

VERIFICACIÓN DE LA CAPACIDAD DEL SISTEMA 3M PARA LA DETECCIÓN
MOLECULAR DE *Listeria monocytogenes* y *Salmonella* Typhimurium.

DEISSY GOSVINTA HERNÁNDEZ CLAVIJO
Estudiante de Décimo Semestre
Programa de Microbiología

DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA
FACULTAD DE CIENCIAS BÁSICAS
UNIVERSIDAD DE PAMPLONA
PAMPLONA
2016

VERIFICACIÓN DE LA CAPACIDAD DEL SISTEMA 3M PARA LA DETECCIÓN
MOLECULAR DE *Listeria monocytogenes* y *Salmonella* Typhimurium.

DEISSY GOSVINTA HERNÁNDEZ CLAVIJO
Estudiante de Décimo Semestre
Programa de Microbiología

TRABAJO DE GRADO
Presentado como requisito parcial para optar al título de
MICROBIOLOGA

Jefe Inmediata Tutora Empresarial
Diyanitza Pérez Contreras, Microbióloga

DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA
FACULTAD DE CIENCIAS BÁSICAS
UNIVERSIDAD DE PAMPLONA
PAMPLONA
2016

Nota de aceptación

Firma Del Jurado

Firma Del Jurado

Pamplona, 05 de Diciembre de 2016

AGRADECIMIENTOS

En la vida existen momentos gratificantes, este es uno de ellos, agradezco especialmente a Dios por ser mi motor, y a mis padres Oscar David Hernández y María Gosvinta Clavijo, que siempre me apoyaron, gracias su confianza y por inculcarme valores que hoy en día me han ayudado a superar obstáculos y culminar mi carrera profesional.

A mis hermanas Yakeline, Carol y Gloricet por su comprensión, paciencia, amor ayuda en todo momento. A Oscar García, quien me brindó todo su amor, comprensión y apoyo constante ¡Gracias!

A los docentes de Microbiología de la Universidad de Pamplona, que con paciencia y dedicación se ganaron toda mi admiración y respeto.

TABLA DE CONTENIDO

INTRODUCCIÓN	10
1. OBJETIVOS.....	13
1.1. OBJETIVO GENERAL	13
1.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	13
.....	13
2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	14
3. JUSTIFICACIÓN.....	15
4. MARCO REFERENCIAL.....	17
4.1. BASES LEGALES.....	17
4.2. ANTECEDENTES.....	18
4.3. MARCO TEÓRICO	21
4.3.1. Enfermedades transmitidas por alimentos.	21
4.3.2. Técnicas de detección de patógenos.....	26
4.3.2.1. Técnicas basadas en la hibridación de ADN.....	27
5. METODOLOGIA	39
5.1. ÁREA DE ESTUDIO	39
5.2. MUESTREO.....	39
5.3. ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO.....	39
5.3.1. Aseguramiento de las condiciones previas de los ensayos.	39
5.3.2. Referencias de procedimientos e instructivos utilizados durante la verificación	40
5.4. DETERMINACIÓN DE CEPAS INOCULADAS.....	40
5.4.1. <i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 13932 por el sistema 3M.....	40
5.4.2. <i>Salmonella</i> Typhimurium ATCC 14028 por el sistema 3M.....	41
5.5. COMPROBACIÓN DEL MÉTODO 3M PARA LA IDENTIFICACIÓN CUALITATIVA MOLECULAR	41
5.6. OTRAS ACTIVIDADES COMPLEMENTARIAS.....	45
6. CRONOGRAMA DE ACTIVIDADES.....	46
7. RESULTADOS Y ANÁLISIS:.....	47
7.1. DETERMINACIÓN DE LAS CEPAS	47
8. CONCLUSIONES	60

9. RECOMENDACIONES	61
10. GLOSARIO	62
11. BIBLIOGRAFIA	64
ANEXOS	74

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Polimorfismo del ADN amplificado al azar	32
Figura 2. Secuencia caracterizada de una región amplificada	32
Figura 3. Representación esquemática del Primer LAMP cuando se hibridan a sitios específicos de un gen diana.	35
Figura 4. Protocolo de LAMP.	36
Figura 5. Kit 3M™ para la detección molecular de <i>Salmonella</i> Typhimurium ATCC 14028 y <i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 13932	40
Figura 6. Diagrama general de la metodología empleada para la detección molecular de <i>Salmonella</i> Typhimurium ATCC 14028 y <i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 13932 por el sistema 3M	44
Figura 7. Gráfica general de los resultados arrojados por el Software de Detección Molecular 3M de <i>L. monocytogenes</i> ATCC 13932	51
Figura 8. Gráfica general de los resultados arrojados por el Software de Detección Molecular 3M sin inocular.	52
Figura 9. Gráfica general de los resultados arrojados por el Software de detección Molecular 3M.	55

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Microorganismos presentes en algunos alimentos responsables de brotes alimentarios	22
Tabla 2. Riesgos de contaminación y prevención.	24
Tabla 3. Cronograma de actividades.....	46
Tabla 4. Detección de <i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 13932 en alimentos cárnicos y quesos a $[10^2]$	47
Tabla 5. Matriz 2X2 con una concentración de 10^2	49
Tabla 6. Detección de <i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 13932 en alimentos cárnicos y lácteos a $[10^1]$	50
Tabla 7. Matriz 2X2 con una concentración de 10^1	51
Tabla 8. Detección de <i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 13932 y <i>Salmonella</i> Typhimurium ATCC 14028 en alimentos cárnicos y lácteos sin inocular.....	52
Tabla 9. Resultados Obtenidos a concentración 10^1 y 10^2	53
Tabla 10. Matriz 2x2 para cárnico concentración 10^2	56
Tabla 11. Matriz 2x2 para cárnico concentración 10^1	56
Tabla 12. Matriz 2x2 para alimento lácteos concentración 10^1	57
Tabla 13. Matriz 2x2 para alimento lácteo concentración 10^2	57
Tabla 14. Sensibilidad del equipo 3M™	57

LISTA DE ANEXOS

Anexo 1. PCR anidada con un IAC para la detección de <i>Salmonella</i> spp.en alimentos	74
Anexo 2. Exactitud de la cuantificación de <i>L. monocytogenes</i> por RTi-PCR en tres matrices de alimentos diferentes	75
Anexo 3. Grafica de muestra positiva y negativa de las muestras reportadas por el Software de Detección Molecular 3M para <i>L. monocytogenes</i> ATCC 13932 en concentración 10^2	77
Anexo 4. Grafica individual de las muestras reportadas por el Software de Detección Molecular 3M para <i>L. monocytogenes</i> ATCC 13932 en concentración 10^1	77

INTRODUCCIÓN

La necesidad importante de prevenir ETA's que pueden incluso producir muertes en todo el mundo, ha llevado a la humanidad a buscar nuevos, rápidos y seguros para la detección de patógenos presentes en productos agroalimentarios. Uno de estos métodos es la amplificación isotérmica mediada por bucles para la amplificación de ácidos nucleicos, que ha sido una forma confiable de identificar microorganismos patógenos como *Listeria monocytogenes* y *Salmonella Typhimurium*.

La técnica de LAMP fue desarrollada en el 2000 por Notomi y *et al.*, como método de amplificación isotérmica de ácido nucleico, desde entonces se ha utilizado en diversas investigaciones en el diagnóstico clínico en animales, evidencia molecular de las infecciones con parásitos virus y bacterias; estudios de enfermedades infecciosas causadas por alimentos y la detección de varios patógenos (Sánchez *et al.*, 2014; Umar *et al.*, 2015). De acuerdo a la base de datos PubMed, más de 500 artículos científicos sobre LAMP han sido publicados desde su aparición (Umar *et al.*, 2015).

Múltiples investigaciones resaltan la importancia de este método, entre otras razones, porque permite una detección muy específica, rápida y sensible del ADN diana y lo diferencia del ADN de especies bacteriana cercanas o contaminación no específica (Mohamed y Xiaonan, 2016).

Actualmente, según informes presentados por el INS los agentes responsables de ETA's se deben a factores de riesgo como inadecuada conservación y almacenamiento, fallas en la cadena de frío y la contaminación cruzada (Instituto Nacional de Salud, 2015). Según la OMS y la OPS en el 2015, entre las medidas empleadas normalmente para evitar la contaminación con dichos patógenos se encuentran las BPM, HACCP y la correcta desinfección de verduras y frutas con agua potable, en algunos casos con compuestos químicos como el hipoclorito de sodio en concentraciones indicadas, evitar la contaminación cruzada, también no consumir alimentos vencidos, así como hábitos adecuados de higiene de los equipos y utensilios. Además es importante mantener los alimentos a temperaturas que eviten la replicación bacteriana, se considera que la ideal es $< 5^{\circ}\text{C}$ o $> 60^{\circ}\text{C}$. De igual manera se deben controlar el manejo de dichos desinfectantes pues la exposición a estos ha sido relacionada a impactos potenciales sobre la salud que van desde irritación hasta desequilibrio hormonal, impactos al sistema inmunológico, asma, reducción potencial de la fertilidad e incluso cáncer. El uso excesivo de desinfectantes también contribuye al problema de las bacterias resistentes a los antibióticos (Delgado y Díaz, 2006).

En cuanto a la determinación de la presencia de agentes patógenos en alimentos, LAMP brinda la posibilidad de detectarlos de manera rápida. Se ha reportado una sensibilidad del 80% al 86%, especificidad del 85,7% al 100% e incluso destacan que su especificidad es mayor que la PCR tradicional (Aristizábal y Rincón, 2016). Teniendo en cuenta que diferentes métodos de detección de patógenos han sido aplicados para la prevención de ETAS, actualmente pocos son los laboratorios de análisis de alimentos que cuentan con un método que cumpla con parámetros como sensibilidad, rapidez y de bajo costo.

A pesar de todas las características escritas, los estudios continúan para mejorar esta tecnología. En este sentido, el presente trabajo se realizó evaluando un sistema de detección molecular para de **Listeria monocytogenes** ATCC 13932 y **Salmonella** Typhimurium 14028 que utiliza la luminiscencia para indicar la presencia de ADN del organismo en estudio.

En este trabajo se llevó a cabo una amplificación isotérmica mediada por bucles, por el equipo de detección molecular 3M MDS a partir dos matrices (cárnicos cocidos y quesos), que fueron inoculadas con concentraciones de 10^1 y 10^2 de **Listeria monocytogenes** ATCC 13932 y **Salmonella** Typhimurium ATCC14028, que es una de las técnicas de amplificación de gran interés al ser una herramienta que detecta el ADN de varias especies bacterianas patógenas como **Listeria monocytogenes** y **Salmonella** spp. en muy bajos niveles comparados con otros métodos. LAMP amplifica muy pocas copias del DNA diana con alta especificidad, eficiencia y rapidez bajo condiciones isotérmicas, utilizando cebadores especialmente diseñados y una DNA *Bst* polimerasa que tiene actividad desplazante de cadena y proviene de **Geobacillus stearothermophilus** (Mohamed y Xiaonan, 2016; Pooja *et al.*, 2014). Esta tecnología se basa en la síntesis de ADN, amplificando hasta 10^9 copias de ADN de interés en una hora. Como resultado de este trabajo se obtuvieron muestras positivas para los microorganismos estudiados en ambas concentraciones, exceptuando dos muestras de **Listeria monocytogenes** ATCC 13932 a una concentración de 10^2 que arrojaron resultados negativos. Este equipo llevó a cabo la detección del gen *invA* de **Salmonella** Typhimurium ATCC 14028; dicho gen se relaciona con el proceso de invasión al epitelio intestinal y se encuentra codificado en el cromosoma bacteriano lo que le confiere mayor estabilidad, en una región conocida como isla de patogenicidad 1 de **Salmonella** (SPI1). Esta isla codifica, entre otros, proteínas del sistema de secreción tipo III. El gen *invA* ha sido ampliamente utilizado en estudios para la detección de **Salmonella** spp. en muestras de alimentos, debido principalmente a la estabilidad que presenta desde el punto de vista genético (Zhang *et al.*, 2003; Malorny *et al.*, 2003; DAUM *et al.*, 2002). Asimismo, la detección de **Listeria monocytogenes** se llevó a cabo mediante la amplificación del gen *iap* que permite diferenciar *L. monocytogenes* de *L. innocua*, *L. grayi*, *L. ivanocii*, *L. seeligeri* y *L. murrayi*. Este gen codifica para la formación de la proteína de superficie p60,

que actúa como una hidrolasa murina, involucrada en la división celular, favoreciendo la adaptación y supervivencia de la célula bacteriana (Hein *et al.*, 2001)

1. OBJETIVOS

1.1. OBJETIVO GENERAL

Verificar la detección de *Listeria monocytogenes* ATCC 13932 y *Salmonella* Typhimurium ATCC 14028, por el método cualitativo 3M en matrices alimentarias.

1.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar la presencia de *Listeria monocytogenes* ATCC 13932 en muestras alimenticias mediante LAMP y bioluminiscencia.
- Determinar la presencia de *Salmonella* Typhimurium ATCC 14028 en muestras alimenticias mediante LAMP y bioluminiscencia.
- Evaluar la sensibilidad aparente del equipo molecular 3M™ para detectar *Listeria monocytogenes* ATCC 13932 y *Salmonella* Typhimurium ATCC 14028

2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La contaminación de alimentos por ***Salmonella*** spp. y ***Listeria monocytogenes*** tiene gran importancia debido a las patologías que producen que en muchos casos ocasionan secuelas graves e incluso la muerte; afectando principalmente a personas de edad avanzada, mujeres embarazadas, recién nacidos y adultos que tienen el sistema inmunitario debilitado, no obstante también puede afectar a las personas sanas.

El problema es mucho más grave de lo que parece, pues el deficiente manejo de las buenas prácticas de higiene alimentaria, BPM y el HACPP, necesarias desde la producción hasta el consumo final, y características fisicoquímicas propias de algunos alimentos también favorecen la vida y reproducción de estos patógenos. Además, el uso constante de antimicrobianos en alimento para animales favorece la transmisión y proliferación de especies de ***Salmonella*** spp. resistentes a fármacos. Otro factor preocupante es la facilidad que tiene ***Listeria monocytogenes*** para multiplicarse y sobrevivir durante varios meses bajo temperaturas de refrigeración y de ***Salmonella*** spp. para proliferar en condiciones inadecuadas de almacenamiento; representando así un grave problema a la salud pública (Iranzo *et al.*,2012).

En este sentido el consumidor ha perdido la confianza en la cadena alimentaria, por lo que se hace necesario mejorar los sistemas de higiene y bioseguridad para garantizar un producto libre de patógenos al consumidor. Así mismo se requiere que el gobierno colombiano y las autoridades sanitarias implementen un sistema de control y concienticen a los manipuladores para que adopten acciones normativas que aseguren alimentos inocuos y seguros en todas las etapas enfocadas a disminuir estas enfermedades.

Los procedimientos de aislamiento e identificación de estos microorganismos resultan demorados, lo que afecta el ritmo de trabajo, ocupando tiempo que se podría emplear para procesar otras muestras. Teniendo en cuenta esto, se hace necesario un sistema molecular de detección de estos patógenos como 3M™ que tenga la capacidad de dar un diagnóstico rápido, preciso, específico y sensible, resultando útil para los análisis de alimentos procesados en los sectores de alimentos y salud; además de permitir que se liberen productos alimenticios de bodegas al mercado ahorrando costos y tiempo.

3. JUSTIFICACIÓN

Los alimentos son fundamentales para mantener la vida y garantizar el sustento, pero su calidad cada día es más preocupante a nivel mundial, pues tienen implicaciones económicas, sociales y en la salud; estos son una vía de transmisión de enfermedades en humanos (ETAS).

De acuerdo con informes del centro de prevención y control de enfermedades en el 2011 el número de infecciones y la incidencia de algunos agentes responsables de brotes de ETA's fue: **Salmonella** spp (7.813, 16,45 por 100.000), **Campylobacter** spp (6.785, 14,28 por 100.000), **Shigella** spp (1.541; 3,24 por 100.000), **E. coli** productor de toxina Shiga (STEC - por sus siglas en inglés) no O157 (521, 1,10 por 100.000); **E. coli** productor de toxina Shiga O157 (463, 0,97 por 100.000), **Yersinia** spp (163 y 0,34 por 100 000), **Vibrio** spp (156, 0,33 por 100.000), **Listeria** spp (145, 0,31 por 100.000) (Centers for Disease Control and Prevention, 2011), y pueden encontrarse por diversos motivos como malas prácticas agrícolas, deficiencias en el plan HACPP y fallas en procesos de higiene y desinfección a lo largo de la cadena alimentaria. Los factores de riesgos asociados a brotes son: inadecuada conservación (323 brotes), inadecuado almacenamiento (297 brotes), fallas en la cadena de frío (239 brotes) y la contaminación cruzada (136 brotes) (Instituto Nacional de Salud, 2015). Según reportes de la OMS, los alimentos insalubres que contienen bacterias, virus, parásitos o sustancias químicas nocivas causan más de 200 enfermedades que van desde la diarrea hasta el cáncer; cada año enferman ~600 millones de personas por ingerir alimentos contaminados y 420.000 mueren. Los niños menores de 5 años reciben un 40% de la carga atribuible a las ETAS, provocando 125.000 defunciones anuales en ellos (OMS, 2015).

La globalización y el crecimiento de industrias alimentarias han incrementado y por ende la posible transmisión de **Salmonella** spp. y **Listeria monocytogenes** (Suarez y Mantilla, 2000). **Salmonella** spp. es una de las causas más comunes de gastroenteritis por intoxicación de origen alimentario en humanos y la infección puede ser consecuencia de la cocción inadecuada del pollo que es su principal reservorio, de la contaminación con otros alimentos o al ser manipulados inapropiadamente (Durango *et al.*, 2004). Además Según la FAO **Listeria monocytogenes**, es un patógeno emergente presente en alimentos listos para el consumo como la leche, quesos, helados y productos cárnicos que produce listeriosis, que afecta a produce síntomas en una forma muy leve, pero en algunos casos es causante de abortos en fetos o meningoencefalitis incluso de muertes, presenta tasas de mortalidad altas (20-30%), en comparación con otros

microorganismos transmitidos por alimentos, como la salmonelosis, producida por **Salmonella** spp. (FAO /OMS, 2004).

Actualmente existen otros métodos diferentes a LAMP que pueden resultar útiles para la determinación de la presencia de agentes biológicos patógenos, como la PCR y PCR en tiempo real entre otros , pero LAMP además de emplear de cuatro o seis cebadores realizar la amplificación del gen diana, utiliza una temperatura de a 60-65 °C durante aproximadamente 60 min, por lo tanto no requiere termociclador ya que puede llevarse a cabo en dispositivos de calefacción simples como baño maría o bloque de calor de laboratorio, sin contar que no se pierde tiempo para realizar el cambio térmico y la reacción se puede conducir en la temperatura óptima para el funcionamiento de la enzima. Además, otro factor que lo hace mejor ante otros métodos rápidos es que los productos se pueden detectar a simple vista por turbidez debido al precipitado blanco de pirofosfato de magnesio en una reacción positiva. Por lo tanto no requiere un equipo costoso ni necesita de pasos especiales de extracción de ADN que desperdicia tiempo y aumenta los costos para dar un alto nivel de precisión, igual o mayor, en comparación con técnicas de PCR, en conclusión LAMP es más específica, rápida y sencilla de realizar que la PCR pero ambas poseen el potencial de detectar las células no viables, en particular porque el ADN bacteriano es más estable que el ARN bacteriano y puede persistir en una muestra mucho después de que el organismo objetivo ha muerto (Kudo *et al.*, 2005; Sánchez *et al.*, 2014).

Por otra parte existen otros métodos de uso convencional que resultan más económicos, pero requieren medios de cultivo, procesos bioquímicos e inmunológicos por lo que son demorados y también presentan constantemente una pérdida de tiempo en el proceso. En relación a esto, LAMP como proceso de detección de patógenos constituye una herramienta atractiva al mostrar diferentes ventajas como economizar el tiempo, capacidad amplificar ADN diana de manera específica, sensible, sin la generación de productos contaminantes al medio ambiente y facilitando el proceso de detección de estos agentes en alimentos, para de esta manera poder controlar las condiciones higiénico sanitarias de estos.

