



**FACULTADE DE CIENCIAS**

**GRAO EN BIOQUÍMICA**

**D.<sup>a</sup> Anne Doval Expósito**

**DESARROLLO DE UN MÉTODO BASADO EN LAMP  
PARA LA DETECCIÓN DE SEROTIPOS DE  
*SALMONELLA* EN MUESTRAS DE ORIGEN AVÍCOLA**

Traballo Fin de Grao

*Xuño 2024*

# Índice

Índice.....	1
Índice de tablas.....	2
Índice de figuras.....	3
Resumen.....	4
Resumo.....	5
Abstract.....	6
Abreviaturas.....	7
1. Introducción.....	8
1.1. <i>Salmonella</i> .....	8
1.2. Clasificación de <i>Salmonella</i> .....	9
1.3. Planes nacionales de control de <i>Salmonella</i> en industria avícola.....	11
1.4. Técnicas de diagnóstico.....	12
2. Objetivos.....	18
3. Material y métodos.....	19
3.1. Cepas bacterianas.....	19
3.2. Procesamiento de muestras.....	20
3.3. Extracción de ADN.....	22
3.4. Calidad y pureza de ADN.....	23
3.5. Diseño de primers o cebadores.....	23
4. Desarrollo de LAMP.....	26
4.1.1. LAMP en tiempo real.....	26
4.2.1. LAMP colorimétrico.....	27
5. Resultados y discusión.....	28
5.1. Pureza y concentración del ADN extraído.....	28
5.2. LAMP en tiempo real.....	30
5.3. LAMP colorimétrico.....	37
6. Conclusión.....	39
7. Bibliografía.....	40

## Índice de tablas

<b>Tabla 1.</b> Condiciones de crecimiento de <i>Salmonella</i> .....	8
<b>Tabla 2.</b> Distribución de casos confirmados de salmonelosis humana en la UE para los 20 serotipos de <i>Salmonella</i> más frecuentes.....	10
<b>Tabla 3.</b> Cronograma de aplicación del Reglamento (CE) N° 2160/2003 para el control de determinados serotipos de <i>Salmonella</i> en las poblaciones de aves.....	12
<b>Tabla 4.</b> Colección de cepas de <i>Salmonella</i> empleadas para el estudio asociadas a su serotipo.....	19
<b>Tabla 5.</b> Inoculaciones de los distintos serotipos de UFC en muestra.....	21
<b>Tabla 6.</b> Genomas empleados para el diseño de primers asociados a su secuencia de referencia de NCBI.....	23
<b>Tabla 7.</b> Diseño de cebadores para ensayos de amplificación isotérmica mediada por bucle....	24
<b>Tabla 8.</b> Resumen de volúmenes añadidos para la preparación de mezcla de primers.....	26
<b>Tabla 9.</b> Componentes y volúmenes de mezcla de reacción para LAMP.....	27
<b>Tabla 10.</b> Resultados de absorbancia y concentración de ADN medidos con NanoDrop Lite Plus y Qubit.....	29
<b>Tabla 11.</b> Resultados LAMP fluorimétrico de muestras de ADN de un cultivo puro.....	31
<b>Tabla 12.</b> Resultados LAMP fluorimétricos de muestras de ADN extraído y obtenidas de los distintos medios: MSRV, RAPID' <i>Salmonella</i> y XLD.....	34
<b>Tabla 13.</b> Resultados de LAMP mediante el empleo de un primer general <i>ttr</i> con muestras de ADN extraído.....	36

## Índice de figuras

<b>Figura 1.</b> Morfología de Salmonella. Adaptada de NIAID bajo licencia CC BY 2.0. ....	8
<b>Figura 2.</b> Esquema procedimiento de muestra según norma ISO 6579-1:2017/A1:2021. Creado por BioRender.com .....	13
<b>Figura 3.</b> Medios de cultivo con crecimiento característico de Salmonella spp. De izquierda a derecha son MSRV, XLD y RAPID´Salmonella Medio. Elaboración propia. ....	14
<b>Figura 4.</b> Proceso de amplificación por LAMP.....	16
<b>Figura 5.</b> Resumen del proceso realizado durante el estudio. Creada con BioRender.com .....	17
<b>Figura 6.</b> Diluciones seriadas. Creada con BioRender.com .....	20
<b>Figura 7.</b> Esquema del procedimiento de extracción del ADN. Creado con BioRender.com....	22
<b>Figura 8.</b> Amplificación por LAMP de la muestra de la cepa C11/21 correspondiente al serotipo Hadar. ....	30
<b>Figura 9.</b> Curva de melting de muestra de ADN extraído inoculada con 10 UFC de Salmonella. ....	31
<b>Figura 10.</b> Amplificaciones de la cepa C4/22 correspondiente al serotipo Typhimurium en los distintos métodos de análisis empleados: mediante extracción de ADN o obtenidos de los 3 distintos medios.....	35
<b>Figura 11.</b> Comparación en muestras procesadas por LAMP colorimétrico con una muestra negativa (izquierda) y otra positiva (derecha).....	37
<b>Figura 12.</b> Resultado LAMP colorimétrica en luz blanca (izquierda) y a luz ultravioleta (derecha). Cada fila de tubos, de izquierda a derecha corresponde con las cepas C11/22, C12/20, C4/22, C2/22 y C11/21. Mientras que de arriba abajo las concentraciones inoculadas van de mayor a menor indicadas por la Tabla 5.....	38

## Resumen

*Salmonella* spp. es uno de los principales patógenos de origen alimentario a nivel mundial, especialmente en productos avícolas, requiriendo un riguroso control a lo largo de la cadena alimentaria para proteger al consumidor. El método de referencia para su detección es la norma ISO 6579: 2017, un método dependiente de cultivo. Aunque es un método robusto, requiere de varios días para determinar la muestra como positiva y determinar el serotipo de *Salmonella* aislado, lo que enlentece el funcionamiento de la industria alimentaria y la respuesta a brotes alimentarios. Para solventar estas limitaciones en los últimos años se están desarrollando métodos alternativos como los basados en la amplificación de ácidos nucleicos. En este trabajo se desarrolló un método rápido de detección de los principales serotipos de *Salmonella* (Typhimurium, Enteritidis, Infantis, Virchow, Hadar) en productos avícolas, combinando un enriquecimiento rápido de la muestra con el empleo de la técnica molecular isotérmica LAMP. Los resultados se compararon con el método de referencia basado en la norma ISO 6579:2017, aplicando la determinación del serotipo mediante LAMP en los siguientes puntos: preenriquecimiento (agua de peptona), enriquecimiento selectivo (MSRV), agar selectivo y diferencial (XLD y RAPID'*Salmonella*). En las muestras de preenriquecimiento se realizó una extracción de ADN mediante lisis térmica. Para el resto se realizó el análisis sin una extracción previa de ADN. Fue posible determinar el serotipado en todos los puntos analizados. Además fue posible realizar el LAMP a partir de los medios selectivos sin extracción previa de ADN, aunque hubo diferencias en los tiempos de amplificación entre los diferentes medios. El empleo de una versión colorimétrica del LAMP permite realizar la determinación del serotipo empleando como único equipo un termobloque. Esto hace que el método puede ser aplicado directamente en puntos de interés, como las propias granjas avícolas.

