



**FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES Y MATEMÁTICA**

USO DEL MÉTODO DE DETECCIÓN GENÉTICA ASSURANCE GDSTM PARA LA  
DETECCIÓN DE Salmonella spp. EN ALIMENTOS, EN UN LABORATORIO DE  
SERVICIOS DE ANÁLISIS MICROBIOLÓGICOS (Callao)

**Línea de investigación:**

**Microbiología, parasitología e inmunología**

Trabajo de suficiencia profesional para optar el Título Profesional de  
Licenciada en Biología

**Autora:**

Grundy Linares, Elena Erika

**Asesor:**

Salas Asencios, Ramsés  
(ORCID: 0000-0002-4075-1736)

**Jurado:**

Rodrigo Rojas, Maria Elena  
Murrugarra Bringas, Victoria Ysabel  
Mayanga Herrera, Ana Lucia

**Lima - Perú**

**2022**

**Referencia:**

Grundy, E. (2022). *Uso del método de Detección Genética Assurance GDS™ para la detección de Salmonella spp. en alimentos, en un laboratorio de servicios de análisis microbiológicos (Callao)*. [Trabajo de suficiencia profesional, Universidad Nacional Federico Villarreal]. Repositorio Institucional UNFV. <http://repositorio.unfv.edu.pe/handle/UNFV/5999>



**Reconocimiento - No comercial - Sin obra derivada (CC BY-NC-ND)**

El autor sólo permite que se pueda descargar esta obra y compartirla con otras personas, siempre que se reconozca su autoría, pero no se puede generar obras derivadas ni se puede utilizar comercialmente.

<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>



FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES Y MATEMÁTICA

USO DEL MÉTODO DE DETECCIÓN GENÉTICA ASSURANCE GDS™ PARA LA  
DETECCIÓN DE *Salmonella spp.* EN ALIMENTOS, EN UN LABORATORIO DE  
SERVICIOS DE ANÁLISIS MICROBIOLÓGICOS (Callao)

Línea de investigación:

Microbiología, parasitología e inmunología

Trabajo de Suficiencia profesional para optar el Título de Licenciado en Biología

Autor:

Grundy Linares, Elena Erika

Asesor:

Salas Asencios, Ramsés

(ORCID: 0000-0002-4075-1736)

Jurado:

Rodrigo Rojas, Maria Elena

Murrugarra Bringas, Victoria Ysabel

Mayanga Herrera, Ana Lucia

Lima – Perú

2022

## **AGRADECIMIENTOS**

Agradezco a mis padres por ser el apoyo y fortaleza en aquellos momentos de dificultad y debilidad.

Gracias a mis maestros de la Facultad de Ciencias Naturales y Matemática de la Universidad Nacional Federico Villarreal, por haber compartido sus conocimientos a lo largo de mi formación.

Agradezco a mis amigos y colegas por estar siempre presentes, acompañándonos a lo largo de esta etapa de nuestras vidas.

## ÍNDICE

<b>RESUMEN.....</b>	<b>5</b>
<b>ABSTRACT.....</b>	<b>6</b>
<b>I. INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>7</b>
1.1. Trayectoria.....	8
1.2. Descripción de la empresa.....	9
1.3. Organigrama de la empresa.....	10
1.3.1. <i>Organigrama general</i> .....	10
1.3.2. <i>Organigrama de División Agri Food</i> .....	11
1.4. Áreas y funciones desempeñadas.....	12
1.4.1. <i>Área: Agri Food - Laboratorio de Microbiología</i> .....	12
1.4.2. <i>Funciones</i> .....	12
<b>II. DESCRIPCIÓN DE UNA ACTIVIDAD ESPECÍFICA.....</b>	<b>14</b>
2.1. Conceptos previos.....	14
2.1.1. <i>Importancia del análisis microbiológico de alimentos</i> .....	14
2.1.2. <i>Género Salmonella</i> .....	15
2.1.2.1. <i>Taxonomía</i> .....	15
2.1.2.2. <i>Epidemiología</i> .....	15
2.2. Métodos de detección de <i>Salmonella spp</i> .....	16
2.2.1. <i>Métodos convencionales</i> .....	17
2.2.2. <i>Métodos rápidos</i> .....	18
2.3. Sistema de detección genética (GDS).....	18
2.3.1. <i>Definiciones técnicas</i> .....	18
2.3.2. <i>Características</i> .....	19
2.3.3. <i>Fundamento de la técnica</i> .....	20

2.3.4. Instrumentos, materiales y reactivos.....	21
2.3.4.1. Instrumentos.....	21
2.3.4.2. Materiales.....	21
2.3.4.3. Reactivos.....	22
2.3.4.4. Materiales de referencia.....	22
2.3.5. Procedimiento.....	22
2.3.5.1. Enriquecimiento de las muestras.....	23
2.3.5.2. Protocolo de preparación de reactivos y muestras.....	23
A. Preparación de reactivos GDS.....	23
B. Preparación de las muestras.....	24
2.3.5.3. Amplificación y detección.....	26
2.3.5.4. Interpretación y reporte de resultados de las pruebas.....	28
2.3.5.5. Aislamiento, confirmación bioquímica y serología de las muestras.....	29
A. Enriquecimiento selectivo.....	29
B. Aislamiento en agares selectivos.....	29
C. Selección de las colonias para confirmación.....	29
D. Confirmación bioquímica y serológica.....	30
<b>III. APORTES DESTACABLES A LA INSTITUCIÓN.....</b>	<b>32</b>
<b>IV. CONCLUSIONES.....</b>	<b>33</b>
<b>V. RECOMENDACIONES.....</b>	<b>34</b>
<b>VI. REFERENCIAS .....</b>	<b>35</b>
<b>VII. ANEXOS .....</b>	<b>38</b>

## RESUMEN

La industria de alimentos enfrenta diversos retos en el proceso de fabricación de productos inocuos para el ser humano. Uno de los principales inconvenientes que se presentan en esta industria y que además genera importantes pérdidas, es la contaminación bacteriana, especialmente con agentes patógenos como el género *Salmonella*, que según la Organización Mundial de la Salud es una de las cuatro principales causas de enfermedades diarreicas en seres humanos. Debido a la gran incidencia de este patógeno, las industrias de alimentos requieren de servicios rápidos y confiables para la detección de los mismos. Una alternativa a los métodos tradicionales de detección de *Salmonella spp.*, son los métodos de detección genética, que son altamente sensibles y que además proporcionan resultados mucho más rápidos. Se describe el uso y las ventajas del sistema Assurance GDS™, aplicado al análisis de alimentos (Productos hidrobiológicos, frutas y hortalizas) en un laboratorio de servicios de análisis microbiológicos, teniendo como referencia la metodología aplicada en la norma AOAC Official Method 2009.03

*Palabras clave:* Assurance GDS™, métodos de detección genética, *Salmonella spp.*, industria de alimentos, agentes patógenos.

## ABSTRACT

The food industry faces a lot of challenges in the process of manufacturing safe products for humans. One of the main drawbacks in this industry, which also generates significant losses, is bacterial contamination, especially with pathogens such as the *Salmonella* genus, which according to the World Health Organization is one of the four main causes of diarrheal diseases in humans. Due to the high incidence of this pathogen, food industries require fast and reliable services for their detection. An alternative to traditional detection methods for *Salmonella* spp., are genetic detection methods, which are highly sensitive and also provide much faster results. The use and advantages of the Assurance GDS™ system are described, applied to food analysis (Seafood, fruit and vegetables) in a microbiological analysis services laboratory, taking as a reference the methodology applied in the AOAC Official Method 2009.03 standard.

*Keywords:* Assurance GDS™, genetic detection methods, *Salmonella* spp., food industry, pathogens.

## I. INTRODUCCIÓN

Las enfermedades de transmisión alimentaria (ETA's) constituyen un problema común en todo el mundo, afectando la salud de millones de personas y generando cuantiosas pérdidas económicas.

Entre las principales ETA's se encuentra la salmonelosis (causada por el género bacteriano *Salmonella*), una de las enfermedades de transmisión alimentaria más común y ampliamente extendida. Se estima que afecta anualmente a decenas de millones de personas de todo el mundo y provoca más de cien mil defunciones (Organización Mundial de la Salud, s.f.). El hombre adquiere la infección después de la ingestión de alimentos contaminados, aunque también puede transmitirse de persona a persona o por vía fecal-oral (OMS, s.f.)

Frente a esta problemática, el aseguramiento de la inocuidad de los alimentos involucra toda la cadena alimenticia, desde la producción al consumo. Para ello debe existir un sistema de control de alimentos que incluya además de normativas, una adecuada gestión, inspección y servicios de análisis de laboratorios acreditados.

Los resultados analíticos de un laboratorio de control son un componente esencial dentro del sistema de control de alimentos, estos suelen utilizarse como prueba ante las autoridades para determinar el cumplimiento de las normas y reglamentos de un país, por ello, se debe garantizar el funcionamiento eficiente y eficaz del laboratorio, así como la exactitud y fiabilidad de los métodos utilizados y los resultados obtenidos.

La determinación de *Salmonella spp.* puede realizarse mediante diferentes métodos. El método ideal debe tener una alta sensibilidad y especificidad, y al mismo tiempo simple, rápido y económico (Colello et al., 2018). Normalmente los métodos tradicionales para la detección *Salmonella spp.* requieren de 4 a 5 días para la obtención de un resultado, lo que muchas veces termina siendo un inconveniente para la industria.

Entre las alternativas que existen para la determinación de *Salmonella spp.* se encuentran las técnicas basadas en los principios de Biología Molecular y en las que es aconsejable apoyarse, puesto que son capaces de acortar los tiempos de entrega de resultados, como es el caso de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) cuyos inicios se remontan a 1971, cuando se describió por primera vez un método que usaba enzimas para replicar una secuencia pequeña de ADN *in vitro* (Colello et al., 2018), y que representa una valiosa herramienta para el estudio de genes a nivel mundial.

Una herramienta de estudio basada en técnicas moleculares es el Assurance GDS™ (Sistema de Detección Genética), que es un sistema automatizado de amplificación del ADN, para la detección de bacterias patógenas en alimentos, ingredientes y muestras de ambiente. El Assurance GDS™ usa sus propias sondas y cebadores específicos dirigido contra un grupo altamente conservado de la secuencia de ADN del organismo diana, y también sus propios dispositivos y reactivos para concentrar la población de microorganismos de interés y eliminar los microorganismos potencialmente competitivos (AOAC, 2015).

