

UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

ESCOLA TÈCNICA SUPERIOR
D'ENGINYERIA AGRONÒMICA I DEL MEDI
NATURAL



TÍTULO

VALIDACIÓN DE LA TÉCNICA DE DETECCIÓN
DE LISTERIA MONOCYTOGENES EN
ALIMENTOS POR PCR A TIEMPO REAL

ALUMNO/A: JAVIER MARCOS MARTIN

TUTOR/A: ANA ISABEL JIMÉNEZ BELENGUER

COTUTOR/A: MARIA LUISA CAMARÓ SALA

CURSO ACADÉMICO: 2015/2016

VALENCIA, MARZO 2016

Licencia Creative Commons “Reconocimiento no Comercial-Sin Obra Derivada”.



TÍTULO

Validación de la técnica de detección de *Listeria monocytogenes* en alimentos por PCR a tiempo real.

RESUMEN

El objetivo de este trabajo es la descripción detallada de todas las actividades necesarias para la validación de la técnica de detección de *Listeria monocytogenes* en alimentos por PCR a tiempo real. La validación se realizó sobre las muestras de alimentos recibidas en la unidad de microbiología del Laboratorio de Salud Pública de Valencia. Todas las muestras se analizaron por PCR a tiempo real a través de un método alternativo al método de referencia. Se evaluaron todos los resultados de las muestras obtenidos y los parámetros de control. Y así asegurar, al máximo nivel permitido por el desarrollo científico y técnico, la calidad del método y del proceso.

ABSTRACT

The aim of this work is the detailed description of the necessary activities to validate the technique of detection of *Listeria monocytogenes* in food by real time PCR. The validation was performed on food samples received in the microbiology department of the Public Health Laboratory of Valencia. The samples were analyzed by PCR in real time through an alternative method to the reference method. All the results obtained and the parameters of control were evaluated in order to guarantee the quality of the method and the process according to the present scientific and technical developments.

PALABRAS CLAVE

Validación, *Listeria monocytogenes*, PCR a tiempo real, límite de detección, eficacia.

KEY WORDS

Validation, *Listeria monocytogenes*, PCR-RT, detection limit, efficacy.

ALUMNO: D. JAVIER MARCOS MARTIN

LOCALIDAD Y FECHA: Valencia, Marzo de 2016

TUTOR/A ACADÉMICO: Prof. Dña. ANA ISABEL JIMÉNEZ BELENGUER

COTUTOR/A: Dña. MARIA LUISA CAMARÓ SALA

COTUTOR/A COLABORADOR: Dña. PIEDAD OLMOS MARTÍNEZ

Licencia Creative Commons “Reconocimiento no Comercial-Sin Obra Derivada”.



ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1. PROGRAMA DE VIGILANCIA SANITARIA DE ALIMENTOS (VISA).....	1
1.1.2. OBJETIVO GENERAL DEL VISA.....	1
1.1.3. OBJETIVOS ESPECÍFICOS DEL VISA.....	1
1.1.4. ORGANISMOS ACTUANTES.....	2
1.1.5. NORMATIVA.....	2
2. GÉNERO <i>LISTERIA</i>	2
2.1. <i>LISTERIA MONOCYTOGENES</i>	2
2.1.1. HISTORIA.....	2
2.1.2. CARACTERÍSTICAS GENERALES.....	3
2.1.3. PATOLOGÍA.....	3
2.1.4. <i>LISTERIA</i> EN ALIMENTOS.....	3
3. MÉTODOS DE DETECCIÓN DE MICROORGANISMOS EN ALIMENTOS.....	4
3.1. MÉTODOS DE DETECCIÓN DE <i>LISTERIA MONOCYTOGENES</i>	4
3.1.1. MÉTODOS DE DETECCIÓN CONVENCIONALES.....	5
3.1.2. MÉTODOS DE DETECCIÓN RÁPIDOS.....	5
4. REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR).....	6
4.1. EXTRACCIÓN Y PURIFICACIÓN DE ADN.....	6
4.2. REACTIVOS.....	7
4.3. ETAPAS DE LA PCR.....	9
4.4. PCR CONVENCIONAL.....	10
4.5. PCR-RT.....	11
4.6. VENTAJAS DE LA PCR-RT.....	14
4.7. LIMITACIONES DE LA PCR.....	15
5. GESTIÓN DE LA CALIDAD.....	15
5.1. TIPOS DE MÉTODOS.....	16
5.1.1. MÉTODOS NORMALIZADOS.....	16
5.1.2. MÉTODOS ALTERNATIVOS AL MÉTODO DE REFERENCIA.....	16
5.1.3. MÉTODOS BASADOS EN MÉTODOS DE REFERENCIA.....	16
5.1.4. OTROS MÉTODOS.....	16
5.2. VALIDACIÓN DE UN MÉTODO ANALÍTICO.....	17
5.3. MÉTODO ALTERNATIVO DE DETECCIÓN DE <i>LISTERIA MONOCYTOGENES</i> POR PCR-RT EN ALIMENTOS.....	17
6. OBJETIVOS.....	19
7. MATERIAL Y MÉTODOS.....	20
7.1. CEPAS EMPLEADAS.....	20
7.2. MEDIOS DE CULTIVO Y REACTIVOS.....	20
7.3. EQUIPOS Y MATERIALES.....	21
7.4. MUESTRAS.....	21
7.5. MÉTODOS.....	21
7.5.1. MÉTODO DE ENRIQUECIMIENTO.....	21
7.5.2. PREPARACIÓN DEL INÓCULO DE <i>LISTERIA MONOCYTOGENES</i>	22
7.5.3. PROTOCOLO DE EXTRACCIÓN DEL ADN.....	22
7.5.4. PREPARACIÓN DE LA PLACA DE PCR-RT.....	22
7.5.5. PROTOCOLO DE PROGRAMACIÓN DE LA PCR-RT.....	23

7.5.6. TRATAMIENTO DE RESULTADOS.....	24
7.6. VALIDACIÓN DEL LÍMITE DE DETECCIÓN.....	25
7.6.1. PROCESAMIENTO DE LAS MUESTRAS.....	26
7.6.2. LECTURA DE RESULTADOS.....	26
7.7. VALIDACIÓN DEL PORCENTAJE DE FALSOS NEGATIVOS.....	27
7.8. VALIDACIÓN DE LA EFICIENCIA DE LA PCR-RT.....	27
7.9. VALIDACIÓN DEL LÍMITE INSTRUMENTAL DE LA PCR-RT.....	27
7.10. VERIFICACIÓN DEL LÍMITE DE DETECCIÓN OBTENIDO EN LA VALIDACIÓN.....	28
7.11. VERIFICACIÓN DEL PORCENTAJE DE FALSOS POSITIVOS DE LA PCR-RT.....	28
7.12. PRECISIÓN DE LA TÉCNICA PCR-RT A LO LARGO DEL TIEMPO.....	28
8. RESULTADOS.....	28
8.1. RESULTADOS DE LA VALIDACIÓN DEL LÍMITE DE DETECCIÓN.....	28
8.2. RESULTADOS DE LA VALIDACIÓN DEL PORCENTAJE DE FALSOS NEGATIVOS.....	30
8.3. RESULTADOS DE LA VALIDACIÓN DE LA EFICIENCIA DE LA PCR-RT.....	30
8.4. RESULTADOS DE LA VALIDACIÓN DEL LÍMITE INSTRUMENTAL LA PCR-RT.....	31
8.5. RESULTADOS DE LA VERIFICACIÓN DEL LÍMITE DE DETECCIÓN OBTENIDO EN LA VALIDACIÓN.....	32
8.6. RESULTADOS DE LA VERIFICACIÓN DEL PORCENTAJE DE FALSOS POSITIVOS DE LA PCR-RT.....	32
8.7. RESULTADOS DE LA PRECISIÓN DE LA TÉCNICA PCR-RT A LO LARGO DEL TIEMPO.....	33
9. CONCLUSIONES.....	34
10. BIBLIOGRAFÍA.....	35
11. ANEXOS.....	38
I. ANÁLISIS DE <i>L. MONOCYTOGENES</i> SEGÚN RD2073/2005.....	38
II. PRÓTOCOLO DE EXTRACCIÓN DEL ADN.....	38
III. RESULTADOS DE LA VALIDACIÓN DEL LÍMITE DE DETECCIÓN.....	39
IV. RESULTADOS DE LA VERIFICACIÓN DEL PORCENTAJE DE FALSOS POSITIVOS.....	42
V. RESULTADOS DE LA VERIFICACIÓN DE LA PRECISIÓN DE LA PCR-RT...	47

ÍNDICE DE ABREVIATURAS.

Abreviatura	Nombre completo
ADE	Agua destilada estéril
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ALOA	Chromogenic Listeria Agar base
APPCC	Análisis de peligros y puntos críticos de control
AS	Agar sangre
BVNC	Bacterias viables no cultivables
CE	Comunidad europea
CNP	Control negativo del proceso
CNPCR	Control negativo de la PCR
CPP	Control positivo del proceso
C _t	Número de ciclos de amplificación de la PCR
DNTPs	Desoxirribonucleótidos trifosfatados
ENAC et al	Entidad nacional de acreditación “y colaboradores”
FRET	Transferencia de energía por resonancia de Förster
g	gramos
HCl	Ácido clorhídrico / cloruro de hidrógeno
H ₂ O	Agua
ICMSF	International Commission on Microbiological Specifications for food
ISO	Organización internacional de Normalización
Kb	Kilobase
KCl	Cloruro potásico
L	litros
Log	Logaritmo decimal
Mg ²⁺	Ión magnesio
MgCl ₂	Cloruro de magnesio
ml	Mililitros
m.o.	Microorganismo
Nm	Nanómetros.
OH	Hidroxilo.
OIE	Organización Mundial de Sanidad Animal
°C	Grados Celsius
PCR	Reacción en cadena de la Polimerasa
R	Coefficiente de correlación
rpm	Revoluciones por minuto
PCR-RT	Reacción en cadena de la Polimerasa a tiempo real
TSA	Tryptic soy agar
ufc	Unidades formadoras de colonia
UV	Ultravioleta
VISA	Programa de Vigilancia Sanitaria de alimentos
ΔRn	Aumento de fluorescencia.
μg	Microgramo
μl	Microlitros
μm	Micrómetro
μM	Micromolar
%	Porcentaje en base 100

ÍNDICE DE FIGURAS.

Figura 1. Cadena de nucleótidos.

Figura 2. Cadena de doble hélice de ADN.

Figura 3. Fases de amplificación de la PCR.

Figura 4. Resultados en gel de agarosa.

Figura 5. Sondas de hidrólisis o sondas taqman.

Figura 6. Sondas beacon.

Figura 7. Sondas Fret.

Figura 8. Curva de amplificación.

Figura 9. Resultados de una curva de amplificación de una muestra positiva.

Figura 10. Gráfica de la eficiencia de la PCR-RT.

Figura 11. Gráfica del límite instrumental de la PCR-RT.

Figura 12. Gráfica de controles de extracción a lo largo del tiempo.

ÍNDICE DE TABLAS.

Tabla 1. Inhibidores de la PCR.

Tabla 2. Condiciones de amplificación.

Tabla 3. Resultados de los parámetros de control.

Tabla 4. Resultados en muestras.

Tabla 5. Muestras empleadas en la validación del método.

Tabla 6. Lectura y clasificación de resultados.

Tabla 7. Resultados de la validación del límite de detección en PCR-RT.

Tabla 8. Resultados de la validación del límite de detección del procedimiento.

Tabla 9. Resultados de la PCR-RT en la validación de la eficiencia de la técnica.

Tabla10. Resultados de la PCR-RT en la validación del límite instrumental.

Tabla 11. Resultados de la PCR-RT en la verificación del porcentaje de falsos positivos.

1. INTRODUCCIÓN.

La libre circulación de alimentos seguros y saludables es un aspecto esencial del mercado interior y contribuye significativamente a la salud y el bienestar de los ciudadanos, así como a sus intereses sociales y económicos. En la ejecución de las políticas comunitarias debe asegurarse un nivel alto de protección de la vida y la salud de las personas (Reglamento (CE) nº 178/2002).

Según el Reglamento (CE) nº 178/2002 la responsabilidad de garantizar alimentos seguros recae sobre las empresas alimentarias en todas las etapas de la producción, transformación y distribución de alimentos bajo su control. Por su parte, los estados miembros están obligados al seguimiento y la verificación del cumplimiento por parte de las empresas alimentarias de las normas orientadas en particular a prevenir, eliminar o reducir a niveles aceptables los riesgos que amenazan directamente o a través del medio ambiente a las personas y animales (Programa de vigilancia sanitaria de alimentos, 2015).

En el artículo 1 del Reglamento (CE) nº 852/2004, se establecen las normas generales destinadas a los operadores de empresa alimentaria en materia de higiene de los productos alimenticios. Conforme a dicho artículo la responsabilidad de la seguridad alimentaria a lo largo de toda la cadena alimentaria recae sobre los operadores, los cuáles, deberán aplicar procedimientos basados en los principios de análisis de peligros y puntos de control crítico (APPCC) y establecer los criterios microbiológicos.

Por otra parte el Reglamento (CE) nº 2073/2005 establece los criterios microbiológicos para determinados microorganismos y las normas de aplicación que deben cumplir los explotadores de empresas alimentarias al aplicar las medidas de higiene generales y específicas contempladas en el artículo 4 del Reglamento (CE) nº 852/2004.

1.1 PROGRAMA DE VIGILANCIA SANITARIA DE ALIMENTOS (VISA).

El Programa de Vigilancia Sanitaria de Alimentos permite abordar el control oficial de los productos alimenticios en la Comunidad Valenciana de acuerdo con los principios generales establecidos por el Reglamento (CE) nº 882/2004, es decir, basándose en los riesgos y con la frecuencia apropiada, mediante la planificación de las actividades de toma de muestras y análisis.

1.1.2. OBJETIVO GENERAL DEL VISA.

Reducir la exposición de la población a los peligros biológicos, químicos o físicos asociados al consumo de alimentos y susceptibles de poner en riesgo la salud de la población.

1.1.3. OBJETIVOS ESPECÍFICOS DEL VISA.

Asegurar que los operadores de empresa alimentaria garantizan que sus procesos controlan los peligros alimentarios con objeto de prevenirlos, eliminarlos o reducirlos a niveles aceptables, mediante la evaluación analítica de los productos alimenticios producidos y/o consumidos en la Comunidad Valenciana

Elaborar, gestionar y actualizar el mapa de peligros biológicos, químicos y físicos de los alimentos producidos y/o consumidos en la Comunidad Valenciana.

Valorar la exposición de la población valenciana a la presencia de residuos y contaminantes abióticos en alimentos, al objeto de identificar tendencias y posibles cambios en los niveles de exposición de la población.

1.1.4. ORGANISMOS ACTUANTES.

Por parte del departamento de seguridad alimentaria se elaboran los requisitos para la toma de muestras en base al tipo de alimento, ya sea perecedero o no, al tipo de matriz o según el análisis que se le vaya a realizar. Estas condiciones de toma de muestras se ven reflejadas en el VISA, en el cuál se establece el tipo de industria, la actividad que desempeña, el producto a analizar, la determinación que conlleva hacerle, el tipo de toma de muestra, el número de muestras a recoger, los valores de referencia y posibles observaciones que deba realizar el inspector de sanidad cuando realiza la toma de la muestra.

Los laboratorios de Salud Pública proporcionan el soporte analítico del programa y su actividad se desarrolla en un marco de aseguramiento de la calidad y de acreditación de los procedimientos analíticos (Programa de vigilancia sanitaria de alimentos, 2015). Según el Reglamento (CE) n° 882/2004, los controles oficiales deberán realizarse basándose en procedimientos documentados, a fin de asegurar que se llevan a cabo de una manera uniforme y con una calidad elevada constante.

1.1.5. NORMATIVA.

Para garantizar la seguridad alimentaria, se fijan criterios microbiológicos que establecen un límite por encima del cual un producto alimenticio debe considerarse contaminado de forma inaceptable y por lo tanto no puede ser comercializado. Un alimento se considera no seguro cuando es nocivo para la salud o no apto para el consumo humano (artículo 14 del Reglamento (CE) N° 178/2002).

Uno de los criterios microbiológicos asociado a la seguridad alimentaria que aparece en el Reglamento (CE) n° 2073/2005 es el que determina el límite de *Listeria monocytogenes* en alimentos, anexo I. En base a dicho reglamento, el departamento de seguridad alimentaria detalla unos procedimientos para la toma de muestras y que tipo de análisis se realiza sobre cada una.

2. GÉNERO *LISTERIA*.

El género *Listeria* comprende en la actualidad seis especies: *L. monocytogenes*, *L. innocua*, *L. ivanovii*, *L. welshimeri*, *L. seeligeri* y *L. grayi* (Doyle et al., 1997). Este género bacteriano comprende dos especies patógenas, *L. ivanovii* y *L. monocytogenes*. La primera se asocia a la patología de rumiantes y solo se han descrito algunos casos esporádicos de listeriosis para esta especie en humanos mientras que la *L. monocytogenes* es la especie principalmente asociada con la aparición de listeriosis en humanos (Institut de Recerca y Tecnologia Agroalimentàries, 2014).

2.1. *LISTERIA MONOCYTOGENES*.

2.1.1. HISTORIA.

En 1926 Murray, Webb y Swann descubrieron una bacteria hasta entonces desconocida, y que es la que actualmente conocemos como *L. monocytogenes* (Lenderman, 2007). La investigación de *L. monocytogenes* fue debida a que la población de conejos de laboratorio de la Universidad de Cambridge estaba siendo diezmada por un extraño trastorno caracterizado por fiebre y monocitosis. Durante la investigación se analizaron los animales enfermos, se cultivó su sangre y otros órganos e identificaron una nueva especie bacteriana, un bacilo Gram positivo no esporulado (Ledermann, 2008). Esta especie fue descrita por primera vez como *Bacterium*

monocytogenes (Adam y Moss, 1995). No fue hasta 1940 que Pirei designó a este agente con su nombre actual, *L. monocytogenes* (ICMSF, 1996).

2.1.2. CARACTERÍSTICAS GENERALES

L. monocytogenes es un microorganismo gram positivo, anaerobio facultativo, catalasa positivo, oxidasa negativo, asporógeno y presenta movilidad (Adam y Moss, 1995). Es un bacilo corto y con extremos redondeados. Mide entre 0,5-2 µm de largo por 0.2-0.5 µm de grueso; a veces adopta forma de cocobacilo. Se presenta aislado, en parejas, cadenas cortas o agrupados en V. La movilidad se debe a flagelos peritricos y se manifiesta mejor entre 20° - 25°C, a 37°C llega a ser imperceptible o nula, reduciéndose el número de flagelos a uno o dos situados en la región polar (Pascual y Calderon, 2000).

L. monocytogenes crece dentro de un amplio intervalo de temperaturas, desde 0 a 42°C, con un crecimiento óptimo de 30 y 35°C (Adam y Moss, 1995). *L. monocytogenes* se puede desarrollar entre valores de pH comprendidos entre 5,0-9,0. Pasados estos límites se inhibe su crecimiento, pero sobrevive. Su pH óptimo es 7,5 (Pascual y Calderon, 2000). *L. monocytogenes* también es muy tolerante a la sal siendo capaz de crecer en un 10% de cloruro sódico (Adam y Moss, 1995).