La contaminación con estos patógenos preocupa enormemente al sector de la salud, debido a su elevada tasa de incidencia y a que se multiplican a una alta densidad en condiciones inapropiadas como alimentos contaminados o refrigerados inadecuadamente, el estudio se enfoca en la detección molecular de **Listeria monocytogenes** ATCC 13932 y **Salmonella** Typhimurium ATCC 14028 a través de una amplificación isotérmica mediada por bucles (LAMP) y bioluminiscencia en matrices alimenticias. Por la importancia de estos microorganismos en salud pública, se espera que este estudio contribuya a una rápida detección, control y prevención.

4. MARCO REFERENCIAL

4.1. BASES LEGALES

Los alimentos deben ser vigilados constantemente por entes gubernamentales, a fin de preservar su calidad, inocuidad y la salud pública. En la actualidad TECNIMICRO Laboratorio De Análisis S.A.S, cuenta con una norma oficial que establece requisitos generales para la competencia de laboratorios de calibración y ensayo; con el propósito de verificar el método analítico 3M™ en la detección molecular de **Listeria monocytogenes** ATCC 13932 y **Salmonella** Typhimurium ATCC 14028, mediante matrices alimentarias para comprobar la confiabilidad del mismo. Considerando las recomendaciones de la norma ISO 17025:2005 (Norma Técnica Colombiana ISO 17025:2005, requisitos generales para la competencia de laboratorios de calibración y ensayo).

Las normas que regulan el manejo de los alimentos utilizados como matrices y su consumo en el país son:

- Norma Técnica Colombiana 1325-2008, Industrias Alimentarias. Productos Cárnicos procesados no enlatados. Requisitos microbiológicos para productos cárnicos procesados cocidos. Detección de **Salmonella** spp. y **Listeria monocytogenes**.
- Norma Técnica Colombiana 5894-2011, Industrias Alimentarias. Productos Lácteos. Queso Fresco. Requisitos microbiológicos para el queso fresco.

Certificaciones y validaciones de métodos:

Salmonella spp.

1. Método oficial AOAC SM #2013.09
2. Certificado AOAC RI 031208
3. Método certificado NF VALIDATION 01/11-11/12 certificado de AFNOR CERTIFICATION

Listeria monocytogenes

1. Certificado AOAC RI 081203

4.2. ANTECEDENTES

Los patógenos como **Salmonella** spp., **E.coli** enterotoxigenica, **Campylobacter** spp. y **Listeria** spp. en alimentos son un gran problema para la salud mundial, un claro ejemplo de esto es **Salmonella** spp., que causa el 93,8 millones de infecciones humanas, del cual el 80,3 millones son enfermedades transmitidas por alimentos y 155.000 muertes al año en todo el mundo (Mahony *et al.*, 2011; Kokkinos *et al.*, 2014). De igual manera, **Listeria monocytogenes** se sitúa entre las ETAS de mayor relevancia en la salud, debido al impacto social y económico que tiene por la gravedad de su cuadro clínico, ya que cuesta cerca de USD 2.7 mil millones en medicina, facturas, salarios perdidos, y muerte prematura (INS, 2011 ; Muñoz *et al.*, 2011; Jenkins *et a.l.*, 2011). Métodos tradicionales para la detección de **Salmonella** spp. y **Listeria monocytogenes** incluyen diversos métodos bioquímicos e inmunológicos, pero resultan tediosos y consumen mucho tiempo. Por lo anterior en los últimos años se han llevado a cabo una gran cantidad de investigaciones sobre su detección en muestras alimenticias mediante la aplicación de molecular técnicas como la PCR que permite una detección altamente específica (Mohamed y Xiaonan, 2016;).

Las ETAS o enfermedades transmitidas por alimentos son un gran problema de salud pública, que preocupa a las autoridades como la Organización de las Naciones Unidas, la FAO y la Organización Mundial de la Salud debido a que en los últimos años ha aumentado la incidencia de ellas (FAO/OMS, 2004); la falta de control y vigilancia acompañado de la globalización hacen que un alimento que se encuentre contaminado con patógenos como **Salmonella** spp. y **Listeria monocytogenes** ocasionen patologías que en muchos casos producen la muerte.

La primera publicación acerca de la técnica de amplificación isotérmica LAMP, fue hecha en el 2000 por Notomi *et al.* En este estudio desarrollaron la prueba molecular LAMP, que consiste en la amplificación de ácidos nucleicos en condiciones isotérmicas, y los autores insisten en que como la señal química de reconocimiento es altamente sensible, el sistema permite la discriminación visual de resultados sin equipos especializados costosos (Notomi *et al.*, 2000). Desde ese momento, diferentes investigadores han enfocado sus estudios desarrollando esta tecnología para la determinación de agentes patógenos en alimentos de consumo humano y animal. Este trabajo además incentiva a estudios posteriores como el realizado por Kudo *et al.*, en el 2005, los cuales aplicaron LAMP para detectar rápidamente **Salmonella enterica** subespecie **enterica** y **Salmonella enterica** subespecie **arizonae**, donde reportaron sensibilidad > 2,2 UFC / tubo de ensayo, especificidad parecida a la PCR y el límite de detección fue de 1,9 - 2,2 células/tubo de ensayo. Donde concluyeron que la amplificación isotérmica

mediada por bucles es rápida, eficaz, con alta sensibilidad y rendimiento en comparación con otros ensayos para la detección este microorganismo (Kudo *et al.*, 2005).

A partir de estos trabajos surge gran interés por descubrir nuevas tecnologías que complementen el mecanismo de amplificación isotérmica, así como por aplicar esta tecnología en los diferentes campos, especialmente para la detección de agentes etiológicos peligrosos a partir de diferentes matrices alimentarias en función de las enormes ventajas que tiene este proceso para determinar amplia variedad de microorganismos como bacterias, parásitos, hongos, y virus. Debido a esto existe una cantidad considerable de trabajos, como la investigación realizada por Muñoz y colaboradores, quienes determinaron la presencia de ***Listeria monocytogenes*** en alimentos listos para el consumo y delicatessen. De 600 muestras, 68 fueron positivas de estas 26 fueron delicatessen y 42 provenían de plazas de mercado. Los investigadores concluyeron que estos alimentos son vehículos de transmisión, en alimentos de alto riesgo, por lo que deben ser vigilados y controlados por la autoridad competente (Muñoz *et al.*, 2011).

Otro de los trabajos en el que se evaluó la contaminación de alimentos con ***Listeria monocytogenes*** es el realizado por el Instituto Nacional de Salud, donde mostró su prevalencia en el queso campesino, queso doble crema y la cuajada. En este estudio los autores concluyen que todas las etapas de la cadena presentan riesgo de contaminación por ***L. monocytogenes*** debido a la característica de ubicuidad del microorganismo y que la eficacia de los procesos de limpieza y desinfección durante las etapas de producción son vitales para determinar la presencia o ausencia del microorganismo en el producto final (Instituto Nacional De Salud, 2011)

Son numerosos los estudios orientados en la identificación de patógenos por amplificación isotérmica mediada por bucles. Recientemente gran cantidad de investigaciones han sido realizadas, motivadas por la especificidad, eficacia y velocidad del proceso, debido a esto existe una cantidad considerable de trabajos sobre esta técnica, como la investigación realizada por Kokkinos *et al.*, quienes en su trabajo evaluaron el método LAMP. Los científicos recomienda LAMP por ser sensible, rápida y de bajo costo en los laboratorios de análisis de alimentos (Kokkinos *et al.*, 2014). Otros estudios destacan a LAMP sobre otras técnicas empleadas tradicionalmente, como el realizado por Wang *et al.*, donde emplean LAMP para detectar cepas de ***Listeria ivanovii***, con especificidad del 100%, sensibilidad de 250 fg de DNA y 16 UFC por reacción para la detección de ***L. ivanovii*** en cultivos puros y materia fecal humana, 10 y 100 veces más sensible que la PCR cuantitativa y PCR tradicional respectivamente. En muestras con bajo nivel (8 UFC / 0,5 g) de ***L. ivanovii***. LAMP consiguió la detección positiva

después de 6 horas de enriquecimiento. Por lo que en este estudio esta técnica resulta ser una herramienta de valor, rápida y sensible para la detección de *L. ivanovii* en el campo (Wang *et al.*, 2014).

La amplificación isotérmica mediada por bucle (LAMP) combinada con otras tecnologías, hacen posible la mejora de la técnica, tal como describen Mohamed y Xiaonan en su estudio, quienes integran espectroscopía raman de superficie con LAMP para la detección de ADN de *Salmonella* Enteritidis, dando una sensibilidad ~ 100 veces más alta que la PCR. Al igual que ellos un grupo de científicos guiados por Yang, también decidieron combinar dos técnicas, LAMP y el ensayo bioluminiscente en tiempo real, con lo que detectaron rápidamente *Salmonella* spp. en alimentos y piensos, dando una especificidad del 100%, su límite de detección fue 36 células/reacción en un cultivo puro y 10^4 a 10^6 UFC /25 g en muestras de alimentos. La precisión LAMP-BART fue igual que la técnica MDA 3M de 1 a 3 UFC/25 g de *Salmonella* spp. y su tiempo máximo para detección de 36 UFC fue de 11.9 a 18.1min y desde el 18,9 min para 37,9 por 3M MDA *Salmonella*. Los investigadores afirman en todos sus estudios esta es una herramienta valiosa para el *screening* de *Salmonella* spp., a partir de diferentes tipos de muestras, porque detecta ADN diana, con alta sensibilidad y de rendimiento, es eficaz, rápida y de bajo costo (Kokkinos *et al.*, 2014; Kudo *et al.*, 2005; Mohamed y Xiaonan, 2016; Yang y Benedetto, 2013).

A nivel nacional, según informes publicados por el Sivigila han presentado 6426 casos de ETAS; de los cuales se confirmaron 4 027 casos, 1 asociado a *Salmonella* spp. Las ciudades QUE más casos presentan son Bogotá, Medellín, Arauca, Boyacá, Pasto, Barranquilla y Montería que registran el 71,8 % de los casos. (SIVIGILA, 2016). En el reciente boletín de la semana epidemiológica 30 se reportaron 6 casos de *Salmonella* spp. y en una muestra contaminada con *Listeria monocytogenes* en todo el país, (SIVIGILA, 2015). Esto no quiere decir que tengan una baja prevalencia en el país, sino que es debido a que las personas no acuden a las entidades de salud y si lo hacen por lo general no se determina el agente causal que ocasionó la enfermedad.

4.3. MARCO TEÓRICO

4.3.1. Enfermedades transmitidas por alimentos.

Un alimento según el Diccionario de la Real Academia Española se define como un conjunto de sustancias que los seres vivos comen o beben para subsistir (DRAE,2014). La contaminación de los alimentos ha presentado un problema de salud desde tiempos remotos, así que no es una novedad. Una ETA es el síndrome originado por la ingestión de alimentos, que contienen agentes etiológicos en cantidades tales que afectan la salud del consumidor. Según OPS y la OMS las ETAS pueden manifestarse como infecciones alimentarias producidas por la ingestión de alimentos contaminados con agentes infecciosos, las cuales pueden producir toxinas o invadir la pared intestinal para alcanzar otros aparatos o sistemas, o como intoxicaciones alimentarias, por la ingestión de toxinas formadas en tejidos de plantas, animales o producidas por microorganismos o sustancias químicas que se incorporan a ellos de manera accidental en cualquier momento desde su producción hasta su consumo(OPS y OMS; 2016). Se estima que en el mundo cada año enferman ~600 millones de personas por ingerir alimentos contaminados y 420.000 mueren, los niños reciben 40% de la carga atribuible a las ETAS, que provocan 125.000 defunciones anuales en ellos (OMS, 2015).

Entre los factores de riesgo que favorecen la proliferación de agentes patógenos como *Listeria monocytogenes* y *Salmonella* spp. se encuentran la inadecuada conservación y almacenamiento, contaminación cruzada, además de fallas en la cadena de frío, y manejo deficiente en las buenas prácticas de higiene alimentaria, BPM y HACPP (Instituto Nacional de Salud,2015). Brotes como el pavo molido contaminado con *Salmonella* Heidelberg en USA que produjo un total de 136 enfermos, y de *Listeria monocytogenes* en melones que produjo 31 fallecimientos, han generado alarma sobre la calidad de los alimentos que consumimos a diario (Food safety, 2011).

Sin embargo, aunque los gobiernos de todo el mundo se están esforzando al máximo por aumentar la inocuidad en el suministro de alimentos, la existencia de enfermedades de transmisión alimentaria sigue siendo un problema de salud significativo tanto en los países desarrollados como en los países en desarrollo por la especial presencia de enfermedades como salmonelosis y listeriosis, cuyos agentes causales son *Salmonella* spp. y *Listeria monocytogenes* respectivamente (Instituto Nacional de Salud, 2015).

El aspecto más importante en cuanto al control de la inocuidad de los alimentos es su calidad microbiológica. Los alimentos expendidos, deben ser monitoreados y evaluados por las entidades gubernamentales para preservar la salud pública, debido a un conjunto de factores de riesgo (Instituto Nacional de Salud, 2015).

Gran variedad de microorganismos como bacterias, virus, parásitos o sustancias químicas nocivas, pueden contaminar los alimentos mediante diferentes vías (OMS, 2015). Actualmente, de acuerdo a informes presentados por la FAO, los agentes patógenos responsables de brotes de ETAs son Coliformes fecales, Coliformes totales, **Bacillus anthracis**, **Bacillus cereus**, **Staphylococcus aureus**, **Streptococcus** spp., **Aeromonas hydrophila**, **Escherichia coli**, **Shigella** spp., **Salmonella** spp., **Fasciola hepática**, **Taenia solium**, **Hymenolepis nana**, **Endolimax nana** y **Listeria monocytogenes** (INS, 2015). **Salmonella** spp., presenta una morfología de bacilo Gram negativo y es uno de los patógenos entéricos más dispersos en el medio ambiente. Esta bacteria crece a un pH entre 4 -9, temperaturas entre 7 y 49 °C, aunque su crecimiento se ve reducido a <15°C, sin embargo, estos datos no son concluyentes porque dependen del serovar y el medio de cultivo donde se inocula. Este patógeno puede ser transferido por vía oral, con excretas humanas o de animales en cualquier punto del proceso productivo. Sin embargo, los principales vehículos de transmisión son la carne (ternera, cerdo, aves), los huevos y los productos industrializados que contienen estas materias primas, productos agroalimentarios, productos frescos, productos lácteos y el agua (Mohamed y Xiaonan, 2016; Patrick *et al.*, 2010). Los serotipos de mayor incidencia son **Salmonella** Typhimurium y **Salmonella** Enteritidis; desatando salmonelosis, que produce fiebre alta, dolor abdominal, diarrea, náusea, gastroenteritis y a veces, vómitos (UNAD, 2015; Durango *et al.*, 2004). De hecho se han reportado trastornos debido a la ingestión de productos contaminados por esta bacteria, en la tabla 1 pueden observarse patógenos aislados en hortalizas causantes de enfermedades de origen alimentario.

Tabla 1. Microorganismos presentes en algunos alimentos responsables de brotes.

Agente	Alimentos implicados
Aeromonas spp.	Brotes de alfalfa, espárrago, brócoli, coliflor, lechuga, pimiento.
Bacillus cereus	Brotes de distintas especies
Escherichia coli 0157:H7	Repollo, apio, cilantro, lechuga(*), ananá, sidra de manzanas(*), brotes de alfalfa(*)
Listeria monocytogenes	Brotes de productos lácteos, quesos, productos cárnicos,

	Poroto, repollo, pepino, repollo cortado(*), papa, rabanito, hongos comestibles (*), ensaladas(*), tomates y otras hortalizas
Salmonella spp.	La carne (ternera, cerdo, aves), los huevos y los productos industrializados que contienen estas materias primas, productos agroalimentarios, productos frescos, productos lácteos y el agua. Brotes de poroto(*), tomate(*), brotes de alfalfa("), sidra de manzanas(*), coliflor, apio, berenjena, endivias, pimienta, melón cantalupo(*), sandía(*), lechuga, rabanito y diversas hortalizas
Clostridium botulinum	Repollo cortado(*)
Shigella spp.	Perejil, hortalizas de hoja, lechuga cortada(*)
Cryptosporidium spp.	Sidra de manzana(*)
Cyclospora spp.	Frambuesa(*), albahaca(*), lechuga(*)
Virus de la Hepatitis A	Lechuga(*), frutilla(*), frutilla congelada(*)

(*) Enfermedades reportadas

Tomado de: Mohamed y Xiaonan, 2016; Patrick *et al*, 2010; Brackett y Harris, 1998.

En Colombia, el Instituto Nacional de Salud es la entidad encargada de hacer la serotipificación de las cepas de **Salmonella** spp. aisladas de humanos, mediante el laboratorio de microbiología. Los aislamientos de **Salmonella** spp. en alimentos son remitidos al laboratorio de microbiología del Instituto Nacional de Vigilancia de Medicamentos y Alimentos (Invima), que se encarga de la serotipificación y los aislamientos obtenidos de los animales vivos que a su vez reporta al Instituto Colombiano Agropecuario (Binzstein *et al.*, 2010). Respecto a la cadena de producción, la información recolectada por el Instituto Colombiano Agropecuario corresponde a un sistema de vigilancia y no obedece a un muestreo estadístico, por lo cual no arroja datos de prevalencia. De ahí la necesidad de que los laboratorios de salud pública de los departamentos la midan en el ámbito territorial.

Otro patógeno importante en la industria alimentaria, por las graves consecuencias que lleva su presencia en alimentos sobre la salud es **Listeria monocytogenes**, el cual es un bacilo Gram positivo, cuya temperatura óptima es 30 a 37°C, posee la capacidad de soportar temperaturas de refrigeración y es capaz de desarrollarse a pH de 4,4 a 9,6; Además, es capaz de crecer a concentraciones altas de cloruro de sodio (15 %) (Mataragas *et al.*, 2010; Food safety, 2010; Cole *et al.*, 1990). Este microorganismo tiene la facultad de adherirse a las superficies, formando biofilm para así protegerse de los procesos antimicrobianos. En el ambiente de fábrica de producción de alimentos, tiene la oportunidad de contaminar en sus diferentes etapas, siendo esta vía la más frecuente para llegar al ser humano (FDA Y USDA,

2001). Es patógeno facultativo intracelular, oportunista que ocasiona la listeriosis, la cual es una enfermedad relativamente poco común, pero grave, con tasas de letalidad altas (20-30%), comparadas con las de otros microorganismos patógenos transmitidos por alimentos, como **Salmonella** entérica. La enfermedad ocasiona graves infecciones en humanos, como meningitis, encefalitis y bacteriemias; también, es causa de abortos (FDA y USDA, 2003).

Dentro de los tratamientos físicos y medidas para prevenir estas ETAs se encuentran el lavado con agua potable, cocción adecuada de carnes crudas, higiene del personal así como de las instalaciones, lavados secuenciales, separación correcta de áreas para evitar contaminación cruzada, las instalaciones no deben permitir el ingreso de animales que diseminen microorganismos patógenos con sus excreciones, contar con un sistema de control de insectos y roedores mediante trampas aprobadas, evitar el almacenamiento y/o transporte con otros productos para evitar la contaminación cruzada, construcción de letrinas sanitarias y el tratamiento de las aguas servidas. Una alternativa que ha mostrado ser eficiente es el uso de riego por goteo enterrado (no en superficie) es el aconsejable evitando mojar el follaje o partes comestibles. Sin embargo, el agua de la red domiciliaria es segura para ser bebida así como apta para cocinar y para estar en contacto con los alimentos. Aun así, es necesario realizar tratamientos germicidas adicionales. El tratamiento de aguas puede realizarse en forma química, térmica, mediante ultrasonido o radiaciones. En la tabla 2 se pueden observar los riesgos potenciales de contaminación y las medidas preventivas (Instituto Nacional de Salud, 2015; FAO, 2003).

