



Universidad Nacional  
**Federico Villarreal**

**VRIN** | VICERRECTORADO  
DE INVESTIGACIÓN

**FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES Y MATEMÁTICA**

**USO DE AOAC OFFICIAL METHOD 2016.01 PARA LA DETECCIÓN DE  
SALMONELLA**

Línea de Investigación:  
Microbiología y Parasitología

Trabajo de Suficiencia Profesional para obtener el Título de:  
Licenciado en Biología

**Autor:**

Bravo Almeida Julian Jeanpaul.

**Asesor**

Mg. Blgo. Ramsés Salas Asencios  
ORCID: 000-0002-4075-1736.

**Jurado**

Rodrigo Rojas, Maria Elena  
Velarde Vilchez, Monica Margarita  
Riveros Ramirez, Maribel Denise

**Lima – Perú**

**2022**

## ÍNDICE

<b>RESUMEN.....</b>	<b>4</b>
<b>ABSTRACT.....</b>	<b>5</b>
<b>I. Introducción .....</b>	<b>6</b>
1.1. Trayectoria del autor .....	7
1.2. Descripción de la empresa .....	7
1.3. Organigrama de la empresa .....	8
1.4. Áreas y funciones desempeñadas .....	9
1.4.1. Área: Agri Food – Laboratorio de Microbiología.....	9
1.4.1.1. Funciones generales .....	9
1.4.1.2. Funciones específicas.....	9
<b>II. Descripción de una actividad específica.....</b>	<b>11</b>
2.1. Conceptos previos .....	11
2.1.1. Salmonella spp .....	11
2.1.2. Gastroenteritis .....	11
2.1.3. Fiebre entérica.....	11
2.2. Evaluation of 3M Molecular Detection Assay (3M MDA™).....	12
2.2.1. Características .....	12
2.2.2. Principios y fundamentos de la técnica.....	13
2.3. Materiales .....	14
2.4. Medios de cultivo y Reactivos.....	15
2.5. Procedimiento .....	15
<b>III. Aportes más destacables a la Empresa/Institución.....</b>	<b>23</b>
<b>IV. Conclusiones .....</b>	<b>24</b>
<b>V. Recomendaciones .....</b>	<b>25</b>

VI. <b>Referencias</b> .....	<b>26</b>
VII. <b>ANEXOS</b> .....	<b>28</b>

## **Resumen**

En el 2020, la Unión Europea notificó un total de 1025 casos de alimentos contaminados por microorganismos patógenos, siendo Salmonella el patógeno más frecuente en alimentos dentro de los países miembros, con 537 notificaciones, de las cuales 149 se referían a Salmonella enteritidis. Además, se encontró Salmonella en pimienta negra de Brasil (61 notificaciones) y semillas de sésamo de otros países no miembros (49 notificaciones). Hubo un aumento del 37% en las notificaciones de microorganismos patógenos en 2020 en comparación con 2019 dentro de los países miembros. En respuesta, 3M® desarrolló el método "3M MDA 2-Salmonella", que permite la detección rápida y específica de Salmonella en alimentos fortificados, piensos y muestras ambientales de procesamiento de alimentos mediante amplificación isotérmica mediada por bucle (LAMP) con alta especificidad y sensibilidad. El método 3M MDA 2-Salmonella se comparó con otros métodos oficiales como el ISO 6579 y el método descrito por la Norma 62 del Ministerio de Agricultura, Pecuaria y Abastecimiento de Brasil (MAPA), y se encontró que era confiable con sensibilidad y especificidad equivalentes. La propiedad isotérmica del sistema 3M permite que la polimerasa trabaje a temperaturas más bajas, lo que permite que el pirofosfato se convierta en ATP para reaccionar con la luciferasa, dando como resultado la producción de luz, y es una ventaja en comparación con técnicas más convencionales como PCR y real. PCR a tiempo.

**Palabras clave:** 3M MDA 2–Salmonella, LAMP, 3M MDS®.

### **Abstract**

In 2020, the European Union reported a total of 1025 cases of food contaminated by pathogenic microorganisms, with Salmonella being the most frequent pathogen in food within member countries, with 537 notifications, of which 149 referred to Salmonella enteritidis. In addition, Salmonella was found in black pepper from Brazil (61 notifications) and sesame seeds from other non-member countries (49 notifications). There was a 37% increase in notifications of pathogenic microorganisms in 2020 compared to 2019 within member countries. In response, 3M® developed the "3M MDA 2-Salmonella" method, which allows the rapid and specific detection of Salmonella in fortified foods, feed, and food processing environmental samples using loop-mediated isothermal amplification (LAMP) with high specificity and sensitivity. The 3M MDA 2-Salmonella method was compared with other official methods such as ISO 6579 and the method described by Standard 62 of the Brazilian Ministry of Agriculture, Livestock and Supply (MAPA), and found to be reliable with equivalent sensitivity and specificity. The isothermal property of the 3M system allows the polymerase to work at lower temperatures, which allows pyrophosphate to be converted into ATP to react with luciferase, resulting in the production of light, and is an advantage compared to more conventional techniques such as PCR and real-time PCR.

**Keywords:** 3M MDA 2–Salmonella, LAMP, 3M MDS®.

## I. Introducción

Las enfermedades de transmisión alimentaria (ETA), se deben a la ingesta de alimentos contaminados por microorganismos o sustancias químicas, a cualquier nivel desde la producción al consumo de alimentos, son producto de la falta de higiene en los alimentos, las carnes mal cocidas, frutas y hortalizas contaminada con heces o pesticidas; llegando a causar en niños, embarazadas, personas inmunosuprimidas y adultos mayores, enfermedades gastrointestinales, ya que son los más vulnerables a este tipo de enfermedades (Gutiérrez, 2019).

En el 2020. La unión europea reportó, como parte de su “Sistema de Alerta Rápida para Alimentos y Piensos”; un total de 1025 casos de alimentos contaminados por microorganismos patógenos, donde la *Salmonella* es el patógeno más frecuentemente en alimentos dentro de los países miembros con 537 notificaciones; de estas 149 se referían a *Salmonella enteritidis*. Además de esto *Salmonella* se halló en pimienta negra de Brasil (61 notificaciones), seguida de semillas de sésamo (49 notificaciones), proveniente de otros países no miembros. Aunque lo más preocupante es que dentro de los países miembros hubo un aumento del 37 % en las notificaciones de microorganismos patógenos en el 2020 en comparación al 2019 (EU, 2021).

