres agrupades amb soja (70% en Fórmules Infantils i 100% en Papilles) que sense soja (29,6% en Fórmules Infantils i 68,4% en Papilles). En aquest cas, és clar que l'addició de soja en mostres agrupades incrementa la capacitat de detecció de positius (concretament un 40,4% en Fórmules Infantils i un 31,6% en Papilles).

Pel que fa a l'anàlisi individual, s'observa que la detecció és més elevada en Fórmules Infantils (92,3%) que en Papilles (67,2%) i això pot ser degut a les característiques intrínseques del producte ja que la composició i els nutrients disponibles en les Fórmules Infantils afavoreixen el creixement de la *Salmonella* en aquest tipus d'aliment.

Per últim, amb el sistema **VIDAS[®]**, que només s'ha estudiat en l'anàlisi individual, també s'observa que el percentatge de detecció és superior en Fórmules Infantils (71,2%) que en Papilles (54,1%) probablement pel mateix motiu que succeïa amb el mètode ISO. Destacar que els percentatges de detecció del VIDAS[®] són inferiors als obtinguts pels mètodes ISO i PCR, presentant diferències significatives respecte als resultats positius esperats en totes dues matrius.

Degut a un problema puntual durant la validació, no es va acomplir estrictament el protocol de les 24 hores del VIDAS[®] establert per la casa comercial (bioMérieux); per aquesta raó es descarta totalment l'aplicació del protocol VIDAS[®] si no es segueixen exactament els passos indicats en el procediment analític ja que, d'introduir modificacions, com aturar l'anàlisi el cap de setmana, podria ser que les etapes de pre-enriquiment fossin insuficients per a detectar

la contaminació microbiana amb les conseqüències negatives que podria comportar l'emissió de falsos negatius en la seguretat dels consumidors.

Al llarg de les validacions, s'observa que els percentatges de positius detectats són diferents segons el tipus de matriu alimentària i la modalitat d'anàlisi utilitzada. El grau de positivitat detectada en Fórmules Infantils i en Papilles ha estat els següent:

Matriu alimentària	Fórmules Infantils	Papilles
Modalitat d'anàlisi	Grau de Positivitat segons la matriu	
Individual	96,3%	84,7%
Agrupat Sense Soja	85,2%	52,8%
Agrupat Amb Soja	37%	13,9%

El fet que el grau de positivitat sigui més elevat en Fórmules Infantils que en Papilles (com ja s'ha comprovat en l'anàlisi individual per ISO i VIDAS[®]) pot ser degut a què la Fórmula Infantil és un producte que no dona tants problemes durant la preparació i reconstitució de la mostra, no presenta tantes interferències i perquè representa un aliment molt nutritiu que aporta els requeriments necessaris perquè la *Salmonella* es multipliqui. En canvi les Papilles, per les seves característiques intrínseques, poden provocar més interferències en les tècniques analítiques utilitzades i d'aquí la recomanació de treballar amb bosses d'estomacher amb filtre per tal de retenir part de les impureses de partida de la matriu. Assumint que no hi ha problema tècnic de detecció del patògen en la matriu Papilla, d'aquests resultats es podria deduir que les Papilles representen un producte més segur a nivell microbiològic ja que dificulten més el creixement de la *Salmonella*.

Segons la modalitat d'anàlisi, les dades mostren que la detecció és millor analitzant de forma individual que en agrupat. La raó principal podria ser que, en els Laboratoris, es disposa de més experiència en la manipulació i anàlisi de mostres individuals que agrupades.

Després d'avaluar la baixa detecció de positius en mostres agrupades, es van estudiar quins podrien haver estat els punts crítics durant l'anàlisi. En aquest sentit, es va concloure que és imprescindible adaptar els Laboratoris per a treballar amb mostres agrupades i entre les principals mesures que es recomana implantar en el futur, destaquen principalment:

- Utilitzar bosses d'stomacher més grans (en funció del volum de la mostra de treball) ja que es considera molt crític el pas de reconstitució de la mostra deshidratada amb l'aigua de peptona: la barreja ha de ser molt vigorosa perquè el producte es dissolgui totalment i la contaminació es reparteixi de forma homogènia.
- Incloure ventilació d'aire forçat en les estufes per tal de que la temperatura es reparteixi homogèniament per la mostra incubada. És molt recomanable controlar la temperatura de les estufes mitjançant sondes que permetin la monitorització en continu i així poder detectar, mitjançant els registres de temperatura, si s'ha produït alguna incidència que hagi pogut afectar l'anàlisi.

Pel que fa a l'anàlisi agrupat amb i sense soja, l'addició de soja incrementa el nombre de positius detectats especialment per la tècnica ISO la qual presenta, en Fórmules Infantils, diferències significatives analitzant de forma agrupada sense soja.

Per treballar amb mostres agrupades (amb i sense soja) és imprescindible mantenir la proporció del pre-enriquiment a l'enriquiment; per tant si es treballa amb un "pool" de 5 mostres, després del pre-enriquiment s'ha de treballar amb 5 ml per a fer l'enriquiment (i no amb 1 ml que és el volum de treball per mostres individuals). A més, per la tècnica ISO és obligatori l'addició de soja; en canvi, per PCR, tot i que no es detecten diferències estadísticament significatives, es recomana l'addició de soja ja que es millora el nivell de detecció (concretament un 18,5% en Fórmules Infantils i 10,5 % en Papilles).

Al llarg d'aquests assajos de validació, s'han detectat un seguit d'incidències que han provocat l'aparició de resultats "anòmals". En aquest sentit és important destacar que, en la 3^a validació de l'anàlisi individual de les Papilles,

hi ha un elevat nombre de mostres positives no detectades; en concret dels 24 positius esperats; només s'han detectat 14. Els motius d'aquesta davallada podrien ser deguts a:

- Un error durant l'anàlisi provocat per una sobrecàrrega de treball en el Laboratori.
- S'han introduït modificacions respecte al mètode d'anàlisi original. En concret, durant la 3^a validació es van mantenir les mostres en refrigeració durant el cap de setmana per a continuar l'anàlisi el dilluns següent. Aquesta modificació influeix negativament en l'anàlisi per ISO i VIDAS[®]; ja que la *Salmonella* no posa de manifest les seves propietats morfològiques (per exemple, els seus flagels) que són determinants perquè pugui ser detectada per aquestes tècniques analítiques.

Comentaris sobre l'estudi de viabilitat.

