



UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE CATALUNYA
BARCELONATECH
Escola d'Enginyeria Agroalimentària
i de Biosistemes de Barcelona



Verificación de los métodos moleculares para la detección de *Salmonella spp.* y *Listeria monocytogenes* mediante PCR en matrices alimentarias

TRABAJO DE FINAL DE GRADO
Grado en Ingeniería Alimentaria

Autora: Sara Carrillo

Tutores Externos: Irene Mir

Esther Bermejo

Departamento Técnico, Bioser

Tutores Internos: Mónica Blanco

Universitat Politècnica de Catalunya, UPC

Castelldefels, Febrero 2022

RESUM

La reacció en cadena de la polimerasa (PCR) és un mètode molecular nascut al 1983 amb diversos usos en diferents camps d'estudi, com són la arqueologia, la medicina i la seguretat alimentaria entre altres.

És per aquest motiu que l'estudi es centra en la utilització d'aquest mètode molecular per poder realitzar una comparació entre els kits destinats a la detecció de microorganismes patògens com poden ser la *Salmonella* i la *Listeria monocytogenes* en diferents matrius alimentaries. Això serà possible gracies a una inoculació prèvia a diferents concentracions. Fins i tot s'ha volgut anar més enllà realitzant una simulació d'una verificació de la validació dels kits utilitzats en l'estudi basada en la normativa ISO 16140:3.

Per poder dur això a terme s'han escollit quatre aliments de quatre categories diferents (un lacti, un ovoproducte, un vegetal i un peix) i tres kits de detecció diferents. Aquests tres kits es compararan entre ells i els resultats obtinguts de la PCR seran analitzats i comentats. Per poder realitzar la simulació de la verificació es calcularà el límit de detecció tenint en compte els resultats obtinguts de la PCR sabent que totes les mostres del assaig han sigut inoculades amb els microorganismes analitzats.

Els resultats obtinguts no han sigut del tot concloents degut a les petites limitacions que s'han anat observant al llarg del desenvolupament del treball experimental, com, per exemple, la contaminació creuada. Malgrat això, s'ha realitzat un anàlisi dels resultats obtinguts de la PCR i s'ha escollit acceptar els resultats obtinguts com a vàlids. Això ha permès calcular i comentat correctament els límits de detecció obtinguts.

Entre les conclusions més destacables cal remarcar que el estudi de camp hauria de ser repetit per poder obtenir resultats concloents i significatius que donessin peu a poder desenvolupar un estudi estadístic a través d'aquests i per poder discernir quin dels tres kits és el més òptim per realitzar una verificació s'han de tenir en compte diversos factors, per tant, no hi ha una única resposta vàlida. A més a més, els límits de detecció obtinguts son considerablement baixos i s'ha de tenir en compte que gran part d'ells ha detectat la inoculació més baixa realitzada en les diferents matrius.

Paraules clau: Verificació, Validació, *Salmonella*, *Listeria monocytogenes* i ISO

RESUMEN

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) es un método molecular nacido en 1983 con varios usos en diferentes campos de estudio, como son la arqueología, la medicina y la seguridad alimentaria entre otros.

Es por eso por lo que el trabajo se centra en la utilización de este método molecular para poder realizar una comparación entre los kits destinados a la detección de microorganismos patógenos como pueden ser la *Salmonella* y la *Listeria monocytogenes* en diferentes matrices alimentarias. Esto será posible gracias a una inoculación previa a diferentes concentraciones. Incluso se ha querido ir más allá queriendo realizar una simulación de una verificación de la validación de los kits usados en el estudio basada en la normativa ISO 16140:3.

Para poder llevar a cabo esto se ha elegido cuatro alimentos de cuatro categorías diferentes (un lácteo, un ovoproducto, un vegetal y un pescado) y tres kits de detección diferentes. Estos tres kits se compararán entre ellos y los resultados obtenidos de la PCR serán analizados y comentado. Para poder realizar la simulación de la verificación se calculará el límite de detección teniendo en cuenta los resultados obtenidos de la PCR sabiendo que todas las muestras del ensayo han sido inoculadas con los microorganismos analizados.

Los resultados obtenidos no han sido del todo concluyentes debido a pequeñas limitaciones que se han ido observando a lo largo del desarrollo del trabajo experimental, como, por ejemplo, la contaminación cruzada. A pesar de esto, se ha realizado un análisis de los resultados obtenidos de la PCR y se ha optado por aceptar los resultados obtenidos como válidos. Esto ha permitido calcular y comentar correctamente los límites de detección obtenidos.

Entre las conclusiones más relevantes se puede destacar que el trabajo debería ser repetido para poder obtener resultados concluyentes y significativos que dieran pie a desarrollar un estudio estadístico a través de ellos y para poder discernir cuál de los tres kits es el óptimo para realizar la verificación se deben tener en cuenta muchos factores, por lo que no hay una única respuesta válida. Además, los límites de detección obtenidos son considerablemente bajos teniendo en cuenta que gran parte de ellos han detectado la inoculación más baja realizada en las diferentes matrices.

Palabras clave: Verificación, Validación, *Salmonella*, *Listeria monocytogenes* y ISO.

ABSTRACT

The polymerase chain reaction (PCR) is a molecular method born in 1983 with several uses in different fields of study, such as archaeology, medicine, and food safety among others.

That is why the work is focused on the use of this molecular method to make a comparison between kits for the detection of pathogenic microorganisms such as *Salmonella* and *Listeria monocytogenes* in different food matrices. This will be possible thanks to a previous inoculation at different concentrations. We even wanted to go further by simulating a verification of the validation of the kits used in the study based on the ISO 16140:3 standard.

In order to do this, four foods from four different categories (a dairy product, an egg product, a vegetable and a fish) and three different detection kits were chosen. These three kits will be compared with each other and the PCR results obtained will be analysed and commented. To perform the simulation of the verification, the detection limit will be calculated considering the PCR results obtained knowing that all the test samples have been inoculated with the analysed microorganisms.

The results obtained have not been entirely conclusive due to small limitations that have been observed throughout the development of the experimental work, such as, for example, cross-contamination. Despite this, an analysis of the PCR results obtained has been carried out and the results obtained have been accepted as valid. This has allowed us to correctly calculate and comment on the detection limits obtained.

Among the most relevant conclusions we can highlight that the work should be repeated in order to obtain conclusive and significant results that would give rise to develop a statistical study through them and to be able to discern which of the three kits is the optimal one to perform the verification many factors must be taken into account, so there is no single valid answer. Furthermore, the detection limits obtained are considerably low considering that most of them have detected the lowest inoculation performed in the different matrices.

Keywords: Verification, Validation, *Salmonella spp.*, *Listeria monocytogenes* and ISO.

ÍNDICE

LISTA DE FIGURAS.....	7
LISTA DE TABLAS.....	9
AGRADECIMIENTOS.....	11
1. INTRODUCCIÓN.....	12
1.1. <i>SALMONELLA SPP</i>	12
1.1.1. ¿Dónde podemos encontrar <i>Salmonella</i> ?.....	12
1.1.2. La Salmonelosis	12
1.1.3. Cómo analizar <i>Salmonella</i>	13
1.1.4. Contexto a nivel Nacional y Europeo de la Salmonelosis.....	14
1.2. <i>LISTERIA MONOCYTOGENES</i>	14
1.2.1. Dónde podemos encontrar la <i>Listeria monocytogenes</i>	14
1.2.2. La Listeriosis	15
1.2.3. Cómo analizar la Listeriosis	15
1.2.4. Contexto a nivel Nacional y Europeo de la Listeriosis.....	15
1.3. REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA	16
1.3.1. Fases de la PCR.....	17
1.3.2. Detección.....	18
1.3.3. Canales de excitación/detección.....	20
1.3.4. Controles	20
1.3.5. PCR en tiempo real y PCR punto final o convencional	21
2. OBJETIVOS.....	22
2.1. CONSIDERACIONES PREVIAS	22
2.2. OBJETIVOS PRINCIPALES Y SECUNDARIOS	23
3. MATERIAL Y MÉTODOS	24
3.1. PROCESO DE VERIFICACIÓN SEGÚN LA ISO 16140-3	24
3.2. CEPAS DE INOCULACIÓN	28
3.3. TERMOCICLADOR CFX96 TOUCH.....	29
3.4. TERMOCICLADOR X5	30
3.5. ENRIQUECIMIENTO	31
3.6. EXTRACCIÓN Y DETECCIÓN	33
3.6.1. Kits de <i>Salmonella</i>	34
3.6.2. Kits de <i>Listeria monocytogenes</i>	36
3.7. DISEÑO EXPERIMENTAL	38
4. RESULTADOS	41
4.1. <i>SALMONELLA</i>	43

4.1.1.	Interpretación y análisis primarios del kit 357-8123.....	43
4.1.2.	Interpretación y análisis primarios del KIT2025.....	44
4.1.3.	Interpretación y análisis primarios del kit S 400 07	45
4.2.	<i>LISTERIA MONOCYTOGENES</i>	47
4.2.1.	Interpretación y análisis primarios del kit 357-8124.....	47
4.2.2.	Interpretación y análisis primarios del kit KIT2023.....	50
4.2.3.	Interpretación y análisis primarios del kit S 400 08.1	51
5.	DISCUSIÓN.....	53
6.	CONCLUSIONES	55
	ANEXOS	59
	ANEXO 1: Certificados de validación de los kits de detección	59
	ANEXO 2: Guía rápida de interpretación del iQ-Check™ <i>Salmonella</i> II.....	68
	ANEXO 3: Guía rápida de interpretación para ensayos en el equipo X5	70
	ANEXO 4: Guía rápida de interpretación del foodproof® <i>Salmonella</i> Detection Lyokit	71
	ANEXO 5: Guía rápida de interpretación del iQ-Check™ <i>Listeria monocytogenes</i> II	73
	ANEXO 6: Guía rápida de interpretación del kit foodproof® <i>Listeria monocytogenes</i> Detection Lyokit	75
	ANEXO 7: Resultados detallados del kit 357-8123.....	77
	ANEXO 8: Resultados detallados del KIT2025.....	78
	ANEXO 9: Resultados detallados del kit S 400 07	83
	ANEXO 10: Resultados detallados del kit 357-8124.....	84
	ANEXO 11: Resultados detallados del KIT2023.....	86
	ANEXO 12: Resultados detallados del kit S 400 08.1	96

LISTA DE FIGURAS

- FIGURA 1. Países con más casos confirmados de salmonelosis de 2015 a 2019
- FIGURA 2. Países con más casos confirmados de listeriosis de 2015 a 2019
- FIGURA 3. Proceso de separación de las hebras de DNA por desnaturalización
- FIGURA 4. Los primers se unen al extremo 3' en la etapa de hibridación
- FIGURA 5. Elongación de la cadena de DNA gracias a la Taq polimerasa
- FIGURA 6. Resumen de las tres etapas que conforman un ciclo de PCR
- FIGURA 7. Representación de los gráficos obtenidos de una PCR convencional
- FIGURA 8. Ejemplo del funcionamiento del SYBR Green
- FIGURA 9. Método no específico por pruebas basadas en hidrólisis
- FIGURA 10. Canales y gráficas de las ondas de excitación y detección
- FIGURA 11. Árbol de decisiones para la aplicación de las partes de la ISO 16140
- FIGURA 12. Descripción de los tres tipos de alcances
- FIGURA 13. Inclusión de los tres tipos de alcances
- FIGURA 14. Representación del paso 2 de la reconstitución de la lentícula
- FIGURA 15. Representación del diluyente de la lentícula
- FIGURA 16. Representación del paso 2 de la reconstitución de la lentícula.
- FIGURA 17. Banco de diluciones
- FIGURA 18. Termociclador CFX96 Touch
- FIGURA 19. Vista lateral de la lanzadera óptica que muestra el LED verde disparando encima de cada pocillo
- FIGURA 20. Representación del equipo X5. En orden de izquierda a derecha: (1) El instrumento se está precalentando para realizar la PCR (2) El instrumento está listo para que inicie la PCR (3) la tapa del instrumento está abierta
- FIGURA 21. Elementos para hacer el enriquecimiento
- FIGURA 22. Esquema resumen del proceso de enriquecimiento para la preparación de muestras
- FIGURA 23. Relación entre los kits de detección y los termocicladores usados en la verificación
- FIGURA 24. Esquema resumen del estudio de verificación para *Salmonella*
- FIGURA 25. Esquema resumen del estudio de verificación para *Listeria monocytogenes*
- FIGURA 26. Resultados del control positivo y negativo del kit 357-8123
- FIGURA 27. Resultados de *Salmonella* en clara de huevo para 357-8123
- FIGURA 28. Resultados de *Salmonella* en lechuga para 357-8123
- FIGURA 29. Resultados de *Salmonella* en queso para 357-8123
- FIGURA 30. Resultados de *Salmonella* en salmón para 357-8123
- FIGURA 31. Resultado del blanco en *Salmonella* para 357-8123
- FIGURA 32. Representación de los resultados de *Salmonella* para KIT2025

- FIGURA 33. Resultados del control positivo y negativo del kit S 400 07
- FIGURA 34. Resultados de *Salmonella* en clara de huevo para S 400 07
- FIGURA 35. Resultados de *Salmonella* en lechuga para S 400 07
- FIGURA 36. Resultados de *Salmonella* en queso para S 400 07
- FIGURA 37. Resultados de *Salmonella* en salmón para S 400 07
- FIGURA 38. Resultado del blanco en *Salmonella* para S 400 07
- FIGURA 39. Resultados del control positivo y negativo del kit 357-8124
- FIGURA 40. Repetición del estudio de verificación en *Listeria monocytogenes*
- FIGURA 41. Resultados del control positivo y negativo de la repetición del ensayo del kit 357-8124
- FIGURA 42. Resultados de *Listeria monocytogenes* en clara de huevo para 357-8124
- FIGURA 43. Resultados de *Listeria monocytogenes* en queso para 357-8124
- FIGURA 44. Resultados de *Listeria monocytogenes* en lechuga para 357-8124
- FIGURA 45. Resultados de *Listeria monocytogenes* en salmón para 357-8124
- FIGURA 46. Resultado del blanco en *Listeria monocytogenes* para 357-8124
- FIGURA 47. Representación de los resultados de *Listeria monocytogenes* para KIT2023
- FIGURA 48. Resultados del control positivo y negativo del kit S 400 08.1
- FIGURA 49. Resultados de *Listeria monocytogenes* en clara de huevo para S 400 08.1
- FIGURA 50. Resultados del control positivo y negativo de la repetición del kir S 400 08.1
- FIGURA 51. Resultados de *Listeria monocytogenes* en clara de huevo para S 400 08.1
- FIGURA 52. Resultados de *Listeria monocytogenes* en queso para S 400 08.1
- FIGURA 53. Resultados de *Listeria monocytogenes* en lechuga para S 400 08.1
- FIGURA 54. Resultados de *Listeria monocytogenes* en salmón para S 400 08.1
- FIGURA 55. Resultado del blanco en *Listeria monocytogenes* S 400 08.1

LISTA DE TABLAS

- TABLA 1. Comparativa entre la PCR en tiempo real y la PCR convencional
- TABLA 2. Captura de pantalla de los criterios de aceptación de seguridad alimentaria para *Listeria monocytogenes* del Reglamento 2073/2005
- TABLA 3. Captura de pantalla de los criterios de aceptación de seguridad alimentaria para *Salmonella* del Reglamento 2073/2005
- TABLA 4. Resumen del número mínimo de alimentos que se deben seleccionar para realizar la verificación
- TABLA 5. Características de rendimiento necesarias que deben determinarse para realizar la verificación
- TABLA 6. Número de réplicas necesarias en función del protocolo elegido y la inoculación para determinar la estimación LOD₅₀
- TABLA 7. Cepas de reconstitución de la casa comercial LGC usadas para la verificación
- TABLA 8. Captura de pantalla de la ficha técnica del producto RM08 con nº de lote 081801
- TABLA 9. Captura de pantalla de la ficha técnica del producto RM28 con nº de lote 28101
- TABLA 10. Tipos de estados del termociclador durante la ejecución del proceso de PCR
- TABLA 11. Tipos de estados del termociclador cuando el equipo no esta procesando muestras
- TABLA 12. Referencias de los caldos de cultivo utilizados para realizar la verificación
- TABLA 13. Referencia BHI para realizar un segundo enriquecimiento
- TABLA 14. Kits de detección que se usarán para realizar la verificación
- TABLA 15. Kits de detección para *Salmonella*
- TABLA 16. Comparación entre los tres kits de *Salmonella*
- TABLA 17. Kits de detección para *Listeria monocytogenes*
- TABLA 18. Comparación entre los tres kits de *Listeria monocytogenes*
- TABLA 19. Determinación del eLOD₅₀ basado en el número de resultados positivos según el nivel de contaminación usando el protocolo 1
- TABLA 20. Resultados de la determinación del LOD₅₀ para el kit 357-8123 de todas las muestras
- TABLA 21. Resultados de la determinación del LOD₅₀ para KIT2025 en clara de huevo, queso y salmón.
- TABLA 22. Resultados de la determinación del LOD₅₀ para KIT2025 en lechuga
- TABLA 23. Resultados de la determinación del LOD₅₀ para el kit S 400 07 en clara de huevo
- TABLA 24. Resultados de la determinación del LOD₅₀ para el kit S 400 07 en lechuga, queso y salmón
- TABLA 25. Resultados de la determinación del LOD₅₀ para el kit 357-8124 de todas las muestras
- TABLA 26. Resultados de la determinación del LOD₅₀ para el KIT2023 en clara de huevo y salmón
- TABLA 27. Resultados de la determinación del LOD₅₀ para el KIT2023 en queso y lechuga
- TABLA 28. Resultados de la determinación del LOD₅₀ para el kit S 400 08.1 de todas las muestras
- TABLA 29. Resumen de los límites de detección obtenidos en los ensayos de *Salmonella*

TABLA 30. Resumen de los límites de detección obtenidos en los ensayos de *Listeria monocytogenes*

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, me gustaría agradecer a la empresa Bioser S.A. por acceder a que yo hiciera las prácticas de empresa con ellos, realmente ha sido una experiencia enriquecedora de un año y medio. Sin ellos este trabajo no hubiera sido posible debido a los materiales e instrumentos que se requieren para realizar este trabajo.

Dentro de esta empresa se encuentran personas a las que les estaré agradecida siempre por la paciencia que han tenido conmigo y por toda la ayuda, tiempo y dedicación que han gastado en este trabajo por querer ayudarme, esto va dirigido a Irene Mir y Esther Bermejo.

Gracias también a mi tutora de la EEABB, Mónica Blanco, por hacer que este trabajo haya sido posible y realizar todas las anotaciones necesarias del trabajo. Gracias por tu dedicación y esfuerzo como docente y por tu tiempo invertido en él.

1. INTRODUCCIÓN

Es importante definir ciertos términos básicos del trabajo para llegar a entender el procedimiento molecular que será descrito en el mismo.

Por este motivo se desarrollarán los principales microorganismos patógenos del trabajo que serán la *Salmonella spp.* y la *Listeria monocytogenes* así como el método molecular, la Reacción en Cadena de la Polimerasa o más conocida como PCR (*Polymerase Chain Reaction*) y la definición de las matrices alimentarias a analizar.

1.1. *SALMONELLA SPP*¹

La *Salmonella* se trata de un microorganismo patógeno, este puede dar lugar a una infección alimentaria como la Salmonelosis. Esta infección es causada principalmente por las serovariedades de *S. enterica*² *Typhimurium* y *Enteritidis*.

Este microorganismo es un bacilo gram negativo que pertenece a la familia de las Enterobacterias. Es aerobio facultativo y tiene la capacidad de moverse mediante flagelos. Su crecimiento se puede dar a temperaturas de 6-46 °C (temperatura óptima de 37 °C) y en un rango de pH de 4,1-9 (pH óptimo de 6,5-7,5) [1].

1.1.1. ¿Dónde podemos encontrar *Salmonella*?

Este microorganismo lo podemos encontrar tanto en agua como en alimentos infectados, ya sea por su origen o por malas prácticas de higiene y manipulación. Los principales animales que la vehiculan son los porcinos y las aves [2].

Listado de alimentos comunes en los que podemos encontrar *Salmonella*:

- Huevos y productos a base de huevo crudo o poco cocinados.
- Carne cruda o poco cocinada, especialmente de aves.
- Leche y productos lácteos no sometidos a ningún tratamiento térmico.
- Agua contaminada.
- Frutas y hortalizas crudas.
- Natillas
- Pasteles de crema y tartas
- Merengues
- Embutidos curados crudos

1.1.2. La Salmonelosis

La salmonelosis o también llamada enterocolitis por definición es la enfermedad gastrointestinal causada por cualquiera de las diversas especies de *Salmonella*.

Los síntomas empiezan a manifestarse a las 8-48 horas después de la ingestión; una vez el patógeno ha colonizado el epitelio intestinal, es decir, el intestino grueso y delgado (este tiene dos funciones principales: actuar de barrera impidiendo la entrada de componentes nocivos y actuar de filtro selectivo). Esta colonización la realiza gracias a las fimbrias (estructuras proteicas que interviene en el proceso de fijación), que participan activamente en la infección facilitando la fijación del patógeno en el intestino delgado del hospedador. Los más frecuentes son los siguientes: cefalea, escalofríos, vómitos, diarrea y una fiebre que puede durar varios días [3].

¹ Indicamos spp. cuando se hace referencia a diversas especies del mismo género.

² Adjetivo aceptado para las *Salmonella* patógena.

Esta fiebre normalmente es debida a las endotoxinas (estructuras lipopolisacáridas que se encuentran en la mayoría de las bacterias gram negativas) liberadas por el patógeno cuando se lisa (ruptura de la membrana celular), suponen un factor de virulencia importante [4].

La enfermedad concluye al cabo de 2-5 días sin necesidad de intervención. Sin embargo, hay algunos pacientes que tras la recuperación pueden convertirse en portadores sanos, en estos casos la propagación acostumbra a darse por las heces.

Es importante realizar un buen diagnóstico de la serovariedad de *Salmonella* ya que algunas de ellas pueden causar septicemia (infección de la sangre) y fiebre tifoidea (se caracteriza por una infección sistémica y fiebre alta durante varias semanas).

Esta infección alimentaria no acostumbra a necesitar tratamiento y la administración de antibióticos no acorta la duración de la enfermedad ni mejora el estado del infectado. Además, desde 1965 la *Salmonella* empezó a mostrar resistencia a los fármacos antimicrobianos [5].

Para poder prevenir la enfermedad recomiendan que los alimentos que puedan contener una posible contaminación de *Salmonella* se calienten a 70 °C ya que a esta temperatura se vuelven inocuos, al igual que si se mantienen a 50 °C o más, o si se guardan a 4 °C. En los alimentos contaminados por un manipulador de alimentos podrá haber crecimiento del microorganismo si se guarda el alimento durante un período de tiempo considerablemente largo, en especial si no se guarda cocinado ni refrigerado [6].

1.1.3. Cómo analizar *Salmonella*

Para poder realizar el análisis se acostumbra a partir del alimento de origen animal que podría ser el causante realizando una serie de pruebas rápidas basadas en procesos de enriquecimiento para incrementar el número de células del patógeno hasta una cantidad que nos permita cuantificar.

Para realizar el enriquecimiento adecuado se usan medios de cultivo diferenciales y selectivos para poder discriminar el patógeno entre otras enterobacterias gram negativas [6].

Por ejemplo, el agar eosina azul de metileno (EMB) es un medio selectivo y diferencial muy utilizado para bacterias entéricas. El azul de metileno inhibe el crecimiento de las bacterias gram positivas, por lo que solo podrán crecer las bacterias gram negativas como la *Salmonella*. El patógeno al no fermentar la lactosa, se manifestará como una colonia translúcida y rosa por lo que el medio será diferencial para bacterias entéricas comunes [7].

Este análisis será descrito con más precisión en el trabajo ya que habrá unas páginas dedicada íntegramente a este. En ellas se describirá con más precisión el enriquecimiento usado y la prueba rápida realizada, en este trabajo se tratará de un método molecular (PCR).

1.1.4. Contexto a nivel Nacional y Europeo de la Salmonelosis

En Europa suceden alrededor de unos 90.000 casos de salmonelosis al año, es la segunda infección gastrointestinal más común en humanos después de la campilobacteriosis, según el informe redactado por la EFSA en 2019.

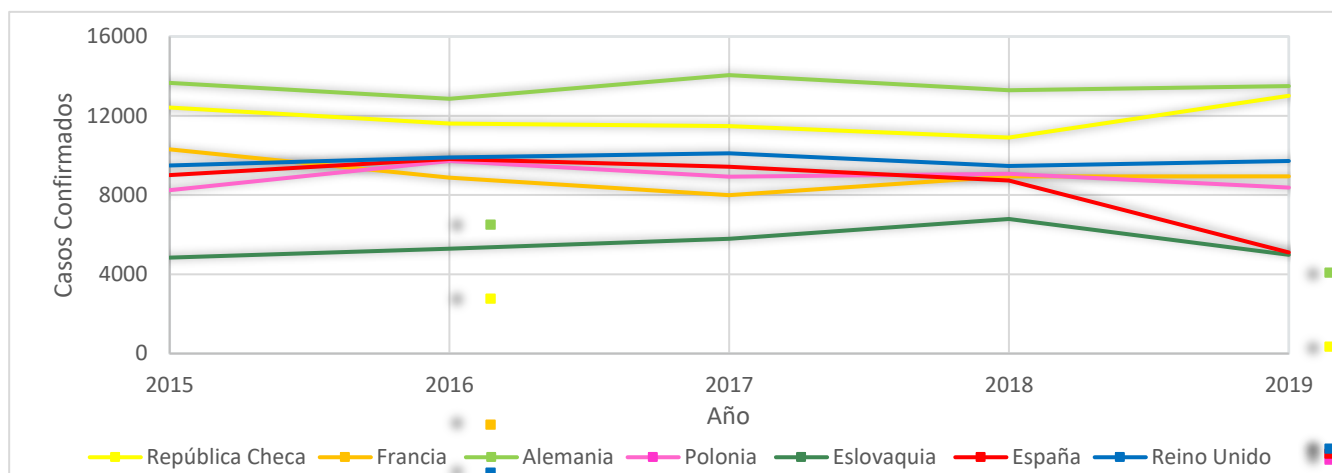


Figura 1 Países con más casos confirmados de Salmonelosis de 2015 a 2019. [8]

En la Figura 1 se encuentran representados los 7 países con más casos confirmados entre 2015 y 2019, como se puede observar España es uno de los países más afectados por *Salmonella*.

En el estudio también se estableció una relación con la incidencia de los casos de Salmonelosis dependiendo de la época del año en la que sucedía. Y se estimó que los casos de Salmonelosis tenían más incidencia durante el verano, cuando las temperaturas acostumbran a ser más elevadas [8].

1.2. LISTERIA MONOCYTOGENES

La *Listeria*, al igual que la *Salmonella* se trata de un microorganismo patógeno. Sin embargo, a diferencia del otro, este se trata de un cocobacilo gram positivo no esporulante, anaerobio facultativo que tolera ambientes salinos. Es capaz de crecer en un medio con pH de 4,4-9,4 y a temperaturas de refrigeración (aproximadamente de 2-4 °C).

Este microorganismo es capaz de formar biofilms (capa fina y viscosa formada por bacterias que forman un ecosistema y que normalmente se encuentran adheridas a una superficie) por lo que lo podremos encontrar en gran variedad de superficies [9].

La *Listeria* la portan los humanos y los animales en la flora intestinal y lo liberan con las heces [3].

1.2.1. Dónde podemos encontrar la *Listeria monocytogenes*

Debido a que la *Listeria* es capaz de multiplicarse a temperaturas de refrigeración se puede encontrar en alimentos que tengan una vida útil relativamente larga como:

- Pescados ahumados
- Productos cárnicos tratados por calor (salchichas cocidas y patés)
- Quesos de pasta blanda
- Leche cruda o helados elaborados de leche cruda
- Ensaladas preparadas, verduras y fruta fresca

El hecho de que tenga capacidad de formar biofilms también nos permitirá encontrar el patógeno en cualquier fase de la elaboración del producto, el transporte, las ventas al por menor, los servicios de comida a grandes masas de gente y hogares.

La contaminación, también se puede dar por contacto del alimento con superficies contaminadas, malas prácticas de manipulación e higiene del personal, contaminación de la materia prima y aerosoles [9].

1.2.2. La Listeriosis

La *Listeria* puede causar bacteriemia (bacterias en la sangre) y meningitis (inflamación del tejido que cubre el cerebro y la médula espinal), su período de incubación dura entre 1-4 semanas. A pesar de ser un patógeno alimentario menor de transmisión alimentaria, las infecciones por *Listeria* pueden ser muy graves.

Los resultados de los estudios hecho en humanos con listeriosis, en animales y alimentos contaminados por el microorganismo, sugieren que no se trata de un patógeno muy invasivo y se requiera de un gran inóculo de colonias para iniciar los síntomas de la enfermedad.

Esta enfermedad es muy frecuente en ancianos, mujeres embarazadas, neonatos y adultos con sistema inmunitario débil. Es muy poco probable que otros grupos de población manifiesten sintomatología. Entre esta sintomatología podemos encontrar fiebre y diarrea moderadas; en el caso de mujeres gestantes se pueden llegar a producir grandes lesiones en el feto llegando a abortos o infecciones graves en el recién nacido [10].

La inmunidad contra la *Listeria monocytogenes* viene dada por unas células inflamatorias de nuestro cuerpo, en el caso de eludirlas (como sucede en personas que tienen el sistema inmunológico debilitado) el microorganismo acabará capturado por los fagocitos intestinales. Aunque parezca algo positivo, en realidad no lo es ya que se iniciaría el proceso de infección de la *Listeria* [11].

Para prevenir la infección, cocinando a temperaturas superiores a 70 °C durante 2 minutos destruiría la bacteria, esto supondría una medida muy efectiva para acabar con la bacteria. En caso de que el proceso de fabricación del alimento no incluya tratamiento térmico, tendrá especial relevancia el mantenimiento de la cadena de frío para reducir al mínimo la contaminación y limitar la proliferación. Por lo que el producto no deberá estar a temperaturas superiores a 5 °C [9].

1.2.3. Cómo analizar la Listeriosis

Para realizar el análisis de listeriosis en alimentos se puede realizar mediante el cultivo directo o mediante métodos moleculares. Gracias a este último se pudo llegar a identificar el origen de la infección [11].

1.2.4. Contexto a nivel Nacional y Europeo de la Listeriosis

La tendencia de casos notificados a nivel europeo permaneció estable desde 2015-2019 después de un período creciente. En 2018 la listeriosis fue la quinta zoonosis más frecuente en la Unión Europea. En 2019 el número de brotes de la unión europea aumentó un 50% respecto el 2018 debido al brote notificado por España de la carne mechada en 2019, durante 2018 España no

notificó ningún brote de *Listeria*, de ahí el aumento. Según lo notificado en el informe de zoonosis de la Unión europea este brote causó 225 casos, 113 hospitalizaciones y 3 muertes.

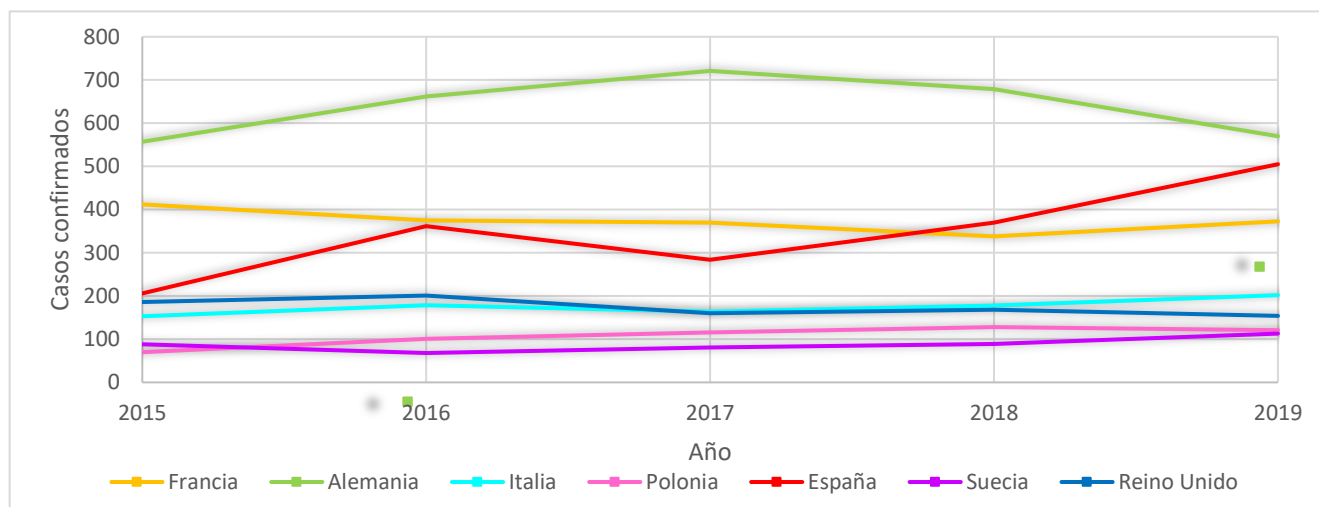


Figura 2 Países con más casos confirmados de Listeriosis de 2015 a 2019. [10]

En la Figura 2 se encuentran representados los 7 países con más casos confirmados de *Listeria* entre 2015 y 2019, como se puede observar hay un pico en los datos de España debido al caso ya comentado de la carne mechada [12].

1.3. REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA

La reacción en cadena de la polimerasa o más conocida como PCR (por su acrónimo en inglés, polymerase chain reaction) es una técnica de biología molecular y tiene como principal objetivo la obtención de un gran número de copias de un fragmento de DNA específico, al que llamaremos DNA molde. Esta técnica fue diseñada por el científico Kary Mullis en 1983, el cual años más tarde ganó el Premio Nobel de Química en 1993.

Entre las aplicaciones de la PCR podemos destacar la clonación de fragmentos de DNA momificados, se ha usado para seguir antiguas migraciones humanas, para obtener datos sobre la evolución de virus humanos patógenos y por supuesto seguridad alimentaria [13].

Se basa en la propiedad de las DNA polimerasas termoestables para poder replicar las hebras de DNA a partir de un molde. Las más comunes son las Taq polimerasas, esta es aislada de una bacteria termófila de fuentes termales *Thermus aquaticus* que es estable a temperaturas de 95 °C y no se ve afectada por la fase de desnaturalización de la PCR; se comentará a continuación.

Las DNA polimerasas termoestables sometidas a distintos ciclos de temperatura permiten la separación y unión de las hebras de DNA. La máquina automatizada que realiza todo este proceso es llamada termociclador.

La PCR no copia realmente moléculas enteras de DNA sino que amplifica fragmentos específicos de unos cuantos miles de pares de bases (la secuencia diana) a partir de una molécula más grande de DNA (el DNA molde). °

Durante cada ciclo de amplificación, la cantidad de DNA diana original se duplica, lo que provoca un aumento exponencial de DNA. En la práctica, se realizan normalmente de 20 a 30 ciclos, lo que produce un aumento de la secuencia diana de 106 a 109 veces. En pocas horas se pueden obtener grandes cantidades de DNA a partir de unas pocas moléculas diana [14].

1.3.1. Fases de la PCR

1. Desnaturalización (*Denaturation*)

Las cadenas de DNA se separan ya que se calientan a 95 °C durante 20-30 segundos³. Al final de esta etapa obtendremos las dos cadenas de DNA diferenciadas que servirán de molde para el siguiente paso.

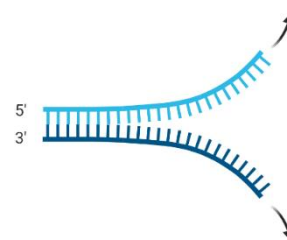


Figura 3 Proceso de separación de las hebras de DNA por desnaturalización

2. Hibridación (*Annealing*)

En esta etapa los primers⁴ se alinean en el extremo 3' con la secuencia complementaria del DNA molde. Esto se realiza a una temperatura de 50-60°C.

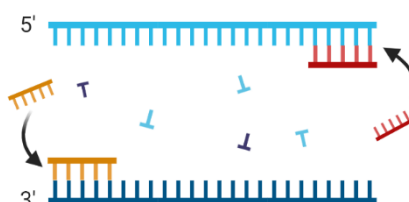


Figura 4 Los primers se unen al extremo 3' en la etapa de hibridación

3. Elongación o Extensión (*Elongation*)

La DNA polimerasa termoestable incorpora los nucleótidos libres (previamente añadidos) partiendo del primer como soporte inicial y tomando como ejemplo la secuencia del DNA molde en dirección 5'-3'. En el caso de la Taq polimerasa la temperatura en la que el encima es funcional es a los 72°C. El tiempo de esta etapa depende de la enzima y del fragmento de DNA a amplificar.

