SEGURIDAD ALIMENTARIA: UN NUEVO RETO PARA LAS TÉCNICAS ANALÍTICAS

Teresa Arangüena Rodríguez
Pascual Alonso Moreno

Laboratorio de Diagnósticos y Alimentación 2008 S.L. (LABDIAL).

Las crecientes exigencias desde el campo de la Seguridad Alimentaria hacia los sectores primarios de nuestra ganadería, y más en concreto en lo referente al control de *Salmonellas* zoonoóticas sobre el sector de avicultura de puesta en primera instancia, y del sector de avicultura de carne en un plazo muy corto, precisan la necesidad de una actualización de las técnicas analíticas disponibles para el control de esta zoonosis. En el presente artículo se pretende hacer un balance de la situación actual por lo que a técnicas analíticas disponibles se refiere, con especial énfasis el tiempo de obtención de resultados, la sensibilidad, el coste y la oficialidad de la técnica.

En la actualidad, la mayoría de las técnicas utilizadas para detección de Salmonella, son **métodos microbiológicos** directos basados en el aislamiento e identificación de este microorganismo. Pues pese a que existen técnicas serológicas —fundamentalmente ELISA—, éstas últimas presentan numerosos inconvenientes en su uso: se trata de métodos de detección indirecta, en los que puede haber interferencia con anticuerpos vacunales, los resultados son de difícil interpretación y en ningún caso son oficiales. De otro lado, y con gran irrupción en el mercado, aparecen los **métodos basados en biología molecular**.

1. MÉTODOS MICROBIOLÓGICOS

Presentan un esquema común de procedimiento: preenriquecimiento, enriquecimiento selectivo, detección específica en medios sólidos, confirmación de positivos por pruebas serológicas y/o bioquímicas, y serotipado.

Asimismo, todos ellos gozan de aplicabilidad a una amplia diversidad de muestras procesables: heces, polvo, fondos de caja, meconios, contenido de ciegos, huevos, muestras de superficie...

Estos métodos microbiológicos utilizados podemos dividirlos en dos tipos:

1) Métodos microbiológicos propiamente dichos, que aglutinan el desarrollo de la **NORMA ISO 6579 : 2002** y su variante, "Anexo D de la Norma ISO 6579:2002", que aporta como principal novedad el enriquecimiento selectivo con siembra directa en un medio semisólido específico para *Salmonella spp* —Rappaport Vassiliadis semisólido—, lo que permite adelantar un día la confirmación de resultados negativos.

Se trata de métodos horizontales para detección de *Salmonella spp*, cuyas principales etapas de desarrollo se resumen en:

*Día 1: Enriquecimiento en agua de peptona (20 horas).

*Día 2: Pase a caldos selectivos para *Salmonella spp* (Rappaport Vassiliadis -RV- y Müller K. Tetrationato -MKTT).(24 horas).

En este punto el Anexo D, sustituye el caldo selectivo por el medio semisólido específico.

*Día 3: Pase a medios sólidos específicos para *Salmonella spp* —XLD y otro medio específico de libre elección—. (24 horas).

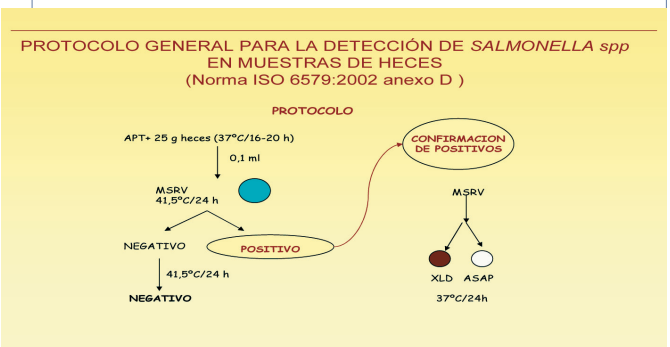
Según el anexo D, las placas negativas deben incubarse durante 24 horas más para su confirmación. Las placas positivas deben confirmarse con siembra en medios XLD y otro medio específico de libre elección.