La soca de *Salmonella* (control positiu) ha estat viable i detectada per les tècniques ISO i PCR els dies 1, 7 i 15 després de la inoculació i en les 3 modalitats d'anàlisi (individual, agrupat sense soja i agrupat amb soja).

Per tant, seria esperable detectar la *Salmonella* en totes les mostres d'aquest assaig. No obstant, hi ha una diferència important entre les mostres "control positiu" i les mostres de l'estudi de viabilitat: els controls positius contenen només la soca de *Salmonella*; en canvi, en l'estudi de viabilitat les mostres contenen la *Salmonella* més la matriu (Fórmules Infantils o Papilles).

Tenint en compte aquest fet, la detecció de menys positius en l'estudi de viabilitat podria significar que el producte inhibeix en certa manera la viabilitat i el creixement de la *Salmonella* ja que s'ha descrit que un organisme, per créixer, s'enfronta a diversos factors que afecten el seu metabolisme. Alguns d'aquests factors són l'activitat d'aigua, el pH, la temperatura i els nutrients del medi en què es troba. Aquests factors determinen significativament l'estabilitat i la seguretat microbiològica dels aliments.

En general, en totes dues matrius, s'observa que:

- a) De manera majoritària, tal i com es podria esperar, en els assajos de viabilitat el número de positius tendeix a disminuir al llarg del temps ja que el microorganisme no es troba en unes condicions de conservació idònies pel seu creixement i viabilitat.
 - Després de mantenir la soca durant 15 dies només amb el producte deshidratat, i sense cap tipus de medi hidratant, s'observa que la viabilitat de la *Salmonella* disminueix.
- b) Podem pensar que les característiques de les matrius alimentàries de treball (Fórmules Infantils i Papilles), inhibeixen la viabilitat de *Salmonella* de manera més marcada en Papilles que en Fórmules Infantils.
 - Es detecten més positius en Fórmules Infantils que en Papilles ja que les Fórmules Infantils tenen components nutritius que la *Salmonella* necessita pel seu creixement i viabilitat.
 - Les Papilles representen un producte més segur microbiològicament parlant.
- c) La pre-incubació de les mostres segons la norma ISO (Anònim. 2003d) redueix la probabilitat de detectar *Salmonella* no viable (falsos positius).
- d) En el cas de treballar amb els mètodes ISO i VIDAS[®], l'addició de soja en les mostres agrupades és del tot imprescindible ja que els percentatges de detecció són superiors quan s'addiciona soja que quan es treballa sense soja.
- e) Tant en l'anàlisi individual com agrupat de la *Salmonella*, s'ha comprovat que les modificacions introduïdes respecte al protocol original influeixen negativament en la detecció de mostres positives mitjançant els mètodes ISO i VIDAS[®]; per aquesta raó cal acomplir estrictament els períodes d'incubació i de temperatura.

Per tant, no es recomana aturar l'anàlisi mitjançant refrigeració de les mostres degut a l'elevat risc de no detectar totes les mostres inoculades.

- f) L'únic objectiu de treballar amb mostres agrupades de *Salmonella* amb i sense soja és la reducció econòmica ja que, tot i que l'anàlisi és precís i sensible, la repetibilitat és baixa.
- L'agrupació de mostres de *Salmonella* no seria recomanable sinó hi ha una adaptació important dels Laboratoris per a treballar amb mostres d'un volum més gran com per exemple utilitzar bosses d'estomacher més grans, adaptar els volums d'enriquiment i treballar amb estufes que incorporin ventilació forçada, principalment.

5.2.1.2. Farines.

Com es pot veure en la taula 77, el grau de positivitat detectat per totes les tècniques és força elevat (94,4%) i el mètode que presenta una major eficiència és la ISO (97,1%).

Taula 77. Resum dels resultats obtinguts en les validacions de la *Salmonella* en Farines.

Matriu	(%) de detecció de cada tècnica	Grau de Positivitat segons la matriu	Tècniques amb diferències significatives
Farines	<ul style="list-style-type: none"> ▪ ISO (97,1) ▪ PCR (94,1) ▪ VIDAS® (82,4) 	94,4%	VIDAS®

A nivell estadístic només s'han detectat diferències significatives amb la tècnica VIDAS®.

El fet que es detecti millor per la tècnica ISO que per d'altres tècniques alternatives (com el VIDAS® o PCR) pot ser degut a:

- Els medis de cultiu utilitzats pel mètode ISO no es veuen tan afectats per les característiques i/o coloració del producte.
- Per ISO, la lectura dels resultats la realitza personal del Laboratori (i no un equip) amb la qual cosa podem pensar que la interferència es produeix a nivell intern de l'instrument que llegeix i interpreta els resultats.

En el cas de la PCR, per a obtenir bons resultats és imprescindible:

- Treballar amb bosses d'estomacher amb filtre per a retenir les partícules de partida de la matriu.
- Incloure un pas extra de centrifugació, i posterior eliminació dels residus tal i com s'havia assajat en els protocols d'extracció del DNA. Sense aquesta centrifugació inicial no és possible obtenir prou sobrenedant per a continuar amb el procés d'extracció del DNA.

Encara que el pas extra de centrifugació només s'ha assajat per la tècnica de PCR, podria també millorar els resultats per VIDAS[®] ja que disminueix els interferents i inhibidors de la matriu.

Això significa que un mètode alternatiu a la ISO seria la utilització de la tècnica de PCR incorporant els punts de millora descrits en el protocol d'extracció del DNA, que són bàsicament la introducció d'un pas de centrifugació extra per reduir impureses de la matriu (tal i que es descriu en l'apartat 5.1.3).

5.2.1.3. Productes Minoritaris.

Segons les dades obtingudes, el grau de positivitat es troba al voltant del 50% i el mètode que presenta una major eficiència és la tècnica ISO (91,9%). Pel que fa al mètode VIDAS[®] és el que presenta menys capacitat de detecció (64,9%) i presenta diferències significatives a nivell estadístic.

És important destacar que, de la mateixa forma que succeïa amb les Farines, les característiques dels productes assajats (que inclouen diferents coloracions, pH, terboleses, etc.) afecten negativament la lectura òptica dins d'un equip (VIDAS[®] i PCR) i presenten casos d'inhibició i/o error de lectura amb més freqüència. En el cas dels Productes Minoritaris, aquesta interferència és més marcada i afecta de forma clara a la detecció amb aquestes dues tècniques. Fins i tot mitjançant la tècnica VIDAS[®] s'han detectat diferències significatives.