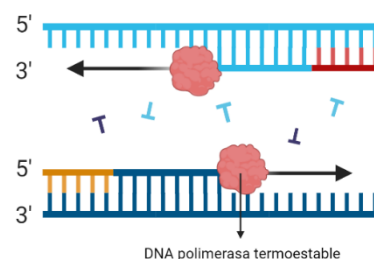


Figura 5 Elongación de la cadena de DNA gracias a la Taq polimerasa

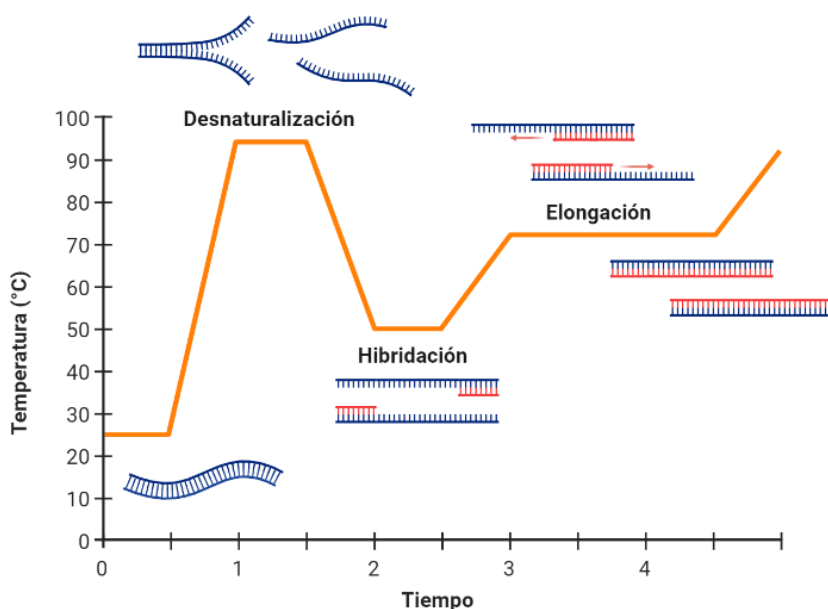


Figura 6 Resumen de las tres etapas que conforman un ciclo de PCR

³ El tiempo depende principalmente de la secuencia de nucleótidos de la cadena de DNA que se tenga que separar y del modelo del termociclador.

⁴ Primers: también llamados cebadores o iniciador molecular, hace referencia a la secuencia de oligonucleótidos que marca las extremidades de la secuencia de DNA molde que se pretende sintetizar.

Al final del ciclo obtendremos los amplicones (pieza de DNA o RNA producto de eventos de amplificación o replicación), los cuales tendrán el tamaño dictado por el número total de pares de bases. Estos se monitorizan gracias a la fluorescencia.

Todo lo descrito corresponde a 1 ciclo de la PCR, por lo que cada vez que se repitan estos 3 pasos contará como ciclo más. Lo más habitual es que los termocicladores realicen entre 40-50 ciclos en cada run, esto dependerá de la casa comercial del termociclador [15].

1.3.2. Detección

Para poder monitorizar la fluorescencia de los amplicones se necesita un lector el cual ya va incorporado en los termocicladores. Lo que diferencia las diferentes casas comerciales es la fuente de energía que utilizan en la excitación. En general acostumbran a ser tres fuentes: lámparas de luz, diodos de emisión de luz (LED) y láseres.

La señal de fluorescencia emitida es proporcional a la cantidad de producto de PCR y es generada por las sondas fluorescentes. Es decir, cuanta más señal de fluorescencia, más cantidad de "producto" en la muestra analizada.

Los datos de fluorescencia son recogidos por un software del termociclador que permite construir una gráfica que representa la cantidad de fluorescencia en función del número de ciclos.

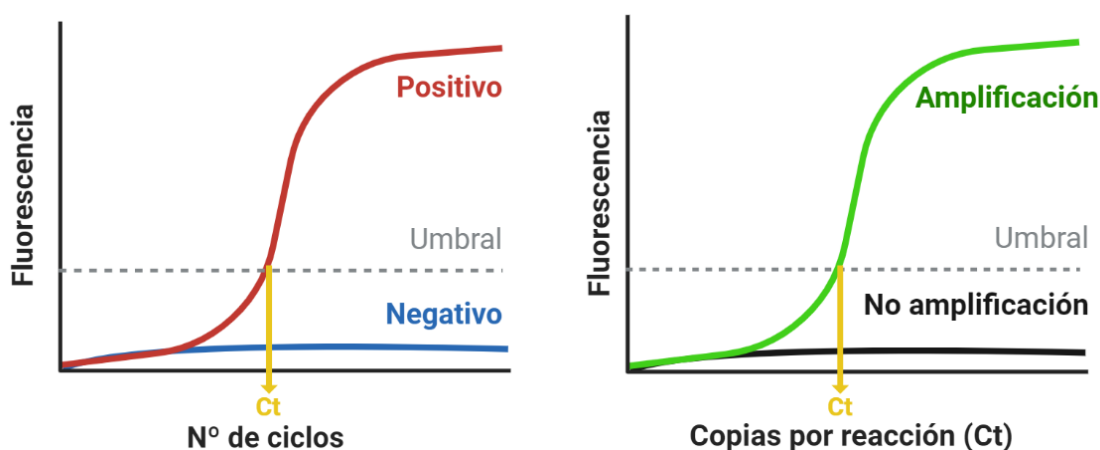


Figura 7 Representación de los de los gráficos obtenidos de una PCR convencional

Como se puede apreciar en la Figura 5 hay un parámetro que se trata del Ct (*cycle threshold*) o también llamado umbral del ciclo, este es la intersección entre una curva de amplificación y una línea de umbral. Indica el número de ciclos de un ensayo de PCR necesario para amplificar el patógeno para alcanzar un nivel detectable.

El valor de Ct puede indicar el nivel relativo de patógeno en una muestra (cuanto más bajos sean los valores de Ct, reflejaran niveles de microorganismo patógeno más altos en la muestra analizada).

Existen varias formas de detección y pueden ser clasificadas en: métodos específicos y métodos no específicos. Lo único que tienen en común los métodos específicos y los no específicos es que ambos métodos utilizan la señal de fluorescencia emitida para detectar los productos amplificados.

- Los métodos no específicos se basan en el uso de moléculas que se intercalan y tienen afinidad por el DNA de doble cadena. Cuando estos se oxidan generan fluorescencia. Esta se captura en la etapa de extensión de cada ciclo.

El fluoróforo no específico más conocido es el SYBR Green. Este al estar cargado positivamente, mientras se encuentra en la solución sin unirse a la doble cadena de DNA prácticamente no emite fluorescencia. Pero, al unirse al surco menor del DNA incrementa hasta 1000 veces su fluorescencia.

Como ventaja positiva este método no requiere la síntesis de sondas específicas, sin embargo, su principal desventaja es que puede unirse a cualquier molécula de DNA de doble cadena, incluyendo dímeros de primers.

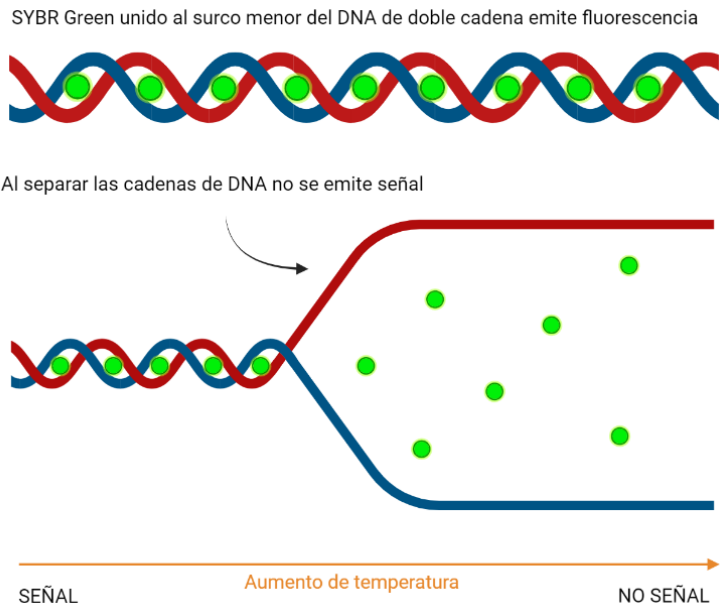


Figura 8 Ejemplo del funcionamiento del SYBR Green

- Los métodos específicos consisten en transferir energía desde un fluoróforo a un aceptor, también llamado “quencher”. Existen dos tipos de métodos no específicos: pruebas basadas en hidrólisis y por hibridación.

En las pruebas basadas en hidrólisis encontramos el fluoróforo unido al quencher, debido a la proximidad el aceptor (quencher) actúa como inhibidor de fluorescencia. Cuando estos se unen a la secuencia diana de DNA entre los dos primers y la Taq polimerasa empieza a realizar la elongación, esta rompe la unión fluoróforo-quencher logrando que la fluorescencia emitida por el fluoróforo sea liberada y captura por el equipo.

En este caso mientras no haya unión de la sonda con el DNA diana no se emitirá ningún tipo de fluorescencia cosa que hace este método muy seguro y específico.

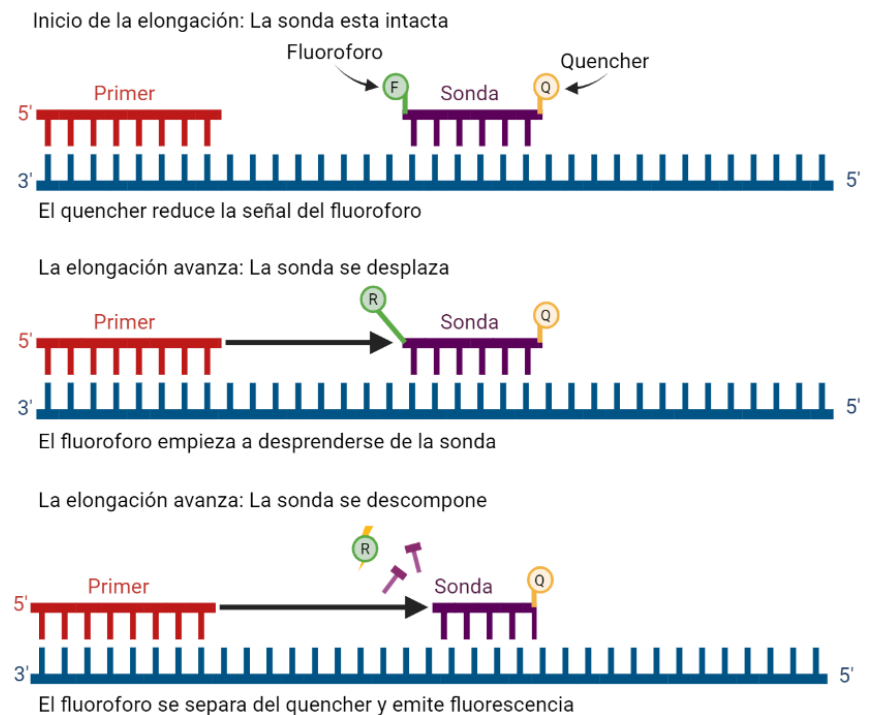


Figura 9 Método no específico por pruebas basadas en hidrólisis

Las pruebas por hibridación consisten en la unión de una fluoroforo a un aceptor que a su vez se encuentra unido a otra sonda. En este caso, tanto el fluoroforo como el aceptor generan un espectro de excitación y emisión similar. Cuando ambas sondas se unen a a la secuencia diana de DNA, el fluoroforo es excitado y la señal emitida se transfiere también al aceptor. De esta manera hay un incremento de la fluorescencia generada. Un ejemplo comercial de pruebas de hibridación son los molecular Beacons.

Como gran desventaja de los métodos específicos es que son más costosos que los no específicos, sin embargo, se gana en especificidad de la reacción [15].

1.3.3. Canales de excitación/detección

Como bien se ha comentado anteriormente para poder monitorizar la fluorescencia se usa una fuente de energía que varía dependiendo de la casa comercial.

Esta fuente de energía se puede medir en varios espectros o “canales” de excitación y detección.

Channel	Excitation (nm)	Detection (nm)	Calibrated Fluorophores
1	450-490	515-530	FAM™, SYBR Green I™
2	515-535	560-580	VIC®, HEX™, TET™, Cal Gold 540™
3	560-590	610-650	ROX™, TEXAS RED®, Cal Red 610™
4	620-650	675-690	CY5, Quasar 670™
5	672-684	705-730	Quasar 705™
6	450-490	560-580	None (accommodates FRET Chemistry)

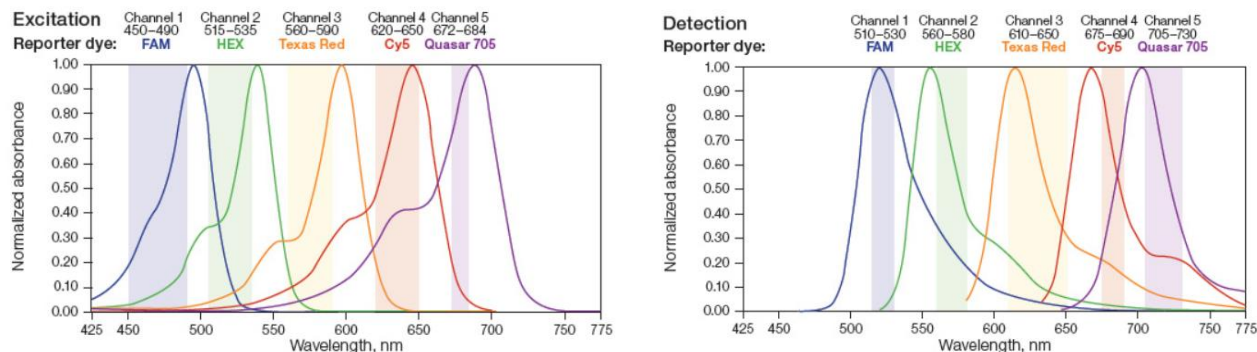


Figura 10 Canales y gráficas de las ondas de excitación y detección [16]

Dependiendo de los canales que nos permita detectar la PCR hablaremos de una reacción monoplex (1 solo canal) o de una reacción multiplex (2 o más canales).

1.3.4. Controles

Además de la secuencia diana, también se añaden y analizan los siguientes controles para asegurarnos de que la reacción PCR se está realizando correctamente.

- Negativo: componente al que se le agregan todos los componentes de la PCR a excepción del DNA. Este control nos permitirá ver posibles contaminaciones.
- Positivo: contiene DNA de la muestra, el cual se deberá amplificar.
- Control interno (CI): secuencia de DNA que se encuentra en el mismo tubo de la muestra, distinta a la del DNA diana que se amplifica de forma simultánea y de forma

independiente de la presencia o no del patógeno. Por tanto, este siempre deberá detectarse.

Se amplifica con los mismos cebadores, pero se detecta por fluoróforos distintos, por lo que el canal de excitación y detección será distinto al del patógeno que se está analizando. Este control nos permitirá detectar falsos negativos causados por inhibidores [17].

1.3.5. PCR en tiempo real y PCR punto final o convencional

Las primeras bases de la PCR en tiempo real se empezaron a desarrollar en 1992. El principio básico de la PCR en tiempo real tiene los fundamentos en la PCR de punto final o “convencional”; la que se ha estado comentado hasta ahora. Lo único que cambia entre ellas es como se detectan y analizan los productos amplificados.

En la PCR en tiempo real la detección de los productos sucede en cada ciclo de la reacción, en la convencional la cantidad de producto acumulado de PCR se mide al final de los ciclos [15].

Tabla 1 Comparativa entre la PCR en tiempo real y la PCR convencional [15]

PCR en tiempo real	PCR convencional
La detección se realiza en cada ciclo de la amplificación	La detección se realiza al final de todos los ciclos, cuando ya se obtiene el producto acumulado de PCR
Método cuantificativo y cualitativo	Método cualitativo
Los datos se recopilan durante la fase logarítmica de la PCR	Menos sensibilidad que la PCR en tiempo real
Menor cantidad de patógeno para ser detectado	Mayor cantidad de patógeno para ser detectado

2. OBJETIVOS

2.1. CONSIDERACIONES PREVIAS

En el último año he estado realizando unas prácticas en la empresa Bioser S.A. que se dedica a la seguridad alimentaria. Es un distribuidor de todo tipo de productos destinados a todas aquellas industrias que requieran realizar análisis de alimentos para su comercialización.

Durante este período de tiempo he podido desempeñar infinidad de funciones y poner en práctica mis conocimientos aprendidos durante mi etapa académica. Al mismo tiempo he adquirido aprendizaje y profesionalidad de la mano del departamento técnico de la empresa al ser mi primer contacto con el mercado de las industrias alimentarias.

Entre las muchas funciones que he desempeñado y han sido parte de mi formación se encuentran temas tanto de maquinaria como de materiales necesarios para realizar ensayos técnicos de laboratorio e incluso toma de contacto con clientes, proveedores y comerciales de la empresa. Por ejemplo, estufas, autoclaves, preparadores de medios, fungible, gestión de incidencias, resolver dudas técnicas, estudio de incorporación de alternativas a productos existentes con rotura, estudio de productos nuevos...

Una de las funciones que he desempeñado en la empresa es la implementación de un nuevo proveedor. Este proveedor cubre todo el sector de PCR a nivel de detección de patógenos alimentarios en productos. Este fue el punto de inicio del cual surgió el interés por realizar este trabajo.

A partir de aquí me planteé como los laboratorios realizaban este tipo de análisis y las pautas que siguen. De ahí descubrí la necesidad del uso de kits que estuvieran validados ya que el hecho de que tuvieran esta certificación daba credibilidad al proveedor del producto y sobre todo a los resultados obtenidos. De esta manera se cercioran de que los resultados obtenidos son correctos.

Pero, también, se quiso ir más allá y realizar una aproximación de la verificación de esta validación.

Estos dos planteamientos permiten una comparación entre los kits validados y el intento de realizar una verificación interna.

Se examinarán kits de extracción y detección de *Salmonella* y *Listeria monocytogenes* de Biotecon y Bax que pertenecen a la casa comercial Hygiena (marca elegida por Bioser S.A.), la cual se ayudó a implementar en la empresa, y kits de Bio-Rad (marca elegida por otros distribuidores). Estos kits tendrán validaciones emitidas por organismos como la AFNOR⁵ y AOAC⁶.

El Anexo 1 recoge los certificados de validación de los seis kits que se usarán para realizar el estudio experimental.

⁵ AFNOR (Asociación francesa de normalización): Asociación que pertenece a la organización internacional de la estandarización que desarrolla sus actividades internacionales de normalización, provisión de información, certificación y ensayo a través de una red de filiales que son miembros de la asociación.

⁶ AOAC (*Association of Official Agricultural Chemists*): asociación sin ánimo de lucro que publica estandarizaciones y análisis químicos basados en métodos específicos con la finalidad de incrementar la confianza de los resultados obtenidos en análisis químicos y microbiológicos.

2.2. OBJETIVOS PRINCIPALES Y SECUNDARIOS

Los objetivos principales del trabajo son:

- Comparación y análisis de resultados de los kits de detección utilizados en la investigación.
- Simulación de la ISO 16140-3:2021 que consiste en la verificación de un método de validación definido en unas matrices concretas.

Objetivos secundarios del trabajo:

- Ampliar conocimientos tanto a nivel de técnico de laboratorio como conocimiento de legislación en el ámbito de seguridad alimentaria.
- Conocer otros usos de la PCR, así como su técnica aplicados a seguridad alimentaria.
- Identificar diferentes equipos e instrumental de laboratorio.
- Trabajar con cepas en las que se conoce la cantidad de UFC.

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1. PROCESO DE VERIFICACIÓN SEGÚN LA ISO 16140-3

Como bien se ha comentado a lo largo del trabajo, este consiste en la verificación del método de validación siguiendo la norma ISO 16140-3:2021. En la ISO se describe el procedimiento que se debe seguir para realizar esta verificación.

Se ha decidido elegir esta parte de la norma ISO 16140 ya que se ha seguido la ruta marcada en azul del árbol de decisiones (Figura 10) indicado en la misma.

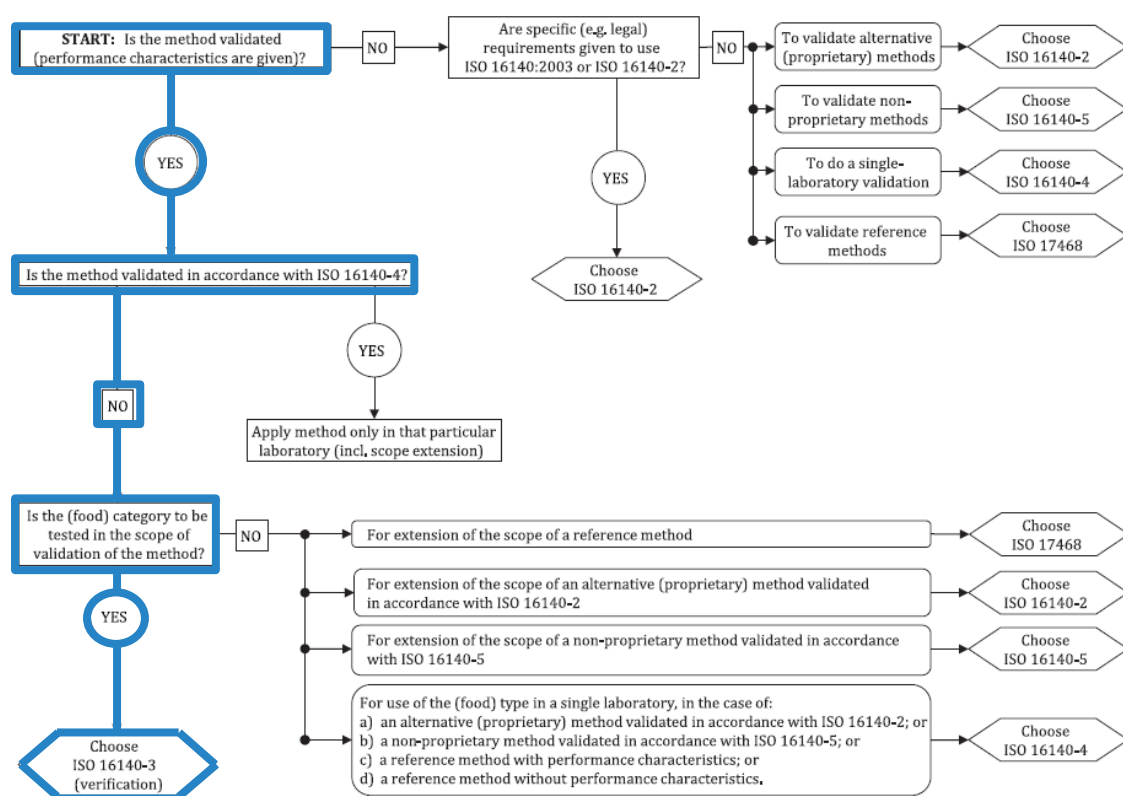


Figura 11 Árbol de decisiones para la aplicación de las partes de la ISO 16140

Antes de realizar una breve descripción de en qué consiste esta norma, enumeraremos las muestras a analizar; su elección será descrita a lo largo de este punto.

- Salmón ahumado
- Clara de huevo
- Queso Brie
- Lechuga

Existen dos tipos de verificación:

- Verificación de la implementación: Esta verificación tiene como objetivo principal demostrar que el laboratorio es capaz de realizar el método descrito en la validación de forma correcta.
- Verificación del alimento: Esta verificación tiene el propósito de demostrar que el laboratorio es capaz de analizar los alimentos que se encuentran dentro del alcance de aplicación del laboratorio.

Dentro de las verificaciones se puede decidir si se realiza un método cualitativo o cuantitativo. En este trabajo se realizará un método cualitativo de verificación, es decir, se determinará la presencia o ausencia del microorganismo patógeno en una determinada cantidad de producto/matriz.

La razón por la que se realizará un ensayo cualitativo es que se seguirá el Reglamento 2073/2005 de la unión europea.

Como se ha elegido alimentos que podrían contribuir al desarrollo de la *Listeria monocytogenes* y supondremos que se está realizando la verificación antes de que el producto haya dejado las instalaciones de la empresa que lo está produciendo, siguiendo el Reglamento 2073/2005 se determinará la presencia/ausencia del patógeno en 25 g de muestra.

Tabla 2 Captura de pantalla de los criterios de aceptación de seguridad alimentaria para *Listeria monocytogenes* del Reglamento 2073/2005 [19]

1.2. Alimentos listos para el consumo que pueden favorecer el desarrollo de <i>L. monocytogenes</i> , que no sean los destinados a los lactantes ni para usos médicos especiales	<i>Listeria monocytogenes</i>	5	0	100 ufc/g (5)	EN/ISO 11290-2 (6)	Productos comercializados durante su vida útil
		5	0	Ausencia en 25 g (7)	EN/ISO 11290-1	Antes de que el alimento haya dejado el control inmediato del explotador de la empresa alimentaria que lo ha producido

En el caso de la *Salmonella* dependerá del producto/matriz que se esté valorando, teniendo en cuenta todos los productos definidos anteriormente, podremos decir que al igual que en el anterior patógeno en todos ellos se determinará la presencia/ausencia en 25 g de muestra.

Tabla 3 Captura de pantalla de los criterios de aceptación de seguridad alimentaria para *Salmonella* del Reglamento 2073/2005 [19]

1.17. Moluscos bivalvos vivos y equinodermos, tunicados y gasterópodos vivos	<i>Salmonella</i>	5	0	Ausencia en 25 g	EN/ISO 6579	Productos comercializados durante su vida útil
1.15. Alimentos listos para el consumo que contengan huevos crudos, excluidos los productos en los que el proceso de fabricación o la composición del producto eliminen el riesgo de <i>Salmonella</i>	<i>Salmonella</i>	5	0	Ausencia en 25 g o ml	EN/ISO 6579	Productos comercializados durante su vida útil
1.11. Quesos, mantequilla y nata a base de leche cruda o leche sometida a tratamiento térmico inferior a la pasteurización (16)	<i>Salmonella</i>	5	0	Ausencia en 25 g	EN/ISO 6579	Productos comercializados durante su vida útil
1.19. Frutas y hortalizas troceadas (listas para el consumo)	<i>Salmonella</i>	5	0	Ausencia en 25 g	EN/ISO 6579	Productos comercializados durante su vida útil

Una vez ya sabemos el tipo de verificaciones que podemos encontrar debemos diferenciar entre los alcances que podemos encontrar, esta diferenciación nos ayudará a clasificar los productos/matrices elegidos para la verificación. Hay tres tipos de alcances: Alcance del método, Alcance de la Validación y Alcance de aplicación del laboratorio.

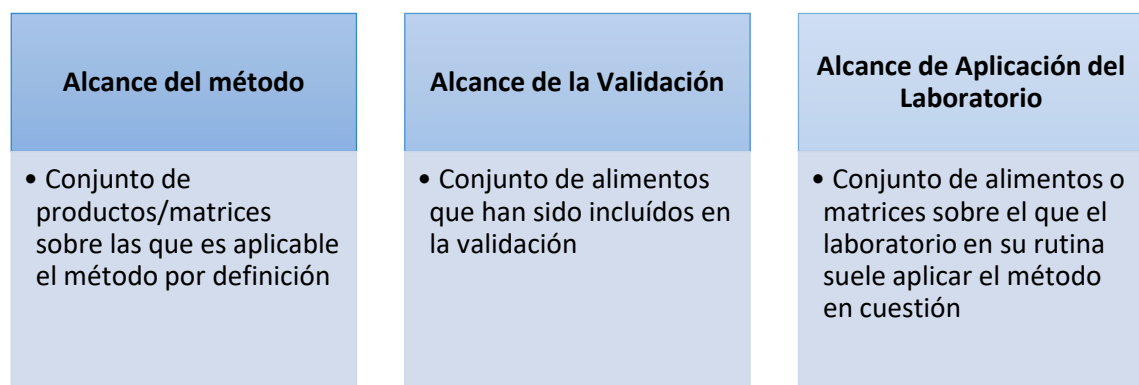


Figura 12 Descripción de los tres tipos de alcances [20]

Dentro de estos alcances hay que mencionar que uno está incluido dentro del otro. Es decir, el alcance de validación estará incluido dentro del alcance del método y el alcance de aplicación del laboratorio estará incluido dentro del alcance de validación que este a su vez estará incluido en el alcance del método.

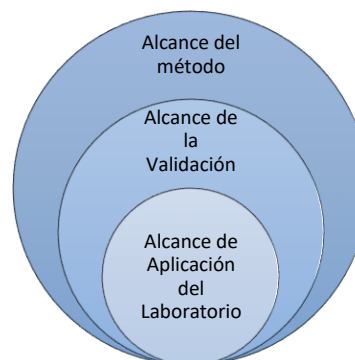


Figura 13 Inclusión de los tres tipos de alcances [20]

El siguiente paso para realizar la verificación consistirá en clasificar el alcance de las matrices/productos seleccionados para cada tipo de verificación.

Para realizar la verificación de la implementación tendré que elegir un producto/matriz que se encuentre dentro de la validación a verificar y que al mismo tiempo se encuentre en el alcance de aplicación del laboratorio. En este caso se seleccionará la **lechuga**.

Para realizar la verificación del alimento se deberá elegir un producto/matriz que se encuentre dentro del alcance de la validación y que sean relevantes para el laboratorio. En este caso se han elegido los alimentos restantes: **el salmón ahumado, la clara de huevo, el queso brie y la lechuga**.

No solo se rige por el alcance si no que la verificación también exige realizar un número mínimo de alimentos. Para saber este dato se consultará la Tabla 5.

Tabla 4 Resumen del número mínimo de alimentos que se deben seleccionar para realizar la verificación [20]

Scope of validation	Number of samples		
	Implementation verification	(Food) item verification	Total minimum number
"Broad range of foods" scope ≥ 5 food categories	1	≥ 5	≥ 6
"Limited range of foods" scope N_{food} categories	1	$N_{\text{food}} \leq 4$	$(N_{\text{food}} + 1) \leq 5$
"Broad range of foods" + other categories (N_{other}) scope	1	≥ 5 food items + 1 item from each of the N_{other} other categories	$\geq 6 + N_{\text{other}}$
"Limited range of foods" N_{food} categories + other categories (N_{other}) scope	1	$N_{\text{food}} \leq 4$ + 1 item from each of the N_{other} other categories	Depending on the scope, minimum is 2 (1 food + 1 other) maximum is 7 (4 food + 3 other)
Other categories (N_{other}) scope only	1	$N_{\text{other}} \leq 3$	$(N_{\text{other}} + 1) \leq 4$

En el caso del trabajo tendremos en cuenta un limitado grupo de alimentos por lo que nos tendremos que fijar en la segunda línea de la Tabla 5. En esta se nos indica tanto el número de alimentos que tienen que realizar la verificación de la implementación (en este caso 1) como el número de alimentos que tienen que realizar la verificación del alimento (en este caso 3). A continuación, se calcula el número total mínimo de muestras que deberán realizar ambas verificaciones:

$$(N_{\text{food}} + 1) \leq 5 \quad \rightarrow \quad (3 + 1) \leq 5 \quad \rightarrow \quad 4 \leq 5$$

Por lo tanto, para realizar la verificación se necesitarán un mínimo de 4 productos/matrices, los cuales ya han sido previamente seleccionados.

En este punto ya sabemos los productos/matrices que se han elegido para realizar la verificación y por qué, como bien se ha comentado anteriormente se aplicará un método cualitativo para realizar esta verificación. Este se basará en las características de rendimiento descritas en la Tabla 6.

Tabla 5 Características de rendimiento necesarias que deben determinarse para realizar la verificación [20]

Method	Performance characteristic	Implementation verification	(Food) item verification
Qualitative	Estimated LOD ₅₀ (eLOD ₅₀)	✓	✓
Quantitative	Intralaboratory reproducibility standard deviation (S_{IR})	✓	Not applicable
	Estimated bias (eBias)	Not applicable	✓

NOTE 1 The relationship between intralaboratory reproducibility standard deviation (S_{IR}) and ISO 19036 is explained in 6.1.
NOTE 2 For the verification of qualitative method, three protocols are proposed to the user laboratory. The protocol 3 does not require a determination of an eLOD₅₀ but to target a concentration of 3 cfu to 5 cfu/test portion.

Por lo que se observa en la Tabla 6 las características de rendimiento estarán basadas en el cálculo de la estimación del límite de detección 50 (LOD₅₀).

Entendemos como límite de detección (LOD_x) la concentración medida del analito⁷ obtenida mediante un procedimiento de medida determinado, para el cual la probabilidad de detección es X. Entonces, podemos decir que el límite de detección 50 (LOD₅₀) será el nivel de detección en el que el 50% de los análisis presentan un resultado positivo. [21]

Para poder realizar esta estimación se deberá elegir entre tres protocolos diferentes:

- Protocolo 1: se aplica cuando hay incerteza de alcanzar el nivel de contaminación deseado ya que se ha hecho una inoculación con cultivo.
- Protocolo 3: se aplica cuando el nivel de contaminación es conocido por que se ha utilizado material de referencia.
- Protocolo 2: se aplica cuando la primera elección de protocolo no ha funcionado correctamente y se necesita repetir el experimento.

En el caso de este trabajo se realizará el protocolo 1 y para saber la cantidad de inoculación que se deberá incluir y las réplicas se consultará la Tabla 7 que se encuentra en la ISO 16140-3.

Tabla 6 Número de replicas necesarias en función del protocolo elegido y la inoculación para determinar la estimación LOD₅₀ [20]

Protocol	Inoculation level of the test portion					Total number of replicates
	9 × LOD ₅₀ / test portion	3 × LOD ₅₀ / test portion	1 × LOD ₅₀ / test portion	3 cfu to 5 cfu /test portion	Blank	
1	1	4	4	–	1	10
2	–	3	5	–	1	9
3	–	–	–	7	1	8

NOTE The abbreviation of colony forming units is cfu.

Tal y como se puede ver en la Tabla 7 se deberán realizar un total de 10 réplicas.

⁷ Analito: componente representado en forma de una cantidad susceptible de medida. [23]

3.2. CEPAS DE INOCULACIÓN

Las cepas (especie descendiente de una única célula) que se usarán para realizar la inoculación (introducción de un componente que crecerá y se reproducirá) del ensayo son unas cepas de la casa comercial LGC, de los dos patógenos objetivos. Es decir, de *Salmonella* y de *Listeria monocytogenes*. Estas se comercializan en forma de lenticula liofilizada para que su transporte y conservación sea óptimo. Las lenticulas que se usarán para realizar el análisis son las siguientes:

Tabla 7 Cepas de reconstitución de la casa comercial LGC usadas para la verificación

Referencia Fabricante	Referencia Bioser	Descripción
LGCMIC-RM08-10	183032010	Easi-tab™: <i>Salmonella</i> ser. Abony, approx. $2,0 \times 10^1$ cfu/RM
LGCMIC-RM28-10	183030010	Easi-tab™: <i>Listeria monocytogenes</i> , approx. $5,0 \times 10^4$ cfu/RM

Según la ficha técnica del fabricante tienen una concentración de UFC aproximada; sin embargo, hay una desviación. Esto indica que no se sabe con ciencia cierta si la cantidad indicada de UFC es la que nos da el proveedor, por tanto, con esto se justifica la elección del protocolo 1.

En el caso de la lenticula de *Salmonella*, la desviación y la concentración de UFC es la siguiente:

Tabla 8 Captura de pantalla de la Ficha Técnica del producto RM08 con nº de lote 081801

Determinand	Concentration (cfu/RM)	Lower - 0.5 Log ₁₀	Upper + 0.5 Log ₁₀
Enumeration of <i>Salmonella</i> spp.	105	33	332

Teniendo en cuenta estos datos y que se deberán hacer 9 réplicas de cada alimento + 1 de blanco. La reconstitución de la lenticula se realizará de la siguiente manera:

- Como las lenticulas se encuentran liofilizadas, estas se conservan a temperatura de congelación. Por tanto, para realizar la reconstitución se deberán sacar del congelador y dejar a temperatura ambiental aproximadamente 10 minutos.
- Una vez pasado este tiempo, se deberá añadir 1ml de agua de peptona tamponada dentro del vial con un golpe de vórtex posterior y esperaremos 15 minutos. De esta manera se facilitará la resuspensión del patógeno en el agua de peptona.
- Al finalizar el paso 2, el 1ml de agua de peptona deberá ser traspasado a 4ml de volumen de diluyente para poder alcanzar la concentración final deseada.

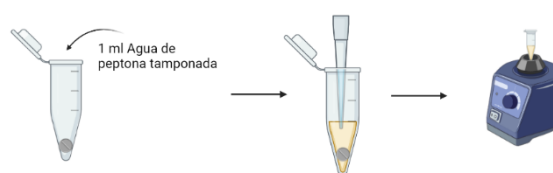


Figura 14 Representación del paso 2 de la reconstitución de la lenticula

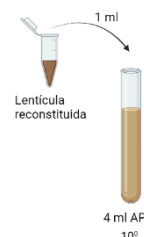


Figura 15 Representación del diluyente de la lenticula

Dado que la lenticula tiene una concentración de patógeno muy baja, en la verificación se ha decidido realizar únicamente 4 réplicas de cada uno de los alimentos seleccionados con la misma concentración de patógeno ya que si se realizaba un banco de diluciones no se obtendría prácticamente patógeno para poder ser analizando una vez hecha la inoculación.

En el caso de la *Listeria monocytogenes*, la desviación y concentración de UFC es la siguiente:

Tabla 9 Captura de pantalla de la Ficha Técnica del producto RM28 con nº de lote 28101

Determinand	Concentration (cfu/RM)	Lower - 0.5 Log ₁₀	Upper + 0.5 Log ₁₀
Enumeration of <i>Listeria monocytogenes</i>	7.08 x 10 ⁴	2.24 x 10 ⁴	2.24 x 10 ⁵

Teniendo en cuenta estos datos y que se deberán hacer 9 réplicas de cada alimento + 1 de blanco. La reconstitución de la lenticula se realizará de la siguiente manera:

1. Como las lenticulas se encuentran liofilizadas, estas se conservan a temperatura de congelación. Por tanto, para realizar la reconstitución se deberán sacar del congelador y dejar a temperatura ambiental aproximadamente 10 minutos.
2. Una vez pasado este tiempo, se deberá añadir 1ml de agua de peptona tamponada dentro del vial con un golpe de vórtex posterior y esperaremos 15 minutos. De esta manera se facilitará la resuspensión del patógeno en el agua de peptona.
3. Al finalizar el paso 2, el 1ml de agua de peptona deberá ser traspasado a los otros volúmenes de diluyente para poder alcanzar la concentración final deseada.

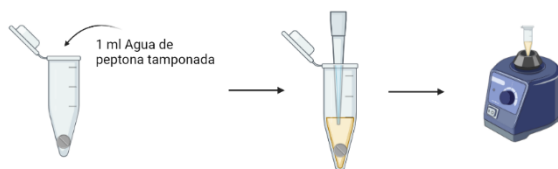


Figura 16 Representación del paso 2 de la reconstitución de la lenticula

Una vez se ha reconstituido la lenticula se realizará un banco de diluciones para realizar una inoculación siguiendo las concentraciones de patógeno de la Tabla 7.