2.1.3. PATOLOGÍA.

L. monocytogenes es el agente causante de la listeriosis (Allerberger y Wagner, 2010). Aunque el intestino humano es el puerto de entrada de las bacterias *L. monocytogenes* asociadas al alimento, la imagen clínica acostumbrada de la listeriosis es meningitis y/o septicemia. La resistencia del hospedador a la infección por *Listeria* constituye un factor determinante del curso de la enfermedad (Eley, 1992). Afecta con más frecuencia a la población de riesgo: personas mayores, niños, mujeres embarazadas y personas con el sistema inmunitario deprimido (Institut de Recerca y Tecnologia Agroalimentaries, 2014). Aunque la morbilidad de la listeriosis es relativamente baja, la mortalidad de la enfermedad sistémica/encefalítica puede ser muy alta, con valores cercanos al 30% (OIE, 2008).

Parece ser que no todas las cepas de *L. monocytogenes* son patógenas, pero todas las cepas patógenas son hemolíticas y la producción de hemolisina es una de las propiedades asociada a la patogenicidad (ICMSF, 1996). La hemolisina, junto con otros factores desconocidos, induce la resistencia a los macrófagos del hospedador, posiblemente al debilitar la membrana del macrófago y alterar su permeabilidad, lo que afecta a su actividad funcional (Eley, 1992).

Los rasgos clínicos de la listeriosis van desde una gripe benigna a meningitis o meningoencefalitis (Pascual y Calderon, 2000). En las mujeres gestantes, corrientemente se asemeja a una enfermedad parecida a la influenza, con fiebre, dolor de cabeza y, accidentalmente, síntomas gastrointestinales (Adam y Moss, 1995). *L. monocytogenes* puede dar paso al feto a través de la madre por vía placentaria y dar lugar a: aborto, muerte durante el nacimiento o a una listeriosis neonatal. En el caso de la listeriosis neonatal de comienzo precoz, la tasa de mortalidad del 40-50 por 100 mientras que en la listeriosis neonatal de comienzo tardío la mortalidad es, aproximadamente, de un 25 por 100 (Pascual y Calderon, 2000). En las personas adultas no gestantes la listeriosis habitualmente se caracteriza por septicemia, meningitis y meningoencefalitis, pero también puede incluir endocarditis (Adam y Moss, 1995).

2.1.4. LISTERIA EN ALIMENTOS.

Durante la última década, la listeriosis ha aparecido como una de las principales enfermedades de origen alimentario. Los distintos modos mediante los cuales la bacteria es capaz de entrar en las plantas de tratamiento de alimentos, su capacidad para sobrevivir durante períodos de tiempo

prolongados en el ambiente, su capacidad para crecer a temperatura muy bajas y sobrevivir en el interior o en la superficie del alimento durante períodos prolongados en condiciones adversas, han hecho de *L. monocytogenes* una preocupación principal en la industria agroalimentaria durante la última década (Doyle et al., 1997).

La transmisión de la listeriosis por medio de los alimentos fue demostrada de modo convincente por primera vez en un brote en las provincias marítimas de Canadá en 1981. El brote implicó a 41 casos en total (Adam y Moss, 1995). El vehículo de transmisión fue identificado como una ensalada de col preparada comercialmente. Las coles utilizadas para la ensalada de col se remontan a una granja donde un brote de listeriosis había matado a varias ovejas (Hui et al., 1994). La col había sido cultivada en campos que habían sido abonados con estiércol reciente de las ovejas mezclado con abono y las coles cosechadas habían sido almacenadas en un cobertizo grande durante el invierno; factores que se cree que explican la introducción del organismo y su multiplicación hasta niveles peligrosos (Adam y Moss, 1995). De los 41 casos 34 se dieron en mujeres embarazadas y 7 en adultos no gestantes y que no evidenciaban inmunosupresión (Hui et al., 1994). De los 34 casos perinatales, hubo 9 nacimientos prematuros, 23 casos en recién nacidos con una tasa de mortalidad del 27 % y 2 nacimientos vivos de niños sanos (Adam y Moss, 1995).

A partir de 1980 se han producido varios brotes importantes de listeriosis humana, claramente identificados (Pascual y Calderon, 2000). En 1983, la leche pasteurizada fue responsable de un brote en Massachusetts que implicó 49 individuos (Adam y Moss, 1995). En 1985 en California, un brote de listeriosis con 142 casos fue atribuido a un queso de estilo mexicano (Doyle et al., 1997). En Suiza en 1987, un brote de queso de pasta blanda provocó 30 personas afectadas y 10 muertos (Pascual y Calderon, 2000). En Francia, se detectaron 279 casos de listeriosis en humanos de los cuáles 92 se dieron en mujeres gestantes y el 187 en adultos no gestantes (Jacquet et al., 1995).

Los alimentos donde se ha aislado *L.monocytogenes* son numerosos, entre ellos están la leche y sus derivados, carnes y productos cárnicos, canales de ave, alimentos vegetales, pescados y mariscos (Pascual y Calderon, 2000). La gravedad y el porcentaje de muertes de casos de listeriosis exigen medidas preventivas apropiadas, pero las características del microorganismo son tales que es irreal esperar que todos los alimentos estén exentos de *Listeria*. El dilema ha creado un vivo debate y ha impulsado la investigación en varios campos, por ejemplo los métodos convencionales y rápidos para la identificación de *L. monocytogenes* en el alimento (Doyle et al., 1997).

3. MÉTODOS DE DETECCIÓN DE MICROORGANISMOS EN ALIMENTOS.

Los métodos microbiológicos “convencionales”, empleados actualmente en numerosos laboratorios de todo el mundo y establecidos en muchos casos como métodos estándares de análisis microbiológicos de alimentos, se caracterizan por ser laboriosos, emplear grandes volúmenes de medios de cultivo y requerir un tiempo considerable para la obtención y el análisis de resultados. Por el contrario, los métodos rápidos requieren un tiempo reducido para la obtención de los resultados y/o permiten procesar un número elevado de muestras por unidad de tiempo, y son en general fáciles de usar, precisos (sensibilidad y especificidad adecuadas y límites de detección bajos) y económicamente rentables “aunque, en algunos casos, pueden requerir una inversión económica inicial considerable” (Herranz, 2008).

3.1. MÉTODOS DE DETECCIÓN DE *LISTERIA MONOCYTOGENES*.

La dosis infectiva de esta bacteria es pequeña y por tanto, su mera presencia en un producto ya constituye un peligro sanitario de consideración. Por consiguiente, el objetivo del análisis de

Listeria en los alimentos suele ser poner de manifiesto la existencia del patógeno más que su enumeración; es decir, se busca la “detección” de la bacteria (Yousef y Carlstrom, 2006).

Cuando *L.monocytogenes* se encuentra en un alimento, su concentración, por regla general, es muy escasa, por lo que no resulta posible un recuento directo (Yousef y Carlstrom, 2006). Por lo que el éxito de su detección en los alimentos depende del enriquecimiento (Pascual y Calderon, 2000).

Gray, en 1948, aprovechando la capacidad de *L. monocytogenes* para crecer a temperatura de refrigeración, usó como medio de enriquecimiento el frío, logrando así suprimir gran parte de la flora competitiva, incapaz de desarrollarse a baja temperatura (Pascual y Calderon, 2000). Aunque el enriquecimiento en frío da buenos resultados con poblaciones pequeñas de *listeria*, el método resulta lento ya que pueden necesitarse semanas para alcanzar una recuperación satisfactoria del patógeno (Yousef y Carlstrom, 2006). El enriquecimiento en caldos selectivos es en la actualidad el método mas utilizado para la investigación de *L. monocytogenes*, en alimentos. En las distintas fórmulas de los caldos de enriquecimiento se integran sustancias que, como los antibióticos, suprimen o inhiben el crecimiento de la mayor parte de la flora competitiva permitiendo, no obstante, el desarrollo de *Listeria* (Pascual y Calderon, 2000).

3.1.1. MÉTODOS DE DETECCIÓN CONVENCIONALES.

Los métodos de detección convencional comprenden un enriquecimiento, un aislamiento y una identificación. El enriquecimiento consiste en incubar una mezcla de la muestra en un medio rico en nutrientes, caracterizado por ser muy poco o nada selectivo. Durante la incubación, las células de *L. monocytogenes* dañadas se recuperan y la población del patógeno aumentará en número. En la actualidad suele preferirse un método más moderno, consistente en dos pasos de enriquecimiento, incluyendo un preenriquecimiento en un medio de cierta selectividad y un segundo y verdadero enriquecimiento en un medio, ya de veras, selectivo (Yousef y Carlstrom, 2006). Después del enriquecimiento selectivo, los cultivos se siembran en placas de agar con un medio selectivo/diferencial para el aislamiento de las colonias presuntivas de *L. monocytogenes* (OIE, 2008). Las colonias presuntivas, aisladas en los medio selectivos/diferenciales, pueden identificarse como *L. monocytogenes* después de caracterizarlas bioquímicamente y confirmar su identidad (Yousef y Carlstrom, 2006).

En general, los métodos de detección y cuantificación que se emplean tradicionalmente en microbiología presentan importantes inconvenientes y limitaciones, entre ellas: el tiempo de obtención de resultados suele ser largo, niveles de sensibilidad y especificidad bajos, no detectan células viables no cultivables o virus incapaces de crecer en cultivo celular y hay una dificultad en la interpretación de los resultados que en algunos casos puede ser ambigua. En los últimos años y debido a estas limitaciones, estos métodos están siendo sustituidos por métodos rápidos (Tomás et al., 2007).

3.1.2. MÉTODOS DE DETECCIÓN RÁPIDOS.

Se define como “método rápido” a cualquier método destinado a la detección, recuento, la caracterización y la subtipificación de microorganismos (patógenos y del deterioro) mediante el cual se obtienen resultados de manera sencilla, fiable y en menor tiempo que con los métodos convencionales (Leotta, 2009). En la actualidad estos métodos requieren un enriquecimiento previo, pero habitualmente proporcionan un resultado más rápido que el método tradicional (OIE, 2008). No obstante, aunque los resultados negativos (es decir, ausencia del patógeno) de los métodos rápidos se consideran concluyentes, los positivos necesitan de una confirmación mediante el cultivo tradicional y las técnicas bioquímicas (Yousef y Carlstrom, 2006). Los métodos rápidos se basan en técnicas físico-químicas, bioquímicas, inmunológicas y moleculares (Leotta, 2009).

Los primeros métodos rápidos de análisis microbiológico comenzaron a ser utilizados por microbiólogos clínicos en la década de 1960 y su aplicación al análisis de alimentos comenzó unos diez años después. Cronológicamente, a la etapa comprendida entre 1965 y 1975 correspondió el desarrollo de los sistemas de miniaturización de las técnicas microbiológicas convencionales y la aparición de los primeros kits diagnósticos. De 1975 a 1985, las técnicas inmunológicas se desarrollaron rápidamente y en el periodo que abarca de 1985 a 1995 irrumpieron las técnicas genéticas y en especial la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), cuya aplicación marcó un punto de inflexión importante en el análisis microbiológico, tanto en muestras clínicas como de alimentos (Martin, 2010).

4. REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR).

La reacción en cadena de la polimerasa o PCR (Polymerase Chain Reaction) fue desarrollada en 1983 por Kary Mullis. La PCR es una técnica de biología molecular altamente específica, rápida, sensible y versátil para detectar cantidades ínfimas de un cierto ADN específico (Rodríguez y Barrera, 2004). Es una reacción enzimática *in vitro* que amplifica millones de veces una secuencia específica de ADN durante varios ciclos repetidos en los que la secuencia blanco es copiada fielmente. Para ello, la reacción aprovecha la actividad de la enzima ADN polimerasa que tiene capacidad de sintetizar naturalmente el ADN en las células (Tamay et al., 2013).

4.1. EXTRACCIÓN Y PURIFICACIÓN DE ADN.

La extracción y purificación de los ácidos nucleicos constituye la primera etapa de la mayoría de los estudios de biología molecular. En nuestro caso, los métodos de extracción permiten obtener ácidos nucleicos purificados de las muestras para después realizar el análisis genético mediante la PCR. La calidad y la pureza de los ácidos nucleicos son dos de los elementos más importantes en ese tipo de análisis (Somma, 2007). Con el propósito de obtener ácidos nucleicos más puros y libre de inhibidores, se deben utilizar métodos de extracción específicos. Los posibles inhibidores en el ADN se muestran en la Tabla 1. La extracción de ácidos nucleicos depende de varios factores, entre ellos el producto que se va analizar. También hay que considerar que a medida que la materia prima es procesada hacia alimentos terminados algunos de los distintos tratamientos a que son sometidos los componentes hacen que se vaya degradando el ADN de los alimentos y pueda influir en la calidad del ADN extraído (Arely et al., 2009).

Tabla 1. Inhibidores de la PCR.

Inhibidor	Concentración de inhibición
Dodecilsulfato sódico	> 0,005 %
Fenol	> 0,2 %
Etanol	> 1 %
Isopropanol	> 1 %
Acetato de sodio	> 5 mM
Cloruro de sodio	> 25 mM
EDTA	> 0,5 mM
Hemoglobina	> 1 GM/ml
Heparina	> 0,15 UI/ml
Urea	> 20 mM
Mezcla de reacción	> 15 %

4.2. REACTIVOS.

En el tubo de reacción deben encontrarse presentes todos los elementos que permitan la reacción en cadena de la polimerasa (Roca et al., 2003). Los elementos son: el ADN molde o diana, la enzima, los oligonucleótidos o *primers*, los desoxirribonucleótidos trifosfatados (dNTPs: adenina, timina, citosina y guanina), el ión magnesio Mg^{2+} , una solución amortiguadora o buffer y H_2O .

El elemento principal en la PCR es el ADN. Es importante recordad que la molécula de ADN está formada por cadenas de nucleótidos unidos por enlaces covalentes, a su vez, estos están formados por un azúcar (D-2-desoxirribosa), un grupo fosfato y una base nitrogenada (adenina, timina, guanina o citosina) (Garrido et al., 2006). En la figura 1 podemos ver la estructura de los cuatro nucleótidos diferentes, cada uno de ellos con una base nitrogenada diferente y unidos entre si por enlaces covalente formando una cadena de nucleótidos.

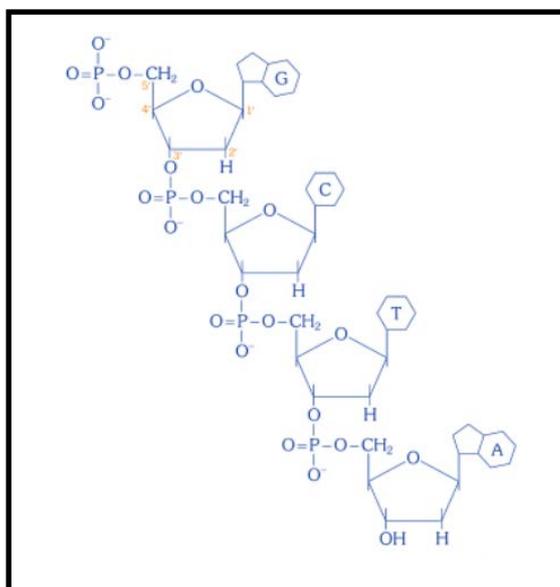


Figura 1. Cadena de nucleótidos (Garrido et al., 2006).

El ADN está formado por una hélice doble tridimensional, en la que las bases nitrogenadas quedan enfrentadas en la parte central o interna de la estructura, estableciéndose entre ellas enlaces por puentes de hidrógeno. A esto se le denomina complementariedad de bases. Como se observa en la figura 2, este enfrentamiento de las bases nitrogenadas siempre es el mismo: adenina con timina y guanina con citosina (Peña et al., 2006).

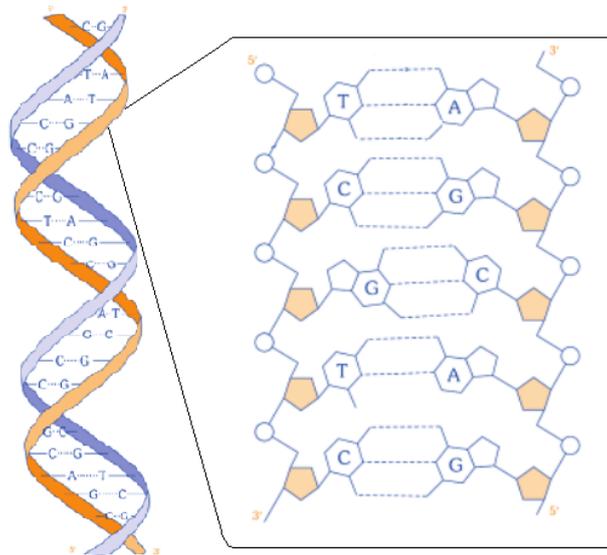


Figura 2. Cadena doble hélice de ADN (Garrido et al., 2006).

Puede efectuarse la amplificación por PCR si está presente al menos un ejemplar intacto del gen diana. Si el número de ejemplares del gen diana es mayor, también lo será la probabilidad de que tenga éxito la amplificación del ADN. La cantidad total de ADN utilizada normalmente para la PCR está entre 0,05 y 1 μg . Aunque las muestras no tienen que estar muy purificadas, sí es necesario eliminar algunos contaminantes, para evitar que inhiban el proceso de amplificación (Somma y Querci, 2007).

Por otro lado los *primers* son necesarios debido a que la ADN polimerasa no es capaz de incorporar de nuevo nucleótidos a una cadena sencilla de ADN, sino que requiere de una región de doble cadena precedente para poder iniciar la síntesis. Son secuencias de ADN monocatenario de pequeño tamaño, de entre 15 y 30 bases (Roca et al., 2003). Sus secuencias han de ser complementarias a los extremos 3' de la región diana en cada hebra, de modo que los *primers* puedan ejercer de cebadores para la replicación de las dos hebras en la región diana (Herráez, 2012). Son dos secuencias diferentes de *primers* las que se utilizan en la PCR, una denominada “forward” o sentido y otra “reward” o antisentido; ambas deben estar diseñadas para que hibriden en la cadena de ADN.

La ADN polimerasa es una enzima capaz de generar una copia de DNA a partir del DNA molde (Pérez, 2011). Una de ellas es la taq polimerasa, esta enzima es capaz de soportar las temperaturas de desnaturalización del ADN aplicadas en la PCR (95°C) (Roca et al., 2003) ya que proviene de una bacteria termófila llamada *Thermus aquaticus*, la cual vive en condiciones de temperatura muy altas y por eso su ADN polimerasa es capaz de soportar este tipo de temperaturas (Tamay et al., 2013). Su temperatura óptima de síntesis de ADN es de 72- 80 °C, donde es capaz de incorporar 150 nucleótidos por segundo (Roca et al., 2003).

Los cuatro desoxirribonucleótidos trifosfatados precursores del ADN son adenina, guanina, citosina y timina (Stanier et al., 1992). Estos nucleótidos se van añadiendo a la cadena complementaria a la cadena molde para crear su complementaria (Pérez, 2011). La concentración de cada uno de los dNTP para la PCR debe estar entre 20 y 200 μM , y los cuatro dNTP deben utilizarse a concentraciones equivalentes para minimizar los errores de incorporación. (Somma y Querci, 2007).

