Referencia: AGL2002-03496

MINISTERIO DE EDUCACIÓN Y CIENCIA

DIRECCIÓN GENERAL DE INVESTIGACIÓN

PROYECTO DE INVESTIGACIÓN
Y DESARROLLO TECNOLÓGICO

INFORME FINAL

Investigador Principal:	Teresa Aymerich
Título del Proyecto:	« Seguridad alimentaria en productos cárnicos: aplicación de sistemas emergentes de conservación y evaluación de patógenos mediante el desarrollo de nuevas técnicas moleculares »
Organismo:	« Institut de Recerca i Tecnología Agroalimentaries (IRTA)»
Centro:	«Centro de Tecnologia de la Carne»
Departamento:	«Microbiología i Biotecnología Alimentarias»
Fecha de Inicio:	«4-12-2002»
Fecha de Finalización:	«4-12-2005»

Fecha:

Conforme el
Representante Legal
del Organismo:

El Investigador Principal:

Fdo: Sergi de Lamo

Fdo: Teresa Aymerich

Ilmo. Sr. Subdirector General de Proyectos de Investigación
Paseo de la Castellana, 160. 28071 MADRID

A. MEMORIA. Resumen de los resultados del proyecto en relación con los objetivos propuestos (máximo 2.000 palabras)

Destaque su relevancia científica y/o su interés tecnológico.
En el caso de haber obtenido resultados no previstos inicialmente, indique su relevancia para el proyecto.
En caso de resultados fallidos, indíquense las causas.

Durante el desarrollo del proyecto se ha podido constatar la relevancia de la utilización de métodos alternativos de conservación tales como la alta presión hidrostática; así como el efecto añadido de los bioconservantes naturales aplicados en masa o envasado activo en la seguridad alimentaria de los productos cárnicos curado cocidos. Asimismo el desarrollo y la identificación, cuantificación de los patógenos alimentarios a estudio (*Listeria monocytogenes* y *Salmonella* spp) mediante técnicas de biología molecular, PCR convencional, PCR cuantitativa y NASBA, además de suponer un importante logro científico, ha significado una enorme ventaja en los ensayos tipo "challenge test" tanto por rapidez en la analítica realizada como para la evaluación simultánea de un número elevado de muestras por ensayo. Cabe destacar la importancia del NASBA en la detección selectiva de células viables.

1. Desarrollo de un modelo cárnico con las características físico-químicas de productos cocidos para el estudio del efecto de la alta presión en patógenos inoculados artificialmente.

Durante el primer año se elaboró un modelo cárnico picado con una composición similar al jamón cocido extra que fuera lo suficientemente homogéneo para: facilitar la distribución de los antimicrobianos naturales lactato, enterocinas, sakacina, pediocina (ALTA^{tm}) y nisina (Nisaplin^{tm}) y para poder valorar el efecto a alta presión hidrostática sobre los patógenos a estudio (*Listeria monocytogenes* y *Salmonella*) en un modelo único y constante a lo largo del proyecto y en las diferentes condiciones evaluadas.

2. Efecto de las altas presiones sobre la actividad metabólica y el efecto subletal de células

El efecto de las altas presiones en la viabilidad celular, permeabilidad y morfología de la membrana en *L. monocytogenes* y *Salmonella* spp. se valoró mediante la incorporación de sales de tetrazolio (Cell Titer, Promega), bromuro de etidio y microscopía electrónica de barrido.

La reducción de la actividad metabólica, así como la reducción del crecimiento celular (DO) fue superior en presencia de sakacina que de enterocina. Sin embargo, las alteraciones en la permeabilidad de la membrana fueron superiores en presencia de enterocina que sakacina.

En las micrografías no se observaron células lisadas después del tratamiento de alta presión. Sólo pudieron observarse pequeñas rugosidades en la membrana después del tratamiento. Se observaron células lisadas por la zona de división celular al final del período de conservación en refrigeración.

3. Estudio de la viabilidad de *L. monocytogenes* y *Salmonella* en productos cocidos mediante sistemas de conservación combinados: altas presiones hidrostáticas, sales de ácidos orgánicos y otros bioconservantes alimentarios

En un primer ensayo se aplicó el modelo de jamón cocido al cual se añadió en su formulación 800 AU/g de enterocina A o nisina o 1,8% de lactato potásico. El jamón fue loncheado y las lonchas fueron inoculadas artificialmente con distintas cantidades de *Salmonella* y *L. monocytogenes*. Se analizó la acción de los distintos antimicrobianos y se evaluó el efecto de un tratamiento de alta presión (400 MPa, 10 min, 17 ºC). Se observó un efecto sinérgico entre el lactato, la alta presión hidrostática y una menor temperatura de conservación.