El presente informe tiene como objetivo detallar el uso del sistema Assurance GDS™ para la detección de *Salmonella spp.* en alimentos, en un laboratorio de análisis microbiológicos en Callao, y explicar las múltiples ventajas que ha generado su uso en la empresa.

## **1.1. Trayectoria**

### **Octubre 2020 – Octubre 2021**

Inspectorate Services Perú S.A.C.

Área: Agri Food – Laboratorio de Microbiología

Puesto: Analista Junior II

### **Octubre 2018 – Octubre 2020**

Inspectorate Services Perú S.A.C.

Área: Agri Food – Laboratorio de Microbiología

Puesto: Analista Junior I

**Noviembre 2017 – Octubre 2018**

Sociedad de Asesoramiento Técnico S.A.C.

Área: Laboratorio de Microbiología

Puesto: Analista

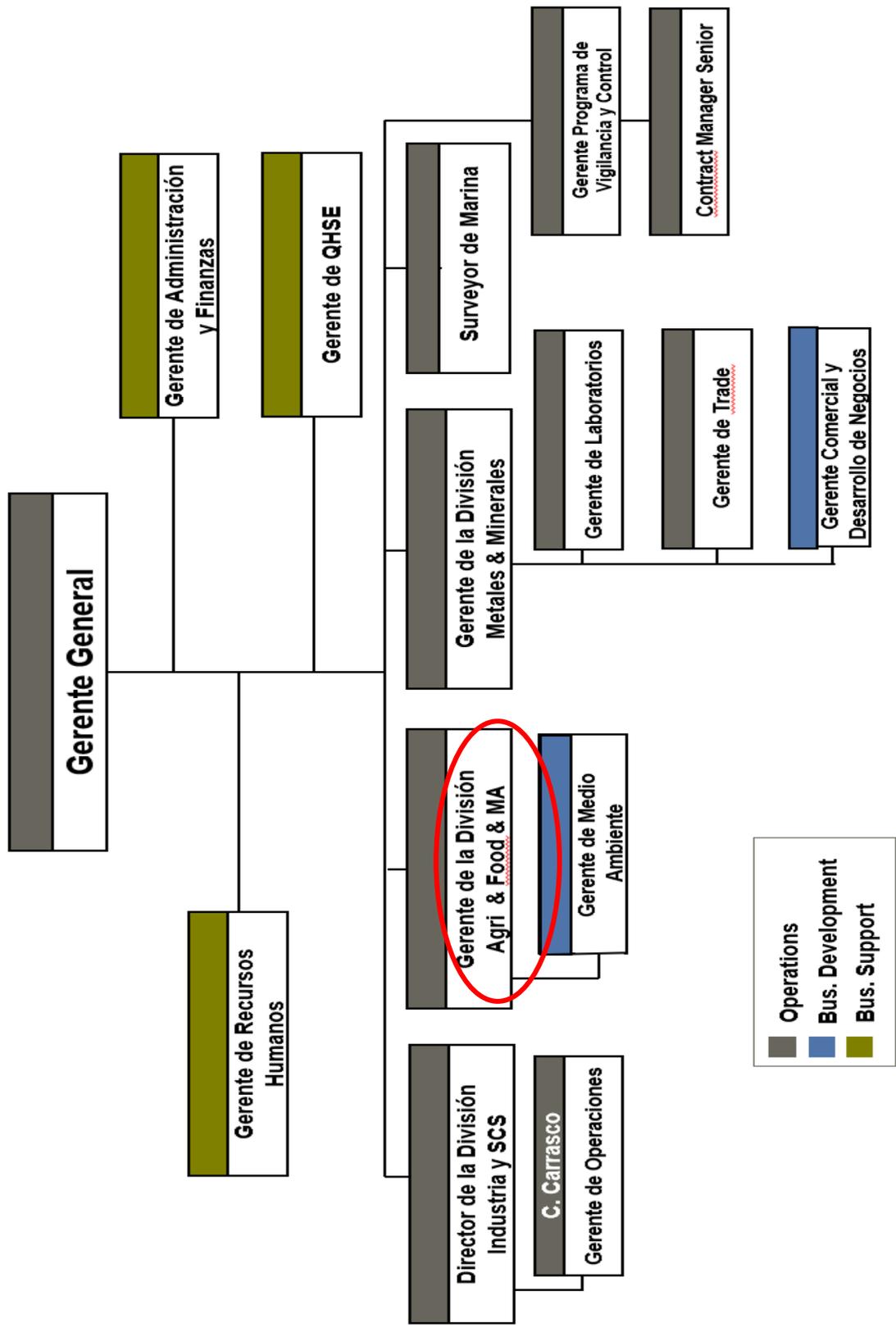
## **1.2. Descripción de la empresa**

Inspectorate Services Perú S.A.C. es una empresa que presta diversos servicios a nivel nacional e internacional, incluyendo los de inspección, ensayos, muestreos, análisis de laboratorio, monitoreo del medio ambiente y consultoría, certificados fitosanitarios, control de consolidación de bodegas, entre otros. 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.

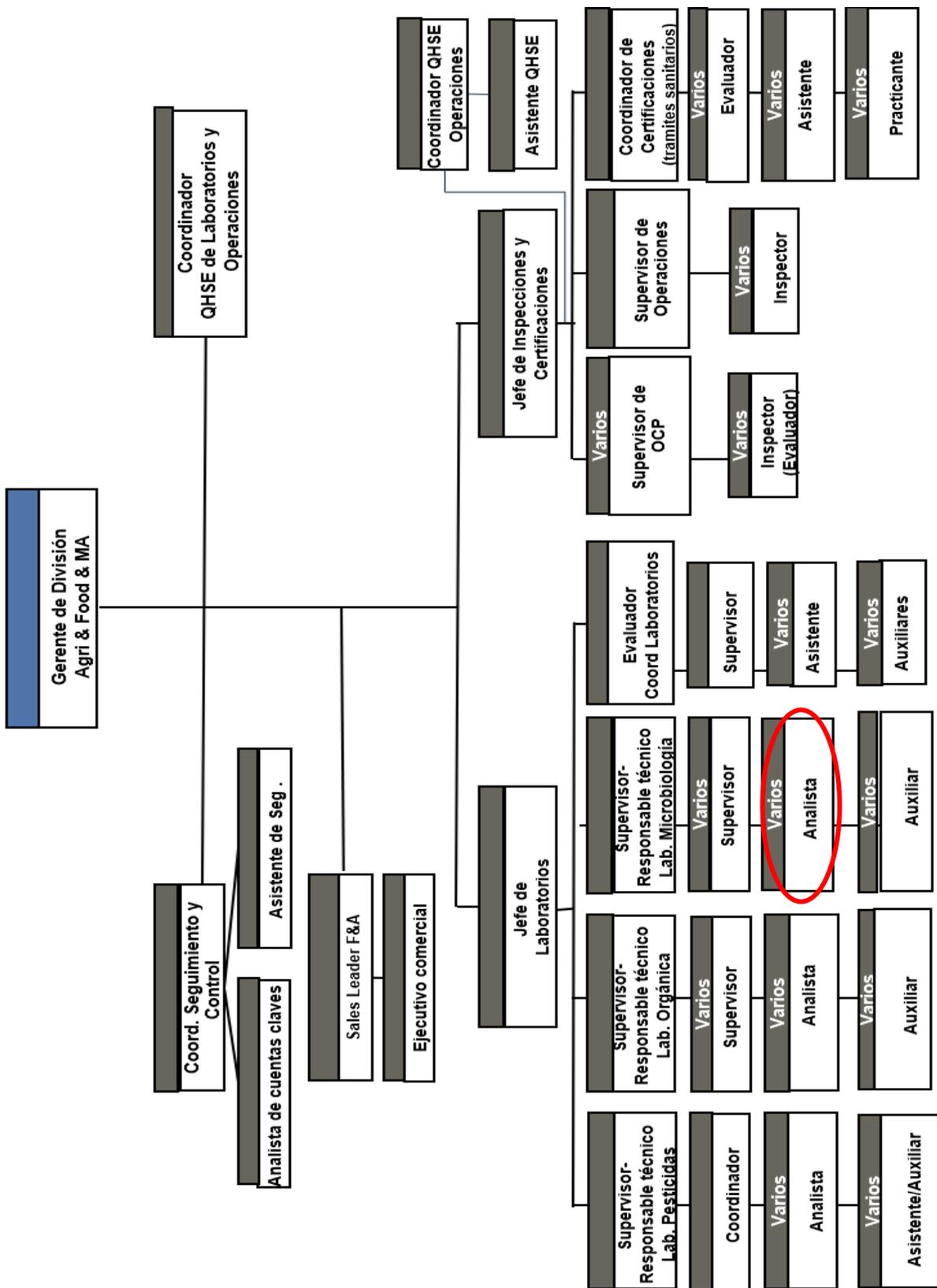
## **1.3. Organigrama de la empresa**

1.3.1. Organigrama general



Operations
Bus. Development
Bus. Support

1.3.2. Organigrama de División Agri Food



## **1.4. Áreas y funciones desempeñadas**

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

#### **1.4.2. Funciones:**

- Ejecutar los ensayos según los requerimientos establecidos en la Solicitud de Servicio, de acuerdo a la planificación realizada, indicaciones impartidas, según metodología establecida y siguiendo las directrices del Procedimiento para la recepción de muestras, ejecución de los análisis y reporte de los resultados en el laboratorio de microbiología, según la autorización delegada.
- Cumplir con las disposiciones establecidas en el Manual de Buenas Prácticas del Laboratorio.
- Apoyar en los procesos de implementación, mantenimiento y la mejora del sistema de gestión.
- Participar en las actividades de Entrenamiento de Sistema de Gestión y Entrenamiento Técnico General.
- Informar a la Jefatura y Supervisora sobre desviaciones observadas, incumplimientos de procesos o procedimientos para la realización de las actividades del laboratorio o incidentes referidos al sistema de Calidad / Seguridad / Gestión de Equipos según corresponda.
- Elaborar la documentación en forma completa, correcta, precisa, clara y debidamente firmada siguiendo las directrices del laboratorio.
- Participar en las actividades de Difusión de procedimientos Operativos, Capacitación en las tareas.
- Participar en actividades de Capacitación para fines de autorización de competencia técnica.
- Capacitar al personal que se encuentre bajo entrenamiento.