Taula 78. Resum dels resultats obtinguts en les validacions de la *Salmonella* en Productes Minoritaris.

Protocol	(%) de detecció de cada tècnica	Grau de Positivitat segons la matriu	Tècniques amb diferències significatives
Minoritari_3	<ul style="list-style-type: none"> ▪ ISO (91,9) ▪ PCR (78,4) ▪ VIDAS® (64,9) 	51,4%	VIDAS®

Es recomana no validar, de moment, els productes minoritaris per PCR a l'espera de trobar un protocol que permeti optimitzar l'extracció del DNA degut:

- A la baixa positivitat detectada (78,4%).
- Els problemes apareguts durant l'extracció del DNA.
- El gran número de casos d'inhibició i/ o errors de lectura.

Mentre no s'estableixin altres millores, la tècnica que es recomana utilitzar, per aquest tipus de matriu, és la ISO, ja que les reaccions químiques que tenen lloc en els equips del VIDAS® i la PCR es veuen afectats per la presència d'inhibidors.

5.2.2. *Listeria monocytogenes* en Fórmules Infantils.

La listeriosi transmesa pels aliments és una malaltia relativament poc comú, però greu, amb taxes de mortalitat elevades (20-30%), comparades amb d'altres microorganismes patògens transmesos pels aliments, com la *Salmonella*. La malaltia afecta principalment a segments específics de la població la vulnerabilitat dels quals és major. Bàsicament, *Listeria monocytogenes* és un patogen oportunista que quasi sempre afecta a persones amb una malaltia o circumstància greu, a dones embarassades, fetus i nens acabats de néixer i a persones grans (Anònim. 2004b).

Taula 79. Resum dels resultats obtinguts en les validacions de la *Listeria monocytogenes* en Fórmules Infantils.

Protocol	(%) de detecció de cada tècnica	Variable assajada	Grau de Positivitat segons la matriu	Tècniques amb diferències significatives
Listeria_1	<ul style="list-style-type: none"> ▪ VIDAS® (100) ▪ PCR (81,3) 	Fraser Semi	88,9%	PCR
Listeria_4	<ul style="list-style-type: none"> ▪ PCR (96,9) ▪ VIDAS® (65,6) 	TBS + Extracte de llevat	69,6%	VIDAS®
Listeria_5	<ul style="list-style-type: none"> ▪ VIDAS® (100) ▪ PCR (48) 	Fraser Semi + rentats amb tampó PBS	92,6%	PCR

S'han detectat percentatges baixos de positivitat especialment aplicant el protocol Listeria_4 (69,6%) la qual cosa era esperable perquè només en aquest cas, la Fórmula Infantil s'ha reconstituït amb un brou d'enriquiment diferent al que indica la ISO (el brou Fraser Semi) (Anònim. 1997b). El medi TBS + Extracte de llevat (Salas, D. 2007) no sembla proporcionar bons resultats de recuperació de la *Listeria monocytogenes* en comparació amb el brou Fraser Semi.

El mètode que presenta una major eficiència de detecció és:

- El VIDAS® seguint els protocols Listeria_1 i _5.
- La PCR aplicant el mètode Listeria_4.

S'observa que, segons el protocol utilitzat, s'obtenen diferents nivells de detecció per a cada tècnica. Amb el protocol Listeria_1 i _5 s'obtenen bons resultats pel sistema VIDAS® i una baixa detecció per PCR ja que en tots dos protocols s'utilitza el medi Fraser Semi el qual s'ha vist que interfereix negativament en la detecció per PCR (Anònim. 2006c). Tot i que el protocol Listeria_5 inclou un seguit de rentats amb el tampó PBS per a eliminar l'efecte del medi Fraser Semi, no semblen ser suficients per a eliminar l'efecte negatiu envers la PCR.

En el procediment [Listeria_4](#) se substitueix el brou Fraser Semi pel medi TBS + Extracte de llevat que la bibliografia descriu com a potenciador de la viabilitat de la *Listeria monocytogenes* (Salas, D. 2007). Per aquest motiu s'obtenen millors resultats per PCR; tot i que treballant amb el brou TBS + Extracte de llevat, el nivell de recuperació és un 19,3% més baix que quan s'utilitza Fraser Semi.

Comentaris sobre l'estudi de viabilitat.

Els controls positius de *Listeria monocytogenes* s'han detectat per les tècniques VIDAS® i PCR els dies 1, 7 i 15 utilitzant el brou Fraser Semi com a medi de pre-enriquiment (Anònim. 1997b).

En aquest cas, en contra del que seria esperable, el brou Fraser Semi no ha provocat interferències per la tècnica de PCR; per tant, estem davant d'una situació d'elevada variabilitat de resultats ja que en alguns casos apareixen errors de lectura per PCR i en d'altres no.

No obstant, cal destacar que, donat que en els assajos de validació, es va constatar una clara inhibició del brou Fraser Semi envers la detecció per PCR, durant l'assaig de viabilitat (que es va realitzar a posteriori) es va treballar amb molta més atenció per tal d'eliminar al màxim els residus del brou Fraser Semi en la mostra d'anàlisi la qual cosa podria explicar la millora en els resultats obtinguts per PCR.

Aquesta situació de variabilitat de resultats no és òptima per implantar una tècnica en un Laboratori de rutina de la Indústria on es manipulen i processen diàriament moltes mostres i el sobrecost econòmic de generar repeticions i el temps invertit per personal i equips no permeten la implantació d'una tècnica alternativa (PCR).

Malgrat que la soca de *Listeria monocytogenes* (control positiu) ha estat viable durant els 3 dies d'assajos, quan la soca s'ha inoculat en les Fórmules Infantils, hi ha una davallada significativa de la positivitat.

A la vista dels següents resultats, podem concloure que la *Listeria monocytogenes*:

- És un microorganisme molt sensible a les condicions estressants, de sequedat i que ràpidament deixa de ser viable.
- Les matrius alimentàries de treball, en aquest cas les Fórmules Infantils, podrien afectar negativament la viabilitat de la soca.

Degut als problemes detectats durant l'extracció del DNA i el gran número de casos d'inhibició, es decideix no validar, de moment, l'anàlisi de la *Listeria monocytogenes* en Fórmules Infantils per PCR. Fins que aquestes millores no arribin, es recomana utilitzar, per aquest tipus de matriu, el sistema VIDAS® que està validat per l'Agència Francesa de Normalització (AFNOR).

5.2.3. *Staphylococcus aureus* en Fórmules Infantils, Papilles i Farines.