En un segundo ensayo y debido a la efectividad moderada de las concentraciones de bacteriocinas aplicadas en el primer ensayo, se realizó un segundo experimento utilizando el mismo modelo de jamón cocido pero añadiendo más cantidad de bacteriocina (4800 AU/g de enterocina A, sakacina o pediocina) y una combinación de lactato-diacetato (2,5% de Optiform). Los resultados obtenidos no fueron significativamente superiores a los obtenidos en el primer experimento y, no se consiguió una mayor reducción de los recuentos de *Salmonella* y *L. monocytogenes*, posiblemente debido a la adsorción de las bacteriocinas a las proteínas y la consecuente reducción de su actividad.

En un tercer experimento se combinaron los antimicrobianos naturales aplicados en films activos con la alta presión hidrostática. Se aplicaron diferentes bacteriocinas (enterocina y sakacina) a dos concentraciones diferentes (200 AU/cm^2 y 2000 AU/cm^2), además de nisina (200 AU/cm^2) y lactato. Se observó una notable reducción en los recuentos de *L. monocytogenes* en presencia de bacteriocinas a altas concentraciones

cuando éstas fueron aplicadas junto a un tratamiento de alta presión hidrostática. Se considera solicitar una patente sobre la aplicación de bacteriocinas en estos films activados y se está preparando un artículo al respecto.

4. Desarrollo de sistemas de aplicación de bioconservantes. Comparación entre inclusión en la masa cárnica, tripa celulósica (en frankfurt o fiambre de cerdo) y/o plástico de envasado. Valoración de su efectividad frente a *Listeria* y *Salmonella* inoculados artificialmente en productos cocidos presurizados.

Se ha evaluado la efectividad de 3 modos de aplicación de bacteriocinas en frankfurts: aplicación en la tripa de celulosa, en la masa cárnica y en spray y la aplicación de dos modos de aplicación (masa y films activos) en jamón cocido.

La aplicación de las bacteriocinas en la masa cárnica de los frankfurts (3500 AU/g de enterocina A y 800 AU/g de sakacina, nisina (Nisaplin) y pediocina (ALTA) permitió reducir de forma significativa los recuentos de *L. monocytogenes* inoculadas artificialmente después del pelado, durante 60 días de almacenamiento a 3.5 ºC. Los mejores resultados se obtuvieron con el lote que contenía una mezcla de enterocina A y sakacina (reducción de 7,61 Log en comparación con el control). La nisina mostró una actividad intermedia y no se observaron diferencias significativas entre los lotes que contenían sakacina o enterocina A únicamente o en combinación con pediocina.

Para evaluar la efectividad de la aplicación de bacteriocinas en forma de spray durante el post-procesado, éstas fueron aplicadas (1750 AU/g de enterocia, 800 AU/g de sakacina y 400 AU/g de nisina y pediocina) en la superficie de frankfurts pelados, produciéndose inmediatamente una reducción significativa de los recuentos de *L. monocytogenes*. Este rápido descenso podría ser debido al contacto físico entre las bacterias y la bacteriocina. Los bajos recuentos (≤ 3 NMP/g) se mantuvieron en todos los lotes hasta el día 14 de almacenamiento a 3,5 ºC. La eficiencia de la aplicación de enterocina A junto a sakacina fue similar a la obtenida con la aplicación de estas bacteriocinas en la masa cárnica. A los 60 días de almacenamiento, los recuentos realizados por triplicado mostraron unas desviaciones estándar superiores a las observadas en los recuentos en tiempos inferiores sugiriendo la necesidad de una mejora en el modo de aplicación.

La aplicación de bacteriocinas (enterocina A, sakacina, nisina y pediocina; a 10-73,5 AU/g) como aditivos en la tripa celulósica retardó el crecimiento de *L. monocytogenes* inoculada artificialmente a 1,7 Log ufc/g durante 14 días de almacenamiento a 3,5 ºC. A los 60 días, las diferencias de crecimiento del patógeno entre los lotes que contenían bacteriocina y los controles no fueron significativamente distintas. La falta de efectividad a largo plazo se debe, posiblemente, a la adición de una cantidad de bacteriocina insuficiente. Sin embargo, fueron los niveles máximos que las condiciones de fabricación de la tripa de celulosa nos permitieron añadir. Además, las altas temperaturas alcanzadas durante el proceso de fabricación de la misma podrían disminuir su actividad.