- 9 x LOD₅₀ / test portion [10⁰] – 1 muestra
- 3 x LOD₅₀ / test portion [10⁻¹] – 4 muestras
- 1 x LOD₅₀ / test portion [10⁻²] – 4 muestras
- 1 muestra del blanco

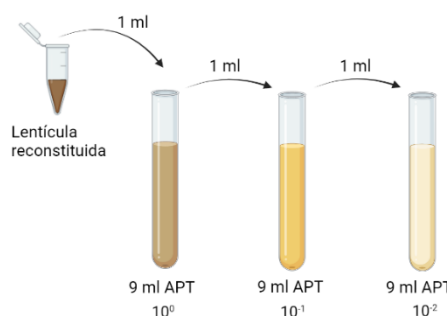


Figura 17 Banco de diluciones

A cada una de las muestras enriquecidas se le añadirá 1 ml de la concentración del banco de diluciones asignado.

3.3. TERMOCICLADOR CFX96 TOUCH

El termociclador CFX96 Touch es un equipo que realiza PCR en tiempo real de la Bio-rad. Tiene una alta capacidad (96 pocillos), un sistema óptico mediante LEDs que permite realizar varias lecturas de fluorescencia de forma simultánea y 6 canales de lectura.



Figura 18 Termociclador CFX96 Touch [18]

Este equipo es capaz de realizar reacciones multiplex en el mismo pocillo y también en el mismo canal. Además, como se ha comentado con anterioridad se trata de un equipo de plataforma abierta, por lo que se pueden usar distintos kits de casas comerciales distintas. También permite modular la rampa de temperatura a la que se hará el ciclo de la PCR dependiendo del patógeno que se esté analizando.

En el caso de este termociclador, la fluorescencia es medida por encima de la placa de la muestra, la lanzadera óptica es capaz de realizar la lectura de los pocillos con una alta sensibilidad y sin ningún tipo de interferencias. Esto se debe a que en cada posición y con cada exploración, la lanzadera óptica está centrada de forma reproducible de sobre cada uno de los pocillos de la placa por lo que la trayectoria de la luz LED es siempre fija y óptima.

En la imagen se puede ver representada la lanzadera óptica del sistema CFX96 Touch la cual se desplaza por la placa. La luz enfoca directamente en el centro de cada pocillo de la muestra.

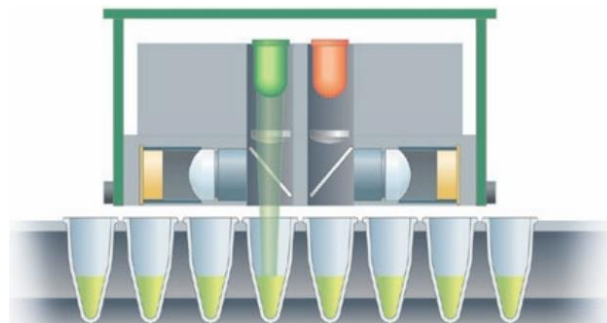


Figura 19 Vista lateral de la lanzadera óptica que muestra el LED verde disparando encima de cada pocillo [21]

El software del termociclador permite que las lecturas de fluorescencia se recojan automáticamente para poder ser interpretada cuando el usuario lo crea más oportuno. Este es fácil de utilizar para hacer una recopilación de los datos, el análisis de estos y la elaboración de Figuras y estudios t de datos de PCR en tiempo real [22].

3.4. TERMOCICLADOR X5

El termociclador de BAX® System X5 realiza la PCR convencional. A diferencia del otro termociclador este no tiene tanta capacidad ya que solo dispone de 32 pocillos [23].

El proveedor describe el Termociclador como un instrumento fácil de instalar y que prácticamente no necesita mantenimiento. Además, el tener solo 32 pocillos hace que sea un equipo pequeño que permite optimizar el espacio de trabajo en el laboratorio.

Está diseñado para informar de la presencia de microorganismo patógeno en concentraciones tan bajas como 10^4 ufc/ml después de un correcto procedimiento de enriquecimiento [24].

En este Termociclador al igual que en el otro la lectura de la fluorescencia se realiza por la parte superior del equipo, también es capaz de realizar reacciones multiplex y va acompañado de un software que proporciona resultados rápidos para ayudar a tomar las decisiones correctas al manipular de alimentos.

Como componente más característico de este instrumento que el otro Termociclador no tiene es que la tapa muestra diferentes colores dependiendo del estado en que se encuentre el equipo:

Tabla 10 Tipos de estados del Termociclador durante la ejecución del proceso de PCR [25]

DURANTE LA EJECUCIÓN DEL PROCESO DE PCR

Color	Estado del instrumento
Azul (fijo)	El instrumento se está precalentando para realizar la ejecución.
Verde (fijo)	El instrumento está listo para la ejecución.
Rojo (parpadeo)	El instrumento se está precalentando durante la ejecución.
Rojo y Azul (se alternan)	El instrumento esta alternando entre el calentamiento y el enfriamiento durante la ejecución del proceso de PCR.
Azul (parpadeo)	El instrumento está adquiriendo datos ópticos durante la ejecución de un proceso.
Azul claro (fijo)	La ejecución se ha completado. Las muestras se pueden sacar del Termociclador.

Tabla 11 Tipos de estados del Termociclador cuando el equipo no está procesando muestras [25]

CUANDO EL EQUIPO NO ESTÁ PROCESANDO MUESTRAS

Color	Estado del instrumento
Azul (parpadeo)	El instrumento se está encendiendo.
Rojo (fijo)	La tapa del instrumento está abierta.
Rojo (intermitente)	Se ha detectado un error en el instrumento.



Figura 20 Representación del equipo X5. En orden de izquierda a derecha: (1) El instrumento se está precalentando para realizar la PCR (2) El instrumento está listo para que inicie la PCR (3) La tapa del instrumento está abierta [18]

3.5. ENRIQUECIMIENTO

El enriquecimiento forma parte de la preparación previa de la matriz la cual consiste principalmente en añadir un caldo de cultivo “x” a “x” gramos de muestra para hacer crecer el microorganismo patógeno. Esta mezcla se realiza en unas bolsas que tienen un filtro incorporado, comúnmente llamadas bolsas stomacher.

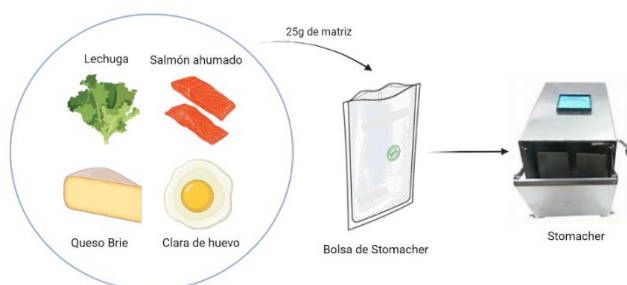


Figura 21 Elementos para hacer el enriquecimiento

Según las validaciones que se van a verificar en todas ellas se realiza el enriquecimiento con 25 gramos de muestra y 225 ml de caldo de cultivo.

En el caso de la *Salmonella* el caldo de cultivo que se usará será el agua de peptona tamponada (APT) y en el caso de la *Listeria monocytogenes* se usará “Half Fraser” de la casa comercial Biokar.

Tabla 12 Referencias de los caldos de cultivo utilizados para realizar la verificación

Referencia Fabricante	Referencia Bioser	Descripción
BM01008	007707010	Agua de Peptona Tamponada (APT) – Buffered Peptone Water (BPW)
BM01608	007713010	Half Fraser

- Agua de peptona tamponada: Permite la reanimación de *Salmonella* en matrices alimentarias que han sido sometidas a tratamientos subletales como la pasteurización, la adición de conservantes, la presión osmótica elevada y la alta acidez.

Entre los compuestos activos del agua de peptona encontramos cloruro de sodio que sirve para mantener el equilibrio osmótico. Esta tamponada con fosfatos de sodio y potasio [26].

- Half Fraser: Este caldo de cultivo se trata de un caldo selectivo y diferencial (caldo de enriquecimiento primario) de *Listeria* en matrices alimentarias.

Entre los compuestos activos más importantes de este caldo de cultivo encontramos las diferencias de concentración de ácido nalidíxico y la acriflavina que permiten la recuperación de la *Listeria*, la poliptona, el extracto de levadura y el extracto de carne que aportan los nutrientes necesarios para el crecimiento de la *Listeria* y el cloruro de sodio aumenta la selectividad del medio. La acriflavina también inhibe el crecimiento de la microflora secundaria gram positiva [27].

Una vez realizados los enriquecimientos dentro de las bolsas stomacher con su respectiva inoculación se ponen dentro de un equipo que se encarga de homogeneizar la muestra (un stomacher).

En este momento las muestras estarán preparadas para incubar en una estufa, dependiendo del tipo de matriz y de microorganismo patógeno la incubación tendrá unas condiciones de tiempo y temperatura diferentes.

En el caso de la *Listeria monocytogenes* todas las muestras se incubarán a 30°C durante aproximadamente 25 horas. Para la *Salmonella* la temperatura de incubación será de 37°C y el tiempo variará dependiendo de la matriz. Para la lechuga y el salmón serán entre 16-20 horas, para la clara de huevo serán entre 22-26 horas y para el queso brie serán entre 20-24 horas.

Además, para analizar *Salmonella* con la referencia KIT2025 se requiere de un segundo enriquecimiento en las matrices de lechuga, salmón y clara de huevo. Este segundo enriquecimiento se llama *Brain Heart Infusion* (BHI).

Tabla 13 Referencia del BHI para realizar el segundo enriquecimiento

Referencia Fabricante	Referencia Bioser	Descripción
032135020	032135020	Brain Heart Infusion Broth

El Brain Heart Infusion, se trata de una infusión de corazón y cerebro utilizado mayoritariamente en microbiología clínica. En este caso se infundieron 10µL de muestra, una vez pasado el primer enriquecimiento, en 500µL de BHI. Posteriormente las muestras se volvieron a incubar entre 3-4 horas.

En este punto las muestras ya estarían listas para realizar la extracción y detección del microorganismo patógeno. Es decir, la prueba de la PCR como tal.

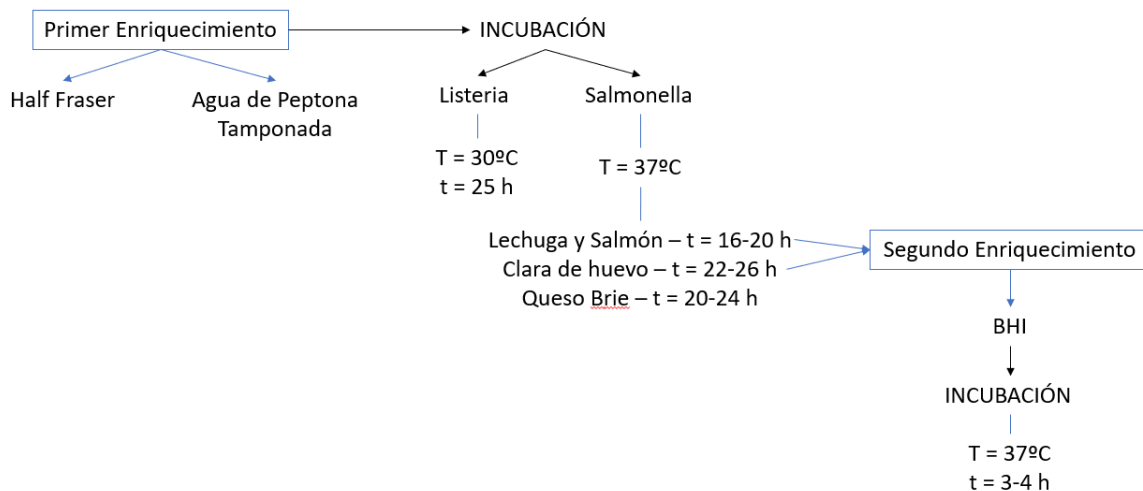


Figura 22 Esquema resumen del proceso de enriquecimiento para la preparación de muestras

3.6. EXTRACCIÓN Y DETECCIÓN

Dependiendo del kit de detección la extracción se hará por separado o vendrá incluido todo en el mismo kit. A continuación, se describirán cuáles son aquellos protocolos que requieren de un kit de extracción por separado y en cuales de ellos viene todo junto. Por lo que, para realizar determinados se necesitaran o dos kits o uno.

La etapa de extracción es la que nos permitirá aislar el DNA de la matriz inoculada en la etapa de detección.

Estos kits contienen oligonucleicos (cebadores y sondas) específicos para el microorganismo patógeno a analizar.

Tabla 14 Kits de detección que se usarán para realizar la verificación

Referencia Fabricante	Referencia Bioser	Descripción
357-8123	-	iQ-Check™ <i>Salmonella</i> II
KIT2025	234016064	BAX® System X5 PCR Assay for <i>Salmonella spp.</i>
R 602 27-1	233003096	foodproof® <i>Salmonella</i> Detection Lyokit
357-8124	-	iQ-Check™ <i>Listeria Monocytogenes</i> II
KIT2023	234015064	BAX® System X5 PCR Assay for <i>L. monocytogenes</i>
R 602 23-1	233004096	foodproof® <i>Listeria monocytogenes</i> Detection Lyokit

En la Tabla 14 se mencionan los kits de detección usados para el estudio.

Tanto los kits de Bio-rad como los de Bioteccon se realizarán en el equipo CFX (Termociclador de Bio-rad), los kits de BAX se realizarán en el equipo X5 (Termociclador de BAX).

La razón principal por la que no se usa el mismo Termociclador es que aquellos kits usados en el CFX corresponden a kits de plataforma abierta y los kits usados en el X5 son kits de plataforma cerrada. Además, la PCR realizada en un termociclador (el X5) será de punto final y en el CFX se realizará PCR en tiempo real.



Figura 23 Relación entre los kits de detección y los termocicladores usados en la verificación [18]

3.6.1. Kits de *Salmonella*

Para analizar un poco los kits de detección de *Salmonella* se ha decidido realizar una tabla comparativa entre los tres kits que se utilizarán para llevar a cabo el trabajo. En esta tabla se analizarán los siguientes kits:

Tabla 15 Kits de detección para *Salmonella*

Referencia Fabricante	Referencia Bioser	Descripción
357-8123	-	iQ-Check™ <i>Salmonella</i> II
KIT2025	234016064	BAX® System X5 PCR Assay for <i>Salmonella spp.</i>
R 602 27-1	233003096	foodproof® <i>Salmonella</i> Detection Lyokit

En esta tabla comparativa se recogen los rasgos principales de los pasos que se deben seguir para poder poner en práctica el kit, así como la duración del termociclador, el coste y características significativas de cada uno de los kits.

Sin embargo, en los kits de Bio-rad no se ha tenido en cuenta el coste por dos motivos: (1) los kits que nos interesa comparar a nivel de costes son los de Hygiena (2) lo que realmente se intenta comparar con el kit de Bio-rad es la practicidad del kit y el número de pasos a realizar.

Tabla 16 Comparación entre los tres kits de detección de *Salmonella* [28] [29] [30] [31]

iQ-Check™ Salmonella II (A)	BAX® System X5 PCR Assay for Salmonella spp. (B)	foodproof® Salmonella Detection Lyokit (C)
Extracción y detección juntas	Extracción y detección juntas	Extracción y detección por separado
COSTE: -	COSTE: 376 €	COSTE: 1.000 € (Detección) + 213 € (Extracción)
Cantidad de reactivo para 96 pruebas	Cantidad de reactivo para 64 pruebas	Cantidad de reactivo para 96 pruebas
Más de un protocolo de extracción	Un solo protocolo de extracción	Más de un protocolo de extracción
Real Time PCR	PCR punto final	Real Time PCR
EXTRACCIÓN		
Añadir reactivo de lisis (1 reactivo) a la placa Deepwell	Preparación del reactivo de lisis (proteasa + tampón de lisis)	Añadir las muestras enriquecidas a un tubo tipo eppendorf
Añadir la muestra en los pocillos asignados	Preparar los tubos de ensayo	Llevar los tubos a centrifugación
Mezclar la solución	Añadir reactivo de lisis en los tubos de ensayo	Descartar el líquido en exceso para que solo quede el pellet
Cerrar la placa con una película pre-sellada	Añadir las muestras enriquecidas a los tubos de ensayo	Añadir el reactivo de lisis y resuspender el pellet
Poner la placa en un agitador térmico con calefacción	Incorporar los tubos de ensayo en el termobloque con el programa preparado para gram negativos	Incubar en un termobloque
		Mezclar en un vórtex
		Centrifugar la muestra
DETECCIÓN		
Preparación de la Mastermix: solución de amplificación + sondas fluorescentes	Depositar los tubos de PCR en el "cooling block"	Depositar los tubos de PCR en una placa apta para ellos
Pipetear la Mastermix preparada en cada pocillo de PCR	Añadir el lisado obtenido de la extracción	Pipetear la muestra en cada pocillo + controles positivo y negativo
Añadir las muestras sacadas de la extracción + controles positivo y negativo	Sellar los tubos con tapones ópticos	Sellar los tubos con los tapones ópticos
Sellar los tubos con los tapones ópticos	Colocar las tiras de PCR en el termociclador (X5)	Colocar las tiras de PCR en el termociclador (CFX)
Colocar las tiras de PCR en el termociclador (CFX)		
Pasos totales del protocolo: 10	Pasos totales del protocolo: 9	Pasos totales del protocolo: 11
Duración del termociclador: 1,5 h	Duración del termociclador: 3 h	Duración del termociclador: 1,5 h

Vemos que tanto en el kit B como en el kit C no se requiere ningún tipo de preparación de Mastermix, esto se debe a que las tiras para PCR del kit ya están preparadas con la Mastermix en forma de pastilla liofilizada. Esto ayuda a reducir el margen de error a la hora de realizar las pruebas.

Además, observamos que el que menos pasos de manipulación tenemos es el kit B, la única desventaja de este kit es que la duración del termociclador será el doble del resto de kits, por lo

que se deberá valorar si nos es favorable tener más pasos y menos tiempo de obtención de resultados o tener menos pasos de manipulación y más tiempo de obtención de resultados.

Por lo que respecta al precio vemos que hay una diferencia abismal entre el kit B y el kit C esto puede ser debido a la inversión inicial del termociclador. Por que como se ha comentado a lo largo del trabajo el termociclador CFX es de plataforma abierta, esto hace que los kits se tengan que adaptar también a trabajar para un termociclador abierto (inversión en i+D por parte del fabricante). En cambio, con el kit del X5 solo se debe realizar una inversión inicial en el termociclador de BAX con el mismo nombre. Este cambio de precio también puede ser debido a la cantidad de pruebas que incluye el kit B y el C, es innegable que al incorporar reactivo para menos reacciones abaratará el producto final. Este último factor también influye en el hecho de que en el kit C se necesitan kits separados para la extracción y la detección. Esto encarece el computo para realizar la PCR.

Otra cosa importante que se debe valorar a la hora de elegir cual será el mejor kit es la cantidad de pruebas que realiza el laboratorio. Si es un laboratorio de larga envergadura con una cantidad de muestras considerable, el kit B con solo 64 reacciones (con posible análisis de 32 pocillos en el termociclador X5) limitará bastante la realización del estudio.

Si comparamos los dos tipos de PCR en cuanto a materiales vemos que aquellos kits destinado a PCR en tiempo real (A y C) contienen el control positivo y negativo que ayudará a poder analizar los resultados finales. De esto, carece el kit destinado a PCR en tiempo final (B).

Para poder ampliar información, consultar los siguientes anexos:

ANEXO 2: Guía rápida de interpretación del iQ-Check™ Salmonella II

ANEXO 3: Guía rápida de interpretación para ensayos en el equipo X5

ANEXO 4: Guía rápida de interpretación del foodproof® Salmonella detection Lyokit

3.6.2. Kits de *Listeria monocytogenes*

Al igual que en el apartado anterior se ha decidido optar por una tabla comparativa para los kits de detección de *Listeria monocytogenes*.

Tabla 17 Kits de detección para *Listeria monocytogenes*

Referencia Fabricante	Referencia Bioser	Descripción
357-8124	-	iQ-Check™ <i>Listeria Monocytogenes</i> II
KIT2023	234015064	BAX® System X5 PCR Assay for <i>L. monocytogenes</i>
R 602 23-1	233004096	foodproof® <i>Listeria monocytogenes</i> Detection Lyokit

En esta tabla se analizarán los mismos parámetros que en la tabla 15.

En este caso y debido a los mismos motivos que para la Salmonella tampoco se ha decidido contar con el precio de coste del kit de Bio-rad.

Verificación de los métodos para la detección de *Salmonella spp.* y *Listeria monocytogenes* mediante PCR en matrices alimentarias

Tabla 18 Comparación entre los tres kits de detección de *Listeria monocytogenes* [29] [32] [33] [34]

iQ-Check™ Listeria monocytogenes II (D)	BAX® System X5 PCR Assay for L. monocytogenes (E)	foodproof® Listeria monocytogenes Detection Lyokit (F)
Extracción y detección juntas	Extracción y detección juntas	Extracción y detección por separado
COSTE: -	COSTE: 376 €	COSTE: 1.000 € (Detección) + 253 € (Extracción)
Cantidad de reactivo para 96 pruebas	Cantidad de reactivo para 64 pruebas	Cantidad de reactivo para 96 pruebas
Más de un protocolo de extracción	Un solo protocolo de extracción	Más de un protocolo de extracción
Real Time PCR	PCR punto final	Real Time PCR
EXTRACCIÓN		
Añadir reactivo de lisis (2 reactivos) a la placa Deepwell	Preparación del reactivo de lisis (proteasa + tampón de lisis + agente de lisis)	Añadir las muestras enriquecidas a un tubo tipo eppendorf
Añadir la muestra en los pocillos asignados	Preparar los tubos de ensayo	Llevar los tubos a centrifugación
Mezclar la solución	Añadir reactivo de lisis en los tubos de ensayo	Descartar el líquido en exceso para que solo quede el pellet
Cerrar la placa con una película pre-sellada	Añadir las muestras enriquecidas a los tubos de ensayo	Añadir el reactivo de lisis y resuspender el pellet
Poner la placa en un agitador térmico con calefacción	Incorporar los tubos de ensayo en el termobloque con el programa preparado para RT Listeria	Poner en un disruptor mecánico
		Incubar en un termobloque
		Mezclar en un vórtex
		Centrifugar la muestra
DETECCIÓN		
Preparación de la Mastermix: solución de amplificación + sondas fluorescentes	Depositar los tubos de PCR en el "cooling block"	Depositar los tubos de PCR en una placa apta para ellos
Pipetear la Mastermix preparada en cada pocillo de PCR	Añadir el lisado obtenido de la extracción	Pipetear la muestra en cada pocillo + controles positivo y negativo
Añadir las muestras sacadas de la extracción + controles positivo y negativo	Sellar los tubos con tapones ópticos	Sellar los tubos con los tapones ópticos
Sellar los tubos con los tapones ópticos	Colocar las tiras de PCR en el termociclador (X5)	Colocar las tiras de PCR en el termociclador (CFX)
Colocar las tiras de PCR en el termociclador (CFX)		
Pasos totales del protocolo: 10	Pasos totales del protocolo: 9	Pasos totales del protocolo: 12
Duración del termociclador: 1,5 h	Duración del termociclador: 3 h	Duración del termociclador: 1,5 h

En el caso de la *Listeria monocytogenes* se puede seguir prácticamente la misma discusión que en el apartado 3.6.1 en el que se comentan la diferencia de los kits de Salmonella. Para poder aplicarla a la *Listeria monocytogenes* la letra A, B y C corresponderían correlativamente a las letras D, E y F.

La diferencia más significativa es que en los tres kits se necesita o bien de un reactivo extra o bien de un equipo extra para poder realizar la extracción. Esto es debido a que al estar analizando *Listeria monocytogenes*, se está analizando una bacteria gram positiva cosa que implica que el microorganismo tenga una pared celular más gruesa que la *Salmonella* y requiera de un proceso de extracción más agresivo o elaborado para poder aislar el DNA.

Observamos el incremento de un paso en el kit F por el motivo comentado en el párrafo anterior que implica un aumento de la probabilidad de fallo por parte del técnico y el hecho de que se necesita una inversión extra en un equipo para poder utilizar este kit.

Para poder ampliar información consultar los siguientes anexos:

ANEXO 3: Guía rápida de interpretación para ensayos en el equipo X5

ANEXO 5: Guía rápida de interpretación del iQ-Check™ *Listeria monocytogenes* II

ANEXO 6: Guía rápida de interpretación del foodproof® *Listeria monocytogenes* Detection Lyokit

3.7. DISEÑO EXPERIMENTAL

En este punto del trabajo, ya se han descrito todos los materiales a realizar. A continuación, se describe de forma esquemática el diseño experimental previo a la interpretación de resultados obtenida.

Para el análisis de *Salmonella*:

- Se analizan 4 alimentos dentro del alcance de la verificación de la implementación y la verificación del alimento.
- Según lo que se comentó en el apartado 3.2. la lentícula usada para realizar la inoculación tiene una concentración muy baja de microorganismo patógeno que no permite realizar el banco de diluciones exigido por la verificación. Por este motivo, se decide llevar a cabo la verificación con 4 réplicas de cada alimento con la misma concentración de inóculo.
- Se realiza la verificación con 17 muestras (4 para cada alimento + 1 blanco).
- Estas muestras han sido enriquecidas con Agua de Peptona tamponada como primer enriquecimiento y algunas de ellas para realizar el análisis de BAX han sido sometidas a un segundo enriquecimiento.
- Todas las muestras pasaran por tres protocolos diferentes para analizar *Salmonella* y dos termocicladores.

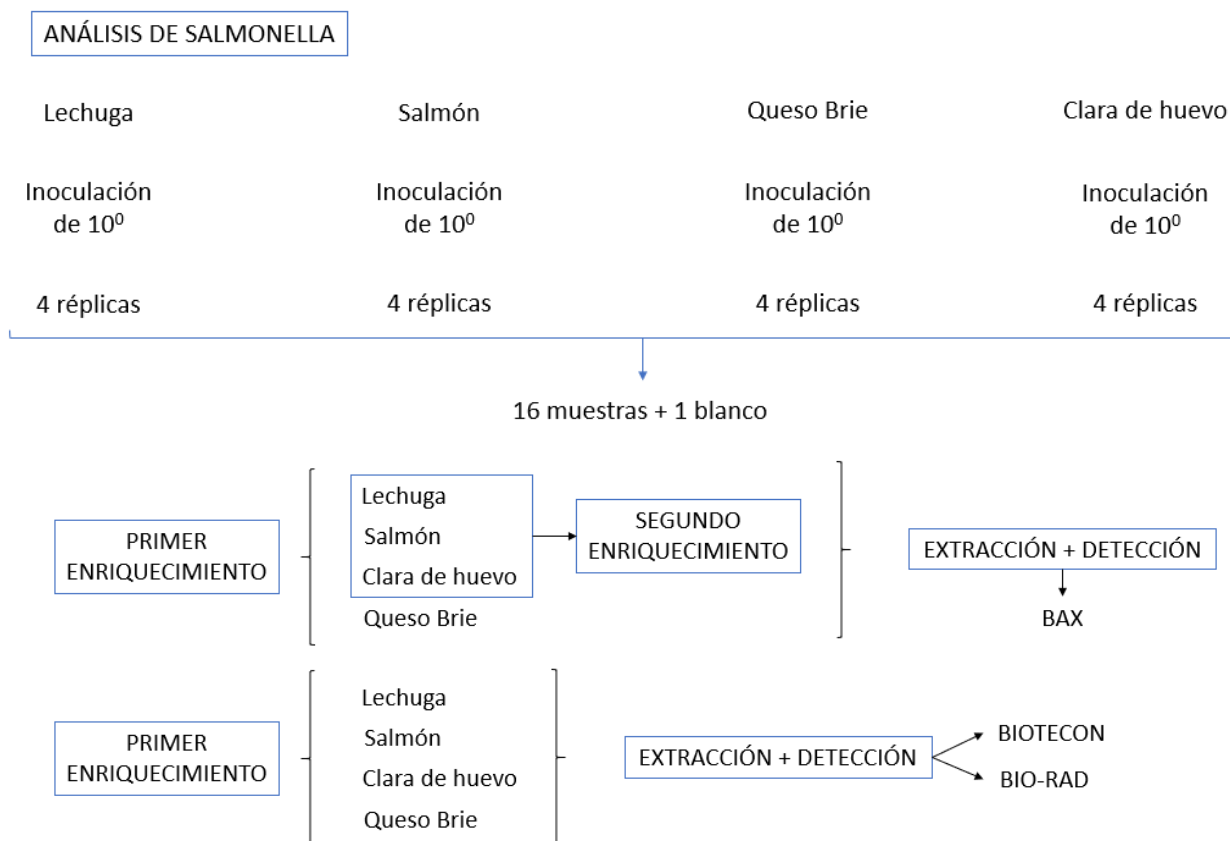


Figura 24 Esquema resumen del estudio de verificación para *Salmonella*

Para el análisis de *Listeria monocytogenes*:

- Se analizan 4 alimentos dentro del alcance de la verificación de la implementación y la verificación del alimento. Los mismo 4 alimentos que para el análisis de *Salmonella*.
- Se realiza un banco de diluciones como el que exige la verificación y se inoculan las muestras siguiendo los criterios establecidos por la verificación en el apartado 3.2.
- Se realiza una verificación con 40 muestras (9 para cada alimento + 4 blancos para cada alimento).
- Estas muestras han sido enriquecidas con Half Fraser.

- Todas las muestras pasaran por tres protocolos diferentes para analizar *Salmonella*.

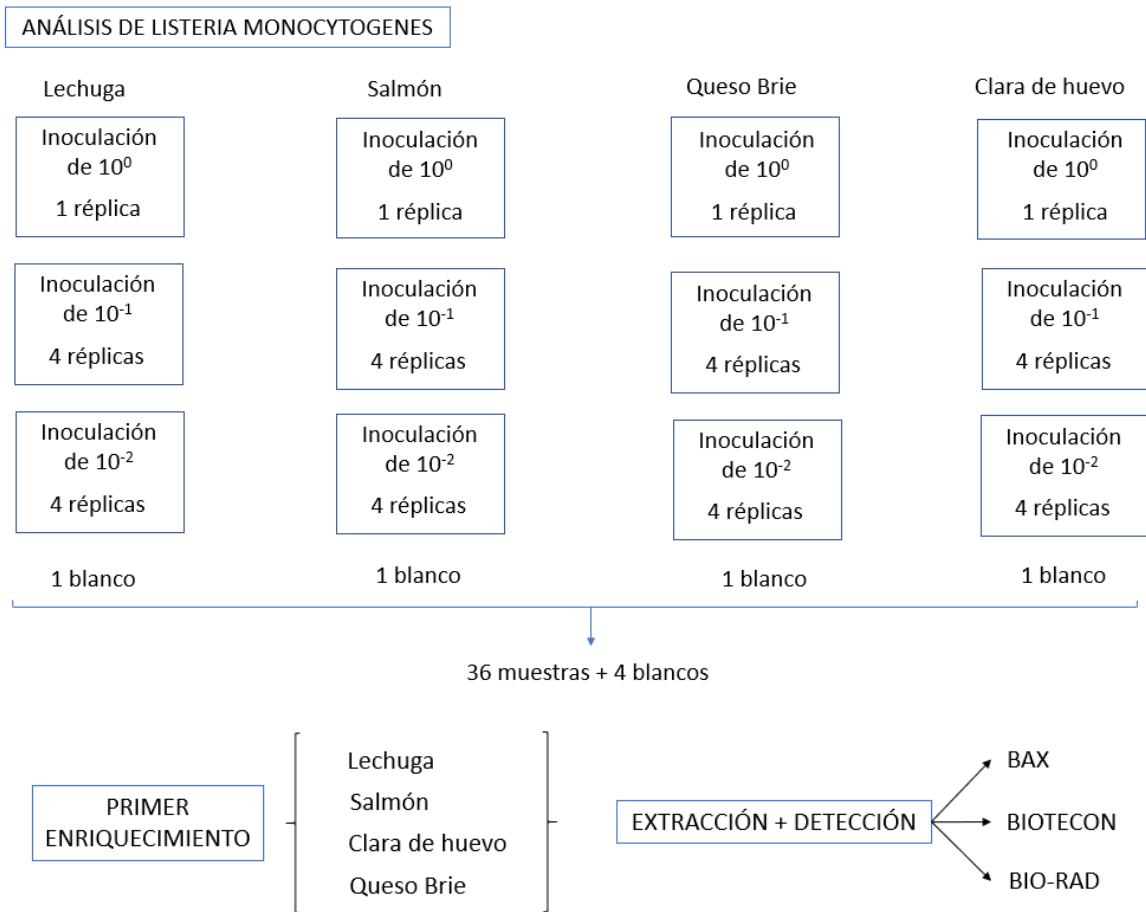


Figura 25 Esquema resumen para el estudio de verificación de *Listeria monocytogenes*

Una vez situados en el momento en que todos los ensayos ya se han realizados se hará una interpretación y análisis de cada uno de los resultados obtenidos siguiendo la verificación.

4. RESULTADOS

Para realizar una correcta interpretación de los resultados obtenidos primero se analizarán los controles positivos y negativos. Para poder dar un ensayo como válido se deberá ver amplificación en el canal FAM para el control positivo, independientemente del resultado del control interno o canal HEX, y se deberá observar amplificación en el canal HEX o control interno para el control negativo. En este último es importante que no haya amplificación en el canal FAM ya que entonces ese ensayo se determinaría como resultado no válido.

Esta amplificación corresponde al ciclo del ensayo de PCR en el que se detecta presencia de fluorescencia (Cq).

Una vez realizada esta interpretación se procederá a analizar los resultados obtenidos de los pocillos de las muestras. Para facilitar esta interpretación todas las figuras que se verán a continuación serán extraídas mediante una captura de pantalla de los resultados obtenidos tanto por el software del termociclador CFX como del software del termociclador X5.

Al final de cada apartado se encuentra el anexo vinculado a estos resultados en los cuales se podrá observar de manera más detallada todos los resultados obtenidos del ensayo.

Para poder realizar una aproximación de la verificación para realizar el análisis de los resultados obtenidos se debe seguir la determinación del límite de detección 50 siguiendo el protocolo 1. El cual ya se justificó la elección en el apartado 3.1.

Para poder seguir esta determinación se deben contabilizar los resultados positivos en cada inóculo siguiendo la Tabla 19 de la verificación. También se nos indican ciertas condiciones que se deben cumplir:

- El blanco de las muestras siempre debería dar negativo, en caso contrario en la misma verificación se indica que todo el ensayo se tendría que repetir.
- Se supone que el inóculo con concentración más alta de patógeno debería ser siempre positivo, en caso de obtener resultados negativos se indica repetir el ensayo desde cero.
- En la Tabla 29 se indican algunos resultados como *Unreliable MPN result* esto indicaría que el resultado de esa combinación de inóculos positivos es muy improbable y no se consideraría como válido. En estos casos también se debería repetir el ensayo.

Verificación de los métodos para la detección de *Salmonella spp.* y *Listeria monocytogenes* mediante PCR en matrices alimentarias

Tabla 19 Determinación del eLOD₅₀ basado en el número de resultados positivos según el nivel de contaminación usando el protocolo 1 [20]

High inoculation level targeted 9 × LOD ₅₀ / test portion	Intermediate inoculation level targeted 3 × LOD ₅₀ / test portion	Low inoculation level targeted 1 × LOD ₅₀ / test portion	Blank level	eLOD ₅₀ cfu/test portion
1/1	4/4	4/4	0/1	< 1,0 × LIL ^a
1/1	4/4	3/4	0/1	= 0,5 × LIL
1/1	4/4	2/4	0/1	= 0,7 × LIL
1/1	4/4	1/4	0/1	= 1,0 × LIL
1/1	4/4	0/4	0/1	= 1,5 × LIL
1/1	3/4	4/4	0/1	= 0,7 × LIL
1/1	3/4	3/4	0/1	= 1,0 × LIL
1/1	3/4	2/4	0/1	= 1,3 × LIL
1/1	3/4	1/4	0/1	= 1,7 × LIL
1/1	3/4	0/4	0/1	= 2,3 × LIL
1/1	2/4	4/4	0/1	= 1,1 × LIL
1/1	2/4	3/4	0/1	= 1,5 × LIL
1/1	2/4	2/4	0/1	= 1,9 × LIL
1/1	2/4	1/4	0/1	= 2,6 × LIL
1/1	2/4	0/4	0/1	= 3,7 × LIL
1/1	1/4	4/4	0/1	Unreliable MPN result ^b
1/1	1/4	3/4	0/1	= 2,1 × LIL
1/1	1/4	2/4	0/1	= 2,8 × LIL
1/1	1/4	1/4	0/1	= 4,0 × LIL
1/1	1/4	0/4	0/1	= 6,3 × LIL
1/1	0/4	4/4	0/1	Unreliable MPN result ^b
1/1	0/4	3/4	0/1	= 3,0 × LIL
1/1	0/4	2/4	0/1	= 4,3 × LIL
1/1	0/4	1/4	0/1	= 6,7 × LIL
1/1	0/4	0/4	0/1	= 14,0 × LIL

^a LIL = low inoculation level.
^b Unreliable MPN result: MPN combination is very unlikely to occur. The experiment shall be repeated.

En este punto en caso de querer realizar una verificación completa se debería valorar si este límite de detección se encuentra dentro del margen de aceptabilidad. Para saber si se encuentra dentro de este margen el resultado del límite de detección no debe ser inferior a 4 × LOD₅₀.

En este estudio no se comprobará si el resultado del límite de detección se encuentra dentro de este margen ya que para poder analizar los resultados con esta condición se debería haber realizado una verificación exacta y recordemos que se está realizando una aproximación de la verificación.