Por ello, la vigilancia de la calidad sanitaria de los alimentos y el agua para uso y consumo humano es importante. En ese contexto herramientas que ayuden a reducir el impacto en la salud, como técnicas de detección específicas, sensibles y además rápidas para determinar la contaminación en los alimentos; se hacen cada vez más necesarias.

En respuesta a esta necesidad, la compañía 3M® ha desarrollado el método “3M MDA 2–*Salmonella*” permitiendo así la detección rápida y específica de *Salmonella* en alimentos enriquecidos, piensos y muestras ambientales de procesamiento de alimentos.

La AOAC Official Method 2016.01, describe diversos aspectos del sistema de ensayo 3M MDA 2–Salmonella; como lo son los principios básicos, instrumentos y reactivos, preparación de la muestra además también la interpretación de resultados

El presente trabajo tiene como objetivo presentar un método relativamente nuevo para la detección de *Salmonella*, 3M MDA™, Implementado en el laboratorio INSPECTORATE SERVICES PERÚ S.A.C.

Así como también explicar de forma detallada el procedimiento, ventajas y principios del ensayo de detección molecular para *Salmonella*.

### **1.1. Trayectoria del autor**

#### **Agosto del 2020 a febrero de 2022.**

Inspectorate Services Perú S.A.C.

Área: Agri Food – Laboratorio de Microbiología

Puesto: Analista de Junior I.

#### **Enero del 2018 - agosto del 2020.**

Servicios Analíticos Generales S.A.C.

Área: Laboratorio de Microbiología

Puesto: Analista de microbiología.

### **1.2. Descripción de la empresa**

La empresa INSPECTORATE SERVICES PERÚ S.A.C. la cual está especializada en servicios de supervisión, auditorías, inspección de conformidad y ensayos en temas relacionados a la calidad, seguridad y salud ocupacional, medio ambiente.

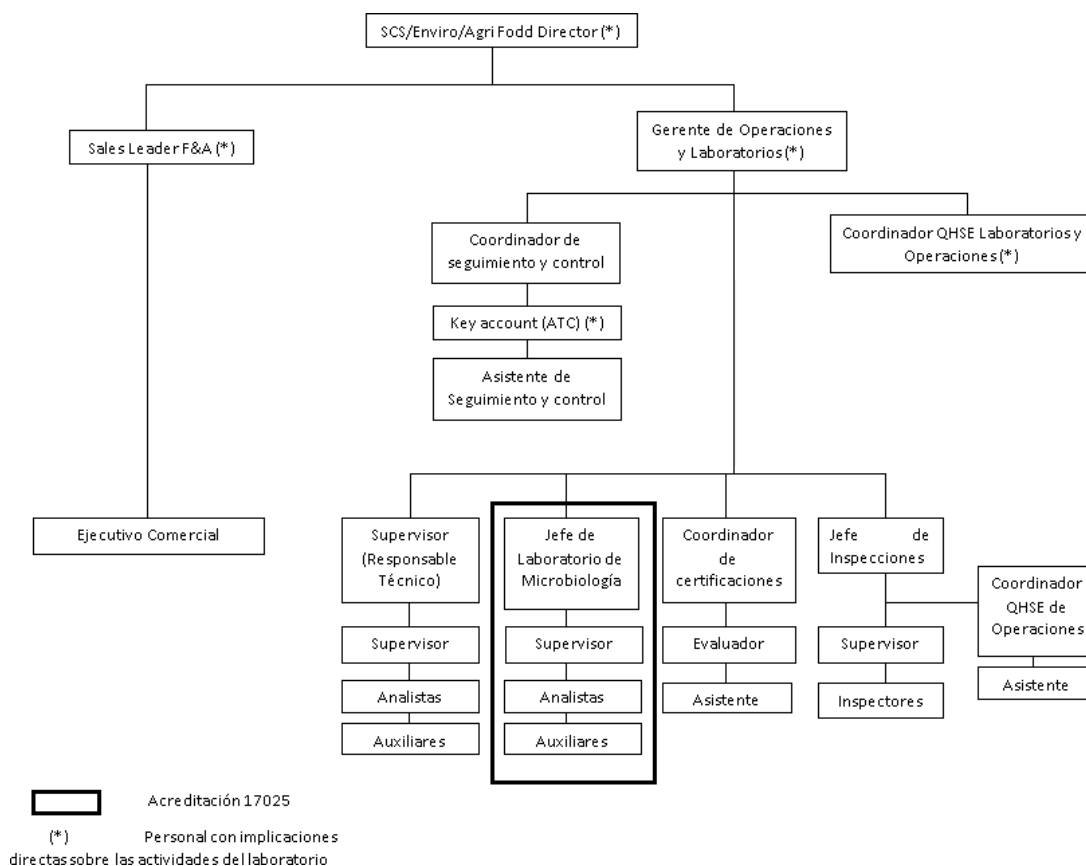
Esta empresa es parte del grupo Bureau Veritas y tiene presencia en 140 países alrededor del mundo. En nuestro país opera principalmente en el Callao.

Dentro de los diversos rubros en los que tiene presencia, se encuentra la División de Agri-Food, en donde se realizan servicios destinados al rubro de producción de alimentos. Contando con laboratorios de diferentes especialidades, entre ellos el laboratorio de Microbiología en donde se llevan a cabo diversos análisis destinados a evaluar la calidad microbiológica de diversos productos, así como elementos de la cadena de producción.

### 1.3. Organigrama de la empresa

**Figura 1.:**

*Organigrama de la división de agricultura del Laboratorio INSPECTORATE. todos los derechos reservados*





## 1.4. Áreas y funciones desempeñadas

### 1.4.1. Área: Agri Food – Laboratorio de Microbiología

#### 1.4.1.1. Funciones generales:

- Apoyo en los procesos de implementación, mantenimiento y la mejora del sistema de gestión, según sea encomendado.
- Cumplimiento con las disposiciones establecidas en el Manual de Buenas Prácticas del Laboratorio.
- Cumplimiento con las acciones dispuestas por el Jefe de Laboratorio y/o Supervisor para prevenir o minimizar alguna desviación detectada (de ser el caso).
- Participación en actividades de Capacitación para fines de autorización de competencia técnica.
- Participación en actividades asignadas para el desarrollo de los ensayos, de acuerdo con la planificación, indicaciones impartidas, metodología establecida y las directrices del laboratorio de microbiología.
- Desarrollo de actividades para las cuales es autorizado o en las tareas específicas delegadas

#### 1.4.1.2. Funciones específicas:

##### Análisis de muestras:

Estas funciones son el inicio de todo ensayo, en su mayoría empieza con el pesado de las muestras con ayuda de pinzas y agujas estériles de ser el caso, para luego ser inoculadas a los agares o tubos con los medios necesarios por cada método. Esto también incluye inocular las diluciones según sea la matriz, las aguas simplemente son inoculadas en los tubos de lauril con la concentración y diluciones necesarias para cada matriz.

