

El sistema de detección molecular 3M™: un medio de control de detección de patógenos presentes en los alimentos

La colección de pruebas de detección molecular 3M™ es la siguiente generación del sistema de detección molecular 3M™. Este método se basa en una combinación única de tecnologías: amplificación isotérmica mediada por bucle (LAMP)¹ y detección por bioluminiscencia. Al combinar estas tecnologías, la plataforma de la prueba de detección molecular 2 3M acelera y facilita la detección de patógenos en alimentos, y permite a los fabricantes de alimentos identificar simultáneamente y con una facilidad y velocidad inigualables *Salmonella*, *Listeria*, *Listeria monocytogenes*, *E. coli* O157 (incl. H7), *Campylobacter* y *Cronobacter* en muestras alimentarias y ambientales.

LAMP es una técnica de amplificación de ácidos nucleicos reconocida en la literatura científica como altamente robusta, eficaz, sensible, específica y sencilla^{2,3}. LAMP utiliza ADN polimerasa *Bst* con desplazamiento de cadena y entre 4 y 6 cebadores para generar una amplificación continua del ADN a una única temperatura, a diferencia de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), que utiliza ADN polimerasa *Taq* sin desplazamiento de cadena y dos cebadores. La polimerasa *Bst* que se utiliza en LAMP es más robusta y tiende menos a la inhibición que la polimerasa *Taq*⁴⁻⁸.

En la PCR, la extensión del ADN está limitada a un periodo específico para cada ciclo de temperatura. En la PCR, la presencia de inhibidores puede evitar que la polimerasa extienda el ADN durante el tiempo permitido, lo que genera productos de amplificación incompletos y evita la detección del organismo objetivo⁹. Los ciclos de temperatura de la PCR y la asociación y disociación de la polimerasa de la plantilla de ADN durante el proceso de desnaturalización crean condiciones en las que puede haber interferencia de inhibidores, a diferencia del método LAMP, que se realiza a una sola temperatura, es de amplificación continua y no disocia la polimerasa de la plantilla de ADN.

La detección por bioluminiscencia es robusta, fiable y resistente a la interferencia de muestras¹⁰, a diferencia de la detección por fluorescencia, que se utiliza en diversos sistemas basados en PCR y en inmunoensayos, y en la que pueden ocurrir interferencias a causa de la fluorescencia natural de algunos medios de enriquecimiento y muestras alimentarias¹¹.

¿Qué controles incluye el sistema de detección molecular 3M?

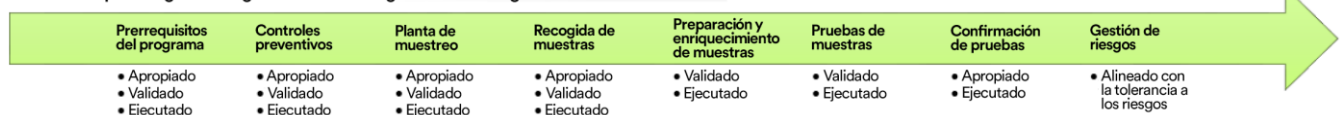
Las pruebas de detección molecular 3M y el sistema de detección molecular 3M utilizan una combinación exclusiva y comprobada de tecnologías, diseño y atención al cliente para proporcionar al usuario final resultados controlados de manera óptima sin tener que depender de un control de amplificación interno (IAC). El control de matriz de detección molecular de 3M™ es un control externo que tiene la misma finalidad que un IAC, para medir la interferencia de matriz con LAMP y bioluminiscencia. Los controles de reactivos de detección molecular de 3M™ incluidos en cada kit de pruebas permiten asegurarse de que los reactivos de amplificación estén activos durante la realización de cada prueba.

Para 3M Food Safety, su éxito es importante. Por eso, le ofrece algo tan esencial como la asistencia con estudios de validación de métodos microbiológicos, no solo para demostrar la carencia de interferencias de matriz, sino también para verificar que los protocolos de enriquecimiento recomendados por 3M realmente generen bajos niveles de patógeno objetivo en sus muestras alimentarias y ambientales específicas.

Es importante reconocer que la inhibición de la amplificación del ADN, tal como la evalúan los controles de amplificación (IAC o controles externos), no es la única causa de la toma de decisiones inadecuadas en la gestión de riesgos. Los controles de amplificación no aseguran que todo el proceso de prueba de muestras se haya ejecutado perfectamente. Los controles de amplificación no evalúan si han podido crecer entre 1 y 5 UFC de un patógeno objetivo hasta llegar al límite de detección bajo las condiciones de enriquecimiento (dilución, búfer, tiempo, temperatura), o si las células bacterianas se han lisado por completo en una muestra determinada.