Sin embargo, si se calcularán los límites de detección como si se siguiera una verificación estricta.

4.1. SALMONELLA

En el caso de la *Salmonella* solo usaremos el nivel de inoculación más bajo:

- Nivel de inoculación bajo: 21 UFC/mL

4.1.1. Interpretación y análisis primarios del kit 357-8123

Lo primero que se debe interpretar son los controles positivos y negativos. El Cq que indica la Figura 26 es la fluorescencia medida en el canal FAM y el I.C. Cq hace referencia al control interno que lleva incorporado y son los resultados de la fluorescencia medida en el canal HEX.

Well ▲	Content ◇	Sample ◇	Cq ◇	I.C. Cq ◇
B05	Pos Ctrl		31.05	32.44
C05	Neg Ctrl		37.36	33.11

Figura 26 Resultados del control positivo y negativo del kit 357-8123

Se observa que en el canal FAM para el control positivo se ha detectado fluorescencia en un ciclo de la PCR aceptable, independientemente de que el control interno también se haya recuperado se podría decir que se trata de una muestra válida. Sin embargo, en el control negativo no se debería ver fluorescencia emitida en canal FAM, únicamente se debería ver la recuperación del control interno, cosa que hace que esto sea un resultado no válido. Esto puede indicar que ha habido algún error, ya sea de pipeteo o de inhibición. Dado que en uno de los ensayos que veremos a continuación pasa exactamente lo mismo, se ha interpretado que la pipeta estaba contaminada.

Sabiendo esta condición, se usarán los resultados como válidos dado que el control interno del control negativo se ha recuperado correctamente.

En la Figura 27 vemos que hay fluorescencia tanto en el canal FAM como el HEX. Independientemente de haber recuperado el control interno, al tener fluorescencia en el canal FAM se darán las pruebas como positivas.

Well ▲	Content ◇	Sample ◇	Cq ◇	I.C. Cq ◇
A03	Unkn	S1	38.04	33.34
B03	Unkn	S2	38.84	32.93
C03	Unkn	S3	37.98	33.10
D03	Unkn	S4	38.07	32.86

Figura 27 Resultados de *Salmonella* en clara de huevo para 357-8123

Además, al estar inoculadas con la misma concentración de patógeno vemos que la recuperación en el canal FAM es prácticamente en el mismo ciclo.

En el caso de la Figura 28 nos encontramos en el mismo caso que en el anterior, por lo tanto, las muestras también se darán como positivas.

Sin embargo, vemos que la recuperación en el canal FAM no es exactamente la misma, hay alguna varianza cosa que extraña porque están inoculadas con la misma concentración de patógeno. Esto puede ser debido a que la recuperación del microorganismo patógeno no ha sido exactamente igual en todas las muestras en la etapa de enriquecimiento o incluso la posición en la que se encontraban en la estufa.

Well ▲	Content ◇	Sample ◇	Cq ◇	I.C. Cq ◇
E03	Unkn	S5	19.49	32.37
F03	Unkn	S6	36.62	33.01
G03	Unkn	S7	28.12	32.05
H03	Unkn	S8	19.65	32.59

Figura 28 Resultados de la *Salmonella* en Lechuga para 357-8123

En las Figuras 29 y 30 pasa exactamente lo mismo que con la Figura 39, por lo que todas las muestras también las consideraremos positivas. Se observa también una pequeña variación en una de las muestras del canal FAM.

Well ▲	Content ◇	Sample ◇	Cq ◇	I.C. Cq ◇
A04	Unkn	S9	38.21	34.17
B04	Unkn	S10	37.19	34.55
C04	Unkn	S11	26.45	36.14
D04	Unkn	S12	38.92	34.83

Figura 29 Resultados de la *Salmonella* en Queso para 357-8123

Well ▲	Content ◇	Sample ◇	Cq ◇	I.C. Cq ◇
E04	Unkn	S13	36.56	31.76
F04	Unkn	S14	33.23	31.90
G04	Unkn	S15	19.32	34.18
H04	Unkn	S16	37.45	32.49

Figura 30 Resultados de la *Salmonella* en Salmón para 357-8123

En el caso del blanco (Figura 31) del ensayo hay recuperación en el canal FAM, cosa que nos supone una incongruencia ya que al ser el blanco y no estar inoculado con ningún microorganismo patógeno no debería dar ninguna señal de fluorescencia en el canal indicado. Y, siguiendo una de las condiciones de verificación el ensayo se tendría que repetir. Esto podría ser debido a contaminación cruzada durante el ensayo.

Aun sabiendo esto para poder realizar el estudio de verificación supondremos que el blanco ha dado negativo, es decir, que no ha habido recuperación en el canal FAM.

Well ▲	Content ◇	Sample ◇	Cq ◇	I.C. Cq ◇
A05	Unkn	Blanc	40.18	34.08

Figura 31 Resultado del Blanco en *Salmonella* para 357-8123

Siguiendo la Tabla 20 y teniendo en cuenta la interpretación de resultados obtendremos el límite de detección 50 siguiente para todos los alimentos:

Tabla 20 Resultados de la determinación del eLOD₅₀ para el kit 357-8123 de todas las muestras

Nivel de inoculación bajo	Blanco	eLOD ₅₀ (UFC/mL)
4/4	0/1	< 1,0 x LIL = 1,0 x 21 UFC / mL = < 21

Anexo 7: Resultados detallados del kit 357-8123

4.1.2. Interpretación y análisis primarios del KIT2025

Para poder realizar la interpretación de este kit no se hará la interpretación observando la fluorescencia en los canales FAM y HEX dado que este kit se ha empleado para realizar una PCR End Point. En este caso la interpretación se realizará únicamente con los resultados obtenidos de los pocillos tal y como se puede observar en la Figura 32.

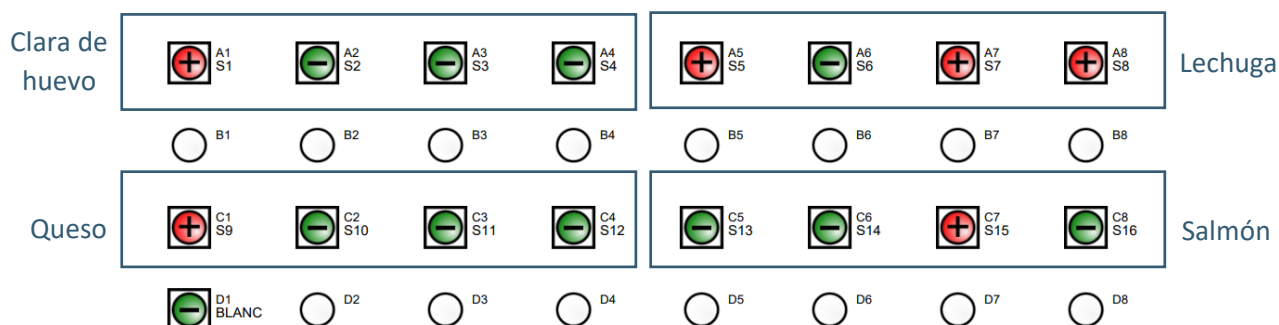


Figura 32 Representación de los resultados de *Salmonella* para KIT2025

Según la Figura 32 se pueden observar varias muestras con resultados negativos, es decir, que no hay presencia de microorganismo patógeno en esa muestra. Al realizar una inoculación de la misma concentración en cada una de las muestras, los resultados obtenidos de esta PCR no son muy lógicos. Quizás en este caso influye el factor del segundo enriquecimiento realizado con BHI que no tienen el resto de los kits con el que se han realizado los otros ensayos de *Salmonella*. En este caso si se realizara una repetición del ensayo se recomendaría realizar con otro medio de cultivo que solo implicara un único enriquecimiento.

También se observa como el blanco ha dado negativo cosa que hace que cumpla con las condiciones de la verificación.

Teniendo en cuenta estos resultados podremos realizar el límite de detección 50 para cada uno de los alimentos representados en las muestras siguiendo la Tabla 29:

Tabla 21 Resultados de la determinación del eLOD₅₀ para KIT2025 en clara de huevo, queso y salmón

Nivel de inoculación bajo	Blanco	eLOD ₅₀ (UFC/mL)
1/4	0/1	= 1,0 x LIL = 1,0 x 21 UFC / mL = 21

Tabla 22 Resultados de la determinación eLOD₅₀ para KIT2025 en Lechuga

Nivel de inoculación bajo	Blanco	eLOD ₅₀ (UFC/mL)
3/4	0/1	= 0,5 x LIL = 0,5 x 21 UFC / mL = 10,5

Anexo 8: Resultados detallados del KIT2025

4.1.3. Interpretación y análisis primarios del kit S 400 07

Empezaremos con los controles positivos y negativos. En la figura 33 podemos ver como el control positivo emite fluorescencia tanto en el canal FAM como en el canal HEX. A pesar de haber recuperación del control interno, al ser positiva en el canal FAM se daría este resultado como válido. Si observamos el control negativo vemos que nos da no concluyente tanto para el canal FAM como para el canal HEX, esto supondría un resultado no válido por que a pesar de que nos interesaría que no hubiera emisión de fluorescencia en el canal FAM, el control interno se debería recuperar para poder dar el resultado del control negativo como válido.

Well	Fluor	Target	Content	Sample	Cq
B05	FAM		Pos Ctrl		46.64
B05	HEX		Pos Ctrl		49.20
C05	FAM		Neg Ctrl		N/A
C05	HEX		Neg Ctrl		N/A

Figura 33 Resultados del control positivo y negativo del kit S 400 07

Sabiendo la información comentada en el párrafo anterior, se debería repetir el estudio de *Salmonella* para el kit S 400 07. Como esto no fue posible, se decidió utilizar los resultados obtenidos en este estudio del kit para realizar la interpretación de resultados.

Si observamos la Figura 34, todas aquellas muestras en las que hay señal de fluorescencia en el canal FAM, se interpretaran como resultados positivos. En este caso las muestras A3, C3 y D3. En el caso de aquellas muestras en las que solo haya señal de fluorescencia en el canal HEX y no en el canal FAM, se interpretaran como resultados negativos ya que a pesar de recuperar el control interno no se ha detectado ningún microorganismo patógeno, como es el caso de la muestra B3.

Well	Fluor	Target	Content	Sample	Cq
A03	FAM		Unkn	S1	42.24
A03	HEX		Unkn	S1	17.32
B03	FAM		Unkn	S2	N/A
B03	HEX		Unkn	S2	37.00
C03	FAM		Unkn	S3	42.02
C03	HEX		Unkn	S3	42.86
D03	FAM		Unkn	S4	42.30
D03	HEX		Unkn	S4	40.07

Figura 34 Resultados de *Salmonella* en clara de huevo para S 400 07

En las Figuras 35, 36 y 37 seguiremos las mismas indicaciones que en la Figura 45 para realizar la interpretación de resultados. Por lo tanto, como todas las muestras emiten fluorescencia en el canal FAM, todas las muestras serán positivas.

Well	Fluor	Target	Content	Sample	Cq
E03	FAM		Unkn	S5	17.23
E03	HEX		Unkn	S5	N/A
F03	FAM		Unkn	S6	32.77
F03	HEX		Unkn	S6	32.47
G03	FAM		Unkn	S7	22.65
G03	HEX		Unkn	S7	43.94
H03	FAM		Unkn	S8	14.82
H03	HEX		Unkn	S8	18.95

Figura 35 Resultados de *Salmonella* en lechuga para S 400 07

Well	Fluor	Target	Content	Sample	Cq
A04	FAM		Unkn	S9	33.41
A04	HEX		Unkn	S9	30.65
B04	FAM		Unkn	S10	32.07
B04	HEX		Unkn	S10	28.77
C04	FAM		Unkn	S11	20.41
C04	HEX		Unkn	S11	N/A
D04	FAM		Unkn	S12	32.26
D04	HEX		Unkn	S12	30.43

Figura 36 Resultados de *Salmonella* en queso para S 400 07

Well	Fluor	Target	Content	Sample	Cq
E04	FAM		Unkn	S13	35.27
E04	HEX		Unkn	S13	33.02
F04	FAM		Unkn	S14	31.74
F04	HEX		Unkn	S14	30.69
G04	FAM		Unkn	S15	15.57
G04	HEX		Unkn	S15	N/A
H04	FAM		Unkn	S16	33.68
H04	HEX		Unkn	S16	32.37

Figura 37 Resultados de *Salmonella* en salmón para S 400 07

Por lo que respecta al blanco del ensayo (Figura 38) vemos que hay emisión de fluorescencia en el canal FAM, cosa que nos indica que se trataría de una muestra positiva. Esto nos estaría indicando que no cumplimos con una de las condiciones de la verificación y que el resultado no tiene sentido ya que al tratarse de un blanco la muestra no debería amplificarse en el canal FAM.

Well	Fluor	Target	Content	Sample	Cq
A05	FAM		Unkn	BLANC	35.67
A05	HEX		Unkn	BLANC	32.41

Figura 38 Resultado del blanco en *Salmonella* para S 400 07

Siguiendo la verificación y los resultados obtenidos podemos decir que habrá un límite de detección para la clara de huevo y el mismo límite de detección para la lechuga, el queso y el salmón.

Tabla 23 Resultados de la determinación eLOD₅₀ para el kit S 400 07 en clara de huevo

Nivel de inoculación bajo	Blanco	eLOD ₅₀ (UFC/mL)
3/4	0/1	= 0,5 x LIL = 0,5 x 21 UFC / mL = 10,5

Tabla 24 Resultados de la determinación eLOD₅₀ para el kit S 400 07 en lechuga, queso y salmón

Nivel de inoculación bajo	Blanco	eLOD ₅₀ (UFC/mL)
4/4	0/1	< 1,0 x LIL = 1,0 x 21 UFC / mL = < 21

Anexo 9: Resultados detallados del kit S 400 07

4.2. LISTERIA MONOCYTOGENES

A diferencia de la *Salmonella* en el caso de la *Listeria monocytogenes* podremos usar los tres niveles de inoculación de la verificación:

- Nivel de inoculación alto: $7,8 \times 10^4$ UFC/mL
- Nivel de inoculación intermedio: $7,8 \times 10^3$ UFC/mL
- Nivel de inoculación bajo: $7,8 \times 10^2$ UFC/mL

Se decidió realizar las inoculaciones con estas concentraciones de unidades formadoras de colonias ya que previamente en una confirmación en placa se analizó el recuento y no se obtuvo la cantidad de colonias suficientes con niveles de inoculación más bajos de $7,8 \times 10^2$ UFC/mL.

4.2.1. Interpretación y análisis primarios del kit 357-8124

Al igual que en los otros ensayos se empezará con la interpretación del control positivo y del control negativo. Como podemos ver en la Figura 39 obtenemos un Cq tardío para el control positivo de este ensayo, es decir, la fluorescencia se empieza a detectar en el ciclo 49 de 50. Además, en el control negativo no hay recuperación del control interno. Teniendo en cuenta estos resultados podríamos dar como no válidos los resultados de este ensayo. En esta ocasión se debería repetir el ensayo.

Well	Content	Sample	Cq	I.C. Cq
A09	Neg Ctrl		N/A	N/A
B09	Pos Ctrl		49.52	N/A

Figura 39 Resultados del control positivo y negativo del kit 357-8124

Se decidió repetir el ensayo, pero reduciendo el número de réplicas de esta manera se reducirá la posibilidad de contaminación cruzada entre las muestras. Al disminuir el número de réplicas para realizar el ensayo de verificación se extrapolarán los resultados para suponer que se han hecho las réplicas necesarias como en la primera ocasión.

Verificación de los métodos para la detección de *Salmonella spp.* y *Listeria monocytogenes* mediante PCR en matrices alimentarias

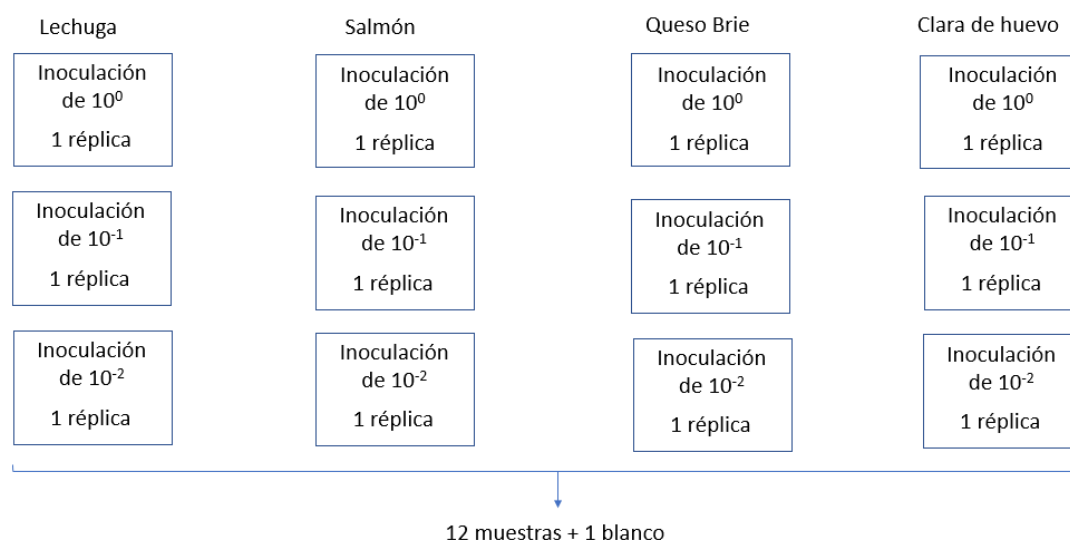


Figura 40 Repetición del estudio de verificación de *Listeria monocytogenes*

En la repetición del ensayo los resultados del control positivo y negativo fueron los representados en la Figura 41. En estos vemos que ha habido emisión de fluorescencia en el canal FAM tanto en el control positivo como en el control negativo. En el caso del control positivo es indiferente que el control interno también haya emitido fluorescencia ya que, aunque no la hubiera emitido se consideraría válido igualmente. En el caso del control negativo no lo podemos considerar resultado válido por que a pesar de que el control interno se ha recuperado también ha dado positivo en el canal FAM, cosa que no debería pasar para poder dar el control negativo como válido.

Well	Content	Sample	Cq	I.C. Cq
F02	Pos Ctrl		31.23	31.68
G02	Neg Ctrl		38.65	32.07

Figura 41 Resultados del control positivo y negativo de la repetición del ensayo del kit 357-8124

Como se ha comentado anteriormente (apartado 4.1.1), este error puede ser debido a que la pipeta que se utilizó para realizar el ensayo se encontraba contaminada. Se llegó a esta conclusión dado que ambos ensayos fueron elaborados el mismo día y en el mismo run de PCR.

Al igual que en el ensayo del apartado 4.1.1., sabiendo este error, se usarán los resultados obtenidos como válidos dado que el control interno del control negativo se ha recuperado correctamente.

En las ilustraciones 42, 43, 44 y 45 vemos como todas las muestras han emitido fluorescencia en el canal FAM. Por lo que los resultados obtenidos se pueden considerar como positivos. Además, como en este caso se ha realizado una inoculación gracias a un banco de diluciones podemos afirmar que los resultados tienen sentido ya que a medida que hay menor cantidad de inoculación más tardío será el ciclo de detección en el canal FAM. Sin embargo, se puede ver una pequeña variación de la inoculación en la Figura 40 ya que no concuerda con el banco de diluciones realizado. Esta variación puede ser debida a la recuperación del microorganismo patógeno e incluso a la posición en la que la bolsa de enriquecimiento se encontraba situada en la estufa.

Verificación de los métodos para la detección de *Salmonella spp.* y *Listeria monocytogenes* mediante PCR en matrices alimentarias

Well ▲	Content ◇	Sample ◇	Cq ◇	I.C. Cq ◇
A01	Unkn	L1	20.99	32.06
B01	Unkn	L2	23.45	31.55
C01	Unkn	L3	24.66	32.49

Figura 42 Resultados de *Listeria monocytogenes* en clara de huevo para 357-8124

Well ▲	Content ◇	Sample ◇	Cq ◇	I.C. Cq ◇
D01	Unkn	L4	26.22	33.13
E01	Unkn	L5	30.78	32.95
F01	Unkn	L6	35.12	32.36

Figura 43 Resultados de *Listeria monocytogenes* en queso para 357-8124

Well ▲	Content ◇	Sample ◇	Cq ◇	I.C. Cq ◇
A02	Unkn	L9	25.82	31.64
G01	Unkn	L7	21.60	31.30
H01	Unkn	L8	23.38	32.27

Figura 44 Resultados de *Listeria monocytogenes* en lechuga para 357-8124

Well ▲	Content ◇	Sample ◇	Cq ◇	I.C. Cq ◇
B02	Unkn	L10	31.20	32.05
C02	Unkn	L11	33.40	31.96
D02	Unkn	L12	36.45	32.68

Figura 45 Resultados de *Listeria monocytogenes* en salmón para 357-8124

Si analizamos el blanco del ensayo (Figura 46) le pasa lo mismo que en el apartado 4.1.1. En el blanco obtenemos una incongruencia ya que emite señal de fluorescencia en el canal FAM cuando la muestra no está inoculada. En este caso no se cumpliría una de las condiciones de la verificación. Pero tal y como se ha hecho en el apartado 4.1.1. supondremos que el control en FAM no se ha recuperado para que se cumplan las condiciones de la verificación y poder determinar el límite de detección 50.

Well ▲	Content ◇	Sample ◇	Cq ◇	I.C. Cq ◇
E02	Unkn	Blanc	36.20	32.64

Figura 46 Resultado del blanco en *Listeria monocytogenes* para 357-8124

Siguiendo la extrapolación mencionada con anterioridad los límites de detección 50 para todas las muestras serán los siguientes:

Tabla 25 Resultados de la determinación eLOD₅₀ para el kit 357-8124 de todas las muestras

Nivel de inoculación alto	Nivel de inoculación intermedio	Nivel de inoculación bajo	Blanco	eLOD ₅₀ (UFC/mL)
1/1	4/4	4/4	0/1	< 1,0 x LIL = 1,0 x (7,8 x 10 ²) UFC / mL = < 7,8 x 10 ²

Anexo 10: Resultados detallados del kit 357-8124

4.2.2. Interpretación y análisis primarios del kit KIT2023

En este apartado nos encontramos en la misma situación que en el apartado 4.1.2. en la que la interpretación de resultados únicamente se realizará con los resultados obtenidos de los pocillos tal y como se puede ver en la Figura 58.



Figura 47 Representación de los resultados de *Listeria monocytogenes* para KIT2023

Tal y como se aprecia en la Figura 47, vemos que gran parte de los análisis han dado positivo, cosa que tiene sentido dado que las muestras estaban todas inoculadas. Las únicas excepciones han sido los pocillos A7 (Huevo) y B7 (Salmón). En los pocillos C2 (Huevo), D2 (Salmón) y D2 (Lechuga) que los resultados sean negativos es concordante dado que se trata de los controles blancos del estudio.

Lo que no es concordante es que el pocillo B2 (Queso Brie) sea positivo ya que este también se trataba de uno de los blancos del estudio, es posible que haya habido contaminación cruzada de los pocillos adjuntos. Al ser negativo este parámetro no cumpliría con una de las condiciones de la verificación y se repetiría el ensayo.

Además, vemos cómo se cumple una de las condiciones de la verificación dado que los pocillos que incluyen la concentración de inoculación más elevada de todas han dado positivo. Estos son los pocillos A1 (Huevo), B1 (Salmón), A1 (Queso Brie) y C1 (Lechuga).

Suponiendo que el pocillo B2 (Queso Brie) ha dado negativo, los resultados de la verificación para el límite de detección 50 son los siguientes:

Tabla 26 Resultados de la determinación $eLOD_{50}$ para KIT2023 en clara de huevo y salmón

Nivel de inoculación alto	Nivel de inoculación intermedio	Nivel de inoculación bajo	Blanco	$eLOD_{50}$ (UFC/mL)
1/1	4/4	3/4	0/1	$= 0,5 \times LIL = 0,5 \times (7,8 \times 10^2)$ UFC / mL = $3,9 \times 10^2$

Tabla 27 Resultados de la determinación eLOD₅₀ para KIT2023 en queso y lechuga

Nivel de inoculación alto	Nivel de inoculación intermedio	Nivel de inoculación bajo	Blanco	eLOD ₅₀ (UFC/mL)
1/1	4/4	4/4	0/1	< 1,0 x LIL = 1,0 x (7,8 x 10 ²) UFC / mL = < 7,8 x 10 ²

Anexo 11: Resultados detallados del KIT2023

4.2.3. Interpretación y análisis primarios del kit S 400 08.1

Como en el resto de los kits que se han realizado usando real time PCR se empezarán analizando los controles positivos y negativos.

En la Figura 48 se observa como ambos controles son válidos ya que para el control positivo hay una amplificación en el canal FAM y para el control negativo hay una amplificación en el canal HEX y no hay amplificación en el canal FAM.

Well	Fluor	Target	Content	Sample	Cq
A09	FAM		Pos Ctrl		44.01
A09	HEX		Pos Ctrl		43.37
B09	FAM		Neg Ctrl		N/A
B09	HEX		Neg Ctrl		46.07

Figura 48 Resultados del control positivo y negativo del kit S 400 08.1

A pesar de que los controles se hayan recuperado correctamente, se observa en la Figura 49 que, a la hora de analizar las muestras, en varias de ellas (pocillos A1 y A2) se empieza a observar detección en ciclos muy tempranos de la de PCR. Esto supone una anomalía en el ensayo ocasionada seguramente por errores en el pipeteo.

A la vista de este resultado se decidió repetir el ensayo como en el apartado 4.2.1., es decir, reduciendo el número de réplicas de las muestras y extrapolando las inoculaciones.

Para poder comprender la repetición del estudio revisar la Figura 40.

Well	Fluor	Target	Content	Sample	Cq
A01	FAM		Unkn	Huevo	1.38
A01	HEX		Unkn	Huevo	N/A
A02	FAM		Unkn	Huevo	3.81
A02	HEX		Unkn	Huevo	1.16
A07	FAM		Unkn	Lechuga	13.08
A07	HEX		Unkn	Lechuga	36.47
B01	FAM		Unkn	Huevo	13.69
B01	HEX		Unkn	Huevo	8.56
B02	FAM		Unkn	Huevo	15.08
B02	HEX		Unkn	Huevo	N/A
C01	FAM		Unkn	Huevo	33.64
C01	HEX		Unkn	Huevo	N/A
D01	FAM		Unkn	Huevo	N/A
D01	HEX		Unkn	Huevo	45.07
E01	FAM		Unkn	Huevo	13.55
E01	HEX		Unkn	Huevo	13.91
F01	FAM		Unkn	Huevo	18.27
F01	HEX		Unkn	Huevo	26.62
G01	FAM		Unkn	Huevo	15.03
G01	HEX		Unkn	Huevo	48.39
H01	FAM		Unkn	Huevo	14.79
H01	HEX		Unkn	Huevo	N/A

Figura 49 Resultados de *Listeria monocytogenes* en clara de huevo para S 400 08.1

Los controles de la repetición del estudio se encuentran representados en la Figura 50. Ambos resultados son válidos por los mismos motivos referentes a la Figura 44.

Los resultados obtenidos fueron los siguientes:

Well	Fluor	Target	Content	Sample	Cq
F02	FAM		Pos Ctrl		41.62
F02	HEX		Pos Ctrl		45.60
G02	FAM		Neg Ctrl		N/A
G02	HEX		Neg Ctrl		47.12

Figura 50 Resultados del control positivo y negativo de la repetición del kit S 400 08.1

Verificación de los métodos para la detección de *Salmonella spp.* y *Listeria monocytogenes* mediante PCR en matrices alimentarias

Well ▲	Fluor ◇	Target ◇	Content ◇	Sample ◇	Cq ◇
A01	FAM		Unkn	L1	12.28
A01	HEX		Unkn	L1	N/A
B01	FAM		Unkn	L2	30.60
B01	HEX		Unkn	L2	24.04
C01	FAM		Unkn	L3	17.07
C01	HEX		Unkn	L3	20.31

Figura 51 Resultados de *Listeria monocytogenes* en clara de huevo para S 400 08.1

Well ▲	Fluor ◇	Target ◇	Content ◇	Sample ◇	Cq ◇
D01	FAM		Unkn	L4	17.09
D01	HEX		Unkn	L4	22.08
E01	FAM		Unkn	L5	24.41
E01	HEX		Unkn	L5	33.78
F01	FAM		Unkn	L6	33.99
F01	HEX		Unkn	L6	N/A

Figura 52 Resultados de *Listeria monocytogenes* en queso para S 400 08.1

Well ▲	Fluor ◇	Target ◇	Content ◇	Sample ◇	Cq ◇
A02	FAM		Unkn	L9	14.72
A02	HEX		Unkn	L9	N/A
G01	FAM		Unkn	L7	13.49
G01	HEX		Unkn	L7	N/A
H01	FAM		Unkn	L8	16.98
H01	HEX		Unkn	L8	N/A

Figura 53 Resultados de *Listeria monocytogenes* en lechuga para S 400 08.1

Well ▲	Fluor ◇	Target ◇	Content ◇	Sample ◇	Cq ◇
B02	FAM		Unkn	L10	23.22
B02	HEX		Unkn	L10	31.68
C02	FAM		Unkn	L11	21.42
C02	HEX		Unkn	L11	N/A
D02	FAM		Unkn	L12	29.12
D02	HEX		Unkn	L12	36.60

Figura 54 Resultados de *Listeria monocytogenes* en salmón para S 400 08.1

Se observa en las ilustraciones 51, 52, 53 y 54 que todos ellos tienen amplificación en el canal FAM, por tanto, todos los resultados obtenidos se podrían considerar positivos. Sin embargo, tal y como también pasa en el apartado 4.2.1, al tener una inoculación seriada el ciclo en el que se detecta la fluorescencia a lo largo de la dilución debería ser más elevado. Al tener menos concentración de microorganismo patógeno tardará más (ciclo tardío) en emitir fluorescencia para detectar que la muestra está contaminada. Y, tal y como podemos ver en las ilustraciones 62, 64 y 65 vemos que esto no se cumple ya que la señal detectada por el canal FAM no es ascendente. En el apartado mencionado se comenta cual podría ser la posible causa de esto.

Si observamos el blanco del estudio, Figura 55, obtenemos un resultado coherente y que cumple con las condiciones de la verificación ya que al no haber emisión de fluorescencia en el canal FAM y recuperación del control interno esta muestra será negativa.

Well ▲	Fluor ◇	Target ◇	Content ◇	Sample ◇	Cq ◇
E02	FAM		Unkn	BLANC	N/A
E02	HEX		Unkn	BLANC	42.28

Figura 55 Resultado del blanco en *Listeria monocytogenes* para S 400 08.1

Siguiendo la verificación, el límite de detección 50 será el siguiente para todas las muestras:

Tabla 28 Resultados de la determinación eLOD₅₀ para el kit S 400 08.1 de todas las muestras

Nivel de inoculación alto	Nivel de inoculación intermedio	Nivel de inoculación bajo	Blanco	eLOD ₅₀ (UFC/mL)
1/1	4/4	4/4	0/1	< 1,0 x LIL = 1,0 x (7,8 x 10 ²) UFC / mL = < 7,8 x 10 ²

Anexo 12: Resultados detallados del kit S 400 08.1

5. DISCUSIÓN

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos, para poder realizar una comparación de los kits usados se podrían diferenciar dos categorías: la practicidad de los kits y el resultado obtenido sabiendo que las muestras han sido inoculadas.

Si solo nos fijamos en los resultados de las muestras inoculadas nos damos cuenta de que hay varios resultados negativos (ausencia de patógeno) que deberían ser positivos y que además como todas las muestras han sido inoculadas con el mismo banco de diluciones y con la misma concentración se deberían observar los mismos resultados de ausencia/presencia de patógeno.

Esto nos da a pensar que puede que el inoculo no se haya recuperado correctamente en la incubación, esto puede ser debido a un factor el cual ya se ha comentado que es la posición de las bolsas de enriquecimiento dentro de la estufa.

También hay que destacar que algunos de los blancos realizados no dan el resultado esperado (ampliación en el canal HEX y no ampliación en el canal FAM), esto supone que ha habido contaminación cruzada a la hora de realizar el ensayo. Aquí quiero destacar que los ensayos se realizaron durante dos días únicamente y todos a la vez, esto es un factor importante ya que la probabilidad de contaminación cruzada era muy elevada. Seguramente, si hubiera la posibilidad de poder rectificar se intentarían realizar los ensayos de manera separada entre ellos tanto de técnica como de microorganismo patógeno.

Si nos fijamos en la practicidad de los kits hay uno que destaca considerablemente por tener muchos menos pasos que el resto y que tanto la extracción como la detección está incluida en el mismo kit. Estos kits son los fabricados por el proveedor BAX (KIT2023 y KIT2025). Personalmente hablando a la hora de realizar el ensayo me han parecido los más simples y prácticos. En cambio, los kits de Biotecno no resultan nada prácticos a la hora de realizar la extracción y la detección. A pesar de que ambos pasos vienen incluidos en el mismo kit, requieren de muchos pasos de manipulación cosa que incrementa las posibilidades de que haya tanto error humano como contaminación cruzada.

Como ventaja positiva de estos últimos es que son de plataforma abierta, es decir, que independientemente de que el termociclador sea de otra casa comercial se pueden usar igualmente y además permiten hacer PCR en tiempo real, características las cuales no cumplen los kits de BAX.

Por lo que respecta a la aproximación de la verificación, los resultados no han sido los más idóneos ya que entre otras muchas cosas descritas en el apartado 4 del trabajo, se han obtenido controles positivos y negativos inválidos y controles blancos que han dado positivo en microorganismo patógeno. Sin embargo, se ha podido justificar la razón de estos resultados y se han utilizado igualmente los resultados obtenidos. En caso de realizar una verificación estricta para un laboratorio acreditado se deberían haber repetido de nuevo todos los ensayos.

A pesar de esto, se ha podido calcular el límite de detección:

- Límite de detección obtenido en los ensayos de *Salmonella*

Tabla 29 Resumen de los límites de detección obtenidos en los ensayos de *Salmonella*

Kit	Alimentos	eLOD50 (UFC/mL)
357-8123	Todos	< 21
KIT2025	Clara de huevo, queso brie y salmón	21
KIT2025	Lechuga	10,5
S 400 07	Clara de huevo	10,5
S 400 07	Lechuga, queso brie y salmón	< 21

Si recogemos todos los datos obtenidos del límite de detección de *Salmonella* se observa que todos ellos son límites de detección considerablemente bajos. Por lo que se podrían dar como límites de detección aceptables teniendo en cuenta que se ha detectado que en gran parte de las muestras había presencia de patógeno ya que estaban inoculadas.

La única discrepancia observada ha sido en la del KIT2025 para clara de huevo, queso brie y salmón dado que de las 4 inoculaciones realizadas solo se ha detectado presencia de patógeno en 1 de ellas. Este resultado hace que el límite de detección sea el mayor de toda la tabla 23.

- Límite de detección obtenido de los ensayos de *Listeria monocytogenes*

Tabla 30 Resumen de los límites de detección obtenidos en los ensayos de *Listeria monocytogenes*

Kit	Alimentos	eLOD50 (UFC/mL)
357-2023	Todos	< $7,8 \times 10^2$
KIT2023	Clara de huevo y salmón	$3,9 \times 10^2$
KIT2023	Lechuga y queso brie	< $7,8 \times 10^2$
S 400 08.1	Todos	< $7,8 \times 10^2$

A diferencia de los resultados obtenidos para *Salmonella*, los resultados del límite de detección para *Listeria monocytogenes* son considerablemente mayores, el motivo es la concentración de inoculación usada para realizar el estudio. En el caso de la *Listeria* el nivel de inoculación más bajo era considerablemente alto.

Observamos que obtenemos el mismo límite de detección si hablamos de PCR en tiempo real y vemos una variación en la PCR en punto final, en la que en la clara de huevo y salmón en el nivel de inoculación más bajo no ha sido capaz de detectar presencia del patógeno.

A pesar de esto en gran parte de las inoculaciones se ha detectado presencia de microorganismo por lo que podríamos dar los límites de detección como válidos.

6. CONCLUSIONES

Para concluir el trabajo se ha llegado a las siguientes valoraciones:

- Se ha podido analizar y poner en práctica conocimiento de análisis de PCR y legislación de seguridad alimentaria.
- Si tenemos que decantarnos por cual es el mejor kit, no hay una respuesta clara ya que dependen de varios factores como, por ejemplo: la cantidad de muestras que se analizarán en el laboratorio, el número de pasos teniendo en cuenta el tiempo de procesamiento de las muestras del termociclador, el coste, la cantidad de equipos extra para realizar el análisis, si el equipo se trata de un equipo abierto o cerrado...
- La simulación de la verificación se ha podido realizar con algunas limitaciones, entre ellas la contaminación cruzada.
- Los resultados obtenidos no han sido los más concluyentes para poder realizar una simulación estricta, sin embargo, se ha podido realizar el cálculo del límite de detección para cada kit y matriz analizada.
- Si tenemos en cuenta los resultados obtenidos de los límites de detección, al ser considerablemente bajos (teniendo en cuenta las concentraciones de inoculación correspondientes) podrían considerarse límites de detección aceptables.
- Sabiendo que los resultados no han sido del todo concluyentes el estudio entero se debería repetir añadiendo algunos cambios, de esta manera se podrían obtener resultados concluyentes para un estudio estadístico como tal.
- Debido a las diferentes limitaciones, si se hubiera hecho la verificación estricta, con los niveles de inoculación adecuados se podrían haber comparado los límites de detección obtenidos con los resultados de las correspondientes validaciones.