Pases y confirmaciones:

Esta actividad está compartida por dos personas, una encargada de las confirmaciones, lectura y reporte de aguas y sedimentos. La otra persona se ocupa de las confirmaciones de las lecturas hechas en placas y tubos para detecciones, numeraciones y recuentos.

Reporte de resultados:

Esta actividad es el final de todos los ensayos microbiológicos realizados en el laboratorio; aquí se desarrollan las lecturas de las confirmaciones, pruebas bioquímicas, pruebas serológicas. Además de esto también incluye la interpretación, reporte y contraste con la normativa vigente respectiva. Posterior a ello se procede a informar a la Jefatura y Supervisora sobre desviaciones observadas.

## II. Descripción de una actividad específica.

### 2.1. Conceptos previos.

- ***Salmonella spp.***

Las Salmonellas son bacilos gramnegativos, anaerobios facultativos, no formadores de esporas que pertenecen a la familia Enterobacteriaceae, en su mayoría móviles gracias a flagelos peritricos. Cabe mencionar que el género *Salmonella* se divide en dos especies causantes de enfermedades en humanos: *S. bongori* y *Salmonella enterica*, esta última se compone de numerosas subespecies y al mismo tiempo divididas en varios serotipos, incluidos *S. enteritidis* y *S. typhimurium* (FDA;2012).

- **Gastroenteritis:**

Comúnmente provocado por *S. Typhi* y *S. Paratyphi*, se encuentran frecuentemente en reservorios animales. Las infecciones por SNT se caracterizan por gastroenteritis o "gripe estomacal", una afección inflamatoria del tracto gastrointestinal acompañada de un cuadro sintomatológico que incluye; náuseas, vómitos, diarrea, calambre y fiebre, con duración de apenas un par de días y remiten en una semana.

Las complicaciones gastrointestinales de las infecciones por SNT incluyen colecistitis, pancreatitis y apendicitis, mientras que la perforación del íleon terminal no se asocia con infecciones por SNT. Los bebés, los niños pequeños, los ancianos y los pacientes inmunocomprometidos son muy susceptibles a las infecciones por NTS y se desarrollan síntomas más graves que las personas normales.

La forma de contraer esta enfermedad estar en relación con la con la ingesta de alimentos contaminados, desde carnes y huevos hasta frutas y verduras, además de alimentos secos, como especias y nueces crudas (Shu-Kee, y otros, 2015)

- **Fiebre entérica:**

*Salmonella Typhi* es el agente etiológico de la fiebre tifoidea fiebre, mientras que la fiebre paratifoidea es causada por *S. Paratyphi*. ya que la sintomatología de la fiebre paratifoidea es indistinguible de la fiebre tifoidea, Se denomina como "fiebre entérica" para ambas fiebres, y tanto *S. Typhi* como *S. Paratyphi* se denominan Salmonella tifoidea

La fiebre entérica provoca afecciones como: fiebre alta, diarrea o estreñimiento, dolores, dolor de cabeza y letargo (somnolencia o pereza) y, a veces, sarpullido. Es una condición muy seria; hasta el 10% de las personas que no reciben tratamiento pueden morir.

La enfermedad tifoidea generalmente se asocia con agua potable contaminada con aguas residuales o cultivos regados con agua contaminada con aguas residuales. (Shu-Kee, y otros, 2015)

## **2.2.Evaluation of 3M Molecular Detection Assay (3M MDA™):**

- **Características**

El Ensayo de Detección Molecular 2 para *Salmonella* 3M™ (3M MDA™) se usa junto con el Sistema de Detección Molecular 3M™ (3M MDS™) para la detección rápida y específica de *Salmonella*, utilizando amplificación isotérmica mediada por bucle (LAMP) y bioluminiscencia, permitiendo detectar la amplificación del ADN de *Salmonella*. (AOAC, 2016)

La AOAC Official Method 2016.01, describe diversos aspectos del sistema de ensayo 3M MDA 2–*Salmonella*; como lo son los principios básicos, instrumentos y reactivos, preparación de la muestra además también la interpretación de resultados.

Puede ser usado para una gran variedad de productos, incluyendo carne de aves, huevos, alimentos para mascotas y muestras ambientales, y los resultados se obtienen en aproximadamente 24 horas.

Dada la declaración que ha hecho el laboratorio ante el Instituto Nacional de la Calidad (INACAL) sobre las matrices en las que se aplicará este método, el presente proyecto solo se restringirá a los alcances e ítems que se han declarado.

El laboratorio tiene dos apartados sobre las matrices, donde el método puede ser aplicado; como alimentos de alta carga (Productos de confitería, frutas y hortalizas) y alimentos de baja carga (Productos de galletería). Dichas categorías responden a la presunta carga bacteriana que pueda presentar el producto a analizar, lo cual también fija la cantidad en gramos que será necesaria tomar de la muestra y el posterior volumen (mL) de diluyente con el que será enriquecido, hasta incluso el tiempo por el cual será incubado.

- **Principios y fundamentos de la técnica**

El Sistema de Detección Molecular de 3M™ usa el método LAMP y lo vincula con la técnica de bioluminiscencia para detección de la presencia de patógenos en muestras de alimentos. Esta combinación aumenta la sensibilidad y especificidad de los resultados.

La polimerasa de ADN Bst (*Bacillus stearothermophilus*) usada en el método LAMP tiene actividad de intercambio de cadena de ADN, pero no actividad de exonucleasa, por lo que el producto resultante tiene una especificidad muy alta. Los ciclos subsiguientes de extensión y desplazamiento de cadena se llevan a cabo utilizando polimerasa y dos o tres pares de cebadores que reconocen seis u ocho regiones diferentes.