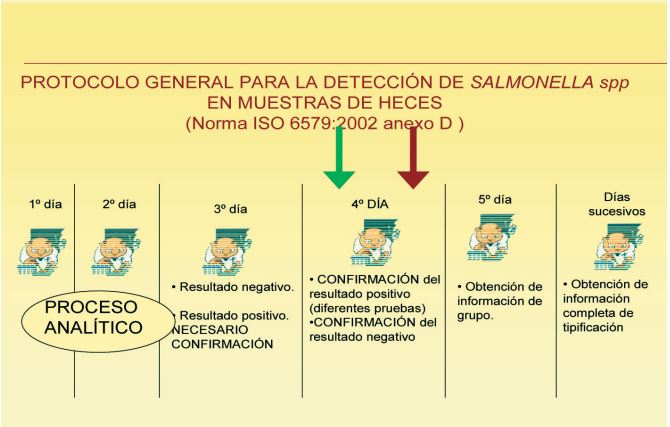
*Día 4: Lectura de las placas de medios sólidos específicos.

Si seguimos el anexo D, este día se realiza la lectura de confirmación tanto de positivos y de negativos.

El Anexo D de la NORMA ISO 6579 : 2002, es el Método Oficial para el control de heces y de muestras del Estado Primario de Producción. El resto de muestras, fundamentalmente referidas a la industria alimentaria, se procesan según el método genérico que marca la NORMA ISO 6579 : 2002, con validez en todo el territorio europeo.

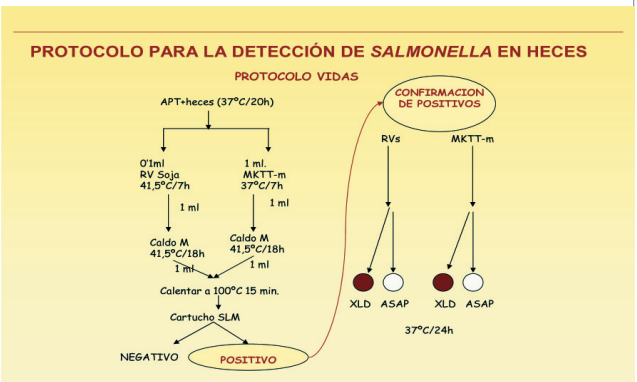
A partir de este día, si el resultado obtenido de la lectura de las placas es positivo, empieza la confirmación con pruebas serológicas y bioquímicas y su posterior tipificación (sólo este proceso puede llevarnos 3 -4 días).

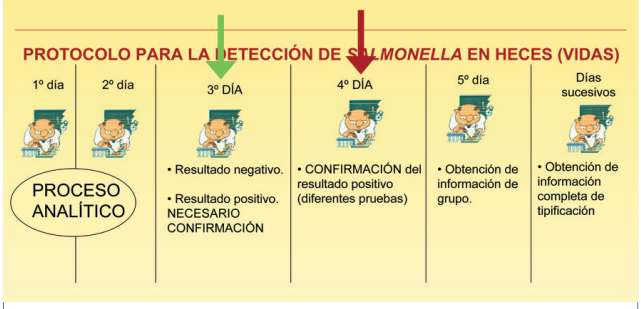




2) Métodos microbiológicos combinados con técnicas de Inmunoensayo: TÉCNICA MINIVIDAS: en una primera fase se procede de forma similar a los métodos anteriores, con enriquecimiento en peptona —20 horas—, siembra en medios Rappaport Vassiliadis y Müller K. Tetrationato —7 horas— y resembrado posterior en caldo M —18 horas—. El tercer día, por medio de la Técnica MINIVIDAS —basado en inmunoensayo—, en 45 minutos procedemos a la lectura de los cartuchos, lo que nos permite confirmar los negativos en este momento. Los positivos se siembran en medio XLD y otro medio de elección para su confirmación el 4º día.

Este método está protocolizado tanto para heces y muestras de estadio primario, como para alimentos (validado en este segundo por la Norma AFNOR BIO 12/1-04/94).





En ambos métodos obtenemos resultados de análisis hasta el nivel de *"Salmonella spp"*, por lo que se debe continuar con un método común de Serotipado, cuyo desarrollo se resume en:

1) Antígenos somáticos "O": se realizan pruebas de aglutinación con diferentes antisueros somáticos que nos darán, inicialmente, la información de grupo para obtener finalmente una información más completa en cuanto a las características antigénicas de las *Salmonella*.