- Participar activamente en la elaboración y reporte de los Índices de Seguridad según corresponda.
- Comunicar los incidentes o accidentes, condiciones o actos inseguros en temas de seguridad, salud y medioambiente.
- Asistir a las charlas, capacitación y cursos dispuestos por la empresa.

## II. DESCRIPCIÓN DE UNA ACTIVIDAD ESPECÍFICA

### 2.1. Conceptos previos

#### 2.1.1. *Importancia del análisis microbiológico de alimentos*

El deterioro de los alimentos es uno de los problemas más comunes en la industria alimentaria, una de las principales causas lo constituyen los microorganismos como bacterias y hongos. A lo largo de la historia, las personas ya tenían conocimientos prácticos sobre el deterioro de los alimentos y la conservación de los mismos, esto mucho antes de que el trabajo de importantes científicos como Louis Pasteur o Robert Koch nos permitiera comprender distintos mecanismos y contar con herramientas útiles para la industria (Custer, 2014).

La microbiología de alimentos evolucionó así, a medida que se han ido incorporando nuevas herramientas y técnicas con las cuales se revelaron diversos problemas, pero también soluciones. El análisis microbiológico en alimentos está destinado a asegurar la inocuidad de los mismos, ya que uno de los requisitos para el consumo humano es la ausencia de microorganismos patógenos que puedan originar trastornos al organismo (DIGESA, 2001).

Para evidenciar la presencia de bacterias u otros microorganismos patógenos contaminantes es necesario efectuar exámenes microbiológicos del alimento, así se determinará si la contaminación sobrepasa los límites permisibles, pudiendo relacionar estos resultados con la correcta o incorrecta manipulación de los mismos (DIGESA, 2001).

Una adecuada detección de altos niveles de contaminación microbiana, evitaría que un producto potencialmente peligroso llegue al consumidor final, rompiendo así la cadena de transmisión de una posible enfermedad.

### 2.1.2. Género *Salmonella*

*Salmonella* es uno de los géneros perteneciente a la familia *Enterobacteriaceae*. Se caracterizan por ser bacterias Gram negativas, no esporuladas, anaerobias facultativas y mesófilas con una temperatura óptima de crecimiento de 35 – 37°C (Ray, 2014).

**2.1.2.1. Taxonomía.** Según la nomenclatura adoptada por el CDC (Centers for Disease Control and Prevention), el género *Salmonella*, contiene solo dos especies: *Salmonella enterica* y *Salmonella bongori*.

*S. enterica* se subdivide en seis subespecies llamadas (o numeradas) como sigue: *enterica* (I), *salamae* (II), *arizonae* (IIIa), *diarizonae* (IIIb), *houtenae* (IV), *indica* (VI). Por otro lado, *S. bongori* no tiene subespecies. Ambas especies de *Salmonella* y las subespecies han sido serotipadas para su posterior identificación (CDC, 2011).

También podemos clasificar *Salmonella spp.* desde el punto de vista epidemiológico en tres grupos (Caffer y Terragno, 2001):

- Las que no tienen preferencia por algún huésped específico, pudiendo infectar al hombre y otros animales. Aquí encontramos a la mayor parte de serovariedades responsables de las salmonelosis.
- Las que infectan exclusivamente al hombre: *Salmonella typhi*, *S. paratyphi* A y *S. paratyphi* C, que se transmiten de forma directa o indirecta de una persona a otra.
- Las que están adaptadas a un huésped en especies animales: *S. abortusovis* (en ovinos), *S. abortusequi* (en equinos) y *S. gallinarum* (en aves).

**2.1.2.2. Epidemiología.** La bacteria salmonela causa la salmonelosis, una enfermedad transmitida a través de los alimentos. Se conoce que esta bacteria lleva causando enfermedades

en las personas desde 1885. Las personas suelen infectarse al comer alimentos contaminados crudos o poco cocidos como productos cárnicos, aves de corral, huevos y productos a base de huevo, frutas y verduras, leche sin pasteurizar, etc. (FDA, 2020).

También es posible la infección a través de la manipulación de alimentos contaminados, transmitiendo accidentalmente las bacterias de las manos a la boca o a objetos y superficies (FDA, 2020).

Otra fuente potencial son muchos animales como el ganado vacuno, pollos, roedores, reptiles, anfibios, etc. Estos portan a *Salmonella* de forma natural en sus intestinos y aunque no muestran los signos de enfermedad las personas pueden contraer salmonelosis al manipular estos animales (FDA, 2020).

Las infecciones asociadas a *Salmonella spp.* varía ampliamente según el tipo de involucrado. Podemos limitar las definiciones a dos tipos de cepas, *Salmonella* Tifoidea y *Salmonella* No Tifoidea (NTS) (Sánchez-Vargas et al, 2011).

La salmonela tifoidea incluye a *S. enterica*, *subespecie enterica*, serotipos *typhi* y *paratyphi*, las que causan la fiebre entérica que puede conducir a una enfermedad grave y hasta mortal, afectando principalmente a países desatendidos. El último grupo (NTS) incluye a las cepas restantes y son causantes de infecciones que tienden a ser autolimitadas y afectan a comunidades en todo el mundo (Hardy, 2004).

## **2.2. Métodos de detección de *Salmonella spp.***

La detección de *Salmonella spp.* puede darse mediante diferentes métodos que pueden ser convencionales o rápidos. Entre los métodos más usados comúnmente se encuentran el cultivo microbiológico y las pruebas bioquímicas; sin embargo, existen diversos nuevos métodos que están innovando la detección de *Salmonella* (Colello et al., 2018).

Es deseable que los métodos de detección de *Salmonella* tengan la sensibilidad suficiente para detectar una célula en una muestra definida, por lo que el tiempo de análisis de los métodos convencionales y rápidos puede variar con los pasos de enriquecimiento celular, para alcanzar una concentración celular mínima suficiente para la detección de esta bacteria (Lee et al, 2015).

### **2.2.1. Métodos convencionales**

El aislamiento tradicional de *Salmonella spp.* implica un pre-enriquecimiento no selectivo de un peso o volumen definido de la muestra, seguido de un enriquecimiento selectivo, un sembrado en agares selectivos y finalmente una confirmación selectiva y serológica de las colonias sospechosas aisladas. Existen diferentes enfoques para el enriquecimiento de este microorganismo, de acuerdo a sus propiedades físicas y bioquímicas, los cuales han sido estandarizados por diferentes agencias reguladoras, como por ejemplo la International Organization for Standardization (ISO), Association of Official Analytical Chemists (AOAC), U.S. Food and Drug Administration (FDA), etc (Lee et al, 2015).

Los métodos convencionales sirven de base para muchos laboratorios de seguridad alimentaria y salud pública gracias a la facilidad en su aplicación, fiabilidad de resultados, buena sensibilidad y especificidad y menor costo en comparación con tecnologías emergentes. Sin embargo, estos métodos necesitan de varios pasos para la identificación, lo que puede tomar más de 5 días para el aislamiento y la confirmación. Por otro lado, pueden producirse falsos positivos debido a los microorganismos acompañantes competitivos.

### 2.2.2. Métodos rápidos.

El método rápido puede definirse como aquel que permite la detección de *Salmonella* spp. en muestras y ofrece resultados fiables dentro de unas pocas horas a un día. Los métodos rápidos disponibles comercialmente para la detección de esta bacteria pueden dividirse en varias categorías, incluyendo nuevos medios, procedimientos convencionales modificados o adaptados, ensayos basados en inmunología y ensayos basados en ácidos nucleicos (Lee et al, 2015).

De estos métodos, los procedimientos de ELISA y PCR muestran especificidad y sensibilidad comparables a los métodos convencionales (Figura 1).

Los ensayos de ELISA pueden detectar la concentración de *Salmonella* al nivel de  $10^4$ – $10^5$  / ml, mientras que los ensayos basados en PCR proporcionan el nivel de sensibilidad de  $10^4$  / ml después del enriquecimiento. La sensibilidad y la especificidad de estos métodos dependen en gran medida de la microbiota de fondo, matriz de muestra, presencia de células no cultivables y sustancias inhibidoras, por ejemplo, grasas, proteínas, polisacáridos, metales pesados, antibióticos y compuestos orgánicos (Lee et al, 2015)

## 2.3. Sistema de detección genética (Assurance GDS™)

### 2.3.1. Definiciones técnicas

- Separación Inmunomagnética: La separación inmunomagnética (IMS) es un método que aísla las células usando partículas paramagnéticas recubiertas con anticuerpos específicos y permite acortar el tiempo de enriquecimiento y eliminar las impurezas (Chen et al, 2017).
- Polymerase chain reaction (PCR): Es un procedimiento cíclico in vitro de tres pasos, basado en la capacidad de la ADN polimerasa para copiar una cadena de ADN. Cuando dos cebadores se unen a hebras complementarias de ADN diana, la secuencia intermedia se amplifica exponencialmente con cada ciclo (Mullis y Faloona, 1989)

- Real-time polymerase chain reaction (PCR en tiempo real): En la PCR en tiempo real, los productos se detectan en cada ciclo de la reacción y el aumento de la señal detectada es proporcional a la cantidad de producto amplificado (Uyttendaele et al, 2014).
- Valor Ct: Ciclo que corresponde al punto en el que la fluorescencia de la reacción se eleva por encima del nivel umbral (ISO, 2019).
- Control negativo: Blanco o control libre de “target” incluido a través de todos los pasos del proceso con el fin de monitorear eventos de contaminación cruzada. Se utilizará el caldo de enriquecimiento respectivo como control negativo (ISO, 2019).
- Control positivo: Cepa de referencia que permite verificar la funcionalidad de los componentes de la reacción y evaluar la eficacia del ensayo de PCR (ISO, 2019).
- Control positivo interno: Porción de DNA exógeno usado para confirmar que no se produjo inhibición de la reacción (ISO, 2019).

### **2.3.2. Características**

Assurance GDS<sup>TM</sup> (Genetic Detection System) es un sistema automatizado de amplificación de ácido nucleico para la detección de organismos patógenos en alimentos, ingredientes y muestras ambientales.