Tabla 2. Riesgos de contaminación y prevención.

Etapa	Riesgo	Prevención
Lote de producción	Contaminación fecal por animales	Evitar el acceso de animales de producción, domésticos o salvajes
Fertilizantes	Bacterias patógenas en orgánicos	Usar fertilizantes inorgánicos. Compostar adecuadamente
Riego	Patógenos	Riego posicionado. Evaluación microbiológica de agua
Cosecha	Contaminación fecal	Higiene personal. Instalaciones portátiles para el aseo. Concientización
	Patógenos en contenedores y herramientas	Usar <i>bins</i> plásticos. Limpieza y desinfección de herramientas y contenedores

Galpón de empaque	Contaminación fecal	Higiene del personal. Instalaciones sanitarias. Evitar el acceso de animales.
	Contaminación por agua	Eliminar lugares de albergue de roedores. Métodos alternativos de preenfriado. Usar agua potable. Filtrado y clorado del agua recirculada. Lavados múltiples
Almacenamiento y transporte	Desarrollo patógenos sobre el producto	Adecuada temperatura y humedad relativa. Especial cuidado de las condiciones dentro del envase. Limpieza y desinfección de instalaciones. Evitar reempaque. Higiene personal. No almacenar ni transportar con otros productos. Usar envases nuevos
Venta	Contaminación producto	Higiene personal. Evitar ingreso de animales. Evitar fraccionar. Limpieza y desinfección de instalaciones y elementos de venta. Eliminar basura

Tomado de: FAO, 2003.

De acuerdo con la FAO, la medida de evitar la contaminación es contar con las medidas de higiene sanitarias, así como HACPP, BPM y BPA, entre las que se encuentran acciones como el aseo personal y la ubicación de los lotes de producción alejados de los baños o instalaciones para el aseo personal, no trabajar con heridas abiertas, los operarios deben lavarse las manos al iniciar la labor diaria y cada vez que reingresen a la línea de trabajo, particularmente luego de ir al baño (FAO, 2003).

El tratamiento con cloro es el más económico, se comercializa como hipoclorito de calcio (sólido) y como hipoclorito de sodio. La forma sólida (65 % hipoclorito de calcio), se disuelve con dificultad en agua fría por lo que la primera dilución se hace con agua tibia. La forma líquida (distintas concentraciones de hipoclorito de sodio). Con el fin de maximizar el efecto de la solución, el pH debe estar entre 6.5 y 7.5, para mantener el pH en esos valores se puede usar vinagre para acidificar o hidróxido de sodio para alcalinizar. Los papeles que cambian de color con el pH se pueden usar para monitorear este valor. La concentración de cloro activo, libre o residual son aquellas que reaccionan con los microorganismos. Concentraciones de cloro de 0,2- 5 ppm activo controlan la mayor parte de las bacterias y hongos presentes en el agua, en las operaciones de lavado utilizan concentraciones mucho mayores (100-200 ppm). Una exposición de unos pocos minutos 3-5 es ideal, además del pH, otra variable importante es la temperatura de la solución ya que el frío disminuye la eficacia. Algunos países no permiten el uso de cloro para el lavado, la razón principal es que puede reaccionar con la materia orgánica generando

hidrocarburos clorados y trihalometanos, compuestos sospechosos de ser carcinogénicos. Esta situación ha determinado la búsqueda de desinfectantes de agua alternativos. Además del cloro, el ozono posee acción oxidante en concentraciones de 0,5-2 ppm, pero su uso está aprobado para potabilizar agua pero su dosificación es dificultosa, efectivo en pH 6-8 y en concentraciones mayores de 4 ppm es peligroso para el ser humano. Sin embargo la mejor estrategia es prevenir la contaminación (FAO, 2003; OPS/OMS, 2015).

4.3.2. Técnicas de detección de patógenos

Debido a la gran importancia de los microorganismos especialmente los patógenos, se han desarrollado una serie de metodologías para poderlos detectar, pero tardan tiempo en generar resultados y son poco sensibles, permitiendo el crecimiento de otras bacterias, lo que dificulta la detección del patógeno (Vanegas y Rojas, 2004). Estas técnicas clásicas se basan en la observación de los síntomas que presentan los hospedadores, desarrollo del patógeno en un medio de cultivo específico, la reacción de un anticuerpo a la presencia de un patógeno y observación macro o microscópica, esta última presenta ciertas desventajas por ser un procedimiento lento, laborioso, y tedioso dado que se tiene que aislar el microorganismo y poner a crecerlo en un medio de cultivo hasta que se alcance un tamaño o una etapa de crecimiento adecuada para su identificación. Así mismo, la estructura de un microorganismo puede cambiar debido a la influencia del medio ambiente, y se requiere de una gran experiencia para poder diferenciar una especie de otra a nivel microscópico (Rodríguez *et al.*, 2009).

Por estos motivos y la necesidad de detectar con rapidez los microorganismos para evitar que salgan a la venta alimentos contaminados, se está implementando el uso de técnicas moleculares para identificar los microorganismos productores de ETAs en productos alimentarios. Actualmente las técnicas moleculares son excelentes por la especificidad (pueden detectar solo la molécula o microorganismo de interés), sensibilidad (son capaces de detectar la presencia de un solo microorganismo), rapidez (se puede identificar un microorganismo en menos de 24 horas) y pueden ser automatizadas (permiten tener un diagnóstico en un menor tiempo y reducir los costos).

El uso de técnicas moleculares ha permitido identificar nuevos microorganismos que no habían podido ser cultivados e identificados por técnicas tradicionales (Jan y LeBorgne, 2001; Rodríguez *et al.*, 2009). Además permiten estudiar las poblaciones microbianas sin hacer aislamientos, por lo tanto, se evitan los sesgos que pueden surgir con el cultivo de microorganismos (Chan *et al.*, 2002). Esta técnica permite

identificar patógenos muertos evitando así los riesgos de infección del analista (Johansson *et al.*, 2000).

El uso de anticuerpos se ha empleado por ser una técnica simple y rápida. Se puede automatizar, y puede ser usada para trabajar con varias muestras al mismo tiempo. Sin embargo, la detección no puede ser precisa cuando existen cantidades mínimas de microorganismos, en el caso de patógenos no distingue entre infecciones activas y latentes. Además se carece de anticuerpos y antígenos para muchos microorganismos y en algunos casos la detección no es precisa por la nula especificidad de algunos anticuerpos. Las técnicas moleculares se basan en el análisis de los ácidos nucleicos extraídos de los microorganismos en forma directa o bien de una muestra conteniendo el microorganismo en cuestión (Rodríguez *et al.*, 2009).

Se han propuesto en los últimos años técnicas moleculares, debido a que las tradicionales resultan algo demoradas, complejas, requieren medios de cultivo, procesos bioquímicos e inmunológicos; esto favorece a procesos moleculares para detección en muestras agroalimentarias de microorganismos infecciosos. (Liu *et al.*, 2002; Eriksson y Aspan, 2007). Una de las técnicas moleculares más sencillas para identificar bacterias consiste en determinar el porcentaje de guanina y citosina presente en su ADN. En este caso se realiza la extracción del ADN de una colonia pura y por espectrometría se determina el porcentaje de guanina y citosina. Esta técnica tiene la desventaja de solo poder identificar bacterias a nivel de género, además algunos géneros de bacterias presentan porcentajes de guaninas y citosina muy similares, por lo cual se incrementa la posibilidad de obtener falsos positivos (Rodríguez *et al.*, 2009).

4.3.2.1. Técnicas basadas en la hibridación de ADN

Estas técnicas se desarrollaron a partir del conocimiento de que dos cadenas sencillas de ácido nucleico que tengan secuencias complementarias se pueden unir o hibridar para formar una cadena doble. Las cadenas sencillas pueden ser de ADN o ARN, o bien una de ADN y otra de ARN. Dentro de las técnicas de hibridación más utilizadas se encuentran:

4.3.2.1.1. RFLPs

Esta técnica está basada en hibridación de ADN. Consiste en extraer ADN de un cultivo puro de un microorganismo o bien de una muestra infectada y digerir el ADN con enzimas de restricción (enzimas que cortan el ADN en sitios específicos), posteriormente estos fragmentos de ADN son separados en un gel de agarosa utilizando electroforesis. El ADN está cargado negativamente, por lo tanto, en un

campo eléctrico el ADN migraría del polo negativo hacia el polo positivo a través de la matriz de un gel. La fricción entre el fragmento y la matriz ocasiona que fragmentos pequeños migren más rápido que fragmentos grandes. En esta técnica el ADN separado de la forma antes descrita en el gel es transferido a un soporte sólido (membranas de nylon o nitrocelulosa), se hibridiza el ADN de la membrana con una sonda de ADN específico (fragmento de ADN de cadena sencilla de 150 a 300 nucleótidos) del microorganismo que se quiere identificar. La sonda va a unirse en el fragmento del ADN que tenga su complemento. La sonda para la detección tiene que ser marcada en forma radioactiva (P_{32}) o no radioactiva (digoxigenina). La sonda puede ser aislada del genoma nuclear, del genoma mitocondrial o bien de ADN que codifica para proteínas (ADNc) del microorganismo. Esta metodología es muy específica. Sin embargo, no es muy rápida ni muy sensible (se requiere 10^3 a 10^6 copias de la molécula o secuencia de interés para dar un resultado confiable), además de que se requiere utilizar radioactividad (si no es empleada adecuadamente y bajo condiciones especiales de laboratorio, se pueden tener riesgos de salud del analista, contaminaciones de instalaciones o del medio ambiente) (Rodríguez *et al.*, 2009).

Una variante de RFLPs se ha diseñado para la detección de ***Listeria monocytogenes***. Esta consiste en fijar en un microtubo una sonda de ADN complementaria a una región del RNA ribosomal de la bacteria. El RNA completo de la muestra es extraído y colocado en el microtubo con la sonda, la cual se unirá al RNA ribosomal, posteriormente se agrega otra sonda de ADN complementaria a otra región del RNA ribosomal la cual está marcada con fluorescencia posteriormente se detecta la presencia del microorganismo por un anticuerpo con fluorescencia (Giese, 2001).

Esta técnica se empleó en un estudio en Brasil, donde se aislaron 26 cepas de ***Listeria*** spp. de las muestras de salchichas de *Hot dog*, identificado 18 cepas de ***Listeria innocua*** y 8 de ***Listeria monocytogenes***. De las 35 muestras de carne de res molida, se aislaron 16 cepas de ***Listeria*** spp., de las cuales se identificaron 12 cepas de ***Listeria innocua*** y 4 de ***Listeria monocytogenes***. Para identificar y confirmar la especie, fueron realizados dos análisis de restricción (RFLP) del amplicón de 890bp (S2) obtenido por digestión con endonucleasas de *Xmn* I y *Cfo* I con la incubación en un baño de agua a 37 ° C durante 2 h, de acuerdo a la metodología propuesta por Paillard *et al.* en el 2003. Los patrones de restricción se visualizaron en gel de agarosa al 2,0% que contenía bromuro de etidio a una concentración de 0,02% en el transiluminador. Los amplicones S2 de tres cepas aisladas de muestras de tipo salchichas de perro caliente sometidas individualmente a la reacción enzimática con la endonucleasa *Xmn* I, resultaron en fragmentos de 770pb y 120pb que son característicos de la especie ***L. monocytogenes***, ***L. seeligeri*** o ***L. ivanovii*** (Rocha, 2008).

4.3.2.1.2. Transferencia por aplastado (squash blot).

En esta técnica la muestra a analizar se aplasta contra un soporte sólido originando una huella, la muestra se fija utilizando alcohol o exponiéndola a UV. Se hibridiza con la sonda específica para el microorganismo en cuestión. Tiene la ventaja de ser una técnica rápida, que puede ser utilizada en campo o fuera de laboratorio. Sin embargo es una técnica sucia, lo cual a veces no permite distinguir una hibridación de ácidos nucleicos, con lo cual las probabilidades de obtener falsos negativos (diagnosticar el microorganismo como ausente cuando en realidad está presente) se incrementan. Otra de las técnicas son: Transferencia de punto (dot blot) similar a squash blot y Northern blot similar a RFLPs sin embargo lo que se separa es ARN y se hibridiza con sondas de ADN presenta ventajas y desventajas similares a RFLPs (Rodríguez *et al.*, 2009).

4.3.2.2. Técnicas basadas en PCR

Es la técnica más utilizada para la detección de microorganismos, se basa principalmente en realizar millones de copias de un segmento de ADN específico de un microorganismo. En esta técnica la cadena doble de ADN es separada en dos cadenas sencillas sometiéndola a temperaturas mayores a 92°C, después se hibridiza dos segmentos de ADN complementarios una a una cadena y el otro a la otra. Estos pequeños segmentos son llamados iniciadores, los cuales son diseñados de tal manera que solo se hibriden con el ADN del microorganismo que se desee y su tamaño generalmente va de 18 a 25 bases. Una vez que los iniciadores se unen a las cadenas complementarias se adiciona a la reacción una ADN polimerasa la cual va a formar la nueva cadena tomando como bases la cadena sencilla y uno de los extremos del iniciador (3'). Después de este primer ciclo, si se partió de una sola cadena doble de ADN se tendrían dos cadenas dobles. Esta amplificación se incrementa a medida que se repite el número de ciclos, así después de dos ciclos se tienen cuatro cadenas dobles de ADN, y después de tres, ocho y así sucesivamente, después de treinta ciclos tendríamos una gran cantidad de ADN amplificado para ser visualizado a simple vista. Las ventajas de PCR sobre otras técnicas de detección se han reportado en varias ocasiones (Louie *et al.*, 2000; Rodríguez *et al.*, 2009).

La precisión y reproducibilidad de los ensayos de PCR depende de la experiencia del analista. La especificidad de la prueba puede ser afectada por la contaminación de la muestra durante su procesamiento. Si los iniciadores no son específicos o si las condiciones de la PCR no son óptimas, se pueden amplificar productos no específicos (Louie *et al.*, 2000). Lo anterior puede guiar a la detección de falsos negativos, de la misma manera la contaminación de la muestra con inhibidores (ácidos húmicos, polifenoles, carbohidratos, etanol, etc) de la enzima polimerasa

puede ocasionar también falsos negativos. Sin embargo esto se puede solucionar incorporando siempre controles positivos. La contaminación de la muestra con otro ADN o RNA, puede conducir a la detección de falsos positivos, esto se soluciona agregando siempre un control negativo (Rodríguez *et al.*, 2009). La identificación de microorganismos directamente de alimentos utilizando PCR presenta algunos retos como es la baja sensibilidad provocada por la inhibición debida a la matriz del alimento, esto puede ser parcialmente reestablecida con una etapa de enriquecimiento pero se alarga el tiempo para el diagnóstico. Sin embargo, dentro de las desventajas se destacan: la necesidad de equipos con ciclo térmico costosos y personal capacitado, estos procesos siguen siendo inadecuados para un exitoso screening de un gran número de muestras, la necesidad de algún conocimiento previo de las secuencias que flanquean el segmento a amplificar (que actúan de iniciadores de la reacción) y las precauciones que se deben de tomar en las condiciones de la reacción para evitar las amplificaciones no deseadas, lo que daría lugar a, dada la elevada sensibilidad de la PCR, la aparición de falsos positivos procedentes de ácidos nucleicos ajenos a nuestra muestra (Bolívar *et al.*, 2014); pero aun así con estas desventajas, la flexibilidad, automatización, rapidez y confiabilidad la PCR es una de las técnicas moleculares con más aceptación en la actualidad para la detección de microorganismos en general (Liu *et al.*, 2002; Eriksson y Aspan, 2007; Rodríguez *et al.*, 2009).

4.3.2.2.1. PCR anidada

La PCR anidada es una técnica que se utiliza principalmente cuando un microorganismo se encuentra en muy bajas cantidades o bien cuando se quiere identificar si en una muestra existen microorganismos de un determinado grupo y después determinar las especies de ese grupo que están presentes. Es la amplificación enzimática de un segmento de ADN interno de un segmento de ADN previamente amplificado.

Esta técnica consiste en amplificar un segmento grande de ADN (700-2000 pb) por la técnica de PCR con un par de iniciadores y posteriormente amplificar con otro par de iniciadores un segmento interno del primer fragmento amplificado, es decir, esta técnica es una PCR doble y por lo tanto se estima que es mil veces más eficiente que una PCR simple (Rodríguez *et al.*, 2009).

En un estudio hecho en la India se empleó esta técnica para la detección de **Salmonella** spp. a partir de alimentos. La sensibilidad del ensayo desarrollado fue comparable a los métodos basados en cultivo tradicional con una ventaja en la reducción del tiempo de ensayo (6 horas). El ensayo detectó 4 UFC **Salmonella** / 25 g de muestras de alimentos (brotes, zanahoria, pepino y pollo). Con dos cebadores sintéticos de 26 mer TS11 y 25 mer TS4, se amplificó un fragmento de

1,2 kb que sirvió como plantilla para la amplificación del producto final de 375 pb utilizando cebadores TS11 y TS5.

La reacción generó una única banda específica para **Salmonella** que permitió al analista interpretar los datos a gusto y sin ninguna confusión. El caldo enriquecido sirvió como molde para la reacción lo que elimina procedimientos laboriosos de aislamiento de ADN. En el caso de muestras contaminadas artificialmente, el caldo de lactosa enriquecido en 6 h puede servir como molde. Sin embargo, para las muestras de mercado en las que los organismos están bajo estrés ambiental, es deseable utilizar una plantilla del medio de Rappaport Vasiliadis. El ensayo también empleó un control de amplificación interno, que se amplificó en un fragmento de 300 pb, sirviendo como control positivo para la reacción y cualquier posibilidad de falsos negativos se descartó debido a la acción inhibitoria de los componentes de los alimentos en la reacción de PCR (Anexo 1)(Sunil *et al.*,2008).

4.3.2.2.2. RAPDs

Polimorfismo del ADN amplificado al azar. En este caso se realiza una reacción de PCR con un solo iniciador el cual tiene un tamaño de 8 a 12 bases con secuencia arbitraria. En la etapa de alineamiento del iniciador se emplean temperaturas bajas 37 a 40 °C para asegurar que el iniciador se una a diferentes regiones del genoma del microorganismo que se desee identificar. En este caso la identificación se realiza solo de cultivos puros del microorganismo y con una sola reacción del PCR se amplifican varios segmentos a la vez (Figura 1). Tiene la ventaja de que no se requiere conocimientos previos del microorganismo para poderlo identificar, esta técnica como método de identificación a nivel comercial no es muy utilizada debido a los problemas de reproducibilidad, sin embargo es muy útil cuando se requiere determinar diferencias entre 2 microorganismos altamente emparentados pudiéndose detectar estas diferencias aun a nivel de cepa. Otra ventaja de los RAPDs es en el caso donde se logra identificar un fragmento de ADN amplificado que se encuentre en una cepa en particular, este se puede secuenciar y se pueden diseñar a partir de esa secuencia iniciadores específicos para esa cepa. Lo mismo aplica para el diseño de iniciadores específicos a nivel de especie o de género esta técnica es conocida como SCAR (secuencia caracterizada de región amplificada) (Figura 2). Además de la desventaja de poca reproducibilidad, la presencia de una banda RAPD, no permite distinguir entre los estados homocigoto y heterocigoto (Babalola, 2003; Rodríguez *et al.*, 2009).

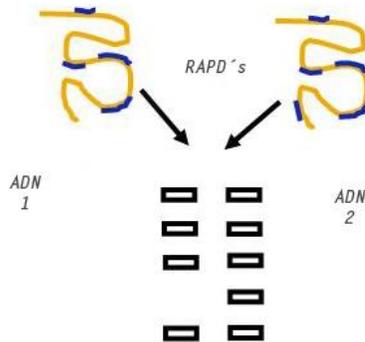


Figura 1. Polimorfismo del ADN amplificado al azar



Figura 2. Secuencia caracterizada de una región amplificada

Tomado de: Rodríguez *et al.*, 2009.