Todas las bacteriocinas estudiadas, exceptuando la nisina, mostraron un mayor efecto cuando fueron aplicadas en la masa cárnica de los frankfurts que aplicadas en spray en la superficie o en la tripa, con unas reducciones de 4,4-7,6 Log en los recuentos de *L. monocytogenes* dependiendo de la bacteriocina. El menor efecto antilisteria mostrado por la nisina cuando fue aplicada como un aditivo en la masa cárnica en comparación a la aplicación en spray podría ser debido a una mayor adsorción de ésta en las proteínas de la carne, fenómeno que se vería incrementado por la cocción y disminuiría su difusión.

En cuanto a la aplicación de las bacteriocinas al jamón cocido (descrita en el apartado 3), el efecto antilisteria de las bacteriocinas sakacina y enterocina en combinación con la alta presión hidrostática fue superior durante la aplicación en films activos que durante la aplicación de las mismas a la masa del jamón cocido, posiblemente debido a la adhesión asociada al tratamiento térmico. El efecto antilisteria del lactato fue superior cuando fue aplicado en masa que en films activados.

5 Investigación de los sistemas de defensa bacterianos de protección frente al estrés por alta presión en *L. monocytogenes*.

Los sistemas de protección frente al estrés por alta presión que posee *L. monocytogenes* se analizaron mediante electroforesis bidimensionales, comparándose el patrón proteico de células de *L. monocytogenes* sometidas a un tratamiento de alta presión hidrostática (400 MPa, 10 min, 17 ºC) con el respectivo control. A través del software ImageMaster (PharmaciaBiotech) se determinaron las especies proteicas con expresión

diferencial, las cuales fueron recortadas del gel de electroforesis, digeridas con tripsina y se determinó el peso molecular de los péptidos resultantes por MALDI-TOF, lo que permitió posteriormente su identificación por Huella Peptídica (*Peptide Mass Fingerprinting*).

Las proteínas inducidas por el tratamiento de alta presión en *L. monocytogenes* incluyeron tanto proteínas de estrés como proteínas del metabolismo general. Las proteínas de estrés identificadas en este estudio (la chaperonina GroES, la *Cold shock protein* Flp y una *Glutatione reductase*) son proteínas de estrés generales. También se ha observado inducción de varias proteínas ribosomales, peptidasas y enzimas relacionadas con la síntesis de tRNA y rutas específicas como la succinato semialdehido deshidrogenasa y la piruvato-formato liasa. Así como las proteínas de estrés tendrían un papel protector frente a tratamiento de alta presión, los enzimas podrían participar en un reajuste de la célula a nivel fisiológico. Este estudio se ha realizado en colaboración con el grupo de *Flore Lactique et Environnement Carné* del INRA del INRA (Jouy en Josas, Francia) y se está preparando una publicación.

6. Desarrollo de sistemas de PCR a tiempo real sobre DNA con tecnología Taqman para detectar, identificar y cuantificar patógenos

Se han desarrollado dos sistemas de PCR cuantitativa a tiempo real para *Salmonella* spp and *L. monocytogenes*, respectivamente. En el sistema RTi-PCR para *Salmonella* spp la diana seleccionada fue el gen *invA* que demostró una inclusividad y una especificidad del 100% después de comprobarlo con 50 cepas diferentes de *Salmonella* spp. y 30 cepas no pertenecientes al género.

También se ha desarrollado un sistema en multiplex de PCR a tiempo real (RTi-PCR) para la detección y cuantificación de *L. monocytogenes* y *Listeria* spp. utilizando el gen *hly* a partir de DNA y cultivos celulares. Los ensayos fueron 100% específicos después de comprobarlos con 100 cepas de *L. monocytogenes* y 45 cepas no pertenecientes a la especie. El ensayo tiene un rango dinámico de 5 logaritmos con un límite de detección de unas 15 moléculas.

7. Adaptación de los sistemas de PCR a tiempo real para la detección, identificación y cuantificación de patógenos en alimentos.

Para evaluar el método desarrollado para *L. monocytogenes*, se inoculó jamón cocido en cantidades decrecientes de *L. monocytogenes* (desde 1×10^6 hasta 10 ufc/g). Todas las muestras se cuantificaron en paralelo mediante el método de referencia (ISO 11290-2:1998) y el método basado en RTi-PCR. Para la optimización del método de RTi-PCR se compararon 3 procedimientos de filtración diferentes: sin filtración, filtro 22-25 μm o filtro de 11 μm de diámetro de poro, todos ellos seguidos o no de una purificación con la resina Chelex® 100.