El sistema GDS es un método de PCR-RT (Real-time polymerase chain reaction) que incluye la técnica de separación inmunomagnética de inmersión como parte del procedimiento. Esto trae para la metodología las siguientes innovaciones:

- Gracias a la utilización de anticuerpos específicos para capturar el patógeno deseado, a través de inmunobeads (perlas inmunomagnéticas), se logra eliminar inhibidores comunes en los métodos de PCR.
- Concentra el patógeno deseado a partir del medio enriquecido, con lo que se logra reducir el tiempo de preparación de la muestra.

- El GDS utiliza 1ml de muestra enriquecida, frente a menos de 0,01 ml que suelen usar los métodos de PCR convencionales. Esto permite reducir la posibilidad de falsos negativos.
- En el Assurance GDS<sup>TM</sup>, el paso de la extracción ocurre dentro del termociclador, eliminando los riesgos de contaminación, no requiriendo un ambiente reservado para este procedimiento, a diferencia del PCR convencional donde la extracción del ADN se realiza en bloques de calentamiento, lo que exige ambientes especiales.

### ***2.3.3. Fundamento de la técnica***

El método utiliza sondas propias y cebadores específicos dirigidos contra una secuencia de ADN altamente conservada del organismo objetivo a la que se une produciendo de manera inmediata una señal fluorescente que es detectada por el equipo y traducida por el Software por medio de gráficas. Assurance GDS<sup>TM</sup> también utiliza sus propios equipos y reactivos que concentran la cantidad de microorganismo objetivo y elimina la potencial microbiota competitiva (ADRIA, 2021).

Una alícuota de 1 ml de caldo de enriquecimiento es agitado con beads (perlas) magnéticas unidas a anticuerpos del organismo objetivo, y después de 10-20 segundos, los complejos bead-bacteria son colectados con el instrumento PickPen®. Los complejos bead-bacteria colectados y lavados son transferidos a los tubos de amplificación que contienen la polimerasa para ser cargados en el Termociclador Assurance GDS<sup>TM</sup> Rotor-Gene donde se realiza la detección del organismo diana (ADRIA, 2021).

### ***2.3.4. Instrumentos, materiales y reactivos***

#### **2.3.4.1. Instrumentos.**

- Termociclador Assurance GDS<sup>TM</sup> Rotor-Gene Q
- Incubadora a  $36 \pm 1$  °C
- Stomacher®

- Conservadora a 2- 8°C
- Congeladora a  $-20 \pm 5$  °C
- Micropipeta monocanal o multicanal 5 - 50  $\mu$ l
- Micropipeta monocanal 100 - 1000  $\mu$ l
- Repetidora
- Vortex mixer
- PickPen® II
- "Laptop con Assurance GDS™ Rotor-Gene software"

#### **2.3.4.2. Materiales (Anexo A).**

- Guantes de nitrilo.
- Pipetas de 1 mL descartables
- Tips (50  $\mu$ L y 1000  $\mu$ L) con filtro
- PickPen® Tips
- Jeringuilla Combitips advanced (0.5 mL y 10 mL)
- Sample Wells (Pocillos de muestras)
- Sample Wells Base (Base de pocillos de muestra)
- GDS Adhesive Strips (Cintas adhesivas)
- Placa de resuspensión
- Bloque de gel para enfriamiento
- Rack para PickPen® Tips
- Propipeta

#### **2.3.4.3. Reactivos.**

- Kit de prueba Assurance GDS™ para *Salmonella* de BioControl Systems.
- Solución de hipoclorito de sodio 1.2 %

- Buffered Peptone Water (BPW)
- Caldo infusión cerebro - corazón (BHI)
- Solución de novobiocina 0.4%

#### **2.3.4.4. Material de referencia.**

- *Salmonella enterica subs. enterica serovar paratyphi B* ATCC 8759
- *Salmonella enterica subs. enterica serovar paratyphi A (A)* ATCC 9150
- *Salmonella enterica subsp. enterica Serov. Enteritidis* INS
- *Salmonella enterica Serov Cholerasuis* ATCC 10708
- *Salmonella enterica subsp. enterica serovar Typhimurium* ATCC 4028

#### **2.3.5. Procedimiento (AOAC, 2015) (Anexo B)**

Para la ejecución del método normalizado para la detección de *Salmonella* se debe tener en cuenta las siguientes pautas durante las etapas de ejecución del análisis:

Antes del inicio de la actividad el personal técnico debe asegurarse que las condiciones ambientales estén conforme lo requerido: 18 - 27°C, Humedad < 75% (ambiente del termociclador) y 18 - 27°C, Humedad < 80 % (ambiente para procesar la muestra)

Antes de comenzar y al finalizar las pruebas, se debe limpiar toda la zona de trabajo y equipos (pipetas, PickPen®, mezclador vórtex, GDS Rotor-gene y otros) con una solución de hipoclorito de sodio 1.2 %.

##### **2.3.5.1. Enriquecimiento de las muestras.**

- Pesar 25 g de muestra y añadir 225 ml de BPW (para frutas y hortalizas) o BPW suplementado con 1 ml de novobiocina al 0.4% (para productos hidrobiológicos).
- Homogenizar las muestras en Stomacher® a 230 RPM por 1 minuto.
- Incubar las muestras a  $36 \pm 1$  ° C durante 18-24 horas.

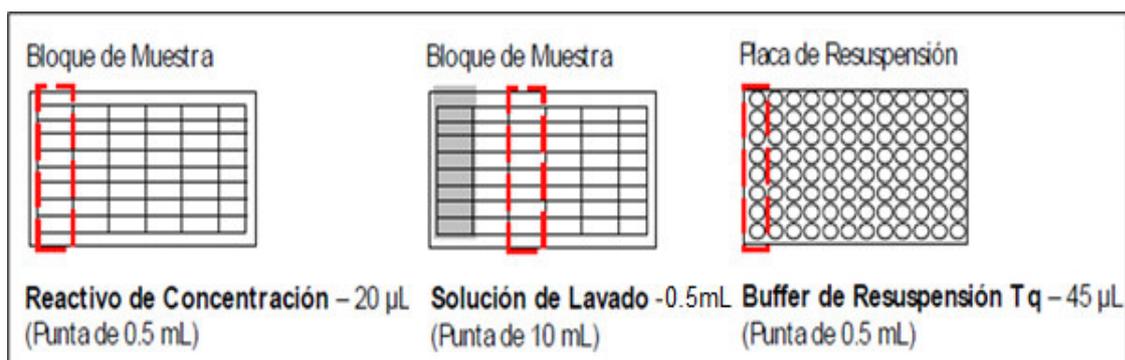
### 2.3.5.2. Protocolo de preparación de reactivos y muestras

#### A. Preparación de reactivos Assurance GDS™ (Figura 1).

- Mezclar el reactivo de concentración en un vórtex, para homogenizar los inmuno-beads (perlas inmunomagnéticas) en el líquido. Colocar el número requerido de pocillos en la base de pocillos de muestra. Adicionalmente a los pocillos requeridos para las muestras, colocar un pocillo de control positivo y un pocillo de control blanco por corrida. Inmediatamente transferir 20  $\mu$ L del reactivo de concentración a cada uno de los pocillos de muestra requeridos (un pocillo / muestra) usando la repetidora y una jeringuilla (combitip) de 0.5 mL. Cubrir los pocillos con cintas adhesivas y reservarlas.
- Agregar 0.5 mL de BHI estéril a nuevos pocillos de muestra adicionales (un pocillo por muestra), usando una repetidora y una jeringuilla de 10 mL. Cubrir los pocillos con cintas adhesivas y reservar.
- Transferir 45  $\mu$ L de buffer de resuspensión Tq a la placa de resuspensión, utilizando una repetidora y una jeringuilla de 0,5 mL. Cubrir la placa de resuspensión con cintas adhesivas y reservar.

#### Figura 1

##### Preparación de Reactivos

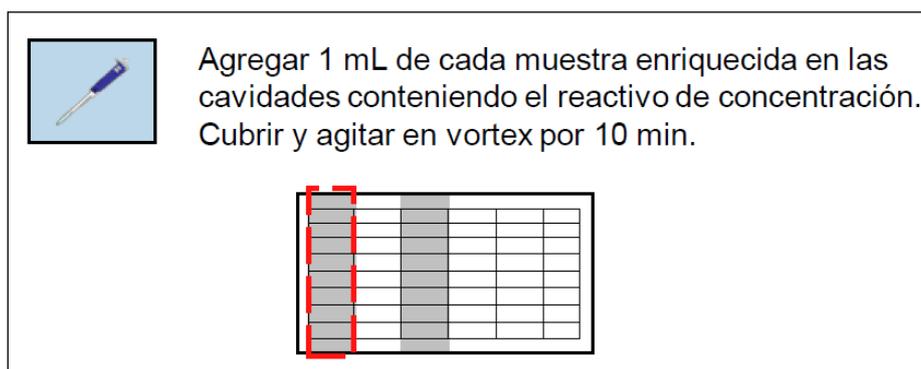


**B. Preparación de las muestras.** Luego de la incubación de las muestras, según el ítem II.3.5.1, seguir los siguientes pasos:

- Retirar con cuidado la cinta adhesiva de una tira de pocillos de muestra que contienen reactivo de concentración. Usando una micropipeta, agregar 1 ml de muestra a cada pocillo evitando transferir partículas de alimento (Figura 2). Se debe utilizar una nueva tip para cada muestra. Cubrir cada tira de pocillos de muestra con una nueva cinta adhesiva antes de agregar las muestras a una nueva tira de pocillos. Inmediatamente devuelva las muestras a la incubadora.
- Colocar los pocillos sellados sobre el vórtex mixer y mezclar a aproximadamente 900 rpm durante 10-20 min. Si es necesario, ajustar la velocidad del vórtex para evitar el contacto del líquido con la cinta adhesiva. Después de completar el tiempo, retirar la base de los pocillos del vórtex.