Staphylococcus aureus és un microorganisme molt resistent a les condicions ambientals i és extremadament difícil d'erradicar. Tot i que no és esporulat suporta bé les condicions extremes encara que s'inactiva a la temperatura de congelació i pot eliminar-se amb una cocció correcta. Es pot localitzar en qualsevol aliment i produeix una intoxicació molt aguda. El responsable del problema és una toxina de caràcter termoestable, que es manté en aliments cuinats, tot i que no estigui present el microorganisme.

Aquest bacteri es troba a la pell dels animals, però també de les persones, així com en la seva gola i fosses nasals, fins el punt que la quasi totalitat de la població humana podrà ser portadora del microorganisme al llarg de la seva vida. Per això, la probabilitat de contaminar els aliments és molt elevada, no

només pels manipuladors, sinó també pels clients al tocar o olorar els aliments (Anònim. 2003b).

Taula 80. Resum dels resultats obtinguts en les validacions de l'*Staphylococcus aureus*.

Matriu	(%) de detecció de cada tècnica	Grau de positivitat segons la matriu	Tècniques amb diferències significatives
Fórmules Infantils	<ul style="list-style-type: none"> ▪ PCR (100) ▪ ISO (28,6) 	38,9%	ISO
Papilles	<ul style="list-style-type: none"> ▪ PCR (100) ▪ ISO (27,3) 	45,8%	
Farines	<ul style="list-style-type: none"> ▪ PCR (100) ▪ ISO (57,1) 	58,3%	Cap

Segons les dades obtingudes, el sistema **PCR** detecta totes les mostres inoculades artificialment amb *Staphylococcus aureus* independentment de la matriu assajada.

Mitjançant la tècnica **ISO** el percentatge més elevat de detecció el trobem a la matriu de Farines (57,1%) mentre que els percentatges obtinguts en Fórmules Infantils i Papilles s'aproximen, en ambdós casos, al 30%.

A la vista d'aquests resultats, hi ha la sospita que els percentatges de detecció d'ambdues tècniques (ISO i PCR) són tan diferents perquè els mètodes no són del tot comparables ja que el límit de detecció de la PCR és de presència/absència mentre que la ISO és d'inferior a 100 ufc/g.

Donat que, en aquest estudi, els inòculs de treball han estat inferiors a 100 ufc/g; (el màxim ha estat de [25 ufc/g]), la ISO les dona com a negatives. Afegit a aquesta situació, cal destacar que la sembra, mitjançant el mètode ISO (Anònim. 1999) s'ha fet en profunditat (i no en superfície) i ha estat difícil observar la presència de l'hàl.lux característic de l'*Staphylococcus aureus*; raó per la qual també es creu que mostres artificialment contaminades, el mètode ISO les podria haver donat com a negatives (és a dir, falsos negatius).

Per altra banda, el motiu d'un major percentatge de detecció en la matriu de Farines podria ser degut a què aquest tipus de producte presenti contaminació de partida per *Staphylococcus aureus* (sense que això comporti un risc per a la salut del consumidor ja que aquest paràmetre no està legislat en Farines) (Anònim. 2007b).

Comentaris sobre l'estudi de viabilitat.

En contra del que seria esperable, la soca d'*Staphylococcus aureus* (control positiu) no ha estat detectada el dia 1 de la inoculació pels mètodes ISO i PCR mentre que els dies 7 i 15 sí s'ha detectat creixement per la tècnica de PCR mentre que per ISO no s'ha detectat en cap cas.

El motiu d'aquesta baixa detecció podria ser degut a què la concentració de patogen inoculada ha estat inferior a 25 ufc/g i el sistema ISO, tal i com s'ha comentat anteriorment, té un límit de detecció superior a 100 ufc/g; per tant, aquesta seria la raó per la que mostres que la PCR detecta com a positives (perquè el seu límit de detecció és de presència/absència), la ISO les dona com a negatives.

Destacar que el dia 1 d'anàlisi els nivells de detecció per **PCR** han estat baixos en les 3 matrius assajades (Fórmules Infantils, Papilles i Farines) ja que, de les 3 mostres inoculades esperades, només detecta 2 mostres (en Fórmules Infantils i en Papilles) mentre que en Farines, la PCR no detecta cap mostra positiva.

En canvi la **ISO** no detecta, el dia 1, cap mostra positiva independentment de la matriu. Al llarg dels següents dies (7 i 15), el nombre de positius detectats, respecte als esperats, han estat molt baixos. Aquesta situació no seria l'esperada ja que el dia 1 d'anàlisi esperaríem que la soca fos viable i detectada, excepte en el cas de què s'haguessin produït problemes durant la

inoculació o viabilitat del cultiu, mentre que els dies 7 i 15 la viabilitat anés disminuint.

Tenint en compte els resultats obtinguts, més que pensar que les matrius alimentàries inhibeixen l'*Staphylococcus aureus*, caldria destacar que la recuperació i viabilitat de la soca ha estat molt baixa malgrat que l'*Staphylococcus aureus* es descriu com un microorganisme molt resistent a les condicions ambientals i extremadament difícil d'erradicar.

Per a la posada a punt en la rutina del Laboratori, es recomana analitzar en paral·lel (ISO i PCR) durant un número representatiu de mostres (mínim 100 mostres) que inclogui les diferents matrius (Fórmules Infantils, Papilles i Farines). Per a dur a terme aquesta comparativa és obligatori adaptar el mètode ISO al límit de <10 ufc/g.

En aquest estudi és important destacar que:

- a) Els mètodes ISO i PCR no han pogut comparar-se ja el límit de detecció de la PCR és presència/absència mentre que per ISO el límit inferior és de màxim 100 ufc/g.
- b) Tot i el baix grau de positivitat detectada en les validacions, per PCR s'han detectat totes les mostres inoculades artificialment.

5.2.4. *Cronobacter sakazakii* en Fórmules Infantils.

El *Cronobacter sakazakii* ha estat relacionat com l'organisme causal d'infeccions neonatals tant esporàdiques com brots epidèmics. És l'agent causal de la infecció invasiva amb un elevat índex de mortalitat en nens acabats de néixer (40-80%). Les infeccions causades per aquest microorganisme són septicèmia, meningitis, infeccions de les vies urinàries i enterocolitis necrotitzant (Anònim. 2003c).

Taula 81. Resum dels resultats obtinguts del *Cronobacter sakazakii* en les validacions de les Fórmules Infantils.