**Palabras clave:** *Salmonella*, serotipo, LAMP, Infantis, Virchow, Enteritidis, Hadar, Typhimurium

## Resumo

*Salmonella* spp. é un dos principais patóxenos de orixe alimentario a nivel mundial, especialmente en produtos avícolas, requirindo un riguroso control ao longo da cadea alimentaria para protexer ao consumidor. O método de referencia para a súa detección é a norma ISO 6579: 2017, un método dependente de cultivo. Aunque é un método robusto, require de varios días para determinar a mostra como positiva e determinar o serotipo de *Salmonella* aislado, o que enlentece o funcionamento da industria alimentaria e a resposta a brotes alimentarios. Para solventar estas limitacións nos últimos anos estanse a desenvolver métodos alternativos como os baseados na amplificación de ácidos nucleicos. Neste traballo desenvolveuse un método rápido de detección dos principais serotipos de *Salmonella* (Typhimurium, Enteritidis, Infantis, Virchow, Hadar) en produtos avícolas, combinando un enriquecemento rápido da mostra co emprego da técnica molecular isotérmica LAMP. Os resultados comparáronse co método de referencia baseado na norma ISO 6579:2017, aplicando a determinación do serotipo mediante LAMP nos seguintes puntos: preenriquecemento (auga de peptona), enriquecemento selectivo (MSRV), agar selectivo e diferencial (XLD y RAPID' *Salmonella*). Nas mostras de preenriquecemento realizouse unha extracción de ADN mediante lisis térmica. Para o resto realizouse o análise sen unha extracción previa de ADN. Foi posible determinar o serotipado en todos os puntos analizados. Ademais foi posible realizar el LAMP a partir dos medios selectivos sen extracción previa de ADN, aínda que houbo diferencias nos tempos de amplificación entre os diferentes medios. O emprego dunha versión colorimétrica del LAMP permite realizara determinación do serotipo empregando como único equipo un termobloque. Esto fai que o método poda ser aplicado directamente en puntos de interés, como as propias granxas avícolas.

**Palabras chave:** *Salmonella*, serotipo, LAMP, Infantis, Virchow, Enteritidis, Hadar, Typhimurium

## Abstract

*Salmonella* spp. is one of the main foodborne pathogens worldwide, especially in poultry products, requiring rigorous control throughout the food chain to protect the consumer. The reference method for its detection is ISO 6579: 2017, a culture-dependent method. Although it is a robust method, it requires several days to determine the sample as positive and determine the *Salmonella* serotype isolated, which slows down the operation of the food industry and the response to food outbreaks. To overcome these limitations, alternative methods such as those based on nucleic acid amplification have been developed in recent years. In this work, a rapid method for the detection of the main *Salmonella* serotypes (Typhimurium, Enteritidis, Infantis, Virchow, Hadar) in poultry products was developed, combining rapid enrichment of the sample with the use of the isothermal molecular technique LAMP. The results were compared with the reference method based on ISO 6579:2017, applying serotyping by LAMP at the following points: pre-enrichment (peptone water), selective enrichment (MSRV), selective and differential agar (XLD and RAPID'*Salmonella*). For the pre-enrichment samples, DNA extraction was performed by thermal lysis. For the rest, the analysis was performed without prior DNA extraction. It was possible to determine serotyping at all points tested. It was also possible to perform LAMP from the selective media without prior DNA extraction, although there were differences in amplification times between the different media. The use of a colorimetric version of LAMP allows serotyping using only a thermoblock as a single instrument. This means that the method can be applied directly at points of interest, such as poultry farms.

**Keywords:** *Salmonella*, serotype, LAMP, Infantis, Virchow, Enteritidis, Hadar, Typhimurium

## Abreviaturas

ATP: Agua de peptona tamponada

BIP: Backward Inner Primer

B3: Backward Outer Primer

Cq: Ciclo de cuantificación

ENT: Enteritidis

ETA: Enfermedades transmitidas por alimentos

FIP: Forward Inner Primer

F3: Forward Outer Primer

HAD: Hadar

INF: Infantis

ISO: International Organization for Standardization

LAMP: Amplificación isotérmica mediada por bucle

LB: Loop Backward Primer

LB: Loop Forward Primer

MSRV: Medio semisólido agar Rappaport-Vassiliadis modificado

PCR: Reacción de cadena de la polimerasa

qPCR: Reacción de cadena de la polimerasa cuantitativa

Tm: Temperatura de melting

TYP: Typhimurium

UFC: Unidades formadoras de colonias

UV: Ultravioleta

VIR: Virchow

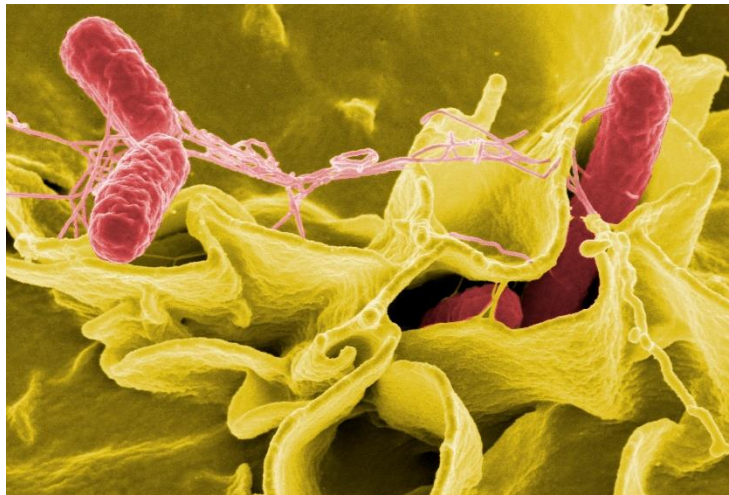
WHO: World Health Organization

XLD: Medio Agar Xilosa Lisina

# 1. Introducción

## 1.1. *Salmonella*

*Salmonella* es un género bacteriano perteneciente a la familia Enterobacteriaceae. Estas bacterias gram negativas tienen varias características principales. Son bacilos (Figura 1) anaerobios facultativos, es decir, capaz de crecer en condiciones de aerobiosis o anaerobiosis y fermentan la glucosa mientras que con la excepción de algunas cepas no son capaces de fermentar la lactosa (Seguridad Alimentaria Elika, 2023). Son oxidasas negativas, no forman esporas, son capaces de producir sulfuro de hidrógeno y convertir nitratos en nitritos. La mayoría de las cepas son móviles gracias a sus flagelos, a excepción de *Salmonella* entérica serotipo Gallinarum y Pullorum, serotipos específicos de aves (Merino, Procura, Trejo, Bueno, & Golowczyc, 2019).



**Figura 1.** Morfología de *Salmonella*. Adaptada de NIAID bajo licencia CC BY 2.0.

En relación a su crecimiento y supervivencia, *Salmonella* se multiplica favorablemente en varios medios según sus condiciones resumidas en la Tabla 1. Su temperatura óptima de crecimiento es de 37°C, pero puede desarrollarse a temperaturas oscilantes entre 5-45°C (Seguridad Alimentaria Elika, 2023). Su pH óptimo varía entre 6,5 y 7,5, en algunas cepas pudiendo a crecer en condiciones de pH de hasta 3,7. Incluso poseen la capacidad de sobrevivir en condiciones de baja humedad durante un periodo prolongado, siendo su actividad o disponibilidad del agua de 0,99 (Shaji, Selvaraj, & Shanmugasundaram, 2023).

**Tabla 1.** Condiciones de crecimiento de *Salmonella*.

	Mínimo	Óptimo	Máximo
Temperatura (°C)	5	37	45
pH	3,7	6,5-7,5	9,5
Actividad de agua	0,93	0,99	0,99

*Salmonella* puede presentarse en un gran rango de alimentos, no obstante, la principal fuente de este patógeno son los productos avícolas como huevos o carne. El serotipo reportado con más frecuencia en gallinas ponedoras es *S. Enteritidis* y en pollos de engorde el serotipo más reportado es *S. Infantis* (European Food Safety Authority, 2022).