## Figura 2

Preparación de muestras

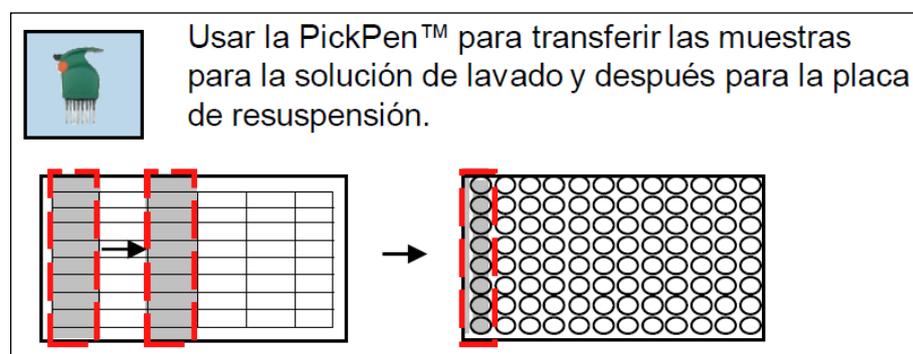


- Retirar y desechar cuidadosamente la cinta adhesiva de una tira de muestras.
- Retirar la cinta adhesiva correspondiente de la tira de los pocillos que contienen BHI.

- Cargar los tips en la herramienta PickPen® II, asegurándose de que los tips estén firmemente en su lugar. Extienda los imanes PickPen® e insértelos en la primera tira de pocillos que contengan las muestras. Agitar suavemente durante 30 segundos mientras mueve continuamente los tips hacia arriba y hacia abajo desde la superficie hasta el fondo del pocillo, con esto quedarán capturados los inmuno-beads. Golpee suavemente los tips contra el costado de los pocillos para eliminar el exceso de gotas.
- Transferir los PickPen® tips a los pocillos de muestra que contengan BHI, con los tips sumergidos, retraer los imanes de la PickPen® y tocar suavemente para liberar los inmuno-beads en el BHI. Cubrir los pocillos con cintas adhesivas. Incubar los pocillos de muestra que contienen BHI y los inmuno-beads durante 2-4 h a  $36 \pm 1$  °C (Figura 3)
- Luego de la incubación, transferir los inmuno-beads de los pocillos a la fila correspondiente en la placa de resuspensión preparada, utilizando la PickPen®. Con los PickPen® tips sumergidos, retraer los imanes de la PickPen® y tocar suavemente para liberar partículas en el tampón de resuspensión Tq (Figura 3). Cubra la placa de resuspensión con la cinta adhesiva y continúe con la etapa de amplificación y detección.

### Figura 3

#### Lavado y resuspensión



**2.3.5.3. Amplificación y detección.** Antes del uso inicial, enfriar el bloque de gel, en el congelador (-25 a -15 °C) durante 6 h. Cuando no esté en uso, el bloque de gel para enfriamiento debe continuar almacenándose a una temperatura de -25 a -15 ° C. Entre cada uso, regresar el bloque de gel al congelador hasta que se vuelva completamente morado, lo que indica que está listo para usar. Esto puede tomar hasta 2 h.

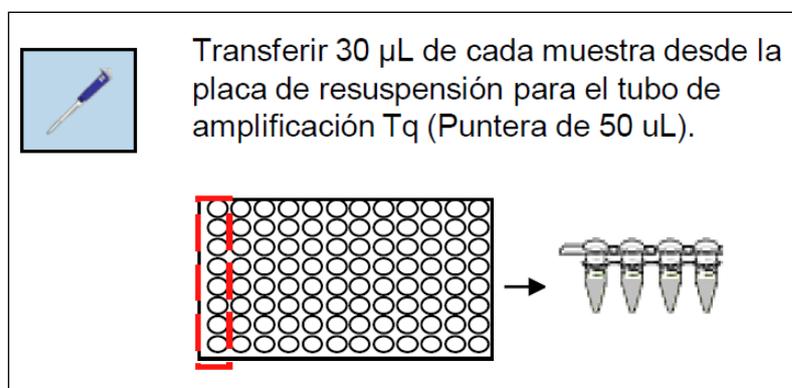
Retirar los tubos de amplificación de la bolsa de aluminio y coloque los tubos de amplificación en el bloque de gel.

La configuración e ingreso de datos al Assurance GDS™ Rotor-Gene debe completarse antes de transferir las muestras de la placa de resuspensión a los tubos de amplificación.

Abrir las tapas de los tubos de amplificación en el bloque de gel. Transferir 30 µL de muestra de los pocillos de la placa de resuspensión a cada tubo de amplificación, utilizando la micropipeta monocanal o multicanal y los tips. Presionar firmemente hacia abajo cada tapa del tubo de amplificación para cerrar. Inspeccionar visualmente cada tubo para asegurarse de que la tapa esté bien sellada (Figura 4).

#### Figura 4

##### Preparación de tubos de amplificación



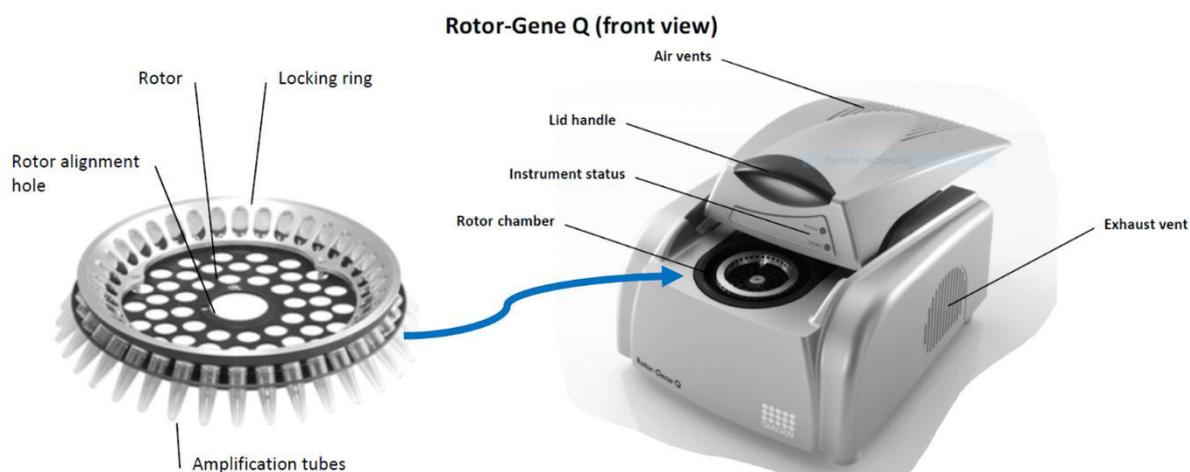
Invertir el bloque de gel que sostienen los tubos de amplificación y agitar con un movimiento rápido para mezclar completamente el contenido de los tubos.

Colocar los tubos de amplificación en el Assurance GDS™ Rotor-Gene en orden secuencial, comenzando con la posición N°1. Inicie la corrida del Rotor-Gene (Figura 5).

Nota: Los tubos de amplificación deberán colocarse en el equipo Assurance GDS™ Rotor-Gene dentro de los 15 minutos posteriores a la adición de las muestras en los tubos de amplificación.

### Figura 5

*Carga del Assurance GDS™ Rotor-gene con los tubos de amplificación*



**2.3.5.4. Interpretación y reporte de resultados de las pruebas.** Al finalizar la ejecución, el software Assurance GDS Rotor-Gene proporcionará resultados para la presencia de Salmonella (Anexo C). Cada muestra se identificará como:

- "Positivo", lo que indica que la muestra de prueba es positiva (presuntiva) para Salmonella, en este caso es necesario realizar un aislamiento y confirmación (ver II.3.5.5).

- "Negativo", que indica que la muestra de prueba es negativa para *Salmonella*.
- "Sin amplificar", lo que indica que no se produjo la amplificación. En este caso, se retira 1 ml de caldo de enriquecimiento de muestra que se ha devuelto a la incubadora (II.3.5.2.2) y se repite todo el proceso. Si el resultado continúa mostrando "Sin amplificar", se comunica al supervisor para que se comunique con el soporte técnico.

Para efectos del reporte final del laboratorio (Anexo D), la muestra que es negativa para *Salmonella*, se reportará como Negativo/peso o volumen de muestra.

La muestra positiva presuntiva que confirma toda las pruebas bioquímicas y serológicas para *Salmonella*, se reportará como Presencia/peso o volumen de muestra.

La muestra positiva presuntiva que no confirma todas las pruebas bioquímicas y serológicas para *Salmonella*, se reportará como Ausencia/peso o volumen de muestra.

**2.3.5.5. Aislamiento, confirmación bioquímica y serológica de las muestras.** El aislamiento y confirmación se realizan según la norma *AOAC 967.27 21st.edition. 2019. Salmonella in Foods*. De igual manera la preparación de cada de uno de los medios y reactivos utilizados en este paso son tomados de la *AOAC 967.25 21st.edition. 2019. Salmonella in Foods. Preparation of Culture Media and Reagents* (Anexo E).

Se procede a aislar los microorganismos a partir del caldo de enriquecimiento (BPW) y realizar la confirmación cultural, bioquímica y serológica de acuerdo a lo siguiente:

**A. Enriquecimiento selectivo.** Transferir 1 mL de caldo enriquecimiento primario hacia un tubo con 10 mL de caldo selenito cistina y transferir 1 mL a un tubo con 10 mL de caldo tetracionato (TT). Mezclar bien con un vórtex. Incubar a  $35 \pm 0.5$  °C durante  $24 \pm 2$  horas.

**B. Aislamiento en agares selectivos.** Mezclar bien con un vórtex. Estriar por agotamiento en agares selectivos: agar de Xilosa, Lisina, Desoxicolato (XLD), agar Hektoen

(HK) y agar Sulfito Bismuto (SB), de tal manera que se obtengan colonias aisladas. Dichos agares se incuban a  $35 \pm 0.5^{\circ}\text{C}$  respetando las horas de incubación: XLD y HK durante  $24 \pm 2$  h mientras que el agar SB durante  $24 \pm 2$  h y  $48 \pm 2$  h.

***C. Selección de las colonias para confirmación.***

XLD: Las colonias típicas son rosadas con o sin centro negro, mientras que las atípicas son color amarillo con o sin centro negro.

HK: Las colonias típicas son azules con o sin centro negro

SB: Las colonias típicas pueden ser marrones, gris o negras con brillo metálico.

***D. Confirmación bioquímica y serológica.*** Elegir con un asa de siembra en punta dos colonias típicas de los agares selectivos (XLD; HK; SB) e inocular en tubos de TSI (porción inclinada y fondo); con la misma asa de siembra, sin tomar más inóculo sembrar en LIA (porción inclinada y fondo); incubar a  $35 \pm 0.5^{\circ}\text{C}$  durante  $24 \pm 2$ h. Tapar los tubos sin apretar para mantener las condiciones aeróbicas de la inoculación en la porción inclinada y para prevenir la excesiva producción de  $\text{H}_2\text{S}$ .