Desde las primeras fases de la planificación de la seguridad alimentaria hasta la confirmación de pruebas de muestras, son muchos los factores que influyen en la ejecución de acciones de gestión de riesgos deseadas para proteger su marca. La precisión de las pruebas de patógenos depende de un sistema de programas de prerrequisitos bien ejecutados y científicamente validados, así como de controles preventivos, planes de muestreo, recolección, preparación, enriquecimiento y prueba de muestras, confirmaciones de pruebas de muestras y procedimientos de gestión de riesgos realizados adecuadamente. La asistencia, educación y consultoría de 3M Food Safety apoya sus esfuerzos dirigidos a controlar algunos de estos factores críticos fuera del laboratorio, y el sistema de detección molecular 3M proporciona un método comprobado y fiable para evaluar los resultados de las pruebas de patógenos de forma precisa, a tiempo y en el primer intento.

Un sistema para la gestión rigurosa de los riesgos microbiológicos



¿Por qué los sistemas de PCR utilizan un IAC?

- Es bien sabido que hay diversos compuestos en alimentos y muestras ambientales que inhiben la PCR^{9, 12, 13}.
- Preparar los kits de pruebas de PCR requiere esfuerzo y es confuso, ya que requiere hidratar distintos búferes, preparar alícuotas de los mismos y almacenarlos bajo condiciones específicas. Se necesita un control interno para comprobar que todos los reactivos se han preparado, separado en alícuotas y almacenado correctamente.
- Los sistemas de PCR no incluyen software de control para indicar si las condiciones de amplificación no consiguen alcanzar la temperatura o cantidad de ciclos adecuados, o si faltan reactivos de amplificación o detección en los pocillos.
- Los sistemas de PCR utilizan un búfer de lisis con una enzima proteasa que inhibe la amplificación de la ADN polimerasa si este búfer no se inactiva por completo durante el calentamiento de lisis.
- Los sistemas de PCR utilizan distintos búferes de lisis en función del protocolo y la prueba de patógenos. Utilizar el búfer incorrecto puede inhibir una PCR, lo que generaría un falso negativo.

¿Cuáles son las desventajas de los controles de amplificación para detectar patógenos moleculares?

- Los controles de amplificación solo miden la inhibición de la amplificación del ADN producida por inhibidores que se puedan encontrar en muestras alimentarias o en el búfer de lisis.
- En cada reacción, las plantillas de ADN para IAC compiten con reactivos de amplificación y detección como la ADN polimerasa, los nucleótidos libres y el magnesio, y reducen la sensibilidad de las pruebas^{12, 13}.
- La inhibición del IAC no siempre equivale a la inhibición de la amplificación objetivo. Los IAC válidos no siempre indican que la detección objetivo se ha conseguido correctamente.
- La norma ISO 22174:2005 recomienda el uso de controles de proceso positivos (muestras con patógeno objetivo procesadas de la misma manera) y no solo controles internos O externos¹⁴.

¿Qué fallos podrían presentar las pruebas de patógenos al depender de IAC de PCR?

- Depender de IAC puede llevar a desatender los estudios de verificación de métodos microbiológicos recomendados por la FDA, USDA e ISO 16140¹⁵. Estos estudios que utilizan controles de cultivos vivos sirven para verificar no solo las reacciones de amplificación y detección, sino también los procesos de recolección, preparación y enriquecimiento.
- El exceso de sanitizador, compuestos de alimentos o la flora de fondo de las muestras podría ralentizar o inhibir el crecimiento del patógeno objetivo durante el enriquecimiento. Los IAC no evalúan esto. Un sistema PCR puede dar negativo en una muestra que contenga el patógeno objetivo y considerar el IAC válido, lo que significa que sería un falso negativo.

¿Por qué el sistema de detección molecular 3M no utiliza IAC?