Actualmente, existe un gran problema de salud pública asociado a las enfermedades transmitidas por alimentos (ETA) ya que causan 600 millones de casos cada año, provocando alrededor de 420.000 muertes (World Health Organization, 2015). En 2021, se produjeron 4005 brotes de enfermedades transmitidas por los alimentos en la Unión Europea, representando un aumento del 29,8 % respecto a 2020 (European Food Safety Authority, 2022). La gran mayoría de casos son provocados por enfermedades diarreicas asociadas a agentes patógenos como *Campylobacter* spp. y *Salmonella* spp. (World Health Organization, 2015).

En Europa, *Salmonella* spp. es el segundo patógeno transmitido por alimentos después de *Campylobacter* spp. (Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición, 2022). En 2022, según la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA) se reportaron 65.208 casos confirmados de salmonelosis humana (European Food Safety Authority, 2022), convirtiendo *Salmonella* en la segunda zoonosis alimentaria más notificada.

## 1.2. Clasificación de *Salmonella*

El género bacteriano *Salmonella* se agrupa en dos únicas especies: *S. enterica* y *S. bongori*, la primera de las cuáles es la responsable de la práctica totalidad de infecciones en el ser humano. *Salmonella entérica* se subdivide en 6 subespecies: : *enterica* (I), *salamae* (II), *arizonae* (IIIa), *diarizonae* (IIIb), *houtenae* (IV) e *indica* (VI), cada una formada por diversos serotipos o variantes serológicamente distinguibles (Ministerio de Agricultura, 2024). Dentro de esta especie existen más de 2500 serotipos basados en el sistema de nomenclatura recomendado por la Organización Mundial de la Salud (OMS) según el esquema Kauffmann-White (Shaji, Selvaraj, & Shanmugasundaram, 2023).

Los serotipos se clasifican en función de sus antígenos de superficie celular en base a su localización, los más comunes son el antígeno O siendo este somático de la pared celular o el antígeno H o flagelar. Algunos serotipos poseen el antígeno K localizado en la cápsula (Shaji, Selvaraj, & Shanmugasundaram, 2023).

La clasificación de los serotipos también puede ser en función de su reservorio y gravedad. Se clasifican en serotipos tifoideos y no tifoideos. Los serotipos tifoideos, como *S. Typhi* y *S. Paratyphi* se encuentran exclusivamente en seres humanos, su transmisión es principalmente a

través de contacto directo pudiendo causar enfermedades mortales como la fiebre tifoidea y la paratifoidea (Seguridad Alimentaria Erika, 2023).

Mientras que los serotipos no tifoideos como *S. Enteritidis* y *S. Typhimurium* son zoonóticos, es decir, transmitidos a través de animales a los seres humanos causando enfermedades gastrointestinales (Seguridad Alimentaria Erika, 2023). Poseen una amplia gama de reservorios animales como pájaros, reptiles, perros o gatos. En *Salmonella* el principal reservorio es en las aves de corral, siendo esta la mayor fuente de transmisión a humanos mediante la carne o los huevos contaminados (Shaji, Selvaraj, & Shanmugasundaram, 2023).

La Tabla 2 muestra la distribución de los serotipos de *Salmonella* en Europa a lo largo de 2020, 2021 y 2022. El 72,3% de los 65208 casos notificados fueron confirmados sin contar los datos de España y Bulgaria. En 2022, los serotipos más notificados son *S. Enteritidis* (54,6%), *S. Typhimurium* (12,1%). Observando el transcurso de los años se observa como disminuyeron el número de casos de *S. Enteritidis*, mientras que del resto de serotipos muestras fluctuaciones pero permanecen estables (European Food Safety Authority, 2022).

El resto de serotipos tienen proporciones bastante menores en casos confirmados que los tres primeros, siendo el cuarto serotipo *S. Infantis* con 1093 casos confirmados en 2022. Los otros serotipos a analizar, Virchow y Hadar, ocupan posiciones muy bajas dentro de los casos confirmados.

**Tabla 2.** Distribución de casos confirmados de salmonelosis humana en la UE para los serotipos de *Salmonella* más frecuentes.

Serotipo	2022			2021			2020		
	Casos	MSs	%	Casos	MSs	%	Casos	MSs	%
<i>Enteritidis</i>	25737	25	54,6	28045	25	58,0	24008	25	56,1
<i>Typhimurium</i>	5694	25	12,1	5841	25	12,1	5337	25	12,5
<i>Typhimurium</i> Monofásico	4906	14	10,4	4802	15	9,9	4697	16	11,0
<i>Infantis</i>	1093	25	2,3	1071	25	2,2	1064	23	2,5
Newport	522	20	1,1	364	21	0,75	336	21	0,79
Derby	513	20	1,1	489	18	1,0	525	20	1,2
Napoli	448	14	0,95	352	12	0,73	412	12	0,96
Agona	343	19	0,73	142	17	0,29	157	18	0,37
Chester	338	17	0,72	333	13	0,69	129	13	0,30
Coeln	333	19	0,71	481	16	1,00	324	19	0,76
Kentucky	314	17	0,67	143	15	0,30	154	16	0,36
<i>Virchow</i>	276	17	0,59	229	17	0,47	121	16	0,28

Stanley	238	17	0,51	205	17	0,42	208	21	0,49
Bovismorificans	226	17	0,48	233	15	0,48	337	15	0,79
Braenderup	218	15	0,46	381	15	0,79	93	12	0,22
Mbandaka	205	14	0,44	98	13	0,20	68	13	0,16
Brandenburg	177	16	0,38	229	16	0,47	309	16	0,72
Hadar	173	17	0,37	106	14	0,22	120	14	0,28
Panama	167	11	0,35	94	10	0,19	159	12	0,37
Montevideo	163	15	0,35	225	12	0,47	102	14	0,24
Other	5038	-	10,7	4456	-	9,2	4115	-	9,62
Total	47122	25	100	48319	25	100	42775	25	100

“MSs” hace referencia a los Estados miembros de los distintos recuentos de casos, mientras que los serotipos marcados en azul referencian los analizados mediante este estudio. Tabla modificada de (European Food Safety Authority, 2022).

### 1.3. Planes nacionales de control de *Salmonella* en industria avícola

Con el objetivo de reducir los casos de *Salmonella* debido al riesgo que suponen para la salud, la Unión Europea estableció en su Reglamento (CE) N° 2160/2003 (European Commission, 2003), el control de determinados serotipos de *Salmonella* en las poblaciones animales como muestra la Tabla 3. El Reglamento (CE) N° 1086/2011 (European Commission, 2011) estableció la ausencia de *S. Typhimurium* y *S. Enteritidis* en 25 g de carne fresca de ave.

Los serotipos a controlar varían según el tipo de producción avícola. En gallinas reproductoras se aplica el Reglamento (CE) N° 200/2010 (European Commission, 2010) cuyo objetivo es reducir la prevalencia al 1% o menos de los serotipos más frecuentes en salmonelosis humana como son *S. Enteritidis*, *S. Hadar*, *S. Infantis*, *S. Typhimurium*, *S. Typhimurium* variante monofásica y *S. Virchow*. Además de establecer el límite de sólo una manada positiva en los estados miembros donde sólo tengan 100 manadas de gallinas reproductoras o menos.

En gallinas ponedoras se estableció el objetivo de una reducción final del porcentaje máximo al 2% o inferior de la prevalencia de *S. Enteritidis*, *S. Typhimurium* y *S. Typhimurium* variante monofásica, prorrogado por el Reglamento (CE) N° 517/2011 (European Commission, 2011). Sin embargo, en los Estados miembros con menos de 50 manadas de gallinas ponedoras, sólo se permitirá el positivo de una manada.

En pollos de engorde se aplica Reglamento (CE) N° 200/2012 (European Commission, 2012) para reducir al 1% o menos el porcentaje de manadas de pollos de engorde positivos respecto a los serotipos *S. Enteritidis*, *S. Typhimurium* y *S. Typhimurium* variante monofásica.