Almacenar las placas de los agares selectivos a  $5-8^{\circ}\text{C}$  o en un cuarto cuya temperatura sea aproximadamente  $26^{\circ}\text{C}$ .

En agar TSI los cultivos típicos de *Salmonella* son alcalinos (rojo) en la porción inclinada y ácidos (amarillo) en el fondo con o sin presencia de  $\text{H}_2\text{S}$  (ennegrecimiento del agar).

En LIA los cultivos típicos de *Salmonella* son alcalinos (púrpura).

Si el crecimiento en TSI y LIA presenta las características típicas de *Salmonella* (Tabla 1), entonces subcultivar una pequeña cantidad del crecimiento del TSI en caldo UREA e incubar a  $35 \pm 0.5^{\circ}\text{C}$  durante  $24 \pm 2$ h.

Para reducir el número de tubos presuntivos positivos de TSI, realizar el test de Serología Flagelar (H); para ello del mismo TSI que se pasó a caldo urea, tomar con el asa de siembra en aro, una pequeña cantidad del crecimiento y pasarlo a tubos con BHI (5mL) si se va a realizar el test el mismo día (incubación:  $35 \pm 0.5$  °C durante 4h-6h) o a tubos con caldo tripticasa de soya - triptosa si el test se realizará al día siguiente (incubación:  $35 \pm 0.5$  °C durante  $24 \pm 2$ h).

**Tabla 1**

Características típicas de *Salmonella*

<b>Prueba o sustrato</b>	<b>Positivo</b>	<b>Negativo</b>	<b>Reacción para <i>Salmonella</i></b>
Glucosa (TSI)	Fondo amarillo	Fondo rojo	+
H <sub>2</sub> S (TSI)	Coloración negra	No coloración negra	+
Ureasa	Purpura-rojo	No cambia de color	-
Lisina descarboxilasa	Purpura	Amarillo	+
Caldo rojo fenol dulcitol	Amarillo con gas	No gas, no cambio de color	+
Caldo KCN	Turbidez	No turbidez	-
Caldo Malonato	Azul	No cambia de color	-
Prueba de indol	Violeta en la superficie	Amarillo en la superficie	-
Serología H	Aglutinación	No aglutina	+
Serología O	Aglutinación	No aglutina	+

Fuente: AOAC 967.27 21st.edition. 2019. *Salmonella* in Foods.

Serología Flagelar “H”:

- Preparación de la solución salina formalizada (SSF): Agregar 6 mL de formaldehído 36-38% a 1 litro de solución salina.
- Preparación del suero “H” diluido: Agregar 0.1 mL del antisuero a 2.4 mL de solución salina.
- Preparación del cultivo formolizado: Al tubo con el cultivo de BHI o Caldo tripticasa de soya-triptosa después de incubación, agregar 2.5 mL de SSF.
- Seleccionar dos tubos con cultivo formolizado y realizar el test de serología “H”: En un tubo estéril agregar 0.5 mL de cultivo formolizado y 0.5 mL del antisuero diluido; llevar a baño de agua de 48 - 50 °C durante 15-60 minutos, observar la aglutinación.

Si el test resulta positivo, continuar la confirmación bioquímica; si el resultado es negativo realizar el test con los 4 tubos restantes.

A partir del cultivo de TSI tomar una cantidad del crecimiento e inocular en tubos con Caldo Rojo Fenol dulcitol ( $35 \pm 0.5$  °C durante  $48 \pm 2$ h) y en tubos con triptona ( $35 \pm 0.5$  °C durante  $24 \pm 2$ h). Después del crecimiento en triptona y antes de realizar la prueba de Indol, subcultivar en caldo KCN y Caldo malonato, ambos medios se incuban a 35°C durante  $48 \pm 2$ h.

Realizar la prueba de indol agregando 0.2-0.3 mL de reactivo Kovacs a los tubos con caldo triptona. Así mismo subcultivar en TSI diariamente a fin de tener cultivos jóvenes que serán usados para la serología “O”.

Serología “O”:

En una placa petri marcar dos secciones de 1x2 cm, con un asa de siembra transferir una pequeña porción del cultivo de TSI de 24 o 48 h a las partes marcadas. Adicionar una gota de solución salina a una sección y una gota de suero “O” a la otra sección, con un asa de siembra en punta emulsificar cada sección. Observar la aglutinación después de un minuto.

### III. APORTES DESTACABLES A LA INSTITUCIÓN

La detección de *Salmonella spp.* en el Laboratorio de Microbiología de Inspectorate del Perú Services S.A.C. constituye uno de sus principales servicios. Debido a la gran demanda, se ofrecen distintos métodos de detección, dependiendo de las necesidades del cliente. Uno de los principales problemas era el tiempo de análisis de los métodos convencionales, por ello y por la gran demanda de métodos rápidos, el laboratorio tomó la decisión de implementar el método de GDS para la detección de *Salmonella* con el propósito de incrementar nuestra capacidad operativa y captar nuevos clientes que precisen de resultados rápidos y confiables.

Para ello, tuve la oportunidad de formar parte de un equipo de trabajo el cual tuvo a cargo el aprendizaje, dominio de técnica, así como los ensayos previos hasta conseguir su aplicación en el laboratorio y su futura acreditación ante las autoridades pertinentes, lo que constituye un importante avance en lo que respecta al análisis de *Salmonella spp.* convirtiéndonos en uno de los pocos laboratorios capaz de ofrecer un servicio de este tipo en el campo de alimentos.

Actualmente se está trabajando en extender el uso de esta metodología para la detección de otros patógenos de interés, por ejemplo, *Listeria monocytogenes*.

#### IV. CONCLUSIONES

- El Laboratorio de Microbiología de Inspectorate del Perú Services S.A.C. ha distinguido dentro de sus necesidades ofrecer servicios que respondan a la demanda del mercado, lo que supone la implementación de métodos de análisis rápidos.
  
- La implementación de la tecnología Assurance GDS™ en el laboratorio, ha significado un importante avance para la ampliación de servicios ofrecidos, así como lograr reducir el tiempo de análisis, además de poder aumentar la capacidad operativa gracias al ahorro de tiempo, consiguiendo llegar a muchos más clientes.
  
- La detección de patógenos mediante métodos moleculares, es la opción más rápida para la obtención de resultados, lo que es ideal para el mercado de exportaciones que son los principales clientes de la empresa, porque precisan de resultados confiables y de rápida ejecución.

## V. RECOMENDACIONES

- En lo posible, se deben mantener zonas de trabajo separadas para las distintas etapas de la metodología (preparación de muestras, amplificación y detección), así como procurar el cambio de bata de trabajo para disminuir el riesgo de contaminación entre las etapas.
- Usar siempre los controles positivo y blanco en cada corrida realizada.
- No se deben autoclavar ni abrir los tubos de amplificación usados. Para descartarlos se deben sumergir en lejía al 10% por al menos 15 min y luego disponerlos en el tacho adecuado fuera del laboratorio.
- Algunas matrices de alimentos podrían causar interferencia en la etapa de amplificación, es necesario establecer protocolos para dichas matrices, por ejemplo, aumentar la cantidad de lavados en la etapa de preparación de muestras.

## VI. REFERENCIAS

- ADRIA Développement. (2021). *Assurance® GDS for Salmonella Tq in all human food products (excluding sprouts), milk powders, infant formula and infant cereals (375 g sample size), pet food and production environmental samples*. [https://nf-validation.afnor.org/wp-content/uploads/2014/03/Synt-TRA-02-12-01-09\\_en.pdf](https://nf-validation.afnor.org/wp-content/uploads/2014/03/Synt-TRA-02-12-01-09_en.pdf)
- Association of Official Analytical Collaboration (AOAC) International (2015). Method 2009.03, *Salmonella* in Foods and Environmental Surfaces, Assurance GDS for *Salmonella*. *Journal of AOAC International*, 98(4), 930-938. [https://doi.org/10.5740/jaoacint.2009\\_03MOD](https://doi.org/10.5740/jaoacint.2009_03MOD)
- Association of Official Analytical Collaboration (AOAC) International 21st. Edition (2019). Method 967.27, *Salmonella* in Foods.
- Caffer M.I. y Terragno, R (2001). *Manual de Procedimientos para la Caracterización de Salmonella*. Ministerio de Salud de Argentina, Subsecretaría de Investigación y Tecnología. <https://docplayer.es/12601568-Manual-de-procedimientos-para-la-caracterizacion-de-salmonella.html>
- Centers for Disease Control and Prevention (CDC). US Department of Health and Human Services (2011). *National Salmonella Surveillance Overview*. [https://www.cdc.gov/nationalsurveillance/pdfs/NationalSalmSurveillOverview\\_508.pdf](https://www.cdc.gov/nationalsurveillance/pdfs/NationalSalmSurveillOverview_508.pdf)
- Chen Q., Li Y., Tao T., Bie X., Lu F. & Lu Z. (2017). Development and application of a sensitive, rapid, and reliable immunomagnetic separation-PCR detection method for *Cronobacter* spp. *Journal of Dairy Science*, 100(2).

- Colello, R., Etcheverria, A., Monteavaro, C., Padola, N., Ramallo, G., Ruiz, M., Villalobo, C (2018). *Diferentes métodos para aislamiento y detección de Salmonella spp. en canales porcinos*. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 20(2), 117-123. <https://doi.org/10.15446/rev.colomb.biote.v20n2.71680>
- Custer, C. S (2014). *History of Food Microbiology (A Brief)*. *Encyclopedia of Food Microbiology*, 213–220. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-384730-0.00165-8>
- Dirección General de Salud Ambiental (2001). *Manual de análisis microbiológico de alimentos*. Decisión Gráfica S.A.C.
- Hardy, A (2004). Salmonella: a continuing problem. *Postgraduate Medical Journal*, 80(947), 541–545. <https://doi.org/10.1136/pgmj.2003.016584>
- International Organization for Standardization (2019). *ISO/TS 15216-2. First edition 2019-07. Microbiology of food chain – Horizontal method for determination of hepatitis A virus and norovirus using real-time RT-PCR-. Part 2 : Method for detection*.
- International Organization for Standardization (2019). *ISO 20395:2019(E) First edition. Biotechnology — Requirements for evaluating the performance of quantification methods for nucleic acid target sequences — qPCR and dPCR*.
- Lee, K.-M., Runyon, M., Herrman, T. J., Phillips, R., & Hsieh, J (2015). *Review of Salmonella detection and identification methods: Aspects of rapid emergency response and food safety*. *Food Control*, 47, 264–276. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2014.07.011>
- Mullis K. y Faloona F (1989). *Specific Synthesis of DNA in Vitro via a Polymerase-Catalyzed Chain Reaction*. *Selected Methods in Enzymology* Pages 189-204.
- Organización Mundial de la Salud (s.f.). *Salmonelosis*. <https://www.who.int/topics/salmonella/es/>

Ray, B. y Bhunia, A. (2014). *Fundamental food microbiology*. CRC Press.