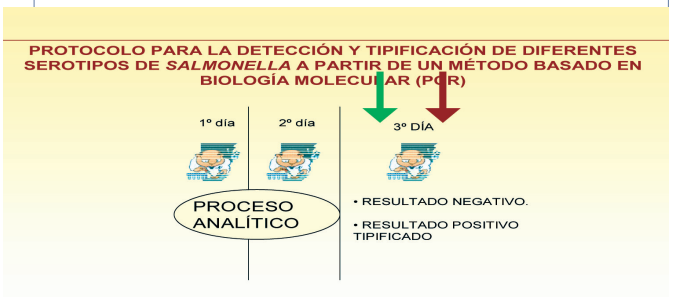
2) Antígenos flagelares "H": con las mismas pruebas de aglutinación y utilizando diferentes antisueros flagelares vamos obteniendo una información más completa hasta poder determinar finalmente de qué *Salmonella* se trata.

MÉTODOS BASADOS EN BIOLOGÍA MOLECULAR

La PCR —Reacción en Cadena de la Polimerasa— es un método basado en la detección de DNA específico del patógeno que sea detectar en la muestra a analizar, con implantación creciente en el diagnóstico laboratorial.

Básicamente la técnica consiste en la extracción del DNA presente en la muestra, para posteriormente realizar una amplificación de fragmentos específicos de DNA del patógeno que buscamos usando "primers" diseñados especialmente para alongar estos fragmentos. Es posible utilizar "primers" específicos de determinados serotipos de *Salmonella* —hasta 65 serotipos—, de tal forma que la información final que se obtiene es una tipificación completa. En caso que la muestra sea positiva, el DNA amplificado de *Salmonella* se detectará posteriormente con mecanismos de fluorescencia (RT-PCR, PCR a tiempo real).

Este método de RT-PCR se caracteriza por su elevada especificidad —detectamos DNA específico del patógeno—, por su versatilidad para muestras de distinta naturaleza y sobre todo por su tiempo tan rápido de detección de positivos totalmente confirmados y serotipados: 3 días.



Es sin duda, el método con mayor implantación en un futuro próximo, y pese a que no es un método oficial, su validación puede obtenerse en el plazo de 1,5 años.

COMPARATIVA ENTRE MÉTODOS

Como se muestra en el cuadro comparativo adjunto, podemos señalar:

1. La PCR es el método más rápido de detección, especialmente por lo que se refiere a la obtención de positivos serotipados. En los métodos microbiológicos el VIDAS aventaja en la confirmación de negativos a la Norma ISO 6579.

2. La sensibilidad es idéntica para los métodos microbiológicos, si bien la PCR implica un salto cualitativo en este sentido.

3. El coste es muy similar en todos los métodos microbiológicos. El PCR tiene un coste algo superior para un resultado negativo —si se compara con los métodos microbiológicos—, pero muy similar a los costes de métodos microbiológicos si el resultado es positivo tipificado.

4. Únicamente son Oficiales los métodos expuestos en la Norma ISO 6579:2.002 y su Anexo D.

Por último, a la vista de esta exposición, sólo queda concluir que existen a disposición de los operadores y productores del sector técnicas analíticas suficientes para todo tipo de análisis —controles internos, autocontroles oficiales, etc...— y para cualquier tipo de muestra —heces, pienso, materias primas, huevos, superficies, etc...—. Estas técnicas se hacen imprescindibles para: medir la eficacia de las medidas correctoras adoptadas en los últimos tiempos —vacunaciones, medidas de bioseguridad, higienización del pienso...—, para implementar y poner en marcha medidas adicionales y, en definitiva, para poder tomar decisiones empresariales estratégicas y poder garantizar la puesta en el mercado de productos seguros, sanos y trazables. ●

Cuadro Comparativo de técnicas analíticas para la detección de los principales agentes productores de zoonosis.

		VIDAS HECES	ANEXO D DE ISO 6579	VIDAS OTRAS MUESTRAS	ISO 6579	PCR
Tiempo de detección	Negativo	3 días	4 días	3 días	4 días	48- 60 horas
	Positivo	4 días	4 días	4 días	5 días	
	Tipificación	6º en adelante	6º en adelante	6º en adelante	6º en adelante	
Sensibilidad		Muy buena	Muy buena	Muy buena	Muy buena	Muy buena
Coste	Neg-pos	++	++	++	++	+++
	Tipificación	+++	+++	+++	+++	
Oficialidad		NO	SI	NO	SI	NO