Además de los reactivos que participan directamente en la reacción, la PCR necesita un tampón adecuado para poder llevar a cabo la reacción (Somma y Querci, 2007). Por lo general esta solución amortiguadora incluye Tris-HCl, KCl, geltaína y MgCl_2 (Rodríguez y Barrera, 2004). Los iones Mg^{2+} forman complejos solubles con los dNTP, lo cual es fundamental para la incorporación de estos. Una concentración baja de Mg^{2+} provoca un rendimiento bajo mientras

que una concentración alta hace que se acumulen productos inespecíficos (Somma y Querci, 2007).

4.3. ETAPAS DE LA PCR.

La reacción en cadena de la polimerasa presenta varias etapas, que cumplen funciones diferentes en el proceso; algunas etapas se dan una sola vez, mientras que otras se repiten n veces, dando lugar a los ciclos de amplificación (Roca et al., 2003). Cada ciclo de amplificación de la PCR se lleva a cabo en tres etapas principales: desnaturalización, hibridación y extensión (Tamay et al., 2013). La PCR promedio comporta 30-35 ciclos de reacciones, que proporcionan hasta mil millones de copias de la plantilla original ($2^{30} \approx 1 \times 10^9$) (Baynes, 2011).

Antes y después de estos ciclos se programan dos pasos (Espinosa, 2007). El previo, a elevada temperatura (incluso superior a la de las etapas de desnaturalización), sirve principalmente para inactivar proteasas y nucleasas de la muestra, así como para asegurar la desnaturalización completa del ADN de partida, en especial si éste tiene gran tamaño o posee regiones muy compactadas. La etapa final, por su parte, consiste en una prolongación de la última elongación o extensión, para permitir que se completen todos los fragmentos (Herráez, 2012).

En la etapa de la desnaturalización, las cadenas de ADN son calentadas y separadas a una temperatura de 95°C durante 20-30 segundos. El tiempo depende de la secuencia del templado, es decir, si la cantidad de Guanina-Citosina es alta, será necesario más tiempo para romper sus uniones debido a que el apareamiento de estas bases está formado por tres enlaces, uno más que las bases Adenina-Timina (Tamay et al., 2013). La reacción se completa cuando todo el ADN bicatenario se convierte en monocatenario (Somma y Querci, 2007).

En la hibridación o anillamiento, se disminuye la temperatura del medio para que pueda darse la unión de los *primers* a sus diana en el ADN. Las temperaturas bajas aumentan la sensibilidad del proceso (se favorece la unión de los *primers* al ADN), al tiempo que la especificidad disminuye (pueden darse más uniones erróneas); las temperaturas elevadas disminuyen la sensibilidad (menor unión *primers*-ADN) y aumentan la especificidad (Roca et al., 2003). En esta etapa, los primers se alinean al extremo 3' de las hebras de ADN previamente separado (Tamay et al., 2013). La temperatura de esta fase suele oscilar entre los 50 y 60 °C. La temperatura se selecciona de manera que el procedimiento tenga el máximo de especificidad y sensibilidad (Roca et al., 2003).

Durante la extensión la ADN polimerasa termoestable elonga los cebadores, empleando como molde ambas hebras originales. La replicación transcurre en dirección 5'→ 3' a partir del extremo 3' OH de cada cebador, empleando como sustrato los cuatro dNTPs, hasta terminar la lectura del molde o hasta que se eleve la temperatura en una nueva etapa de desnaturalización (siguiente ciclo) (Herráez, 2012). Esta etapa debe realizarse a una temperatura alta, que es la que coincide con la máxima actividad de la polimerasa (72°C) (Rodríguez y Barrera, 2004). La duración del tiempo necesario para las fases de extensión del cebador puede aumentar si es larga la región de ADN que se va a amplificar (Somma y Querci, 2007). Normalmente suele dar un buen resultado la utilización de tiempos de elongación que van desde 20 hasta 40 segundos (Roca et al., 2003).

En la figura 3 podemos observar las diferentes etapas de la reacción en cadena de la polimerasa. En la primera imagen observamos la separación de las hebras de ADN, en la segunda la unión de los cebadores y en la tercera la unión de los dNTPs por complementariedad.

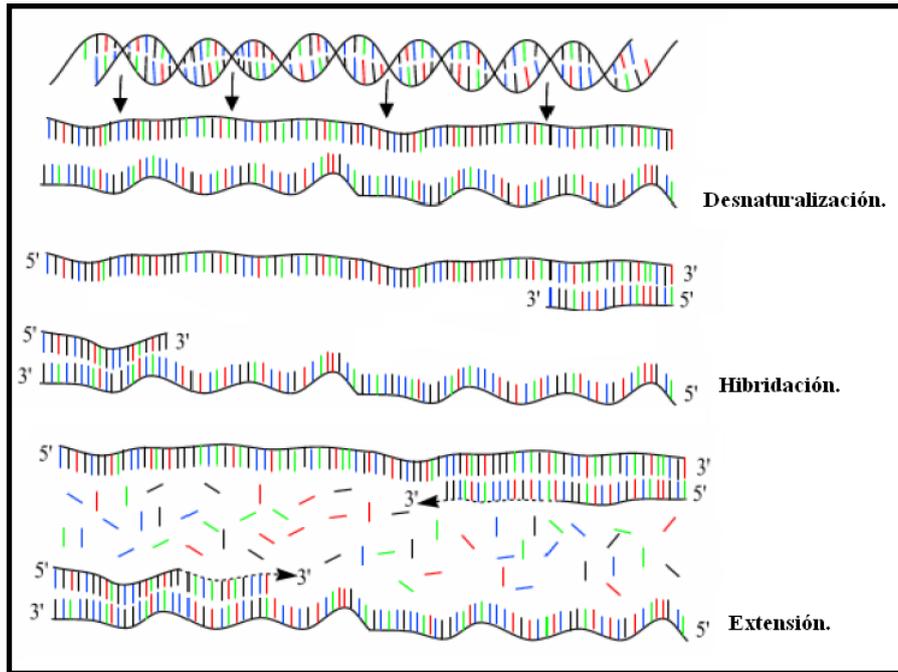


Figura 3. Fases de amplificación de la PCR (Somma y Querci, 2007).

4.4. PCR CONVENCIONAL.

La PCR convencional consiste en la detección de fragmentos de ADN amplificados (amplicones) por electroforesis en gel de agarosa y tinción de bromuro de etidio (Costa, 2004). La electroforesis en geles de agarosa es un método normalizado que se utiliza para separar e identificar fragmentos de ADN. La técnica consiste en aplicar corriente eléctrica sobre el gel de agarosa para que las moléculas lo atraviesen por cargas eléctricas. Las propiedades de una molécula determinan la velocidad con que un campo eléctrico puede desplazarla a través del medio. La velocidad depende de dos variables: carga y masa (Somma y Querci, 2007). En el caso de los ácidos nucleicos, el grupo fosfato les proporciona carga negativa, por lo que durante la electroforesis migran hacia el polo positivo. Otro ingrediente que se agrega al gel es bromuro de etidio, una molécula capaz de unirse al ADN de doble cadena que, cuando es excitado con luz UV, emite una señal que permite la visualización de los amplicones en forma de bandas. Cuando los amplicones son corridos en el gel, éstos deben ser cargados junto con un marcador molecular que contenga un número determinado de segmentos de ADN conocidos, lo que facilita la identificación de los amplicones y si su tamaño corresponde con el esperado. El tamaño está dado por el número de pares de bases del amplicón (Tamay et al., 2013). En la figura 4 podemos observar un esquema de un gel de agarosa con una muestra y una serie de marcadores moleculares de peso molecular conocido que nos permite, por comparación, establecer la cantidad de pares de bases que tiene el fragmento de ADN amplificado de la muestra.

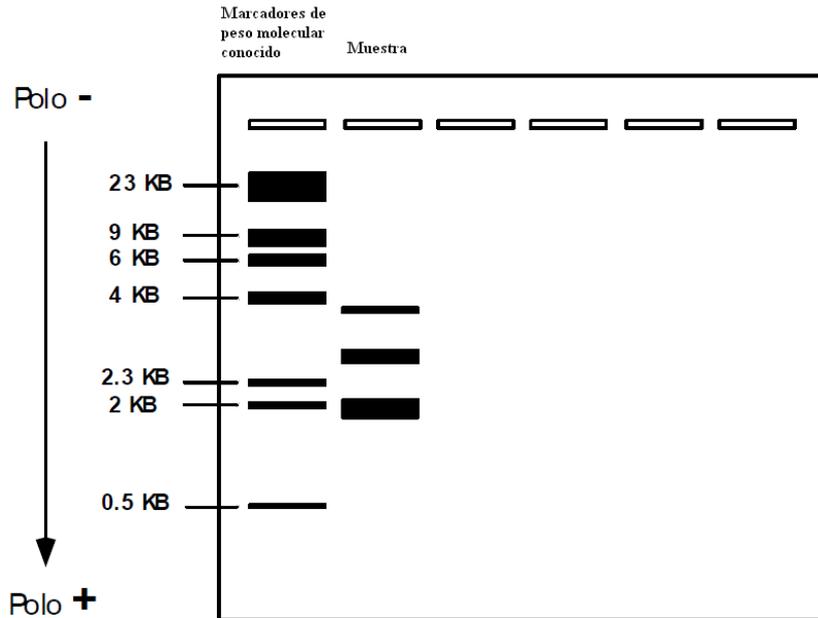


Figura 4. Resultados en gel de agarosa (Padilla).

4.5. PCR-RT.

La PCR en tiempo real es una técnica que combina la amplificación y la detección en un mismo paso, al correlacionar el producto de la PCR de cada uno de los ciclos con una señal de intensidad de fluorescencia. Posee características importantes como alta especificidad, amplio rango de detección y rapidez en la visualización del resultado ya que no es necesario realizar una electroforesis posterior. Para la amplificación por PCR a tiempo real, además de los reactivos que se emplean en la amplificación de la PCR convencional, es necesario emplear un fluoróforo. Para llevarse a cabo la PCR a tiempo real es necesario un equipo con un termociclador y una unidad capaz de detectar señales fluorescentes. El termociclador del equipo debe ser capaz de mantener una temperatura uniforme para todas las muestras y ser lo suficientemente rápido en la transición de temperaturas de una etapa a otra (desnaturalización del ADN molde, alineamiento de los oligonucleótidos y síntesis). El sistema fluorométrico consiste en una fuente de energía para excitar a los fluoróforos (a una determinada longitud de onda de excitación) y un sistema de detección, que permita monitorear la señal emitida (a una longitud de onda de emisión) (Aguilera, 2014).

Los sistemas de detección por fluorescencia empleados en la PCR a tiempo real pueden ser de dos tipos: agente intercalantes y sondas específicas marcadas con fluorocromos. Los agentes quelantes son fluorocromos que aumentan notablemente la emisión de fluorescencia cuando se unen a ADN de doble hélice. El incremento de cada ciclo se refleja en un aumento proporcional de la fluorescencia emitida. Este sistema de detección tiene la ventaja de que la optimización de las condiciones de la reacción es muy fácil y es más barato que las sondas específicas. El principal inconveniente de los agentes intercalantes es su baja especificidad, debido a que se unen de manera indistinta a productos generados inespecíficamente. Por otra parte, las sondas específicas están marcadas con dos tipos de fluorocromos, un donador y un aceptor. Las sondas más utilizadas son las sondas de hidrólisis, denominadas también sondas Taqman, las sondas molecular *beacons* y las sondas FRET (Costa, 2004).

Las sondas de hidrólisis o sondas Taqman son oligonucleótidos marcados con un fluoróforo donador en el extremo 5' que emite fluorescencia al ser excitado y un aceptor en el extremo 3' que absorbe la fluorescencia liberada por el donador. Para que esto ocurra, las moléculas donadora y aceptora deben estar espacialmente próximas. Además, el espectro de emisión de la primera se ha de solapar con el espectro de absorción de la segunda. Mientras la sonda está intacta, la fluorescencia emitida por el donador es absorbida por el aceptor. Sin embargo, durante la amplificación de ADN templado, la sonda se hibrida con su cadena complementaria. Al desplazarse a lo largo de la cadena, en su acción de síntesis, la ADN polimerasa de *Thermus aquaticus*, que tiene actividad 5' exonucleasa, hidroliza el extremo 5' de la sonda, produciéndose la liberación del fluoróforo. Como donador y aceptor están ahora espacialmente alejados, la fluorescencia emitida por el primero es captada por el detector (figura 5) (Rodríguez y Rodríguez, 2006).

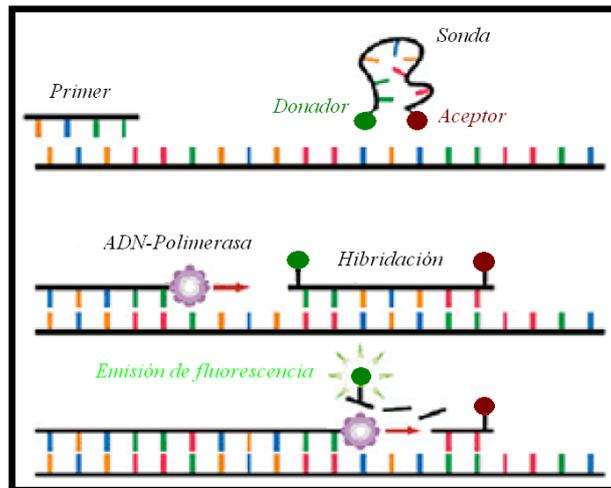


Figura 5. Sondas de hidrólisis o sondas Taqman (Rodríguez y Rodríguez, 2006).

Las sondas *beacons* tienen una molécula donadora en el extremo 5' y una aceptora en el extremo 3' pero, además, presentan una estructura secundario en forma de asa, en la que reside la secuencia de unión específica con el ADN diana. Como se puede observar en la figura 6, los extremos permanecen plegados cuando la sonda no está hibridada, lo que conlleva que donador y aceptor estén muy cerca uno de otro. En esta conformación la fluorescencia emitida por el donador es absorbida por el aceptor y no es captada por el lector del equipo. Sin embargo, al hibridar con el ADN diana la sonda se abre, alejándose donador y aceptor, pudiendo ser detectada la fluorescencia emitida por el primero (Costa, 2004).

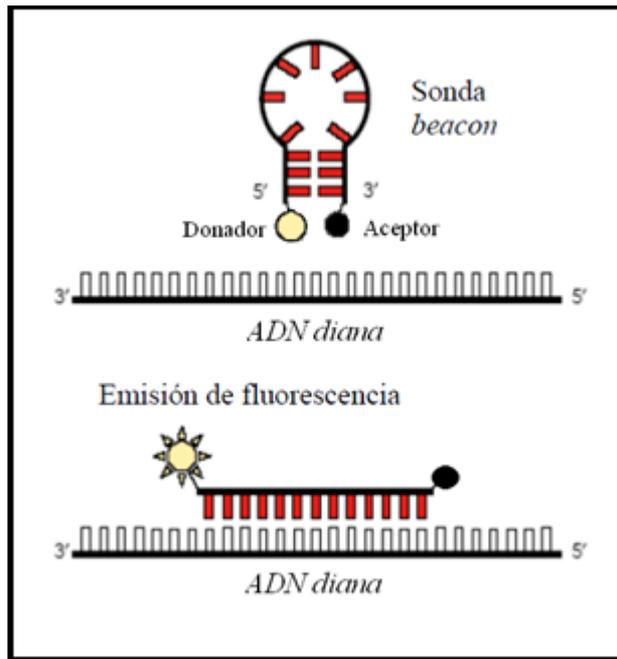


Figura 6. Sonda Beacon (Rodríguez y Rodríguez, 2006).

Las sondas FRET transfieren energía fluorescente mediante resonancia o hibridación. Para ello se utilizan dos sondas de hibridación diferentes, una que lleva una molécula donadora de fluorescencia en su extremo 3' y otra aceptora en su extremo 5' (figura 7). Estas dos sondas de oligonucleótidos están diseñada para que se hibriden en el ADN diana muy próximas entre ellas. El donador de energía es excitado por una fuente de luz y emite luz fluorescente que excita al aceptor y éste emite una fluorescencia en una longitud de onda mayor, de la cuál se mide su intensidad (Forbes et al., 2007).

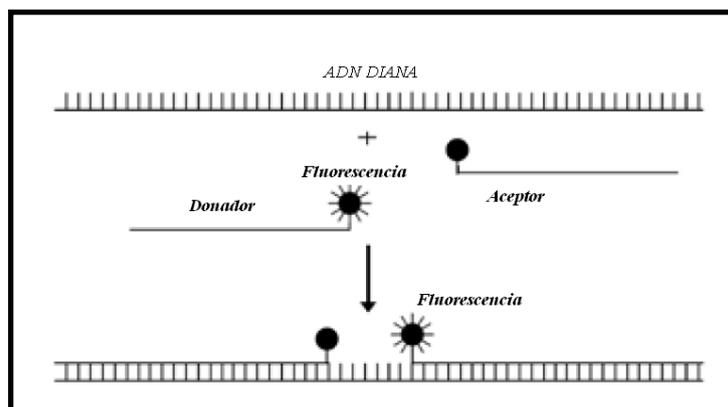


Figura 7. Sonda Fret (Aguilera et al., 2014).

Durante la PCR a tiempo real, la sonda adicionada genera una señal de fluorescencia que refleja la cantidad de producto amplificado. La cinética de la amplificación de la PCR-RT se puede dividir en cuatro fases: inicial, exponencial, lineal y *plateau*. Durante la fase inicial, entre los primeros 10-15 ciclos, la fluorescencia es insuficiente para lograr discriminar el ruido basal. Sin embargo, esta línea sirve para delimitar la línea base. En la fase exponencial, los reactivos de la reacción se encuentran de forma abundante por lo que la amplificación por la PCR tiene una

eficiencia cercana al 100%. En esta fase de la cinética de amplificación, el comportamiento del ADN es 2^n , es decir, a partir de cada molécula de ADN se generan dos, por lo que el producto de la PCR se duplica después de cada uno de los ciclos. La fase lineal comprende el momento en que los reactivos empiezan a ser limitantes en la reacción y se presenta un decaimiento de la actividad enzimática. La eficiencia de la amplificación es inconstante durante esta fase. Por último, la fase de *plateau* muestra una señal saturada. La amplificación se detiene debido a que los componentes de la reacción se agotaron. En esta, la cantidad de producto obtenida es constante aunque se incremente el número de ciclos (Aguilera et al., 2014). En la figura 8 se observa una gráfica con la amplificación de una muestra que supera el umbral de fluorescencia para discriminar el ruido basal.