El proceso de detección se basa en una reacción enzimática en la que el pirofosfato, producido como subproducto de la amplificación del ADN, se convierte en trifosfato de adenosina (ATP), que es al ser procesado por la luciferasa termoestable emite una señal de

luz; por lo que el equipo nos muestra lecturas de “Unidades relativas de luz” (URL) o por sus siglas en inglés (RLU)

Este sistema proporciona resultados cualitativos e indica solo la presencia o ausencia del patógeno.

Principios del Ensayo de Detección Molecular 2 para *Salmonella* 3M™. (ANEXO A)

Principios de la técnica LAMP. (ANEXO B).

### 2.3. Materiales:

- Kit 3M MDA 2–*Salmonella* de 3M; (Tabla 1.) Componentes del kit
- herramienta para tapar/destapar tubos de reactivos (Microtubos)
- herramienta para tapar/destapar para tubos de lisis
- Micropipeta de 20  $\mu$ L de capacidad.
- Puntas de pipeta estériles con filtro para 20  $\mu$ L de capacidad
- Bolsas para Stomacher.
- Stomacher.
- Termómetro calibrado a  $100 \pm 1^\circ\text{C}$ .
- Unidad de calentador de bloque seco calibrado a  $100 \pm 1^\circ\text{C}$ .
- Incubadoras calibradas a  $37 \pm 1^\circ\text{C}$  o  $41,5 \pm 1^\circ\text{C}$ .
- Refrigerador. Capaz de mantener entre 2 y 8  $^\circ\text{C}$ , para almacenar el kit 3M MDA
- Computadora compatible con el instrumento 3M MDS y el programa para las lecturas del equipo.

**Tabla 1.:**

*Componentes del Kit 3M MDA 2–Salmonella. Extraído de las instrucciones de Ensayo de Detección Molecular 2 para Salmonella 3M™ (3M MDA™). 2019 todos los derechos reservados*

Artículo	Identificación	Cantidad	Contenido	Comentarios
Solución de Lisis (LS) 3M™	Solución rosada en tubos transparentes	96 (12 tiras de 8 tubos)	580 µL de LS por tubo	En bastidor y lista para usar
Tubos de reactivos para el Ensayo de Detección Molecular 2 para <i>Salmonella</i> 3M™	Tubos verdes	96 (12 tiras de 8 tubos)	Mezcla de detección y amplificación específica liofilizada	Listas para usar
Tapas adicionales	Tapas verdes	96 (12 tiras de 8 tapas)		Listas para usar
Control de Reactivos 3M™ (RC)	Tubos transparentes con tapa de bisagra	16 (2 bolsas de 8 tubos individuales)	Mezcla de detección y amplificación de control liofilizado de ADN	Listas para usar
Guía de inicio rápido		1		

#### 2.4. Medios de cultivo y Reactivos:

- ISO BPW de formulación equivalente a ISO 6579:2002.
- Caldo selenita cistina.
- Caldo de tetrionato.
- XLD (Agar Xilosa, Lisina, Desoxicolato).
- HE (Agar Entérico Hektoen).
- BS (Agar Bismuto Sulfito).
- Agar triple azúcar hierro (TSI).
- Lisina hierro agar (LIA).
- Caldo urea (UREA)

#### 2.5. Procedimiento:

##### ✓ Enriquecimiento de muestras

El enriquecimiento de la muestra dependerá de qué tipo de productos se hayan pesado, los cuales ya se han mencionado antes:

a) Alimentos de alta carga (Productos de confitería, frutas y hortalizas):

- Pesar 25 gramos de las muestras, de ser necesario se usa pinzas y tijeras previamente esterilizadas
- Las muestras son llevadas a bolsas de un 1L de capacidad
- Con la ayuda de un Stomacher se homogeniza con 225 mL de ISO BPW estéril y
- En este caso las muestras son incubadas a  $37 \pm 1$  °C por 24-28 horas

b) Alimentos de baja carga (Productos de galletería):

- Ya que estos productos son considerados de baja carga se toma una porción más grande de muestra de 250 gramos
- Las muestras son llevadas a bolsas de un 5L de capacidad y enriquecida con volumen de 2250 mL de ISO BPW estéril así manteniendo la relación 1:9
- Incubar a  $37 \pm 1$  °C por 24-28 horas

**✓ Preparación de la bandeja del cargador rápido de detección molecular 3M**

Utilizar una toalla de papel con solución de lejía 1-5 % (v/v en agua) para limpiar la bandeja, enjuagar con agua y secar con papel toalla. Dejarla secar antes de realizar el ensayo.

**✓ Preparación del Instrumento de Detección Molecular 3M**

- Abrir el software del sistema de detección molecular o MDS por sus siglas en inglés
- Iniciar sesión y encender el equipo de detección Molecular 3M
- Crear una corrida de muestras en el programa, indicando la codificación de las muestras, lote del kit y fecha
- Designar posiciones dentro de la bandeja de cargado rápido para muestras y los controles (control negativo, control de reactivos y control de cepa)

**✓ Lisis**



- Colocar los tubos que contienen la solución de lisis en la gradilla. Abrir los tubos y transferir asépticamente 20  $\mu\text{L}$  de la muestra enriquecida. Se requiere un tubo de lisis para cada muestra y el control negativo (medio de enriquecimiento estéril).
- Prepare el control negativo transfiriendo asépticamente 20  $\mu\text{L}$  de reactivo NC a un tubo de solución de lisis. El Control Negativo (NC), no está incluido en el kit, use el medio de enriquecimiento, BPW ISO.
- Cerrar los tubos e invertir con cuidado las muestras de 3 a 5 veces.
- Colocar las muestras en el bloque térmico a  $100\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1$  durante  $15 \pm 1$  minutos. Durante el calentamiento, la Solución de Lisis 3M cambiará de rosado (frío) a amarillo (caliente).
- Retire las muestras del bloque de calor. Deje que se enfríe durante 5 - 10 min. Cuando esté fría, la solución de lisis volverá a tomar un color rosado.