Matriu	(%) de detecció de cada tècnica	Grau de Positivitat segons la matriu	Tècniques amb diferències significatives
Fórmules Infantils	<ul style="list-style-type: none"> ▪ PCR (100) ▪ ISO (100) 	88,9%	Cap

Les tècniques ISO i PCR detecten 24 mostres inoculades artificialment, malgrat que es van inocular artificialment 27 mostres. Per aquest motiu, el grau de positivitat no és del 100% sinó del 88,9%.

Comentaris sobre l'estudi de viabilitat.

La soca del *Cronobacter sakazakii* (control positiu) ha estat viable els dies 1, 7 i 15 i ha estat detectada per les tècniques ISO i PCR.

Al llarg de l'estudi de viabilitat, les tècniques ISO i PCR detecten totes les mostres contaminades. Per tant, la matriu de Fórmules Infantils no sembla inhibir la viabilitat del *Cronobacter sakazakii*. El fet de no haver detectat 3 mostres de treball durant les validacions pot atribuir-se a un problema:

- Durant la inoculació, perquè s'ha treballat amb concentracions del bacteri molt baixes (en alguns casos per sota de 5 unitats formadores de colònies).
- Insuficient homogeneïtzació de la mostra, ja que si aquesta no és correcta la contaminació podria no haver-se distribuït homogèniament a la bossa d'estomacher (aquest fet fa disminuir la probabilitat de trobar el microorganisme en el pipeteig).
- Incorrecta homogeneïtzació de la temperatura de l'estufa durant la incubació donat que, si l'estufa s'ha omplert amb moltes mostres, malgrat acomplir el temps d'incubació establert, existeix la possibilitat que no s'hagi arribat a la temperatura òptima d'incubació establert pel creixement del *Cronobacter sakazakii*.

Es recomana treballar amb la tècnica de PCR ja que els mètodes ISO i PCR presenten la mateixa capacitat de detecció (com s'ha comprovat en els assajos de validació i en l'estudi de viabilitat), però l'avantatge de la tècnica de PCR és que els resultats s'obtenen 2 dies abans que per la tècnica ISO tradicional.

CAPÍTOL 6. CONCLUSIONS

CONCLUSIONS DE L'ESTUDI.

- 1) L'anàlisi per PCR representa un mètode ràpid i alternatiu en la detecció dels patògens en les matrius alimentàries infantils. A més proporciona una elevada sensibilitat, especificitat i probabilitat de detecció.
- 2) Després d'estudiar els nivells de significació de cada tècnica al llarg de les validacions, es recomana la utilització de la tècnica de PCR en les següents matrius:
 - Anàlisi individual de *Salmonella* i *Staphylococcus aureus* en Fórmules Infantils, Papilles i Farines.
 - Anàlisi agrupat de *Salmonella* amb soja en Fórmules Infantils i Papilles.
 - Anàlisi individual de *Cronobacter sakazakii* en Fórmules Infantils.
- 3) Els resultats de les validacions han evidenciat que l'extracció del DNA no sempre ha estat efectiva en totes les matrius ni ha proporcionat una forma correcta amplifacació per PCR.

Els principals inconvenients s'han trobat en la detecció de la *Salmonella* en Productes Minoritaris i la inhibició que el brou d'enriquiment Fraser Semi provoca en la detecció de la *Listeria monocytogenes* en les Fórmules Infantils.

Tot i avaluar altres procediments alternatius, es decideix no aplicar, de moment, la PCR en aquests 2 casos.
- 4) La implantació de les anàlisis per PCR millora l'operativa i l'organització del Laboratori, el que es tradueix en un increment de la capacitat analítica passant de 120 mostres diàries processades pel sistema VIDAS® a 180 mostres per la PCR, el que significa un increment de 60 mostres diàries.

A més, la PCR és una tècnica molt versàtil que no inclou cap incubació llarga, el que representa un avantatge per adaptar el protocol als horaris dels Laboratoris de la Indústria.

- 5) Pel que fa al cost econòmic, tenint en compte el temps de dedicació del personal en fer l'anàlisi i l'amortització dels equips, la PCR té un preu més reduït que el VIDAS[®] (6,64 € més econòmic en cada anàlisi de *Salmonella* per PCR).
- 6) La baixa viabilitat dels patògens en Fórmules Infantils i Papilles indiquen que les característiques de les matrius (deshidratades i amb baixa activitat d'aigua principalment) no afavoreixen el creixement dels microorganismes.
- 7) Un punt molt crític de l'anàlisi de patògens amb mostres agrupades és mantenir la proporció dels volums de pre-enriquiment i enriquiment així com adaptar els Laboratoris a aquesta manera de treballar.
- 8) És estrictament necessari acomplir els temps i les temperatures d'anàlisi indicades en els procediments analítics per a cada microorganisme ja que de no fer-ho es poden donar conseqüències negatives molt importants envers els consumidors (com així s'ha demostrat en els brots de *Salmonella* en Fórmules Infantils durant el 2008).
- 9) Actualment, el mètode de la PCR a Temps Real ha estat optimitzat i validat internament per a la detecció específica de *Salmonella* en Fórmules Infantils i Papilles en el Laboratori de la Indústria dedicada a l'Alimentació Infantil.

CAPÍTOL 7. REFERÈNCIES BIBLIOGRÀFIQUES

Anònim. 1977. Food and Agricultural Organization of the United Nations. Microbiological specifications for foods. Report of the second joint FAO/WHO Expert Consultation. Roma: Naciones Unidas.

Anònim. 1981. World Health Organization (WHO). International Code of marketing of breast-milk substitute. Ginebra.

Anònim. 1994. Food and Agriculture Organization. Codex Alimentarius: Code of hygienic practice for foods for infants and children. CAC/RCP 21-1979. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome, Italy.

Anònim. 1997a. American Academy of Pediatrics. Working group on breastfeeding. Breastfeeding and the use of human milk.

Anònim. 1997b. Scientific Committee for Food. Principles for the development of risk assessment of microbiological hazards under the hygiene of foodstuffs Directive 93/43/EEC. List of Reports of the Scientific Committee for Food.

Anònim. 1997c. Comisión del Codex Alimentarius (FAO/OMS). Principios para el establecimiento y la aplicación de criterios microbiológicos para los alimentos (CAC/GL 21).

Anònim. 1998a. Reial Decret 490/1998, de 27 de Març de 1998, pel que s'aprova la Reglamentació Tècnic-sanitària específica dels aliments elaborats a base de Papilles i aliments infantils per lactants i nens de curta edat. (B.O.E. 07/04/98). Transposició de la Directiva 96/5/CE.