BIBLIOGRAFIA

- [1] UNIVERSITY OF NEBRASKA-LINCOLN. Pathogenic Organisms. *Salmonella*.
[[Salmonella | UNL Food](#), 28 de Noviembre de 2021]
- [2] AGENCIA ESPAÑOLA DE SEGURIDAD ALIMENTARIA Y NUTRICIÓN. Enfermedades de transmisión alimentaria. *Salmonellosis*
[[Aesan - Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición](#), 29 de Noviembre de 2021]
- [3] MICHAEL T. MADIGAN; JOHN M. MARTINKO; KELLY S. BENDER; DANIEL H. BUCKLEY; DAVID A. STAHL. *Brock. Biología de los microorganismos*. Pearson Educación S.A. Madrid: 2015, p. 775-777.
- [4] MICHAEL T. MADIGAN; JOHN M. MARTINKO; KELLY S. BENDER; DANIEL H. BUCKLEY; DAVID A. STAHL. *Brock. Biología de los microorganismos*. Pearson Educación S.A. Madrid: 2015, p. 783
- [5] MICHAEL T. MADIGAN; JOHN M. MARTINKO; KELLY S. BENDER; DANIEL H. BUCKLEY; DAVID A. STAHL. *Brock. Biología de los microorganismos*. Pearson Educación S.A. Madrid: 2015, p. 892
- [6] MICHAEL T. MADIGAN; JOHN M. MARTINKO; KELLY S. BENDER; DANIEL H. BUCKLEY; DAVID A. STAHL. *Brock. Biología de los microorganismos*. Pearson Educación S.A. Madrid: 2015, p. 997-998.
- [7] MICHAEL T. MADIGAN; JOHN M. MARTINKO; KELLY S. BENDER; DANIEL H. BUCKLEY; DAVID A. STAHL. *Brock. Biología de los microorganismos*. Pearson Educación S.A. Madrid: 2015, p. 870
- [8] EU ONE HEALTH ZONOSSES REPORT, 2021. *Salmonella* p. 31-75
[[The European Union One Health 2019 Zoonoses Report - - 2021 - EFSA Journal - Wiley Online Library](#), 29 de Noviembre de 2021]
- [9] AGENCIA ESPAÑOLA DE SEGURIDAD ALIMENTARIA Y NUTRICIÓN. Enfermedades de transmisión alimentaria. *Listeriosis*
[[Aesan - Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición](#), 6 de Diciembre de 2021]
- [10] INFORME DE ZONOSIS, 2018. *Listeriosis* p. 17-20
[[informe_web_final_zoonosis_2018_tcm30-543744.pdf \(mapa.gob.es\)](#), 9 de Diciembre de 2021]
- [11] MICHAEL T. MADIGAN; JOHN M. MARTINKO; KELLY S. BENDER; DANIEL H. BUCKLEY; DAVID A. STAHL. *Brock. Biología de los microorganismos*. Pearson Educación S.A. Madrid: 2015, p. 1000-1001.
- [12] EU ONE HEALTH ZONOSSES REPORT, 2021. *Listeria* p. 78-94
[[The European Union One Health 2019 Zoonoses Report - - 2021 - EFSA Journal - Wiley Online Library](#), 7 de Diciembre de 2021]
- [13] DAVID L. NELSON; MICHAEL M. COX. *Lehninger Principles of Biochemistry*, Fifth Edition. Ediciones Omega S.A. Barcelona: 2019, p. 317-318
- [14] MICHAEL T. MADIGAN; JOHN M. MARTINKO; KELLY S. BENDER; DANIEL H. BUCKLEY; DAVID A. STAHL. *Brock. Biología de los microorganismos*. Pearson Educación S.A. Madrid: 2015, p. 339-341

[15] TAMAY DE DIOS L.; IBARRA C.; VELASQUITO C. *Fundamentos de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y de la PCR en tiempo real.*

[[Fundamentos de la reacción en cadena de la polimerasa \(PCR\) y de la PCR en tiempo real \(medigraphic.com\)](#), 12 de Diciembre de 2021]

[16] BIO-RAD LABORATORIES. *Excitation and Detection Wavelength Charts.*

[https://www.biorad.com/webroot/web/html/lsr/products/amplification_pcr/product_overlay/global/amp_excit_emiss_cfx96touch.html, 13 de Diciembre de 2021]

[17] MIR I. *Nociones Básicas de PCR.*

[Material interno de Bioser S.A., 13 de Diciembre de 2021]

[18] BIBLIOTECA TÉCNICA DE BIOSER

[Material interno de Bioser S.A., 3 de Enero de 2022]

[19] REGLAMENTO (CE) Nº 2073/2005 DE LA COMISIÓN de 15 de noviembre de 2005. *Relativo a los criterios microbiológicos aplicables a los productos alimenticios.* p. 9-11

[20] PNE-EN ISO 16140-3. *Microbiología de la cadena alimentaria. Validación de métodos. Parte 3: Protocolo para la verificación en un único laboratorio de métodos de referencia y de métodos alternativos validados (ISO 16140-3:2021)*

[21] UNE-ES ISO 16140-1:2016. *Microbiología de la cadena alimentaria. Validación de métodos. Parte 1: Vocabulario (ISO 16140-1:2016)*

[22] BIO-RAD LABORATORIES. *Bulletin_6093: CFX96 Touch Real-Time PCR System.*

[[Bulletin_6093.pdf \(bio-rad.com\)](#), 19 de Diciembre de 2021]

[23] HYGIENA, FOOD SAFETY SOLUTIONS. *Brochure Bax System X5 PCR Pathogen detection.*

[[MBFB-BAX-System-X5-Brochure-EN-Rev-02.pdf \(hygiena.com\)](#), 19 de Diciembre 2021]

[24] HYGIENA. *Bax System X5.*

[Material interno de Bioser S.A., 5 de Enero de 2022]

[25] HYGIENA. *Bax System User Guide.* p. 12.

[[BAX-System-X5-User-Guide.pdf \(hygiena.com\)](#), 5 de Enero de 2022]

[26] BOKAR DIAGNOSTICS. *Technical data sheet: Buffered Peptone Water.*

[[TDS BUFFERED PEPTONE WATER BK018 BK131 BM010 BM056 BM057 BK131 BK132 BK214 ENV19 \(5\).pdf](#), 5 de Enero de 2022]

[27] BOKAR DIAGNOSTICS. *Technical data sheet: Half Fraser*

[[TDS HALF FRASER BROTH BK133 bk173 BM016 133 134 BS030 032 059 062 ENV18 \(2\).pdf](#), 6 de Enero 2022]

[28] BIO-RAD. *iQ-Check™ Salmonella User Guide. Bulletin #10000131519.*

[[10000131519.pdf \(bio-rad.com\)](#), 6 de Enero de 2022]

[29] HYGIENA. *Bax System X5 User Guide.*

[[BAX-System-X5-User-Guide.pdf \(hygiena.com\)](#), 7 de Enero de 2022]

[30] BIOTECON DIAGNOSTICS. *foodproof® StarPrep One Kit Manual*.

[[S_400_07-L_20_StarPrep-One-Kit.pdf \(bc-diagnostics.com\)](#), 7 de Enero de 2022]

[31] BIOTECON DIAGNOSTICS. *Product Manual: foodproof® Samonella Detection Lyokit - 5' nuclease -*.

[[Beipackzettel Muster Word \(bc-diagnostics.com\)](#), 7 de Enero de 2022]

[32] BIO-RAD. *iQ-Check™ Listeria monocytogenes II User Guide. Bulletin #10000123535*.

[[10000123535.pdf \(bio-rad.com\)](#), 6 de Enero de 2022]

[33] BIOTECON DIAGNOSTICS. *foodproof® StarPrep Two Kit: Listeria Manual*.

[[S_400_08-1_20-2_StarPrep-Two-Kit_Listeria.pdf \(bc-diagnostics.com\)](#), 7 de Enero de 2022]

[34] BIOTECON DIAGNOSTICS. *Product Manual: foodproof® Listeria monocytogenes Detection Lyokit - 5' nuclease -*.

[[Beipackzettel Muster Word \(bc-diagnostics.com\)](#), 7 de Enero de 2022]

ANEXOS

ANEXO 1: Certificados de validación de los kits de detección



Certificate

Certificate No.: **BRD 07/06 -07/04**
Renewal decision dated: 14-12-2020
Expiry date: 01-07-2024

The Company:

BIO-RAD
3 Boulevard Raymond Poincaré
92430 Marnes La Coquette - France

is authorized to affix the NF VALIDATION mark on the alternative analysis method cited below, in accordance with the NF VALIDATION general rules and the certification rules NF102 - Validation of alternative analysis methods (Application to the food industry):

iQ-Check *Salmonella* II

Validated for the detection of *Salmonella* spp.

Technical sheet
reference's

10000131519 Ver A

This decision attests that the alternative analysis method has been assessed by AFNOR Certification and found to conform to the standards cited in page 2/2 and complementary requirements, as specified in the certification reference document. The principal certified characteristics are the "analytical performances" as defined in the associated validation study summarized report (sensitivity, relative detection level...), available on the certification dedicated website <http://nf-validation.afnor.org/en>.

This certificate supersedes all previous certificates. This NF VALIDATION certificate, included 2 pages, is valid until July 1st, 2024. It is subject to the results obtained upon regular controls carried out by AFNOR Certification. Appropriate decision is made by AFNOR Certification in accordance with the NF VALIDATION general rules and certification rules NF102 - Validation of alternative analysis methods (Application to the food industry).



Managing Director
Julien NIZRI

Issue date: 28-06-2021

Page 2/2



Validation of alternative analysis methods
NF 102 – Application to the food industry

Certificate

Certificate No.: **BRD 07/06 -07/04**
Renewal decision dated: **14-12-2020**
Expiry date: **01-07-2024**

The alternative analysis method:

iQ-Check *Salmonella* II

Validated for the detection of *Salmonella* spp.

Manufactured by:

BIO-RAD Laboratories, Inc
2000 Alfred Nobel Drive
California 94547 Hercules - USA

Has been certified according to the reference documents and for the application scope specified here after:

Validation protocol	NF EN ISO 16140-2 (September 2016): Microbiology of the food chain. Method validation - Part 2: Protocol for the validation of alternative (proprietary) methods against a reference method.
Reference method(s)	NF EN ISO 6579-1 (April 2017) and its amendment A1 (March 2020): Microbiology of the food chain - Horizontal method for the detection, enumeration and serotyping of <i>Salmonella</i> - Part 1: detection of <i>Salmonella</i> spp.
Scope	All human food products (by performing validation assays on a broad range of foods), feed products, industrial and primary environmental production samples.
Restriction(s)	None.
Warning	None.
Other information(s)	The scope includes cyclers and softwares listed in the technical sheet of the manufacturer.

Please send any queries concerning the performances of the certified alternative method to AFNOR Certification.

You may download the validation study summarized report on <http://nf-validation.afnor.org/en>.

Issue dated 20-03-2021

Page 2/2

11 rue Francis de Pressensé - 93571 La Plaine Saint-Denis Cedex - France - T. +33 (0)1 41 82 80 00 - F. +33 (0)1 49 17 90 00
SAS au capital de 16 187 000 € - 470 078 002 RCS Bobigny - www.afnor.org

afnor
CERTIFICATION



Validation of alternative analysis methods
NF102 – Application to the food industry

Certificate

Certificate No.: **BRD 07/10-04/05**
Extension decision dated: 07-04-2021
Expiry date: 07-04-2025

The Company:

BIO-RAD
3 Boulevard Raymond Poincaré
92430 Marnes La Coquette - France

Is authorized to affix the NF VALIDATION mark on the alternative analysis method cited below, in accordance with the NF VALIDATION general rules and the certification rules NF102 - Validation of alternative analysis methods (Application to the food industry):

iQ-Check[®] *Listeria monocytogenes* II

Validated for the detection of *Listeria monocytogenes*

Technical sheet
reference's

Cat. 10000123535 Ver B

This decision attests that the alternative analysis method has been assessed by AFNOR Certification and found to conform to the standards cited in page 2/2 and complementary requirements, as specified in the certification reference document. The principal certified characteristics are the "analytical performances" as defined in the associated validation study summarized report (sensitivity, relative detection level...), available on the certification dedicated website <http://nf-validation.afnor.org/en>.

This certificate supersedes all previous certificates (last version dated 11-05-2021). This NF VALIDATION certificate, included 2 pages, is valid until 07th April 2025. It is subject to the results obtained upon regular controls carried out by AFNOR Certification. Appropriate decision is made by AFNOR Certification in accordance with the NF VALIDATION general rules and certification rules NF102 - Validation of alternative analysis methods (Application to the food industry).



Managing Director
Julien NIZRI

Issue dated: 16-10-2021

Page 1/2

11 rue Francis de Pressensé - 93571 La Plaine Saint-Denis Cedex - France - T. +33 (0)1 41 82 80 00 - F. +33 (0)1 49 17 90 00
SAS au capital de 18 187 000 € - 470 078 002 RCS Bobigny - www.afnor.org





Certificate

Certificate No.: **BRD 07/10-04/05**
Extension decision dated: 07-04-2021
Expiry date: 07-04-2025

The alternative analysis method:

iQ-Check[®] *Listeria monocytogenes* II

Validated for the detection of *Listeria monocytogenes*

Manufactured by:

BIO-RAD Laboratories, Inc
2000 Alfred Nobel Drive
California 94547 Hercules - USA

Has been certified according to the reference documents and for the application scope specified here after:

Validation protocol	NF EN ISO 16140-2 (September 2016): Microbiology of the food chain. Method validation - Part 2: Protocol for the validation of alternative (proprietary) methods against a reference method.
Reference method(s)	NF EN ISO 11290-1 (July 2017): Microbiology of the food chain - Horizontal method for the detection and enumeration of <i>Listeria monocytogenes</i> - Part 1: detection method.
Scope	All human products (by performing validation assays on a broad range of foods) and industrial production environment samples.
Restriction(s)	None.
Warning	None.
Other information	The scope includes cyclers and software listed in the technical sheet of the manufacturer.

Please send any queries concerning the performances of the certified alternative method to AFNOR Certification.

You may download the validation study summarized report on <http://nf-validation.afnor.org/en>.



CERTIFICATION

AOAC® Performance TestedSM

Certificate No.

070202

The AOAC Research Institute hereby certifies the test kit known as:

BAX® System PCR Assay for *Listeria monocytogenes*
BAX® System X5 PCR Assay for *Listeria monocytogenes*

manufactured by

Hygiena
2 Boulden Circle
New Castle, DE 19720
USA

This method has been evaluated in the AOAC® *Performance Tested MethodsSM* program and found to perform as stated by the manufacturer contingent to the comments contained in the manuscript. This certification means that an AOAC® Certification Mark License Agreement has been executed which authorizes the manufacturer to display the AOAC *Performance TestedSM* certification mark along with the statement - "THIS METHOD'S PERFORMANCE WAS REVIEWED BY AOAC RESEARCH INSTITUTE AND WAS FOUND TO PERFORM TO THE MANUFACTURER'S SPECIFICATIONS" - on the above mentioned method for a period of one calendar year from the date of this certificate (December 04, 2019 – December 31, 2020). Renewal may be granted at the end of one year under the rules stated in the licensing agreement.

Scott Coates, Senior Director
Signature for AOAC Research Institute

2275 Research Blvd., Suite 300, Rockville, MD 20850-3250 USA * Telephone: +1-301-924-7077 * Fax: +1-301-924-7089
Internet e-mail: aocaci@aoac.org * World Wide Web Site: <http://www.aoac.org>

December 04, 2019

Date



Validation of alternative analysis methods
NF102 – Application to the food industry

Certificate

Certificate No.: **QUA 18/03-11/02**
Renewal decision dated: 05-10-2018
Expiry date: 28-11-2022

The Company:

QUALICON DIAGNOSTICS LLC
2 Boulden Circle
New Castle, Delaware 19720
United States

Is authorized to affix the NF VALIDATION mark on the alternative analysis method cited below, in accordance with the NF VALIDATION general rules and the certification rules NF 102 - Validation of alternative analysis methods (Application to the food industry):

BAX System PCR Assay *Salmonella spp*

Validated for the detection of *Salmonella spp.*

Technical sheets reference's | KIT2012 (D11000133) and KIT2011 (D14366501)
KIT2025 (D15407187)

This decision attests that the alternative analysis method has been assessed by AFNOR Certification and found to conform to the standards cited in page 2/2 and complementary requirements, as specified in the certification reference document. The principal certified characteristics are the "analytical performances" as defined in the associated validation study summarized report (sensitivity, relative level of detection...), available on the certification dedicated website <http://nf-validation.org/en>.

This NF VALIDATION certificate, included 2 pages, is valid until November 28th, 2022. It is subject to the results obtained upon regular controls carried out by AFNOR Certification. Appropriate decision is made by AFNOR Certification in accordance with the NF VALIDATION general rules and certification rules NF 102 - Validation of alternative analysis methods (Application to the food industry).




Managing Director
Franck LEBEUGLE

Issued date: 06/03/2019

Page: 1/2



186552-10/2016

11 rue Francis de Pressensé - 93571 La Plaine Saint-Denis Cedex - France - T +33 (0)1 41 62 80 00 - F +33 (0)1 49 17 90 00
SAS au capital de 18 182 000 € - 439 076 002 RCS Bobigny - www.afnor.org

afnor
CERTIFICATION



UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE CATALUNYA
BARCELONATECH
Escola d'Enginyeria Agroalimentària
i de Biosistemes de Barcelona





Validation of alternative analysis methods
NF102 – Application to the food industry

Certificate

Certificate No.: **QUA 18/03-11/02**
Renewal decision dated: 05-10-2018
Expiry date: 28-11-2022

The alternative analysis method:

BAX System PCR Assay *Salmonella spp*

Validated for the detection of *Salmonella spp.*

Manufactured by:

QUALICON DIAGNOSTICS LLC
200 Powder Mill Rd
Wilmington
DE 19803 USA

Has been certified according to the reference documents and the application scope specified here after:

Validation protocol	NF EN ISO 16140-2 (September 2016): Microbiology of the food chain. Method validation - Part 2: Protocol for the validation of alternative (proprietary) methods against a reference method.
Reference method(s)	NF EN ISO 6579-1 (April 2017): Microbiology of the food chain - Horizontal method for the detection, enumeration and serotyping of <i>Salmonella</i> - Part 1: detection of <i>Salmonella spp.</i>
Scope	All human food products (by performing validation assays on a broad range of foods), feed products and industrial production environmental samples (excluding primary production environmental samples).
Restriction(s)	None.
Warning	None.
Other informations	The scope includes the use of BAX® System version 3.6. and BAX® System X5 instrument version 1.0.

Please send any queries concerning the performances of the certified alternative method to AFNOR Certification.

You may download the validation study summarized report on <http://nf-validation.afnor.org/en>.

Issue dated 09/02/2019

Page 2/2



100552-106696

11 rue Francis de Pressensé - 93571 La Plaine Saint-Denis Cedex - France - T. +33 (0)1 41 62 80 00 - F. +33 (0)1 49 17 90 00
SAS au capital de 10 187 000 € - 479 074 002 RCS Boulogne - www.afnor.org

afnor
CERTIFICATION





CERTIFICATION

AOAC® Performance TestedSM

Certificate No.

070401

The AOAC Research Institute hereby certifies the test kit known as:

foodproof® *Listeria monocytogenes* Detection Kits (liquid and lyophilized)

manufactured by

**BIOTECON Diagnostics GmbH
Hermannswerder Haus 17
14473 Potsdam, Germany**

This method has been evaluated in the AOAC® Performance Tested MethodsSM Program and found to perform as stated by the manufacturer contingent to the comments contained in the manuscript. This certificate means that an AOAC® Certification Mark License Agreement has been executed which authorizes the manufacturer to display the AOAC Performance TestedSM certification mark along with the statement - "THIS METHOD'S PERFORMANCE WAS REVIEWED BY AOAC RESEARCH INSTITUTE AND WAS FOUND TO PERFORM TO THE MANUFACTURER'S SPECIFICATIONS" - on the above mentioned method for a period of one calendar year from the date of this certificate (December 06, 2020 – December 31, 2021). Renewal may be granted at the end of one year under the rules stated in the licensing agreement.

Scott Coates

Scott Coates, Senior Director
Signature for AOAC Research Institute

December 06, 2020

Date

2275 Research Blvd., Suite 300, Rockville, MD 20850-3250 USA * Telephone: +1-301-924-7077 * Fax: +1-301-924-7089
Internet e-mail: aoacri@aoac.org * World Wide Web Site: <http://www.aoac.org>



CERTIFICATION

AOAC® Performance TestedSM

Certificate No.

120301

The AOAC Research Institute hereby certifies the test kits known as:

foodproof® Salmonella Detection Kits (liquid and lyophilized)
with **foodproof® ShortPrep I Kit**, **foodproof® StarPrep One Kit**, or
foodproof® Magnetic Preparation Kit I with the **foodproof® RoboPrep Series**

manufactured by
BIOTECON Diagnostics GmbH
Hermannswerder 17
14473 Potsdam, Germany







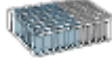







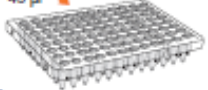
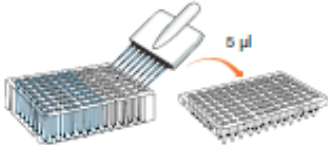


This method has been evaluated in the AOAC® *Performance Tested Methods*SM program and found to perform as stated by the manufacturer contingent to the comments contained in the manuscript. This certificate means that an AOAC® Certification Mark License Agreement has been executed which authorizes the manufacturer to display the AOAC *Performance Tested*SM certification mark along with the statement - "THIS METHOD'S PERFORMANCE WAS REVIEWED BY AOAC RESEARCH INSTITUTE AND WAS FOUND TO PERFORM TO THE MANUFACTURER'S SPECIFICATIONS" - on the above mentioned method for a period of one calendar year from the date of this certificate (December 06, 2020 – December 31, 2021). Renewal may be granted at the end of one year under the rules stated in the licensing agreement.

Scott Coates, Senior Director
Signature for AOAC Research Institute

December 06, 2020
Date

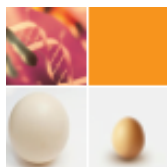
2275 Research Blvd., Suite 300, Rockville, MD 20850-3250 USA * Telephone: +1-301-924-7077 * Fax: +1-301-924-7089
Internet e-mail: aoacri@aoac.org * World Wide Web Site: <http://www.aoac.org>

ANEXO 2: Guía rápida de interpretación del iQ-Check™ *Salmonella* II

Quick Guide		357-8123 • iQ-Check™ <i>Salmonella</i> II	 
 21 hrs ± 1 hr  37°C BPW 		<ul style="list-style-type: none">• Enrich the sample in buffered peptone water (25 g in 225 ml), 21 hrs ± 1 hr at 37°C	
 100 µl   100 µl		<ul style="list-style-type: none">• Add 100 µl of the lysis reagent (reagent A) in the deepwell plate <i>Lysis reagent must be constantly stirring in order to keep it in suspension</i>• Transfer 100 µl of enriched sample <i>Avoid including large fragments of food debris, and shaking stomacher bag before collecting</i>• Seal the deepwell plate with the pre-pierced sealing film	
  10-15 min 1,300 rpm  95-100°C		<ul style="list-style-type: none">• Incubate at 95-100°C for 10-15 min at 1,300 rpm in a plate agitator-incubator• Cool the deepwell plate	
 probe mix +  amplification mix =  PCR mix 45 µl 		<ul style="list-style-type: none">• Prepare the PCR mix• Distribute 45 µl/well in the PCR microplate	
 5 µl		<ul style="list-style-type: none">• Add 5 µl of controls• Transfer 5 µl of sample supernatants Do not vortex before collecting the sample <i>Check there are no bubbles</i>• Seal the microplate	
 		<ul style="list-style-type: none">• Start software• Create the plate setup• Start the amplification by clicking on "Run"	

Please read the kit instruction manual and instrument user guide for complete and detailed instructions.

BIO-RAD



Quick Guide

iQ-Check™ Salmonella II PCR Mix Calculation Guide

To find the correct volumes to use when preparing the PCR mix, add the total number of samples and controls to be analyzed, and find the corresponding volumes of reagent B and reagent C in the table.

Total number of samples & controls	Probes - Reagent B (µl)	Amplification Mix Reagent C (µl)	Total number of samples & controls	Probes - Reagent B (µl)	Amplification Mix Reagent C (µl)
1	5	40	49	265	2100
2	11	86	50	270	2200
3	16	130	51	275	2200
4	22	173	52	281	2200
5	27	216	53	286	2300
6	32	259	54	292	2300
7	38	302	55	297	2400
8	43	346	56	302	2400
9	49	389	57	308	2500
10	54	432	58	313	2500
11	59	475	59	319	2500
12	65	518	60	324	2600
13	70	562	61	329	2600
14	76	605	62	335	2700
15	81	648	63	340	2700
16	86	691	64	346	2800
17	92	734	65	351	2800
18	97	778	66	356	2900
19	103	821	67	362	2900
20	108	864	68	367	2900
21	113	907	69	373	3000
22	119	950	70	378	3000
23	124	994	71	383	3100
24	130	1000	72	389	3100
25	135	1100	73	394	3200
26	140	1100	74	400	3200
27	146	1200	75	405	3200
28	151	1200	76	410	3300
29	157	1300	77	416	3300
30	162	1300	78	421	3400
31	167	1300	79	427	3400
32	173	1400	80	432	3500
33	178	1400	81	437	3500
34	184	1500	82	443	3500
35	189	1500	83	448	3600
36	194	1600	84	454	3600
37	200	1600	85	459	3700
38	205	1600	86	464	3700
39	211	1700	87	470	3800
40	216	1700	88	475	3800
41	221	1800	89	481	3800
42	227	1800	90	486	3900
43	232	1900	91	491	3900
44	238	1900	92	497	4000
45	243	1900	93	502	4000
46	248	2000	94	508	4100
47	254	2000	95	513	4100
48	259	2100	96	518	4100

Bio-Rad, S.N.C. au capital de 90 000 000 Euros, Localité-Océant, 449 000 712 RCS Nantes - N° Intracommunautaire FR BE 449 000 712 - Siret 449 000 712 00019



Bio-Rad
Laboratories, Inc.

Life Science
Group

Web site www.bio-rad.com USA 800 451RAD Australia 61 02 8014 2800 Austria 43 66 1 877 89 01 Belgium 09 385 55 11 Brazil 55 21 2057 9400
Canada 1 800 368 5213 China 86 21 5385 2555 Czech Republic 420 2411 430 533 Denmark 45 50 19 05 Finland 35 864 52 00 France 33 1 47 85 69 59
Germany 49 69 90 318 84 0 Greece 30 210 777 4385 Hong Kong 852 2789 2000 Hungary 36 1 455 8800 India 1 800 180 1224
Israel 972 651 4127 Italy 39 02 316 091 Japan 81 03 5811 6970 Korea 82 2 3470 4450 Latin America 365 894 5900 Mexico 52 555 488 7670
The Netherlands 31 208 540 650 New Zealand 64 9 415 2080 Norway 47 22 41 30 Poland 48 22 201 88 89 Portugal 351 21 472 7200
Romania 4021 210 1700 Russia 7 095 791 1404 Singapore 65 6415 2788 South Africa 27 11 442 8508 Spain 34 91 590 5200 Sweden 46 8 555 13700
Switzerland 41 61 717 85 55 Taiwan 886 2 2576 7100 Thailand 662 051 8311 United Kingdom 44 20 8208 2000 Vietnam 846 829 6757

© Bio-Rad PROBITMx Rev C 07/2011




UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE CATALUNYA
BARCELONATECH
Escola d'Enginyeria Agroalimentària
i de Biosistemes de Barcelona



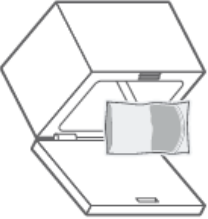
ANEXO 3: Guía rápida de interpretación para ensayos en el equipo X5

BAX® System X5

Ready Reference for X5 PCR Assays



1. Enrich samples.
(See User Guide)



2. Prepare the Automated Thermal Block.


Load Samples
GmiNeg

For *E. coli* and *Salmonella* assays

Load Samples
RTLis

For *Genus Listeria* and *L. monocytogenes* assays

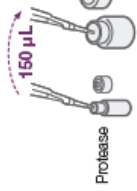
3. Create rack file with data on each sample.



3. Prepare BAX® System Lysis Reagent

For *E. coli* O157:H7 and *Salmonella*


150 µL Protease + 12 mL lysis buffer



Protease

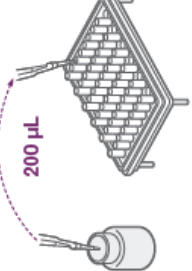
For *Genus Listeria* and *L. monocytogenes*

150 µL Protease + 200 µL Lysing Agent 2 + 12 mL lysis buffer



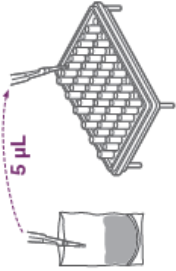
Protease Lysing Agent 2

4. Dispense lysis reagent into cluster tubes



200 µL

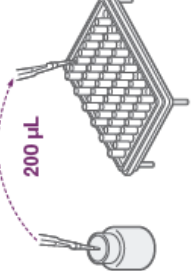
5. Transfer 5 µL* enriched samples to cluster tubes.
*20 µL for *E. coli* O157:H7 samples enriched with BAX® System MP Media



5 µL

For regrown samples, use multi-channel pipettor

6. Dispense lysis reagent into cluster tubes




200 µL

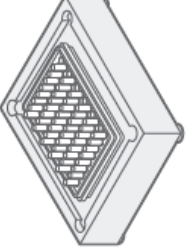
6. Perform Sample Lysis*

Place cluster tubes on the Hygiena™ Automated Thermal Block

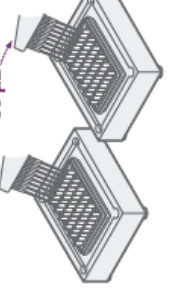
- Press the SELECT/CONTINUE button
- Lysis is complete when the Hygiena™ Automated Thermal Block beeps and displays the message "Sample PCR Ready"
- Sample Lysis (Step 5) can also be performed using analog heat blocks. See the BAX® System X5 User Guide for details and instructions.



7. Arrange PCR tubes in cooling block using sample carrier.

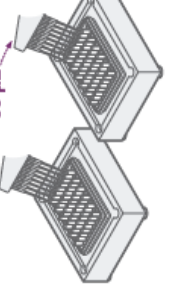


8. Arrange PCR tubes in cooling block using sample carrier.



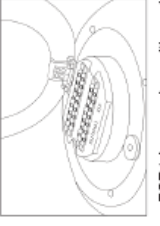
50 µL

9. Hydrate PCR tablets with 50 µL lysate from step 5.*



50 µL


10. Open the BAX System X5 instrument lid. Insert PCR tubes in a symmetrical, balanced layout. Close lid; run begins automatically.




Ensure PCR tubes are clean with no air bubbles

11. Unload samples and review results on screen.
See User Guide for details.


Negative




Positive




Indeterminate




Signal error







6. Initialize Instrument




In the Instrument tab, click the RUN button. You must load samples within 20 minutes of clicking the RUN button.



UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE CATALUNYA
BARCELONATECH
Escola d'Enginyeria Agroalimentària i de Biosistemes de Barcelona





70

FRP-005 Rev.03

ANEXO 4: Guía rápida de interpretación del foodproof® Salmonella Detection Lyokit



foodproof®

Salmonella Detection LyoKit Quick Guide

- 5'Nuclease -

Order no. R 602 27-1 (L) / R 602 27-2 / R 602 27-3

Version 2, June 2017

PCR kit for the qualitative detection of *Salmonella* DNA using real-time PCR instruments.

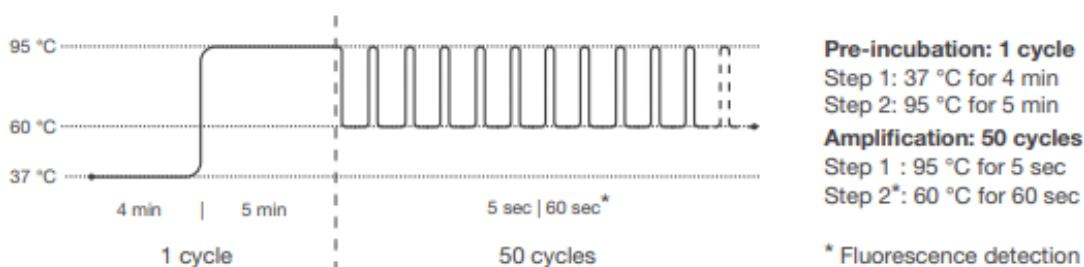
Before starting, it is strongly recommended to read the entire product manual available on our website.

PROGRAM SETUP

Program your real-time PCR instrument before setting up the PCR reactions. Select the following channels:

- FAM (*Salmonella*) and VIC (Internal Control).

As an alternative to VIC, HEX can be used. For the PikoReal® 24, Yakima Yellow has to be selected.



For some real-time PCR instruments the probe quencher as well as the usage of a passive reference dye has to be specified. This kit contains probes with a non-fluorescent "dark" quencher and no passive reference dye.

DATA INTERPRETATION

Verify results of positive (Control Template) and negative controls (H₂O), before interpreting sample results. Always compare samples to positive and negative control. Review data from each channel and interpret results as described in the table.

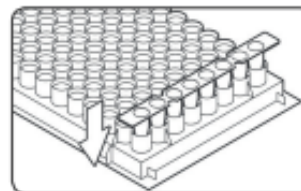
FAM	VIC	Result Interpretation
+	+ or -	Positive for <i>Salmonella</i>
-	+	Negative for <i>Salmonella</i>
-	-	Invalid

PREPARATION OF THE PCR MIX

Take appropriate precautions to prevent contamination, e.g. by using filter tips and wearing gloves.

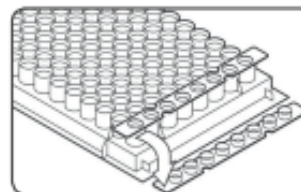
1. PLACE STRIPS IN RACK

Take needed number of PCR tube strips out of aluminum bag.
Important: close bag tight afterwards. Place strips in a suitable PCR tube rack.
If needed, gently tap the tubes to move the lyophilized pellets to the bottom of all tubes.



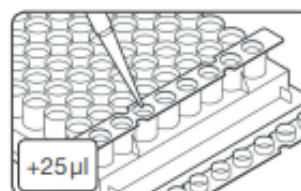
2. DECAP

Open strips carefully direct before filling and discard caps.
Do not leave open longer than necessary.



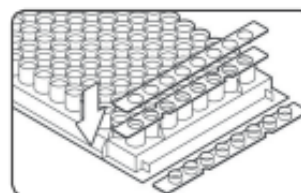
3. ADD SAMPLES AND CONTROLS

Pipet 25 μ l of samples, negative control (colorless cap) or Control Template (purple cap) into respective wells.
If using less volume, add PCR-grade H₂O to reach 25 μ l.



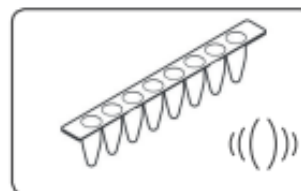
4. SEAL

Seal the tubes with the provided 8-Cap Strips accurately.



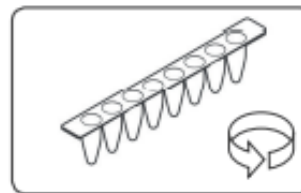
5. MIX

Resuspend pellet after sealing by mixing thoroughly.
Alternatively resuspend pellet by pipetting up and down multiple times in step 3.



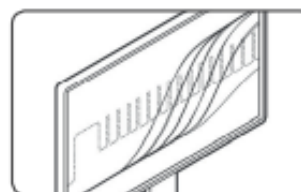
6. CENTRIFUGE

Briefly spin strips, e.g. 5 sec at 500 - 1.000 x g, in a suitable centrifuge.



7. START REAL-TIME PCR RUN

Cycle samples as described above.
Place tubes in a vertical, balanced order into the cycler, e.g. two strips can be placed in the first and last column.



ANEXO 5: Guía rápida de interpretación del iQ-Check™ *Listeria monocytogenes* II

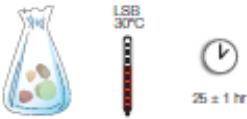


Quick Guide

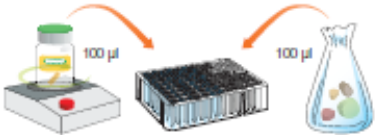
iQ-Check *Listeria monocytogenes* II, 3578124

iQ-Check *Listeria spp.*, 3578113

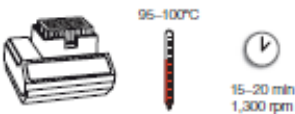
Easy II Extraction Deep Well Protocol Using the Thermoshaker




- Enrich the sample in *Listeria* Special Broth (LSB) (25 g in 225 ml), for 25 ± 1 hr at 30°C
Check with your Bio-Rad representative for specific validations.




- **Be sure the lysis reagent is constantly stirring to keep it in suspension.**
- Add 100 µl of the lysis reagent (reagent A and reagent F) to the deep well plate
- Transfer 100 µl of enriched sample to the deep well plate
Avoid shaking the stomacher bag to prevent collecting large fragments of food debris.
- Seal the deep well plate using the pre-pierced sealing film




- Incubate at 95–100°C for 15–20 min at 1,300 rpm in the thermoshaker
- Cool the deep well plate



- Prepare the PCR mix (see PCR Mix Calculation Guide on back)
- Distribute 45 µl/well in the PCR microplate



- Add 5 µl each of positive and negative controls to each well
- Transfer 5 µl of extracted DNA from the deep well plate to the microplate
Do not vortex before collecting the sample.
Check there are no bubbles.
- Seal the PCR microplate



- Launch CFX Manager IDE Software
- Create the plate setup
- Start the amplification by clicking **Run**

* Steps automated by iQ-Check Prep System.

For detailed instructions, review the kit instruction manual.

BIO-RAD

PCR Mix Calculation Guide

To find the correct volumes to use when preparing the PCR mix, add the total number of samples and controls to be analyzed and find the corresponding volumes of reagent B and reagent C in the table.