La inclusión de un paso de purificación con Chelex® 100 incrementó considerablemente la sensibilidad del método, obteniéndose una detección consistente hasta 10^3 ufc/g de *L. monocytogenes* (Límite de cuantificación, LDC) y una detección en al menos 50% de los replicados que contenían 10^2 ufc/g (Límite de detección, LDD). Dicha sensibilidad fue independiente de los filtros usados. El análisis de las curvas de regresión muestra unos coeficientes de correlación (R^2) superiores a 0.96, mostrando la linealidad del sistema desde 10^3 a 10^6 ufc/g. Asimismo, tanto R^2 como la eficiencia de la reacción fueron similares a los valores obtenidos en la cuantificación de ADN genómico o cultivos puros. La exactitud relativa o grado de similitud entre el método alternativo (RTi-PCR) y el método de referencia aceptado (ISO) fue próxima al 100% siempre que se incluyó el Chelex® en el tratamiento pre-PCR. El método desarrollado se aplicó a otros productos cárnicos de características diferentes: carne de cerdo (4% grasa), salchichas Frankfurt (19.8% grasa) y embutidos fermentados –fuet- (38,2% grasa). Incluyendo una filtración con el filtro de 11 μm de diámetro de poro y la purificación con Chelex®, la sensibilidad y la capacidad de cuantificación que se obtuvieron fueron similares a las obtenidas para el jamón cocido. Así, este método puede ser usado para analizar un amplio espectro de productos cárnicos que difieren en procesado, % de grasa y microbiota acompañante. Su rapidez y fácil manipulación lo hace adecuado para el uso rutinario en los laboratorios de microbiología de los alimentos.

Posteriormente, se ha aplicado el sistema de RTi-PCR para la detección cuantitativa de *L. monocytogenes* en carne para el análisis de salmón ahumado y fresco. Se han evaluado distintos tratamientos del salmón ahumado inoculado artificialmente antes de la realización de la reacción de PCR. Una parte de las muestras fueron purificadas con Chelex® 100 mientras que en la otra mitad se usó un kit comercial (*Wizard genomic DNA purification*, Promega). Todas ellas fueron también tratadas o no con tripsina/Triton x100 y filtradas o no con un filtro de 22-25 μm de diámetro. Los mejores resultados, muy similares a los obtenidos para los

productos cárnicos (LDC de 10^3 ufc/g y LDD de 10^2 ufc/g) se obtuvieron utilizando el kit comercial y sin el tratamiento de tripsina/Triton x100. La inclusión de un paso de filtrado no mostró diferencias significativas. Finalmente, se aplicó este método a muestras de salmón fresco inoculado artificialmente. Sin embargo, los resultados mostraron una sensibilidad unos 2 ordenes de magnitud inferior y unos coeficientes de correlación bajos que no permitieron la cuantificación. El uso en la RTi-PCR de un control interno de amplificación mostró que el bajo rendimiento de la reacción de PCR no era debido a la presencia de inhibidores de la reacción. Posiblemente, el bajo rendimiento se deba a una pérdida de células de *L. monocytogenes* durante el tratamiento pre-PCR.

8. Utilización de transcripción reversa RT-PCR (a tiempo real) o DNAsaI para la detección e identificación de patógenos viables en matrices cárnicas

Se valoraron las técnicas de la DNAasa para RT-PCR y el NASBA. La técnica de la DNAasa resultó ser poco precisa ya que no eliminaba totalmente el ADN presente en la muestra e interfería en la detección del número de células viables mediante la cuantificación del ARN. Se considera el NASBA como la mejor opción para la detección de ARN incluso en presencia de ADN. La técnica tiene un amplio rango dinámico y permite detectar hasta 100 moléculas diana y/o 400 células de *L. monocytogenes* en fase exponencial. Después de un período de preenriquecimiento permite detectar células viables de *L.monocytogenes* tanto en productos cárnicos como en salmón.

9. Evaluación del nivel de higienización alcanzado con diversos tratamientos. Comparación de diferentes técnicas de cuantificación de microorganismos.

La viabilidad de los microorganismos patógenos en todos los ensayos realizados se ha llevado a cabo mediante técnicas de microbiología clásica y técnicas de biología molecular mediante PCR convencional en base a los resultados obtenidos en el proyecto europeo de técnicas de validación para detección de patógenos alimentarios; asimismo se han desarrollo protocolos de PCR para detección y/o confimación (placa, colonia única, cultivo mixto y productos cocidos inoculados artificialmente) en multiplex de *L. monocytogenes* y *Salmonella* spp. También se ha desarrollado un método para la enumeración de bajos niveles de *L. monocytogenes* que combina la técnica del Número Más Probable (NMP) con la PCR.