En una publicación hecha por Frederick *et al* en el 2015, donde se aplicó esta técnica para caracterizar ***Salmonella*** Typhimurium, ***Salmonella*** Enteritidis y ***Salmonella*** Albany aisladas de pollos y patos para determinar su relación utilizando el ácido desoxirribonucleico polimórfico amplificado aleatorio (RAPD) -PCR. El análisis RAPD-PCR de los serovares de ***Salmonella*** produjo bandas de ADN que variaron de 242 a 3189 pb para ***Salmonella*** Typhimurium, 252 a 2756 pb para ***Salmonella*** Enteritidis y 232 a 2612 pb para ***Salmonella*** Albany. El análisis de grupo con un coeficiente de 0,85 agrupó los serovares de ***Salmonella*** en varios grupos y *singletons*. ***Salmonella*** Typhimurium se agruparon en 4 racimos y 1 *singleton* con un índice discriminatorio de 0.85. ***Salmonella*** Enteritidis se agruparon en 2 racimos y 2 *singletons* con un índice discriminatorio de 0.64. ***Salmonella*** Albany se agruparon en 3 grupos y 1 *singleton* en un índice discriminatorio de 0,71 (Frederick *et al.*, 2015).

4.3.2.2.3. Inmuno-PCR

Unión de un microorganismo a un soporte sólido utilizando un anticuerpo y una posterior amplificación de ADN por PCR. Es una técnica que combina las ventajas de las técnicas inmunológicas (ELISA) y de las técnicas moleculares (PCR) para

que las ventajas combinadas, disminuyan o eliminen las desventajas de ambas técnicas; ELISA es ineficiente en la detección cuando se presentan niveles muy bajos de la molécula o microorganismo de interés en la muestra a analizar, mientras que la PCR se ve inhibida por algunos componentes de la muestra (fenólicos, polisacáridos) (Rocha, 2003).

4.3.2.2.4. PCR Inmunomagnética

En este caso el soporte es una esfera magnética, la cual es removida de la muestra con un magneto y posteriormente se realiza la PCR. En esta técnica un anticuerpo primario se encuentra unido a perlas metálicas las cuales se colocan dentro de la muestra a analizar, se deja incubar para la unión antígeno-anticuerpo, posteriormente se extraen estas perlas metálicas con un imán, se lavan y se colocan en un tubo en el cual se realiza la PCR. Esta técnica se ha utilizado para la detección de *Listeria monocytogenes* en alimentos (Rodríguez *et al.*, 2009).

4.3.2.2.5. PCR-múltiple

Esta técnica se ha utilizado para la detección de diferentes especies de *Listeria* en una misma muestra, así como para detectar diferentes microorganismos a la vez como es el caso de *Salmonella* spp., *Campylobacter* spp., *Shigella* spp. y *E. coli* (Babalola, 2003). La PCR múltiple también ha sido usada para detectar diferentes genes de un mismo organismo en una muestra. Esta técnica también es usada para identificar cuales genes de resistencia a antibióticos poseen una determinada cepa bacteriana (Pérez *et al.*, 2001).

Esta técnica se ha utilizado para la detección de *L. monocytogenes* a partir de ADN de cultivos puros y en muestras de leches crudas, quesos frescos, carne de res y carne de pollo. En DNA de cultivos puros la sensibilidad, la especificidad y la reproducibilidad encontrada fue de 100%, 10^1 UFC/ml y K=1 respectivamente. Para la extracción del ADN se emplearon dos métodos, uno basado en la precipitación alcohólica en presencia de NaI, lo que redujo en gran medida las grasas; permitiendo la detección directa de 10^1 UFC/ml en leche cruda y 10^5 UFC/g en queso fresco. El otro método, basado en la extracción con lisozima, proteinasa K y fenol-cloroformo, permitió establecer límites de detección de 10^2 y 10^4 UFC/g para las carnes de res y pollo respectivamente. La PCR se basó en la especificidad de los iniciadores LI1/U1 que amplificaron una banda de 938 pb (identificación de género) característica del rDNA 16S y los iniciadores LF/LR que amplificaron una banda de 750 pb característica del gen hlyA (identificación de especie). Los resultados de la validación reportaron una reproducibilidad, sensibilidad y especificidad del 100% en leches crudas. Para las muestras de queso frescos se

reportó una reproducibilidad de 97%, sensibilidad 96.3% y especificidad del 100%, para la carne de pollo la reproducibilidad fue 98.43%, sensibilidad 96.9%, especificidad 100%, para la carne de res todos los parámetros fueron 100%. El trabajo muestra que ambas técnicas pueden ser utilizadas para detectar *L. monocytogenes* en este tipo de alimentos y que la PCR reduce el tiempo de ensayo considerablemente (Poutou *et al.*, 2005)

4.3.2.2.6. PCR en tiempo real

Emplea sondas marcadas con fluorocromos. Entre las sondas más utilizadas se encuentran las sondas de hidrólisis que son oligonucleótidos que presentan fluorocromos en ambos extremos y tienen una secuencia complementaria a parte del fragmento de ADN que se quiere amplificar. Uno de los fluorocromos actúa como donador de fluorescencia en el extremo 5' y el otro como aceptor de esta fluorescencia en el extremo 3'. La ADN polimerasa se desplaza sobre la cadena de ADN sintetizando la cadena complementaria a partir de un fragmento de ADN que sirve de molde (cebador). Al llegar al punto en el que la sonda se ha hibridado, la hidroliza. El fluorocromo del extremo 5' de la sonda (el donador) es liberado. El fluorocromo aceptor no puede entonces absorber la fluorescencia del donador por estar alejado de él espacialmente. Un detector realiza la medida de esta emisión de fluorescencia, que es proporcional a la cantidad de ADN presente, y la representa gráficamente. Además de proporcionar información cuantitativa, la PCR en tiempo real es más sensible que la PCR tradicional, lo que disminuye el riesgo de falsos negativos. También es más rápida y tiene menos probabilidad de contaminación con lo que disminuyen los falsos positivos. Son muchas las aplicaciones de esta técnica en el campo de la medicina. Cabe destacar la cuantificación viral, la cuantificación de la expresión de genes, el control de la eficacia de fármacos, la detección de agentes infecciosos, el diagnóstico de tumores y la detección de polimorfismo. Se realiza utilizando un marcador como SYBR GREEN-I, que produce fluorescencia al unirse al ADN de cadena doble, con un equipo que la detecta y genera una curva de la intensidad de fluorescencia vs temperatura. El pico de la curva indica la temperatura de fusión *–melting peak–*, en la cual el 50% del ADN se encuentra en doble cadena. De esta manera, cada cepa bacteriana genera una temperatura de fusión específica que indica su presencia (Vanegas y Rojas, 2004).

En estudios realizados con esta técnica en España, se describe como un método sencillo y rápido para la detección cuantitativa de *Listeria monocytogenes* en productos cárnicos. Es capaz de detectar 100 CFU / g y cuantificar tan pocas como 1000 UFC/g, con una excelente precisión en comparación con la del método de recuento en placa. Por lo tanto, es una alternativa prometedora para la detección de *L.monocytogenes* en productos cárnicos (Anexo 2) (Rodríguez *et al.*, 2004).

4.3.2.3. Amplificación isotérmica mediada por bucles

LAMP es una técnica, fácil de realizar debido a que sus principios son sencillos, requiere un personal semi-calificado. La reacción se lleva a cabo con rapidez y eficiencia en un solo paso, por lo tanto, constituye una herramienta ideal para la detección de patógenos (Tomita *et al.*, 2008).

4.3.2.3.1. Componentes de LAMP

Este método utiliza 4- 6 cebadores especialmente diseñados para seis a ocho regiones en un gen de interés. Son primer Forward interno (FIP), primer Forward externo (F3), primer reverse interno (BIP), primer reverse externo (B3) y dos cebadores bucle opcionales (Notomi *et al.*, 2000; Nagamine *et al.*, 2002). Los cebadores son diseñados de forma manual o mediante el uso de softwares de diseño de primer LAMP disponibles en Internet (Oligo 7,6 Primer Analysis Software). En la figura 3 se muestran esquemáticamente los primers LAMP, que muestra seis cebadores que se hibridan a ocho regiones de un gen diana; la F3 hibrida con F3c que es la secuencia complementaria en el extremo 3', la FIP consiste de la F2 y F1c ambas se alinean a los complementos F2c y F1, respectivamente, el proceso es similar con los primer reverse. Los primer bucles FLP y BLP se alinean a la región entre el F2c / F1c y B1c / B2c, respectivamente.

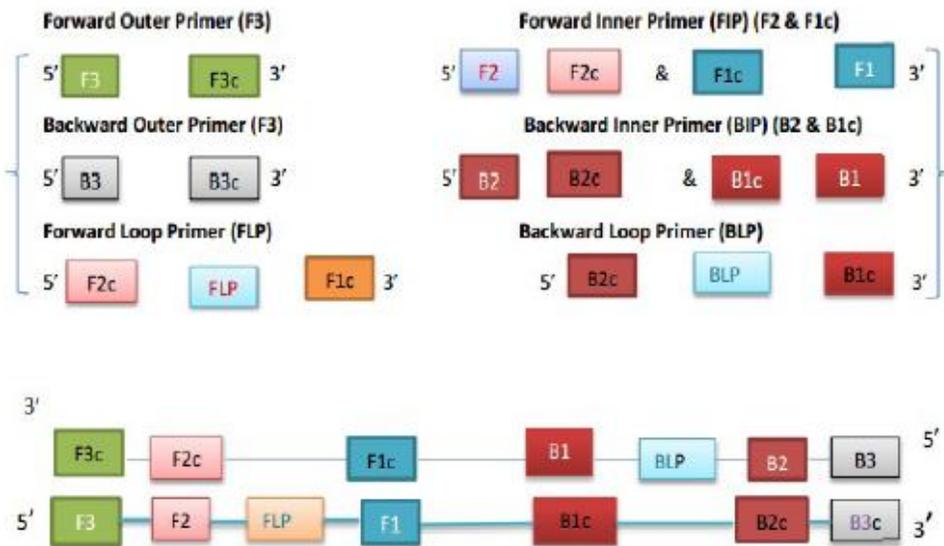


Figura 3. Representación esquemática del Primer LAMP cuando se hibridan a sitios específicos de un gen diana.

Tomado de: Umar *et al.*, 2015

Son dos las enzimas polimerasas adecuadas para la reacción LAMP, la más común es la ADN polimerasa Bst, y la enzima menos comúnmente es la ADN polimerasa Bsm, estas enzimas se obtienen a partir de ***Geobacillus stearothermophilus*** y ***Bacillus smithii*** respectivamente. Las enzimas poseen actividad de desplazamiento de cadena y catalizan la polimerización de ADN 5'-3'. El Bst y la enzima Bsm conservan su actividad enzimática a 66°C y 63°C, respectivamente (Umar *et al.*, 2015; Sánchez *et al.*, 2014; Nagamine *et al.*, 2001); sin embargo, ellas trabajan mejor a 63 ° C y 60 ° C, respectivamente (Dhama *et al.*, 2014).

La betaína se utiliza en la estabilización del contenido de la Adenina- Timina (A-T) y de Guanina-Citocina(G-C), para asegurar la estabilidad de la reacción. Otros componentes incluyen dNTPs, que proporciona los nucleótidos requeridos, MgSO₄ para formar los iones pirofosfato, que se acumulan formando precipitado blanco (Mori *et al.*, 2001; Tomita *et al.*, 2008; y Goto *et al.*, 2009). Se puede añadir tinte de ADN fluorescente para facilitar la visualización de la turbidez resultante de precipitado de iones pirofosfato (Hirayama *et al.*, 2007), algunos de estos colorantes son SYBR Green, HNB, Picogreen. Y además contiene (NH₄)₂SO₄, Tris-HCL con pH 8,8, MgSO₄ y KCl como parte de la mezcla de reacción LAMP (Umar *et al.*, 2015).Otros componentes se muestran en la Figura 4.

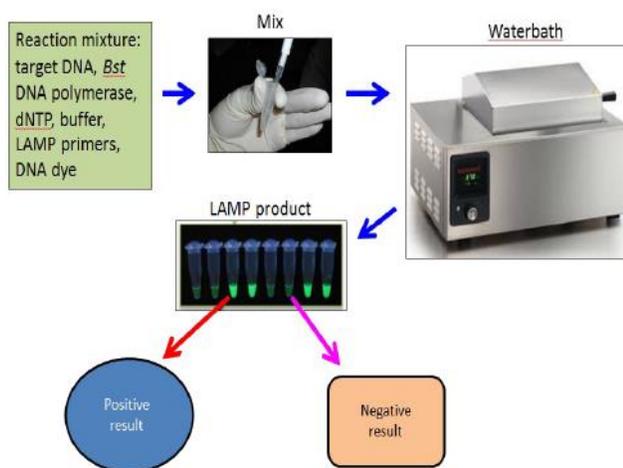


Figura 4. Protocolo de LAMP.

Tomado de: Umar *et al.*, 2015

Para amplificar el DNA blanco, además de los componentes ya mencionados se requieren condiciones isotérmicas, para ello se mezclan los dNTPs, solución

tampón LAMP, betaína (opcional), tinte de ADN fluorescente (opcional) y plantilla de ADN y se incubaba a una temperatura entre 60 °C - 65 °C/60 min, excluyendo la etapa de extracción de la plantilla, el proceso tendrá una duración de cerca de una hora utilizando 4 primers para amplificación. Sin embargo, la amplificación con 6 primers que incluye dos cebadores bucle acelera el proceso de reacción, lo que acorta el tiempo de amplificación a aproximadamente 30 minutos. (Nagamine *et al.*, 2002; Sánchez *et al.*, 2014) y utiliza una Bst polimerasa con actividad de desplazamiento de cadena. (Sánchez *et al.*, 2014).

Después de la incubación de la mezcla de reacción, el resultado se detecta inmediatamente sin ningún paso adicional. Esto se logra mediante la visualización a simple vista de la turbidez resultante de una reacción positiva. Además la visualización de LAMP se puede simplificar mediante la adición de tinte de ADN para mejorar la visibilidad de la turbidez.; SYBR green sólo se pueden añadir después de que se completa la reacción (Umar *et al.*, 2015).

4.3.2.3.2. Principio de amplificación isotérmica mediada por bucles

LAMP utiliza una enzima polimerasa de ADN cuya propiedad es la del desplazamiento de la cadena de ADN junto con su propiedad habitual de polimerización. LAMP amplifica el ADN del patógeno al punto de permitir una visualización directa de la reacción, por la liberación de pirofosfatos que causan turbidez.

La amplificación por medio de LAMP también puede ser cuantitativa y depende del desplazamiento de la cadena por realizado por la ADN polimerasa. La efectividad de LAMP se basa en el diseño de primers o cebadores que deben ser muy específicos. requiere de entre 4 y 6 primers, los primers externos F3 y B3, que hibridan con las regiones externas de la secuencia diana, mientras que los internos FIP y BIP poseen secuencias en ambos sentidos que permiten la formación de un bucle. Los primers se diseñan de manera que puedan reconocer 8 regiones diana que permiten dar especificidad al método. El uso de una enzima termoestable la hace una técnica amigable. Las enzimas con capacidad recomendada son Bst polimerasa aislada de *Geobacillus stearothermophilus* cuya actividad enzimática es de 66°C. Estas enzimas tienen actividad similar a la helicasa por lo que es capaz de abrir la cadena de ADN a una temperatura óptima entre 60 y 65°C, desnaturizándose a temperaturas por encima de 70°C. Estas características hacen que sea útil en la amplificación isotérmica ya que no requieren el paso de 90°C requerido para desnaturizar el ADN como el caso de la PCR convencional

Funciona bajo un principio de amplificación, que implica dos pasos básicos: Fase no cíclica y cíclica. La no cíclica precede a la fase cíclica. Los cuatro cebadores, ADN polimerasa Bst con una actividad de desplazamiento de cadena, juegan un

papel en esta primera etapa de la reacción LAMP. Sin embargo, el paso cíclico se basa en el producto del no cíclico que sólo implica los dos cebadores externos y la enzima ADN polimerasa Bst. cebadores bucle están involucrados en el paso cíclico cuando seis cebadores son usados (Nagamine *et al.*, 2002; Umar *et al.*, 2015).

La fase no cíclica comienza con el alineamiento del primer forward interior (FIP) a una secuencia complementaria en el extremo 5' del ADN de doble cadena, la extensión desde el punto del alineamiento se produce a raíz de la actividad de la ADN polimerasa Bst produciendo una longitud completa de una cadena complementaria al ADN diana. El cebador externo Forward (F3) después se hibrida a la región F3c fuera de la FIP, iniciando el desplazamiento de la hebra de ADN recién formada, como resultado se obtiene ADN de cadena sencilla con una forma de bucle en el extremo 5' (Umar *et al.*, 2015). El primer reverse Interior (BIP) usa el ADN monocatenario desplazado con una forma de bucle en el extremo 5' como plantilla, luego se hibrida con una secuencia complementaria a la región B2c de esta nueva cadena de ADN y posteriormente es extendida por la Bst DNA polimerasa (Notomi *et al.*, 2000; Parida *et al.*, 2008)

La fase cíclica se basa en el producto de la etapa no cíclica. Esta fase consiste básicamente en la hibridación de los cebadores internos al producto tallo bucle de la etapa no cíclica para iniciar la síntesis de ADN de desplazamiento. En última instancia, los productos finales de esta fase son ADN bucle-tallo con varias repeticiones de los dianas, y con forma de coliflor (Ushikubo, 2004; Umar *et al.*, 2015)

Su principal ventaja frente a la PCR es que no requiere termociclador y en su lugar usa baño de maría o bloque de calor de laboratorio. Los productos de amplificación tienen estructuras de distintos tamaños que consisten en repeticiones invertidas de la secuencia diana en gran cantidad. Es decir La amplificación isotérmica mediada por bucles, es más específica, rápida y sencilla de realizar que la PCR. (Noboru *et al.*, 2015). Además, debido a que el método LAMP sintetiza una gran cantidad de ADN, los productos se pueden detectar por simple turbidez. Por lo tanto un equipo costoso, no es necesario para dar un alto nivel de precisión, equivalente o mayor, en comparación con técnicas de PCR.

La bioluminiscencia se utiliza para detectar la amplificación. Los resultados positivos presuntivos se informan en tiempo real mientras que los resultados negativos se muestran después de que el análisis se ha completado. El equipo ofrece un solo paso de enriquecimiento y transferencia mínima posterior al enriquecimiento, lo que hace que la prueba de patógenos sea más simple y más rápida (Centro 3M, 2012).

5. METODOLOGIA

5.1. ÁREA DE ESTUDIO

Este estudio se llevó a cabo en el Cuarto 4, laboratorio de patógenos del departamento de microbiología, de TECNIMICRO Laboratorio de Análisis S.A.S, de la ciudad de Medellín.

A continuación se describe la metodología realizada para la detección molecular de ***Listeria monocytogenes*** y ***Salmonella*** spp. con el sistema 3M.

5.2. MUESTREO

Las muestras de alimentos estudiadas en este trabajo fueron tomadas en distintos supermercados ubicados el municipio de Medellín, Departamento de Antioquia.

Se desarrolló un método de muestreo aleatorio simple manualmente, teniendo en cuenta las medidas de higiene y asepsia necesarias. Para la toma de las muestras se dispuso de bolsas plásticas estériles. Después de recolectadas las muestras, estas se transportaron al cuarto de siembra en neveras portátiles a temperatura de refrigeración (4°C), y se conservaron a esta temperatura hasta su uso. Su análisis se realizó en un lapso de tiempo inferior a las 24 horas para conservar la confiabilidad de los resultados (Kudo *et al.*, 2005).

Como primer paso se realizó la preparación de la muestra para determinar la presencia de ***Salmonella*** Typhimurium. ATCC 14028 y ***Listeria monocytogenes*** ATCC 13932 en quesos, carnes cocidas.

5.3. ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO

5.3.1. Aseguramiento de las condiciones previas de los ensayos.

TECNIMICRO Laboratorio de Análisis S.A.S, dentro de su plan de control de calidad realiza controles estrictos de las condiciones requeridas para realizar los ensayos como es el control de los medios de cultivo, las condiciones ambientales, los instrumentos de ensayo empleados, la capacitación y entrenamiento de los analistas.