Total Number of Samples and Controls	Probes Reagent B, μ l	Amplification Mix Reagent C, μ l	Total Number of Samples and Controls	Probes Reagent B, μ l	Amplification Mix Reagent C, μ l	Total Number of Samples and Controls	Probes Reagent B, μ l	Amplification Mix Reagent C, μ l
1	5	40	33	178	1,400	65	351	2,800
2	11	86	34	184	1,500	66	356	2,900
3	16	130	35	189	1,500	67	362	2,900
4	22	173	36	194	1,600	68	367	2,900
5	27	216	37	200	1,600	69	373	3,000
6	32	259	38	205	1,600	70	378	3,000
7	38	302	39	211	1,700	71	383	3,100
8	43	346	40	216	1,700	72	389	3,100
9	49	389	41	221	1,800	73	394	3,200
10	54	432	42	227	1,800	74	400	3,200
11	59	475	43	232	1,900	75	405	3,200
12	65	518	44	238	1,900	76	410	3,300
13	70	562	45	243	1,900	77	416	3,300
14	76	605	46	248	2,000	78	421	3,400
15	81	648	47	254	2,000	79	427	3,400
16	86	691	48	259	2,100	80	432	3,500
17	92	734	49	265	2,100	81	437	3,500
18	97	778	50	270	2,200	82	443	3,500
19	103	821	51	275	2,200	83	448	3,600
20	108	864	52	281	2,200	84	454	3,600
21	113	907	53	286	2,300	85	459	3,700
22	119	950	54	292	2,300	86	464	3,700
23	124	994	55	297	2,400	87	470	3,800
24	130	1,000	56	302	2,400	88	475	3,800
25	135	1,100	57	308	2,500	89	481	3,800
26	140	1,100	58	313	2,500	90	486	3,900
27	146	1,200	59	319	2,500	91	491	3,900
28	151	1,200	60	324	2,600	92	497	4,000
29	157	1,300	61	329	2,600	93	502	4,000
30	162	1,300	62	335	2,700	94	508	4,100
31	167	1,300	63	340	2,700	95	513	4,100
32	173	1,400	64	346	2,800	96	518	4,100

Visit bio-rad.com/foodscience for more information.

Bio-Rad is a trademark of Bio-Rad Laboratories, Inc. in certain jurisdictions. iQ-Check is a registered trademark of Bio-Rad Europe, GmbH in certain jurisdictions. All trademarks used herein are the property of their respective owner.



Bio-Rad
Laboratories, Inc.

Life Science
Group

Web site bio-rad.com USA 1 800 424 6723 Australia 61 2 9914 2800 Austria 43 01 877 89019 Belgium 32 03 710 53 00 Brazil 55 11 3065 7550
Canada 1 905 364 3435 China 86 21 6169 8500 Czech Republic 36 01 459 6192 Denmark 45 04 452 10 00 Finland 35 08 980 422 00 France 33 01 479 593 00
Germany 49 089 3189 4393 Hong Kong 852 2789 3300 Hungary 36 01 459 6190 India 91 124 4029300 Israel 972 03 953 6050 Italy 39 02 49486500
Japan 81 3 6361 7000 Korea 82 2 3473 4450 Mexico 52 555 488 7670 The Netherlands 31 0 318 540 666 New Zealand 64 9 415 2280 Norway 47 0 233 841 30
Poland 36 01 459 6191 Portugal 351 21 4727717 Russia 7 495 721 14 04 Singapore 65 6415 3188 South Africa 36 01 459 6193 Spain 34 091 49 06 580
Sweden 46 08 555 127 00 Switzerland 41 0617 17 9555 Taiwan 886 2 2578 7189 Thailand 66 2 051 8311 United Arab Emirates 971 4 8187300
United Kingdom 44 01923 47 1301

Bulletin 7117 Ver B US/EG

19-0206 0419 Sig 0119



UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE CATALUNYA
BARCELONATECH
Escola d'Enginyeria Agroalimentària
i de Biosistemes de Barcelona



ANEXO 6: Gu3a r3pida de interpretaci3n del kit foodproof® Listeria monocytogenes Detection Lyokit



foodproof®

Listeria monocytogenes Detection LyoKit Quick Guide

- 5'Nuclease -

Order no. R 602 23-1 / R 602 23-2 / R 602 23-3

Version 3, December 2019

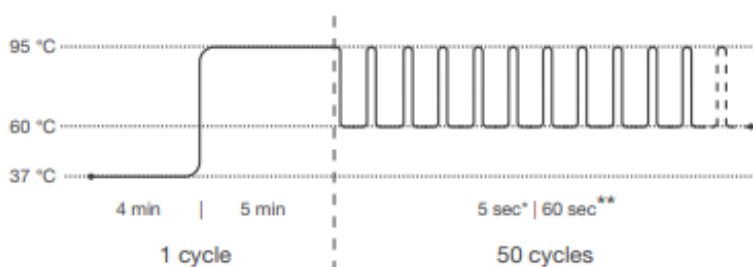
PCR kit for the qualitative detection of *L. monocytogenes* DNA using real-time PCR instruments.
Before starting, it is strongly recommended to read the entire product manual available on our website.

PROGRAM SETUP

Program your real-time PCR instrument before setting up the PCR reactions. Select the following channels:

- FAM (*L. monocytogenes*) and VIC (Internal Control).

As an alternative to VIC, HEX can be used. For the PikoReal® 24, Yakima Yellow has to be selected.



Pre-incubation: 1 cycle

Step 1: 37 °C for 4 min
Step 2: 95 °C for 5 min

Amplification: 50 cycles

Step 1 : 95 °C for 5 sec*
Step 2** : 60 °C for 60 sec

* Please use 15 seconds for the LightCycler 96

** Fluorescence detection

For some real-time PCR instruments the probe quencher as well as the usage of a passive reference dye has to be specified. This kit contains probes with a non-fluorescent "dark" quencher and no passive reference dye.

DATA INTERPRETATION

Verify results of positive (Control Template) and negative controls (H₂O), before interpreting sample results. Always compare samples to positive and negative control. Review data from each channel and interpret results as described in the table.

FAM	VIC	Result Interpretation
+	+ or -	Positive for <i>L. monocytogenes</i>
-	+	Negative for <i>L. monocytogenes</i>
-	-	Invalid

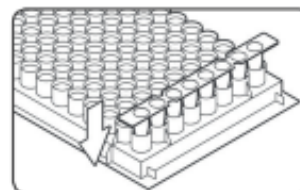
PREPARATION OF THE PCR MIX

Take appropriate precautions to prevent contamination, e.g. by using filter tips and wearing gloves.

1. PLACE STRIPS IN RACK

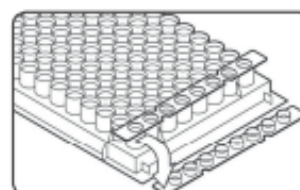
Take needed number of PCR tube strips out of aluminum bag. Important: close bag tight afterwards. Place strips in a suitable PCR tube rack.

If needed, gently tap the tubes to move the lyophilized pellets to the bottom of all tubes.



2. DECAP

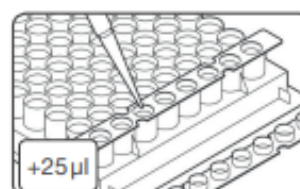
Open strips carefully direct before filling and discard caps. Do not leave open longer than necessary.



3. ADD SAMPLES AND CONTROLS

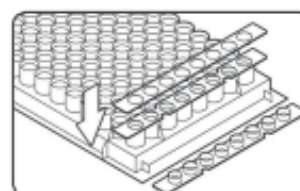
Pipet 25 μ l of samples, negative control (colorless cap) or Control Template (purple cap) into respective wells.

If using less volume, add PCR-grade H₂O to reach 25 μ l.



4. SEAL

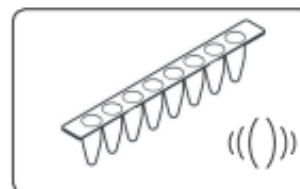
Seal the tubes with the provided 8-Cap Strips accurately.



5. MIX

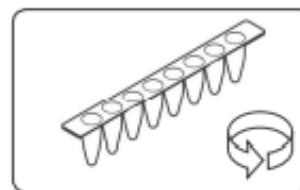
Resuspend pellet after sealing by mixing thoroughly.

Alternatively resuspend pellet by pipetting up and down multiple times in step 3.



6. CENTRIFUGE

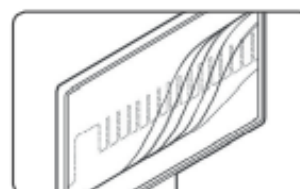
Briefly spin strips, e.g. 5 sec at 500 - 1.000 x g, in a suitable centrifuge.



7. START REAL-TIME PCR RUN

Cycle samples as described above.

Place tubes in a vertical, balanced order into the cycler, e.g. two strips can be placed in the first and last column.



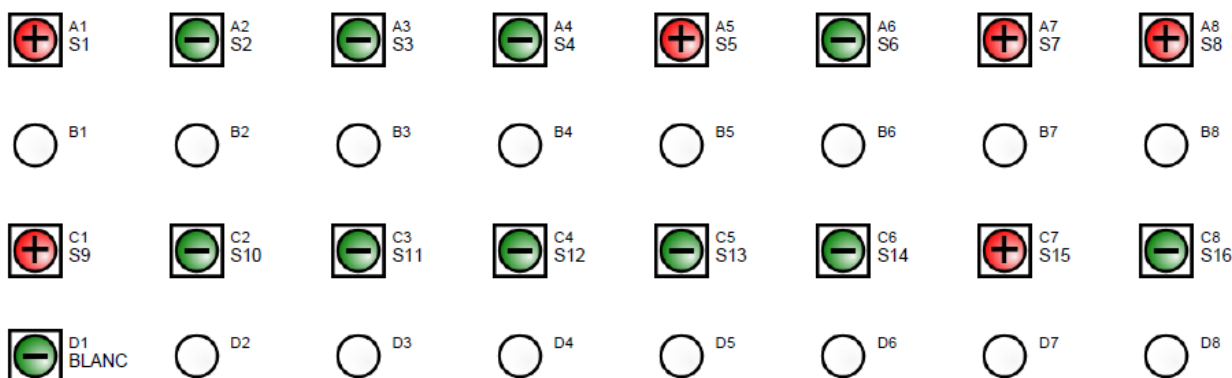
ANEXO 7: Resultados detallados del kit 357-8123

	A	B	C	D	E	F	K	R
1		Well	Content	Target	Sample	Cq	I.C. Cq	
2		A03	Unkn		S1	38,04	33,34	
3		B03	Unkn		S2	38,84	32,93	
4		C03	Unkn		S3	37,98	33,10	
5		D03	Unkn		S4	38,07	32,86	
6		E03	Unkn		S5	19,49	32,37	
7		F03	Unkn		S6	36,62	33,01	
8		G03	Unkn		S7	28,12	32,05	
9		H03	Unkn		S8	19,65	32,59	
10		A04	Unkn		S9	38,21	34,17	
11		B04	Unkn		S10	37,19	34,55	
12		C04	Unkn		S11	26,45	36,14	
13		D04	Unkn		S12	38,92	34,83	
14		E04	Unkn		S13	36,56	31,76	
15		F04	Unkn		S14	33,23	31,90	
16		G04	Unkn		S15	19,32	34,18	
17		H04	Unkn		S16	37,45	32,49	
18		A05	Unkn		Blanc	40,18	34,08	
19		B05	Pos Ctrl			31,05	32,44	
20		C05	Neg Ctrl			37,36	33,11	

ANEXO 8: Resultados detallados del KIT2025

File: TFG SALMO.bax

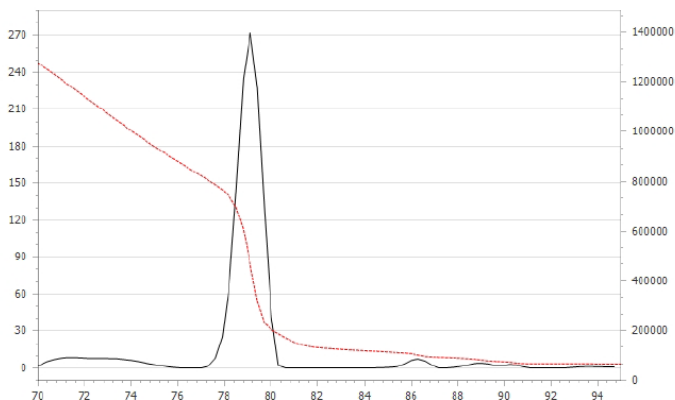
Rack Name:
Instrument: X5 (1D093-04296)
Accession: 24
Rack Status: Rack processing completed normally.
Rack Description:
Operator:
Original Data File: TFG SALMO
Time of PCR Run: 12/28/2021 17:35:53
Time of Detection: 12/28/2021 18:28:01
Time of Analysis: 12/28/2021 18:31:20, SW ver: 12/28/2021 18:31:20 b1.3.7251.0, Analysis ver: 3.6.6270



File: TFG SALMO.bax

Page 1 of 17

Rack Name:
Instrument: X5 (1D093-04296)
Accession: 24
Rack Status: Rack processing completed normally.
Rack Description:
Operator:
Original Data File: TFG SALMO
Time of PCR Run: 12/28/2021 17:35:53
Time of Detection: 12/28/2021 18:28:01
Time of Analysis: 12/28/2021 18:31:20, SW ver: 12/28/2021 18:31:20 b1.3.7251.0, Analysis ver: 3.6.6270

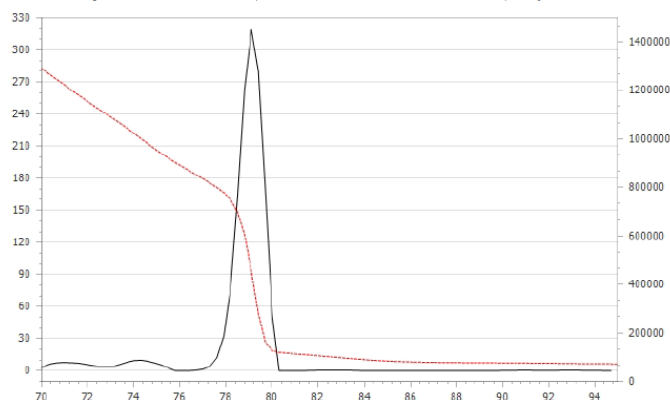


Well Number: A1
Sample ID: S1
Result: Positive
Target: Salmonella
Description:
Lot Number: 24521KA
Control Status: Positive

File: TFG SALMO.bax

Page 2 of 17

Rack Name:
Instrument: X5 (1D093-04296)
Accession: 24
Rack Status: Rack processing completed normally.
Rack Description:
Operator:
Original Data File: TFG SALMO
Time of PCR Run: 12/28/2021 17:35:53
Time of Detection: 12/28/2021 18:28:01
Time of Analysis: 12/28/2021 18:31:20, SW ver: 12/28/2021 18:31:20 b1.3.7251.0, Analysis ver: 3.6.6270



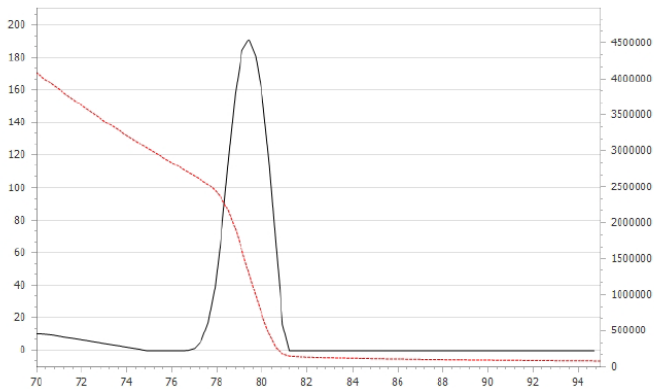
Well Number: A2
Sample ID: S2
Result: Negative
Target: Salmonella
Description:
Lot Number: 24521KA
Control Status: Positive

Verificación de los métodos para la detección de *Salmonella spp.* y *Listeria monocytogenes* mediante PCR en matrices alimentarias

File: TFG SALMO.bax

Page 3 of 17

Rack Name:
Instrument: X5 (1D093-04296)
Accession: 24
Rack Status: Rack processing completed normally.
Rack Description:
Operator:
Original Data File: TFG SALMO
Time of PCR Run: 12/28/2021 17:35:53
Time of Detection: 12/28/2021 18:28:01
Time of Analysis: 12/28/2021 18:31:20, SW ver: 12/28/2021 18:31:20 b1.3.7251.0, Analysis ver: 3.6.6270

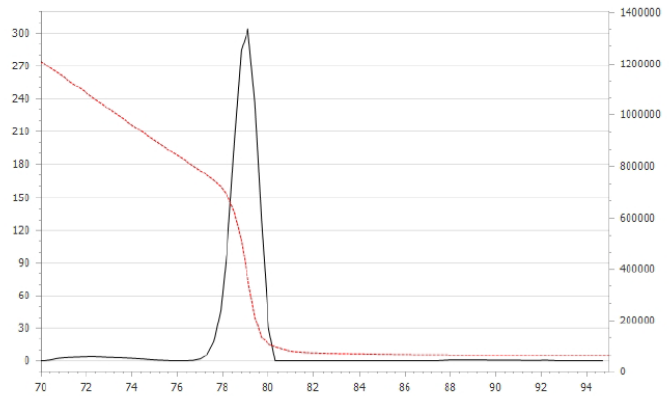


Well Number: A3
Sample ID: S3
Result: Negative
Target: Salmonella
Description:
Lot Number: 24521KA
Control Status: Positive

File: TFG SALMO.bax

Page 4 of 17

Rack Name:
Instrument: X5 (1D093-04296)
Accession: 24
Rack Status: Rack processing completed normally.
Rack Description:
Operator:
Original Data File: TFG SALMO
Time of PCR Run: 12/28/2021 17:35:53
Time of Detection: 12/28/2021 18:28:01
Time of Analysis: 12/28/2021 18:31:20, SW ver: 12/28/2021 18:31:20 b1.3.7251.0, Analysis ver: 3.6.6270

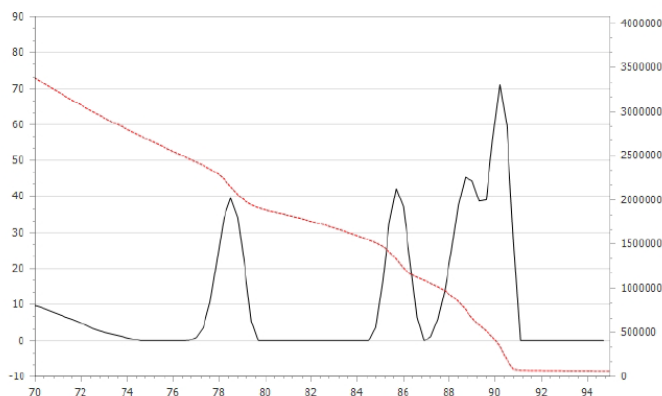


Well Number: A4
Sample ID: S4
Result: Negative
Target: Salmonella
Description:
Lot Number: 24521KA
Control Status: Positive

File: TFG SALMO.bax

Page 5 of 17

Rack Name:
Instrument: X5 (1D093-04296)
Accession: 24
Rack Status: Rack processing completed normally.
Rack Description:
Operator:
Original Data File: TFG SALMO
Time of PCR Run: 12/28/2021 17:35:53
Time of Detection: 12/28/2021 18:28:01
Time of Analysis: 12/28/2021 18:31:20, SW ver: 12/28/2021 18:31:20 b1.3.7251.0, Analysis ver: 3.6.6270

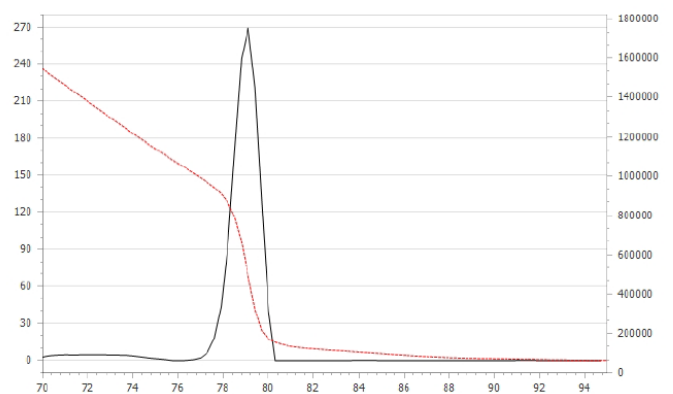


Well Number: A5
Sample ID: S5
Result: Positive
Target: Salmonella
Description:
Lot Number: 24521KA
Control Status: Positive

File: TFG SALMO.bax

Page 6 of 17

Rack Name:
Instrument: X5 (1D093-04296)
Accession: 24
Rack Status: Rack processing completed normally.
Rack Description:
Operator:
Original Data File: TFG SALMO
Time of PCR Run: 12/28/2021 17:35:53
Time of Detection: 12/28/2021 18:28:01
Time of Analysis: 12/28/2021 18:31:20, SW ver: 12/28/2021 18:31:20 b1.3.7251.0, Analysis ver: 3.6.6270



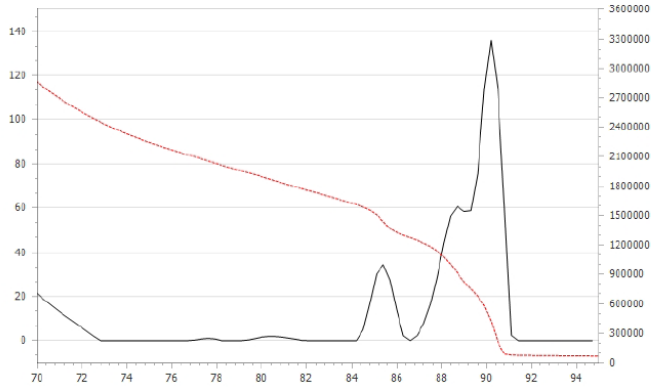
Well Number: A6
Sample ID: S6
Result: Negative
Target: Salmonella
Description:
Lot Number: 24521KA
Control Status: Positive

Verificación de los métodos para la detección de *Salmonella spp.* y *Listeria monocytogenes* mediante PCR en matrices alimentarias

File: TFG SALMO.bax

Page 7 of 17

Rack Name:
Instrument: X5 (1D093-04296)
Accession: 24
Rack Status: Rack processing completed normally.
Rack Description:
Operator:
Original Data File: TFG SALMO
Time of PCR Run: 12/28/2021 17:35:53
Time of Detection: 12/28/2021 18:28:01
Time of Analysis: 12/28/2021 18:31:20, SW ver: 12/28/2021 18:31:20 b1.3.7251.0, Analysis ver: 3.6.6270

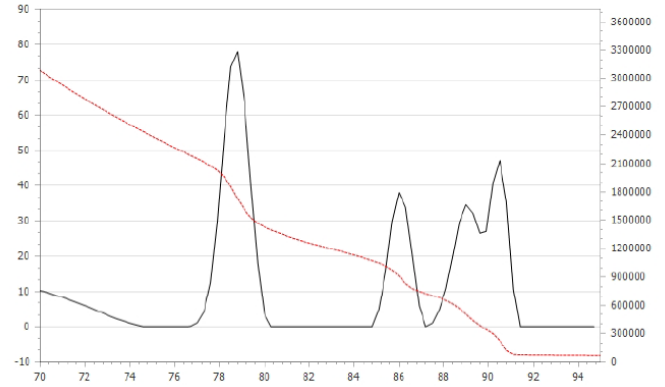


Well Number: A7
Sample ID: S7
Result: Positive
Target: Salmonella
Description:
Lot Number: 24521KA
Control Status: Negative

File: TFG SALMO.bax

Page 8 of 17

Rack Name:
Instrument: X5 (1D093-04296)
Accession: 24
Rack Status: Rack processing completed normally.
Rack Description:
Operator:
Original Data File: TFG SALMO
Time of PCR Run: 12/28/2021 17:35:53
Time of Detection: 12/28/2021 18:28:01
Time of Analysis: 12/28/2021 18:31:20, SW ver: 12/28/2021 18:31:20 b1.3.7251.0, Analysis ver: 3.6.6270

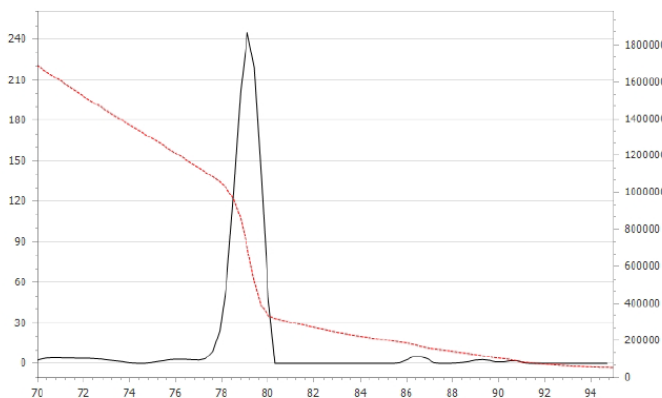


Well Number: A8
Sample ID: S8
Result: Positive
Target: Salmonella
Description:
Lot Number: 24521KA
Control Status: Positive

File: TFG SALMO.bax

Page 9 of 17

Rack Name:
Instrument: X5 (1D093-04296)
Accession: 24
Rack Status: Rack processing completed normally.
Rack Description:
Operator:
Original Data File: TFG SALMO
Time of PCR Run: 12/28/2021 17:35:53
Time of Detection: 12/28/2021 18:28:01
Time of Analysis: 12/28/2021 18:31:20, SW ver: 12/28/2021 18:31:20 b1.3.7251.0, Analysis ver: 3.6.6270

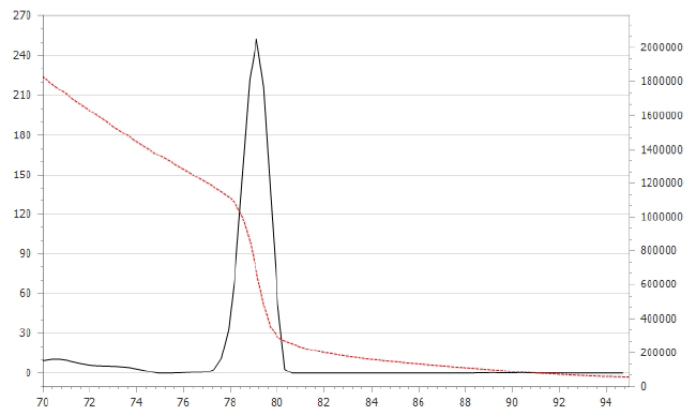


Well Number: C1
Sample ID: S9
Result: Positive
Target: Salmonella
Description:
Lot Number: 24521KA
Control Status: Positive

File: TFG SALMO.bax

Page 10 of 17

Rack Name:
Instrument: X5 (1D093-04296)
Accession: 24
Rack Status: Rack processing completed normally.
Rack Description:
Operator:
Original Data File: TFG SALMO
Time of PCR Run: 12/28/2021 17:35:53
Time of Detection: 12/28/2021 18:28:01
Time of Analysis: 12/28/2021 18:31:20, SW ver: 12/28/2021 18:31:20 b1.3.7251.0, Analysis ver: 3.6.6270



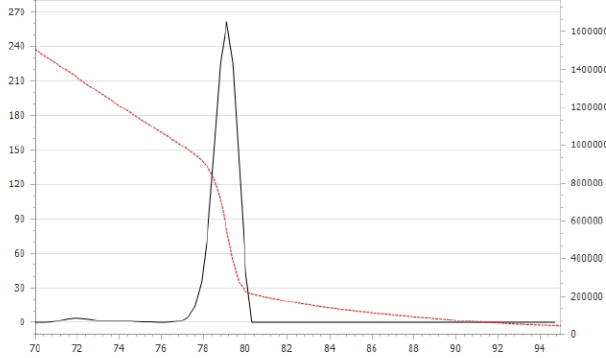
Well Number: C2
Sample ID: S10
Result: Negative
Target: Salmonella
Description:
Lot Number: 24521KA
Control Status: Positive

Verificación de los métodos para la detección de *Salmonella spp.* y *Listeria monocytogenes* mediante PCR en matrices alimentarias

File: TFG SALMO.bax

Page 11 of 17

Rack Name:
Instrument: X5 (1D093-04296)
Accession: 24
Rack Status: Rack processing completed normally.
Rack Description:
Operator:
Original Data File: TFG SALMO
Time of PCR Run: 12/28/2021 17:35:53
Time of Detection: 12/28/2021 18:28:01
Time of Analysis: 12/28/2021 18:31:20, SW ver: 12/28/2021 18:31:20 b1.3.7251.0, Analysis ver: 3.6.6270

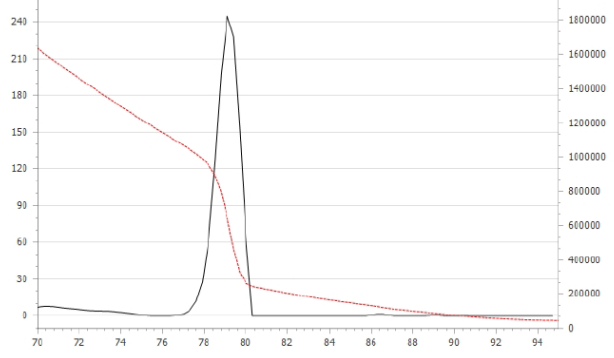


Well Number: C3
Sample ID: S11
Result: Negative
Target: Salmonella
Description:
Lot Number: 24521KA
Control Status: Positive

File: TFG SALMO.bax

Page 12 of 17

Rack Name:
Instrument: X5 (1D093-04296)
Accession: 24
Rack Status: Rack processing completed normally.
Rack Description:
Operator:
Original Data File: TFG SALMO
Time of PCR Run: 12/28/2021 17:35:53
Time of Detection: 12/28/2021 18:28:01
Time of Analysis: 12/28/2021 18:31:20, SW ver: 12/28/2021 18:31:20 b1.3.7251.0, Analysis ver: 3.6.6270

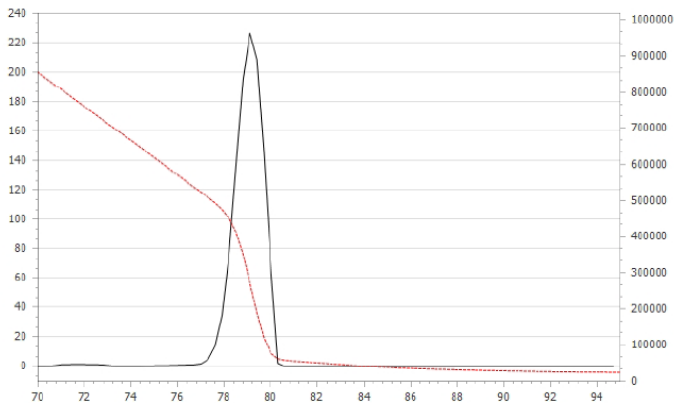


Well Number: C4
Sample ID: S12
Result: Negative
Target: Salmonella
Description:
Lot Number: 24521KA
Control Status: Positive

File: TFG SALMO.bax

Page 13 of 17

Rack Name:
Instrument: X5 (1D093-04296)
Accession: 24
Rack Status: Rack processing completed normally.
Rack Description:
Operator:
Original Data File: TFG SALMO
Time of PCR Run: 12/28/2021 17:35:53
Time of Detection: 12/28/2021 18:28:01
Time of Analysis: 12/28/2021 18:31:20, SW ver: 12/28/2021 18:31:20 b1.3.7251.0, Analysis ver: 3.6.6270

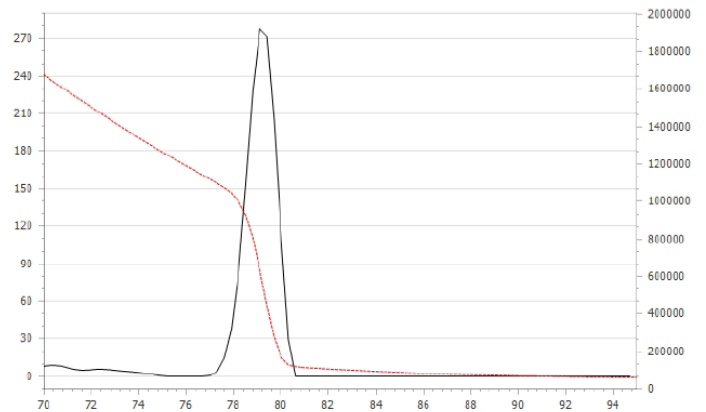


Well Number: C5
Sample ID: S13
Result: Negative
Target: Salmonella
Description:
Lot Number: 24521KA
Control Status: Positive

File: TFG SALMO.bax

Page 14 of 17

Rack Name:
Instrument: X5 (1D093-04296)
Accession: 24
Rack Status: Rack processing completed normally.
Rack Description:
Operator:
Original Data File: TFG SALMO
Time of PCR Run: 12/28/2021 17:35:53
Time of Detection: 12/28/2021 18:28:01
Time of Analysis: 12/28/2021 18:31:20, SW ver: 12/28/2021 18:31:20 b1.3.7251.0, Analysis ver: 3.6.6270



Well Number: C6
Sample ID: S14
Result: Negative
Target: Salmonella
Description:
Lot Number: 24521KA
Control Status: Positive

Verificación de los métodos para la detección de *Salmonella spp.* y *Listeria monocytogenes* mediante PCR en matrices alimentarias

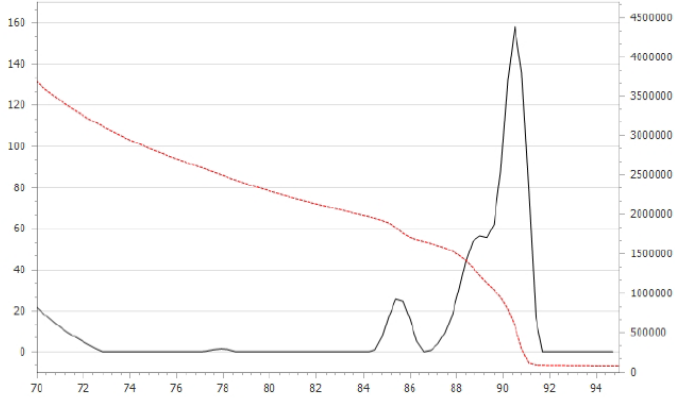
File: TFG SALMO.bax

Page 15 of 17

File: TFG SALMO.bax

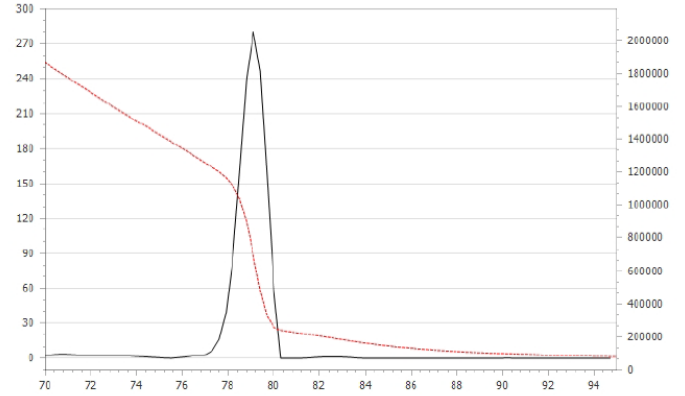
Page 16 of 17

Rack Name:
Instrument: X5 (1D093-04296)
Accession: 24
Rack Status: Rack processing completed normally.
Rack Description:
Operator:
Original Data File: TFG SALMO
Time of PCR Run: 12/28/2021 17:35:53
Time of Detection: 12/28/2021 18:28:01
Time of Analysis: 12/28/2021 18:31:20, SW ver: 12/28/2021 18:31:20 b1.3.7251.0, Analysis ver: 3.6.6270



Well Number: C7
Sample ID: S15
Result: Positive
Target: Salmonella
Description:
Lot Number: 24521KA
Control Status: Negative

Rack Name:
Instrument: X5 (1D093-04296)
Accession: 24
Rack Status: Rack processing completed normally.
Rack Description:
Operator:
Original Data File: TFG SALMO
Time of PCR Run: 12/28/2021 17:35:53
Time of Detection: 12/28/2021 18:28:01
Time of Analysis: 12/28/2021 18:31:20, SW ver: 12/28/2021 18:31:20 b1.3.7251.0, Analysis ver: 3.6.6270

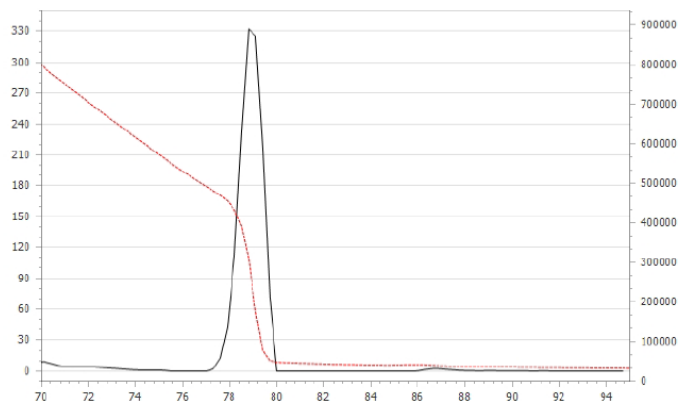


Well Number: C8
Sample ID: S16
Result: Negative
Target: Salmonella
Description:
Lot Number: 24521KA
Control Status: Positive

File: TFG SALMO.bax

Page 17 of 17

Rack Name:
Instrument: X5 (1D093-04296)
Accession: 24
Rack Status: Rack processing completed normally.
Rack Description:
Operator:
Original Data File: TFG SALMO
Time of PCR Run: 12/28/2021 17:35:53
Time of Detection: 12/28/2021 18:28:01
Time of Analysis: 12/28/2021 18:31:20, SW ver: 12/28/2021 18:31:20 b1.3.7251.0, Analysis ver: 3.6.6270



Well Number: D1
Sample ID: BLANC
Result: Negative
Target: Salmonella
Description:
Lot Number: 24521KA
Control Status: Positive