Los sistemas de PCR cuantitativa y NASBA desarrollados se han aplicado con éxito tanto en productos cárnicos como en salmón (apartados 7 y 8)

1. **Si ha encontrado problemas en el desarrollo del proyecto, coméntelos, especificando su naturaleza (de carácter científico, de gestión, etc.), y, en su caso, describa las desviaciones causadas por ellos con respecto a las previsiones de la propuesta original, o que puedan causar a la finalización del proyecto.**

2. **Actividades previstas hasta la finalización del proyecto.**

B. RESULTADOS MÁS RELEVANTES ALCANZADOS EN EL PROYECTO

Los resultados más relevantes abarcan tanto el campo teórico como el teórico-práctico e incluyen la utilización de métodos alternativos de conservación tales como la alta presión hidrostática; así como el efecto añadido de los bioconservantes naturales aplicados en masa o envasado activo en la seguridad alimentaria de los productos cárnicos curado cocidos. Así como el desarrollo y la identificación, cuantificación de los patógenos alimentarios a estudio (*Listeria monocytogenes* y *Salmonella* spp) mediante técnicas de biología molecular, PCR convencional y cuantitativa altamente específicas, rápidas y que permiten una evaluación simultánea de un número elevado de muestras por ensayo.

C. RESUMEN DE LOS RESULTADOS DEL PROYECTO

C1. Formación del personal Nº

Personal formado (11)

Personal formado o en formación que se ha transferido al sector industrial:

Doctores ( ) Titulados Superiores (1) Técnicos ( )

C2. Tesis doctorales	(4)			
C3. Artículos científicos en revistas	( )	nacionales	(9)	internacionales
C4. Artículos de divulgación en revistas	(2)	nacionales	( )	internacionales
C5. Artículos de revisión en revistas	( )	nacionales	( )	internacionales
C6. Libros, capítulos de libros y monografías	(1)	nacionales	(2)	internacionales
C7. Conferencias en congresos (por invitación)	(4)	nacionales	(3)	internacionales
C8. Patentes y otros títulos de propiedad	( )	registrados	( )	en explotación industrial
	( )	España	( )	extranjero

C1. FORMACIÓN DE PERSONAL EN RELACIÓN AL PROYECTO, describir brevemente.

Formación de personal contratado en base al proyecto: La Dra Anna Jofré (Doctor en Ciencias Biológicas) se ha formado en las técnicas de detección de patógenos por técnicas de PCR convencional, adaptación de técnicas de PCR cuantitativa a tiempo real en productos cárnicos; así como en la acción antilisteria de la alta presión hidrostática y los antimicrobianos naturales. Anna Claret (Ingeniero Técnico Agrícola) ha colaborado con el grupo durante 7 semanas, sustituyendo a la Dra. Jofré en la técnicas moleculares. Anna Nadal ha desarrollado y se ha formado en sistemas de NASBA para detección de células viables y en sistemas de captura de RNA por triples hélices. David Tibau (Licenciado en Ciencias Biológicas. Contratado mediante el Programa Personal Técnico de Apoyo) ha colaborado y se ha formado en las técnicas de detección de biología molecular mediante PCR convencional, ensayos y evaluación de tratamientos combinados de alta presión y bioconservantes naturales.

Además en el proyecto se han formado total o parcialmente 4 doctorandos en técnicas moleculares de detección por PCR y métodos de conservación alternativos como la alta presión hidrostática y los antimicrobianos naturales. (Vease apartado C2), formando el trabajo realizado parte de su tesis doctoral. Se ha presentado un proyecto final de carrera sobre captura de RNA mediante triples hélices asociado a la Diplomatura de Ingeniero Técnico Agrícola de la UdG (Anna Coll) y este año (junio 2006 y diciembre 2006) se presentaran dos trabajos final de carrera más (Raquel Rubio, Eva Alvarez) en base a la aplicación de combinada de antimicrobianos naturales y alta presión hidrostática.

C2. TESIS DOCTORALES REALIZADAS TOTAL O PARCIALMENTE EN EL PROYECTO
Indicar: Título, nombre del doctorado, Universidad, Facultad o Escuela, fecha de comienzo, fecha de lectura, calificación y director.

Desarrollo de técnicas moleculares para la detección, identificación y cuantificación de microorganismos patógenos. David Rodríguez Lázaro. Mayo 2004.

Estudio de las comunidades microbianas de embutidos fermentados ligeramente acidificados mediante técnicas moleculares. Estandarización, seguridad y mejora tecnológica. Belén Martín. Mayo 2005.