✓ **Amplificación**

- Seleccionar la cantidad apropiada de microtubos para el ensayo. No olvidar que se necesita un tubo de control de reactivo y un tubo para el control negativo por cada corrida.
- Cargar los tubos tapados en una Bandeja de Carga Rápida limpia y descontaminada.
- Transferir 20  $\mu\text{L}$  de cada lisado de muestra a los tubos de reactivos. Tome los 20  $\mu\text{L}$  de la parte superior para evitar el precipitado.
- Transferir 20  $\mu\text{L}$  de lisado de control negativo a un tubo de reactivo (NC).
- Transferir 20  $\mu\text{L}$  de lisado de control negativo a un tubo de control de reactivo (RC).
- Mezclar cada tubo pipeteando suavemente hacia arriba y hacia abajo 5 veces.
- Cerrar los tubos con tapones extra nuevos que vienen incluidos en el kit. Transferir los tubos a la bandeja del cargador rápido. Cerrar y trabar la tapa de la Bandeja.

- Revisar y confirme configuración de la corrida en el Software de Detección Molecular 3M.
- Hacer clic en el botón de inicio del software y seleccione el equipo que usará. La tapa del equipo se abrirá automáticamente.
- Colocar la Bandeja de Carga Rápida en el Equipo de Detección y cierre la tapa del equipo para empezar con la lectura.
- Obtendrá los resultados al cabo de 60 minutos, aunque los positivos pueden detectarse antes.

Flujograma del procedimiento del ensayo. (**Anexo C**).

### ✓ **Resultados e Interpretación**

Una vez alcanzado el tiempo necesario para que se efectúen las lecturas del equipo, se procede a analizar los gráficos y pictogramas que nos muestra el programa.

Mediante un algoritmo que interpreta la curva de producción de luz que se obtiene de la detección de ácido nucleico amplificado, el software analiza automáticamente los resultados y los expresa en color según el resultado. Los pictogramas de color nos permiten corroborar que los controles son satisfactorios, además de buscar la presencia de algún pocillo presuntamente positivo.

Los resultados presuntivos positivos se informan en tiempo real, mientras que los resultados Negativos o alguno que requiera inspeccionar, se muestran una vez terminado el análisis.

Iconografía de posibles resultados. (**Anexo D**).

Ejemplo de resultados. (**Anexo E**).

## ✓ **Confirmación**

La confirmación de los resultados presuntamente positivos se realiza bajo las indicaciones de la norma AOAC 967.26.2019. Con la excepción de que para los productos de galletería considerados de baja carga se validó esta metodología ya que se encuentra fuera de alcance de la norma. Esta confirmación de resultados se hace desde el caldo de Pre enriquecimiento (BPW). Sin embargo, para las pruebas bioquímicas y serológicas se siguen las indicaciones de la ISO 6579-1.2017.

### ○ **Enriquecimiento selectivo:**

Agite suavemente la mezcla de la porción de muestra incubada y transfiera 1 mL a 10 mL de caldo selenita cistina e igualmente hágalo para el caldo de tetrionato. lleve a incubar a 35°C por 24 ± 2 horas.

### ○ **Aislamiento con agares selectivos:**

Después de la lectura de tubos, se estrían el caldo selenito cistina y el tetrionato en placas de medios selectivos de XLD (Agar Xilosa, Lisina, Desoxicolato), HE (Agar Entérico Hektoen), y BS (Agar Bismuto Sulfito).

Incubar las placas 24 ± 2 h a 35°C. Si las placas muestran características sospechosas comunes de salmonelas. Seleccionar 2 o más colonias de cada placa (XLD, HE y BS) para su confirmación bioquímica. En XLD, las colonias presuntas aparecerán como colonias negras redondas; también puede aparecer un crecimiento similar a un halo blanco amarillento alrededor del crecimiento negro. El agar circundante puede cambiar de rojo a amarillo/naranja.

Las colonias presuntamente positivas en SB serán marrones, grises o negras con brillo metálico. Por otro lado, las colonias típicas sobre el agar HK son azules con o sin centro negro

### ○ **Bioquímica de confirmación:**

siguen las indicaciones de la ISO 6579-1.2017.

Inocular las colonias seleccionadas en agar triple azúcar hierro (TSI), lisina hierro agar (LIA) y caldo urea(UREA); siendo la manera correcta de inocular para en el caso de TSI y LIA picar el fondo del tubo y sobre la superficie de la porción inclinada del agar, también conocida como “pico de flauta”

Los tres medios de selección bioquímica se incuban a  $35 \pm 0.5^\circ\text{C}$  por  $24 \pm 2$  horas.

**TSI:** estriar la superficie inclinada del agar y picar el fondo del agar. Interprete los cambios en el medio de la siguiente manera:

**Fondo:**

- Amarillo: glucosa positiva (fermentación de glucosa)
- Rojo o sin cambios: glucosa negativa (sin fermentación de glucosa)
- Negro: formación de sulfuro de hidrógeno
- Burbujas o grietas: formación de gas a partir de la glucosa.

**Superficie inclinada:**

- Amarillo: lactosa y/o sacarosa positiva (fermentación de lactosa y/o sacarosa)
- Rojo o sin cambios: lactosa y sacarosa negativos (sin fermentación de lactosa o sacarosa)

la mayoría de los cultivos típicos de salmonella muestran inclinaciones alcalinas y extremos ácidos con formación de gas (burbujas) y formación de sulfuro de hidrógeno

**Medio Descarboxilación** L-Lisina: inocular justo debajo de la superficie del medio líquido.

la turbidez y el color púrpura después de la incubación indican una reacción positiva. un color amarillo indica una reacción negativa.

**Urea:** Estriar la superficie inclinada del agar; si la reacción es positiva, se hidroliza la urea liberando amoníaco. esto cambia el color del rojo fenol a rosado y luego a cereza intenso. La reacción es a menudo evidente después de 2 a 4 horas. *Salmonella* spp. son ureasa negativa (sin cambios en el color o el color anaranjado del medio).

**Tabla 2.:**

*Interpretación de pruebas bioquímicas. Extraído de ISO 6579-1. 2017 todos los derechos reservados.*

Test	Cepa <i>Salmonella</i>						
	<i>S.Ty phi</i>	<i>S.Paraty phi A</i>	<i>S.Paraty phi B</i>	<i>S.Paraty phi C</i>	<i>S.Gallinarum biovar gallinarum</i>	<i>S.Gallinarum biovar pullorum</i>	<i>otras cepas</i>
	Reacción						
TSI (ácido de la glucosa)	+	+	+	+	+	+	+
TSI (gas de la glucosa)	-	+	+	+	+	+	+
TSI (ácido de la lactosa)	-	-	-	-	-	-	-
TSI (ácido de la sacarosa)	-	-	-	-	-	-	-
TSI producción de sulfuro de hidrogeno	+	+	+	+	*	*	+
Hidrólisis de Urea	-	-	-	-	-	-	-
Descarboxilación de lisina	-	-	+	+	-	-	+

\* = Resultados variables

✓ **Serotipificación con antisueros Poly O y Poly H:**

Usando un cuentagotas, una gota de cada antisuero, Poly O y Poly H, se coloca por separado en una placa estéril.