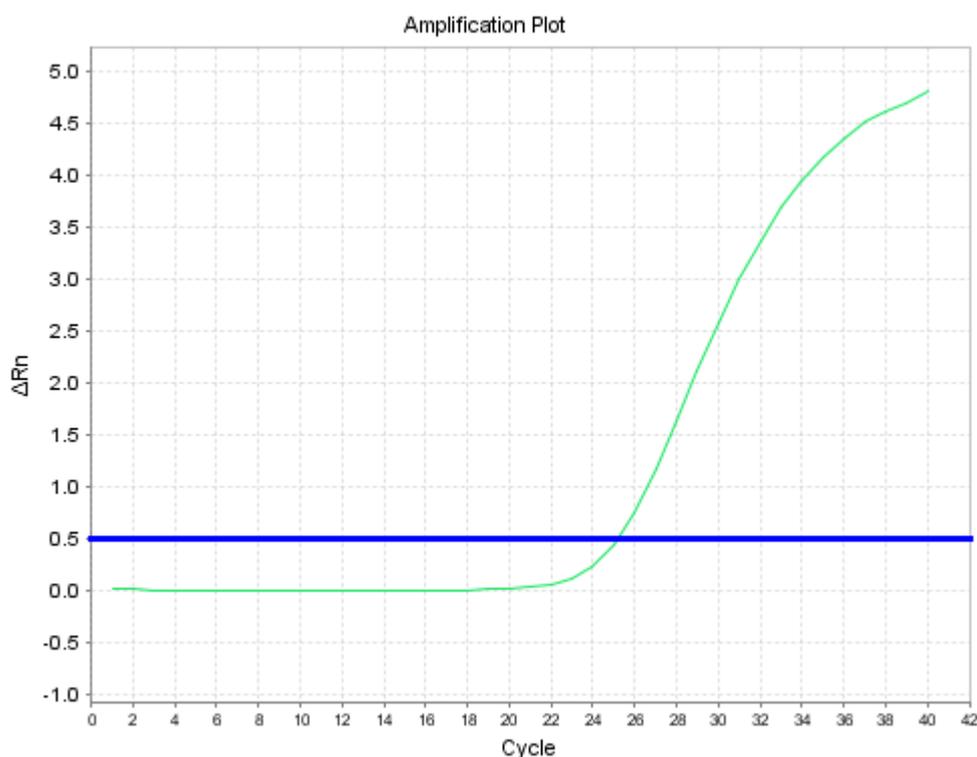


Figura 8. Curva de amplificación.

Como se ha descrito, los resultados de la PCR en tiempo real se basan en la detección y cuantificación de los marcadores fluorescentes a lo largo de la reacción de la PCR-RT (Vinueza, 2009). Para obtener estos resultados se fija el umbral de fluorescencia, por encima de la línea base y posteriormente se determina el punto en el cual la fluorescencia de la reacción sobrepasa la fluorescencia umbral, este punto se llama C_t (De Alba y Rueda, 2013). El C_t equivale al número de ciclos necesarios para que cada curva de amplificación de PCR-RT alcance el umbral en la señal de fluorescencia (Aguilera et al., 2014).

4.6. VENTAJAS DE LA PCR-RT.

Las principales ventajas del uso de la PCR-RT en la detección e identificación de bacterias radica en tres aspectos fundamentales; su sensibilidad, su especificidad y su capacidad de procesamiento de grandes muestras (Rojas y González, 2006). La PCR-RT tiene la capacidad de identificar y detectar de forma más rápida microorganismos de crecimiento lento o aquellos que sean difíciles de cultivar (Forbes et al., 2007). Actualmente la PCR-RT permite la detección de bacterias específicas a concentración muy bajas que las técnicas convencionales no podrían hacerlo. El descubrimiento de las ADN polimerasas termoestables permitió la automatización

del proceso, lo que se traduce en reducción del tiempo de ejecución y facilidad a la hora de realizar la técnica (Rojas y González, 2006).

En los alimentos, está la posibilidad que las bacterias entren en un estado fisiológico que son viables pero que no son capaces de crecer en placa (BVNC) debido principalmente a lesiones celulares o a ambientes hostiles a su fisiología. Un análisis microbiológico por metodología clásica daría un resultado negativo en el alimento mientras que la PCR-RT detectaría la presencia de dicho microorganismo. (Microbial, 2009).

4.7. LIMITACIONES DE LA PCR.

La PCR es una técnica reciente y por lo tanto no está ampliamente incorporada a los métodos estandarizados. Estas técnicas son relativamente complicadas y necesitan de mano de obra experimentada para llevarse a cabo. Además el equipo y los reactivos para realizarla son caros y necesitan de una inversión inicial elevada (Palomino y González, 2014).

Otra de las limitaciones de las técnicas de PCR radica en que la amplificación del material genético se produce tanto en las células viables como en las muertas. Es decir, podemos obtener un resultado positivo a partir de una muestra de alimento en la que todos los microorganismos hayan sido destruidos posiblemente como consecuencia del proceso tecnológico aplicado (Martin, 2010). Además, en la técnica está la posibilidad de la existencia de inhibidores en las muestras de alimentos, que no permiten una extracción/amplificación correcta del ADN, y nos conduciría a obtener falsos negativos (Rojas y González, 2006).

5. GESTIÓN DE LA CALIDAD.

Los laboratorios de diagnóstico microbiológico, tanto clínicos como agroalimentarios y medioambientales, requieren metodologías eficaces en los continuos controles analíticos que realizan. Además, la predisposición de ciertos microorganismos a causar brotes epidemiológicos, unida a la continua emergencia de patógenos, obliga a los laboratorios a estar preparados para ofrecer respuestas analíticas rápidas y eficaces (Tomás et al., 2007). Por ello, los laboratorios deben disponer de procedimientos de control de calidad para comprobar la validez de los ensayos y calibraciones realizadas (ISO, 2005). Esto se consigue mediante la implantación en el laboratorio de un Sistema de Calidad que implica la adopción de las medidas necesarias para mantener un adecuado registro de todos los resultados obtenidos en los procesos, eliminar o reducir los errores que pueden deberse al personal, al instrumental, a los productos, a los procedimientos de toma de muestras o a la metodología utilizada, con el fin de garantizar credibilidad y confianza de la información generada y asegurar que las técnicas analíticas utilizadas sean adecuadas, seguras, reproducibles y fidedignas (Tomás et al., 2007). En este sentido, el empleo de métodos de referencia, reconocidos y aceptados, es la herramienta más eficaz para obtener estas garantías (Camaró, 2013).

Como se cita en el apartado 1.1.4., los laboratorios de Salud pública desarrollan su actividad en un marco de aseguramiento de la calidad y de acreditación de los procedimientos analíticos. En España, la acreditación ISO:17025 de ámbito internacional para pruebas analíticas concretas, la otorga el organismo nacional y oficial de calidad (ENAC) (Fernández, 2005). Por lo tanto todos los métodos analíticos de Salud Pública deben estar acreditados por dicho organismo.

Aunque los laboratorios de Salud Pública plenamente acreditados puedan generar resultados experimentales de elevada reproducibilidad, dichos resultados podrían llevar a error si el proceso de validación del ensayo no se hubiera realizado de la forma adecuada. Por ello la validación de un ensayo es el esqueleto que sustenta el producto básico de cualquier laboratorio de diagnóstico. La validación puede definirse como el conjunto de procesos desarrollados para la “confirmación mediante examen y, la aportación de evidencias objetivas que demuestren el

cumplimiento de ciertos requisitos para el uso específico previsto de los procedimientos analíticos” (Camaró, 2013).

5.1. TIPOS DE MÉTODOS.

El laboratorio debe utilizar métodos de ensayo y/o calibración que sean apropiados para los ensayos o calibraciones realizados, preferiblemente los publicados como normas internacionales (ISO, 2005). La naturaleza y extensión de las actividades de validación y de las evidencias a presentar a ENAC para demostrar dicha validez dependerá del tipo de método seleccionado (ENAC, 2014). Los tipos de métodos se agrupan en cuatro según las directrices definidas por la Entidad Nacional de Acreditación: métodos normalizados, métodos alternativos al método de referencia, métodos normalizados con modificaciones o basados en métodos de referencia y otros métodos (Camaró, 2013).

5.1.1. MÉTODOS NORMALIZADOS.

Los métodos normalizados son desarrollados por organizaciones reconocidas y aceptadas por el sector técnico en cuestión sin estar en duda para ser aceptados por ENAC como fuente fiable de elaboración de métodos normalizados (ENAC, 2014). Estos métodos normalizados son considerados como de referencia ya que pueden ser utilizados para evaluar otros métodos desarrollados para la misma determinación. No requieren una validación completa, pero si la confirmación de su correcta aplicación. Para ello hay que verificar la capacidad para cumplir de forma satisfactoria los requisitos establecidos en dichos métodos, tales como reproducibilidad, repetibilidad y exactitud. Se trata de métodos que el laboratorio aplica como ya está descrito en las normas (Camaró, 2013).

5.1.2. MÉTODOS ALTERNATIVOS AL MÉTODO DE REFERENCIA.

Son métodos que han sido validados por comparación con el método de referencia que corresponda, de acuerdo a un estándar aceptado y que sean reconocidos formalmente como equivalentes al método de referencia por una organización técnica competente e independiente de acuerdo a unos datos experimentales obtenidos por ejemplo en ejercicios de intercomparación. En esta categoría suelen incluirse los métodos desarrollados por los fabricantes de equipos. El laboratorio deberá poseer evidencias de la validación del método. Se tratarán a efectos de validación como los métodos de referencia (Camaró, 2013).

5.1.3. MÉTODOS BASADOS EN MÉTODOS DE REFERENCIA.

Son métodos descritos en procedimientos internos del laboratorio, que están basados claramente en métodos de referencia, y que no suponen una modificación técnica respecto del método de referencia, entendiéndose como “modificación técnica” aquella que ponga en cuestión la validez técnica del método. Estos métodos no precisan de una validación completa, pero si la comprobación de su correcto funcionamiento (Camaró, 2013).

5.1.4. OTROS MÉTODOS.

Son aquellos métodos desarrollados por el propio laboratorio o por organizaciones externas al laboratorio (ENAC, 2014). La validación de este método debe ser todo lo extensa que sea necesario para atender las necesidades de la aplicación o campo de aplicación en cuestión (ISO, 2005). Por tanto, para este tipo de métodos, el laboratorio deberá disponer de evidencias de haber sido evaluada su idoneidad con el fin propuesto, empleando sistemáticas de validación reconocidas para este fin. ENAC deberá tener acceso a las evidencias de demuestren que dichos métodos han sido adecuadamente validados. El laboratorio deberá disponer información suficiente sobre el trabajo experimental realizado para la validación del método así como de las

evidencias de su adecuado funcionamiento en el laboratorio. Dicha información deberá demostrar de manera indiscutible la validez del método (ENAC, 2014).

5.2. VALIDACIÓN DE UN MÉTODO ANALÍTICO.

Existen dos modalidades o tipos de validación: validación primaria y validación secundaria o verificación (Camaró, 2013). La validación primaria de un método analítico es un paso fundamental para asegurar que los resultados entregados por dicho método son creíbles (Instituto Salud Pública de Chile, 2010). El objetivo o meta de la validación primaria es establecer los límites operacionales y las características de desempeño de un método nuevo, modificado o caracterizado en forma inadecuada. La validación primaria debe llevarse a cabo por los laboratorios o las casas comerciales que diseñan un equipo diagnóstico, una prueba nueva o la unión en un solo protocolo de varios métodos normalizados. Por otro lado, la validación secundaria o verificación se centra en la reunión de evidencias acerca de que el laboratorio está capacitado para cumplir especificaciones establecidas en la validación primaria. Es la confirmación de que se cumplen los requisitos en las condiciones de uso de ese laboratorio. Las muestras naturales constituyen el material de ensayo óptimo y el trabajo solo requiere tratar el procedimiento dentro de los límites operacionales establecidos por la validación primaria (Camaró, 2013).

5.3. MÉTODO ALTERNATIVO DE DETECCIÓN DE *LISTERIA MONOCYTOGENES* POR PCR-RT EN ALIMENTOS.

Todos los laboratorios de Salud Pública de Valencia están acreditados a través de la ENAC y se consideran competentes para la realización de análisis oficiales, ya que cumplen los requisitos establecidos en ISO/IEC 17025. Una vez cumplen estos requisitos cada departamento establece unos métodos analíticos, los cuáles deberán ser validados por ENAC. En el caso de la detección de *L. monocytogenes* por PCR a tiempo real en alimentos se utiliza un método analítico alternativo al método oficial.

Los métodos alternativos que han sido validados por comparación con el método de referencia que corresponda, de acuerdo a un estándar aceptado y que son generalmente reconocidos por la comunidad científica y tecnológica como equivalentes al método de referencia, se consideran como métodos normalizados de acuerdo a la definición establecida en el apartado A.2. del anexo I del CGA-ENAC-LEC a la hora de ser verificados por los laboratorios (ENAC, 2015). Y por lo tanto, se realizará la misma validación secundaria que a un método de referencia.

Según el CGA-ENAC-LEC rev.6 las evidencias de que un laboratorio debe disponer para demostrar la validez de los métodos normalizados o de referencia de ensayos cualitativos es el límite de detección. Además según el apartado 3.1. de la nota técnica 32 de ENAC, puede obtenerse información sobre las características de funcionamiento de los métodos a través de actividades de control de calidad interno y en la participación en intercomparativos (control de calidad externo).

Esta técnica utiliza un reactivo liofilizado, basado en una sonda de hidrólisis tipo Taqman. Esta sonda está marcada con un fluorocromo donador (Reporter FAM) en el extremo 5' que emite fluorescencia al ser excitado y un aceptor (Quencher, NFQ-MGB) en el extremo 3' que absorbe la fluorescencia liberada por el donador. Al mismo tiempo utiliza un set de *primers* específicos para un segmento del gen *L. monocytogenes* y un control interno positivo de amplificación (ICP) consistente en un ADN plasmídico. La sonda utilizada para el ICP tiene como Reporter el VIC y como Quencher el NFQ-MGB.

La cantidad de fluorescencia emitida durante cada ciclo de la PCR será proporcional a la cantidad de ADN que se está amplificando.

Únicamente las muestras que de un resultado positivo, así como las inhibidas, serán confirmadas. La confirmación se realizará a partir del caldo de enriquecimiento obtenido por siembra en agar ALOA y observación de las colonias crecidas.

Para un desarrollo óptimo de la técnica se emplean diferentes parámetros de control en sus distintas etapas. En ellos se sustenta la capacidad de la PCR-RT para ofrecer resultados fiables y que no lleven a duda su veracidad. Estos parámetros son:

- a. Control positivo del proceso (CPP): muestra contaminada artificialmente con el organismo diana (*L. monocytogenes*), que debe ser tratada de la misma manera que las muestras para análisis. Esto permite verificar que el comportamiento global de la técnica es satisfactorio.
- b. Control negativo del proceso (CNP): caldo de cultivo exento del microorganismo patógeno diana (*L. monocytogenes*) que pasa por todas las etapas del proceso analítico. Para asegurarse que no hay una contaminación cruzada durante todas las etapas de la técnica.
- c. Control de amplificación interno (ICP): ADN plasmídico añadido a cada reacción en una cantidad o número de copias definido que sirve como un control interno de la amplificación. Este control nos permite observar que la amplificación se realiza de una manera correcta.
- d. Control positivo de extracción (CE): Suspensión de *L. monocytogenes* a una concentración determinada. Nos permite controlar que la eficiencia de la extracción y la amplificación es la esperada. Nos da una idea de la precisión del método en reproducibilidad.
- e. Control negativo de la PCR (CNPCR): reacción realizada con agua exenta de ADN sin ningún inhibidor de la PCR. El objetivo principal de este control es asegurar que los reactivos no se contaminan durante la preparación de la placa.

6. OBJETIVOS.

Con el objetivo de realizar la validación secundaria o verificación de esta técnica, se ha adquirido un *kit* ya validado según norma ISO16140 por la casa comercial y que se ha reconocido formalmente como equivalente al método de referencia por AFNOR, será igual a la del método de referencia. Esta validación consiste en:

- Validación del límite de detección del método, que deberá ser inferior a 10 u.f.c./cantidad de muestra procesada.
- Validación del porcentaje de falsos negativos.

A pesar de que el único cumplimiento por ley que precisa esta técnica es que el límite de detección sea correcto, el departamento de Microbiología de Salud Pública de Valencia ve conveniente que se analicen los siguientes parámetros:

- Validación del rendimiento o eficiencia de la reacción de PCR-RT, que deberá estar comprendida entre 95-105% y un coeficiente de correlación (R) $> 95\%$.
- Validación del límite instrumental de PCR-RT, que nos será de utilidad para establecer la concentración a utilizar en el control de extracción.

Además en este estudio comprobamos que los parámetros de validación se cumplen a lo largo del tiempo, estudiando:

- Verificación del límite de detección obtenido en la validación.
- Comparación entre el porcentaje de falsos positivos obtenidos a lo largo del tiempo y los obtenidos en la validación.
- Estudio de la precisión del método a lo largo del tiempo.

7. MATERIAL Y MÉTODOS.

7.1. CEPAS EMPLEADAS.

Para la elaboración de inóculos con el fin de contaminar las muestras de alimentos para el control positivo del proceso se utilizó la cepa de referencia de *L. monocytogenes* CECT935.

7.2. MEDIOS DE CULTIVO Y REACTIVOS.

Todos los medios de cultivo y reactivos para llevar a cabo la validación del método son:

- TSA (agar peptona de caseína-peptona de harina de soja): es un medio de uso general que permite el crecimiento de microorganismos exigentes y no exigentes. Su composición en g/l es: 15g peptona de caseína, 5g peptona de harina de soja, 5g cloruro sódico, 15g agar-agar.
- ALOA: es un medio cromógeno para el aislamiento selectivo, enumeración y presunta identificación de *Listeria monocytogenes* y *Listeria spp.*. Todas las especies crecen en la placa produciendo colonias azul turquesa (actividad β -glucosidasa). Un halo opaco aparece alrededor de las colonias de *L. monocytogenes* y *L. ivanovii* (actividad fosfolipasa C). Su composición en g/l es: 18g peptona de carne, 10g cloruro de litio, 10g extracto de levadura, 6g triptona, 5g cloruro de sodio, 2,5g di-sodio hidrogeno fosfato anhidro, 2g glucosa, 2g sodio piruvato, 0,5g magnesio sulfato, 0,05g x glucósido, 13,5g agar.
- ALOA CONFIRMACIÓN: es un medio cromógeno para el aislamiento selectivo, enumeración y presunta identificación de *Listeria monocytogenes*, a través de la observación de tres de sus características bioquímicas: la primera es la expresión de la fosfolipasa C responsable de un halo opaco, la segunda es la expresión de la β -glucosidasa que mediante el producto cromógeno permite una coloración azul-verdosa y la tercera observación es la fermentación de la ramnosa que provoca un viraje a amarillo alrededor de las colonias típicas.
- CALDO Fraser-Semi: utilizado como medio de enriquecimiento selectivo de *L.monocytogenes* en muestras de alimentos. Su composición en g/L es: 5g peptona proteosa, 5g triptona, 5g extracto de carne, 5g extracto de levadura, 20g cloruro sódico, 12g fosfato disódico anhidro, 1,5g fosfato monopotásico, 1g esculina, 3g cloruro de litio.
- ADE: agua destilada estéril.
- Agua calidad PCR
- PreSEQ Rapid Spin Bead-BEating Sample Prep Kit® constituido por:
 - Tampón de lisis, un tubo con 5 ml.
 - Columnas para la preparación de muestras.
 - Tubos con zirconio de 1,5 ml.
 - Proteinasa k (20mg/ml), tubo con 1,25 ml.
- MicroSEQ *L. monocytogenes* Detection Kit® conteniendo:
 - *L. monocytogenes* target Assay Beads, 96 tubos en tiras de 8 tubos con todos los reactivos necesarios para la reacción de la PCR liofilizados.
 - MicroAmp Optical 8-Cap Strips, doce tiras para 8 tubos cada una.
 - Control negativo: Pathogen Detection Negative Control. Un tubo con 1,5 ml.