Desarrollo de nuevas técnicas analíticas de OMG y microorganismos viables. Comunidades microbioanas en OMG y no-MG. Anna Coll. Universidad de Girona. Lectura prevista 2008.

Combinación de métodos de conservación para la obtención de productos higiénicamente seguros. Begoña Marcos. Universidad de Girona. Lectura prevista. Junio 2007.

C3. ARTÍCULOS CIENTÍFICOS EN REVISTAS
Indicar: Autor(es), título, referencia de la publicación, **(adjuntar separatas)**

Rodríguez-Lázaro D., Hernández M., Esteve T., Hoorfar J y Pla. M. 2003. A rapid and direct real time PCR based method for identification of *Salmonella.* J. Microbiological Methods. 381-390

Rodríguez-Lázaro D., Hernández M., Scortti M., Esteve T., Vázquez-Boland, Pla M. 2004. Quantitative detection of *Listeria monocytogenes* and *Listeria innocua* by real-time PCR: Assessment of hly, iap and lin02483 targets and amplifluor technology. Appl. Environ. Microbiol. 70 (3):1366-1377.

Rodríguez-Lázaro D., Jofré A., Aymerich T., Hugas M. y Pla M. 2004. Rapid quantitative detection of *Listeria monocytogenes* in meat products by real time PCR. Applied and Environmental Microbiology 70 (10): 6299-6301

Martin B., Jofré A.,Garriga M, Hugas M, Aymerich T. Quantification of Listeria monocytogenes in fermented sausages by MPN-PCR method. Letters in Applied Microbiology (2004) 39(3):290.

Jofré, A.,Martín, B., Garriga, M., Hugas, M., Plà, M., Rodríguez-Lázaro, D., Aymerich, T.* 2005. Simultaneous detection of *Listeria monocytogenes* and *Salmonella* by multiplex. Food Microbiology 22:109- 115.

Rodríguez-Lázaro D., Jofré A., Aymerich T., Garriga M. y Pla M. 2005. Rapid quantitative detection of *Listeria monocytogenes* in salmon products: evaluation of pre-real-time PCR strategies.'J. Food Protection 68(7): 1467-1471.

Aymerich T., Jofré A., Garriga M. Y Hugas M. 2005. Inhibition of *Listeria monocytogenes* and *Salmonella* by natural antimicrobials and high hydrostatic pressure in sliced cooked ham. Journal of Food Protection 68 (2): 173-177.

Rodríguez-Lázaro D., Pla M., Scortti M., Monzó H.J. y Vázquez-Boland. 2005.A novel real-time PCR for *Listeria monocytogenes* that monitors analytical performance via an internal amplification control. Applied and Environmental Microbiology 71: 9008-9012.

Nadal A., Coll A., Aviñó A., Esteve T, Eritja R. Y Pla M. 2006. Efficient sequence-specific purification of *Listeria innocua* mRNA species by triples affinity capture with parallel tail-clamps. ChemBiochem en prensa.

Nadal A., Coll A., Cook N. and Pla M. 2006. A molecular beacon-based real time NASBA assay for detection of *Listeria monocytogenes*. Role of target mRNA secondary structure on NASBA design". Applied and Environmental Microbiology Enviado.

Jofré A., Garriga M., Zagorec M., Champomier M. y Aymerich T. 2006. Proteomic analysis of the response of *Lactobacillus sakei* and *Listeria monocytogenes* to a high hydrostatic pressure treatment. Enviado

C4. ARTÍCULOS DE DIVULGACIÓN EN REVISTAS
Indicar: Autor(es), título, referencia de la publicación.

Aymerich T., Jofré A., Hugas M, Garriga M. 2003. Inhibición de *Listeria monocytogenes* y *Salmonella* en jamón cocido elaborado con antimicrobianos naturales y sometidos a alta presión hidrostática. Eurocarne 120: 75-79.

Rodríguez-Lázaro D., Jofré A., Aymerich T., Hugas M. y Pla M. 2004. Enumeración rápida de *L.monocytogenes* en productos cárnicos mediante PCR a tiempo real Alimentaria 357: 44- 47.

C5. ARTÍCULOS DE REVISIÓN
Indicar: Autor(es), título, referencia de la publicación, **(adjuntar separatas)**

C6. LIBROS, CAPÍTULOS DE LIBROS Y MONOGRAFÍAS
Indicar: Autor(es), título, referencia de la publicación, **(adjuntar un ejemplar)**

Aymerich T., Garriga M. Hugas M. 2003. Aplicación de bioconservantes (bacteriocinas y lactato) y altas presiones como nueva tecnología de conservación en los productos cárnicos cocidos. Bacteriocinas de bacterias lácticas en la mejora de la calidad de los alimentos. Pag 173-179. Editorial (si libro): INIA. Madrid

Aymerich T, Garriga M., Jofré A., Martín B., Monfort J.M. 2006. The use of bacteriocins against meat borne pathogens. Advanced Technologies for Meat Processing. Marcel Dekker, Inc. New Cork. En prensa.