**Tabla 3.** Cronograma de aplicación del Reglamento (CE) N° 2160/2003 para el control de determinados serotipos de *Salmonella* en las poblaciones de aves.

Zoonosis o agente	Población animal	Fase de la cadena	Fecha de fijación del objetivo	Fecha de inicio del Programa Nacional de Control
Todos los serotipos de <i>Salmonella</i> con importancia para la salud pública: 5 serotipos (SE, ST, SH, SV, SI)	Gallinas reproductoras líneas pesadas (carne) y líneas ligeras (huevos)	Explotaciones de selección, multiplicación y recría de reproductoras	Se fijó 1-Jul-2005 Máximo 1% prevalencia Reglamento (CE) 1003/2005	1-enero-2007 (hasta 31-12-2009)
Serotipos de <i>Salmonella</i> con importancia para la salud pública (SE, ST)	Gallinas ponedoras	Explotaciones de producción de huevos (recría y puesta)	Aprobado 7/06/06 publicación en julio 2006 Reducción % ó máx 2%	1-enero-2008 (hasta 31-12-2010)
Serotipos de importancia para la salud pública (SE, ST)	Pollos de engorde	Explotación de producción de pollos de carne	Estudio prevalencia. Finalizó 2006, R. 646/2007 junio 07 máxima 1%	1-enero-2009 (hasta 31-12-2011)
Serotipos de <i>Salmonella</i> con importancia para la salud pública (SE, ST)	Pavos	Explotaciones de reproductoras, explotaciones producción de pavos para carne	Estudio de prevalencia finalizó en oct-2007 R.584/2008. Objetivo 1%	1-enero-2010 hasta el 31-12-2012.

Datos obtenidos de (European Commission, 2003)

#### 1.4. Técnicas de diagnóstico

Los métodos de referencia para la detección o identificación de bacterias se basan en microbiología clásica combinando el empleo de medios de cultivo de enriquecimiento y selectivos, seguidos de pruebas bioquímicas y serológicas para la confirmación (Ghorashi, Pant, & Ghorashi, 2022). El método convencional o de referencia para detectar e identificar *Salmonella* requiere de múltiples pasos de subcultivo consumiendo mucho tiempo, entre 5 y 7 días para completar el análisis (da Silva et al., 2023).

El método convencional o de referencia para la detección de *Salmonella* en alimentos se realiza acorde a la norma EN/ISO 6579-1 :2017 y su modificación EN/ISO 6579-1 :2017/Amd1:2020 (International Organization for Standardization, 2021), denominada “Microbiología de la cadena alimentaria - Método horizontal para la detección, recuento y serotipado de *Salmonella* spp. —

Parte 1: Detección de *Salmonella* spp.- Modificación 1: Rango más amplio de temperaturas de incubación. Modificación a la situación del anexo D y corrección de la composición de MSR/V y SC”.

Según el método estandarizado, la recuperación de *Salmonella* se basa en tres pasos: preenriquecimiento, enriquecimiento selectivo y cultivo en placas. Tras estos pasos, para confirmar la presencia de *Salmonella*, al menos una colonia sospechosa obtenida del enriquecimiento selectivo debe ser comprobada a través de pruebas bioquímicas o serológicas, esto se representa en la Figura 2.

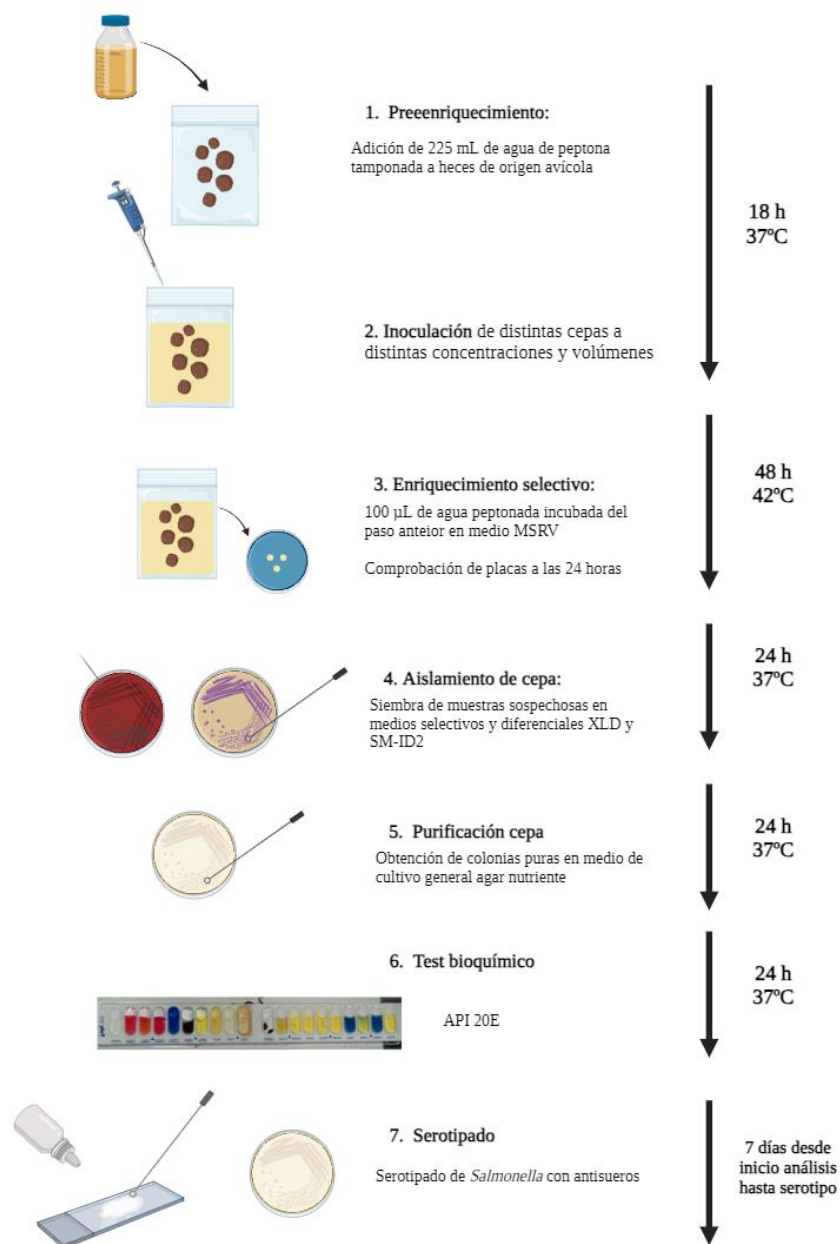
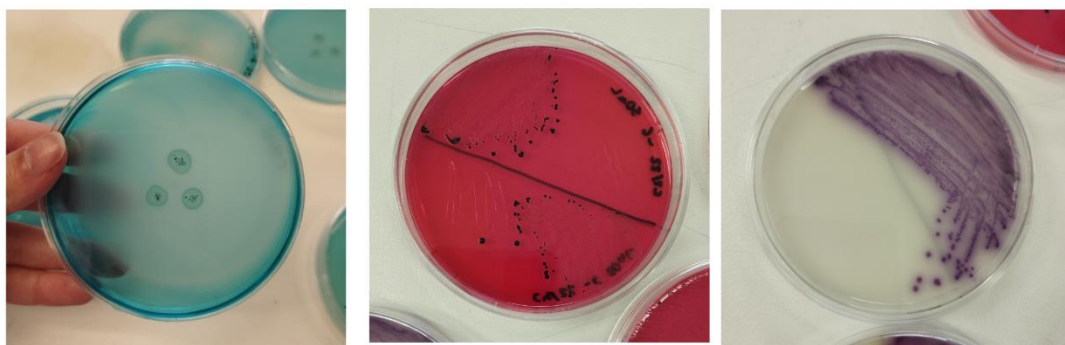


Figura 2. Esquema procedimiento de muestra según norma ISO 6579-1:2017/A1:2021. Creado por BioRender.com

El preenriquecimiento no selectivo de la muestra de heces se realiza con agua peptonada incubando la muestra a 34-38°C durante 18 horas. Continúa con el enriquecimiento selectivo en medio semisólido agar Rappaport-Vassiliadis modificado (MSRV) cuya incubación es a 42 °C durante 24 horas. Posteriormente, se realizan siembras en medios selectivos para *Salmonella*, en agar Xilosa Lisina Desoxicolato (XLD) y RAPID' *Salmonella* Medio, incubadas a 37 °C durante 24 horas. Los medios de cultivo nombrados pueden observarse en la Figura 3.