7.3. EQUIPOS Y MATERIALES.

Todos los equipos empleados durante la realización de las diferentes actividades necesarias para la validación fueron:

- Bolsas de filtro.
- Pinzas estériles.
- Cabinas de flujo laminar horizontal para el procesamiento de las muestras.
- Guantes de vinilo o trinito que no contengan talco.
- Cabinas de PCR.
- Bloque calefactor agitador.
- Agitador tipo vórtex.
- Tubos de 1.5 ml de capacidad.
- Tubos con tapón de rosca de 1.7 ml de capacidad.
- Columnas para la preparación de muestras por centrifugación.
- Tubos para insertar las columnas.
- Tubos para la preparación de las muestras con zirconio.
- Pipetas Pasteur de plástico, estériles.
- Microcentrífugas.
- Pipetas automáticas de volumen variable.
- Puntas estériles con filtro antiaerosol para micropipetas.
- Soporte para 96 tubos de reacción.
- Tiras con 8 tubos de reacción sin reactivo.
- Tapas para tiras de 8 tubos de reacción.
- Centrífuga con accesorio para placas y tubos de PCR.
- PCR. Applied Biosystems© 7.500 Fast.: Provisto de termociclador, lector de fluorescencia y ordenador.
- Estufa termo-regulable a $37^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$.

7.4. MUESTRAS.

Para la validación del método se han utilizado los resultados de los análisis de los últimos tres años, en muestras que llegaron al laboratorio para el análisis de *L. monocytogenes*. Sobre las cuáles yo realicé parte de dichos análisis, en el 2014 y 2015. Las muestras que se analizaron fueron previamente establecidas en el VISA. Dichas muestras se clasificaron en grupos de alimentos para diferenciar entre diversas matrices: carnes y derivados, pescados y derivados, productos lácteos, harinas y derivados, vegetales troceados, comidas preparadas, helados y bebidas no alcohólicas.

7.5. MÉTODOS.

7.5.1. MÉTODO DE ENRIQUECIMIENTO.

Se realizará en la sala de siembras, dentro de una cabina destinada a ello y con el uso de guantes.

Los pasos a seguir para preparación de las muestras son:

1. Pesada de 25 gramos del alimento, dentro de una cabina de flujo laminar y con pinzas estériles, de forma homogénea en bolsa de filtro de tal forma que la muestra a analizar sea representativa de toda la cantidad de producto.
2. Añadir 225 gramos de Caldo Fraser-semi, con una precisión del 5%.
3. Incubar las muestras a $37^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$ durante 18 a 24 horas.

En el caso del control negativo del proceso los pasos a seguir son:

1. Añadir 250 gramos de Caldo Fraser-semi, con una precisión del 5%.
2. Incubar a $37^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$ durante 18 a 24 horas con el resto de las muestras.

7.5.2. PREPARACIÓN DEL INÓCULO DE *LISTERIA MONOCYTOGENES*.

A partir de las cepas de *L.monocytogenes* conservadas en el laboratorio de Salud Pública, se hará una siembra por aislamiento en agar nutritivo Se incubará en el medio de cultivo a $37^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$ durante 48 horas. Una vez el cultivo presente crecimiento, se hará una suspensión con la ayuda de un asa de cultivo, en agua destilada estéril. Al mismo tiempo se preparará un tubo con ADE, que se utilizará como blanco.

Se medirá la absorbancia tanto del blanco: (absorbancia 0) como de la suspensión inicial así preparada, en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 550nm. Los valores de absorbancia obtenidos se introducirán en la siguiente ecuación, que nos permitirá conocer de forma estimativa la concentración en ufc/ml de la suspensión inicial preparada (A), sabiendo que Mc Farland: 0.125 unidades de absorbancia, a 550 nm se corresponden con una concentración del orden de 1.5×10^8 ufc/ml.

$$\text{Concentración} = (150 \times \text{Absorbancia} / 0.125) \times 10^6$$

El resultado de la concentración nos permite determinar el volumen, que añadiremos a los tubos que contienen 9 ml de ADE, para obtener la concentración de 10^7 .

7.5.3. PROTOCOLO DE EXTRACCIÓN DEL ADN.

Para la extracción del ADN de las muestras se ha seguido la metodología dada por el fabricante del kit comercial. Esta metodología queda detallada en el anexo II.

7.5.4. PROTOCOLO DE PREPARACIÓN DE LA PLACA DE PCR-RT.

Los reactivos se encuentran en el interior de los microtubos liofilizados, por lo tanto no hay que preparar nada, solamente saber el número de reacciones que necesitamos realizar. Para la preparación de la placa se toma el soporte se colocan las filas de 8 microtubos con el reactivo que necesitamos. Las filas tienen que ser de ocho, por lo tanto si nuestro número de tubos necesarios es menor completaremos lo que le falte a la fila con tubos vacíos. Destapar los microtubos con la precaución de que la perla que contienen el reactivo se encuentre en el fondo de los microtubos. Agitar en vórtex los tubos que contienen las muestras y los controles. Dar un spin (centrifugar los tubos en la microcentrífuga a velocidad máxima 10 segundos) a todos los tubos para evitar la formación de gotículas que podrían producir contaminación cruzada. Añadir 30 μl de: los ADN extraídos de las muestras y de sus duplicados con inóculo, el control negativo del proceso y un control negativo de la PCR (compuesto por agua calidad PCR) en los pocillos asignados. Cambiar de punta pipeta cada vez. Sellar las series de tubos con las tiras de tapas transparentes. Centrifugar los tubos 1.500 rpm durante 2 minutos. La placa ya está preparada para introducir en el termociclador.

Utilizaremos la placa especial para la colocación de los tubos en el termociclador para evitar las pérdidas de señal de las columnas exteriores. Además para los tubos en el termociclador, la distribución de las muestras en el mismo es conveniente hacerla utilizando las columnas centrales de la placa, poniendo en las columnas 1 y 12 dos tiras de pocillos vacíos cuando no vayan a ser utilizadas.

7.5.5. PROTOCOLO DE PROGRAMACIÓN DE LA PCR-RT.

1. Condiciones del termociclador y las sondas.

- a. *Experiment properties* seleccionamos las propiedades siguientes:
 - i. *7500 Fast Relat-Time.*
 - ii. *Quantitation-Standard curve*
 - iii. *Taqman Reagents*
 - iv. *Standard 2 hours to completed a run.*
- b. En *Plate Setup*. Aparecerá la pantalla para definir los *targets* y las muestras:
 - i. *Targets:*
 1. *L. monocytogenes:* Reporter FAM; Quencher NFQ-MGB y elegir un color.
 2. IPC: Reporter VIC, Quencher NFQ-MGB y elegir un color.
- c. Introducir las muestras y los controles y asignar posición en la planilla.

2. Condiciones de amplificación.

Estableceremos el volumen de la reacción (30µl) y el número de ciclos (40) así como las temperaturas y los tiempos para la amplificación. La lectura de la fluorescencia se realizará en la fase de acoplamiento y extensión.

Tabla 2. Condiciones de amplificación.

ETAPAS	ACTIVACIÓN DEL ENZIMA	PCR	
	HOLD	CICLOS (40)	
		desnaturalización	acomplamiento/ extensión
TEMPERATURA	95°C	95°C	60°C
TIEMPO	2 minutos	3 segundos	30 segundos

3. Condiciones de Análisis.

Indicaremos cuales son los parámetros de análisis:

Para el target de *Listeria* en *CT Setting for Listeria* se seleccionan las condiciones:

-Threshold: 0,5.

-Baseline: Auto.

Para el target de IPC en *CT Setting for IPC* seleccionar:

-Threshold: 0,3.

-Baseline: Auto.

(Valores establecidos por el fabricante)

4. Análisis de amplificación:

En la pantalla nos aparece un gráfico en el que, en el eje de ordenadas se representan los valores de ΔRn y en el eje de abscisas los ciclos de amplificación. En él podemos visualmente comprobar las muestras que presentan amplificación. En el informe de resultados obtenemos los valores de los Ct correspondientes al IPC y al microorganismo diana de cada muestra y control.

Siendo ΔRn = El aumento de la fluorescencia generada por el reporter en cada ciclo durante la amplificación.

-View Plate Layout: Podemos ver la placa con los valores de los C_t obtenidos para el ICP y para la *L. monocytogenes*.

-Amplification plot: Aparece la gráfica con las curvas de amplificación. En el caso de que no aparezca amplificación el resultado será negativo.

En la figura 9 se contempla la imagen del software cuando un resultado es positivo. Dos líneas horizontales (azul y roja) establecen los límites umbral de fluorescencia para el ICP y *L. monocytogenes*.

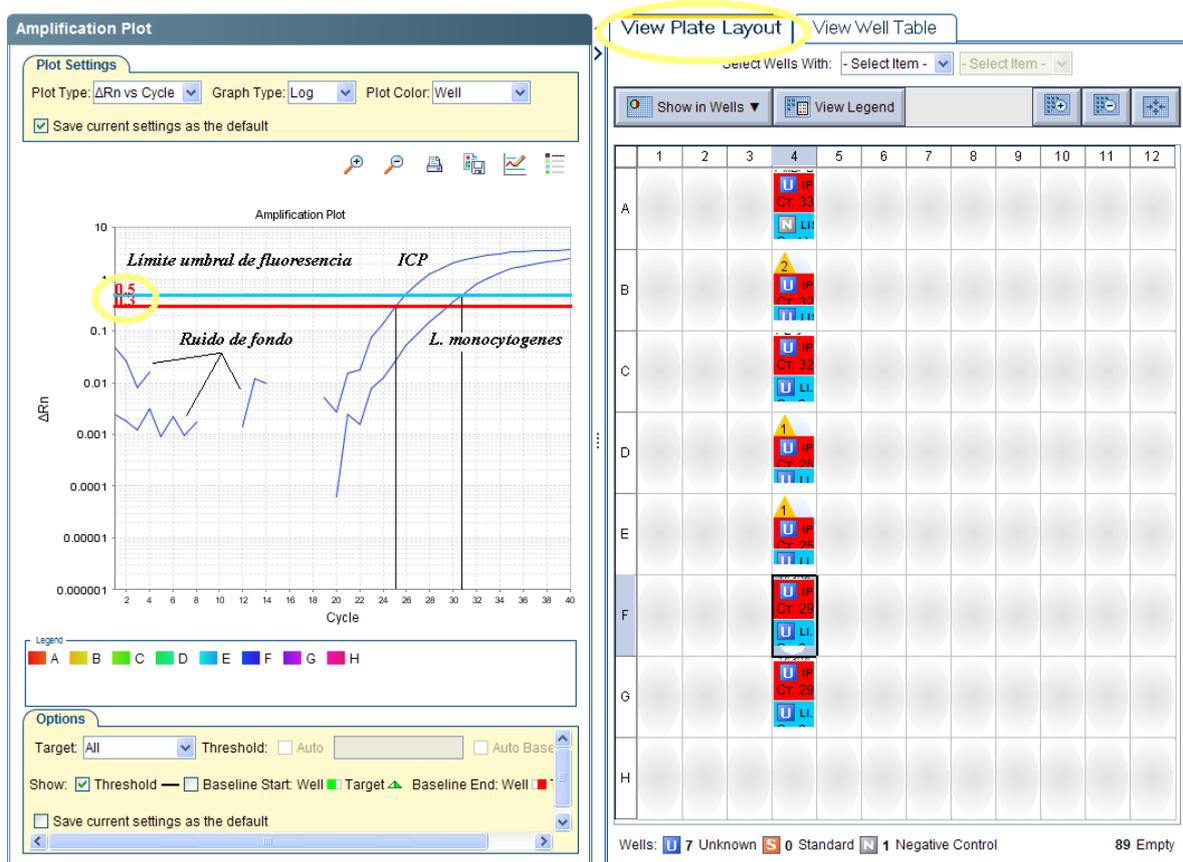


Figura 9. Resultado de una curva amplificación de una muestra positiva.

7.5.6. TRATAMIENTO DE RESULTADOS.

Una vez obtenida la curva de amplificación el tratamiento de los resultados será:

- “AMPLIFICA” todo pocillo del que se obtenga un valor de C_t .
- “NO AMPLIFICA” todo pocillo del que no se obtenga un valor de C_t .

Se verificará que los controles dan el resultado esperado:

Tabla 3. Resultados de los parámetros de control.

TARGET	CE	CPP	CNP	CNPCR
<i>L. monocytogenes</i>	AMPLIFICA	AMPLIFICA	NO AMPLIFICA	NO AMPLIFICA
IPC	AMPLIFICA/NO	AMPLIFICA/NO	AMPLIFICA	AMPLIFICA

Una vez verificados los resultados de los controles se realiza la lectura de los resultados en las muestras. Los posibles resultados se recogen de la siguiente forma:

Tabla 4. Resultados en muestras.

TARGET (<i>L. monocytogenes</i>)	IPC	RESULTADO
AMPLIFICA	AMPLIFICA	POSITIVO
AMPLIFICA	NO AMPLIFICA	POSITIVO
NO AMPLIFICA	AMPLIFICA	NEGATIVO
NO AMPLIFICA	AMPLIFICA Ct > Ct + 2 unidades CNPCR	INHIBICION PARCIAL
NO AMPLIFICA	NO AMPLIFICA	INHIBIDO

El valor aceptado del C_t para el IPC del CNPCR deberá estar comprendido entre 25 y 35 (dato del fabricante).

Los resultados positivos se confirmaran por:

- Siembra en agar ALOA de 100 µl de las soluciones madre contenidas en el tubo del punto 2 del protocolo de extracción de ADN a través de una triple estría con asa de siembra.
- Incubación a 37°C±1°C durante 24 a 48 horas.
- Comprobar la presencia de colonias típicas de *L. monocytogenes*, colonias regulares, redondas, de color azul o azul-verdoso (detección de beta-glucosidasa por medio de un substrato cromogénico específico) y que presentan además, un halo opaco.

En los casos en que el resultado de la muestra sea inhibido o inhibido parcial se confirmaran los resultados de la siguiente manera:

- Siembra en agar ALOA de 100 µl de las soluciones madre contenidas en el tubo del punto 2 del protocolo de extracción de ADN.
- Incubación a 37°C±1°C durante 24 a 48 horas.
- Comprobar la presencia de colonias típicas de *L. monocytogenes*, colonias regulares, redondas, de color azul o azul-verdoso (detección de beta-glucosidasa por medio de un substrato cromogénico específico) y que presentan además, un halo opaco. Confirmar la presencia en la placa de agar ALOA de colonias típicas con el medio ALOA CONFIRMACIÓN. A partir de las colonias típicas y aisladas sobre ALOA, realizar una siembra por estría en la superficie del medio ALOA CONFIRMACIÓN. Incubar las placas a 37°C±1°C durante 24±2horas.
- Comprobar la presencia de colonias típicas de *L. monocytogenes*, coloración azul/verde, halo opaco y viraje del indicador a amarillo.

7.6. VALIDACIÓN DEL LÍMITE DE DETECCIÓN.

Antes de empezar la técnica para la validación del límite de detección se preparó un inóculo a una concentración estimada de 10 u.f.c./200 µl, a partir del preparado en el apartado 7.5.2. De dicho inóculo se añadieron 200 µl a las muestras inoculadas. Además se sembraran por duplicado 200 µl, en agar TSA con el fin de comprobar el número de ufc de la misma y en medio agar ALOA para comprobar su pureza. El recuento en estas placas debe ser ≤10 (límite de detección de la técnica).

7.6.1. PROCESAMIENTO DE LAS MUESTRAS.

Se utilizaron para la validación, muestras que llegaron al laboratorio para el análisis de *L.monocytogenes*. A las muestras se les realizó el enriquecimiento, la extracción de ADN y la PCR-RT. El tipo y el número de muestras se recogen en la siguiente tabla:

Tabla 5. Muestras empleadas en la validación del método.

Grupo de alimentos	Blanco	Inoculadas	Total
Carnes y derivados	6	2	8
Pescados y derivados	6	6	12
Productos lácteos	3	3	6
Harinas y derivados	3	3	6
Vegetales y troceados	2	2	4
Comidas preparadas	3	3	6
Helados	19	19	38
Bebidas no alcohólicas	5	5	10
Total			90

Paralelamente, a todas las alícuotas no inoculadas se les aplicó el procedimiento interno de “*Listeria* en alimentos”. Para asegurarnos que éstas son negativas al microorganismo diana.

Todas las muestras fueron confirmadas en ALOA a través de los procedimientos internos.

7.6.2. LECTURA DE LOS RESULTADOS.

Una vez obtenidos los resultados de la PCR-RT, su confirmación y los resultados del procedimiento interno de “*Listeria* en alimentos”. Clasificamos los resultados de la siguiente forma:

Tabla 6. Lectura y clasificación de resultados.

Nº registro	Resultado teórico	Resultado teórico	Método validar	Método validar	Clasificación
	+	-	+	-	

Nº Registro = tipo de muestra

Resultado teórico (+) = todas las muestras inoculadas

Resultado teórico (-) = todas las muestras no inoculadas y que en el procedimiento de “*Listeria* en alimentos” es negativo.

Método a validar (+) = PCR/Procedimiento con resultado positivo.

Método a validar (-) = PCR/Procedimiento con resultado negativo.

La clasificación del resultado tiene 4 posibilidades:

a= Resultados positivos correctamente asignados.

b= Resultados negativos asignados erróneamente (falsos negativos).

c= Resultados positivos asignados erróneamente (falsos positivos).

d= Resultados negativos asignados correctamente.

7.7. VALIDACIÓN DEL PORCENTAJE DE FALSOS NEGATIVOS.

Un falso negativo es el número de resultados negativos asignados erróneamente. Para la verificación del porcentaje de falsos negativos utilizaremos los datos obtenidos en la validación del límite de detección. Todos los resultados de PCR de las muestras inoculadas que hayan tenido un resultado negativo se consideraran falsos negativos de la técnica mientras que si el resultado es negativo en la confirmación se considerará un falso negativo del procedimiento/método. Dicho valor debe ser de cero en ambos casos.

7.8. VALIDACIÓN DE LA EFICIENCIA INSTRUMENTAL DE LA PCR-RT.

La eficiencia instrumental de la PCR-RT es la capacidad de respuesta que tiene el equipo de ser lineal expresada con la siguiente ecuación:

$$Ct = m * \log () + b$$

Ct= ciclo de amplificación en el que la fluorescencia corta el valor umbral.

m= pendiente de la curva.

()= concentración de ADN.

b= ordenada en el origen.

Para comprobar la eficiencia de la reacción de PCR-RT en nuestro procedimiento prepararemos una suspensión inicial de *L. monocytogenes*, a una concentración estimada por espectrofotometría de 10^6 ufc/ml, cuya concentración se comprobará mediante siembra por duplicado y en profundidad en agar TSA, de la dilución 10^2 ufc/ml.