- Los inhibidores PCR más usados y los sanitizadores que se usan en el sector alimentario no inhiben la tecnología LAMP. Por ejemplo, en varias matrices líquidas de huevo pasteurizado¹⁶ y especias^{17, 18} que mostraban inhibición producida por algunos métodos de evaluación rápida basados en PCR, la tecnología LAMP y de bioluminiscencia del sistema de detección molecular de 3M no demostró inhibición ni amplificación alguna. Estudios con revisión por pares demuestran que el sistema de detección molecular de 3M funciona bien con una amplia variedad de alimentos¹⁹⁻³⁵.
- Las pruebas de detección molecular 3M se presentan 100 % en gradilla y listas para usar. No es necesario preparar, separar alícuotas ni almacenar búferes ni mezclas de reactivos. No existe riesgo de falsos negativos causados por una preparación incorrecta del búfer de lisis o del reactivo de amplificación o detección.
- El sistema de detección molecular 3M utiliza un solo búfer de lisis individual para todos los protocolos y pruebas, por lo que no es posible que se produzca un falso positivo por utilizar el búfer de lisis incorrecto.
- El sistema de detección molecular 3M incluye controles de software para indicar cuándo el instrumento no consigue las condiciones de amplificación esperadas. Esto permite a los usuarios tomar decisiones relacionadas con la gestión de riesgos basándose en sus planes específicos de seguridad alimentaria y en resultados en tiempo real previamente determinados.
- La familia de pruebas de detección molecular 3M utiliza un búfer de lisis químico en lugar de enzimático para reducir la posibilidad de una lisis incompleta y para que no sea necesario emplear controles de amplificación en cada una de las reacciones.
- El sistema de detección molecular 3M contiene un control de software que mide cualquier prueba correctamente sin considerar el sedimento de la prueba como un "error" durante los primeros 60 segundos de la realización de dicha prueba.

Referencias

1. Notomi T, et al. Loop-mediated isothermal amplification of DNA. *Nucleic Acids Res.* 2000, 28:E63.
2. Fu S, et al. Applications of loop-mediated isothermal DNA amplification. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 2011, 163:845-50
3. Parida M, et al. Loop mediated isothermal amplification (LAMP): a new generation of innovative gene amplification technique; perspectives in clinical diagnosis of infectious diseases. *Rev. Med. Virol.* 2008, 18:407-21.
4. Francois P, et al. Robustness of a loop-mediated isothermal amplification reaction for diagnostic applications. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 2011, 62:41-48.
5. Kaneko H, et al. Tolerance of loop-mediated isothermal amplification to a culture medium and biological substances. *J. Biochem. Biophys. Methods.* 2007, 70:499-501
6. Kiddle G, et al. GMO detection using a bioluminescent real time reporter (BART) of loop mediated isothermal amplification (LAMP) suitable for field use. *BMC Biotechnology.* 2012, 12:15
7. Plutzer J, and Karanis P. Rapid identification of *Giardia duodenalis* by loop-mediated isothermal amplification (LAMP) from faecal and environmental samples and comparative findings by PCR and real-time PCR methods. *Parasitol. Res.* 2009, 104:1527-1533.
8. Nkouawa A, et al. Evaluation of a loop-mediated isothermal amplification method using fecal specimens for differential detection of *Taenia* species from humans. *J. Clin. Microbiol.* 2010, 48:3350-3352.
9. Opel K, et al. A study of PCR inhibition mechanisms using Real Time PCR. *J. Forensic Sci.* 2010, 55:25-33.
10. Gandelman OA. Novel bioluminescent quantitative detection of nucleic acid amplification in real-time. *PLoS ONE.* 2010, 5: e14155.
11. Rossmannith P, et al. The fluorescence characteristics of enrichment media in the wavelength range of Real-Time PCR thermocycler optical path assignments. *Food Anal. Methods.* 2010, 3:219-224.
12. Rossen L, Nørskov P, Holmstrøm K, Rasmussen OF. 1992. Inhibition of PCR by components of food samples, microbial diagnostic assays and DNA-extraction solutions. *Int J Food Microbiol.* 17:37-45.
13. Hoorfar J, et al. Practical considerations in design of internal amplification controls for diagnostic PCR assays. *J Clin Microbiol.* 2004, 42:1863-1868.
14. ISO 22174:2005. Microbiología de los alimentos para consumo humano y animal. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para la detección de patógenos en los alimentos. Requisitos generales y definiciones.
15. ISO 16140-2:2016. Microbiología de la cadena alimentaria. Validación de métodos. Parte 2: Protocolo para la validación de métodos alternativos (registrados) frente a los métodos de referencia.