Con la ayuda de un asa de inoculación estéril, se extrae una pequeña alícuota de crecimiento de la placa y se ralentiza la propagación dentro de los antisueros Poly O. Se observa la coagulación de esta mezcla, lo que indicaría la presencia de proteínas de la pared celular de Salmonella.

Si se observa un resultado positivo con un antisuero Poly O, otra asada para confirmar la presencia de proteínas flagelares de Salmonella, repitiendo el proceso en el último paso usando los antisueros Poly H.

### **III. Aportes más destacables a la Empresa/Institución**

- Apoyo a las implementaciones de métodos y de análisis de en los ensayos de aptitud interlaboratorios.
- Apoyo en los procesos de implementación, mantenimiento y la mejora del sistema de gestión.
- Participante en las actividades de Entrenamiento de Sistema de Gestión y Entrenamiento Técnico General y Específico
- Participante en las actividades de Difusión de procedimientos Operativos, Capacitación en las tareas.
- Participante en actividades de Capacitación para fines de autorización de competencia técnica.
- Participante en auditorías ante INACAL, en diferentes ensayos acreditados con los que contaba el laboratorio.
- Participante en los interlaboratorios con resultados victoriosos de diferentes ensayos, que se llevaban a cabo y muy importante para que la competencia técnica del laboratorio y analista se mantenga vigente.

#### IV. Conclusiones

4.1. Bergamo et al. (2018) comparó el método 3M MDS® ,descrito en la AOAC Official Method 2016.01, con otros métodos oficiales como ISO 6579 método descrito por la Organización Internacional para Estandarización y El método descrito por la Norma 62 del Ministerio Brasileño de Agricultura, Ganadería y Abastecimiento (MAPA); encontrando que el método 3M MDS® es confiable porque revelaron sensibilidad y especificidad equivalentes a los otros dos métodos, presentando así a 3M MDS® como una posible alternativa viable para la detección de *Salmonella spp.* principalmente para productos lácteos y cárnicos.

4.2. Como ya se mencionó antes, el método 3M MDS® se basa en la amplificación isotérmica mediada por bucle (LAMP) y la bioluminiscencia. Sánchez et al. (2014) menciona las ventajas de la técnica LAMP frente a técnicas más convencionales como: PCR y PCR en tiempo real. Destacando su propiedad isotérmica la cual le permite a la polimerasa trabajar a temperaturas de entre 60-65 °C.

4.3. Otra ventaja del método 3M MDS® es que durante la amplificación del ADN se forma pirofosfato. El pirofosfato se convierte luego en ATP. El APT producido reacciona luciferasa, dando como resultado la producción de luz; en caso de la PCR esto no sucede debido a que el pirofosfato es hidrolizado a 94 °C (Bergamo & Avila;2021).

4.4. En conclusión, 3M MDS® es un sistema que combina la capacidad isotérmica de la técnica LAMP y la complementa con bioluminiscencia, para dar como resultado una herramienta no solo eficaz si no también específica a la hora de detectar a *Salmonella* presentes en alimentos.



## V. Recomendaciones

5.1. Para evitar la contaminación cruzada, destapar una tira de tubo de reactivo por vez y usar una nueva punta de pipeta para cada paso de transferencia

5.2. Una vez terminado el ensayo, retirar la bandeja y deseche los microtubos sumergiéndolos 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.

## VI. Referencias

- AOAC. (2016). Official Method 2016.01 *Salmonella* spp. in *Select Foods and Environmental Surfaces Official methods of analysis to AOAC international*.
- Bergamo G., Timm C.D., Carvalho N.R., Helbig E., y Gandra E A. (2018) Comparison between the 3M MDS® method and phenotypic methods to detect *Salmonella* spp. In *foods*. LWT 97:693–696.
- EU. RASFF – *The Rapid Alert System for Food and Feed* – Annual Report 2020  
[http://ec.europa.eu/food/safety/rasff/index\\_en.htm](http://ec.europa.eu/food/safety/rasff/index_en.htm)
- FDA. (2012). *Bad Bug Book, Foodborne Pathogenic Microorganisms and Natural Toxins*. Second Edition. [*Salmonella* spp, pp .9-13]. *Microorganisms and Natural Toxins Handbook*. [http://www. https://www.fda.gov/food/foodborne-pathogens/bad-bug-book-second-edition](http://www.fda.gov/food/foodborne-pathogens/bad-bug-book-second-edition).
- Gill, P. y Amree, A.H. (2020). As-LAMP, A new and alternative method of genotyping. *Avicenna Journal of Medical Biotechnology*, 12 (1), 2-8.
- Bergamo, G. y Avila, E. (2021). Detection of *Salmonella* by the 3M Molecular Detection Assays: MDS® Method. En: Heide Schatten (ed.), *Salmonella: Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology*, 2182, 33-38. [https://doi.org/10.1007/978-1-0716-0791-6\\_4](https://doi.org/10.1007/978-1-0716-0791-6_4)
- Sanchez E., Nina M., Aguirre P., Arce M., Toro N. y Vilela R. (2014). Amplificación isotérmica mediada por LOOP (LAMP) de ácidos nucleicos en el diagnóstico clínico. *Revista Con-ciencia*, 2(1), 125-138

Shu-Kee, E., Priyia, P., Nurul-Syakima, A., Hooi-Leng, S., Kok-Gan, C., & Learn-Han, L.

(2015)). Salmonella: A review on pathogenesis, epidemiology and antibiotic resistance. *Frontiers in Life Science*, 8:3, 284-293.

doi:<https://www.tandfonline.com/action/showCitFormats?doi=10.1080/21553769.2015.1051243>

5.1051243

## VII. Anexos

### Anexo A: Principios Ensayo de Detección Molecular 2 para *Salmonella* 3M™.

**Figura 2:**

Representación gráfica de la detección molecular para *Salmonella* 3M™.