**Figura 3.** Medios de cultivo con crecimiento característico de *Salmonella* spp. De izquierda a derecha son MSR, XLD y RAPID' *Salmonella* Medio. Elaboración propia.

A partir de las colonias compatibles con *Salmonella* spp. de estos medios, se realizan pruebas bioquímicas y serológicas para confirmar al menos una de las colonias sospechosas. En caso negativo deben confirmarse 4 colonias sospechosas adicionales.

La confirmación de *Salmonella* spp. mediante pruebas bioquímicas a través de las galerías miniaturizadas API. En el caso de *Salmonella* se emplea API20E. Esa galería suele combinarse con otras pruebas complementarias como el test de la oxidasa, para el cuál *Salmonella* es negativo (International Organization for Standardization, 2021).

Por último, se realiza el serotipado, una técnica de aglutinación que determina la fórmula antigénica de cada serotipo mediante el empleo de antisueros específicos contra antígenos de superficie somáticos y flagelares. El serotipado de *Salmonella* se realiza de acuerdo a la norma CEN ISO/TR 6579-3:2014 (International Organisation for Standardisation, 2014) denominada “Microbiología de la cadena alimentaria. Método horizontal para la detección, enumeración y serotipado de *Salmonella*. Parte 3: Directrices para el serotipado de *Salmonella* spp”.

Los avances tecnológicos en métodos de diagnóstico molecular han permitido un diagnóstico más rápido, sensible y específico en comparación con métodos tradicionales. Los diagnósticos moleculares como reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y amplificación isotérmica mediada por bucle (LAMP) son potencialmente más rápidos, sensibles y específicos para la detección de *Salmonella* (Ghorashi, Pant, & Ghorashi, 2022).

La PCR es una técnica específica, sensible y rápida, aunque requiere de equipos específicos con capacidad de detectar fluorescencia y con capacidad de trabajar a distintas temperaturas a lo largo de un mismo análisis (Vichaibun & Kanchanaphum, 2020). Esta metodología es sensible a la contaminación e inhibición por compuestos presentes en la muestra analizada (Francois et al., 2011).

Para tratar de contrarrestar estas limitaciones, han surgido otras técnicas moleculares innovadoras para el diagnóstico de varios patógenos basadas en amplificaciones isotérmicas como la amplificación isotérmica mediada por bucle (LAMP). LAMP es un método de amplificación de ADN en condiciones isotérmicas, mediante el uso de un conjunto de cebadores específicos para el ADN diana. El tiempo estimado de reacción es alrededor de 40 minutos a una temperatura constante de 60-65°C. Este método proporciona varias ventajas como su especificidad y sensibilidad, y no requiere de equipos sofisticados ya que sólo con un termobloque se podría realizar la reacción (da Silva et al., 2023).

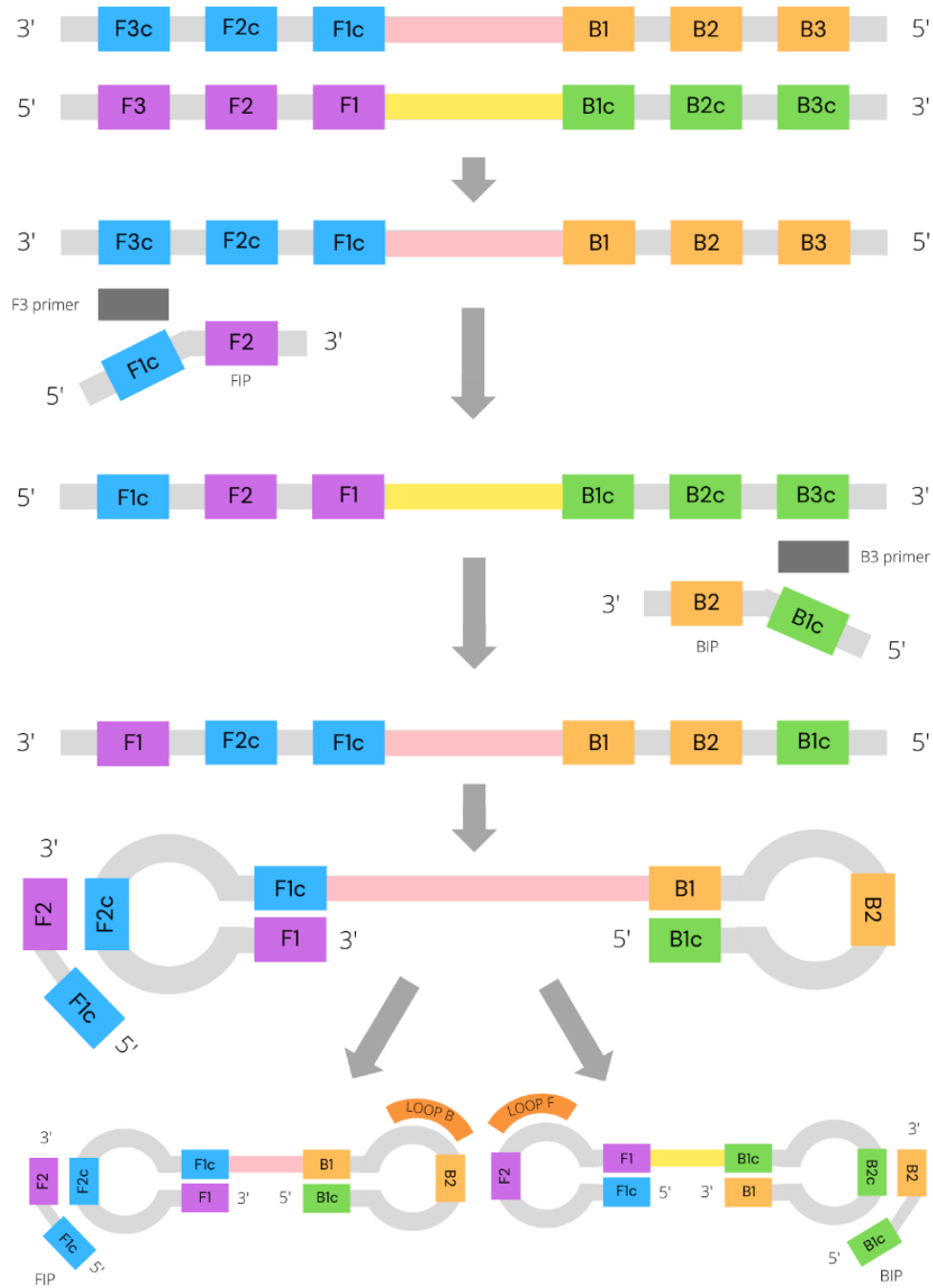
El conjunto de cebadores para realizar LAMP, se compone de dos cebadores externos (F3 y B3), dos cebadores internos (cebador interno directo (FIP) y cebador interno inverso (BIP)) y adicionalmente cebadores de bucle (bucle hacia delante y bucle hacia atrás) (Wong, Othman, Y.-L. Lau, Radu., & Chee, 2018).