Para la detección de los patógenos de interés en este estudio, ***Salmonella*** Typhimurium y ***Listeria monocytogenes***, se empleó sistema de detección Molecular 3M™ fabricado por la empresa 3M. Descrito como el método principal de

screening en el Manual de Análisis Bacteriológico (BAM, por sus siglas en inglés) de la administración de drogas y alimentos Food and Drug Administration (FDA, por sus siglas en inglés). Este sistema permite tener resultados en menos de 24 horas.



Figura 5. Kit 3M™ para la detección molecular de *Salmonella* spp. y *Listeria monocytogenes*

5.3.2. Referencias de procedimientos e instructivos utilizados durante la verificación

La verificación se realizó con 80 muestras sin realizar más replicas, siguiendo las indicaciones dadas en el procedimiento validación de métodos analíticos microbiológico (PD-GS-4.006).

Se partió de una concentración Mc Farland de 3.0×10^8 comparada visualmente con la suspensión de Cl₂Ba 1% (0.1) y SO₄H₂ 1% (9.9ml). Se empleó el equipo automatizado Densichek y realizando diluciones seriadas tomando 1 ml y transfiriendo a 9 ml de solución salina hasta obtener una concentración de 1×10^1 para los dos microorganismos a estudiar, que procedió a inocularse en muestras inocuas para *Listeria monocytogenes* ATCC 13932 y *Salmonella* Typhimurium ATCC 14028.

Los datos primarios de cada uno de los pasos realizados y datos obtenidos de la verificación se consignan en la hoja de trabajo PD-GS-4.006-F02 (Centro 3M).

5.4. DETERMINACIÓN DE CEPAS INOCULADAS

5.4.1. *Listeria monocytogenes* ATCC 13932 por el sistema 3M

Etapas de preenriquecimiento: 25 gramos de la matriz seleccionada (Cárnico cocido y quesos), fueron transferidas a 225 ml de caldo *Frasser* suplementado con Citrato de amonio férrico. Se incubó a $30^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ por 24 horas con el objetivo de

estabilizar metabólicamente al microorganismo para posteriormente realizar las diluciones seriadas utilizadas en la verificación.

5.4.2. *Salmonella* Typhimurium ATCC 14028 por el sistema 3M

Etapas de pre enriquecimiento: 25 gramos de la matriz seleccionada (Cárnico, queso) fueron transferidas a 225 ml de agua peptona tamponada al 2%. Se incubó por 24 horas a 35°C±1°C con el objetivo de estabilizar metabólicamente al microorganismo para posteriormente realizar las diluciones seriadas utilizadas en la verificación (Centro 3M, 2012).

5.5. COMPROBACIÓN DEL MÉTODO 3M PARA LA IDENTIFICACIÓN CUALITATIVA MOLECULAR

5.5.1. PREPARACIÓN DEL EQUIPO DE DETECCIÓN MOLECULAR 3M™

- 5.5.1.1. Se inició el Software de Detección Molecular 3M™ e inició la sesión.
- 5.5.1.2. Se encendió el Equipo de Detección Molecular 3M.
- 5.5.1.3. Luego se creó una corrida con datos para cada muestra.

NOTA: El Equipo de Detección Molecular 3M alcanzó y mantuvo una temperatura de 60 °C antes de insertar la Bandeja de Carga Rápida para el Sistema de Detección Molecular 3M con los tubos de reacción. Este paso de calentamiento llevó unos 20 minutos y apareció indicado por una luz ANARANJADA en la barra de estado del equipo. Una vez que el equipo estuvo listo para iniciar una corrida, la barra de estado se cambió a color VERDE.

5.5.2. LISIS

- 5.5.2.1. Se calentaron los tubos de Solución para la Lisis (LS) colocando la gradilla a temperatura ambiente (20 a 25 °C) durante la noche (16 a 18 horas). Las alternativas para que los tubos de LS alcanzaran temperatura ambiente fueron colocar los tubos LS sobre la mesa de laboratorio durante por lo menos 2 horas, incubar los tubos LS en una incubadora a 37 ± 1 °C durante 1 hora o colocarlos en una unidad de calentamiento de dos bloques durante 30 a 100 °C.
- 5.5.2.2. Se Invertieron los tubos tapados para mezclarlos, 4 horas antes de su uso.
- 5.5.2.3. Se retiró el caldo de enriquecimiento de la incubadora.

5.5.2.4. Luego se utilizó un tubo de LS para cada muestra y la muestra de Control Negativo (NC) (medio de enriquecimiento estéril).

5.5.2.4.1. Después se procedió a cortar las tiras de tubos de LS para obtener la cantidad de tubos de LS deseada. Luego se colocaron los tubos de LS en una gradilla vacía.

5.5.2.4.2. Luego se procedió a transferir la muestra enriquecida a los tubos de LS como se describe a continuación:

Primero, transfiera cada muestra enriquecida a un tubo de LS. Transfiera el NC al final.

5.5.2.4.3. Se utilizó la Herramienta para Encapuchado/Desencapuchado del Sistema de Detección Molecular - Lisis 3M™ para destapar una tira de tubos de LS, una tira por vez.

5.5.2.4.4. Se desechó la tapa del tubo de LS.

5.5.2.4.5. Se transfirió 20 µl de la muestra a un tubo de LS.

5.5.2.5. Cuando fueron transferidas todas las muestras, se transferieron 20 µl de NC (medio de enriquecimiento estéril, por ejemplo, Caldo Demi-Fraser) a un tubo de LS. NOTA: No usar agua como un NC.

5.5.2.6. Se verificó que la temperatura del Bloque de calor para el Sistema de Detección Molecular 3M fuera de 100 ± 1 °C.

5.5.2.7. Luego se colocó la gradilla descubierta de tubos de LS en el Bloque de calor para el Sistema de Detección Molecular 3M y se calentó durante 15 ± 1 minutos. Durante el calentamiento, la solución de LS cambió de rosado (frío) a amarillo (calor).

NOTA: Las muestras que no se hayan tratado debidamente con calor durante el paso de lisis del ensayo pueden considerarse un posible riesgo biológico y NO deben introducirse en el Equipo de Detección Molecular 3M.

5.5.2.8. Se retiró la gradilla descubierta de tubos de LS del bloque de calentamiento y se dejó enfriar en la Inserción del Bloque de Frío para el Sistema de Detección Molecular 3M al menos durante 5 minutos y por un máximo de 10 minutos.

NOTA: Cuando se usa Inserción del Bloque de Frío para el Sistema de Detección Molecular 3M a temperatura ambiente sin la Bandeja para el Bloque de Frío del Sistema de Detección Molecular, debe colocarse directamente sobre el banco de laboratorio. Cuando esté frío, la solución para la lisis volverá a un color rosado.

5.5.2.9. Se retiró la gradilla de tubos de LS de la Inserción del Bloque de Frío para el Sistema de Detección Molecular 3M.

5.5.3. AMPLIFICACIÓN DEL GEN *inv A* EN *Salmonella* Thyphimurium ATCC 14028 y DEL GEN *iap* EN *Listeria monocytogenes*.

- 5.5.3.1. Se tomó un tubo de reactivo para cada muestra y el NC.
- 5.5.3.1.1. Se cortaron las tiras de tubos de reactivo.
- 5.5.3.1.2. Después se colocaron los tubos de reactivo en una gradilla vacía.
- 5.5.3.1.3. Se evitó mover las perlas de reactivo en el fondo de los tubos.
- 5.5.3.2. Se seleccionó 1 tubo de Control de Reactivos (RC) y colocó en la gradilla.
- 5.5.3.3. Luego transferir el lisado a los tubos de reactivo y al tubo de RC como se indica a continuación:

Transfiera cada lisado de muestra a un tubo de reactivo individual primero y luego el NC. Hidrate el tubo de RC al final.

- 5.5.3.4. Se utilizó la Herramienta para Encapuchado/Desencapuchado del Sistema de Detección Molecular - Reactivo 3M™ para destapar una tira de tubos de reactivo, una tira por vez.
- 5.5.3.4.1. Luego se transfirió 20 µl de lisado de muestra en el tubo de LS al tubo de reactivo correspondiente. Después vertirlo en ángulo para evitar que se movieran las perlas y se mezcló pipeteando suavemente hacia arriba y hacia abajo 5 veces.
- 5.5.3.4.2. Se cubrieron los tubos de reactivo con la tapa adicional provista y se utilizó el lado redondeado de la Herramienta para Encapuchado/Desencapuchado del Sistema de Detección Molecular – Reactivo 3M para aplicar presión con un movimiento hacia adelante y hacia atrás para asegurar de que la tapa quedara bien ajustada.
- 5.5.3.4.3. Transferir 20 µl de lisado de NC a un tubo de RC. Vertirlo en ángulo para evitar que se muevan las perlas. Mezcle pipeteando suavemente hacia arriba y hacia abajo 5 veces.
- 5.5.3.6. Después se cargaron los tubos tapados en una Bandeja de Carga Rápida para el Sistema de Detección Molecular 3M limpia y descontaminada.
- 5.5.3.7. Se cerró y trabar la tapa de la Bandeja de Carga Rápida para el Sistema de Detección Molecular 3M.
- 5.5.3.8. Se revisó y confirmó la corrida configurada en el Software de Detección Molecular 3M.
- 5.5.3.9. Se hizo clic en el botón de inicio del software. La tapa del equipo seleccionado se abrirá automáticamente.
- 5.5.3.10. Se Colocó la Bandeja de Carga Rápida para el Sistema de Detección Molecular 3M en el Equipo de Detección Molecular 3M y cerró la tapa para comenzar con el ensayo. Los resultados se obtuvieron al cabo de 75 minutos, aunque los positivos antes.
- 5.5.3.11. Una vez terminado el ensayo, se retiró la bandeja de carga rápida para el Sistema de Detección Molecular 3M del Equipo de Detección Molecular

3M y se desecharon los tubos embebiéndolos en una solución de cloro de uso doméstico del 1 % al 5 % (v:v en agua) durante 1 hora y lejos del área en que se prepara el ensayo.

NOTA: Para minimizar el riesgo de falsos positivos a causa de contaminación cruzada, nunca abra tubos de reactivo que contengan ADN amplificado. Esto incluye tubos de Control de Reactivos, reactivos y control de matriz. Siempre deseche los tubos de reactivo sellados embebiéndolos en una solución de cloro de uso doméstico del 1 % al 5 % (v:v en agua) durante 1 hora y lejos del área en que se prepara el ensayo (Centro 3M, 2012).

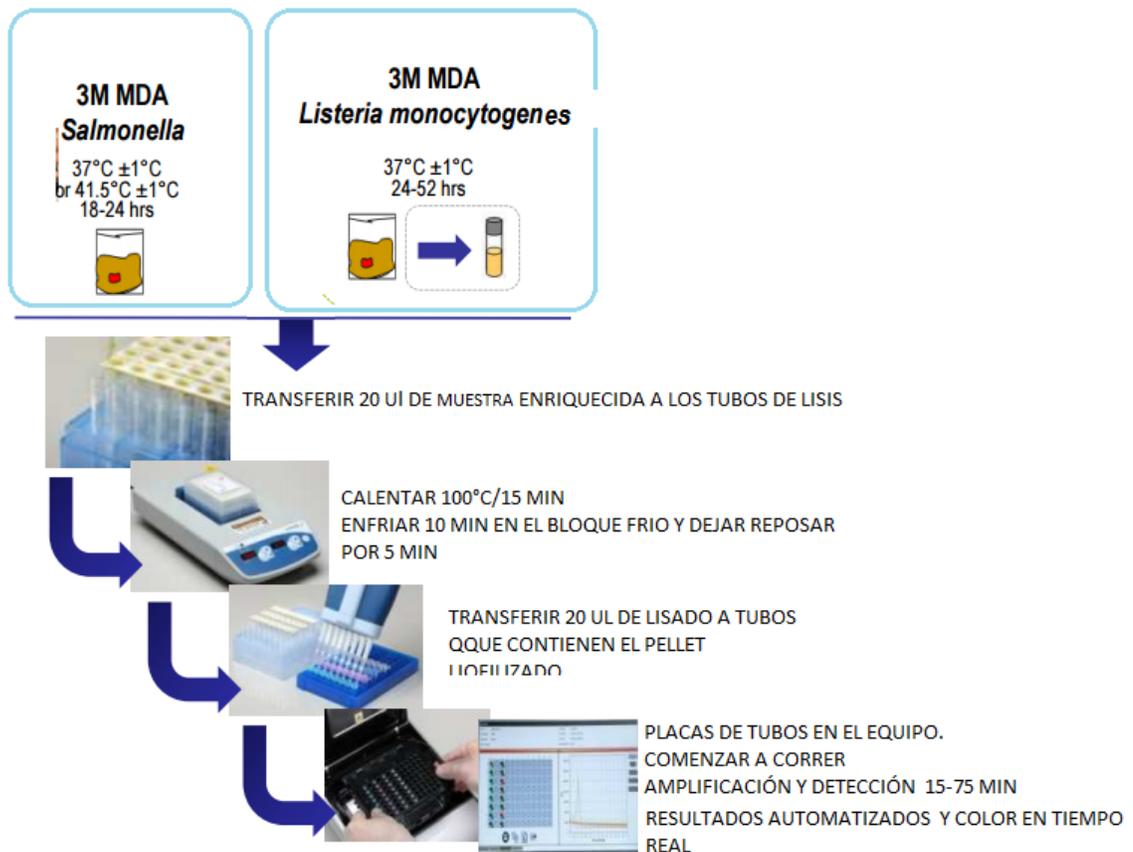


Figura 6. Diagrama general de la metodología empleada para la detección molecular de *Salmonella spp.*, y *Listeria monocytogenes* por el sistema 3M Tomado de: 3M center, 2012

5.6. OTRAS ACTIVIDADES COMPLEMENTARIAS.

Durante el desarrollo de la pasantía se realizaron tareas rutinarias como la lectura de los análisis microbiológicos realizados a todas las muestras procesadas en los cuartos de siembra, procesamiento de muestras, codificación de muestras, observación de las características microscópicas y macroscópicas de las colonias obtenidas, tipificación a través del vitek, rotulado y procesamiento de muestras alimenticias, de aguas, medicamentos y de cosméticos en el cuarto de siembra, además se llevó a cabo la siembra de muestras para análisis de patógenos en el cuarto destinado para ello (cuarto 4 de patógenos) y descarte de muestras. También se ejecutaron jornadas de limpieza y desinfección de materiales y del laboratorio. Esterilización, preparación de medios y materiales, igualmente se desarrollaron informes, y funciones de analista.

6. CRONOGRAMA DE ACTIVIDADES

Tabla 3. Cronograma de actividades

Actividades/Semana		Julio				Agosto				Septiembre				Octubre				Noviembre				Diciembre		
		1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3
1.	Presentación e inducción																							
2.	Elección del tema																							
3.	Planteamiento de los objetivos																							
4.	Revisión Bibliográfica																							
5.	Diseño metodológico																							
6.	Cronograma de Actividades																							
7.	Resultados																							
9.	Análisis de Resultados																							
10.	Escritura del trabajo de grado																							
11.	Entrega del trabajo																							
12.	Sustentación del trabajo final																							
13.	Tareas de rutina:	Lectura, codificación de muestras, tipificación través en el vitek, rotulado y procesamiento de muestras alimenticias, de aguas, y de cosméticos, esterilidades de medicamentos, siembra de patógenos, descarte, desarrollo de informes.																						

7. RESULTADOS Y ANÁLISIS

En este estudio se llevó a cabo la verificación del método cualitativo MDS 3M™ en matrices alimentarias para la detección de *Listeria monocytogenes* ATCC 13932 y *Salmonella* Typhimurium ATCC 14028.

7.1. DETERMINACIÓN DE LAS CEPAS

Por su parte, como resultado del análisis microbiológico realizado por el método de amplificación isotérmica mediada por bucles por el equipo 3M™, se determinó el crecimiento de *Listeria monocytogenes* ATCC 13932 en cárnicos cocidos y quesos, por lo que este resultado fue reportado como ausencia/ presencia (Albarracin *et al.*, 2006). En la Tabla 4 se presentan los resultados arrojados por el equipo 3M™ para la detección de *Listeria monocytogenes* ATCC 13932 en alimentos cárnico cocidos y quesos.

Tabla 4. Detección de *Listeria monocytogenes* ATCC 13932 en alimentos cárnicos y quesos a concentración de 10².

RESULTADOS OBTENIDOS A CONCENTRACION DE 10 ² (30-300 UFC)					
Id. Pozo	Id. Muestra	Ensayo	Tipo de pozo	Número de lote de kit	Resultado
A1	C10(2)_1	<i>L. monocytogenes</i> -2	Muestra	2016-04 FB	-
B1	C10(2)_2	<i>L. monocytogenes</i> -2	Muestra	2016-04 FB	+
C7	C10(2)_3	<i>L. monocytogenes</i> -2	Muestra	2016-04 FB	+
D1	C10(2)_4	<i>L. monocytogenes</i> -2	Muestra	2016-04 FB	+
E1	C10(2)_5	<i>L. monocytogenes</i> -2	Muestra	2016-04 FB	+
F1	C10(2)_6	<i>L. monocytogenes</i> -2	Muestra	2016-04 FB	+
G7	C10(2)_7	<i>L. monocytogenes</i> -2	Muestra	2016-04 FB	+
H1	C10(2)_8	<i>L. monocytogenes</i> -2	Muestra	2016-04 FB	+
A	C10(2)_9	<i>L. monocytogenes</i> -2	Muestra	2016-04 FB	+

B2	C10(2)_10	<i>L. monocytogenes</i> -2	Muestra	2016-04 FB	+
E3	AP10(2)_1	<i>L. monocytogenes</i> -2	Muestra	2016-04 FB	+
F9	AP10(2)_2	<i>L. monocytogenes</i> -2	Muestra	2016-04 FB	+
G9	AP10(2)_3	<i>L. monocytogenes</i> -2	Muestra	2016-04 FB	+
H3	AP10(2)_4	<i>L. monocytogenes</i> -2	Muestra	2016-04 FB	+
A4	AP10(2)_5	<i>L. monocytogenes</i> -2	Muestra	2016-04 FB	+
B4	AP10(2)_6	<i>L. monocytogenes</i> -2	Muestra	2016-04 FB	-
C4	AP10(2)_7	<i>L. monocytogenes</i> -2	Muestra	2016-04 FB	+
D4	AP10(2)_8	<i>L. monocytogenes</i> -2	Muestra	2016-04 FB	+
E4	AP10(2)_9	<i>L. monocytogenes</i> -2	Muestra	2016-04 FB	+
F4	AP10(2)_1 0	<i>L. monocytogenes</i> -2	Muestra	2016-04 FB	+

C (cárnicos cocidos), AP (quesos), + (Presencia), - (ausencia).

En la tabla 4 puede observarse que el equipo detectó la presencia de *Listeria monocytogenes* ATCC 13932 en una concentración de 10^2 en todas las muestras excepto en dos, un queso y una carne (AP10(2)_6 y C10(2)_1). Los resultados sugieren que la concentración permite detectar la presencia de *Listeria monocytogenes* ATCC 13932, pero que se requiere sumo cuidado al momento de realizar la preparación y montaje en el equipo de detección molecular 3M™ que pueden afectar los resultados. En el anexo 3 se muestra un ejemplo de la gráfica de una muestra positiva y negativa obtenida durante la elaboración de este estudio.

Con respecto a los análisis para la detección de *Listeria monocytogenes* ATCC 13932 de las concentraciones 10^2 en cárnicos y lácteos (Tabla 4) los resultados obtenidos muestran que el método a la concentración evaluada fue un 90% Coherente. Siendo el 10% de no coherencia de los resultados obtenidos en la detección de *Listeria monocytogenes* ATCC 13932 asociados con la incertidumbre y no con el equipo, dado que estudios han demostrado la sensibilidad y especificidad de este (Yang y Benedetto, 2013; Eggink, 2012).

Tabla 5. Matriz 2X2 con una concentración de 10^2 .