Anònim. 1998b. Reial Decret 72/1998, de 23 de Gener de 1998, pel que s'aprova la Reglamentació Tècnic-Sanitària específica dels preparats per a lactants i preparats de continuació. (B.O.E. 04/02/98). Transposició de la Directiva 91/321/CEE modificada per la Directiva 96/4/CE. Modificat pel Reial Decret 1446/2000, de 31 de Juliol (B.O.E. 01/08/00) i Reial Decret 500/2004, de 1 d' Abril, B.O.E. 02/04/2004.

Anònim. 1999. Horizontal method for the enumeration of coagulase-positive staphylococci (*Staphylococcus aureus* and other species). Norma ISO 6888-2.

Anònim. 2001. Centers for Disease Control and Prevention. Morbidity and mortality weekly Report. *Cronobacter sakazakii* infections associated with the use of powdered infant formula, Tennessee.

Anònim. 2002a. International Commission on Microbiological Specifications for Foods (ICMSF).

Anònim. 2002b. Comisión del Codex Alimentarius (FAO/OMS). Principles and guidelines for incorporating microbiological risk assessment in the development of food safety standards, guidelines and related texts. Report of a Joint FAO/WHO Consultation, Kiel, Germany, 18-22 March.

Anònim. 2002c. World Health Organisation (WHO). Infant and young child nutrition: Global strategy and young child feeding. Ginebra: 55 th World Health Assembly. A55/15.

Anònim. 2003a. Pediatric Nutrition Practice Group of the American Dietetic Association. Infant Feedings: Guidelines for preparation of formulae and breast milk in health care facilities.

Anònim. 2003b. Committee on the review of the use of scientific criteria and performance standards for safe food. Food and Nutrition Board & Board on Agriculture and Natural Resources Scientific criteria to ensure safe food. Washington. DC, USA. The National Academies Press.

Anònim. 2003c. A global *Salmonella* surveillance and Laboratory support project of the World Health Organization (WHO). Department of Communicable Disease Surveillance and Response in collaboration with Centers for Disease Control and Prevention, USA Danish Veterinary Laboratory, Denmark Institute Pasteur, França Health Canada.

Anònim. 2003d. Método horizontal para la detección de *Salmonella* spp. Microbiología de los Alimentos para consumo humano y alimentación animal. AENOR, UNE-EN ISO 6579.

Anònim. 2004a. Promotion of breastfeeding in Europe. Project. Contract N SPC2002359. Protection, promotion and support of breastfeeding in Europe; review of interventions.

Anònim. 2004b. Evaluación de riesgos de *Listeria monocytogenes* en alimentos listos para el consumo. Departamento de Inocuidad de los alimentos de la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación y Organización Mundial de la Salud (FAO/WHO).

Anònim. 2004c. Joint FAO/WHO Workshop on *Cronobacter sakazakii* and other microorganisms in powdered infant formula. Ginebra.

Anònim. 2005a. Codex Committee on Food Hygiene. http://www.fsis.usda.gov/Codex_Alimentarius/Codex_Committee_Food_Hygiene/index.asp.

Anònim. 2005b. UE. Reglamento (CE) nº 2073/2005 de 15 de noviembre de 2005, relativo a los criterios microbiológicos aplicables a los productos alimenticios. DO L3338 de 22 de Diciembre; pp:1-26.

Anònim. 2005c. Red Internacional de autoridades de inocuidad de los alimentos. FAO/WHO.

Anònim. 2006a. Antimicrobial Resistance and Foodborne Outbreaks in the European Union in 2005. The Community Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses, Zoonotic Agents. The EFSA Journal, 94 1.

Anònim. 2006b. Directiva 2006/141/CE de la Comissió del 22 de desembre de 2006 relativa als preparats per a lactants i preparats de continuació i per la que es modifica la Directiva 1999/21/CE.

Anònim. 2006c. Applied Biosystems. Introducción a la PCR Real-Time.

Anònim. 2006d. Milk and milk products. Detection of *Enterobacter sakazakii*. ISO/TS 22964.

Anònim. 2007a. World Health Organization (WHO) <http://www.who.int/es/>.

Anònim. 2007b. Toxiinfecciones alimentarias. Los alimentos y las condiciones que las causan. Consumer Eroski. <http://revista.consumer.es/web/es/19990701/alimentacion/31183.php>.

Anònim. 2007c. VIDAS[®] Seguridad. bioMérieux[®].

Anònim. 2007d. Clínica Universitaria de Navarra. <http://www.cun.es/areadesalud/tu-salud/nutricion-y-salud/formulas-infantiles/>.

Anònim. 2007e. Consumaseguridad. <http://www.consumer.es/seguridad-alimentaria/>

Anònim. 2008a. Agència Catalana de Seguretat Alimentària. <http://www.gencat.cat/salut/acsa/Du12/html/ca/dir1350/index.html>

Anònim. 2008b. Dietética y Salud. <http://www.revistadieticaysalud.com/>

Aggett, P.J. 2001. Fórmulas para la lactancia artificial. Tratado de Nutrición Pediátrica. (ed) R Tojo. Doyma: 387-398.

Agostoni, C., Axelsson, I., Goulet, O., Kolezko, B., Michaelsen, K.F, Puntis, JWL., *et al.* 2004. Preparation and handling of powdered infant formula: a

commentary by the ESPGHAN Committee on Nutrition. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*; 39:320-322.

Aguilar, F., i Escolástica, L. 2008. Caracterización Fenotípica y Genotípica de Estirpes de *Salmonella choleraesuis* aisladas de ambientes marinos. http://www.cybertesis.edu.pe/sisbib/2003/flores_al/html/index-frames.html

Alan, J., Rebecca, I., Eric, T., Sang-Ho Lee, H.T., i Kevin, W. 2006. Rapid, sequence-specific detection of unpurified PCR amplicons by a reusable, electrochemical sensor. *Applied Biological Sciences* 103 (11): 4017–4021.

Baiguini, A. 2005. *Cronobacter sakazakii*: an emerging pathogen!. *La Pediatria medica e chirurgica* 27(1-2):98-100.

Ballabriga, A., i Carrascosa, A. 2001. Tendencias y controversias en la composición de las fórmulas para la alimentación de los lactantes. *Nutrición en la infancia y adolescencia*. (2ª edición), Ergon: 119-154.