El cebador FIP consta de una región F2 en el extremo 3' y otra región F1c en el extremo 5', mientras que el cebador BIP consta de una región B2 situada en el extremo 3' y una región B1c en el extremo 5'. Los cebadores externos como el F3 que es directo, consta de una región F3 que es complementaria a la región F3c de la secuencia plantilla, por otra parte, está el B3 que es inverso consta de una región B3 que es complementaria a la región B3c de la secuencia plantilla.

Conociendo la composición de los distintos primers, la amplificación o síntesis de la cadena complementaria, mostrada en la Figura 4, comienza a producirse una vez la región F2 de FIP se hibrida con la región F2c del ADN. Seguidamente, el cebador F3 se hibrida con la región F3c del ADN, extendiéndose y desplazando la cadena complementaria unida a FIP, esto forma un bucle en el extremo 5'. Dicho bucle en el extremo 5' de ADN monocatenario sirve como molde para el cebador BIP (Wong, Othman, Y.-L. Lau, Radu., & Chee, 2018).

El cebador B2 se hibrida con la región B2c del ADN molde, iniciando así la síntesis de ADN complementario y apertura del bucle del extremo 5'. A posteriori, el cebador B3 se hibrida con la región B3c del ADN objetivo y procede a su extensión, de modo que desplaza la cadena complementaria unida a BIP obteniendo así un ADN con forma de mancuerna (Wong, Othman, Y.-L. Lau, Radu., & Chee, 2018).

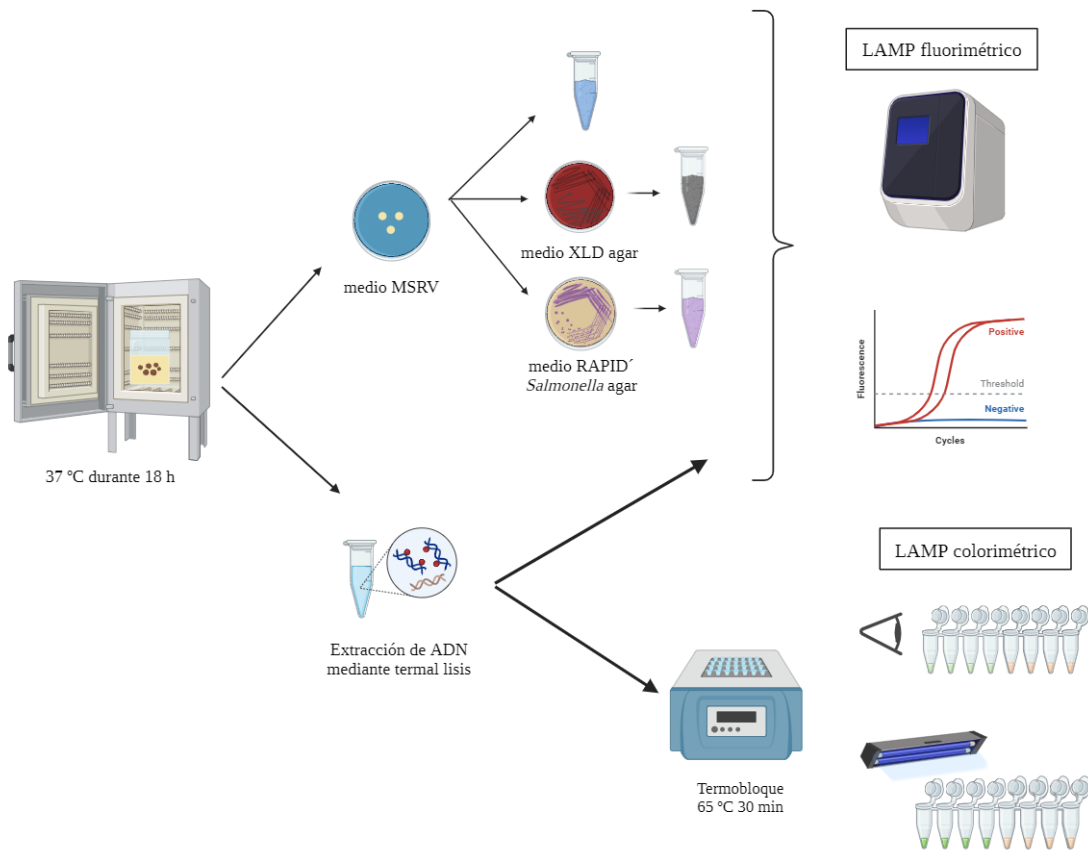
La función de la ADN polimerasa Bst es adicionar nucleótidos al extremo 3' de F1, extendiendo y provocando la apertura del bucle en el extremo 5' convirtiendo el ADN en estructura de tallo y bucle. Siendo esta estructura el iniciador del ciclo LAMP, agregándose cebadores de bucle para una amplificación exponencial (Wong, Othman, Y.-L. Lau, Radu., & Chee, 2018).



**Figura 4.** Proceso de amplificación por LAMP.

Los ensayos LAMP pueden indicar reacciones positivas según fluorescencia, turbidez o cambio de color, siendo la detección a simple vista el método más simple y económico, aunque no el más fiable debido a la imposibilidad de detectar reacciones positivas debido a amplificaciones inespecíficas (Kim, Yang, & Kim, 2024). Estudios han demostrado que la sensibilidad detectada mediante el uso de un fluoróforo uniéndose al ADN es mayor que la obtenida con turbidez (Le, Nguyen, Truong, & De Nguyen Van, 2012).

En este trabajo, mostrado en la Figura 5, se desarrolló un nuevo método de detección de distintos serotipos de Salmonella que permite su detección en muestras preenriquecidas en distintas condiciones como son el aislamiento acorde a la norma EN/ISO 6579-1 :2017 o mediante un método de extracción simple. Posteriormente, se probaron dos estrategias de detección con LAMP, en fluorescencia en tiempo real y detección colorimétrica a simple vista.



**Figura 5.** Resumen del proceso realizado durante el estudio. Creada con BioRender.com

## 2. Objetivos

El objetivo de este trabajo es el desarrollo de un método basado en la amplificación isotérmica mediada por bucle (LAMP) para la detección de los cinco serotipos de *Salmonella* de mayor interés epidemiológico en muestras de origen avícola. Para ello se establecieron los siguientes objetivos específicos:

- Diseñar y optimizar ensayos LAMP para la detección de los serotipos *S. Typhimurium*, *S. Enteritidis*, *S. Infantis*, *S. Virchow*, *S. Hadar*.
- Evaluación de un procedimiento de extracción de ADN simple.
- Evaluación de la detección mediante LAMP sin la realización de extracción de ADN previa a partir de los diferentes medios selectivos empleados en el proceso de detección de *Salmonella* según la ISO 6579-1:2017.

### 3. Material y métodos

#### 3.1. Cepas bacterianas

Las cepas de *Salmonella* empleadas pertenecen a una colección del propio laboratorio obtenidas a partir de ensayos interlaboratoriales, estas pueden observarse en la Tabla 4.