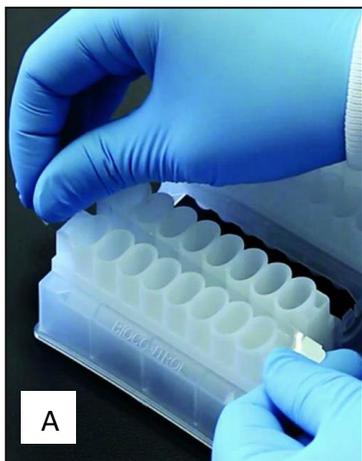
Sánchez-Vargas, F. M., Abu-El-Haija, M. A., & Gómez-Duarte, O. G (2011). Salmonella infections: An update on epidemiology, management, and prevention. *Travel Medicine and Infectious Disease*, 9(6), 263–277. <https://doi.org/10.1016/j.tmaid.2011.11.001>

U.S. Food and Drug Administration (FDA) (2020). *Get the Facts about Salmonella*. <https://www.fda.gov/animal-veterinary/animal-health-literacy/get-facts-about-salmonella#statistics>

Uyttendaele M., Rajkovic A., Ceuppens S., Baert L., Coillie E., Herman L., Jasson V. y Imberechts, H. (2014). PCR Applications in Food Microbiology. En C. Batt y P. Patel (Eds.) *Encyclopedia of Food Microbiology*, (Vol. 2). Academic Press.

## VII. ANEXOS.

### Anexo A. Principales materiales e instrumentos utilizados en Assurance GDS™



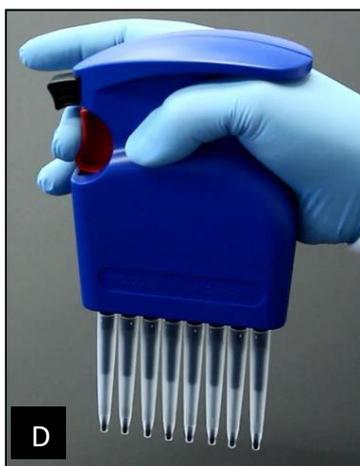
A



B



C



D



E



F



G

A: Pocillos de muestra.

B: Repetidora con jeringuilla (Combitip advanced).

C: Vortex mixer cargado con pocillos de muestra.

D: PickPen® II cargada con PickPen® Tips.

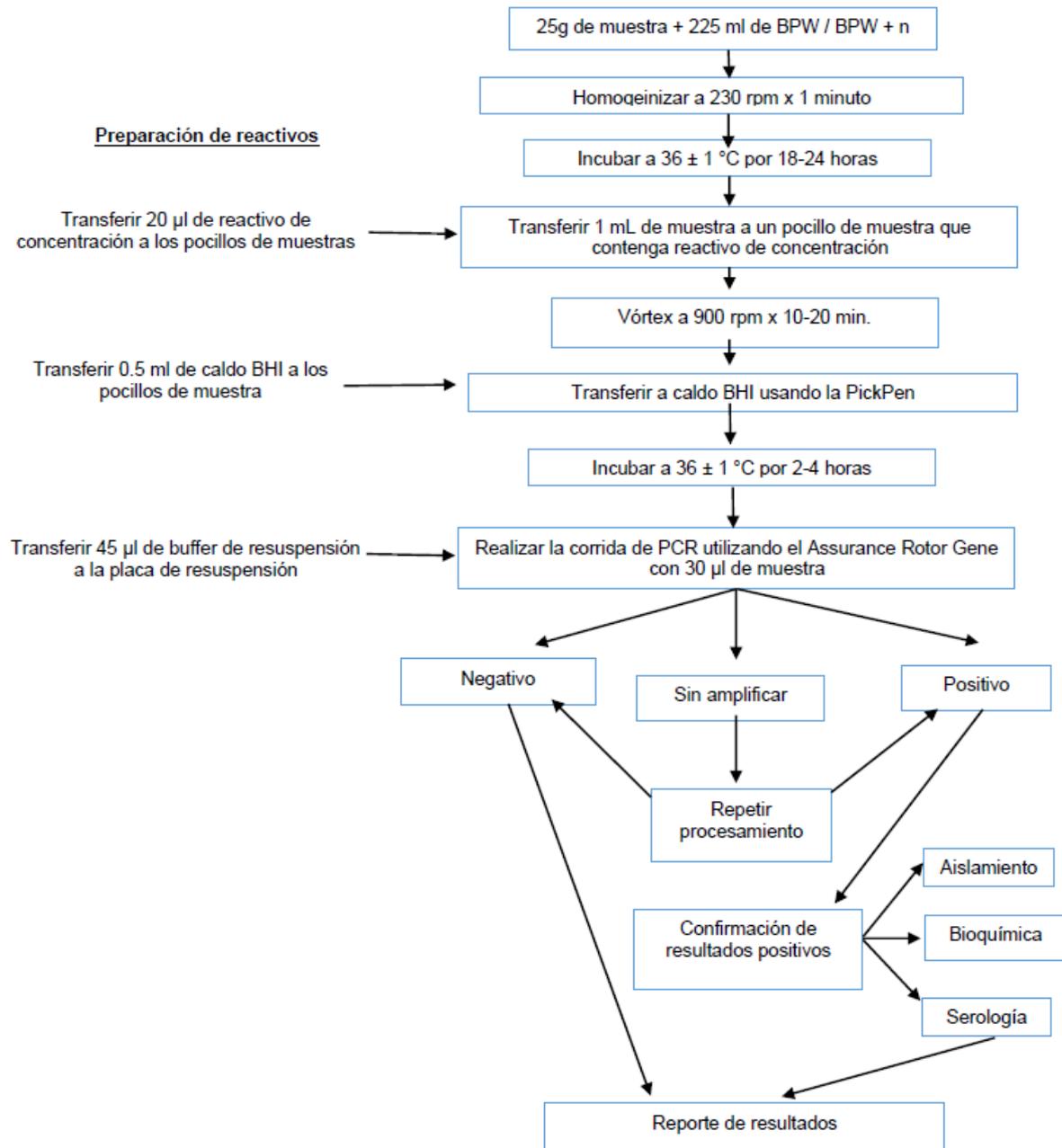
E: Placa de resuspensión.

F: Bloque de gel para enfriamiento.

G: Kit Assurance GDS™ Salmonella Tq.

Anexo B. Flujograma del método AOAC Official Method 2009.03.21 st Edition.

Confirmación por AOAC 967.26 .2019.





## Anexo E. Medios y Reactivos.

- Caldo Tetrionato (con yodo y verde brillante). Resuspender 5.0 g de polipeptona, 1.0 g de sales biliares, 10 g de  $\text{CaCO}_3$  y 30 g de  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \times 5\text{H}_2\text{O}$  en 1 L de  $\text{H}_2\text{O}$ , mezclar bien y calentar (El precipitado no se disolverá por completo). Enfríe a menos de  $45^\circ\text{C}$  y almacenar a  $5^\circ - 8^\circ\text{C}$ . Preparar la solución de I<sub>2</sub>-KI disolviendo 5 g de KI en 5 mL de  $\text{H}_2\text{O}$  estéril, agregando 6 g de I<sub>2</sub> resublimado, disolviendo y diluyendo a 20 mL con  $\text{H}_2\text{O}$  estéril. Preparar una solución de verde brillante disolviendo 0.1 g del colorante en  $\text{H}_2\text{O}$  estéril y diluyéndolo a 100 mL. El día en que se usa el medio, agregar 20 mL de solución I<sub>2</sub>-KI y 10 mL de solución verde brillante por 1 L de caldo basal. Resuspender el precipitado agitando suavemente y dispensar asépticamente porciones de 10 mL en tubos de ensayo estériles de 20 o 16 x 150 mm. No caliente el medio después de agregar I<sub>2</sub> – KI y la solución de colorante.

- Caldo Selenito Cistina: Resuspender 5.0 g de triptona o polipeptona, 4.0 g de lactosa, 10.0 g de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 4.0 g de  $\text{NaHSeO}_3$  y 0.01 g de L-cistina en 1 L de  $\text{H}_2\text{O}$  y mezclar bien. Calentar con agitación frecuente. Dispensar porciones de 10 mL en tubos de ensayo estériles de 16 x 150 mm. Calentar 10 minutos en vapor fluyendo. No esterilizar en autoclave. El pH final debe ser  $7.0 \pm 0.2$ . El medio no es estéril. Usar el mismo día que se preparó.

- Agar XLD: Resuspender los ingredientes o el medio completo en 1 L de  $\text{H}_2\text{O}$  y mezclar bien. Calentar con agitación frecuente hasta que comience a hervir. No sobrecalentar. Enfriar en baño de  $\text{H}_2\text{O}$  y verter porciones de 20 ml en placas Petri de 15 x 100 mm. Dejar secar aproximadamente 2 h con las tapas parcialmente retiradas, luego cerrar las placas. El pH final debe ser  $7.4 \pm 0.2$ . No esterilizar en autoclave. Componentes: 3.75 g de xilosa, 5.0 g de L-lisina, 7.5 g de lactosa, 7.5 g de sacarosa, 5.0 g de NaCl, 3.0 g de extracto de levadura, 0.08 g

de rojo fenol, 2.5 g de desoxicolato de sodio, 6.8 g de tiosulfato de sodio, 0.8 g de citrato férrico de amonio y 15 g de agar.