Barreda, P. 2008. Comenzando a comer: nuevos sabores en platos y con cuchara. http://www.pediatraldia.cl/comenzando_a_comer.htm.

Berg, J.M., Stryer, L., Tymoczko, J., i Macarulla, J.M. 2008. *Bioquímica*. Ediciones Reverte.

Carpentier, B., i Cerf, O. 1993. Biofilms and their consequences, with particular reference to hygiene in the food industry. *Journal of Applied Bacteriology*. 75:499-511.

Chavarrías, M. 2007. Nuevas pautas para el control de toxiinfecciones alimentarias. *Consumer Eroski*.

Clark, N.C., Hill, B.C., O'Ara, C.M., Steingrímsson, O., i Cooksey, R.C. 1990. Epidemiologic typing of *Cronobacter sakazakii* in two neonatal nosocomial outbreaks. *Diagnostic Microbiology and infectious disease* 13(6):467-72.

Conde, A., Perez, A., Echaniz, I., Hernando, Z., i Arrate, J.K. 2007. Sepsis neonatal por *Enterobacter sakazakii*. *Pediatrics* 66, 191-200.

Criado, E., i Merino, M. 2005. Lactancia artificial y biberón. Centro de Salud El Greco (Getafe). Madrid.

Derzelle, S., i Dilasser, F. 2006. A robotic DNA purification protocol and real-time PCR for the detection of *Cronobacter sakazakii* in powdered infant formulae. *BMC Microbiology*.

Díaz, S. 2008. Cómo ver la PCR en directo: La RT-PCR. Dpto Biología Molecular y Bioquímica, Universidad de Málaga

Dinges, M., Orwin, P., i Schlievert, P. 2000. Exotoxins of *Staphylococcus aureus*. *Clinical Microbiology Reviews* 1; 16-34.

Drudy, D., Mullane, N.R., Quinn, T., Wall, P.G., i Fanning, S. 2006. *Cronobacter sakazakii*: an emerging pathogen in powdered infant formula. *Clinical Infectious Diseases*; April 1;42(7):996-1002.

Fein, S.B., i Falci, C.D. 1999. Infant formula preparation, handling, and related practices in the United States. *Journal of the American Dietetic Association*; 99: 1.234-1.240.

García-Onieva, M. 2003. Lactancia artificial: Técnica, indicaciones y fórmulas especiales. Centro de Salud Entrevías, Área 1. Madrid.

Gill, C.O., i Reichel, M.P. 1989. Growth of the cold-tolerant pathogens *Yersinia enterocolitica*, *Aeromonas hydrophila* and *Listeria monocytogenes* on high-pH beef packaged under vacuum or carbon dioxide. *Food Microbiology*; 6:223-230.

Gurtler, J.B., Kornacki, J.L., i Beuchat, L.R. 2005. *Cronobacter sakazakii*: a coliform of increased concern to infant health. *International Journal of Food Microbiology* 104(1):1-34.

González, M. 2008. Detección de Ácidos Nucleicos. www.dim.uchile.cl/CIMPA/Cursos/Mauricio_Gonzalez/CIMPA-Biologia%20MG/clase%202/clase%202.ppt

Hamlym, B., Broker, S., Olenikova, K., *et al.* 2002. Infant feeding. Londres. Food and Agricultural Organization of the United Nations.

Hein, I., Flekna, G., Krassnig, M., i Wagner, M. 2006. Real time PCR for the detection of *Salmonella* spp. in food: An alternative approach to a conventional PCR system suggested by the Food-PCR project. *Journal of Microbiology Methods* 66(3):538-47.

Herald, P.J., i Zottola, E.A. 1988. Attachment of *Listeria monocytogenes* to stainless steel surfaces at various temperatures and pH values. *Journal of Food Science* 53:1549-1562.

Hernández, M. 2001. Alimentación Infantil, 3ª Edición. Editorial Díaz De Santos.

Himelright, I., Harris, E., Lorch, V. *et al.* 2002. *Cronobacter sakazakii* infections with the use of powdered infant formula. *The Journal of the American Medical Association* 287:2.204-2.205.

Holland, P.M., Abramson, R.D., Watson, R., i Gelfand, D.H. 1991. Detection of specific polymerase chain reaction product by utilizing the 5'-3' exonuclease

activity of *Thermus aquaticus* DNA polymerase. Proceedings of The National Academy of Sciences USA 88:7276-80.

Hudson, J.A., i Mott, S.J. 1993a. Growth of *Listeria monocytogenes*, *Aeromonas hydrophila* and *Yersinia enterocolitica* on cold-smoked salmon under refrigeration and mild temperature abuse. Food Microbiology 10:61-68.

Hudson, J.A., i Mott, S.J. 1993b. Presence of *Listeria monocytogenes*, motile aeromonads and *Yersinia enterocolitica* in environmental samples taken from a supermarket delicatessen. International Journal of Food Microbiology 18:333-337.

Kandhai, M.C., Reij, M.W., Gorris, L.G.M., Guillaume-Gentil, O., i Van Schothorst, M. 2004. Occurrence of *Cronobacter sakazakii* in food production environments and households. Lancet 363:39-40.

Kawasaki, S., Kimura, B., i Fujii, T. 2001. Comparison of TaqMan[®] *Salmonella* amplification/detection kit with standard culture procedure for detection of *Salmonella* in meat mostres 42(1):33-9.

Ke, D., Ménard, C., Picard, F.J., Boissinot, M., Oullette, M., Roy, P.H., *et al.* 2000. Development of conventional and real-time PCR assays for the rapid detection of group B streptococci. Clinical Chemistry 46:324-31.

Lai, K.K. 2001. *Cronobacter sakazakii* infections among neonates, infants, children and adults: case reports and review of the literature. Medicine 80; 113-120.

LeChevalier, M.W., Cawthon, C.D., i Lee, R.G. 1998. Inactivation of biofilm bacteria. Applied and Environmental Microbiology 54(10): 2492-2499.

Löfström, C., Knutsson, R., Axelsson, E., i Rådström, P. 2004. Rapid and Specific Detection of *Salmonella* spp. in Animal Feed by PCR after Culture Enrichment. *Applied Environment Microbiology* 70 (1): 69–75.

Mackay, I.M., Arden, KE, i Nitsche, A. 2002. Real-time PCR in virology. *Nucleic Acids Research* 30:1292-305.

Malorni, B., Paccassoni, E., Fach, P., Bunge, C., Martin, A., i Helmuth, R. 2004. Diagnostic Real-Time PCR for Detection of *Salmonella* in Food. *Applied Environment Microbiology* 70(12): 7046–7052.