ANEXO 9: Resultados detallados del kit S 400 07

	A	B	C	D	E	F	G	H
1		Well	Fluor	Target	Content	Sample	Cq	SQ
32		A03	FAM		Unkn	S1	42,24	
33		A03	HEX		Unkn	S1	17,32	
34		B03	FAM		Unkn	S2		
35		B03	HEX		Unkn	S2	37,00	
36		C03	FAM		Unkn	S3	42,02	
37		C03	HEX		Unkn	S3	42,86	
38		D03	FAM		Unkn	S4	42,30	
39		D03	HEX		Unkn	S4	40,07	
40		E03	FAM		Unkn	S5	17,23	
41		E03	HEX		Unkn	S5		
42		F03	FAM		Unkn	S6	32,77	
43		F03	HEX		Unkn	S6	32,47	
44		G03	FAM		Unkn	S7	22,65	
45		G03	HEX		Unkn	S7	43,94	
46		H03	FAM		Unkn	S8	14,82	
47		H03	HEX		Unkn	S8	18,95	
48		A04	FAM		Unkn	S9	33,41	
49		A04	HEX		Unkn	S9	30,65	
50		B04	FAM		Unkn	S10	32,07	
51		B04	HEX		Unkn	S10	28,77	
52		C04	FAM		Unkn	S11	20,41	
53		C04	HEX		Unkn	S11		
54		D04	FAM		Unkn	S12	32,26	
55		D04	HEX		Unkn	S12	30,43	
56		E04	FAM		Unkn	S13	35,27	
57		E04	HEX		Unkn	S13	33,02	
58		F04	FAM		Unkn	S14	31,74	
59		F04	HEX		Unkn	S14	30,69	
60		G04	FAM		Unkn	S15	15,57	
61		G04	HEX		Unkn	S15		
62		H04	FAM		Unkn	S16	33,68	
63		H04	HEX		Unkn	S16	32,37	
64		A05	FAM		Unkn	BLANC	35,67	
65		A05	HEX		Unkn	BLANC	32,41	
66		B05	FAM		Pos Ctrl		46,64	
67		B05	HEX		Pos Ctrl		49,20	
68		C05	FAM		Neg Ctrl			
69		C05	HEX		Neg Ctrl			

ANEXO 10: Resultados detallados del kit 357-8124

Resultados del ensayo:

	A	B	C	D	E	H	J
1		Well	Content	Sample	Cq	I.C. Cq	
2		A01	Unkn	Huevo	N/A	49,93	
3		B01	Unkn	Huevo	N/A	35,37	
4		C01	Unkn	Huevo	23,29	37,12	
5		D01	Unkn	Huevo	24,11	37,02	
6		E01	Unkn	Huevo	N/A	36,78	
7		F01	Unkn	Huevo	N/A	34,82	
8		G01	Unkn	Huevo	20,93	34,55	
9		H01	Unkn	Huevo	22,54	35,35	
10		A02	Unkn	Huevo	N/A	37,06	
11		B02	Unkn	Huevo	43,91	36,28	
12		A03	Unkn	Salmón	43,13	34,38	
13		B03	Unkn	Salmón	41,75	34,06	
14		C03	Unkn	Salmón	31,72	34,62	
15		D03	Unkn	Salmón	37,49	34,74	
16		E03	Unkn	Salmón	42,49	35,60	
17		F03	Unkn	Salmón	39,27	33,69	
18		G03	Unkn	Salmón	38,18	32,39	
19		H03	Unkn	Salmón	N/A	42,10	
20		A04	Unkn	Salmón	32,56	36,78	
21		B04	Unkn	Salmón	41,73	37,22	
22		A05	Unkn	Queso Brie	27,33	33,72	
23		B05	Unkn	Queso Brie	N/A	N/A	
24		C05	Unkn	Queso Brie	29,27	N/A	
25		D05	Unkn	Queso Brie	N/A	N/A	
26		E05	Unkn	Queso Brie	32,39	N/A	
27		F05	Unkn	Queso Brie	N/A	N/A	
28		G05	Unkn	Queso Brie	36,88	N/A	
29		H05	Unkn	Queso Brie	38,23	N/A	
30		A06	Unkn	Queso Brie	40,11	N/A	
31		B06	Unkn	Queso Brie	N/A	N/A	
32		A07	Unkn	Lechuga	27,06	N/A	
33		B07	Unkn	Lechuga	N/A	N/A	
34		C07	Unkn	Lechuga	N/A	N/A	
35		D07	Unkn	Lechuga	N/A	N/A	
36		E07	Unkn	Lechuga	N/A	N/A	
37		F07	Unkn	Lechuga	29,94	N/A	
38		G07	Unkn	Lechuga	N/A	N/A	
39		H07	Unkn	Lechuga	23,06	N/A	
40		A08	Unkn	Lechuga	30,60	N/A	
41		B08	Unkn	Lechuga	N/A	N/A	
42		A09	Neg Ctrl		N/A	N/A	
43		B09	Pos Ctrl		49,52	N/A	

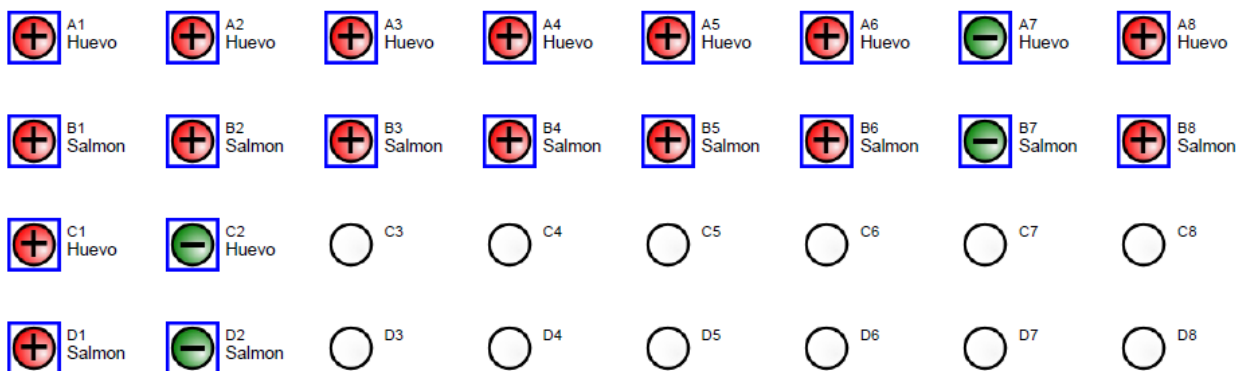
Resultados de la repetición del ensayo:

	A	B	C	D	E	F	K	T
1		Well	Content	Target	Sample	Cq	I.C. Cq	
2	A01	Unkn		L1		20,99	32,06	
3	B01	Unkn		L2		23,45	31,55	
4	C01	Unkn		L3		24,66	32,49	
5	D01	Unkn		L4		26,22	33,13	
6	E01	Unkn		L5		30,78	32,95	
7	F01	Unkn		L6		35,12	32,36	
8	G01	Unkn		L7		21,60	31,30	
9	H01	Unkn		L8		23,38	32,27	
10	A02	Unkn		L9		25,82	31,64	
11	B02	Unkn		L10		31,20	32,05	
12	C02	Unkn		L11		33,40	31,96	
13	D02	Unkn		L12		36,45	32,68	
14	E02	Unkn		Blanc		36,20	32,64	
15	F02	Pos Ctrl				31,23	31,68	
16	G02	Neg Ctrl				38,65	32,07	

ANEXO 11: Resultados detallados del KIT2023

File: TFG L.MONO HUEVO Y SALMON.bax

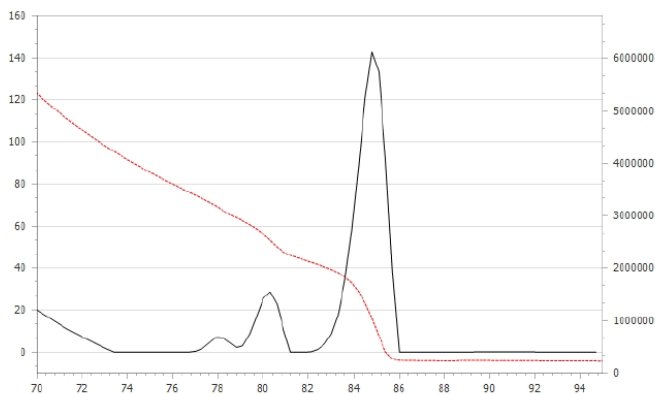
Rack Name:
Instrument: X5 (1D093-04296)
Accession: 22
Rack Status: Rack processing completed normally.
Rack Description:
Operator:
Original Data File: TFG L.MONO HUEVO Y SALMON
Time of PCR Run: 12/22/2021 18:10:57
Time of Detection: 12/22/2021 19:03:05
Time of Analysis: 12/22/2021 19:06:17, SW ver: 12/22/2021 19:06:17 b1.3.7251.0, Analysis ver: 3.6.6270



File: TFG L.MONO HUEVO Y SALMON.bax

Page 1 of 20

Rack Name:
Instrument: X5 (1D093-04296)
Accession: 22
Rack Status: Rack processing completed normally.
Rack Description:
Operator:
Original Data File: TFG L.MONO HUEVO Y SALMON
Time of PCR Run: 12/22/2021 18:10:57
Time of Detection: 12/22/2021 19:03:05
Time of Analysis: 12/22/2021 19:06:17, SW ver: 12/22/2021 19:06:17 b1.3.7251.0, Analysis ver: 3.6.6270

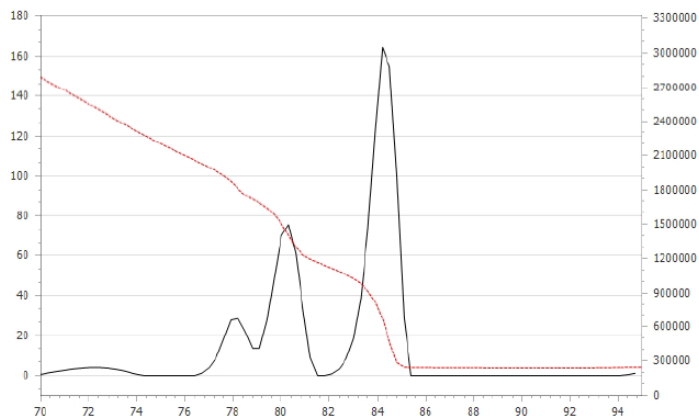


Well Number: A1
Sample ID: Huevo
Result: Positive
Target: Listeria monocytogenes
Description: 1
Lot Number: 10621KA
Control Status: Positive

File: TFG L.MONO HUEVO Y SALMON.bax

Page 2 of 20

Rack Name:
Instrument: X5 (1D093-04296)
Accession: 22
Rack Status: Rack processing completed normally.
Rack Description:
Operator:
Original Data File: TFG L.MONO HUEVO Y SALMON
Time of PCR Run: 12/22/2021 18:10:57
Time of Detection: 12/22/2021 19:03:05
Time of Analysis: 12/22/2021 19:06:17, SW ver: 12/22/2021 19:06:17 b1.3.7251.0, Analysis ver: 3.6.6270



Well Number: A2
Sample ID: Huevo
Result: Positive
Target: Listeria monocytogenes
Description: 2
Lot Number: 10621KA
Control Status: Positive

Verificación de los métodos para la detección de *Salmonella spp.* y *Listeria monocytogenes* mediante PCR en matrices alimentarias

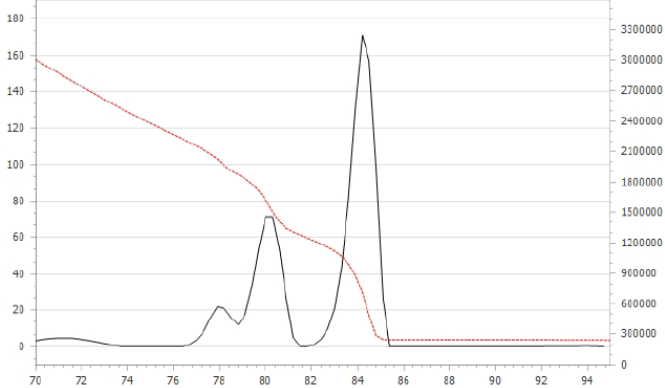
File: TFG L.MONO HUEVO Y SALMON.bax

Page 3 of 20

File: TFG L.MONO HUEVO Y SALMON.bax

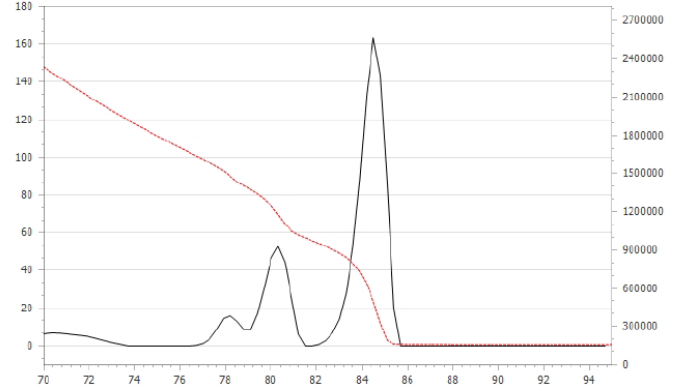
Page 4 of 20

Rack Name:
Instrument: X5 (1D093-04296)
Accession: 22
Rack Status: Rack processing completed normally.
Rack Description:
Operator:
Original Data File: TFG L.MONO HUEVO Y SALMON
Time of PCR Run: 12/22/2021 18:10:57
Time of Detection: 12/22/2021 19:03:05
Time of Analysis: 12/22/2021 19:06:17, SW ver: 12/22/2021 19:06:17 b1.3.7251.0, Analysis ver: 3.6.6270



Well Number: A3
Sample ID: Huevo
Result: Positive
Target: *Listeria monocytogenes*
Description: 3
Lot Number: 10621KA
Control Status: Positive

Rack Name:
Instrument: X5 (1D093-04296)
Accession: 22
Rack Status: Rack processing completed normally.
Rack Description:
Operator:
Original Data File: TFG L.MONO HUEVO Y SALMON
Time of PCR Run: 12/22/2021 18:10:57
Time of Detection: 12/22/2021 19:03:05
Time of Analysis: 12/22/2021 19:06:17, SW ver: 12/22/2021 19:06:17 b1.3.7251.0, Analysis ver: 3.6.6270



Well Number: A4
Sample ID: Huevo
Result: Positive
Target: *Listeria monocytogenes*
Description: 4
Lot Number: 10621KA
Control Status: Positive

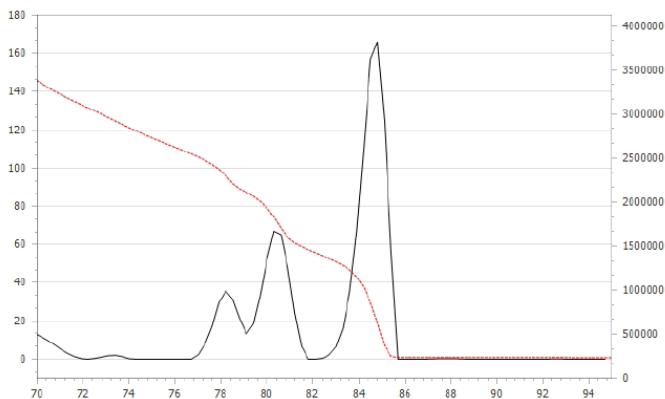
File: TFG L.MONO HUEVO Y SALMON.bax

Page 5 of 20

File: TFG L.MONO HUEVO Y SALMON.bax

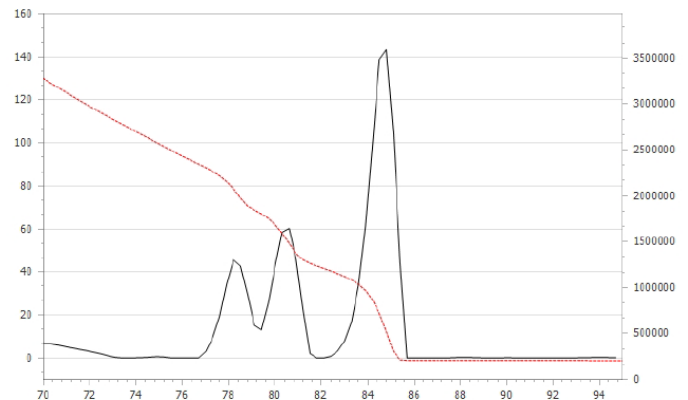
Page 6 of 20

Rack Name:
Instrument: X5 (1D093-04296)
Accession: 22
Rack Status: Rack processing completed normally.
Rack Description:
Operator:
Original Data File: TFG L.MONO HUEVO Y SALMON
Time of PCR Run: 12/22/2021 18:10:57
Time of Detection: 12/22/2021 19:03:05
Time of Analysis: 12/22/2021 19:06:17, SW ver: 12/22/2021 19:06:17 b1.3.7251.0, Analysis ver: 3.6.6270



Well Number: A5
Sample ID: Huevo
Result: Positive
Target: *Listeria monocytogenes*
Description: 5
Lot Number: 10621KA
Control Status: Positive

Rack Name:
Instrument: X5 (1D093-04296)
Accession: 22
Rack Status: Rack processing completed normally.
Rack Description:
Operator:
Original Data File: TFG L.MONO HUEVO Y SALMON
Time of PCR Run: 12/22/2021 18:10:57
Time of Detection: 12/22/2021 19:03:05
Time of Analysis: 12/22/2021 19:06:17, SW ver: 12/22/2021 19:06:17 b1.3.7251.0, Analysis ver: 3.6.6270



Well Number: A6
Sample ID: Huevo
Result: Positive
Target: *Listeria monocytogenes*
Description: 6
Lot Number: 10621KA
Control Status: Positive

Verificación de los métodos para la detección de *Salmonella spp.* y *Listeria monocytogenes* mediante PCR en matrices alimentarias

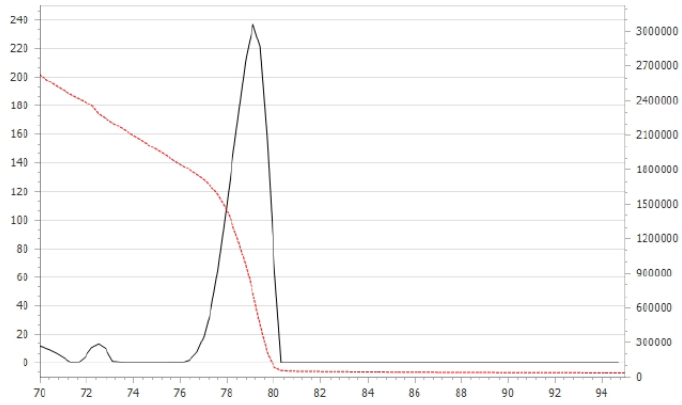
File: TFG LMONO HUEVO Y SALMON.bax

Page 7 of 20

File: TFG LMONO HUEVO Y SALMON.bax

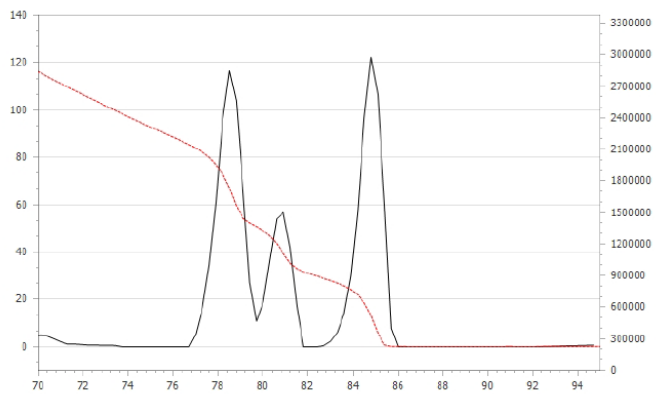
Page 8 of 20

Rack Name:
Instrument: X5 (1D093-04296)
Accession: 22
Rack Status: Rack processing completed normally.
Rack Description:
Operator:
Original Data File: TFG LMONO HUEVO Y SALMON
Time of PCR Run: 12/22/2021 18:10:57
Time of Detection: 12/22/2021 19:03:05
Time of Analysis: 12/22/2021 19:06:17, SW ver: 12/22/2021 19:06:17 b1.3.7251.0, Analysis ver: 3.6.6270



Well Number: A7
Sample ID: Huevo
Result: Negative
Target: Listeria monocytogenes
Description: 7
Lot Number: 10621KA
Control Status: Positive

Rack Name:
Instrument: X5 (1D093-04296)
Accession: 22
Rack Status: Rack processing completed normally.
Rack Description:
Operator:
Original Data File: TFG LMONO HUEVO Y SALMON
Time of PCR Run: 12/22/2021 18:10:57
Time of Detection: 12/22/2021 19:03:05
Time of Analysis: 12/22/2021 19:06:17, SW ver: 12/22/2021 19:06:17 b1.3.7251.0, Analysis ver: 3.6.6270



Well Number: A8
Sample ID: Huevo
Result: Positive
Target: Listeria monocytogenes
Description: 8
Lot Number: 10621KA
Control Status: Positive

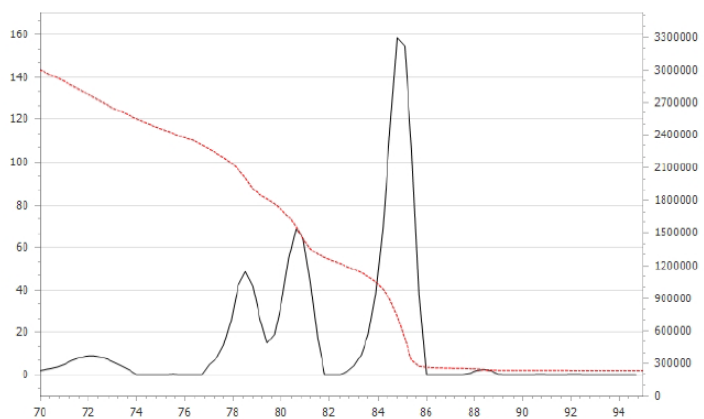
File: TFG LMONO HUEVO Y SALMON.bax

Page 9 of 20

File: TFG LMONO HUEVO Y SALMON.bax

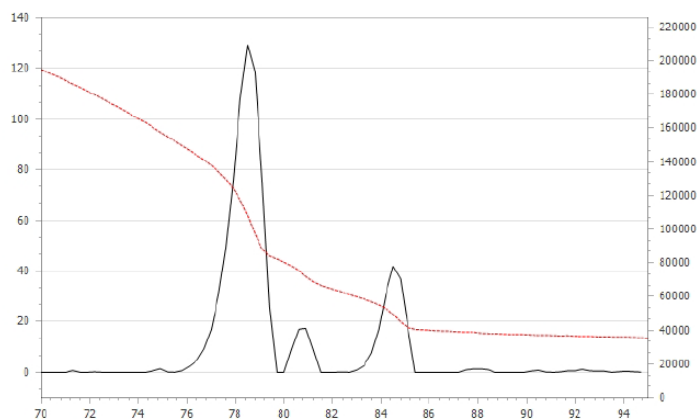
Page 10 of 20

Rack Name:
Instrument: X5 (1D093-04296)
Accession: 22
Rack Status: Rack processing completed normally.
Rack Description:
Operator:
Original Data File: TFG LMONO HUEVO Y SALMON
Time of PCR Run: 12/22/2021 18:10:57
Time of Detection: 12/22/2021 19:03:05
Time of Analysis: 12/22/2021 19:06:17, SW ver: 12/22/2021 19:06:17 b1.3.7251.0, Analysis ver: 3.6.6270



Well Number: B1
Sample ID: Salmon
Result: Positive
Target: Listeria monocytogenes
Description: 11
Lot Number: 10621KA
Control Status: Positive

Rack Name:
Instrument: X5 (1D093-04296)
Accession: 22
Rack Status: Rack processing completed normally.
Rack Description:
Operator:
Original Data File: TFG LMONO HUEVO Y SALMON
Time of PCR Run: 12/22/2021 18:10:57
Time of Detection: 12/22/2021 19:03:05
Time of Analysis: 12/22/2021 19:06:17, SW ver: 12/22/2021 19:06:17 b1.3.7251.0, Analysis ver: 3.6.6270



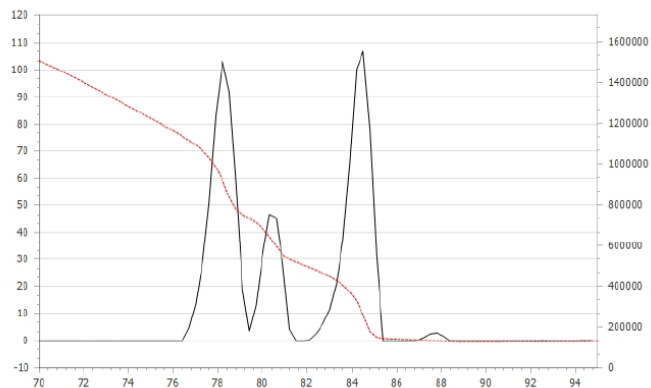
Well Number: B2
Sample ID: Salmon
Result: Positive
Target: Listeria monocytogenes
Description: 12
Lot Number: 10621KA
Control Status: Positive

Verificación de los métodos para la detección de *Salmonella spp.* y *Listeria monocytogenes* mediante PCR en matrices alimentarias

File: TFG L.MONO HUEVO Y SALMON.bax

Page 11 of 20

Rack Name:
Instrument: X5 (1D093-04296)
Accession: 22
Rack Status: Rack processing completed normally.
Rack Description:
Operator:
Original Data File: TFG L.MONO HUEVO Y SALMON
Time of PCR Run: 12/22/2021 18:10:57
Time of Detection: 12/22/2021 19:03:05
Time of Analysis: 12/22/2021 19:06:17, SW ver: 12/22/2021 19:06:17 b1.3.7251.0, Analysis ver: 3.6.6270

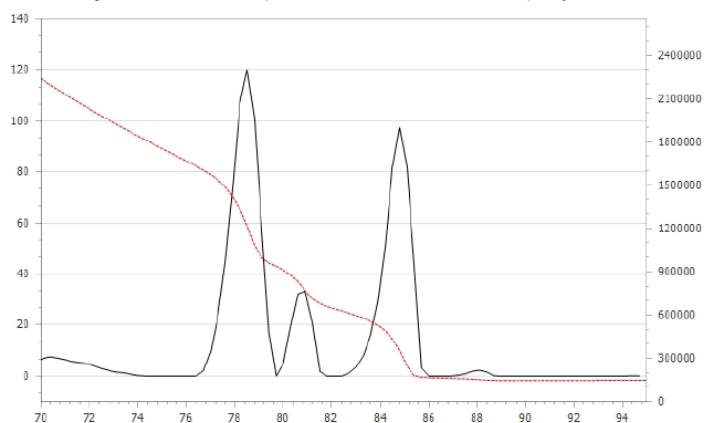


Well Number: B3
Sample ID: Salmon
Result: Positive
Target: *Listeria monocytogenes*
Description: 13
Lot Number: 10621KA
Control Status: Positive

File: TFG L.MONO HUEVO Y SALMON.bax

Page 13 of 20

Rack Name:
Instrument: X5 (1D093-04296)
Accession: 22
Rack Status: Rack processing completed normally.
Rack Description:
Operator:
Original Data File: TFG L.MONO HUEVO Y SALMON
Time of PCR Run: 12/22/2021 18:10:57
Time of Detection: 12/22/2021 19:03:05
Time of Analysis: 12/22/2021 19:06:17, SW ver: 12/22/2021 19:06:17 b1.3.7251.0, Analysis ver: 3.6.6270

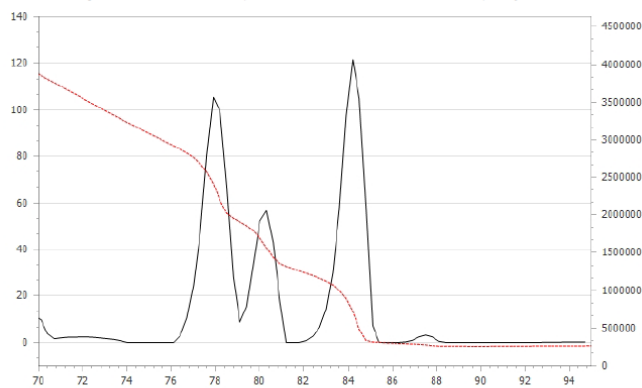


Well Number: B5
Sample ID: Salmon
Result: Positive
Target: *Listeria monocytogenes*
Description: 15
Lot Number: 10621KA
Control Status: Positive

File: TFG L.MONO HUEVO Y SALMON.bax

Page 12 of 20

Rack Name:
Instrument: X5 (1D093-04296)
Accession: 22
Rack Status: Rack processing completed normally.
Rack Description:
Operator:
Original Data File: TFG L.MONO HUEVO Y SALMON
Time of PCR Run: 12/22/2021 18:10:57
Time of Detection: 12/22/2021 19:03:05
Time of Analysis: 12/22/2021 19:06:17, SW ver: 12/22/2021 19:06:17 b1.3.7251.0, Analysis ver: 3.6.6270

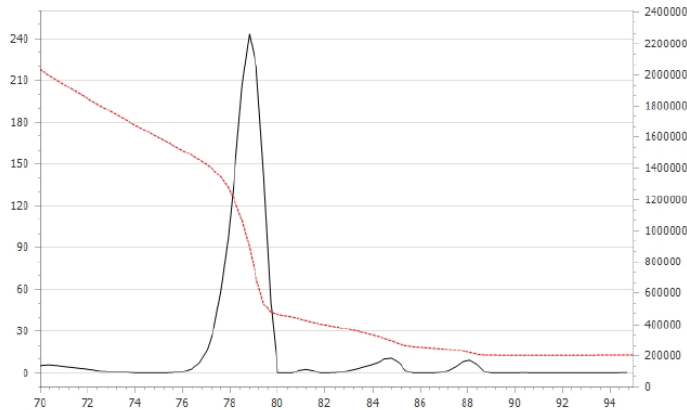


Well Number: B4
Sample ID: Salmon
Result: Positive
Target: *Listeria monocytogenes*
Description: 14
Lot Number: 10621KA
Control Status: Positive

File: TFG L.MONO HUEVO Y SALMON.bax

Page 14 of 20

Rack Name:
Instrument: X5 (1D093-04296)
Accession: 22
Rack Status: Rack processing completed normally.
Rack Description:
Operator:
Original Data File: TFG L.MONO HUEVO Y SALMON
Time of PCR Run: 12/22/2021 18:10:57
Time of Detection: 12/22/2021 19:03:05
Time of Analysis: 12/22/2021 19:06:17, SW ver: 12/22/2021 19:06:17 b1.3.7251.0, Analysis ver: 3.6.6270



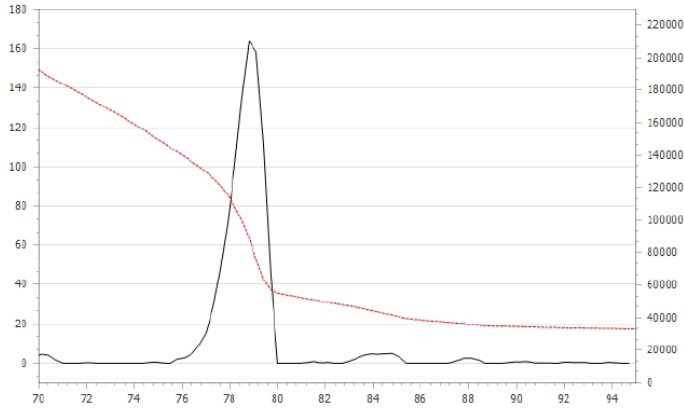
Well Number: B6
Sample ID: Salmon
Result: Positive
Target: *Listeria monocytogenes*
Description: 16
Lot Number: 10621KA
Control Status: Positive

Verificación de los métodos para la detección de *Salmonella spp.* y *Listeria monocytogenes* mediante PCR en matrices alimentarias

File: TFG L MONO HUEVO Y SALMON.bax

Page 15 of 20

Rack Name:
Instrument: X5 (1D093-04296)
Accession: 22
Rack Status: Rack processing completed normally.
Rack Description:
Operator:
Original Data File: TFG L MONO HUEVO Y SALMON
Time of PCR Run: 12/22/2021 18:10:57
Time of Detection: 12/22/2021 19:03:05
Time of Analysis: 12/22/2021 19:06:17, SW ver: 12/22/2021 19:06:17 b1.3.7251.0, Analysis ver: 3.6.6270

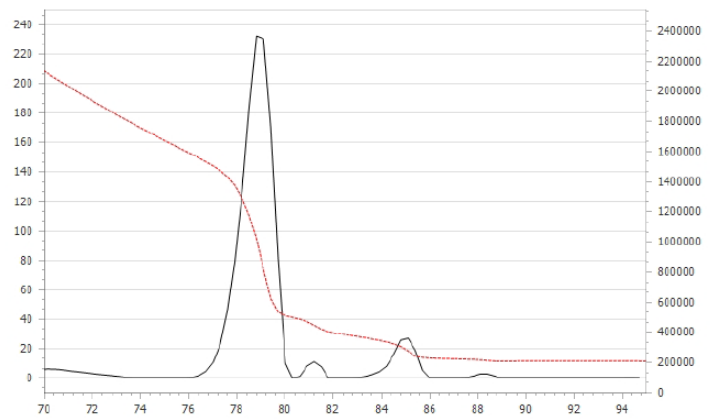


Well Number: B7
Sample ID: Salmon
Result: Negative
Target: Listeria monocytogenes
Description: 17
Lot Number: 10621KA
Control Status: Positive

File: TFG L MONO HUEVO Y SALMON.bax

Page 16 of 20

Rack Name:
Instrument: X5 (1D093-04296)
Accession: 22
Rack Status: Rack processing completed normally.
Rack Description:
Operator:
Original Data File: TFG L MONO HUEVO Y SALMON
Time of PCR Run: 12/22/2021 18:10:57
Time of Detection: 12/22/2021 19:03:05
Time of Analysis: 12/22/2021 19:06:17, SW ver: 12/22/2021 19:06:17 b1.3.7251.0, Analysis ver: 3.6.6270

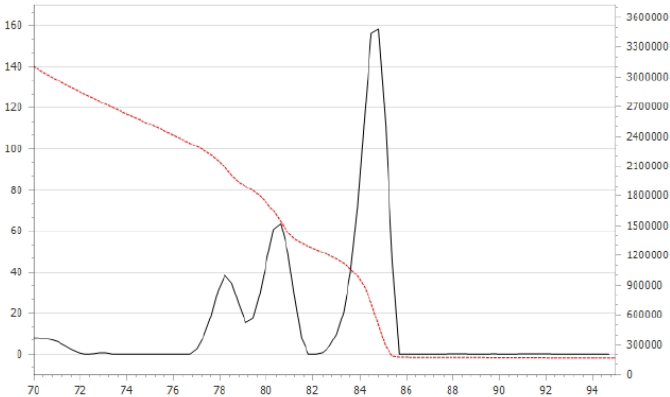


Well Number: B8
Sample ID: Salmon
Result: Positive
Target: Listeria monocytogenes
Description: 18
Lot Number: 10621KA
Control Status: Positive

File: TFG L MONO HUEVO Y SALMON.bax

Page 17 of 20

Rack Name:
Instrument: X5 (1D093-04296)
Accession: 22
Rack Status: Rack processing completed normally.
Rack Description:
Operator:
Original Data File: TFG L MONO HUEVO Y SALMON
Time of PCR Run: 12/22/2021 18:10:57
Time of Detection: 12/22/2021 19:03:05
Time of Analysis: 12/22/2021 19:06:17, SW ver: 12/22/2021 19:06:17 b1.3.7251.0, Analysis ver: 3.6.6270

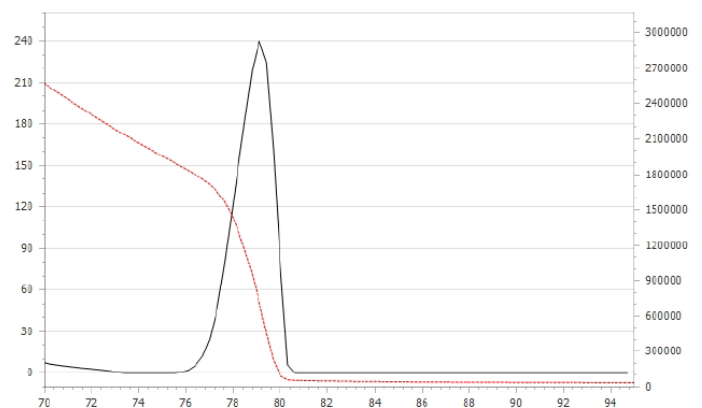


Well Number: C1
Sample ID: Huevo
Result: Positive
Target: Listeria monocytogenes
Description: 9
Lot Number: 10621KA
Control Status: Positive

File: TFG L MONO HUEVO Y SALMON.bax

Page 18 of 20

Rack Name:
Instrument: X5 (1D093-04296)
Accession: 22
Rack Status: Rack processing completed normally.
Rack Description:
Operator:
Original Data File: TFG L MONO HUEVO Y SALMON
Time of PCR Run: 12/22/2021 18:10:57
Time of Detection: 12/22/2021 19:03:05
Time of Analysis: 12/22/2021 19:06:17, SW ver: 12/22/2021 19:06:17 b1.3.7251.0, Analysis ver: 3.6.6270



Well Number: C2
Sample ID: Huevo
Result: Negative
Target: Listeria monocytogenes
Description: 10
Lot Number: 10621KA
Control Status: Positive

Verificación de los métodos para la detección de *Salmonella spp.* y *Listeria monocytogenes* mediante PCR en matrices alimentarias