A partir de la suspensión inicial se realiza la extracción de ADN según procedimiento y se lleva a cabo una serie de diluciones decimales hasta obtener una suspensión con una concentración teórica de 1 copia/reacción posteriormente se realiza la amplificación. Este procedimiento se realizará por triplicado y se calculará la media de los tres valores. Con los resultados obtenidos detectamos el nivel mínimo en el que se observa señal de amplificado, sin pérdida de la linealidad. A partir de la recta (calculada automáticamente por el software de equipo) se obtiene la eficiencia instrumental de la PCR-RT, relacionada con la pendiente de la recta de la siguiente manera:

$$\text{Eficiencia} = (10^{(-1/m)} - 1) \times 100 \text{ (expresado en \%)}$$

7.9. VALIDACIÓN DEL LÍMITE INSTRUMENTAL DE LA PCR-RT.

El límite instrumental es la concentración más pequeña de ufc que genera un resultado positivo con un nivel de fiabilidad del 90% en las condiciones de trabajo establecidas en los procedimientos normalizados de trabajo.

Para ello, se realiza una suspensión del microorganismo diana, a una concentración estimativa de 10^6 u.f.c./ml la cual se comprobará mediante siembra por duplicado y en profundidad en agar TSA, de la dilución 10^2 u.f.c./ml.

A partir de esta suspensión se realizan diluciones decimales seriadas, hasta llegar a una concentración teórica de 1 u.f.c./ml. Posteriormente se procede a la extracción de ADN diana de cada una de las diluciones, a través del protocolo de extracción del ADN.

Se realiza la amplificación/detección por triplicado de cada dilución. Una vez obtenemos los resultados establecemos que nuestro límite de detección instrumental de la PCR-RT es el valor

más bajo por el cuál el equipo nos registra un Ct. Además con los resultados obtenemos una recta y podemos establecer cual es la menor concentración del microorganismo diana en ufc/ml por debajo de la cual se pierde la linealidad. Con este valor se obtiene el límite de cuantificación instrumental y se establece la concentración del control de extracción de la PCR-RT, que será 100 veces superior al mismo.

7.10. VERIFICACIÓN DEL LÍMITE DE DETECCIÓN OBTENIDO EN LA VALIDACIÓN.

Para ello cada día que se realiza una PCR-RT se inocular una muestra con una cantidad determinada (<10 u.f.c.) como límite de detección y se comprueba que la respuesta de la PCR-RT es positiva.

7.11. VERIFICACIÓN DEL PORCENTAJE DE FALSOS POSITIVOS DE LA PCR-RT.

Con los resultados positivos en PCR-RT durante los años 2013, 2014 y 2015 sobre muestras no inoculadas realizamos un control del porcentaje de falsos positivos. Para ello se evalúan todas las muestras donde el resultado de la amplificación es positivo. Sobre estos resultados se calcula la fracción entre los que tienen confirmación negativa y todos los que tienen amplificación positiva.

El objetivo de este parámetro es controlar a lo largo del tiempo que la técnica recoge un elevado porcentaje de positivos correctamente asignados.

Durante esta verificación se ha comprobado que en las muestras con un alto contenido en grasa, el número de resultados falsos positivos, en la técnica de PCR-RT, queda reducido al introducir la proteinasa K.

7.12. PRECISIÓN DE LA TÉCNICA PCR-RT A LO LARGO DEL TIEMPO.

Este parámetro nos informa de que la respuesta de la PCR-RT obtenida a lo largo del tiempo en condiciones de reproducibilidad (distintos técnicos, lotes, equipos,...) para una concentración determinada de m.o. diana está comprendida dentro de los límites establecidos:

-Límite de alarma: media de los valores C_t obtenidos ± 2 veces su desviación estandar. Podemos obtener un total de 1 valor por cada 20 resultados fuera de rango.

-Límite de control: media de los valores C_t obtenidos ± 3 veces su desviación estandar. Cualquier valor obtenido fuera de este rango llevará a estudio la respuesta del equipo.

Utilizaremos los controles de extracción de cada serie analítica de la PCR-RT.

8. RESULTADOS.

8.1. RESULTADOS DE LA VALIDACIÓN DEL LÍMITE DE DETECCIÓN.

Los resultados obtenidos a través de las tareas descritas en el apartado 7.6. para la validación del límite de detección se encuentran en el anexo III. y a partir de dichos resultados conformamos dos tablas, la primera para el estudio de los resultados de la PCR-RT y la segunda para los resultados del procedimiento:

Tabla 7. Resultados de la validación del límite de detección en PCR-RT.

Nº Registro	Resultado teórico	Resultado teórico	Método a validar (PCR-RT)	Método a validar (PCR-RT)	Clasificación
	+	-	+	-	
Carnes y derivados	2		2		a
		6		6	d
Pescados y derivados	6		6		a
		2	2		c
		4		4	d
Productos lácteos	3		3		a
		3		3	d
Harinas y derivados	3		3		a
		3		3	d
Vegetales troceados	2		2		a
		2		2	d
Comidas preparadas	3		3		a
		3		3	d
Helados	19		19		a
		12	12		c
		7		7	d
Bebidas no alcohólicas	5		5		a
		5		5	d

Tabla 8. Resultados de la validación del límite de detección del procedimiento.

N° Registro	Resultado teórico	Resultado teórico	Método validar	Método validar	Clasificación
	+	-	+	-	
Carnes y derivados	2		2		a
		6		6	d
Pescados y derivados	6		6		a
		6		6	c
Productos lácteos	3		3		a
		3		3	d
Harinas y derivados	3		3		a
		3		3	d
Vegetales y troceados	2		2		a
		2		2	d
Comidas preparadas	3		3		a
		3		3	d
Helados	19		19		a
		19		19	c
Bebidas no alcohólicas	5		5		a
		5		5	d

Tras los resultados se puede concluir que el límite de detección obtenido es ≤ 10 u.f.c./muestra procesada al comprobarse que todas las muestras inoculadas dieron un resultado positivo tanto en la técnica de PCR-RT como en el procedimiento. Además se obtuvieron los porcentajes de falsos positivos de la técnica de PCR-RT y del procedimiento. Siendo estos 24.5% y 0 % respectivamente.

8.2. RESULTADOS DE LA VALIDACIÓN DEL PORCENTAJE DE FALSOS NEGATIVOS.

Una vez obtenidos los resultados de validación del límite de detección y recogidos en el apartado anterior se comprueba que el porcentaje de falsos negativos es de cero tanto de la técnica de PCR-RT como del método en conjunto, es decir, todas las muestras que fueron inoculadas con el microorganismo diana tuvieron una respuesta positiva tanto en la técnica de PCR-RT como en el procedimiento de la misma.

8.3. RESULTADOS DE LA VALIDACIÓN DE LA EFICIENCIA DE LA PCR-RT.

Tras la lectura de la siembra en profundidad del TSA por duplicado con un resultado de 50 u.f.c/ml, calculamos la concentración de las distintas diluciones preparadas proporcionalmente.

En la siguiente tabla se registran los 3 ciclos de amplificación donde la fluorescencia corta el valor umbral, la media de los tres ciclos y la concentración de microorganismos en la reacción.

Tabla 9. Resultados de la PCR-RT en la validación de la eficiencia de la técnica.

	Prueba 1	Prueba 2	Prueba 3	Media
Concentración (m.o./ml)	Ct			
5	Negativo	Negativo	Negativo	-
50	Negativo	Negativo	38,59	38,59
500	33,0736	33,6895	33,3883	33,3838
5000	29,9612	30,0821	30,048	30,03043
50000	26,8199	26,8891	26,7958	26,83493
500000	23,4399	23,3413	23,3098	23,36367
5000000	20,3263	20,2951	20,2599	20,29377

A partir de los datos obtenidos en la tabla anterior realizamos un gráfico de dispersión donde en el eje de abscisas se sitúan las concentraciones y en el eje de ordenadas los ciclos de amplificación. Como se puede observar el resultado es una serie de puntos que al unirlos obtenemos una recta de tipo logarítmica. Con una pendiente de $m=-3.285$ y una $R^2=0.999$.

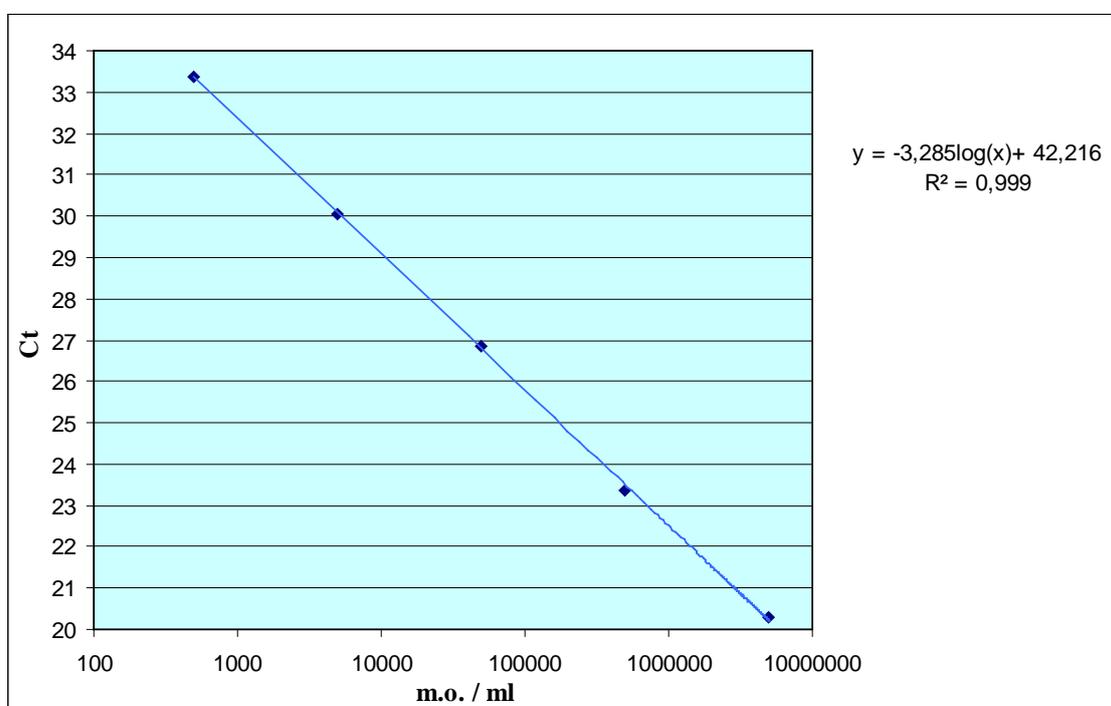


Figura 10. Gráfica de la eficiencia de la PCR-RT.

Conociendo “m” podemos obtener el valor de la eficiencia en porcentaje:

$$\text{Eficiencia} = (10^{(-1/m)} - 1) \times 100 = 102 \%$$

8.4. RESULTADOS DE LA VALIDACIÓN DEL LÍMITE INSTRUMENTAL DE LA PCR-RT.

Tras la lectura de la siembra en profundidad del TSA por duplicado con un resultado de 50 u.f.c./ml, calculamos la concentración de las distintas diluciones preparadas proporcionalmente.

En la siguiente tabla se registran los ciclos de amplificación por triplicado, la media de los tres y la concentración de m.o. en la reacción.

Tabla 10. Resultados de la PCR-RT en la validación del límite instrumental.

	Prueba 1	Prueba 2	Prueba 3	Media
Concentración (m.o./ml)	Ct			
5	Negativo	37,95	38,38	38,165
50	38,14	Negativo	35,53	36,835
500	32,7719	33,1408	32,8281	32,9136
5000	29,9973	30,0214	29,9669	29,9952
50000	26,7197	26,8837	26,7925	26,79863
500000	23,5417	23,4754	23,4943	23,5038
5000000	20,3102	20,2537	20,2761	20,28

A partir de los datos obtenidos en la tabla se fija el límite instrumental de la PCR-RT en 5 u.f.c./ml. Además, al realizar una recta con los diferentes puntos, excluyendo los datos en los que la respuesta no es lineal, establecemos que el límite de cuantificación es 500 u.f.c./ml. Por lo tanto el control de extracción será de 5×10^4 u.f.c./ml.

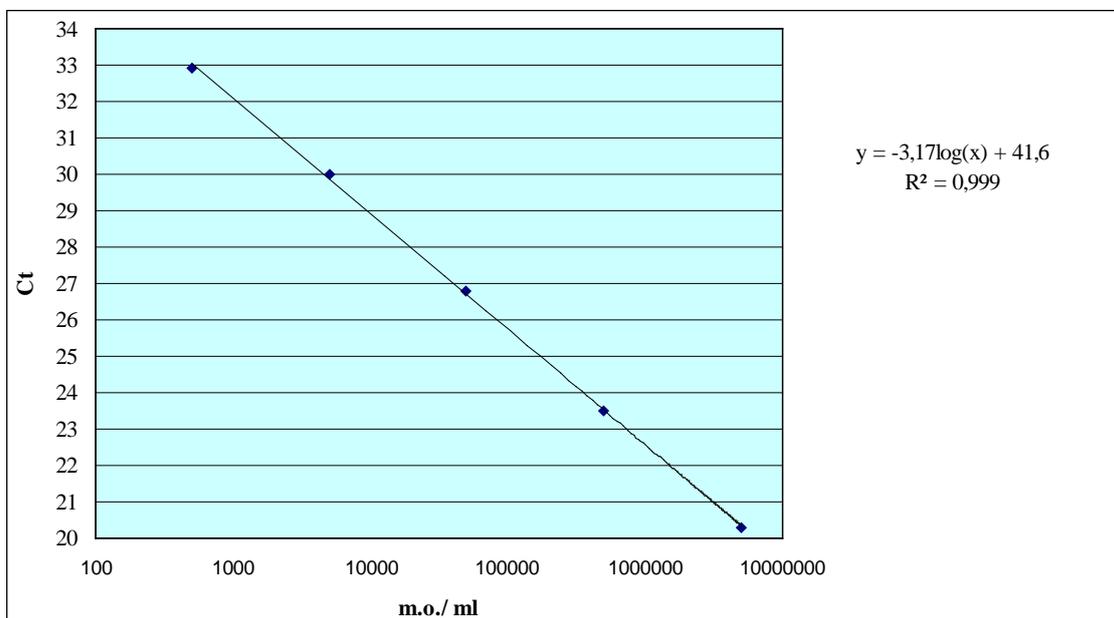


Figura 11. Gráfica del límite instrumental de la PCR-RT.

8.5. RESULTADOS DE LA VERIFICACIÓN DEL LÍMITE DE DETECCIÓN OBTENIDO EN LA VALIDACIÓN.

Durante la realización de todas las tandas de muestras desde el 2013 a 2015 el resultado de las muestras inoculadas ha sido positivo. Por lo tanto el límite de detección obtenido en la validación continúa siendo correcto. Sin obtener ni un solo falso negativo.

8.6. RESULTADOS DE LA VERIFICACIÓN DEL PORCENTAJE DE FALSOS POSITIVOS DE LA PCR-RT.

Con los resultados recogidos en el anexo IV elaboramos una tabla resumen con los siguientes datos:

Tabla 11. Resultados de la PCR-RT en la verificación del porcentaje de falsos positivos.

Positivos (PCR)			
Grupo de alimento	Positivos	Falsos positivos	Total
Carnes y derivados	4	3	7
Pescados y derivados	39	3	42
Productos lácteos	1	1	2
Harinas y derivados	5	0	5
Vegetales troceados	15	1	16
Comidas preparadas	67	11	78
Helados	0	6	6
Bebidas no alcohólicas	26	1	27
Total	157	26	183

El cálculo del porcentaje de falsos positivos es la fracción de los resultados positivos asignados erróneamente entre el total de los resultados positivos. Dicho valor es 16,56%. Con este dato se considera que la técnica a lo largo del tiempo ha sido perfeccionada ya que en la validación el resultado de falsos positivos fue mayor. Esto se debe a la utilización de la proteínasa K que elimina posible inhibidores de la PCR.

8.7. RESULTADOS DE LA PRECISIÓN DE LA TÉCNICA PCR-RT A LO LARGO DEL TIEMPO.

Con los resultados recogidos en el anexo V obtenemos la media y los límites en el control de extracción:

- Media (Ct): 30,69
- Límite alarma superior (LAS): 33,73
- Límite alarma inferior (LAI): 27,66
- Límite control superior (LCS): 35,25
- Límite control inferior (LCI): 26,14

Una vez calculados los límites para la precisión de la PCR-RT realizamos una gráfica.

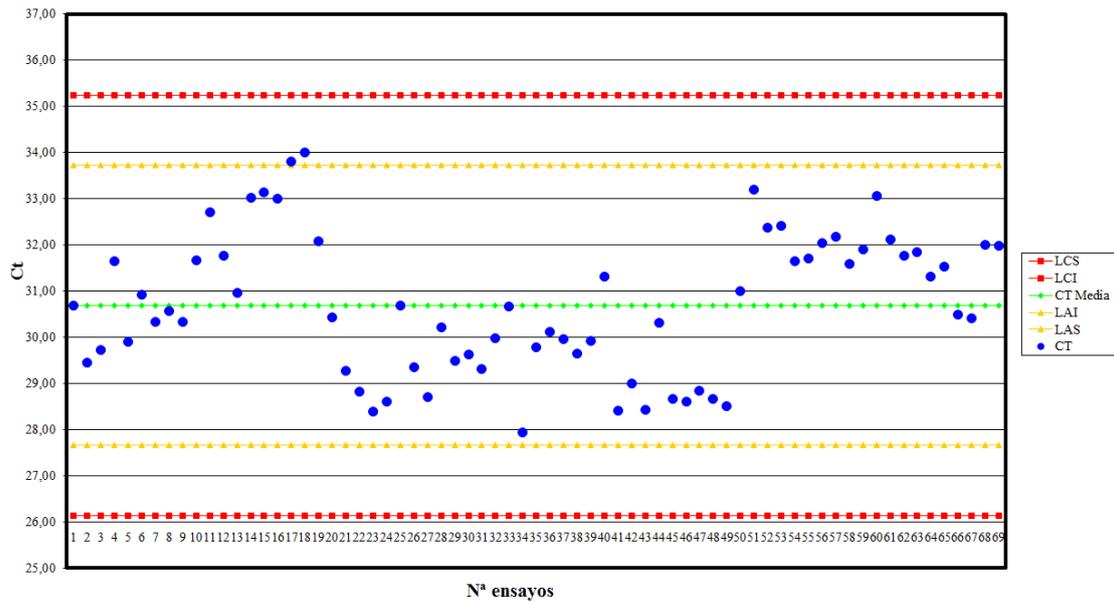


Figura 12. Gráfica de controles de extracción a lo largo del tiempo.

Visualmente, la gráfica nos permite establecer que del total de los 69 resultados únicamente dos controles de extracción se sitúan fuera del rango de alarma, con ello podemos confirmar que la respuesta del equipo es precisa a lo largo del tiempo.

9. CONCLUSIONES.

- Los resultados obtenidos cumplen con los requisitos exigidos en la validación del método: el límite de detección es inferior a 10 ufc/cantidad de muestra procesada y el porcentaje de falsos negativos es igual a cero.
- La verificación del método a lo largo del tiempo ha sido satisfactoria, manteniéndose el límite de detección y el porcentaje de falsos negativos obtenidos en la validación.
- La utilización de la PCR-RT como técnica de cribado es adecuada por su rápida respuesta ya que permite la emisión de un informe negativo en 24 horas.
- El método cumple con las exigencias descritas en el RD 2073/2005 para la detección de *L. monocytogenes* en alimentos.
- Este trabajo confirma que el uso de PCR-RT con confirmación es una alternativa válida frente a los métodos convencionales en el análisis de detección de *L. monocytogenes* en alimentos.