- Agar Hektoen: Resuspender los ingredientes o el medio completo en 1 L de H<sub>2</sub>O y mezclar bien. Calentar con agitación frecuente hasta que comience a hervir. No sobrecalentar. Enfriar en baño de H<sub>2</sub>O y verter porciones de 20 ml en placas Petri de 15 x 100 mm. Dejar secar aproximadamente 2 h con las tapas parcialmente retiradas, luego cerrar las placas. El pH final debe ser  $7.6 \pm 0.2$ . No esterilizar en autoclave. Componentes: 12.0 g de peptona, 3.0 g de extracto de levadura, 9.0 g de sales biliares, 12.0 g de lactosa, 12.0 g de sacarosa, 2.0 g de salicina, 5.0 g de NaCl, 5.0 g de tiosulfato de sodio, 1.5 g de citrato de amonio férrico, 0.064 g de azul de bromotimol, 0.1 g de fucsina ácida y 13.5 g de agar.

- Agar Sulfito Bismuto: Resuspender 10 g de polipeptona o peptona, 5.0 g de extracto de carne, 5.0 g de glucosa, 4.0 g de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0.3 g de FeSO<sub>4</sub>, 8.0 g de indicador Bi<sub>2</sub> (SO<sub>3</sub>)<sub>3</sub>, 0.025 g de verde brillante y 20 g de agar en 1 L de H<sub>2</sub>O, mezcle bien y calentar con agitación ocasional. Hervir aproximadamente 1 minuto para obtener una suspensión uniforme (El precipitado no se disolverá.) Enfriar a 45 ° -50 ° C. Resuspender el precipitado con agitación suave y verter porciones de 20 ml en Placas de Petri de 15 x 100 mm. Dejar secar aproximadamente de 2 h con las tapas parcialmente retiradas, luego cerrar las placas. El pH final debe ser  $7.6 \pm 0.2$ . No esterilizar en autoclave. Preparar las placas un día antes de estriarlas y guardarlas en oscuridad a temperatura ambiente. La selectividad de las placas disminuye 48 h después de la preparación.

- Agar triple azúcar / hierro (agar TSI): Resuspender los ingredientes o el medio completo en 1 L de H<sub>2</sub>O, mezclar bien. y calentar con agitación ocasional. Hervir aproximadamente 1

minuto hasta que los ingredientes se disuelvan. Llenar tubos de 16 x 150 mm a 1/3 de su capacidad y taparlos para que se mantengan las condiciones aeróbicas durante el uso. Autoclavar 12 min a 121 ° C. Antes de que el medio se solidifique, colocar los tubos en posición inclinada para que se formen fondos profundos (aprox. 3 cm) y planos inclinados adecuados (aprox. 5 cm) con la solidificación. Componentes: 3.0 g de extracto de carne, 3.0 g de extracto de levadura, 15 g de peptona, 5.0 g de proteasa peptona, 1.0 g de glucosa, 10 g de lactosa, 10 g de sacarosa, 0.2 g de FeSO<sub>4</sub>, 5.0 g de NaCl, 0.3 g de Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, 0.024 g de rojo fenol y 12 g de agar. El pH final debe ser 7.4 ± 0.2.

- Agar lisina hierro (LIA): Disolver 5.0 g de gelisato o peptona, 3.0 g de extracto de levadura, 1.0 g de glucosa, 10 g de L-lisina, 0.5 g de citrato de amonio férrico, 0.04 g de Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub> anhidro, 0.02 g de púrpura de bromocresol y 15 g de agar en 1 L de H<sub>2</sub>O, calentar hasta que se disuelva. Dispensar porciones de 4 ml en tubos de ensayo de 13x100 mm y tapar para mantener las condiciones aeróbicas durante el uso. Autoclavar 12 min a 121 ° C. Antes de que el medio se solidifique, coloque los tubos en posición inclinada de modo que se formen fondos de 4 cm y planos inclinados de 2.5 cm con la solidificación. El pH final debe ser 6.7 ± 0.2.

- Caldo urea: Disolver 20 g de urea, 0.1 g de extracto de levadura, 9.1 g de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 9.5 g de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> y 4.0 mL de solución de rojo de fenol al 0.25% (10 mg) en 1 L de H<sub>2</sub>O. No calentar. Esterilizar por filtración y dispensar asépticamente porciones de 1,5 - 3 ml en tubos de ensayo estériles de 13 x 100 mm. El pH final debe ser 6.8 ± 0.2.

- Caldo infusión cerebro - corazón (BHI): Disolver la infusión de 200 g de cerebro de ternera y 250 g de corazón de res, 10.0 g de proteasa peptona o gelisato 5.0 g de NaCl, 2.5 g

de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 12\text{H}_2\text{O}$  y 2.0 g de glucosa en 1 L de  $\text{H}_2\text{O}$ , calentando suavemente si es necesario. Dispensar porciones de 5 ml en tubos de ensayo de 16 x 150 mm y esterilizar en autoclave durante 15 minutos a  $121^\circ\text{C}$ . El pH final debe ser  $7.4 \pm 0.2$ .

- Caldo tripticasa de soya - triptosa: Combinar 15 g del medio deshidratado comercial de caldo tripticasa soya (que contiene 17.0 g de tripticasa, 3.0 g de fitona, 5.0 g de NaCl, 2.5 g de  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  y 2.5 g de glucosa), 13.5 g de medio comercial deshidratado de caldo triptosa (que contiene 20 g de triptosa, 5 g de NaCl y 1,0 g de glucosa), 3 g de extracto de levadura y 1 L de  $\text{H}_2\text{O}$ . Calentar, si es necesario, hasta que se disuelva. Dispensar porciones de 5 ml en tubos de ensayo de 16 x 150 mm y esterilizar en autoclave durante 15 minutos a  $121^\circ\text{C}$ . El pH final debe ser  $7.2 \pm 0.2$ .

- Caldo rojo fenol dulcitol: Disolver 10 g de tripticasa o proteasa peptona N° 3, 5.0 g de NaCl, 1.0 g de extracto de carne (opcional) y 7.2 mL de solución de rojo de fenol al 0.25% (18 mg) en 1 L de  $\text{H}_2\text{O}$  y calentar con agitación suave. hasta que se disuelva. Disolver 5 g de dulcitol en este caldo basal. Dispensar porciones de 2.5 ml en tubos de ensayo de 13 x 100 mm que contengan tubos de ensayo Durham invertidos de 6 x 50 mm. Autoclavar 10 min a  $118^\circ\text{C}$  (12 psi). El pH final debe ser  $7.4 \pm 0.2$ .

Alternativamente, disuelva los ingredientes, omitiendo los carbohidratos, en 800 ml de  $\text{H}_2\text{O}$  con calor y agitación ocasional. Dispense porciones de 2,0 ml en tubos de ensayo de 13 x 100 mm que contengan tubos de fermentación vertidos. Autoclave 15 min a  $118^\circ\text{C}$  y dejar enfriar. Disuelva los carbohidratos en 200 ml de  $\text{H}_2\text{O}$  y esterilice pasando la solución a través del filtro de retención de bacterias. Agregue asépticamente 0,5 ml de filtrado estéril a cada tubo de caldo esterilizado después de enfriar a  $<45^\circ\text{C}$ . Agite suavemente para mezclar. El pH final debe ser  $7.4 \pm 0.2$ .

- Caldo triptona: Disolver calentando, con agitación, 10,0 g de triptona o tripticasa en 1 L de H<sub>2</sub>O. Dispensar en porciones de 5 ml en tubos de ensayo de 16 o 20 x 150 mm y esterilizar en autoclave 15 min a 121 ° C. pH final, 6.9 ± 0.2.
  
- Caldo cianuro de potasio (KCN): Disolver 3.0 g de proteasa peptona No. 3 o polipeptona, 5.0 g de NaCl, 0.225 g de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> y 5.64 g de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> en 1 L de H<sub>2</sub>O. Autoclave 15 min a 121 ° C. Enfríe y refrigere a 5° - 8 °C. El pH final debe ser 7.6 ± 0.2. Disolver 0,5 g de KCN en 100 ml de agua fría (5 ° - 8 ° C) esterilizar H<sub>2</sub>O. Con una pipeta agregar asépticamente 15 ml de solución fría de KCN por litro de caldo basal estéril frío. Mezcle bien con agitación suave y dispense asépticamente porciones de 1.0 - 1.5 ml en tubos de ensayo estériles de 13 x 100 mm. Usando una técnica aséptica, tapar inmediatamente los tubos con corchos No. 2 impregnados con parafina. Prepare los corchos hirviendo en parafina aproximadamente 5 min. Coloque los corchos en tubos para que la parafina no fluya al caldo, sino que forme un buen sello entre el borde del tubo y el corcho. El medio almacenado a 5° - 8 °C suele ser estable aproximadamente 2 semanas.
  
- Caldo malonato: Disolver 1.0 g de extracto de levadura, 2.0 g (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 0.6 g de K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0.4 g de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 2.0 g de NaCl, 3.0 g de malonato de sodio, 0.25 g de glucosa y 0.025 g de azul de bromotimol en 1 L de H<sub>2</sub>O, calentar si es necesario hasta que se disuelva. Dispensar porciones de 3 ml en tubos de ensayo de 13 x 100 mm y esterilizar en autoclave durante 15 minutos a 121 ° C. El pH final debe ser 6.7 ± 0.2.
  
- Antisuero somático polivalente de Salmonella "O": Contiene aglutininas para al menos los siguientes antígenos somáticos (O) 1, 2, 3,4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 19, 22,

23, 24, 25, 34 y Vi. Son aglutininas para grupos somáticos (O): A, B, C1, C2, D, E1, E2, E3, E4, F, G1, G2, H, I y Vi.

- Antisuero flagelar polivalente de Salmonella "H": Contiene aglutininas para al menos los siguientes antígenos flagelares (H): a, b, c, d, e, f, g, h, i, k, l, m, n, p, q, r, s, t, u, v, w, x, y, z, z4, z6, z10, z13, z15, z23, z24, z28, z29, z32, 1, 2, 5, 6, 7.

- Solución salina fisiológica estéril: Disolver 8.5 g de NaCl en 1L H<sub>2</sub>O. Autoclavar 15 min a 121 ° C y enfriar a temperatura ambiente.

- Solución salina formalizada (SSF): Agregue 6 ml de solución de HCHO (36–38%) a 1 L de solución salina estéril y mezclar. Almacenar en recipientes bien cerrados.

- Reactivo de Kovacs: Disuelva 5 g de p-dimetil-aminobenzaldehído en 75 ml de alcohol amílico y agregue lentamente 25 ml de HCl.