**Tabla 4.** Colección de cepas de *Salmonella* empleadas para el estudio asociadas a su serotipo.

<b>Cepas bacterianas de <i>Salmonella</i></b>	<b>Serotipos</b>	<b>Cepas bacterianas de <i>Salmonella</i></b>	<b>Serotipos</b>
Fresno	C13/20	<i>S. Infantis</i>	C12/20
Lawndale	C6/20		C2/21
<i>S. Abony</i>	C11/20	<i>S. Lagos</i>	C10/22
<i>S. Agama</i>	C15/21	<i>S. Stanley</i>	C12/21
<i>S. Agbeni</i>	C13/21		C5/22
<i>S. Augustenborg</i>	C12/22	<i>S. Teddington</i>	C3/20
	C14/21		C13/22
<i>S. Berta</i>	C8/22		C3/21
<i>S. Coeln</i>	C8/20	<i>S. Typhimirium</i>	C4/20
	C1/22		C4/22
<i>S. Dublin</i>	C5/21		C7/21
	C1/20		C9/20
	C1/21		C15/22
<i>S. Enteritidis</i>	C10/20	<i>S. Typhimirium</i>	C9/21
	C10/21	Monofásica	C9/22
	C2/22		C7/20
	C7/22		C11/22
<i>S. Give</i>	C5/20	<i>S. Virchow</i>	C15/20
<i>S. Gloucester</i>	C4/21		C6/21
	C11/21		C14/22
<i>S. Hadar</i>	C2/20	<i>S. Wernigerode</i>	C8/21
	C3/22	<i>S. Yoruba</i>	C14/20

Estas cepas fueron las que se emplearon para el desarrollo del método. Finalmente para los ensayos de inoculaciones sólo se analizó la detección de los serotipos Enteritidis, Typhimirium, Hadar, Infantis, y Virchow, donde las cepas escogidas fueron C2/22, C4/22, C11/21, C12/20 y C11/22, siendo estas las correspondientes a los serotipos más comunes en la industria avícola.

### 3.2. Procesamiento de muestras

Para el desarrollo del método basado en LAMP se emplearon muestras simuladas a las que se recogen en los Planes Nacionales de Control de *Salmonella*. Las cepas de *Salmonella* empleadas fueron conservadas en unos crioviales a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Para revitalizar las cepas se sembró una criobola de los viales de conservación en placas de Agar Nutritivo (VWR, Alemania), las placas fueron incubadas a  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  durante 24 horas. Estas placas fueron conservadas a  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  y empleadas para los procesos descritos a continuación.

Las muestras simuladas fueron inoculadas con diferentes concentraciones de *Salmonella*. En primer lugar, el inóculo se preparó a partir de una suspensión de *Salmonella* en solución salina al 0,85%. Mediante el uso de un asa de siembra fueron recuperadas colonias de la placa de agar nutriente y disueltas en la solución salina de modo que se obtuvo un valor de absorbancia de 0,2 en el densitómetro (Photometer DEN600, Biosan, Letonia). Este valor es equivalente a  $10^8$  UFC/mL de *Salmonella* según se ha validado previamente en el laboratorio.

A partir de la suspensión inicial se realizan diluciones seriadas 1:100 en microtubos de 1,5 mL como se puede observar en la **¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.** Figura 6. De este modo diluimos hasta alcanzar la dilución -6 que se espera que tenga  $10^2$  UFC/mL. Esta dilución fue utilizada para la inoculación de las muestras de heces.

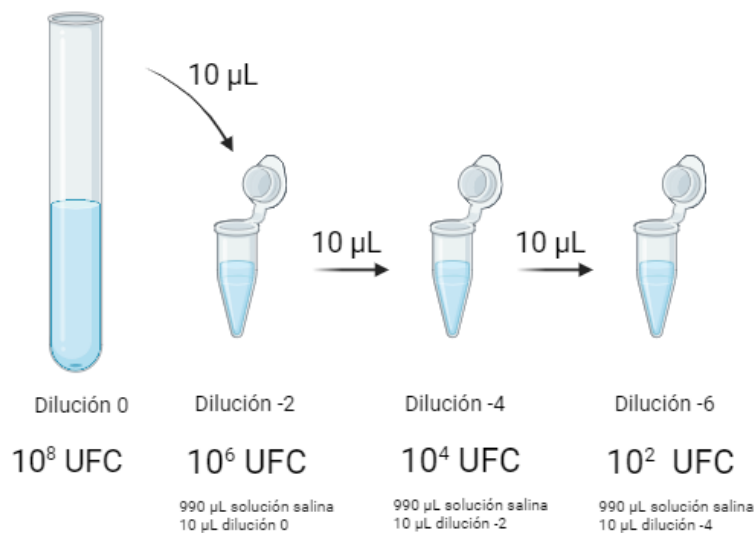


Figura 6. Diluciones seriadas. Creada con BioRender.com

Para determinar la concentración de bacterias viables presentes en las diluciones posteriormente inoculadas, se sembraron  $100\text{ }\mu\text{L}$   $10^2$  UFC y  $10\text{ }\mu\text{L}$   $10^2$  UFC en dos placas de Agar Nutritivo (VWR, Alemania), se incubaron a  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  durante 24 horas. Tras la incubación, se realiza el recuento de colonias en cada una de las placas, calculando individualmente la concentración de cada placa cuya unidad es UFC/mL mediante la siguiente ecuación:

$$\frac{\text{número de colonias} \times \text{factor de dilución}}{\text{volumen (mL)}} = \frac{\text{UFC}}{\text{mL}}$$

Una vez obtenido el valor para cada placa se realiza una media de los dos valores para obtener la concentración de *Salmonella* spp. en el tubo original.

El método de referencia para la detección de *Salmonella* se rige por EN/ISO 6579-1:2017/Amd1:2020 (International Organization for Standardization, 2021). Comienza con el preenriquecimiento, se realiza mediante la adición de 225 mL de agua de peptona tamponada (APT, Merck Millipore) por muestra. En este momento también se inocula la cantidad de *Salmonella* mostrada en la Tabla 5, se homogeneiza y se introduce en la estufa a 37 °C durante 18 horas.

**Tabla 5.** Inoculaciones de los distintos serotipos de UFC en muestra.

Cepa	Serotipo	Inoculado	Inoculado	Inoculado	Inoculado	Inoculado
<b>C11/21</b>	<i>S. Hadar</i>	2,5 x 10 <sup>3</sup>	40	20	10	5,5
<b>C11/22</b>	<i>S. Virchow</i>	3,0 x 10 <sup>3</sup>	39	19,5	9,8	3,3
<b>C12/20</b>	<i>S. Infantis</i>	2,2 x 10 <sup>3</sup>	46,2	23,1	4,6	2,5
<b>C2/22</b>	<i>S. Enteritidis</i>	3,1 x 10 <sup>3</sup>	50	25	5	4,9
<b>C4/20</b>	<i>S. Typhimurium</i>	3,4 x 10 <sup>3</sup>	40	20	10	19,9

A continuación, se realiza un enriquecimiento selectivo en medio de agar semisólido como es Agar Rappaport-Vassiliadis Semi-Sólido Modificado (MSRV, Difco™, BD, Francia), inoculando 100 µL de muestra preenriquecida en tres gotas equidistantes formando un triángulo (International Organization for Standardization, 2021).

Las placas se incubaron a 42 °C durante 24 horas. Tras estas 24 horas se realiza una primera revisión de placas. Las placas sospechosas se resiembran en los medios selectivos como se indica a continuación, mientras que las presuntamente negativas son incubadas otras 24 horas, tras las que se realiza una nueva revisión de estas.

Asimismo, las placas positivas en agar MSRV deben sembrarse en dos medios selectivos como son agar Xilosa Lisina Desoxicolato (XLD, Thermo Scientific, Oxoid) y un segundo medio de aislamiento a elección del laboratorio entre los medios disponibles en el mercado y validados por la norma ISO 6579-1:2017. (International Organization for Standardization, 2021). En este caso el elegido fue RAPID' *Salmonella* Medio (Bio-Rad, EE.UU). En ambos medios se realiza la siembra por estrías tras obtener muestra de la placa de MSRV, luego serán incubados a 37°C durante 24 horas.