10. BIBLIOGRAFÍA.

- ADAMS, M.; MOSS, M., 1995. *Microbiología de los alimentos*. Ed. ACRIBIA S.A., Zaragoza.
- AGUILERA, P.; RUIZ M.; PINEDA B.; CHÁNEZ M. E., 2014. PCR en tiempo real, en: *Herramientas moleculares aplicadas en ecología: aspectos teóricos y prácticos*. Instituto nacional de ecología y cambio climático. México.
- ALLERBERGER, F.; WAGNER, M., 2010. Listeriosis: a resurgent foodborne infection. *European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*. Vol.16. nº 1. 16-23 pp.
- ARELY, Y.; RODRÍGUEZ, R.; NOÉ, C.; VEGA, M.; CONTRERAS, J. C., 2009. Extracción de ADN de alimentos altamente procesados utilizando el método de Graham modificado. *Acta química Mexicana*. Vol. 1. nº 1. México.
- BOVER, S.; GARRIGA, M., 2014. *Condiciones que determinan el crecimiento y la supervivencia de Listeria Monocytogenes en alimentos listos para el consumo*. Institut de Recerca i tecnologia agroalimentàries. Generalitat de Catalunya.
- CAMARÓ, M. L.; CATALÁ, V.; GIMENO, C.; MARTÍNEZ, R.; OLMOS, P., 2013. *Validación y verificación analítica de los métodos microbiológicos*. Procedimientos en Microbiología Clínica. Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología clínica.
- COSTA, J., 2004. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) a tiempo real. *Enfermedades infecciosas microbiología clínica*, volumen 22. Nº 5. 299-305.
- DE ALBA, D.; RUEDA, A., 2013. Determinación del ciclo umbral y la eficiencia para PCR cuantitativa en tiempo real. *Revista de educación bioquímica*. Vol. 32. nº 1. 36-39.
- DOYLE, M.; BEUCHAT, L.; MONTEVILLE, T., 1997. *Microbiología de los alimentos. Fundamentos y fronteras*. Ed. ACRIBIA S.A., Zaragoza.
- ELEY, A., 1992. *Intoxicaciones alimentarias de etiología microbiana*. Ed. ACRIBIA S.A., Zaragoza.
- ENAC, 2014. *Criterios generales para la acreditación de laboratorios de ensayo y calibración según norma UNE-EN ISO/IEC 17025:2005*. CGA-ENAC-LEC. Rev.6.
- ENAC, 2015. *Análisis microbiológico: Documento aclaratorio*. Nota técnica 32. Rev. 5. <https://www.enac.es/documents/7020/704de3a8-e6c0-48b1-a326-c6f96bbbcbcd>.
- ESPINOSA, L., 2007. Guía práctica sobre la técnica de PCR, en: *Ecología molecular*. Universidad Nacional Autónoma de México. 517-536, visto el 8 de Noviembre de 2015. <http://www2.inecc.gob.mx/publicaciones/download/530.pdf>
- FERNÁNDEZ, C. 2005. Elaboración y gestión de los procedimientos y otros documentos de calidad del laboratorio. *Gestión de la calidad en el laboratorio clínico*. Ed. Médica panamericana. Madrid, 121-165.
- FORBES, B.; SAHM, D.; WEISSFELD, A., 2007. *Diagnóstico microbiológico*. 12ª edición. Ed. Médica Panamericana. Madrid. 1026pp.
- HERRÁEZ, A., 2012. *Texto ilustrado e interactivo de biología molecular e ingeniería genética. Conceptos, técnicas y aplicaciones en ciencias de la salud*. Ed. Elsevier España, S.L.. Barcelona.
- HUI, J. Y.; GORHAM, J. R.; MURRELL, K. D. ; CLIVER, D. O., 1994. *Foodborne Disease Handbook. Diseases Caused by Bacteria*. Volumen 1. Ed. Marcel Dekker, Inc. New York.
- GARRIDO, AMANDO.; TEIJON, J. M.; BLANCO, D.; VILLAVERDE, C.; MENDOZA, C.; RAMIREZ, J., 2006. *Fundamentos de bioquímica estructural*. 2ª edición. Ed. Tébas, S.L.. Madrid. 444pp.

- ICMSF, 1996. *Microbiología de los alimentos. Características de los patógenos microbianos*. Ed. ACRIBIA S.A., Zaragoza.
- INSTITUTO DE SALUD PÚBLICA DE CHILE, 2010. *Aspectos generales sobre la validación de métodos*. Validación de métodos y determinación de la incertidumbre de la medición. Guía técnica n° 1. Santiago.
- ISO 17025:2005, 2005. Evaluación de la conformidad. Requisitos generales para la competencia de los laboratorios de ensayo y de calibración.
- JACQUET, C.; CATIMEL, B.; BROSCHE, R.; BUCHRIESER, C.; DEHAUMONT, P.; GOULET, V.; LEPOUTRE, A.; VEIT, P.; ROCOURT, J., 1995, Investigations Related to the Epidemic Strain Involved in the French Listeriosis Outbreak 1992. *Applied and environmental microbiology*, vol.61. n° 6. 2242-2246pp.
- KISTLER, W.; BEST, R.; JAMIESON, A., 2011. Tecnología de ADN recombinante, en: *Bioquímica médica*, 3ª edición. Ed. Elsevier España S.L.. Barcelona, 461-479.
- HERRÁEZ, A., 2012. *Texto ilustrado e interactivo de Biología molecular e ingeniería genética. Conceptos, técnicas y aplicaciones en ciencias de la salud*. Elviesier España S.L., Barcelona. 512 pp.
- HERRANZ, C., 2008. Métodos rápidos y automatización en microbiología alimentaria, *Revista de tecnología e higiene de los alimentos*. N° 392. 109-113 pp.
- LENDERMAN, W., 2008. *En memoria de Lister*. Hospital Luis Calvo Mackenna Santiago, Chile. Laboratorio de microbiología.
- LENDERMAN, W., 2007. *Una historia personal de las bacterias*. Ril editores. Santiago de Chile. 135 pp.
- LEOTTA, G., 2009. Métodos rápidos: una herramienta útil y práctica para el análisis microbiológico de los alimentos. *Revista argentina de microbiología*. N° 41:63-64.
- MARTIN, R., 2010. Métodos rápidos y automatizados aplicados al análisis microbiológico de los alimentos, en: *Monografía XXI: Aspectos higiénicos de los alimentos microbiológicamente seguros*. Real Academia Nacional de Farmacia. 67-98. <http://www.analesranf.com/index.php/mono/issue/view/402>.
- MICROBIAL, 2009. *Los falsos positivos en PCR: ¿solamente falsas alarmas?*. Informaciones sobre análisis microbiológicos por PCR. Núm 5. Microbial S.L.
- OIE, 2008. *Listeria Monocytogenes, capítulo 2.9.7. Manual de la OIE sobre animales terrestres, visto el 16 de Noviembre de 2015*. http://web.oie.int/esp/normes/mmanual/pdf_es_2008/2.09.07.%20Listeria%20monocytogenes.pdf
- PADILLA, C. A.; DÍEZ, J.; MARTÍNEZ, E.; BÁRCENA, J. A.; GARCÍA, C.. *Electroforesis de ácidos nucleicos en geles de agarosa*. Prácticas generales de bioquímica y biología molecular. Universidad de Córdoba, visto el 10 de Diciembre de 2015. <http://www.uco.es/dptos/bioquimica-biol-mol/pdfs/17%20ELECTROFORESIS%20ACS%20NUCLEICOS%20GELES%20AGAROSA.pdf>.
- PALOMINO, C.; GONZÁLEZ, Y.; 2014. Técnicas moleculares para la detección e identificación de patógenos en alimentos: ventajas y limitaciones. *Rev. Peru Med. Exp. Salud pública*, 31(3): 535-546.
- PASCUAL, M^a. R.; CALDERÓN, V., 2000. *Microbiología alimentaria. Metodología analítica para alimentos y bebidas*. Ed. Díaz de Santos, S.A., 2ª edición, Madrid.

PEÑA, A.; ARROYO, A.; GÓMEZ, A.; TAPIA, R., 2006. *Bioquímica*. Ed. Noriega. México. 183 pp.

PÉREZ, A. M., 2011, *Reacción en cadena de la polimerasa (Polymerase Chain Reaction, PCR)*. Universidad politécnica de Valencia, visto el 17 de Noviembre de 2015. <https://riunet.upv.es/bitstream/handle/10251/10700/Reacci%C3%B3n%20en%20cadena%20de%20la%20polimerasa.pdf>

Reglamento (CE) nº 178/2002 del Parlamento Europeo y del consejo, de 28 de enero de 2002, por el que se establecen los principios y los requisitos generales de la legislación alimentaria, se crea la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria y se fijan procedimientos relativos a la seguridad alimentaria. Visto el 16 de Noviembre de 2015. <http://www.boe.es/buscar/doc.php?id=DOUE-L-2002-80201>.

Reglamento (CE) nº 852/2004 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 29 de abril de 2004, relativo a la higiene de los productos alimenticios. <http://www.boe.es/buscar/doc.php?id=DOUE-L-2004-81035>.

Reglamento (CE) nº 882/2004 del Parlamento Europeo y del Consejo de 29 de abril de 2004, sobre los controles oficiales efectuados para garantizar la verificación del cumplimiento de la legislación en materia de piensos y alimentos y la normativa sobre salud animal y bienestar de los animales. <http://www.boe.es/buscar/doc.php?id=DOUE-L-2004-81110>.

Reglamento (CE) nº 2073/2005 de la Comisión, de 15 de noviembre de 2005, relativo a los criterios microbiológicos aplicables a los productos alimenticios. <http://www.boe.es/buscar/doc.php?id=DOUE-L-2005-82539>.

ROCA, P.; OLIVER, J.; RODRÍGUEZ, A., 2003. *Bioquímica. Técnicas y métodos*. Ed. Hélice. Madrid.

RODRÍGUEZ, I.; BARRERA, H., 2004. *La reacción en cadena de la polimerasa a dos décadas de su invención*. Ciencia UANL. Vol. VII, nº 3. 323-335 pp.

RODRÍGUEZ, M.; RODRÍGUEZ, W., 2006. PCR en tiempo real. *Métodos físicos-químicos en biotecnología*. Instituto de biotecnología. Universidad Nacional Autónoma de México.

ROJAS, R.; GONZÁLEZ, T., 2006. Detección e identificación de bacterias causantes de enfermedades transmitidas por alimentos mediante la reacción en cadena de la polimerasa. *Bioquímica*, 31: 69-76.

SOMMA, M.; QUERCI, M., 2007. Curso de formación sobre análisis de la presencia de organismos genéticamente modificados en muestras de alimentos. *Manual del participante*. Oficina de Publicaciones Oficiales de las Comunidades Europeas. Luxemburgo.

STANIER, R.; INGRAHAN, J.; WHEELIOS, M.; PAINTER, P., 1992. *Microbiología*. Ed. Reverté S.A.. Barcelona. 746pp.

TAMAY, L.; IBARRA, C.; VELAQUILLO, C., 2013. *Fundamentos de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y de la PCR en tiempo real*. Investigación a discapacidad. Vol.2, Núm.2. 70-78 pp.

TOMAS, D.; BOSCH, A.; CATALÁN, V.; PINTÓ, R. M.; RODRIGUEZ, M.; RODRÍGUEZ, D., 2007. Comisión de normalización y validación. *Informe técnico sobre normalización de métodos moleculares basados en la amplificación de ácidos nucleicos por la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), aplicados al análisis microbiológico de aguas y alimentos*. Sociedad española de microbiología.

VINUEZA, C., 2009, PCR a tiempo real: la nueva era de la información genética celular. *Revista electrónica de veterinaria*. Vol. 10. nº 2. 1-13.

YOUSEF, A.; CARLSTROM, C., 2003. *Microbiología de los alimentos. Manual de laboratorio*. Ed. ACRIBIA S.A., Zaragoza.

11. ANEXOS.

I. ANÁLISIS DE *L. MONOCYTOGENES* SEGÚN RD2073/2005.

Categoría de alimentos	Microorganismos/sus toxinas, metabolitos	Plan de toma de muestras (1)		Límites (2)		Método analítico de referencia (3)	Fase en la que se aplica el criterio
		n	c	m	M		
1.1. Alimentos listos para el consumo destinados a los lactantes, y alimentos listos para el consumo destinados a usos médicos especiales (4)	<i>Listeria monocytogenes</i>	10	0	Ausencia en 25 g		EN/ISO 11290-1	Productos comercializados durante su vida útil
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
1.3. Alimentos listos para el consumo que no pueden favorecer el desarrollo de <i>L. monocytogenes</i> , que no sean los destinados a los lactantes ni para usos médicos especiales (4) (8)	<i>Listeria monocytogenes</i>	5	0	100 ufc/g		EN/ISO 11290-2 (6)	Productos comercializados durante su vida útil

II. PRÓTOCOLO DE EXTRACCIÓN DEL ADN.

Se realizara en la sala destinada para la extracción.

1. Limpieza de manos y puesta de guantes libres de polvo.
2. Preparar el número necesario de tubos vacíos, tipo 1,5 ml de capacidad y transvasar 1 ml de solución madre de cada muestra y de cada duplicado.
3. Preparar el número necesario de tubos con zirconio e insertar en ellos la columna del kit de extracción y colocarlos en una gradilla.
4. Trasvasar 750 µl de cada uno de los tubos preparados en el punto 2, a las columnas preparadas correctamente identificadas.
5. Colocar el tubo con la columna en la microcentrífuga de forma adecuada, (uno si, uno no, con el tapón hacia abajo y colocar la tapa de la centrífuga). Centrifugar a una velocidad de 13.000 rpm durante 3 minutos. Obtendremos en el tubo insertado debajo de la columna un sedimento oscuro.
6. Descartar la columna y eliminar cuidadosamente el sobrenadante, usando una pipeta Pasteur estéril con punta fina o pipeta automática de volumen variable, sin coger el zirconio presente. Cerrar el vial y cambiar de pipeta, o de punta, cada vez. En el caso de que se haya formado una capa de grasa en la parte superior aspirar con la pipeta realizando un movimiento circular desde la superficie hasta eliminar todo el sobrenadante sin alterar el sedimento.
7. Añadir 500 µl de agua calidad PCR. Cerrar el vial y cambiar de punta de pipeta cada vez. En el caso de muestras muy grasas en las que queda las grasas adheridas a las paredes del tubo, recoger el sedimento con el zirconio en dos veces con 250 µl de agua calidad PCR, y transferirlo al tubo limpio para evitar arrastrar la grasa de las paredes del tubo.
8. Agitar en un agitador tipo Vórtex, para que se mezcle el contenido del tubo.
9. Centrifugar los tubos en una microcentrífuga a 13.000 rpm durante 3 minutos.
10. Descartar el sobrenadante.
11. Lisis en muestras sin lípidos:
 - 11.1. Añadir 50 µl de tampón de lisis.
 - 11.2. Agitar los tubos en el accesorio del Vórtex durante 5 minutos a las velocidad 5.
 - 11.3. Centrifugar a 13000 rpm durante 10 segundos. Pasar al punto 13.
12. Lisis cuando la muestra tiene un alto contenido en lípidos: Se tratarán por este procedimiento de extracción las muestras de Salmón ahumado y pescados grasos; horchatas; productos lácteos tales como: quesos, pasteles con nata, helados y aquellos alimentos que contengan chocolate.

- 12.3. Reactivo: Añadir 5 µl de proteinasa K por cada 50 µl de tampón de lisis.
 12.4. Añadir 55 µl de la mezcla anterior al sedimento.
 12.5. Agitar los tubos en el accesorio del vortex durante 5 minutos a la velocidad 5.
 12.6. Centrifugar a 13.000 rpm durante 10 segundos.
 12.7. Incubar a 56±2°C durante 30 minutos. Agitar y pasar los punto 13.
13. Incubar en el bloque calefactor durante 10 minutos 97±2°C.
 14. Dejar los tubos a temperatura ambiente durante 2 minutos para que se enfríen.
 15. Centrifugar los tubos en una microcentrífuga a 13.000 rpm durante 1 minuto.
 16. Añadir 250 µl de agua calidad PCR.
 17. Centrifugar los tubos en una microcentrífuga a 13.000 rpm durante 1 minuto.
 18. El sobrenadante obtenido contiene el ADN extraído. Se puede utilizar directamente del tubo para la extracción o separar a otro tubo limpio una fracción para su procesamiento o conservación.
 19. Desechar los guantes y lavarse las manos. Cambiar de bata y guantes para pasar a la sala de Preparación de Reactivos y colocar los tubos en la cabina de PCR.