Martínez, A. 2000. La alimentación del bebé: ¿Qué preparado de cereales para bebés es mejor?. <http://www.elbebe.com/>.

Mata, A.I. 2007. Introducción a las técnicas de Biología Molecular. BioMérieux España, S.A.

Miint, M.S., Johnson, IJ., Taulante, NL., i Heckert, RA. 2006. The effect of pre-enrichment protocol on the sensitivity and specificity of PCR for detection of naturally contaminated *Salmonella* in raw poultry compared to conventional culture. *Food Microbiology* 23(6):599-604.

Molifa, J.A., i Valenzuela, A. 2001. Lactancia artificial y mixta. Tratado de Pediatría. M Cruz. (8th edition) 596-606.

Moreno, J.M., Galiano, M.J., i Dalmau, J. 2005. Preparación y manejo de las fórmulas infantiles en polvo. Reflexiones en torno a las recomendaciones del Comité de Nutrición de la ESPGHAN. *Acta Pediátrica Española* 63: 279-282.

Moretti, T., Koons, B., i Budowle, B. 1998. Enhancement of PCR amplification yield and specificity using AmpliTaq Gold DNA polymerase. *Biotechniques* 25:716-22.

Murray, P.R. 1995. Manual of Clinical Microbiology. 6th edition.

Nazarowec-White, M., i Farber, JM. 1997a. Thermal resistance of *Cronobacter sakazakii* in reconstituted dried infant formula. Letters in Applied Microbiology 24:9-13.

Nazarowec-White, M., i Farber, J.M. 1997b. *Cronobacter sakazakii*: a review. International Journal of Food Microbiology 103-113.

Pascual Anderson, M^a. 1992. Microbiología alimentaria, metodología analítica para alimentos y bebidas. Editorial Díaz de Santos S.A, Madrid.

Pelayo, M. 2007. Seguridad en alimentos infantiles. Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición y Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria.

Pérez-Choliz, V. 2003. Lactancia de fórmula. Nutrición en Pediatría.(2^a edición) (eds) M. Bueno, A. Sarría, JM. Pérez-González. Ergon; 139-148.

Petra, F., Wolffs, G., Glencross, K., Thibaudeau, R., i Mansel, W. Griffiths. 2006. Direct Quantitation and Detection of *Salmonella* in Biological Samples without Enrichment, Using Two-step Filtration and Real-Time PCR. Applied Environment Microbiology 72(6): 3896–3900.

Renfrew, M.J., Ansell, P., i MacLeod, KL. 2003. Formula feed preparation: helping reduce the risks; a systematic review. Archives of disease in childhood; 88: 855-858.

Robertfroid, M.B. 2000. El rol de los prebióticos en la alimentación infantil. Nestlé. Comunicación a profesionales.

Rodríguez, J.J. 2003. Beneficios y riesgos de la lactancia artificial. Consumer Eroski. <http://www.consumer.es/seguridad-alimentaria/sociedad-y-consumo/2003/04/23/6045.php>.

Rodríguez, J.J. 2007. Criterios microbiológicos y niveles de seguridad. Consumer Eroski. <http://www.consumer.es/seguridad-alimentaria/ciencia-y-tecnologia/2007/06/13/27901.php>.

Rodríguez-Lázaro, D., Hernandez, M., Esteve, T., Hoofar, J., i Pla, M. 2003. A rapid and direct real time PCR-based method for identification of *Salmonella* spp. *Journal Microbiology Methods* 54(3):381-90.

Sails, A.D., Andrew, J., Frederick, J., David, R., Wareing, A. i David, L.A.. 2003. A Real-Time PCR Assay for the Detection of *Campylobacter jejuni* in Foods after Enrichment Culture. *Applied Environment Microbiology* 69(3): 1383–1390.

Salas, D. 2007. Evaluación de metodologías de control higiénico de superficies alimentarias y adaptación de la PCR en tiempo real como método de control de patógenos. Tesis Doctoral del Departament de Ciència Animal i dels Aliments de la Facultat de Veterinària de la Universitat Autònoma de Barcelona.

Scheu, P., Gasch, A., i Berghof, K. 1999. Rapid detection of *Listeria monocytogenes* by PCR-ELISA. *Applied Microbiology*, 29, 416–420.

Siblei, J., Iue, B., Huang, F., Harding, J., Kingdon, J., Chirino-Trejo, M., i I Appleyard, GD. 2003. Comparison of bacterial enriched-broth culture, enzyme linked immunoabsorbent assay and broth culture-polimerase chain reaction techniques for identifying asymptomatic infections with *Salmonella* in swine. *Canadian Journal of Veterinary Research* 67(3): 219–224.

Stoll, B., Hansen, N., Avroy, A. i Fanaroff, JA. 2004. Lemons, for the National Institute of Child Health and Human Development Neonatal Research Network.

Cronobacter sakazakii is a rare cause of neonatal septicemia or meningitis in infants.

Tyagi, S., i Kramer, F.R. 1996. Molecular beacons: Proves that fluorescent upon hybridization. *Nature Biotechnology* 14:303-8.

Van Acker, J., Smet, F., Muylde-mans, G., Bougatef, A., Naessens A., i Lauwers, S. 2001. Outbreak of necrotizing enterocolitis associated with *Cronobacter sakazakii* in powdered milk formulae. *Journal of Clinical Microbiology*; 39:293-297.

Virgilio, R., Cordano, A.M., Escobedo V., i Escobedo, M.E. 1974. *Revista Chilena Pediatría* 45, N 1.

Weir, E. 2002. Powdered infant formula and fetal infection with *Cronobacter sakazakii*. *Canadian Medical Association Journal* 166 (12).

CAPÍTOL 8. PUBLICACIONS RELACIONADES

PUBLICACIONES RELACIONADAS.

El passat mes de gener (22 i 23 de gener del 2009) es va celebrar un congrés internacional sobre el *Cronobacter sakazakii*: “1st International Conference on *Cronobacter (Enterobacter sakazakii)*” a Dublín on es va presentar un pòster amb els resultats de la validació del *Cronobacter sakazakii* obtinguts en aquest estudi. El pòster portava per títol: “**Validation study of a *Cronobacter sakazakii* Real-Time PCR Kit with Infant Formula**”.



1st International Conference on *Cronobacter (Enterobacter sakazakii)*

January 22nd & 23rd, 2009
University College Dublin, IRELAND