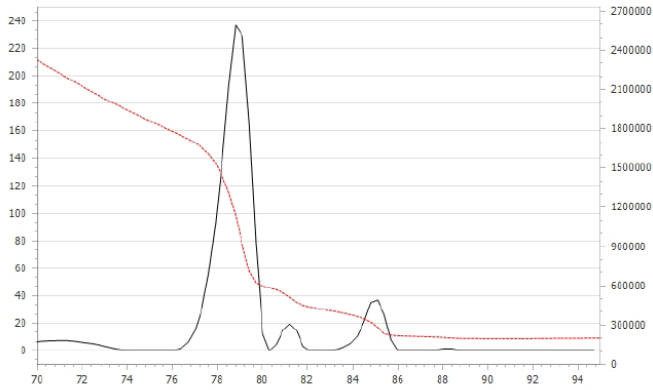
File: TFG L.MONO HUEVO Y SALMON.bax

Page 19 of 20

File: TFG L.MONO HUEVO Y SALMON.bax

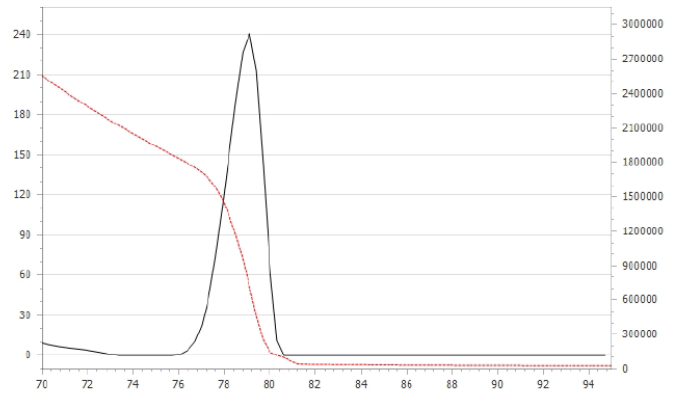
Page 20 of 20

Rack Name:
Instrument: X5 (1D093-04296)
Accession: 22
Rack Status: Rack processing completed normally.
Rack Description:
Operator:
Original Data File: TFG L.MONO HUEVO Y SALMON
Time of PCR Run: 12/22/2021 18:10:57
Time of Detection: 12/22/2021 19:03:05
Time of Analysis: 12/22/2021 19:06:17, SW ver: 12/22/2021 19:06:17 b1.3.7251.0, Analysis ver: 3.6.6270



Well Number: D1
Sample ID: Salmon
Result: Positive
Target: Listeria monocytogenes
Description: 19
Lot Number: 10621KA
Control Status: Positive

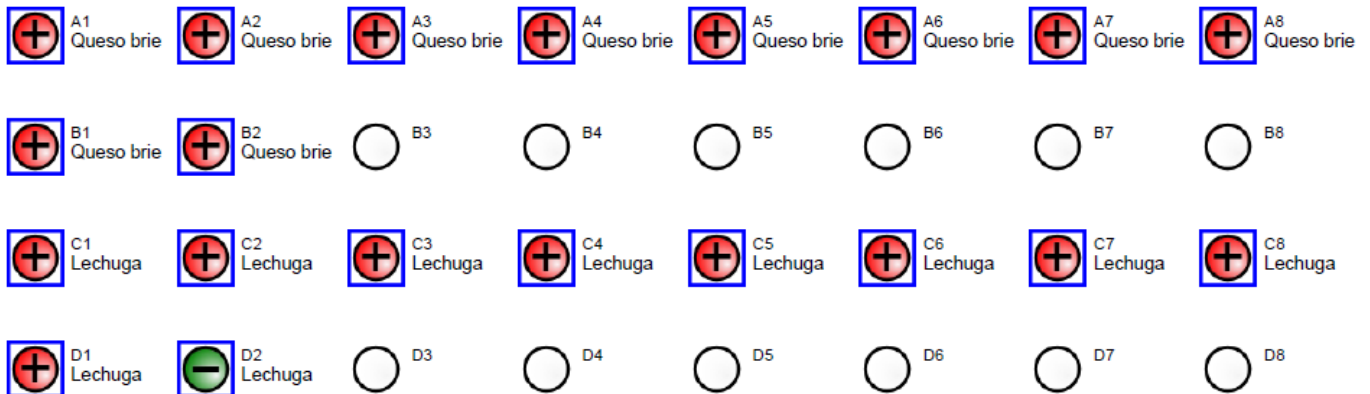
Rack Name:
Instrument: X5 (1D093-04296)
Accession: 22
Rack Status: Rack processing completed normally.
Rack Description:
Operator:
Original Data File: TFG L.MONO HUEVO Y SALMON
Time of PCR Run: 12/22/2021 18:10:57
Time of Detection: 12/22/2021 19:03:05
Time of Analysis: 12/22/2021 19:06:17, SW ver: 12/22/2021 19:06:17 b1.3.7251.0, Analysis ver: 3.6.6270



Well Number: D2
Sample ID: Salmon
Result: Negative
Target: Listeria monocytogenes
Description: 20
Lot Number: 10621KA
Control Status: Positive

File: TFG L.MONO QUESO Y LECHUGA.bax

Rack Name:
Instrument: X5 (1D093-04296)
Accession: 23
Rack Status: Rack processing completed normally.
Rack Description:
Operator:
Original Data File: TFG L.MONO QUESO Y LECHUGA
Time of PCR Run: 12/22/2021 22:35:31
Time of Detection: 12/22/2021 23:27:39
Time of Analysis: 12/22/2021 23:30:22, SW ver: 12/22/2021 23:30:22 b1.3.7251.0, Analysis ver: 3.6.6270

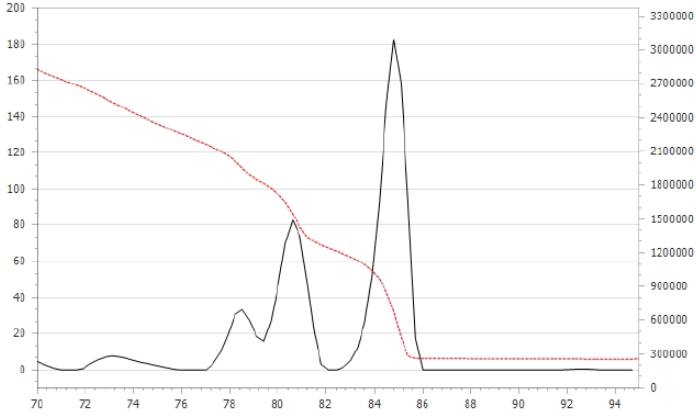


Verificación de los métodos para la detección de *Salmonella spp.* y *Listeria monocytogenes* mediante PCR en matrices alimentarias

File: TFG LMONO QUESO Y LECHUGA.bax

Page 1 of 20

Rack Name:
Instrument: X5 (1D093-04296)
Accession: 23
Rack Status: Rack processing completed normally.
Rack Description:
Operator:
Original Data File: TFG LMONO QUESO Y LECHUGA
Time of PCR Run: 12/22/2021 22:35:31
Time of Detection: 12/22/2021 23:27:39
Time of Analysis: 12/22/2021 23:30:22, SW ver: 12/22/2021 23:30:22 b1.3.7251.0, Analysis ver: 3.6.6270

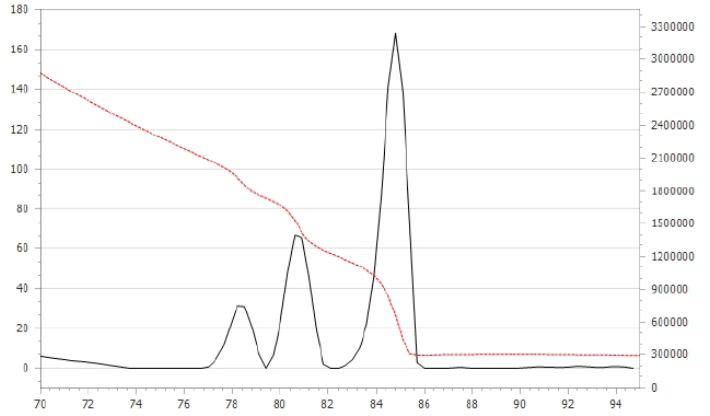


Well Number: A1
Sample ID: Queso brie
Result: Positive
Target: *Listeria monocytogenes*
Description: 19
Lot Number: 10621KA
Control Status: Positive

File: TFG LMONO QUESO Y LECHUGA.bax

Page 2 of 20

Rack Name:
Instrument: X5 (1D093-04296)
Accession: 23
Rack Status: Rack processing completed normally.
Rack Description:
Operator:
Original Data File: TFG LMONO QUESO Y LECHUGA
Time of PCR Run: 12/22/2021 22:35:31
Time of Detection: 12/22/2021 23:27:39
Time of Analysis: 12/22/2021 23:30:22, SW ver: 12/22/2021 23:30:22 b1.3.7251.0, Analysis ver: 3.6.6270

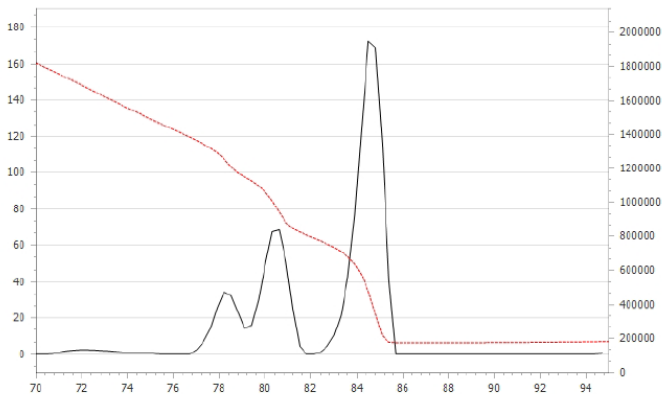


Well Number: A2
Sample ID: Queso brie
Result: Positive
Target: *Listeria monocytogenes*
Description: 20
Lot Number: 10621KA
Control Status: Positive

File: TFG LMONO QUESO Y LECHUGA.bax

Page 3 of 20

Rack Name:
Instrument: X5 (1D093-04296)
Accession: 23
Rack Status: Rack processing completed normally.
Rack Description:
Operator:
Original Data File: TFG LMONO QUESO Y LECHUGA
Time of PCR Run: 12/22/2021 22:35:31
Time of Detection: 12/22/2021 23:27:39
Time of Analysis: 12/22/2021 23:30:22, SW ver: 12/22/2021 23:30:22 b1.3.7251.0, Analysis ver: 3.6.6270

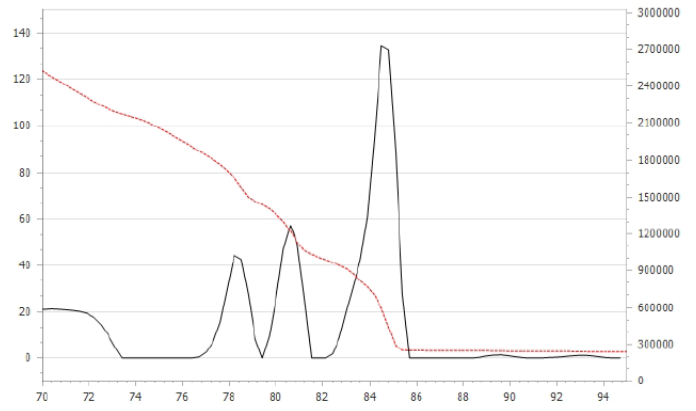


Well Number: A3
Sample ID: Queso brie
Result: Positive
Target: *Listeria monocytogenes*
Description: 21
Lot Number: 10621KA
Control Status: Positive

File: TFG LMONO QUESO Y LECHUGA.bax

Page 4 of 20

Rack Name:
Instrument: X5 (1D093-04296)
Accession: 23
Rack Status: Rack processing completed normally.
Rack Description:
Operator:
Original Data File: TFG LMONO QUESO Y LECHUGA
Time of PCR Run: 12/22/2021 22:35:31
Time of Detection: 12/22/2021 23:27:39
Time of Analysis: 12/22/2021 23:30:22, SW ver: 12/22/2021 23:30:22 b1.3.7251.0, Analysis ver: 3.6.6270



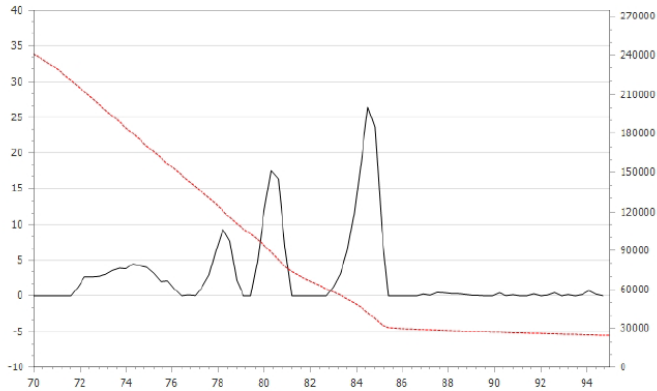
Well Number: A4
Sample ID: Queso brie
Result: Positive
Target: *Listeria monocytogenes*
Description: 22
Lot Number: 10621KA
Control Status: Positive

Verificación de los métodos para la detección de *Salmonella spp.* y *Listeria monocytogenes* mediante PCR en matrices alimentarias

File: TFG L MONO QUESO Y LECHUGA.bax

Page 5 of 20

Rack Name:
Instrument: X5 (1D093-04296)
Accession: 23
Rack Status: Rack processing completed normally.
Rack Description:
Operator:
Original Data File: TFG L MONO QUESO Y LECHUGA
Time of PCR Run: 12/22/2021 22:35:31
Time of Detection: 12/22/2021 23:27:39
Time of Analysis: 12/22/2021 23:30:22, SW ver: 12/22/2021 23:30:22 b1.3.7251.0, Analysis ver: 3.6.6270

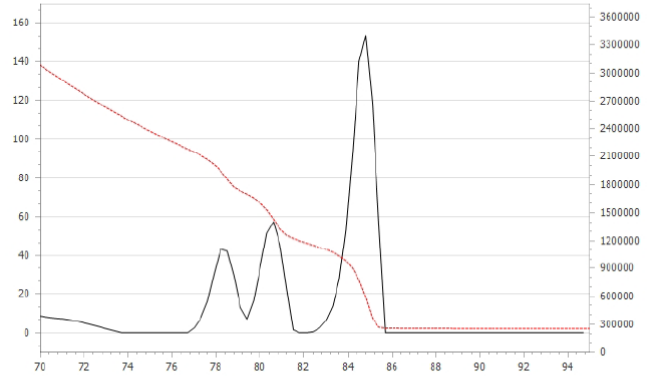


Well Number: A5
Sample ID: Queso brie
Result: Positive
Target: Listeria monocytogenes
Description: 23
Lot Number: 10621KA
Control Status: Positive

File: TFG L MONO QUESO Y LECHUGA.bax

Page 6 of 20

Rack Name:
Instrument: X5 (1D093-04296)
Accession: 23
Rack Status: Rack processing completed normally.
Rack Description:
Operator:
Original Data File: TFG L MONO QUESO Y LECHUGA
Time of PCR Run: 12/22/2021 22:35:31
Time of Detection: 12/22/2021 23:27:39
Time of Analysis: 12/22/2021 23:30:22, SW ver: 12/22/2021 23:30:22 b1.3.7251.0, Analysis ver: 3.6.6270

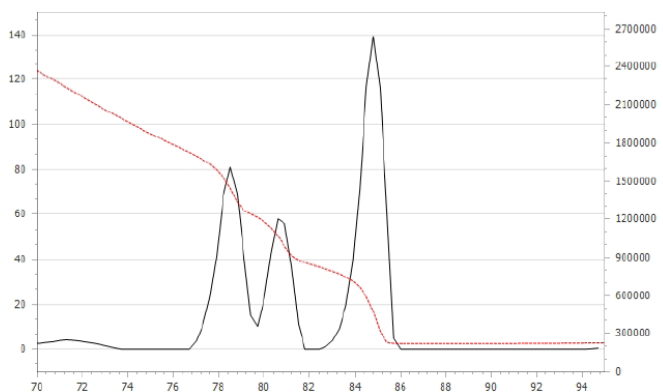


Well Number: A6
Sample ID: Queso brie
Result: Positive
Target: Listeria monocytogenes
Description: 24
Lot Number: 10621KA
Control Status: Positive

File: TFG L MONO QUESO Y LECHUGA.bax

Page 7 of 20

Rack Name:
Instrument: X5 (1D093-04296)
Accession: 23
Rack Status: Rack processing completed normally.
Rack Description:
Operator:
Original Data File: TFG L MONO QUESO Y LECHUGA
Time of PCR Run: 12/22/2021 22:35:31
Time of Detection: 12/22/2021 23:27:39
Time of Analysis: 12/22/2021 23:30:22, SW ver: 12/22/2021 23:30:22 b1.3.7251.0, Analysis ver: 3.6.6270

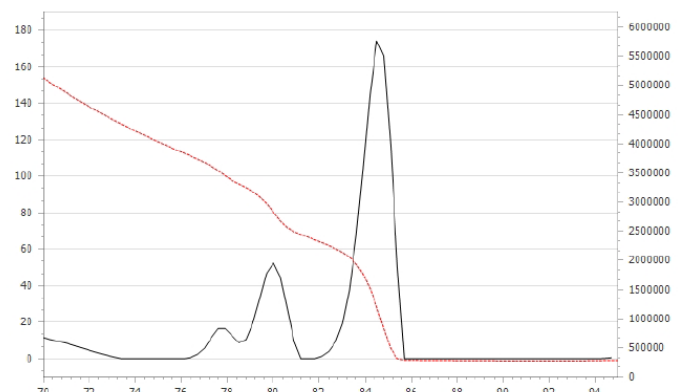


Well Number: A7
Sample ID: Queso brie
Result: Positive
Target: Listeria monocytogenes
Description: 25
Lot Number: 10621KA
Control Status: Positive

File: TFG L MONO QUESO Y LECHUGA.bax

Page 8 of 20

Rack Name:
Instrument: X5 (1D093-04296)
Accession: 23
Rack Status: Rack processing completed normally.
Rack Description:
Operator:
Original Data File: TFG L MONO QUESO Y LECHUGA
Time of PCR Run: 12/22/2021 22:35:31
Time of Detection: 12/22/2021 23:27:39
Time of Analysis: 12/22/2021 23:30:22, SW ver: 12/22/2021 23:30:22 b1.3.7251.0, Analysis ver: 3.6.6270



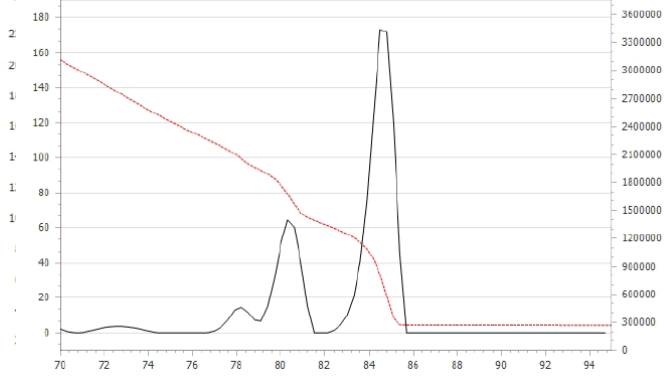
Well Number: A8
Sample ID: Queso brie
Result: Positive
Target: Listeria monocytogenes
Description: 26
Lot Number: 10621KA
Control Status: Positive

Verificación de los métodos para la detección de *Salmonella spp.* y *Listeria monocytogenes* mediante PCR en matrices alimentarias

File: TFG L MONO QUESO Y LECHUGA.bax

Page 13 of 20

Rack Name:
Instrument: X5 (1D093-04296)
Accession: 23
Rack Status: Rack processing completed normally.
Rack Description:
Operator:
Original Data File: TFG L MONO QUESO Y LECHUGA
Time of PCR Run: 12/22/2021 22:35:31
Time of Detection: 12/22/2021 23:27:39
Time of Analysis: 12/22/2021 23:30:22, SW ver: 12/22/2021 23:30:22 b1.3.7251.0, Analysis ver: 3.6.6270

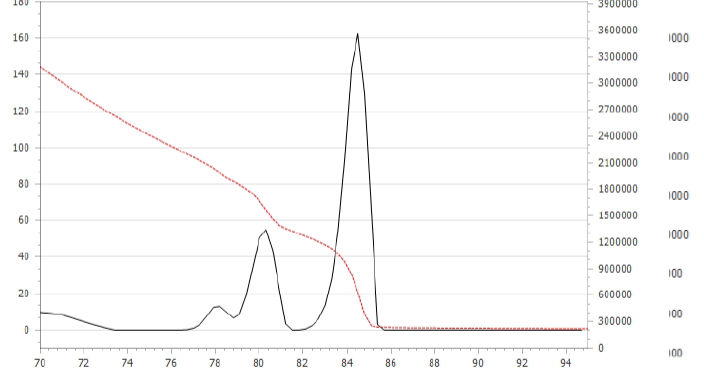


Well Number: C3
Sample ID: Lechuga
Result: Positive
Target: *Listeria monocytogenes*
Description: 30
Lot Number: 10621KA
Control Status: Positive
Lot Number: 10621KA
Control Status: Positive

File: TFG L MONO QUESO Y LECHUGA.bax

Page 14 of 20

Rack Name:
Instrument: X5 (1D093-04296)
Accession: 23
Rack Status: Rack processing completed normally.
Rack Description:
Operator:
Original Data File: TFG L MONO QUESO Y LECHUGA
Time of PCR Run: 12/22/2021 22:35:31
Time of Detection: 12/22/2021 23:27:39
Time of Analysis: 12/22/2021 23:30:22, SW ver: 12/22/2021 23:30:22 b1.3.7251.0, Analysis ver: 3.6.6270

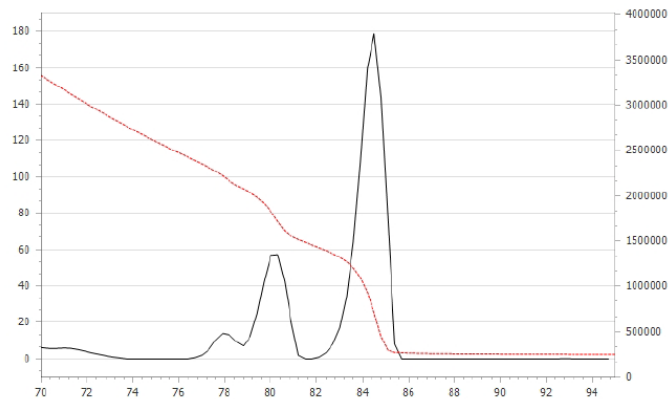


Well Number: C4
Sample ID: Lechuga
Result: Positive
Target: *Listeria monocytogenes*
Description: 31
Lot Number: 10621KA
Control Status: Positive
Lot Number: 10621KA
Control Status: Positive

File: TFG L MONO QUESO Y LECHUGA.bax

Page 15 of 20

Rack Name:
Instrument: X5 (1D093-04296)
Accession: 23
Rack Status: Rack processing completed normally.
Rack Description:
Operator:
Original Data File: TFG L MONO QUESO Y LECHUGA
Time of PCR Run: 12/22/2021 22:35:31
Time of Detection: 12/22/2021 23:27:39
Time of Analysis: 12/22/2021 23:30:22, SW ver: 12/22/2021 23:30:22 b1.3.7251.0, Analysis ver: 3.6.6270

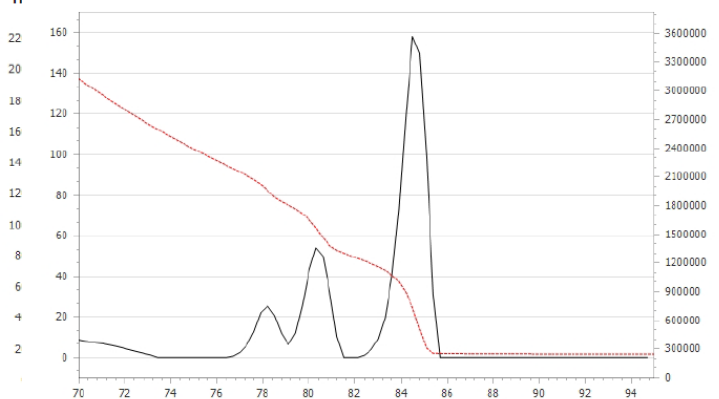


Well Number: C5
Sample ID: Lechuga
Result: Positive
Target: *Listeria monocytogenes*
Description: 32
Lot Number: 10621KA
Control Status: Positive
Control Status: Positive

File: TFG L MONO QUESO Y LECHUGA.bax

Page 16 of 20

Rack Name:
Instrument: X5 (1D093-04296)
Accession: 23
Rack Status: Rack processing completed normally.
Rack Description:
Operator:
Original Data File: TFG L MONO QUESO Y LECHUGA
Time of PCR Run: 12/22/2021 22:35:31
Time of Detection: 12/22/2021 23:27:39
Time of Analysis: 12/22/2021 23:30:22, SW ver: 12/22/2021 23:30:22 b1.3.7251.0, Analysis ver: 3.6.6270



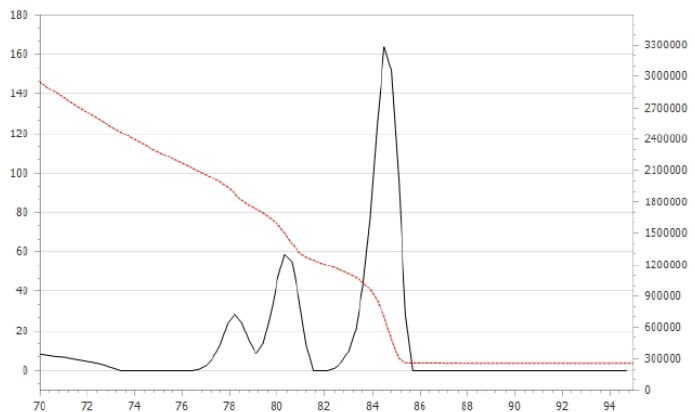
Well Number: C6
Sample ID: Lechuga
Result: Positive
Target: *Listeria monocytogenes*
Description: 33
Lot Number: 10621KA
Control Status: Positive
Control Status: Positive

Verificación de los métodos para la detección de *Salmonella spp.* y *Listeria monocytogenes* mediante PCR en matrices alimentarias

File: TFG LMONO QUESO Y LECHUGA.bax

Page 17 of 20

Rack Name:
Instrument: X5 (1D093-04296)
Accession: 23
Rack Status: Rack processing completed normally.
Rack Description:
Operator:
Original Data File: TFG LMONO QUESO Y LECHUGA
Time of PCR Run: 12/22/2021 22:35:31
Time of Detection: 12/22/2021 23:27:39
Time of Analysis: 12/22/2021 23:30:22, SW ver: 12/22/2021 23:30:22 b1.3.7251.0, Analysis ver: 3.6.6270

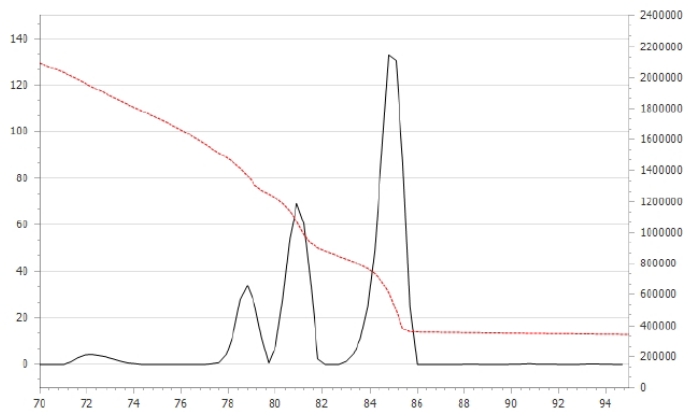


Well Number: C7
Sample ID: Lechuga
Result: Positive
Target: *Listeria monocytogenes*
Description: 34
Lot Number: 10621KA
Control Status: Positive

File: TFG LMONO QUESO Y LECHUGA.bax

Page 18 of 20

Rack Name:
Instrument: X5 (1D093-04296)
Accession: 23
Rack Status: Rack processing completed normally.
Rack Description:
Operator:
Original Data File: TFG LMONO QUESO Y LECHUGA
Time of PCR Run: 12/22/2021 22:35:31
Time of Detection: 12/22/2021 23:27:39
Time of Analysis: 12/22/2021 23:30:22, SW ver: 12/22/2021 23:30:22 b1.3.7251.0, Analysis ver: 3.6.6270

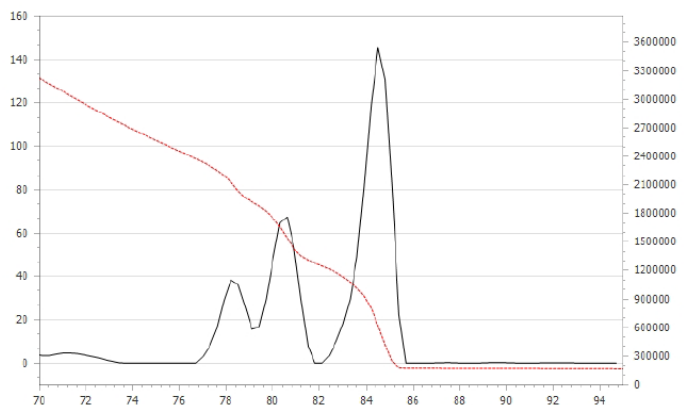


Well Number: C8
Sample ID: Lechuga
Result: Positive
Target: *Listeria monocytogenes*
Description: 35
Lot Number: 10621KA
Control Status: Positive

File: TFG LMONO QUESO Y LECHUGA.bax

Page 19 of 20

Rack Name:
Instrument: X5 (1D093-04296)
Accession: 23
Rack Status: Rack processing completed normally.
Rack Description:
Operator:
Original Data File: TFG LMONO QUESO Y LECHUGA
Time of PCR Run: 12/22/2021 22:35:31
Time of Detection: 12/22/2021 23:27:39
Time of Analysis: 12/22/2021 23:30:22, SW ver: 12/22/2021 23:30:22 b1.3.7251.0, Analysis ver: 3.6.6270

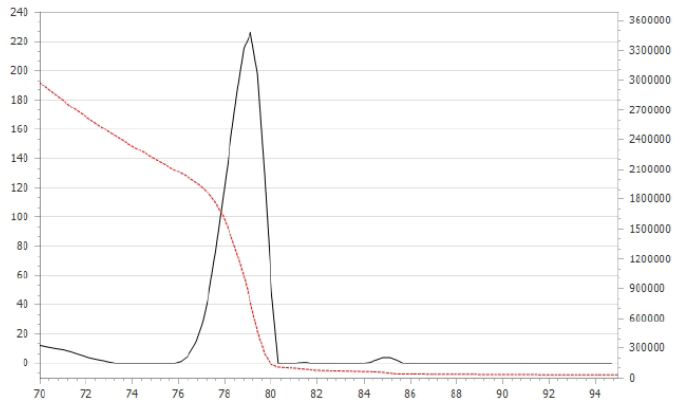


Well Number: D1
Sample ID: Lechuga
Result: Positive
Target: *Listeria monocytogenes*
Description:
Lot Number: 10621KA
Control Status: Positive

File: TFG LMONO QUESO Y LECHUGA.bax

Page 20 of 20

Rack Name:
Instrument: X5 (1D093-04296)
Accession: 23
Rack Status: Rack processing completed normally.
Rack Description:
Operator:
Original Data File: TFG LMONO QUESO Y LECHUGA
Time of PCR Run: 12/22/2021 22:35:31
Time of Detection: 12/22/2021 23:27:39
Time of Analysis: 12/22/2021 23:30:22, SW ver: 12/22/2021 23:30:22 b1.3.7251.0, Analysis ver: 3.6.6270



Well Number: D2
Sample ID: Lechuga
Result: Negative
Target: *Listeria monocytogenes*
Description: Blanco
Lot Number: 10621KA
Control Status: Positive

ANEXO 12: Resultados detallados del kit S 400 08.1

Resultados del ensayo:

A	B	C	D	E	F	G
1	Well	Fluor	Target	Content	Sample	Cq
2	A01	FAM		Unkn	Huevo	1,38
3	A01	HEX		Unkn	Huevo	
4	B01	FAM		Unkn	Huevo	13,69
5	B01	HEX		Unkn	Huevo	8,56
6	C01	FAM		Unkn	Huevo	33,64
7	C01	HEX		Unkn	Huevo	
8	D01	FAM		Unkn	Huevo	
9	D01	HEX		Unkn	Huevo	45,07
10	E01	FAM		Unkn	Huevo	13,55
11	E01	HEX		Unkn	Huevo	13,91
12	F01	FAM		Unkn	Huevo	18,27
13	F01	HEX		Unkn	Huevo	26,62
14	G01	FAM		Unkn	Huevo	15,03
15	G01	HEX		Unkn	Huevo	48,39
16	H01	FAM		Unkn	Huevo	14,79
17	H01	HEX		Unkn	Huevo	
18	A02	FAM		Unkn	Huevo	3,81
19	A02	HEX		Unkn	Huevo	1,16
20	B02	FAM		Unkn	Huevo	15,08
21	B02	HEX		Unkn	Huevo	
22	A03	FAM		Unkn	Salmon	3,11
23	A03	HEX		Unkn	Salmon	
24	B03	FAM		Unkn	Salmon	23,59
25	B03	HEX		Unkn	Salmon	34,91
26	C03	FAM		Unkn	Salmon	23,04
27	C03	HEX		Unkn	Salmon	34,16
28	D03	FAM		Unkn	Salmon	20,86
29	D03	HEX		Unkn	Salmon	30,82
30	E03	FAM		Unkn	Salmon	33,53
31	E03	HEX		Unkn	Salmon	35,10
32	F03	FAM		Unkn	Salmon	27,39
33	F03	HEX		Unkn	Salmon	37,50
34	G03	FAM		Unkn	Salmon	37,07
35	G03	HEX		Unkn	Salmon	32,58
36	H03	FAM		Unkn	Salmon	27,58
37	H03	HEX		Unkn	Salmon	37,95
38	A04	FAM		Unkn	Salmon	33,02
39	A04	HEX		Unkn	Salmon	32,97
40	B04	FAM		Unkn	Salmon	45,09
41	B04	HEX		Unkn	Salmon	39,04
42	A05	FAM		Unkn	Queso	25,14
43	A05	HEX		Unkn	Queso	20,67
44	B05	FAM		Unkn	Queso	21,17
45	B05	HEX		Unkn	Queso	
46	C05	FAM		Unkn	Queso	22,41
47	C05	HEX		Unkn	Queso	
48	D05	FAM		Unkn	Queso	23,96
49	D05	HEX		Unkn	Queso	
50	E05	FAM		Unkn	Queso	23,09
51	E05	HEX		Unkn	Queso	
52	F05	FAM		Unkn	Queso	33,26
53	F05	HEX		Unkn	Queso	
54	G05	FAM		Unkn	Queso	23,47
55	G05	HEX		Unkn	Queso	

A	B	C	D	E	F	G
56	H05	FAM		Unkn	Queso	49,68
57	H05	HEX		Unkn	Queso	
58	A06	FAM		Unkn	Queso	
59	A06	HEX		Unkn	Queso	
60	B06	FAM		Unkn	Queso	40,31
61	B06	HEX		Unkn	Queso	36,02
62	A07	FAM		Unkn	Lechuga	13,08
63	A07	HEX		Unkn	Lechuga	36,47
64	B07	FAM		Unkn	Lechuga	20,53
65	B07	HEX		Unkn	Lechuga	21,24
66	C07	FAM		Unkn	Lechuga	15,49
67	C07	HEX		Unkn	Lechuga	23,06
68	D07	FAM		Unkn	Lechuga	15,29
69	D07	HEX		Unkn	Lechuga	31,34
70	E07	FAM		Unkn	Lechuga	12,31
71	E07	HEX		Unkn	Lechuga	46,33
72	F07	FAM		Unkn	Lechuga	18,59
73	F07	HEX		Unkn	Lechuga	
74	G07	FAM		Unkn	Lechuga	21,08
75	G07	HEX		Unkn	Lechuga	23,44
76	H07	FAM		Unkn	Lechuga	17,71
77	H07	HEX		Unkn	Lechuga	
78	A08	FAM		Unkn	Lechuga	19,32
79	A08	HEX		Unkn	Lechuga	24,03
80	B08	FAM		Unkn	Lechuga	31,02
81	B08	HEX		Unkn	Lechuga	30,44
82	A09	FAM		Pos Ctrl		44,01
83	A09	HEX		Pos Ctrl		43,37
84	B09	FAM		Neg Ctrl		
85	B09	HEX		Neg Ctrl		46,07

Resultados de la repetición del ensayo:

	A	B	C	D	E	F	G
1		Well	Fluor	Target	Content	Sample	Cq
2		A01	FAM		Unkn	L1	12,28
3		A01	HEX		Unkn	L1	
4		B01	FAM		Unkn	L2	30,60
5		B01	HEX		Unkn	L2	24,04
6		C01	FAM		Unkn	L3	17,07
7		C01	HEX		Unkn	L3	20,31
8		D01	FAM		Unkn	L4	17,09
9		D01	HEX		Unkn	L4	22,08
10		E01	FAM		Unkn	L5	24,41
11		E01	HEX		Unkn	L5	33,78
12		F01	FAM		Unkn	L6	33,99
13		F01	HEX		Unkn	L6	
14		G01	FAM		Unkn	L7	13,49
15		G01	HEX		Unkn	L7	
16		H01	FAM		Unkn	L8	16,98
17		H01	HEX		Unkn	L8	
18		A02	FAM		Unkn	L9	14,72
19		A02	HEX		Unkn	L9	
20		B02	FAM		Unkn	L10	23,22
21		B02	HEX		Unkn	L10	31,68
22		C02	FAM		Unkn	L11	21,42
23		C02	HEX		Unkn	L11	
24		D02	FAM		Unkn	L12	29,12
25		D02	HEX		Unkn	L12	36,60
26		E02	FAM		Unkn	BLANC	
27		E02	HEX		Unkn	BLANC	42,28
28		F02	FAM		Pos Ctrl		41,62
29		F02	HEX		Pos Ctrl		45,60
30		G02	FAM		Neg Ctrl		
31		G02	HEX		Neg Ctrl		47,12