Pla M., Rodríguez D., Badosa E. y Montesinos E. 2005 " Measuring microbiological contamination in fresh fruits and vegetables". En "Improving the Safety of Fresh Fruit and Vegetables". Ed. Woodhead Publishing Limited. Win Jongen and Francis Dodds, Wageningen, The Netherlands

C7. CONFERENCIAS EN CONGRESOS, SIMPOSIOS Y REUNIONES (POR INVITACIÓN)
Indicar: Autor(es), nombre del congreso, lugar de celebración, año.

Aymerich T., Jofré A., Hugas M., Garriga M. Aplicación de bioconservantes (bacteriocinas y lactato) y altas presiones hidrostáticas como nueva tecnología de conservación en productos cárnicos cocidos. Segunda reunión RED ANPENET. INIA. Madrid. 23-24 de octubre 2003.

Aymerich T., Martín B., Jofré A., Garriga M., Hugas M. La PCR ¿Complemento o alternativa a las técnicas de microbiología clásica? XIV Congreso de Microbiología de los Alimentos. Girona 19-22 septiembre 2004.

Aymerich, T., Jofré, A., Garriga, M., Hugas, M. Application of high hydrostatic pressure and biopreservatives as a new preservation alternative in cooked meat products. The SAFE consortium seminars. Bruselas 22-23 enero 2004.

Aymerich T., Martín B., Jofré A., Garriga M, Hugas M. La PCR como técnica rápida para la detección de bacterias patógenas en los Alimentos. I semana de la Seguridad Alimentaria. BTA. Barcelona. 24 febrero 2005.

Aymerich T. Detection of food-borne pathogens by PCR rapid methods. The Veterinary Public Health Association Autumn meeting. Global disease surveillance and foo higiene news. Barcelona. 19 noviembre 2005

Aymerich T. y Garriga M. Antimicrobials and HHP to improve the microbial safety of meta products. Meeting of the COST working group project D30/007/04. High Pressure Tuning of Biochemical Processes: Macromolecular interaction and cellular physiology. Reading. Reino Unido. 13-15 octubre 2005.

Martín B., Jofré A., Garriga M y Aymerich T. Aplicación y validación de métodos de PCR para la detección de patógenos de interés, *Salmonella* y *Listeria monocytogenes*, en productos cárnicos. Jornadas RETSA. Desarrollo y Utilización de Técnicas Rápidas de Análisis para el Control de la Seguridad Alimentaria. Pamplona. 15 de Febrero 2006.

C8. PATENTES Y OTROS TÍTULOS DE PROPIEDAD INDUSTRIAL
Indicar: Autor(es), título, registro, entidad titular de la patente, año, países, clase.

Se pretende presentar una patente sobre la efectividad antilisteria de los films activados con antimicrobianos naturales.

D. CARACTER DE LOS RESULTADOS DEL PROYECTO (señalar hasta dos opciones)

( ) Teóricos (X) Teórico-prácticos

(X) Prácticos ( ) De inmediata aplicación industrial

E1. SI EL PROYECTO HA DADO LUGAR A COLABORACIONES CON OTROS GRUPOS DE INVESTIGACIÓN, coméntelas brevemente.
En caso contrario, indicar qué dificultades ha encontrado.

- Colaboración con el grupo de "Flore Lactique et Environnement Carné" del INRA de Jouy en Josas (Francia) en el estudio proteómico de la respuesta de *Listeria monocytogenes* a la alta presión hidrostática. Participación IRTA.

- COST Action D30. "High Pressure Tuning of Biochemical Processes". Relación científica con otros grupos europeos de renombre en el campo de la aplicación de las altas presiones hidrostáticas a los alimentos y el estrés generado a los microorganismos. Rudi Vogel de la Universidad Técnica de Munich (Alemania), B. Mackey de la Universidad de Reading (UK), Chris Michiels de la Universidad Católica de Leuven (Bélgica), M Patterson de la Escuela de Agricultura y Ciencia de los Alimentos (Irlanda). Participación IRTA.