RESULTADOS DEL ENSAYO A VALIDAR	Resultado asignado POSITIVO*	Resultado asignado NEGATIVO*	TOTAL
Positivo	90%(18/20)	10%(2/20)	100
Negativo	0%(0/10)	0% (0/10)	0
TOTAL	90	10	100%

Para obtener resultados de la coherencia de los ensayos se empleó una matriz 2x2, que en este caso permitió obtener como resultado una coherencia del 90% del método MDS 3M para una concentración de 10^2 . Como puede observarse en la tabla 4, dos de las veinte muestras no fueron detectadas por el equipo, contrario al 100% de coherencia que se esperaba con la detección de todas las 20 muestras como positivas. Las posibles causas de estos datos no coherentes son atribuibles a los posibles errores que se pueden cometer cuando se emplea este método los cuales se detallan más adelante en el análisis.

Las fuentes de error encontradas según **AOAC 2016.08 Ed 19** para la detección de estos microorganismos son las siguientes: Homogenización de las diluciones, variaciones en el pesaje de la muestra, variaciones en los volúmenes utilizados para el acondicionamiento de la muestra, variaciones en los tiempos transcurridos entre homogenización y siembra, variaciones en el tiempo de incubación de la muestra, variaciones en la temperatura de incubación de la muestra, variaciones en la temperatura de lisado de muestra, presencia de inhibidores variaciones en el pipeteado de las muestras y exactitud de los equipos utilizados durante el ensayo (AOAC, 2016).

El tiempo de incubación es un factor importante en la detección de microorganismos sobre todo si las células se encuentran heridas por métodos que buscan su conservación, como lo son los tratamientos térmicos, el uso de ácidos y de desinfectantes. Porque dependiendo del periodo de incubación las células lesionadas presentes pueden crecer hasta el límite de detección de MDM 3M™ y ser detectadas como positivas. (Bunduki *et al.*, 1995) anunciaron la relevancia que tiene el tiempo de incubación para la reparación de las células de *L. monocytogenes* lesionadas. Siendo menor el intervalo de tiempo que las células lesionadas por calor necesitaron (5 h) en comparación al tiempo de las células lesionadas por desinfectantes (14 h). De forma similar Liao y Fett, (2005) dieron a conocer que la extensión de la herida y el medio de enriquecimiento o pre-

enriquecimiento influyen en la recuperación de las lesiones **Salmonella** Typhimurium ATCC 14028 dañadas, mostrando una recuperación más rápida las células lesionadas con ácidos cultivadas en caldo universal de pre-enriquecimiento (UPB) que en agua de peptona tamponada (BPO) o en caldo lactosa (LB).

Tabla 6. Detección de **Listeria monocytogenes** ATCC 13932 en alimentos cárnicos y lácteos a concentración de 10^1 .

RESULTADOS OBTENIDOS A CONCENTRACION DE 10^1 (1-30 UFC)					
Id. Pozo	Id. Muestra	Ensayo	Tipo de pozo	Número de lote de kit	Resultado
A1	C10(1)_1	<i>L. monocytogenes</i> - 2	Muestra	2016-04 FB	+
B1	C10(1)_2	<i>L. monocytogenes</i> - 2	Muestra	2016-04 FB	+
C1	C10(1)_3	<i>L. monocytogenes</i> - 2	Muestra	2016-04 FB	+
D1	C10(1)_4	<i>L. monocytogenes</i> - 2	Muestra	2016-04 FB	+
E1	C10(1)_5	<i>L. monocytogenes</i> - 2	Muestra	2016-04 FB	+
F1	C10(1)_6	<i>L. monocytogenes</i> - 2	Muestra	2016-04 FB	+
G1	C10(1)_7	<i>L. monocytogenes</i> - 2	Muestra	2016-04 FB	+
A2	AP10(1)_1	<i>L. monocytogenes</i> - 2	Muestra	2016-04 FB	+
B2	AP10(1)_2	<i>L. monocytogenes</i> - 2	Muestra	2016-04 FB	+
C2	AP10(1)_3	<i>L. monocytogenes</i> - 2	Muestra	2016-04 FB	+
D2	AP10(1)_4	<i>L. monocytogenes</i> - 2	Muestra	2016-04 FB	+
E2	AP10(1)_5	<i>L. monocytogenes</i> - 2	Muestra	2016-04 FB	+
F2	AP10(1)_6	<i>L. monocytogenes</i> - 2	Muestra	2016-04 FB	+
G2	AP10(1)_7	<i>L. monocytogenes</i> - 2	Muestra	2016-04 FB	+

C (cárnicos cocidos), AP (quesos), + (Presencia), - (ausencia).

En la tabla 6 puede observarse que el equipo MDS de 3M, detectó la presencia de ***Listeria monocytogenes*** ATCC 13932. en una concentración de 10^1 previamente inoculada en todas las muestras de queso y carne. Los resultados sugieren que la concentración permite detectar la presencia de ***Listeria monocytogenes*** ATCC 13932. Las gráficas individuales de cada resultado se muestran por separado en el anexo 4.

A continuación se muestran los resultados arrojados por el Software de Detección Molecular 3M

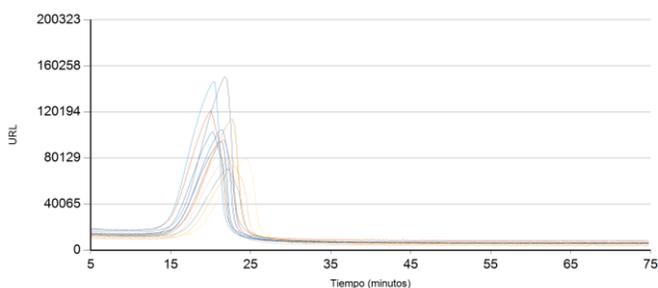


Figura 7. Gráfica general de los resultados arrojados por el Software de Detección Molecular 3M de ***L.monocytogenes*** ATCC 13932.

En la figura 7, se puede observar que la detección de ***L. monocytogenes*** ATCC 13932, se lleva a cabo a partir del minuto 15, y la detección en todas las muestras se obtiene a los 25 minutos después de iniciada el corrido del equipo. La presencia de una curva indicó la detección de este microorganismo en cada una las muestras.

Tabla 7. Matriz 2X2 con una concentración de 10^1 .

RESULTADOS DEL ENSAYO A VALIDAR	Resultado asignado POSITIVO*	Resultado asignado NEGATIVO*	TOTAL
Positivo	100%(20/20)	0%(0/20)	100
Negativo	0%(0/10)	0% (0/10)	0
TOTAL	100	0	100%

De acuerdo a los resultados obtenidos en la tabla 7, se puede verificar que el método a la concentración evaluada 10^1 fue un 100% Coherente, con cero muestras negativas para la detección en MDS 3M™.

Tabla 8. Detección de *Listeria monocytogenes* ATCC 13932 y *Salmonella* Typhimurium ATCC 14028 en alimentos cárnicos y lácteos sin inocular.

Numero de muestras	Ensayo	Tipo de pozo	Número de lote de kit	Resultado
10	<i>L. monocytogenes</i> -2	Muestra	2016-04 FB	-
10	<i>Salmonella</i> -2	Muestra	2016-07 HB	-

C (cárnico), AP(quesos).

En esta tabla, se analizaron las muestras de carne y queso sin inocular las concentraciones 10^1 y 10^2 de *Salmonella* Typhimurium ATCC 14028 y *Listeria monocytogenes*. ATCC 13932, obteniendo resultados negativos en las veinte muestras en estudio.

Las muestras de control no fueron inoculadas durante el ensayo con cargas microbianas de *Listeria monocytogenes* ATCC 13932 y *Salmonella* Typhimurium ATCC 14028 y como resultado en su detección fueron todas negativas (Tabla 8). De acuerdo con los resultados obtenidos se puede verificar que el método a la concentración evaluada fue un 100% coherente, lo que coincide con los resultados para la detección de *Listeria monocytogenes* y *Salmonella* spp. obtenidos en estudios previos (Yang y Benedetto, 2013; Eggink, 2012).

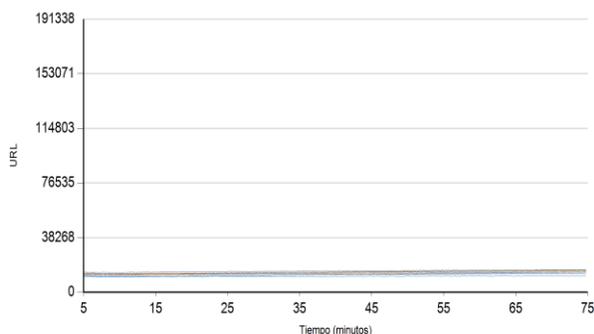


Figura 8. Gráfica general de los resultados arrojados por el Software de Detección Molecular 3M™ sin inocular.

Las líneas rectas observadas en la figura 8, indican que no se pudo detectar *Salmonella* Typhimurium ATCC 14028 ni *Listeria monocytogenes* ATCC 13932, pues las muestras no contenían carga microbiana de estos patógenos,

porque las matrices que se emplearon para los ensayos se encontraban libres según los reportes obtenidos por otros métodos de análisis previos en el laboratorio.

Detección de *Salmonella* Typhimurium ATCC 14028

Tabla 9. Resultados obtenidos a concentraciones de 10^1 y 10^2

Id. de pozo	Id. de muestra	Tipo de ensayo	Tipo de pozo	Número de Lote de Kit	Resultado
A1	C10(2)-1	<i>Salmonella-2</i>	Muestra	2016-07 HB	+
B1	C10(2)_2	<i>Salmonella-2</i>	Muestra	2016-07 HB	+
C1	C10(2)_3	<i>Salmonella-2</i>	Muestra	2016-07 HB	+
D1	C10(2)_4	<i>Salmonella-2</i>	Muestra	2016-07 HB	+
E1	C10(2)_5	<i>Salmonella-2</i>	Muestra	2016-07 HB	+
F1	C10(2)_6	<i>Salmonella-2</i>	Muestra	2016-07 HB	+
G1	C10(2)_7	<i>Salmonella-2</i>	Muestra	2016-07 HB	+
H1	C10(2)_8	<i>Salmonella-2</i>	Muestra	2016-07 HB	+
A2	C10(2)_9	<i>Salmonella-2</i>	Muestra	2016-07 HB	+
B2	C10(2)_10	<i>Salmonella-2</i>	Muestra	2016-07 HB	+
C2	c10(1)_1	<i>Salmonella-2</i>	Muestra	2016-07 HB	+
D2	c10(1)_2	<i>Salmonella-2</i>	Muestra	2016-07 HB	+
E2	c10(1)_3	<i>Salmonella-2</i>	Muestra	2016-07 HB	+
F2	c10(1)_4	<i>Salmonella-2</i>	Muestra	2016-07 HB	+
G2	c10(1)_5	<i>Salmonella-2</i>	Muestra	2016-07 HB	+
H2	c10(1)_6	<i>Salmonella-2</i>	Muestra	2016-07 HB	+
A3	c10(1)_7	<i>Salmonella-2</i>	Muestra	2016-07 HB	+
B3	c10(1)_8	<i>Salmonella-2</i>	Muestra	2016-07 HB	+
C3	c10(1)_9	<i>Salmonella-2</i>	Muestra	2016-07 HB	+
D3	c10(1)_10	<i>Salmonella-2</i>	Muestra	2016-07 HB	+
E3	AP10(2)_1	<i>Salmonella-2</i>	Muestra	2016-07 HB	+
F3	AP10(2)_2	<i>Salmonella-2</i>	Muestra	2016-07 HB	+
G3	AP10(2)_3	<i>Salmonella-2</i>	Muestra	2016-07 HB	+
H3	AP10(2)_4	<i>Salmonella-2</i>	Muestra	2016-07 HB	+
A4	AP10(2)_5	<i>Salmonella-2</i>	Muestra	2016-07 HB	+
B4	AP10(2)_6	<i>Salmonella-2</i>	Muestra	2016-07 HB	+
C4	AP10(2)_7	<i>Salmonella-2</i>	Muestra	2016-07 HB	+
D4	AP10(2)_8	<i>Salmonella-2</i>	Muestra	2016-07 HB	+
E4	AP10(2)_9	<i>Salmonella-2</i>	Muestra	2016-07 HB	+
F4	AP10(2)_10	<i>Salmonella-2</i>	Muestra	2016-07 HB	+

G4	G4 AP10(1)_1	<i>Salmonella-2</i>	Muestra	2016-07 HB	+
H4	G4 AP10(1)_2	<i>Salmonella-2</i>	Muestra	2016-07 HB	+
A5	G4 AP10(1)_3	<i>Salmonella-2</i>	Muestra	2016-07 HB	+
B5	G4 AP10(1)_4	<i>Salmonella-2</i>	Muestra	2016-07 HB	+
C5	G4 AP10(1)_5	<i>Salmonella-2</i>	Muestra	2016-07 HB	+
D5	G4 AP10(1)_6	<i>Salmonella-2</i>	Muestra	2016-07 HB	+
E5	G4 AP10(1)_7	<i>Salmonella-2</i>	Muestra	2016-07 HB	+
F5	G4 AP10(1)_8	<i>Salmonella-2</i>	Muestra	2016-07 HB	+
G5	G4 AP10(1)_9	<i>Salmonella-2</i>	Muestra	2016-07 HB	+
H5	G4 AP10(1)_10	<i>Salmonella-2</i>	Muestra	2016-07 HB	+

C (cárnico a [10^2]), c (cárnico [10^1]), AP (queso [10^1]), G4 AP (queso [10^2]), +(presencia).

En la tabla 9 puede observarse que el equipo MDS de 3M™, detectó la presencia de *Salmonella* Typhimurium ATCC 14028 en concentraciones de 10^1 y 10^2 previamente inoculadas en todas las muestras de queso y carne. Los resultados sugieren que las concentraciones permiten detectar la presencia de *Salmonella* Typhimurium ATCC 14028.

Los resultados obtenidos a la concentración evaluada 10^1 para la detección de *Listeria monocytogenes* (Tabla 6) muestran que respecto a esta concentración el método fue un 100% coherente. Con relación a los análisis para la detección de *Salmonella* Typhimurium de las concentraciones 10^1 y 10^2 en cárnicos y lácteos (Tabla 9) los resultados obtenidos muestran que el método a la concentración evaluada también fue un 100% coherente para ambas concentraciones, lo que indica que el método presenta una sensibilidad parcial en la detección de estos microorganismos, coincidiendo con lo planteado por Yang y colaboradores en el 2013, quienes en un estudio colaborativo de múltiples laboratorios encontraron el equipo 3M™ como un método confiable y preciso en varias matrices de alimentos sin ninguna diferencia estadística significativa entre 3M™ y métodos de referencia aplicados, que indicaron aproximadamente el 100% sensibilidad de MDM 3M™ (Yang y Benedetto, 2013; Eggink, 2012).

Los Iones Pirofosfato (IPP), que se forman como resultado de la reacción de amplificación de ADN diana y APS, se convierte gracias a la ATP sulfúrilasa en ATP, este ATP formado reacciona con la enzima luciferasa para producir luz que es detectada por el equipo, indicando de esta manera la presencia del ADN del organismo objetivo.

Los microorganismos analizados se detectan exitosamente gracias a la capacidad de amplificar secuencias diana que presenta la técnica LAMP, lo que permite una

detección altamente sensible de patógenos tales como *Listeria monocytogenes* y *Salmonella Typhimurium*, debido al diseño de primers muy específicos que pueden reconocer 8 regiones diana. (Parida *et al.*, 2008). Garantizándose de esta forma que la luminiscencia producida indica la presencia del gen blanco, porque se ha observado que la detección de la fluorescencia es concordante con la detección de la turbidez del precipitado que es un subproducto de color blanco formada de pirofosfato de magnesio que se genera en tiempo real durante el transcurso de la prueba (Imai *et al.*, 2006). Todas las células vivas contienen ATP, que se degrada muy rápidamente mediante autólisis al morir las células. En presencia de la enzima luciferasa y el sustrato luciferina (procedentes de la luciérnaga), oxígeno y magnesio, el ATP facilita el paso de la luciferina a oxiluciferina, generándose luz (bioluminiscencia) que puede ser detectada en el equipo. La cantidad de luz emitida en esta reacción es directamente proporcional a la cantidad de ATP presente en la muestra, es decir, al número de células vivas, y está correlacionada con la biomasa celular (la cantidad de ATP de 1 UFC oscila entre 0,22 y 1,03 fg, es decir la curva mostrada por el equipo en tiempo real es proporcional a la cantidad de ADN amplificado (Fung *et al.*, 2000; Han *et al.*, 2007).

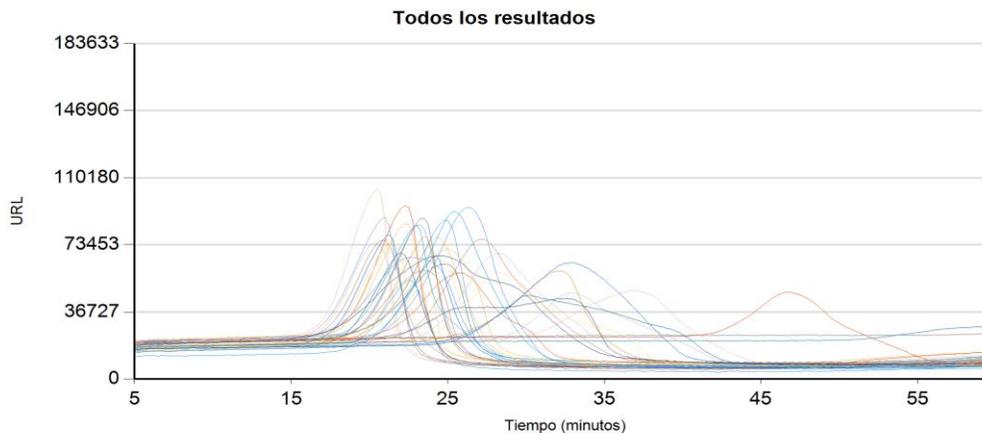


Figura 9. Gráfica general de los resultados arrojados por el Software de detección Molecular 3M.

Como se refleja en la figura, todas las muestras son positivas para la detección de *Salmonella Typhimurium* ATCC 14028 a las concentraciones 10^1 y 10^2 . En cuanto al tiempo de detección durante el ensayo, éste osciló entre 15-47 minutos, lo que concuerda con el funcionamiento del equipo según el fabricante, quien plantea que la amplificación y detección se producen de forma simultánea y continua durante la fase exponencial para obtener resultados en tiempo real y en un corto plazo de 15-75 minutos (Centro 3M, 2012)

Tabla 10. Matriz 2x2 para cárnico concentración de 10^2

RESULTADOS DEL ENSAYO A VALIDAR	Resultado asignado POSITIVO	Resultado asignado NEGATIVO	TOTAL
Positivo	100% (10/10)	0%(0/10)	100%
Negativo	0%(0/10)	0%(0/10)	0%
TOTAL	100%	0	100%

Se evidencia en esta tabla que el resultado para la concentración 10^2 de **Salmonella** Typhimurium ATCC 14028 en cárnicos fue 100% coherente, pues todos los resultados arrojados por el equipo son positivos.

Tabla 11. Matriz 2x2 para cárnico concentración 10^1

RESULTADOS DEL ENSAYO A VALIDAR	Resultado asignado POSITIVO	Resultado asignado NEGATIVO	TOTAL
Positivo	100% (10/10)	0%(0/10)	100%
Negativo	0%(0/10)	0%(0/10)	0%
TOTAL	100%	0	100%

Se evidencia en la tabla 11, que el resultado para la concentración 10^1 de **Salmonella** Typhimurium ATCC 14028 fue 100% coherente en muestras cárnicas, pues todos los resultados arrojados por el equipo son positivos.

Tabla 12. Matriz 2x2 para quesos concentración 10¹

RESULTADOS DEL ENSAYO A VALIDAR	Resultado asignado POSITIVO	Resultado asignado NEGATIVO	TOTAL
Positivo	100% (10/10)	0%(0/10)	100
Negativo	0%(0/10)	0%(0/10)	0%
TOTAL	100%	0	100%

Se observa en esta tabla que el resultado para la concentración 10¹ de **Salmonella** Typhimurium ATCC 14028 fue 100% coherente, pues todos los resultados arrojados por el equipo son positivos para quesos.