III. RESULTADOS DE LA VALIDACIÓN DEL LÍMITE DE DETECCIÓN.

Carnes y derivados			
Nº Registro	Producto	Ct	Confirmación
325	Jamón serrano	Negativo	Negativo
326	Jamón serrano	Negativo	Negativo
327	Jamón serrano	Negativo	Negativo
328	Jamón serrano	Negativo	Negativo
329	Jamón serrano	Negativo	Negativo
330	Jamón serrano	Negativo	Negativo
329 CPP	Jamón serrano	25,75	Positivo
330 CPP	Jamón serrano	25,56	Positivo

Pescados y derivados			
Nº Registro	Producto	Ct	Confirmación
3862-1	Salmón ahumado	Negativo	Negativo
3862-1 CPP	Salmón ahumado	36,9	Positivo
3861	Salmón ahumado	17,62	Negativo
3861 CPP	Salmón ahumado	36,96	Positivo
3862	Salmón ahumado	Negativo	Negativo
3862 CPP	Salmón ahumado	29,39	Positivo
3864	Salmón ahumado	38,47	Negativo
3864 CPP	Salmón ahumado	33,87	Positivo
3897	Salmón ahumado	Negativo	Negativo
3897 CPP	Salmón ahumado	34,96	Positivo
3901	Bacalao ahumado	Negativo	Negativo
3901 CPP	Bacalao ahumado	29,62	Positivo

Harinas y derivados			
Nº Registro	Producto	Ct	Confirmación
362	Ensaimada crema	Negativo	Negativo
362 CPP	Ensaimada crema	35,68	Positivo
367	Milhojas	Negativo	Negativo
367 CPP	Milhojas	37,22	Positivo
368	Pastel capuchino	Negativo	Negativo
368 CPP	Pastel capuchino	38,12	Positivo

Helados			
Nº Registro	Producto	Ct	Confirmación
6664	Helado nata	Negativo	Negativo
6664 CPP	Helado nata	29,37	Positivo
7996	Helado vainilla	Negativo	Negativo
7996 CPP	Helado vainilla	31,52	Positivo
8829	Helado café	Negativo	Negativo
8829 CPP	Helado café	28,81	Positivo
8931	Helado limón	Negativo	Negativo
8931 CPP	Helado limón	30,07	Positivo
6283	Helado vainilla/chocolate	9,93	Negativo
6283 CPP	Helado vainilla/chocolate	30,24	Positivo
6320	Helado nata/fresa	27,53	Negativo
6320 CPP	Helado nata/fresa	27,59	Positivo
6499	Helado leche merengada	14,73	Negativo
6499 CPP	Helado leche merengada	17,25	Positivo
6595	Helado leche merengada	25,63	Negativo
6595 CPP	Helado leche merengada	26,71	Positivo
6625	Helado vainilla	32,14	Negativo
6625 CPP	Helado vainilla	25,5	Positivo
5880-1	Helado nata	30,34	Negativo
5880-1 CPP	Helado nata	29,9	Positivo
5880-2	Helado nata	23,47	Negativo
5880-2 CPP	Helado nata	31,8	Positivo
5880-3	Helado nata	31,43	Negativo
5880-3 CPP	Helado nata	30,63	Positivo
5880-4	Helado nata	27,56	Negativo
5880-4 CPP	Helado nata	33,19	Positivo
5880-5	Helado nata	35,34	Negativo
5880-5 CPP	Helado nata	30,96	Positivo
5064	Helado tutti-frutti	33,75	Negativo
5064 CPP	Helado tutti-frutti	28,85	Positivo
5474	Tarta laminada	39,01	Negativo
5474 CPP	Tarta laminada	28,49	Positivo
5479	Tarta helada queso/fresas	Negativo	Negativo
5479 CPP	Tarta helada queso/fresas	30,38	Positivo
5483	Helado sándwich nata	Negativo	Negativo
5483 CPP	Helado sándwich nata	30,54	Positivo
5486	Helado cono nata	Negativo	Negativo
5486 CPP	Helado cono nata	32,44	Positivo

Productos lácteos			
N° Registro	Producto	Ct	Confirmación
598	Queso curado	Negativo	Negativo
598 CPP	Queso curado	39,14	Positivo
599	Queso curado	Negativo	Negativo
599 CPP	Queso curado	32,85	Positivo
602	Queso curado	Negativo	Negativo
602 CPP	Queso curado	35,53	Positivo

Comidas preparadas			
N° Registro	Producto	Ct	Confirmación
2756	Puré verduras	Negativo	Negativo
2756 CPP	Puré verduras	24	Positivo
2759	Puré pollo y verdura	Negativo	Negativo
2759 CPP	Puré pollo y verdura	24,85	Positivo
2761	Panga al horno	Negativo	Negativo
2761 CPP	Panga al horno	30,89	Positivo

Vegetales y troceados			
N° Registro	Producto	Ct	Confirmación
2754	Ensalada vegetal	Negativo	Negativo
2754 CPP	Ensalada vegetal	34,04	Positivo
2784	Ensalada de tomate	Negativo	Negativo
2784 CPP	Ensalada de tomate	33,37	Positivo

Bebidas no alcohólicas			
N° Registro	Producto	Ct	Confirmación
5896-1	Horchata	Negativo	Negativo
5896-1 CPP	Horchata	31,51	Positivo
5896-2	Horchata	Negativo	Negativo
5896-2 CPP	Horchata	33,28	Positivo
5896-3	Horchata	Negativo	Negativo
5896-3 CPP	Horchata	31,76	Positivo
5896-4	Horchata	Negativo	Negativo
5896-4 CPP	Horchata	30,39	Positivo
5896-5	Horchata	Negativo	Negativo
5896-5 CPP	Horchata	33,31	Positivo

IV. RESULTADOS DE LA VERIFICACIÓN DEL PORCENTAJE DE FALSOS POSITIVOS.

2013

N° Registro	Ct	Cultivo	Producto	Grupo alimento
1134	28,46	P	Ensalada vegetal	Vegetales y troceados
1159	36,1	P	Embutido frito casero	Comidas preparadas
1418	24,75	P	Ensaladilla rusa	Comidas preparadas
1858	25,76	P	Longaniza de pascua	Carnes y derivados
1903	30,91	P	Ensalada queso fresco	Comidas preparadas
2138	23,49	P	Ensalada	Vegetales y troceados
3807-1	22,92	P	Macarrones boloñesa	Comidas preparadas
3807-2	23,39	P	Macarrones boloñesa	Comidas preparadas
3807-3	23,34	P	Macarrones boloñesa	Comidas preparadas
3807-4	22,91	P	Macarrones boloñesa	Comidas preparadas
3807-5	25,76	P	Macarrones boloñesa	Comidas preparadas
3812-3	26,73	P	Ensaladilla	Comidas preparadas
4206-2	32,73	P	Ensalada especial	Comidas preparadas
4535-1	21,79	P	Ensalada iceberg	Vegetales y troceados
4535-2	20,08	P	Ensalada iceberg	Vegetales y troceados
4535-3	21,82	P	Ensalada iceberg	Vegetales y troceados
4535-4	20,92	P	Ensalada iceberg	Vegetales y troceados
4535-5	22,97	P	Ensalada iceberg	Vegetales y troceados
4823-1	33,2	N	Helado tutti-fruti	Helados
4823-2	28,7	N	Helado tutti-fruti	Helados
4823-3	33,34	N	Helado tutti-fruti	Helados
4823-4	34,36	N	Helado tutti-fruti	Helados
4823-5	35,06	N	Helado tutti-fruti	Helados
5140	29,95	P	Horchata de chufa natural	Bebidas no alcohólicas
5141-1	35,87	P	Horchata de chufa natural	Bebidas no alcohólicas
5141-2	32,94	P	Horchata de chufa natural	Bebidas no alcohólicas
5141-3	33,65	P	Horchata de chufa natural	Bebidas no alcohólicas
5141-4	35,4	P	Horchata de chufa natural	Bebidas no alcohólicas
5321-4	24,03	N	Granizado de leche merengada	Helados
6532-1	34,23	P	Gazpacho	Comidas preparadas
6532-3	27,21	P	Gazpacho	Comidas preparadas
6532-5	31,42	P	Gazpacho	Comidas preparadas
6814	22,86	P	Horchata de chufa natural	Bebidas no alcohólicas
6815	32,14	P	Horchata de chufa natural	Bebidas no alcohólicas
6826	30,31	P	Horchata de chufa natural	Bebidas no alcohólicas
6914-2	37,26	N	Berenjena al horno	Comidas preparadas
7430-1	26,27	P	Salmón ahumado	Pescados y derivados
7430-2	29,19	P	Salmón ahumado	Pescados y derivados
7430-3	29,66	P	Salmón ahumado	Pescados y derivados
7430-4	28,97	P	Salmón ahumado	Pescados y derivados
7430-5	30,73	P	Salmón ahumado	Pescados y derivados
7468-4	36,43	P	Horchata de chufa natural	Bebidas no alcohólicas
7476	31	N	Horchata de chufa natural	Bebidas no alcohólicas
7753-1	33,07	P	Salmón ahumado	Pescados y derivados
7753-2	29,29	N	Salmón ahumado	Pescados y derivados
7753-3	29,8	P	Salmón ahumado	Pescados y derivados

N° Registro	Ct	Cultivo	Producto	Grupo alimento
7753-4	33,31	P	Salmón ahumado	Pescados y derivados
7753-5	33,79	N	Salmón ahumado	Pescados y derivados
8494-2	33,17	N	Callos caseros	Comidas preparadas
8543	30,89	N	Salsa de asar pollos	Comidas preparadas
8704-1	24,07	P	Salmón ahumado	Pescados y derivados
8704-3	26,42	P	Salmón ahumado	Pescados y derivados
8704-4	32,76	P	Salmón ahumado	Pescados y derivados
9207-3	31,8	P	Pate de pato a las finas hierbas	Carnes y derivados
9218-5	34,97	N	Ensalada de cangrejo	Comidas preparadas
9221-1	25,06	P	Patatas vinagreta	Comidas preparadas
9221-2	26,22	P	Patatas vinagreta	Comidas preparadas
9221-3	24,54	P	Patatas vinagreta	Comidas preparadas
9221-4	28,54	P	Patatas vinagreta	Comidas preparadas
9221-5	26,39	P	Patatas vinagreta	Comidas preparadas
9537-2	18,9	P	Canelones de carne	Comidas preparadas
9537-3	19,09	P	Canelones de carne	Comidas preparadas
9537-4	38,54	P	Canelones de carne	Comidas preparadas
9537-5	35,39	P	Canelones de carne	Comidas preparadas
9538-1	26,53	P	Sándwich salmón con almendras	Comidas preparadas
9538-2	25,84	P	Sándwich salmón con almendras	Comidas preparadas
9538-3	25,72	P	Sándwich salmón con almendras	Comidas preparadas
9538-4	25,38	P	Sándwich salmón con almendras	Comidas preparadas
9538-5	25,82	P	Sándwich salmón con almendras	Comidas preparadas
10452-1	24,55	P	Albóndigas de bacalao	Comidas preparadas
10452-2	21,56	P	Albóndigas de bacalao	Comidas preparadas
10452-3	20,06	P	Albóndigas de bacalao	Comidas preparadas
10452-4	19,91	P	Albóndigas de bacalao	Comidas preparadas
10452-5	19,8	P	Albóndigas de bacalao	Comidas preparadas

2014

Nº Registro	Ct	Cultivo	Producto	Grupo alimento
00748-5	25,88	P	Ensalada	Vegetales y troceados
1076-4	28,97	P	Ensalada cangrejo	Comidas preparadas
1832-1	23,15	N	Ensalada mixta	Comidas preparadas
1832-2	22,3	N	Ensalada mixta	Comidas preparadas
1832-3	22,9	N	Ensalada mixta	Comidas preparadas
1832-4	22,54	P	Ensalada mixta	Comidas preparadas
1832-5	23,19	N	Ensalada mixta	Comidas preparadas
2128-1	27,99	P	Anchodina	Pescados y derivados
2128-2	24,36	P	Anchodina	Pescados y derivados
2128-3	22,02	P	Anchodina	Pescados y derivados
2128-5	23,5	P	Anchodina	Pescados y derivados
2568-4	36,1	N	Queso curado cabra	Productos lácteos
3746-1	24,46	P	Mortadela	Carnes y derivados
4682-4	36,43	P	Queso ecológico de cabra	Productos lácteos
11237	23,99	P	Macarrones a la boloñesa	Comidas preparadas
11300	27,34	P	Gazpacho	Comidas preparadas
11400-1	36,54	N	Mejillón media concha	Pescados y derivados
11400-4	35,92	P	Mejillón media concha	Pescados y derivados
18292-1	33,69	P	Trucha ahumada	Pescados y derivados
18293-1	29,27	P	Salmón noruego ahumado	Pescados y derivados
18293-2	24,04	P	Salmón noruego ahumado	Pescados y derivados
18293-3	27,97	P	Salmón noruego ahumado	Pescados y derivados
18293-4	22,56	P	Salmón noruego ahumado	Pescados y derivados
18293-5	23,19	P	Salmón noruego ahumado	Pescados y derivados
18294-4	31,81	P	Salmón ahumado noruego	Pescados y derivados
18294-5	32,94	P	Salmón ahumado noruego	Pescados y derivados
21022-1	24,78	P	Sándwich vegetal	Comidas preparadas
21022-4	24,98	P	Sándwich vegetal	Comidas preparadas
21022-5	27,86	P	Sándwich vegetal	Comidas preparadas
21026-1	25,52	P	Sándwich estrella vegetal	Comidas preparadas
21026-2	26,53	P	Sándwich estrella vegetal	Comidas preparadas
21026-3	22,86	P	Sándwich estrella vegetal	Comidas preparadas
21026-4	26,88	P	Sándwich estrella vegetal	Comidas preparadas
21026-5	26,55	P	Sándwich estrella vegetal	Comidas preparadas
21650-3	23,99	P	Ensalada con huevo	Comidas preparadas
21650-5	23,38	P	Ensalada con huevo	Comidas preparadas
21897-1	34,14	P	Salmón ahumado noruego	Pescados y derivados
21897-5	31,38	P	Salmón ahumado noruego	Pescados y derivados
22560	27,11	P	Sepia con mayonesa	Comidas preparadas
22789-2	24,87	P	Ensalada de verano	Vegetales y troceados
22789-5	26,98	N	Ensalada de verano	Vegetales y troceados

2015

N° Registro	Ct	Cultivo	Producto	Grupo alimento
12233-1	36,48	P	Ensalada de cangrejo	Comidas preparadas
12233-3	29,05	P	Ensalada de cangrejo	Comidas preparadas
12233-5	37,46	P	Ensalada de cangrejo	Comidas preparadas
12144-1	29,93	P	Sándwich ensalada/pollo	Comidas preparadas
12144-2	27,94	P	Sándwich ensalada/pollo	Comidas preparadas
12144-3	32,83	P	Sándwich ensalada/pollo	Comidas preparadas
12144-4	26,46	P	Sándwich ensalada/pollo	Comidas preparadas
12135-5	36,47	N	Ensalada cesar	Comidas preparadas
11774-5	30,96	N	Jamón cocido extra	Carnes y derivados
11498-2	36,98	P	Longaniza valenciana	Carnes y derivados
11451-1	22,98	P	Salmón ahumado noruego	Pescados y derivados
11451-2	29,37	P	Salmón ahumado noruego	Pescados y derivados
11451-3	22,66	P	Salmón ahumado noruego	Pescados y derivados
11451-4	28,64	P	Salmón ahumado noruego	Pescados y derivados
11451-5	24,53	P	Salmón ahumado noruego	Pescados y derivados
11128-1	23,93	P	Dama de chocolate	Harinas y derivados
11128-2	24,39	P	Dama de chocolate	Harinas y derivados
11128-3	24,56	P	Dama de chocolate	Harinas y derivados
11128-4	24,73	P	Dama de chocolate	Harinas y derivados
11128-5	23,93	P	Dama de chocolate	Harinas y derivados
10684-1	27,19	P	Macarrones atún/tomate	Comidas preparadas
10684-2	35,63	P	Macarrones atún/tomate	Comidas preparadas
10684-3	26,58	P	Macarrones atún/tomate	Comidas preparadas
10321-1	37,49	P	Ensaladilla	Comidas preparadas
10321-2	33,08	P	Ensaladilla	Comidas preparadas
10321-3	33,23	P	Ensaladilla	Comidas preparadas
10321-4	38,45	N	Ensaladilla	Comidas preparadas
10321-5	34,53	P	Ensaladilla	Comidas preparadas
9900-1	27,77	P	Bacalao ahumado	Pescados y derivados
9900-4	39,09	P	Bacalao ahumado	Pescados y derivados
9929-5	37,44	P	Pulpo seco	Pescados y derivados
9930-2	34,35	P	Salmón ahumado	Pescados y derivados
9930-3	27,18	P	Salmón ahumado	Pescados y derivados
9930-4	23,18	P	Salmón ahumado	Pescados y derivados
9930-5	17,63	P	Salmón ahumado	Pescados y derivados
8947-1	39,39	P	Horchata chufa natural	Bebidas no alcohólicas
8947-2	28,95	P	Horchata chufa natural	Bebidas no alcohólicas
8947-3	29,67	P	Horchata chufa natural	Bebidas no alcohólicas
8947-4	29,26	P	Horchata chufa natural	Bebidas no alcohólicas
8947-5	29,16	P	Horchata chufa natural	Bebidas no alcohólicas
8642-1	24,23	P	Horchata chufa natural	Bebidas no alcohólicas
8642-2	24,45	P	Horchata chufa natural	Bebidas no alcohólicas
8642-3	25,59	P	Horchata chufa natural	Bebidas no alcohólicas
8642-4	24,25	P	Horchata chufa natural	Bebidas no alcohólicas
8642-5	24,48	P	Horchata chufa natural	Bebidas no alcohólicas
8320-1	30,24	P	Horchata chufa natural	Bebidas no alcohólicas
8320-5	35,11	P	Horchata chufa natural	Bebidas no alcohólicas
8076	30,98	P	Albóndigas de carne	Comidas preparadas
7705-1	37,3	P	Ensaladilla cangrejo	Comidas preparadas

N° Registro	Ct	Cultivo	Producto	Grupo alimento
7705-2	10,37	P	Ensaladilla cangrejo	Comidas preparadas
7705-3	37,44	P	Ensaladilla cangrejo	Comidas preparadas
7705-4	36,19	P	Ensaladilla cangrejo	Comidas preparadas
7635-1	28,92	P	Horchata chufa natural	Bebidas no alcohólicas
7635-2	30,28	P	Horchata chufa natural	Bebidas no alcohólicas
7635-3	29,61	P	Horchata chufa natural	Bebidas no alcohólicas
7635-4	28,39	P	Horchata chufa natural	Bebidas no alcohólicas
7635-5	29,46	P	Horchata chufa natural	Bebidas no alcohólicas
5420-4	29,26	P	Ensalada	Vegetales y troceados
5445-3	26,69	P	Ensalada de verduras	Comidas preparadas
4889-3	23,02	N	Paté de campagne	Carnes y derivados
4889-4	25,98	N	Paté de campagne	Carnes y derivados
2294-5	28,99	P	Bacalao ahumado	Pescados y derivados
1685-1	24,87	P	Ensalada	Vegetales y troceados
1685-2	23,52	P	Ensalada	Vegetales y troceados
1685-3	23,23	P	Ensalada	Vegetales y troceados
1685-4	24,39	P	Ensalada	Vegetales y troceados
1685-5	24,22	P	Ensalada	Vegetales y troceados
1277	35,66	N	Kebab mixto	Comidas preparadas

V. RESULTADOS DE LA VERIFICACIÓN DE LA PRECISIÓN DE LA PCR.

Nº	Fecha	C _T	Nº	Fecha	C _T
1	16/01/2012	30,68	42	07/11/2014	29
2	19/01/2012	29,45	43	11/11/2014	28,44
3	07/03/2012	29,73	44	13/11/2014	30,32
4	11/04/2012	31,65	45	14/11/2014	28,66
5	14/05/2012	29,9	46	27/11/2014	28,61
6	21/05/2012	30,92	47	28/11/2014	28,85
7	22/05/2012	30,33	48	04/12/2014	28,66
8	04/06/2012	30,56	49	05/12/2014	28,51
9	14/06/2012	30,33	50	27/02/2015	31,01
10	10/07/2012	31,66	51	04/03/2015	33,2
11	26/04/2013	32,7	52	11/03/2015	32,38
12	07/05/2013	31,77	53	11/03/2015	32,42
13	09/05/2013	30,96	54	11/03/2015	31,64
14	10/05/2013	33,02	55	11/03/2015	31,71
15	14/05/2013	33,13	56	12/03/2015	32,03
16	16/05/2013	33	57	12/03/2015	32,17
17	17/05/2013	33,81	58	13/03/2015	31,59
18	21/05/2013	34	59	13/03/2015	31,91
19	23/05/2013	32,08	60	18/06/2015	33,06
20	04/06/2013	30,44	61	18/06/2015	32,11
21	17/07/2013	29,27	62	19/06/2015	31,77
22	18/07/2013	28,83	63	19/06/2015	31,84
23	23/07/2013	28,39	64	23/06/2015	31,31
24	25/07/2013	28,61	65	23/06/2015	31,53
25	30/07/2013	30,69	66	24/06/2015	30,49
26	31/07/2013	29,35	67	24/06/2015	30,41
27	01/08/2013	28,7	68	25/06/2015	32
28	06/08/2013	30,22	69	25/06/2015	31,98
29	08/08/2013	29,49			
30	21/08/2013	29,62			
31	29/01/2014	29,31			
32	30/01/2014	29,98			
33	04/02/2014	30,67			
34	05/02/2014	27,94			
35	06/02/2014	29,78			
36	07/02/2014	30,11			
37	13/02/2014	29,97			
38	14/02/2014	29,65			
39	20/02/2014	29,92			
40	04/04/2014	31,31			
41	06/11/2014	28,41			