E2. SI HA PARTICIPADO EN PROYECTOS DEL PROGRAMA MARCO DE I+D DE LA UE Y/O EN OTROS PROGRAMAS INTERNACIONALES EN TEMÁTICAS RELACIONADAS CON LAS DE ESTE PROYECTO, indique programa, tipo de participación y beneficios para el proyecto.
Mencione las solicitudes presentadas al Programa Marco de la UE durante la ejecución del proyecto, aunque no hayan sido aprobadas.

-Validation and standardization of diagnostic Polymerase Chain Reaction for detection of food borne pathogens (FOOD-PCR QLRT-1999-00226 2000-2002) del V Programa Marco como assistant contractor (grupo IRTA). La participación en este proyecto ha permitido participar en los ensayos de validación y estandarización de los protocolos de PCR para la detección de varios patógenos, especialmente *Salmonella* y *L. monocytogenes* tanto a partir de DNA purificado como muestras contaminadas natural o artificialmente.

-Assessment and improvement of safety of tradicional dry sausages from producers to consumers. TRADISAUSAGE. El grupo IRTA ha participado en cada una de las áreas del proyecto de forma activa. El proyecto ha permitido evaluar el alcance de las técnicas moleculares desarrolladas en diferentes matrices cárnicas. 2002-2005.

- Network for Prevention and Control of Zoonoses (European Union. VI Framework Programme. Network of Excellence) 2004-07 donde el grupo Udg consta como Institución asociada.

F. PROYECTOS COORDINADOS [1]

1. Describa el desarrollo de la coordinación entre subproyectos, y los resultados de dicha coordinación en relación a los objetivos globales del proyecto.

G. RELACIONES O COLABORACIONES CON DIVERSOS SECTORES

G1. SI EN EL PROYECTO HA HABIDO COLABORACIÓN CON ENTES PROMOTORES OBSERVADORES (EPO) PARTICIPANTES:

1. Describa en detalle la relación mantenida con los EPO's, y la participación concreta de éstos en el proyecto, especificando, si procede, su aportación al mismo en todos sus aspectos. (Si se ha modificado la relación y/o el apoyo del EPO, en relación con lo previsto a la aprobación del proyecto, descríbalo brevemente).

Se ha colaborando con la empresa ESTEBAN ESPUÑA S.A. Esta empresa dispone de una unidad de presurización industrial Alstom (Nantes, Francia) donde se ha realizado la presurización de las muestras.

2. Describa, si procede, las transferencias realizadas al (los) EPO (s) de los resultados obtenidos, indicando el carácter de la transferencia y el alcance de su aplicación.

Se ha transferido a Esteban Espuña S.A. los artículos relativos a la aplicación de la alta presión hidrostática.

3. Indique si esta colaboración ha dado lugar a la presentación de nuevos proyectos o si se tiene intención de continuarla en el futuro. En caso afirmativo, describa brevemente cómo va a concretarse.

G2. SI EL PROYECTO HA DADO LUGAR A OTRAS COLABORACIONES CON EL ENTORNO SOCIOECONÓMICO (INDUSTRIAL, ADMINISTRATIVO, DE SERVICIOS, ETC.), NO PREVISTAS INICIALMENTE EN EL PROYECTO, descríbalas brevemente.

[1] A rellenar sólo por el coordinador del proyecto.

H. RESUMEN DE GASTO DEL PROYECTO

Euros

1. Gastos de personal (indicar datos personales, situación laboral y función desempeñada,)

Total €

2. Material inventariable (describir brevemente el material adquirido)

Total €

3. Material fungible (describir brevemente el tipo de material)

Total €

4. Viajes y dietas (describir brevemente)

Total €

5. Otros gastos (describir brevemente)

Total €

6. Costes indirectos

Total €

TOTAL GASTOS EJECUTADOS DEL PROYECTO €

CON ESTE INFORME DEBERÁ ADJUNTARSE:

Organismos sujetos al control del Tribunal de Cuentas y de la Intervención General de la Administración del Estado:

- **Certificado de la Gerencia o Servicio de Contabilidad** de la entidad participante (nombre, cargo, fecha, firma y sello) en el que se especifiquen los gastos efectuados, desglosados en: personal, costes de ejecución y costes indirectos.
- **Fotocopia de reingreso al Tesoro Público,** si procede, de los fondos no utilizados.

Entidades restantes:

- **Certificado de la Gerencia o Servicio de Contabilidad** de la entidad participante (nombre, cargo, fecha, firma y sello) en el que se especifiquen los gastos efectuados, desglosados en: personal, costes de ejecución y, si procede, costes indirectos. Asimismo, se presentarán los justificantes originales de los gastos realizados.
- **Documento original que acredite el reintegro al Tesoro Público,** si procede, de los fondos no utilizados.