Tabla 13. Matriz 2x2 para quesos a una concentración 10²

RESULTADOS DEL ENSAYO A VALIDAR	Resultado asignado POSITIVO	Resultado asignado NEGATIVO	TOTAL
Positivo	100% (10/10)	0%(0/10)	100
Negativo	0%(0/10)	0%(0/10)	0%
TOTAL	100%	0	100%

Se puede observar en tabla 13, que el resultado para la concentración 10² de **Salmonella** Thiphimurium ATCC 14028 fue 100% coherente, pues todos los resultados arrojados por el equipo son positivos para quesos.

Tabla 14. Sensibilidad del equipo 3M™

VERDADERO POSITIVO	78
FALSO POSITIVO	0
VERDADERO NEGATIVO	0
FALSO NEGATIVO	2
TOTAL	80

En la tabla 14 se detalla el total de muestras positivas y negativas que se obtuvieron a partir de las 80 matrices, de las cuales 40 fueron inoculadas con **Salmonella** spp. ATCC 14028 (20 con concentración 10^1 y 20 con concentración 10^2); y 40 con **Listeria monocytogenes** ATCC 13932 (20 con concentración 10^1 y 20 con concentración 10^2). Las 80 que debieron dar positivas pero solo 78 fueron confirmadas por el equipo MSD y se obtuvieron dos falsos negativos.

CALCULO DE SENSIBILIDAD

Los cálculos realizados para obtener la sensibilidad del ensayo, se realizaron de acuerdo a Bravo y Cruz, (2015).

$$SENSIBILIDAD = \frac{POSITIVO VERDADERO}{POSITIVO VERDADERO + FALSO NEGATIVO} = \frac{78}{78+2} \times 100 = 97.5\%$$

En cuanto a la sensibilidad del método, el 97,5% de sensibilidad obtenido en la detección de **Salmonella** Typhimurium ATCC 14028 y **Listeria monocytogenes** ATCC 13932 en las concentraciones analizadas puede atribuirse entre otras causas a efectos del operador, porque la persona que realizó el experimento, no contó con la debida capacitación sobre el manejo del equipo, que es una de las principales recomendaciones que se hacen por el fabricante, Sin embargo no se realizaron réplicas del ensayo con el mismo y otros analistas para descartar que los operadores influyeron en los resultados del método. Lo que pudo favorecer a un posible error de procedimiento durante el transcurso del estudio realizado (Centro 3M, 2012).

Además otros factores no controlados, como los errores experimentales", también influyen en la variación observada en la sensibilidad, puesto que no se tuvieron en cuenta los tres principios del diseño experimental como son: la aleatorización que permite obtener estimaciones válidas de la varianza del error y fundamenta el uso de los métodos estadísticos en el diseño de los experimentos, además ayuda a cancelar los efectos de los factores extraños, que pudieran estar presentes. La repetición que permite obtener una estimación del error experimental así como calcular una respuesta más precisa del efecto a estudio, entre mayor sea el número de repeticiones mejor será el resultado obtenido en la estimación de la varianza, y en este caso no se hicieron réplicas del ensayo y el ultimo de principio que es el bloqueo, que aumenta la precisión del experimento (Tanco,2008).

Los efectos del operador y la exactitud de los equipos utilizados durante el ensayo afectan de forma directa las variaciones en el pesaje de la muestra, las variaciones en el pipeteado y por ende las variaciones en los volúmenes utilizados para el acondicionamiento de la muestra. Dado que el manual del *Codex Alimentarius* define la exactitud como el grado de concordancia entre el resultado de un ensayo

y el valor real. Si un equipo de trabajo no es exacto, y su operador no está capacitado, los valores de trabajo obtenidos serán inexactos y por lo tanto no serán valores que manejen los criterios de repetibilidad y reproducibilidad. Por lo cual se recomienda que a todos los equipos se les realice un calibración periódica, porque su uso frecuente hace que se descalibren (FAO/OMS, 2015).

Las variaciones en el tiempo de incubación de la muestra, las variaciones en la temperatura de incubación de la muestra y variaciones en los tiempos transcurridos entre homogenización y siembra, pueden afectar la detección de los microorganismos de interés. El tiempo transcurrido entre la homogenización y la siembra es importante, porque si la siembra se hace justo después de homogenizar el caldo se asegura que se está tomando la alícuota de una mezcla uniforme de los microorganismos que crecen en el caldo, y de esta forma se evita tomar el volumen deseado de un sitio donde la concentración sea menor y pueda interferir con el resultado. Las variaciones en la temperatura a que se incuba afectan la velocidad de crecimiento, ya que la temperatura incide en la velocidad de las reacciones enzimáticas entre 1.5 y 2.5 veces al aumentar 10°C la temperatura a la que tienen lugar. Por lo tanto se incubaron a la temperatura óptima de crecimiento de los microorganismos, disminuyendo de esta forma el tiempo de incubación de estos. Este efecto se debe al incremento generalizado de la velocidad de las reacciones enzimáticas con la temperatura. Se denomina coeficiente de temperatura a la relación entre el incremento de la velocidad de reacción y el de temperatura. La falta de crecimiento a temperaturas muy bajas se debe a la reducción de la velocidad de crecimiento por la reducción de la velocidad de reacción y al cambio de estado de los lípidos de la membrana celular que pasan de ser fluidos a cristalinos impidiendo el funcionamiento de la membrana celular (Brock *et al.*, 2003).

8. CONCLUSIONES

Los resultados de este estudio revelaron que el MDA 3M™ es eficaz para la detección de células de ***Salmonella*** Typhimurium ATCC 14028 y ***Listeria monocytogenes*** ATCC 13932 en un tiempo significativamente corto y en muestras contaminadas de forma natural con estos microorganismos. Incluso en presencia de colorantes y carga orgánica, gracias a que es un método altamente específico y sensible para la detección estos. Omitiendo las interferencias que estas variables puedan ocasionar.

El equipo 3M™ demostró ser sensible de forma parcial para la detección e de ***Salmonella*** Typhimurium ATCC 14028 y ***Listeria monocytogenes*** ATCC 13932 en los alimentos empleados.

El equipo de detección Molecular 3M™, con capacidad para 96 pruebas perteneciente al cuarto 4 de patógenos del laboratorio de microbiología de TECNIMICRO Laboratorio De Análisis S.A.S, no presenta problemas en su funcionamiento de amplificación y bioluminiscencia ya que sus mediciones arrojan resultados verdaderos y precisos que conllevan a la determinación de la presencia de ***Salmonella*** Typhimurium ATCC 14028 y ***Listeria monocytogenes*** ATCC 13932 al momento de utilizarlo con diferentes matrices.

9. RECOMENDACIONES

Resulta pertinente la capacitación del personal de laboratorio sobre el manejo y calibración del equipo 3M™ e implementos empleados que permitan disminuir la fuentes de error para confirmar la presencia de ***Salmonella*** Typhimurium ATCC 14028 y ***Listeria monocytogenes*** ATCC 13932 en muestras alimentarias, para que de esta manera se pueda establecer con mayor certeza su detección.

Las células lesionadas que presentan desventaja con la microbiota acompañante, por lo que se debe considerar una etapa de enriquecimiento adicional que le permita recuperarse o realizar una concentración bacteriana por centrifugación que incremente la probabilidad recolectar un mayor número de células y por lo tanto mejorar la sensibilidad del método MDA 3M™.

Se recomienda este método por ser rápido y sensible para la detección de patógenos, para prevenir ETAS y análisis de alimentos, para así disminuir tiempo y costos que estas tienen a nivel de salud e industria al no permitir la liberación de productos al mercado.

Se recomienda realizar réplicas adicionales para disminuir la variabilidad encontrada; así como inocular controles positivos y negativos con otros patógenos para detectar realmente la especificidad de la técnica y realizar recuento para comprobar realmente la carga microbiana inoculada.

Debido a la oportunidad que ofrece MDM 3M™, es necesario evaluar la reproducibilidad, capacidad diagnóstica y realizar un análisis costo-efectivo de MDM 3M™, además se requiere medir la concordancia de MDM 3M™ respecto a los resultados de las pruebas realizadas en otros países, teniendo en cuenta que hasta el momento en Colombia no se conocen estudios al respecto. El desempeño del

protocolo MDM 3M™ debe ser rigurosamente validado con un panel de ADN moldes y preparar diluciones de ellos, evaluando en diferentes matrices alimenticias. Para la validación del método es necesario considerar factores importantes que puedan interferir en el rendimiento analítico de la prueba como lo son: el error técnico, el instrumental, la elección de los reactivos y su calibración, los límites de exactitud y aceptación de los controles de la prueba, los recipientes y formatos de reacción, la calidad del agua, el pH y la ionicidad de los tampones y los diluyentes, las temperaturas de incubación y sus duraciones, y el error introducido por la detección de analitos estrechamente relacionados. Es importante que los reactivos biológicos estén libres de agentes extraños.

10. GLOSARIO

Amplificación: es aumento en el número de copias de un fragmento de ADN particular.

Bioluminiscencia: Producción de luz por parte de un organismo vivo.

Bucle: Es una estructura de ADN en la que las dos cadenas de una molécula de ADN bicatenario están separadas por un tramo y mantenidas aparte de una tercera cadena de ADN. Esta última cadena tiene una secuencia de nucleobases complementaria de una de las dos cadenas principales y se empareja con ella, desplazando así la otra cadena principal.

Especificad: La especificidad se refiere a la propiedad del método de producir una señal medible debida sólo a la presencia del analito, libre de interferencia de otros componentes en la matriz de la muestra.

Exactitud: Es la cercanía del valor analítico al "valor verdadero" de concentración del compuesto de interés en el material bajo examen.

MDS: Sistema de Detección Molecular.

NC: Control negativo.

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) es una técnica que consiste en la amplificación in vitro de un fragmento de ADN específico. Para llevar a cabo el experimento de amplificación es necesario conocer, al menos parcialmente, la secuencia del fragmento a amplificar. Básicamente, se trata de replicar una y otra

vez un mismo fragmento de ADN y, para ello, debemos realizar in vitro lo que hacen las células in vivo para replicar su ADN.

PPI: Iones pirofosfato

Primer: es una cadena de ácido nucleico o de una molécula relacionada que sirve como punto de partida para la replicación del ADN. Es una secuencia corta de ácido nucleico que contiene un grupo 3'hidroxilo libre que forma pares de bases complementarios a una hebra molde y actúa como punto de inicio para la adición de nucleótidos con el fin de copiar la hebra molde. Se necesita un partidor porque la mayoría de ADN polimerasas, enzimas que catalizan la replicación del ADN, no pueden empezar a sintetizar una nueva cadena de ADN de la nada, sino que solo pueden añadir nucleótidos a una hebra preexistente.

PRECISIÓN: disposición de las medidas alrededor de su valor medio o central y corresponde al grado de concordancia entre ensayos individuales cuando el método se aplica repetidamente a múltiples alícuotas de una muestra homogénea.

RC: Control de reactivos.

RLU: Unidades relativas de luz.

Sensibilidad: Cantidad mínima de analito requerida para dar un resultado significativo, cualitativo o cuantitativo. Debe distinguirse entre sensibilidad de calibrado y sensibilidad analítica.

LAMP: Amplificación isotérmica mediada por bucles.

11. BIBLIOGRAFIA

ALBARRACIN, F. SARMIENTO, P.; CARRASCAL, A.; y MERCADO, M. Estimación de la proporción de *Listeria monocytogenes* y *Salmonella* spp. En quesos frescos y doble crema producidos y comercializados en el municipio de Pamplona, Norte de Santander. En: BISTUA. Vol.; 4. (2006); pp. 28- 40.

AOAC. ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS INTERNATIONAL. Ed.; 19 (2016). *Official methods of analysis of AOAC International*. Gaithersburg (Maryland), AOAC International.

ARISTIZÁBAL, B; y RINCÓN, O. Diagnostic utility of the loop-mediated isothermal amplification (LAMP) for detection of cytomegalovirus DNA, Epstein Barr and herpes simplex 1 and 2 in biological samples: a systematic review.[en línea]. <<http://aprendeenlinea.udea.edu.co/revistas/index.php/hm/article/viewFile/5223/4564>>[Consultado el 3 de Octubre del 2016].

BABALOLA, O. Molecular techniques: An overview of methods for the detection of bacteria. En: African J. of Biotechnology. Vol.; 2. (2003); pp.710-713.

BINZSTEIN, N.; CAMPOS, J.; Y CHAPARRO, L. III Curso Avanzado Global Food borne Infections Network (WHO-GFN). [En línea]. <<http://fos.panalimentos.org/LinkClick.aspx?fileticket=MP%2BJEoHXCII%3D&tabid=784&mid=1715&language=en-US> > [citado el 4 de septiembre del 2016].

BIOMÉRIEUX. VIDAS constantemente evolucionando con usted [En línea]. <http://jornades.uab.cat/workshopmrama/sites/jornades.uab.cat/workshopmrama/files/VIDAS.pdf> [citado el 6 de Octubre del 2016].

BOLIVAR, M.; ROJAS, A.; y GARCÍA, L. PCR y PCR-Múltiple: parámetros críticos y protocolo de estandarización. En: Avances en Biomedicina. Vol.; 3. (2014); pp.25-33.

BRACKETT, R. Safe handling of fruits and vegetables. Fresh cut products: Maintaining quality and safety. En: Postharvest horticulture series. (1998); pp.269-303 (1998).

BRAVO, S., y CRUZ, J. Estudios de exactitud diagnóstica: Herramientas para su Interpretación. En: Revista Chilena de Radiología. Vol.; 21. (2015); pp.158-164.

BUNDUKI, C.; FLANDERS, K.; y DONNELLY C. Metabolic and structural sites of damage in heat-and sanitizer-injured populations of *Listeria monocytogenes*. En: Journal of Food Protection Vol.; 58. (1995); pp. 410-415.

CENTRO 3M. Detección de patógenos [En línea]. <<http://jornades.uab.cat/workshopmrama/sites/jornades.uab.cat/workshopmrama/files/MDS.pdf>> [Citada el 04 de Septiembre del 2016].

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. FoodNet. Foodborne Diseases Active Surveillance Network. Surveillance Report. US Department of Health & Human Services.(2011);Atlanta, United States.

CHAN, O.; WOLF, M.; HEPPELLE, D.; y CASPER, P. Methanogenic archaeal community in the sediment of an artificial partitioned acidic bog lake. En: FEMS Microbiology Ecology. Vol.; 42. (2002); pp.119-129.

COLE, M.; JONES, M.; y HOLYOAK, C. The effect of pH, salt concentration and temperature on the survival and growth of *Listeria monocytogenes*. En: J Applied Bacteriology. Vol.; 69. (1990); pp.260.

DAUM,L.; BARNES, W.; MCAVIN, J.; NEIDERT, M.;Y COOPER L.Real-Time PCR detection of *Salmonella* in suspect foods from a gastroenteritis outbreak in Kerr County, Texas.En: J Clin Microbiol. Vol.; 40.(2002); 3050-3052.

DHAMA, K.; KARTHIK, K.; CHAKRABORTY, S.; TIWARI, R.; KAPOOR, S.; KUMAR, A.;y THOMAS P. Loop-Mediated Isothermal Amplification of DNA (LAMP): A new diagnostic tool lights the world of diagnosis of animal and human pathogens: A review. Pakistan Journal of Biological Sciences. Vol.; 17. (2014); pp. 158.

DELGADO, MEDINA E y DIAZ, ROA P. Elaboración y documentación del programa de limpieza y desinfección de los laboratorios del Departamento de Microbiología

de la Pontificia Universidad Javeriana. Bogotá, 2006. Tesis Profesional (Ingeniería Industrial). Universidad Pontificia Javeriana.

DRAE. Alimento. Asociación de Academias de la Lengua Española (ASALE). Edición 23ª. (2014).

DURANGO, J.; ARRIETA, G.; Y MATTAR, S. Presencia de *Salmonella* spp. en un área del Caribe colombiano: un riesgo para la salud pública. Instituto de Investigaciones Biológicas del Trópico. Universidad de Córdoba, Montería. Vol.; 24. (2004); pp.89.

EGGINK, N. A new molecular platform for the detection of *Salmonella*, *Escherichia coli* O157, *Listeria* and *Listeria monocytogenes*. Poster, 3M Company. (2012); St. Paul, MN, United States.

ERIKSSON E, y ASPAN A. Comparison of culture, ELISA and PCR techniques for *Salmonella* detection in faecal samples for cattle, pig and poultry. BMC Veterinary Research. Vol.; 3. (2007); pp.: 1-19.

FAO. Manual para la preparación de frutas y hortalizas. [Página de Internet].2003. < <http://www.fao.org/docrep/006/Y4893S/y4893s07.htm>> [citado el 10 de septiembre del 2016].

FAO, Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación. Organización Mundial de la Salud. Evaluación de riesgos de *Listeria monocytogenes* en alimentos listos para el consumo: resumen interpretativo. Serie de evaluación de riesgos microbiológicos. No. 4. pp. 53.

FAO, OMS. Organización de las Naciones Unidas para la alimentación y la agricultura. Organización mundial de la Salud. Risk assessment of *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat-foods. [En línea] 2004. http://www.who.int/foodsafety/publications/micro/mra_listeria/en/index.html [Citada el 04 de Septiembre del 2016].

FAO/OMS. Manual de Procedimiento- Comisión del Codex Alimentarius. 23º Edición. (2015); pp.97-150

FDA. Centro de Servicio de Inspección y Seguridad Alimentaria (USDA). Quantitative assessment of the relative risk to public health from food-borne *Listeria monocytogenes* among selected categories of ready-to-eat foods. [En línea].2003. < www.foodsafety.gov/~dms/lmr2-toc.html> [Citada el 04 de Septiembre del 2016].

FDA. Centro de Servicio de Inspección y Seguridad Alimentaria (USDA Centers for Disease Control and Prevention). Draft assessment of the relative risk to public health from foodborne *Listeria monocytogenes* among selected categories of ready-to-eat foods. Interpretative summary. [En línea]. 2001. <http://www.foodsafety.gov/~dms/lmrisk.html> [(Citada el 05 Septiembre del 2016)].

FOOD SAFETY. Brotes de enfermedades transmitidas por alimentos. [en línea]. 2011. <http://www.cisan.org.ar/articulo_ampliado.php?id=173&hash=ba844db1cadf8ae52fa6d1c07de5019> [citado en 2 de Octubre del 2016].

FREDERICK ,A.; RAJA ,D.; Y GULAM,R. Characterization of *Salmonella* Typhimurium, *Salmonella* Enteritidis and *Salmonella* Albany Isolated from Chickens and Ducks using Random Amplified. En: Journal of Microbiology, Immunology and Biotechnology .Vol.; 2.(2015); pp. 15.

FUNG, D.; THOMPSON,L.; y KASTNER,L. Hands-free “Pop-up” adhesive type method for microbial sampling of meat surfaces. En: Journal of Rapid Methods and Automation in Microbiology. Vol.; 8. (2000); pp. 209-217.

GIESE, J. New microorganism detection methods introduced. En: Food Technology. Vol.; 55. (2001); pp.68-69.

GOTO, M; HONDA, E.; OGURA, A; NOMOTO, A.; y HANAOKI, K. Colorimetric detection of loop-mediated isothermal amplification reaction by using hydroxynaphthol blue. En: Biotechniques. Vol.; 46. (2009); pp. 167.

HAN, E.; WATANABE, R.; SATTABONGKOT, J.; y KHUNTIRAT, B.; Detection of four Plasmodium species by genus- and species-specific LoopMediated Isothermal Amplification for clinical diagnosis. En: J Clin Microbiol. Vol.; 45. (2007); pp. 2521–2528.