#### Amplificación de ADN ISOTÉRMICA

La amplificación isotérmica mediada por bucle está impulsada por la polimerasa de ADN Bst robusta, que utiliza seis cebadores diferentes para una alta especificidad.



#### Detección de bioluminiscencia

La generación exponencial de pirofosfato (ppi) se convierte en trifosfato de adenosina por (ATP) ATP-SULFURILASA



La luciferasa utiliza ATP para generar luz, proporcionando detección en tiempo real en tan solo 15 minutos

### **Anexo B: Principios de la técnica LAMP.**

La reacción LAMP, amplifica el gen gracias a la repetición de dos tipos de cebadores los externos (F3 y B3) y los cebadores internos. El cebador interno directo (FIP) consiste en la zona F2 en el extremo 3' similar a la secuencia de F1c en el extremo 5', complementario a la zona F2c, a su vez el cebador interno (BIP) consiste en la zona B2 en el extremo 3' similar a la región B1c en el extremo 5', complementaria a B2c(Gill & Hadian;2020).

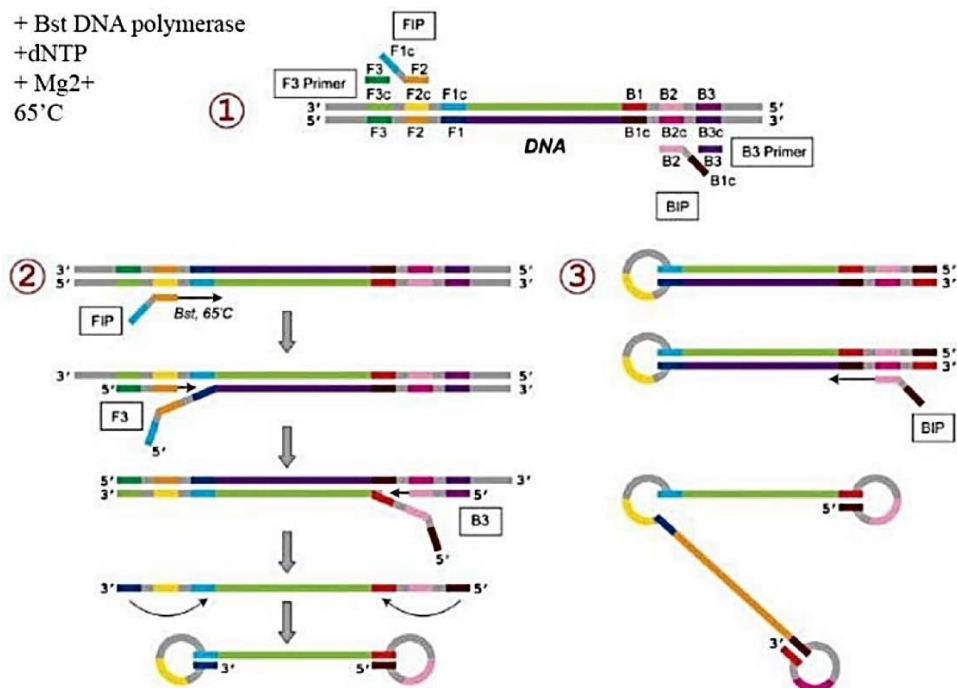
Los dos cebadores internos son complementarios a la zona “downstream” de la hebra opuesta (F1 y B1). Además de los cebadores, la reacción también requiere de trifosfatos de desoxinucleótidos (dNTP), betaína de magnesio, tampón para la enzima y polimerasa Bst (*Bacillus stearothermophilus*).

La polimerasa Bst tiene actividad helicasa, por lo que no es necesario denaturar el ADN, permitiendo así que la reacción se desarrolle a una temperatura estable de 60 -65 °C.

Los productos de amplificación, tienen una estructura de ADN de bucle de tallo, consisten en numerosas repeticiones invertidas de la región objetivo y estructuras similares con múltiples bucles (Gill & Hadian;2020).

**Figura 3:**

*Representación gráfica de la amplificación isotérmica mediada por bucle (LAMP).*