16. Hu L, et al. Evaluation of 3M Molecular Detection System and ANSR Pathogen Detection System for rapid detection of *Salmonella* from egg products. *Poultry Sci.* 2017, 96:1410-1418.
17. Lins P. Detection of *Salmonella* spp. in spices and herbs, *Food Control*, 2017, 83: 61-68.
18. Sarowska J, et al. Detection of *Salmonella* in Foods Using a Reference PN-ISO Method and an Alternative Method Based on Loop-mediated Isothermal Amplification Coupled with Bioluminescence. *Adv Clin Exp Med.* 2016, 25:945-950.
19. Yang Q, et al. Rapid detection of *Salmonella* in food and feed by coupling loop-mediated isothermal amplification with bioluminescent assay in real-time. *BMC Microbiol.* 2016, 16:112.
20. Miks-Krajnik M, et al Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) coupled with bioluminescence for the detection of *Listeria monocytogenes* at low levels on food contact surfaces. *Food Control*, 2016, 60:237-240.
21. Abirami N, et al. Evaluation of commercial loop-mediated isothermal amplification based kit and ready-to-use plating system for detection of *Salmonella* in naturally contaminated poultry and their processing environment. *Food Control*, 2016, 70:74-78.
22. Vongkamjan K, et al Various Ready-to-Eat Products from Retail Stores Linked to Occurrence of Diverse *Listeria monocytogenes* and *Listeria* spp. Isolates. *J Food Prot.* 2016, 79:239-45.
23. Lim HS, et al. Evaluation of commercial kit based on loop-mediated isothermal amplification for rapid detection of low levels of uninjured and injured *Salmonella* on duck meat, bean sprouts, and fishballs in Singapore. *J Food Prot.* 2015, 78:1203-1207.
24. Ryan G, et al. Evaluation of Rapid Molecular Detection Assays for *Salmonella* in Challenging Food Matrices at Low Inoculation Levels and Using Difficult-to-Detect Strains. *J Food Prot.* 2015, 78:1632-41.
25. Loff M, et al 3M™ Molecular detection system versus MALDI-TOF mass spectrometry and molecular techniques for the identification of *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella* spp. & *Listeria* spp. *J Microbiol Methods.* 2014, 101:33-43.
26. Fortes ED, et al. Validation of the 3M molecular detection system for the detection of *Listeria* in meat, seafood, dairy, and retail environments. *J Food Prot.* 2013, 76:874-878
27. Bonardi S, et al. Comparison of an isothermal amplification and bioluminescence detection of DNA method and ISO 6579:2002 for the detection of *Salmonella enterica* serovars in retail meat samples. *J Food Prot.* 2013, 76:657-61.
28. Bird P, et al. Evaluation of 3M Molecular Detection Assay (MDA) 2- *E. coli* O157 (including H7) for the Detection of *E. coli* O157 in Select Foods: Collaborative Study, First Action 2017.01. *J AOAC Int.* 2017, In Press.
29. Bird P, et al. Evaluation of 3M Molecular Detection Assay (MDA) 2- *Listeria* for the Detection of *Listeria* Species in Select Foods and Environmental Surfaces: Collaborative Study, First Action 2016.07. *J AOAC Int.* 2017, 100:82-98.
30. Bird P, et al. Evaluation of the 3M™ Molecular Detection Assay (MDA) 2 - *Listeria monocytogenes* for the Detection of *Listeria monocytogenes* in a Variety of Foods and Select Environmental Surfaces: Collaborative Study, First Action 2016.08. *J AOAC Int.* 2017, 100:454-469.
31. Bird P, et al. Evaluation of the 3M™ Molecular Detection Assay (MDA) 2 - *Salmonella* for the Detection of *Salmonella* spp. in Select Foods and Environmental Surfaces: Collaborative Study, First Action 2016.01. *J AOAC Int.* 2016, 99:980-997.
32. Bird P, et al. Evaluation of 3M™ Molecular Detection Assay (MDA) *Listeria* for the Detection of *Listeria* species in Selected Foods and Environmental Surfaces: Collaborative Study, First Action 2014.06. *J AOAC Int.* 2015, 98:993-1002.
33. Bird P, et al. Evaluation of 3M™ Molecular Detection Assay (MDA) *Listeria monocytogenes* for the Detection of *Listeria monocytogenes* in Selected Foods and Environmental Surfaces: Collaborative Study, First Action 2014.07. *J AOAC Int.* 2015, 98:980-992
34. Bird P, et al. Evaluation of Modification of the 3M™ Molecular Detection Assay (MDA) *Salmonella* Method (2013.09) for the Detection of *Salmonella* in Selected Foods: Collaborative Study. *J AOAC Int.* 2014, 97:1329-1342.
35. Bird P, et al. Evaluation of 3M™ Molecular Detection Assay (MDA) *Salmonella* for the detection of *Salmonella* in selected foods: collaborative study. *J AOAC Int.* 2013, 96:1325-1335.



3M España S.L.
 Juan Ignacio Luca de Tena, 19-25
 28027 Madrid

Tel: 900 210 584
www.3m.com.es

3M es una marca registrada de 3M.
 Usada bajo licencia en Canadá.
 Recicle. Impreso en EE. UU.
 © 3M 2018. Todos los derechos reservados.