HARRIS,L.Food Safety.II Microbial pathogens associated with produce, En: Fresh cut products: MAintaining quality and safety. En: Postharvest horticulture serie. (1998); pp.97-100

HEIN, I.; KLEIN, D.; LEHNER, A.;BUBERT, A.; BRANDL, E.; y WAGNER, M. Detection and quantification of the *iap* gene of *Listeria monocytogenes* and *Listeria innocua* by a new real-time quantitative PCR assay. En: research microbiology Journal. Vol.; 152. (2001); pp. 37-46

HIRAYAMA, H.; KATAGIRI, S; KAGEYAMA, S.; y MINAMIHASHI, A. Rapid sex chromosomal chimerism analysis in heterosexual twin female calves by Loop-mediated Isothermal Amplification. En: Anim Reprod Sci. Vol.;101. (2007); pp. 40

IMAI, M.; NINOMIYA, A.; MINEKAWA, H.; NOTOMI ,T.; Y ISHIZAKI. Development of H5-RT-LAMP (loop-mediated isothermal amplification) system for rapid diagnosis of H5 avian influenza virus infection. En: Vaccine. Vol.; 24. (2006); pp. 6679-6682

INSTITUTO COLOMBIANO DE NORMAS TECNICAS Y CERTIFICACIÓN. Norma Técnica Colombiana ISO 17025-2005. Requisitos generales para la competencia de laboratorios de calibración y ensayo. Colombia: ICONTEC, 2005. (NTC-ISO/IEC 17025-2005).

INSTITUTO COLOMBIANO DE NORMAS TECNICAS. Norma Técnica colombiana 1325- 2008. Requisitos microbiológicos para productos cárnicos procesados cocidos. Detección de **Salmonella** spp. y **Listeria monocytogenes**. Colombia: Ministerio de protección social, 2008.

INSTITUTO COLOMBIANO DE NORMAS TECNICAS. Norma Técnica colombiana 5894- 2011. Requisitos microbiológicos para el queso fresco. Colombia: Ministerio de protección social, 2011.

INSTITUTO COLOMBIANO DE NORMAS TECNICAS. Norma Técnica colombiana 5894- 2011. Requisitos microbiológicos para el queso fresco.

INSTITUTO NACIONAL DE SALUD. Evaluación De Riesgos De *Listeria monocytogenes* En Queso Fresco En Colombia.[en línea].2001.<<https://www.minsalud.gov.co/sites/rid/Lists/BibliotecaDigital/RIDE/IA/INS/Er-listeria-en-lpc.pdf>> 2011 [Consultado en 3 de Octubre del 2016].

INSTITUTO NACIONAL DE SALUD. Enfermedades Transmitidas por Alimentos. Vol.; 1. (2015); pp.1-69.

INSTITUTO NACIONAL DE VIGILANCIA. Enfermedades Transmitidas por Alimentos (ETA); Semana epidemiológica Semana epidemiológica número 35 de 2016. Ministerio de Salud. (2016); pp.30-31

INSTITUTO NACIONAL DE VIGILANCIA. Enfermedades Transmitidas por Alimentos (ETA); Semana epidemiológica 21 y 30. Ministerio de Salud. Colombia. (2015); pp.1-10.

IRANZO, O.; NAVARRO,R.; CANET , J.; CARTÓN, F. El control de *Listeria monocytogenes* persistente en industrias alimentarias (I), ISSN 0212-1689, N° 269, 2012, págs. 15-18

JAN, J. y LEBORGNE, S. Uso de técnicas moleculares para realizar estudios de biodiversidad microbiana en ambientes petroleros. En: BioTecnología. Vol.; 5. (2001); pp.103-109.

JENKINS, D.; KUBOTA, R.; DONG, J.; y HIGASHIGUCHI, D. Handheld device for real-time, quantitative, LAMP-based detection of *Salmonella enterica* using assimilating probes. Biosens Bioelectron.Vol.; 30. (2011); pp. 200-258.

JOHANSSON, A.; IBRAHIM, A.; GORANSSON, I.;ERIKSSON, U.; GURYCOVA, D.; CLARRIDGE J.; y Sjostedt, A. Evaluation of PCR-based methods for discrimination of *Francisella* species and subspecies and development of a specific PCR that distinguishes the two major subspecies of *Francisella tularensis*.En : Journal of Clinical Microbiology.Vol.; 38. (2000); pp.4180-4185.

KOKKINOS, P.; ZIROS, P.; BELLOU, M.; y VANTARAKIS, A. Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP) for the Detection of *Salmonella* in Food. Food Anal Methods. Vol.; 7. (2014); pp.512.

KUDO, Y.; YOSHINO, M.; e IKEDO, M. Loop-mediated isothermal amplification for the rapid detection of *Salmonella*. En: FEMS Microbiology Letters. Vol.;1.(2005); p.155–161.

LIAO ,C.; y FETT, W. Resuscitation of acid-injured *Salmonella* in enrichment broth, in apple juice and on the surfaces of fresh-cut cucumber and apple.En: Letters in Applied Microbiology . Vol.; 41.(2005); pp.487-492.

LIU T, LILJEBJELKE K, BARTLETT E, HOFACRE C, SANCHEZ S,y MAURER,J. Application of nested polymerase chain reaction to detection of *Salmonella* in poultry environment. En: Journal of Food Protection. Vol.; 65. (2002); pp.1227-1232.

LOUIE, M.; LOUIE, L.; Y SIMOR, A. The role of ADN amplification technology in the diagnosis of infectious diseases. En: Journal Canadian Medical. Vol.; 163. (2000); pp.301-309.

MADIGAN, M. T., Martinko, J. M., y PARKER, J. BROCK. Biología de los Microorganismos. 10ª edición. Prentice-Hall. Madrid, 2003; pp. 102-155

MAHONY, J.; MCAULIFFE, O.; ROSS, R.; y SINDEREN, VAN. Bacteriophages as biocontrol agents of food pathogens. En: Current Opinion in Biotechnology. Vol.; 22. (2011); pp.159.

MALORNY, B.; HOOFFAR, J.; BUNGE, C.; Y HELMUTH, R. Multicenter validation of the Analytical Accuracy of *Salmonella* PCR: towards in an International Standard. En: Applied and Environmental Microbiology. Vol.;69.(2003);p.290-296.

MATARAGAS, M.; ZWIETERING , M.; SKANDAMIS, P.; y DROSINOS , E. Quantitative microbiological risk assessment as a tool to obtain useful information for risk managers -- Specific application to *Listeria monocytogenes* and ready-to-eat meat products. En: Int J Food Microbiol. Vol.; 141.(2010); pp. 174-176.

MOHAMED, D. y XIAONAN, L. Development of a Loop Mediated Isothermal Amplification (LAMP) – Surface Enhanced Raman spectroscopy (SERS) Assay for the Detection of *Salmonella Enterica* Serotype Enteritidis. En: International Journal Teranostic. Vol.;6.(2016); pp.522-532.

MORI, Y.; NAGAMINE, K.; TOMITA ,N.; y NOTOMI ,T. Detection of loop-mediated isothermal amplification reaction by turbidity derived from magnesium pyrophosphate formation. En: Biochem Biophys Res Commun. Vol.;289.(2001);pp 150–154.

MUÑOZ, A.; VARGAS, M.; OTERO, L.; DÍAZ, G.; GUZMÁN, V. Presencia de *Listeria monocytogenes* en alimentos listos para el consumo, procedentes de plazas de mercado y delicatess en de supermercados de cadena. En: Biomedica. Vol.;31 (2011); pp.1-12.

NAGAMINE, K.; WATANABE, K.; OHTSUKA, K.; HASE ,T.; Y NOTOMI, T. Loop-mediated isothermal amplification reaction using a non-denatured template. En: Clin Chem. Vol.;47.(2001); pp.1742.

NAGAMINE, K.; HASE, T.; y NOTOMI ,T. Accelerated reaction by loop-mediated isothermal amplification using loop primers. Mol Cell Probes. Vol.;16. (2002);pp. 223–229.

NOBORU, I.; KUBOKI, N.; SAKURAI,T.; SUZUKI,I.; SUGIMOTO C.; y IGARASHI, I. Molecular Diagnosis of Protozoan Infections by Loop-mediated Isothermal Amplification (LAMP). Vol.; 41.(2015); pp. 88-102.

NOTOMI, T.; OKAYAMA, H.; MASUBUCHI, H.; YONEKAWA, T.; WATANABE, K.; y AMINO, N. Loop-mediated isothermal amplification of DNA. En: Nucleic Acids Research.Vol.; 28(2000); pp.E63-E76.

OMS. Inocuidad de los alimentos. [en línea]. 2015. <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs399/es/>>[citado el 02 de Octubre del 2016].

OPS y OMS. Guía Para El Establecimiento De Sistemas De Vigilancia Epidemiológica De Enfermedades Transmitidas Por Alimentos (Veta) Y La Investigación De Brotes De Toxi-Infecciones Alimentarias. [en línea]. 2016 <<https://www.assa.gov.ar/assa/userfiles/file/guia%20veta.pdf> > [Consultado en 4 de Octubre del 2016].

OPS Y OMS. Manual de capacitación para manipuladores de alimentos. [en línea]. 2015 < <http://www1.paho.org/hq/dmdocuments/manual-manipuladores-alimentos.pdf> > [Consultado el 2 de Octubre del 2016].

PAILLARD, D.; Dubois, V.; Thiebaut,R.; Nathier, F.;Hoogland,E.; Caumetteand, P.; y Quentin, C. Rapid Identification of *Listeria* Species by Using Restriction Fragment Length Polymorphism of PCR-Amplified 23S rRNA Gene Fragments. En: Applied and Environmental Microbiology. Vol.;69.(2003);p.6386-6392.

PARIDA, M.; SANNARANGAIAH ,S; DASH, P.; RAO, P.; y MORITA, K. Loop Mediated Isothermal Amplification (LAMP): A new generation of innovative gene amplification technique; perspectives in clinical diagnosis of infectious diseases.En: Rev Med Virol.Vol.; 18.(2008); 407–419.

PATRICK, P.; MAHON, ZANSKY.; HURD, S.; y SCALLAN, E. Riding in shopping carts and exposure to raw meat and poultry products: prevalence of and factors associated with, this risk factor for *Salmonella* and *Campylobacter* infection in children younger than 3 years. En: J Food Prot. Vol.; 73. (2010); pp.1097- 20016

PÉREZ, E.; CLAVERIE, F.; VILLAR, J.; y MENDEZ, S. Multiplex PCR for simultaneous identification of ***Staphylococcus aureus*** and detection of methicillin and mupirocin resistance. En: J. of Clinical Microbiology.Vol.; 39. (2001); pp.4037-4041.

POOJA, S.; SUDESH, D.; POONAM, K.; y JGINDER, S. Suresh Kumar. Loop mediated isothermnl aplification (LAMP) based detección of bacteria: A review. En: African Journal of Biotechnology.Vol.; 13.(2014); pp 1920-1936.

POUTOU, R.; BURBANO,M.; SIERRA,S.; TORRES,K.; CARRASCAL,K.; MERCADO,M. Estandarización de la extracción De ADN y validación De La PCR múltiple para detectar *Listeria monocytogenes* en queso, leche, carne de res y pollo. En: Universitas Scientiarum. Vol.; 10.(2005); pp.61-63

ROCHA, J. Detección de *Pantoea stewartii* directamente de la semilla de maíz usando la técnica inmuno-PCR. Tesis de Licenciatura. 2003. Universidad Autónoma de Coahuila. México.

ROCHA, R Ocorrência e diferenciação de espécies de *Listeria* spp. em salsichas tipo *hot dog* a granel e em amostras de carne moída bovina comercializadas no Distrito Federal. En: Cienc. Rural. Vol.;44 (2008);pp 147-152.

RODRIGUEZ, M.; SILVA M.; GOMES, E.; LOPES, R.; y TSAI, S. Detection DNA diversity assessment of *Xylella fastidiosa* in field-collected plant DNA insect samples by using rRNA and gryB sequences. En: Applied and Environmental Microbiology. Vol.;69. (2004); pp.4249-4255.

RODRÍGUEZ, D.; JOFRE,A.; AYMERICH, T.;HUGAS, M.; Y PLA, M. Rapid Quantitative Detection of *Listeria monocytogenes* in Meat Products by Real-Time PCR .En: applied and environmental microbiology. Vol.;70.(2009); pp. 6299–6301.

SÁNCHEZ, E. AGUIRRE, M. ARCE,P. TORO,M. VILELA,R. Amplificación isotérmica mediada por LOOP (LAMP) de ácidos nucleicos en el diagnóstico clínico. Journal CON-CIENCIA.Bolivia, Vol.;2. (2014);pp. 128-143.

SUAREZ, M.; Y MANTILLA, JOSÉ. Presencia de *Salmonella* serovariedad Enteritidis en productos de origen avícola y su repercusión en salud pública. Universidad Nacional de Colombia; Vol.; 13.(2000); p.237.

SUNIL, D.; SAROJ, R.; SHASHIDHAR, M.; JAYANT, R. Rapid, sensitive, and validated method for detection of *Salmonella* in food by an enrichment broth culture – Nested PCR combination assay. En: Molecular and Cellular Probes Journal. Vol.; 22.(2008);pp. 201-206.

TOMITA, N.; MORI, Y.;KANDA, H.; Y NOTOMI ,T. Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP) of gene sequences and simple visual detection of products. En: Nat Protoc.Vol.;3.(2008);pp. 877–882.

UMAR , A.; ROCHMAN, N.; WAN,T.; AHMADU,S.; ANAS, M.; SANI, A.; y ATIF, B. Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP), An Innovation in Gene

Amplification: Bridging the Gap in Molecular Diagnostics; A Review. En: Indian Journal of Science and Technology. Vol.; 8.(2015); pp. 3-5.

Tanco, P. Metodología para la aplicación del diseño de experimentos (DoE) en la industria. Memoria para optar al título de doctor.(2008); pp. 45-48.

USHIKUBO, H. Principle of LAMP method - A simple and rapid gene amplification method. Virus. Vol.; 54. (2004); pp. 107–112.

UNIVERSIDAD NACIONAL ABIERTA YA DISTANCIA. Microorganismos indicadores de alimentos.[en línea]. 2015.<http://datateca.unad.edu.co/contenidos/211624/AVA_2015/Microorganismos_indicadores.pdf > [citado en 04 de Octubre del 2016].

VANEGAS, C.; y ROJAS, J. Detección de patógenos en alimentos [en línea] 2004.<<http://hipotesis.uniandes.edu.co/hipotesis/images/stories/ed04pdf/Deteccion%20de%20patogenos.pdf> > [citado en 05 de Octubre del 2016].

YANG, M., y BENEDETTO, P. Validation of the 3M™ molecular detection system for the detection of *Salmonella*, *E. coli* O157 (including H7) and *Listeria* spp., in Dried Fruits, Nuts and Environmental Samples. Poster 3M Company. (2013); St. Paul, MN, United States.

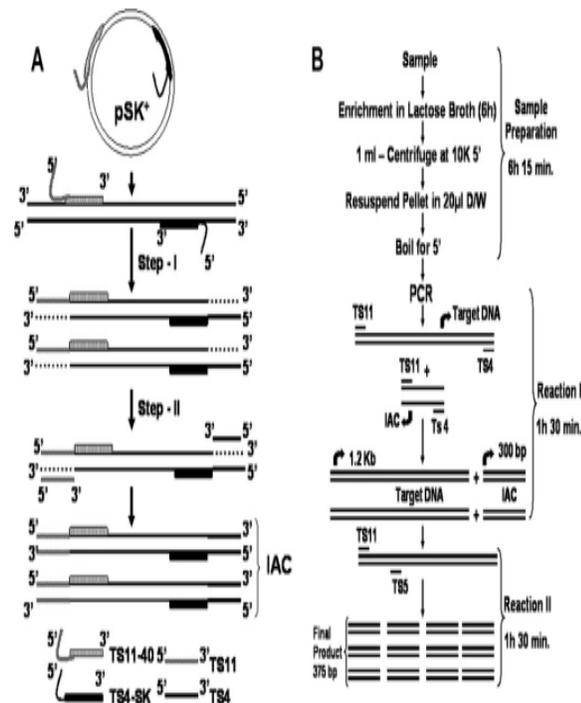
WANG, Y.; HUAQING, X.; HANG,D.; SHUANG,M.; y CHANGYUN,Y. Rapid and Sensitive Detection of *Listeria ivanovii* by Loop-Mediated Isothermal Amplification of the smcL Gene. En: PLoS ONE.Vol.; 9. (2014); pp.1-12.

ZHANG, S.; KINGSLEY, A.; SANTOS, R.; RAFFATELLU, M. Molecular pathogenesis of *Salmonella enterica* serotype Typhimurium-induced diarrhea. EN: J Infection and immunity. Vol.; 71.(2003);pp. 1-12

ANEXOS

Anexo 1. PCR anidada con un IAC para la detección de *Salmonella spp.* en alimentos

A) Construcción de IAC. Los oligonucleótidos TS11-40 y TS4-SK contienen región para TS11 y TS4 en los extremos 5' y regiones para la amplificación del fragmento de 249pb a partir del plásmido pSK en los extremos 3'. La secuencia de nucleótidos en el extremo 3' es importante para la unión específica y amplificación de PCR. Esto permite la incorporación de las secuencias de nucleótidos de TS11 y TS4 al producto de PCR. La siguiente etapa de amplificación con TS11 y TS4 da como resultado un fragmento de 300 pb. El producto final así generado tiene ambas regiones de unión para TS11 y TS4 y sirve como un IAC. **B)** Representación esquemática de la PCR anidada.



Tomado de: Sunil *et al.*;2008.

Anexo 2. Exactitud de la cuantificación de *L. monocytogenes* por RTi-PCR en tres matrices de alimentos diferentes

Approx no. of CFU/g	Relative accuracy		
	Raw pork	Frankfurter sausages	Fermented sausages
10 ⁶	101.12 ± 0.30	99.77 ± 0.52	98.62 ± 1.30
10 ⁵	97.99 ± 1.37	100.60 ± 0.41	101.77 ± 3.85
10 ⁴	100.16 ± 4.11	99.48 ± 2.56	103.80 ± 1.45
10 ³	100.88 ± 2.89	100.12 ± 2.15	94.98 ± 2.53
10 ²	BQ	BQ	BQ

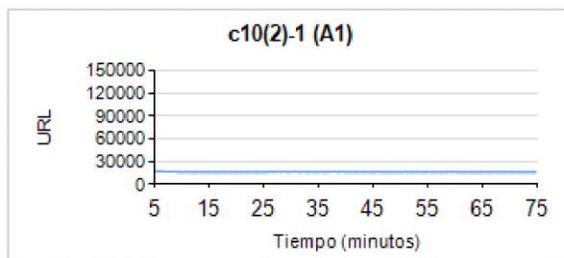
Tomado de: Rodríguez *et al.*; 2004.

Las muestras se filtraron a través de membranas de nylon. Los números aproximados de UFC por gramo son los tamaños iniciales del inóculo. La exactitud de la respuesta se calculó como un porcentaje de los números de log de UFC por gramo obtenido por el método de enumeración basado en RTi-PCR. Los valores se

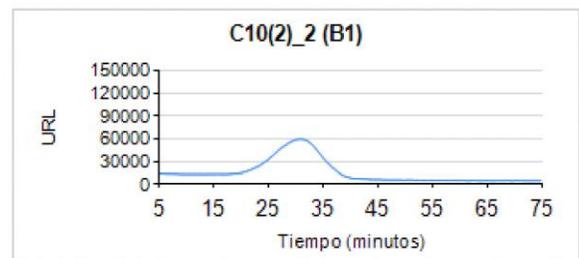
expresan como media \pm desviaciones estándar de los resultados obtenidos en tres experimentos independientes. Todas las muestras resultaron positivas (n = 9).BQ, Por debajo del rango de cuantificación.

Anexo 3. Ejemplo de Graficas individuales de muestras reportadas como positivas y negativas por el Software de Detección Molecular 3M para *L. monocytogenes* ATCC 13932 en concentración 10^2 .

Muestra Negativa



Muestra Positiva



Anexo 4. Grafica individual de las muestras reportadas por el Software de Detección Molecular 3M para *L. monocytogenes* ATCC 13932 en concentración 10^1 .