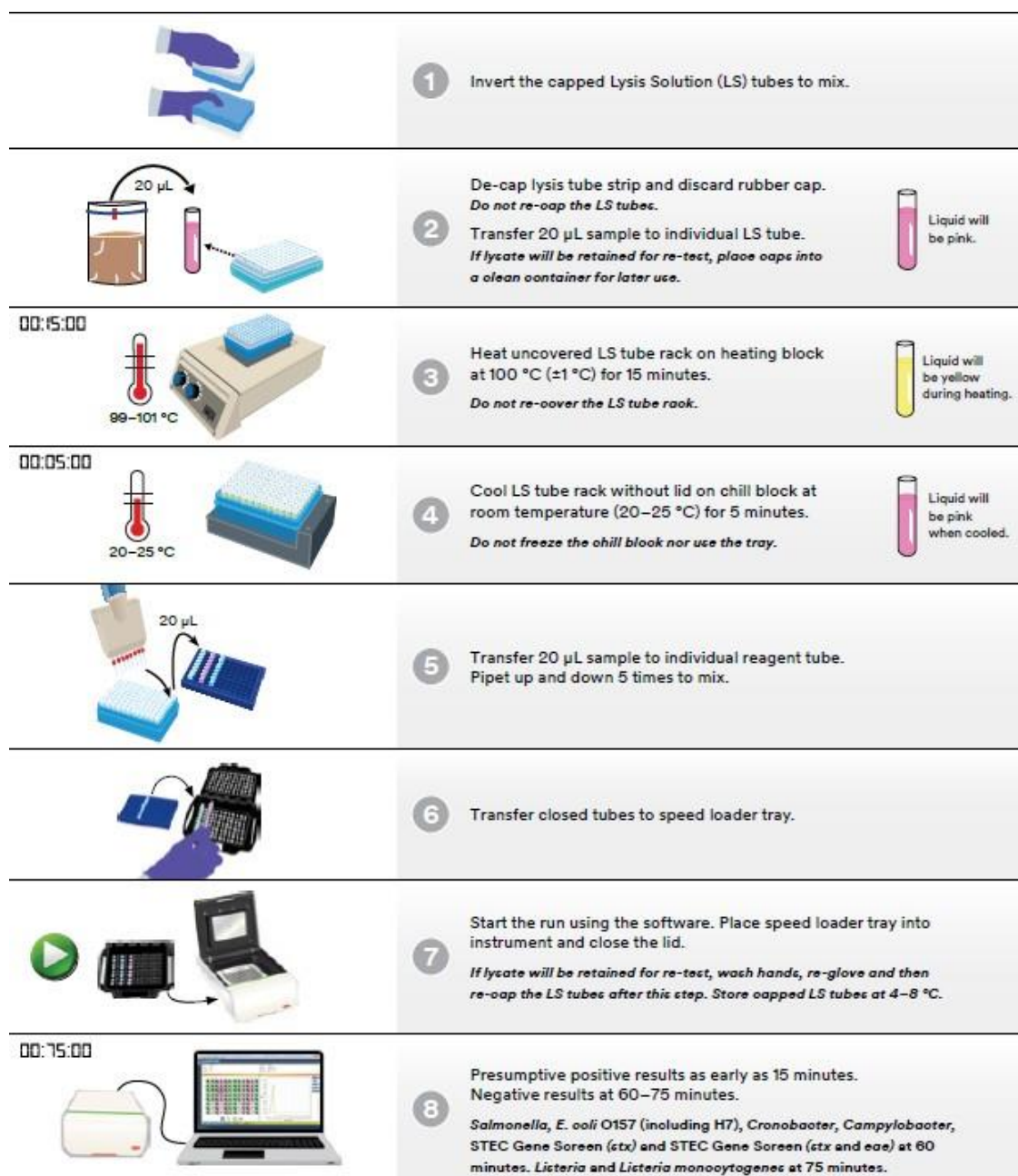


## Anexo C: Flujograma del procedimiento del ensayo.

**Figura 4:**

*Flujograma de la detección molecular para Salmonella 3M™. Extraído de las instrucciones de Ensayo de Detección Molecular 2 para Salmonella 3M™ (3M MDA™).*

2019



## Anexo D: Iconografía de posibles resultados.

**Figura 5:**  
Iconografía de los posibles resultados del ensayo Detección Molecular 2 para *Salmonella* 3M™ (3M MDA™). Extraído de las instrucciones de Ensayo de Detección Molecular

Tipo de hoyo	Símbolo de resultado del hoyo	Resultado	Interpretación
Muestra		Positivo	La muestra es presuntiva positiva para el patógeno objetivo.
Muestra		Negativo	La muestra es negativa para el patógeno objetivo.
Muestra		Inhibido	La matriz de la muestra fue inhibidora para el análisis. Es posible que se deba repetir la prueba. Para obtener más información, consulte la sección de Diagnóstico de fallas y las instrucciones del producto para el kit de análisis.
Muestra		Inspeccionar	La presencia o ausencia del patógeno objetivo era indeterminada. Es posible que se deba repetir la prueba. Para obtener más información, consulte la sección de Diagnóstico de fallas y las instrucciones del producto para el kit de análisis.
Muestra		Error	No se detectó bioluminiscencia. Es posible que se deba repetir la prueba. Para obtener más información, consulte la sección de Diagnóstico de fallas y las instrucciones del producto para el kit de análisis.
Control de reactivos		Válido	El Control de reactivos fue válido.
Control de reactivos		No válido	El Control de reactivos no fue válido. Es posible que se deba repetir la prueba. Para obtener más información, consulte la sección de Diagnóstico de fallas y las instrucciones del producto para el kit de análisis.
Control de reactivos		Inspeccionar	El Control de reactivos fue indeterminado. Es posible que se deba repetir la prueba. Para obtener más información, consulte la sección de Diagnóstico de fallas y las instrucciones del producto para el kit de análisis.
Control de reactivos		Error	No se detectó bioluminiscencia. Es posible que se deba repetir la prueba. Para obtener más información, consulte la sección de Diagnóstico de fallas y las instrucciones del producto para el kit de análisis.
Control negativo		Válido	El Control negativo fue válido.
Control negativo		No válido	El Control negativo no fue válido. Es posible que se deba repetir la prueba. Para obtener más información, consulte la sección de Diagnóstico de fallas y las instrucciones del producto para el kit de análisis.
Control negativo		Inspeccionar	El Control negativo fue indeterminado. Es posible que se deba repetir la prueba. Para obtener más información, consulte la sección de Diagnóstico de fallas y las instrucciones del producto para el kit de análisis.
Control negativo		Error	No se detectó bioluminiscencia. Es posible que se deba repetir la prueba. Para obtener más información, consulte la sección de Diagnóstico de fallas y las instrucciones del producto para el kit de análisis.
Control de Matriz		Válido	El Control de matriz fue válido.
Control de Matriz		Inhibido	La matriz de la muestra fue inhibidora para el control de la matriz. Es posible que se deba repetir la prueba. Para obtener más información, consulte la sección de Diagnóstico de fallas y las instrucciones del producto para el kit de análisis.
Control de Matriz		Error	No se detectó bioluminiscencia. Es posible que se deba repetir la prueba. Para obtener más información, consulte la sección de Diagnóstico de fallas y las instrucciones del producto para el kit de análisis.



## Anexo E: Ejemplo de resultados.

### Software de Detección Molecular 3M

#### Reporte de la corrida

Id. de la corrida	05092022(1)	Fecha de la corrida	09/05/2022 11:57:28 a. m.
Estado de la corrida	Completado	Usuario	Esthefany Burgos
Técnico	Esthefany Burgos	Reportado por	Esthefany Burgos
Comentario de la corrida	AOAC 2016.01. 21st Edition. Confirmación por AOAC 967.26.2019. Validado (Aplicado fuera	equipo	0216020047-216020047

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B												
C												
D												
E												
F												
G												
H												

Id. de pozo	Id. de muestra	Tipo de ensayo	Gen Objetivo	Tipo de pozo	Número de Lote de kit	Resultado	Final Result	Comentarios
A3	15268-22	Salmonella-2		Muestra	8735277	Negativo		
B3	CONTROL CEPA 10	Salmonella-2		Muestra	8735277	Positivo		
C3	CONTROL CEPA 43	Salmonella-2		Muestra	8735277	Positivo		
D3		Salmonella-2		Control negativo	8735277	Válido		
E3		Salmonella-2		Control de reactivos	8735277	Válido		

### Todos los resultados