### 3.4. Calidad y pureza de ADN

Con el fin de evaluar o cuantificar la calidad del ADN extraído se emplearon técnicas espectroscópicas y fluorimétricas. Mediante técnicas espectroscópicas empleando el espectrofotómetro UV de microvolúmenes NanoDrop Lite Plus (Thermo Fisher Scientific, EE.UU.) podemos estimar la pureza del ADN en base a los ratios 260/280 y 260/230 relacionados en función de las mediciones de absorbancia a 230, 260 y 280 nm (Thermo Fisher Scientific, 2022). Para determinar la concentración de los extractos de ADN se utilizó el fluorímetro Qubit™4 (Invitrogen™ Thermofisher, Carlsbad, CA, EE. UU.). Para la medición de concentración de ácidos nucleicos se realizó con el kit comercial Qubit™ dsDNA BR Assay Kit con un rango de cuantificación de 4 - 2000 ng de acuerdo a las instrucciones del productor (Thermo Fisher Scientific., 2014).

### 3.5. Diseño de primers o cebadores

El diseño de primers para LAMP utilizados para este estudio fue basado en los siguientes genomas descargados de Gen Bank de NCBI mostrados en la Tabla 6.

**Tabla 6.** Genomas empleados para el diseño de primers asociados a su secuencia de referencia de NCBI.

<b>Cepas bacterianas</b>	<b>Secuencia de referencia de NCBI</b>
<i>Salmonella</i> Virchow	NZ_CP025094.1
<i>Salmonella</i> Infantis	NZ_CP121068.1
<i>Salmonella</i> Hadar	NZ_CP022069.2

Los primers diseñados para obtener seis cebadores específicos de LAMP siendo estos dos internos (FIP y BIP), dos externos (F3 y B3) y dos cebadores de bucle (LF y LB), se diseñaron con Primer Explorer V5 (<https://primerexplorer.jp/e/index.html>), cuyas secuencias se muestran en la Tabla 7. Mientras que los primers empleados para los serotipos Typhimurium y Enteritidis fueron diseñados en estudios previos.

**Tabla 7.** Diseño de cebadores para ensayos de amplificación isotérmica mediada por bucle.

<b>Target</b>	<b>Primer Name</b>	<b>Sequence (5'-3')</b>	<b>Reference</b>
<i>Salmonella</i> spp.	FIP_ttr	GCATCAGCCAACATAGCGCCA-CTACGCCATCCGTTATCACA	(Costa-Ribeiro, Lamas, & Garrido-Maestu, 2024)
	BIP_ttr	TCAGGTACAAACCGTCCCCAAG-CATCCGTTCCGCCTGGTA	
	F3_ttr	ACACTGCTGTTCTGTAGCCT	
	B3_ttr	AGGTGCCGAGAATAGCCA	
	LB_ttr	CCAGCAGGACGCGTCTT	
	LF_ttr	CGCGCAATTTAACCCTTACTCG	
<i>S. Typhimurium</i>	FIP_STM	ACCTGCAGCTCATTCTGAGCAG-TCAAAAACAACGGCTCCGG	(Azinheiro Sarah, Carvalho, Prado, & Garrido-Maestu, 2018)
	BIP_STM	GAAAAGGACCACAAGTTCGCGC-TCAGTGAGCATGTCGACGAT	
	F3_STM	AGCCGCATTAGCGAAGAG	
	B3_STM	GCGGTCAAATAACCCACGT	
	LB_STM	TCA AAA ATC CAG	
	LF_STM	AAC CCA ATC TCA	
<i>S. Enteritidis</i>	FIP_SEN	AGCCCACAGTGAGTATCGTG-CGCTGCTGGTAGTGCATGG	(Azinheiro Sarah, Carvalho, Prado, & Garrido-Maestu, 2018)
	BIP_SEN	CAGAGGTCATGGCGCGCAAAT-GGCATTGGTATCAAAGGTGA	
	F3_SEN	GTTGCTAACACGACACTGGAC	
	B3_SEN	GTGGGATATTCTGAGCCCCTAT	

<i>S. Infantis</i>	FIP_INF	ATAGCCACCCCGCAATTTTCG-GACTACATACCGTAGCCCCA	Este estudio
	BIP_INF	CCAGGCGAATTAGTATACGACCCAT-TTGAGCCAAGCTTCGAGGA	
	F3_INF	GCAGATATCCCATTAAAACTGAGC	
	B3_INF	CGGTACCAATAGTATCCCTACCT	
	LB_INF	GGGCGCATCTTCCCAATG	
	LF_INF	TTTGTGGTTCTGGTACTGTGC	
<i>S. Virchow</i>	FIP_VIR	TGGGCCAGCACAAATGAATACTGTG-CCATGATGGCAACGGGAT	Este estudio
	BIP_VIR	TTAGGTGGCACCCATCCAGTG-TAAGGCAGCTCACAACGC	
	F3_VIR	TGTACCTGGTGTGTTGATATTTTCGT	
	B3_VIR	CTGCAATTGACCAGTCGGT	
	LB_VIR	TGGATCTTAAATAGTCATCAAACGA	
	LF_VIR	CTGAAACTTTTATTTATGCTTGGGT	
<i>S. Hadar</i>	FIP_HAD	GCCGTGATTTTCTTGACTAATTGAT-CATGTGGCAACATTAGAACG	Este estudio
	BIP_HAD	TCTTTGGCGAGAAAACAGCAA-TCCTTCATAAACGGAACCG	
	F3_HAD	AGAAGTCCGAGAGGATGA	
	B3_HAD	ACAGATTAAGTCCCTTCCAA	
	LB_HAD	GCATACTGAAGCTCTTTTTCTGC	
	LF_HAD	ATTTGCATTGCTGGCGT	

Los primers FIP y BIP, el símbolo “-” indica la existencia de un linker de cuatro timinas seguidas.

## 4. Desarrollo de LAMP

Durante el desarrollo de LAMP fueron empleados dos tipos de técnicas de detección, mediante fluorescencia o cambios colorimétricos.

### 4.1.1. LAMP en tiempo real

Los ensayos de LAMP se realizaron en QuantStudio 12k Flex Real Time PCR system (Applied Biosystems, ThermoFisher Scientific, CA, USA). Para la realización del LAMP se emplearon 4 tipos de muestras obtenidas de los distintos procedimientos. Por un lado se analizó el ADN extraído. Por otro lado, las otras muestras fueron obtenidas transfiriendo colonias características de *Salmonella* de los distintos medios MSRV, XLD o RAPID' *Salmonella* en distintos microtubos disolviéndolas en 1 mL de agua, donde posteriormente se tomaron 2  $\mu$ L para realizar la reacción de cada muestra obtenida.

Las reacciones fueron realizadas mediante el uso de distintos primers en función del serotipo a detectar, y en último lugar para una comprobación general de detección de *Salmonella* mediante el empleo de un primer general dirigido al gen *ttr*. Los primers específicos para cada serotipo estaban contenidos en tubos en forma liofilizada, los cuales se disolvieron en agua libre de nucleasas dependiendo de la concentración de estos con el fin de obtener una concentración de 100  $\mu$ M. Tras esto se procedió a la realización de stock intermedio con todos los primers a una concentración de 20X. Los volúmenes añadidos serán los expuestos en la Tabla 8 consiguiendo un volumen final de 100  $\mu$ L.

**Tabla 8.** Resumen de volúmenes añadidos para la preparación de mezcla de primers.

<b>Componentes de la mezcla de primers</b>	<b>Volumen añadido para el stock 20X (<math>\mu</math>L)</b>	<b>Concentración final (nM)</b>
FIP	16	800
BIP	16	800
LB	8	400
LF	8	400
F3	4	200
B3	4	200
Agua	40	-

La mezcla de cada reacción está compuesta por 12  $\mu$ L Fast Master Mix (ISO-004, OptiGene, UK), 1  $\mu$ L de mezcla de primers formada por 800 nM de FIP/BIP primers, 400 nM de primers LB/LF y 200 nM de primers F3/B3, 50nM de ROX (InvitrogenTM, ThermoFisher Scientific) 50 nM

diluido 1:10, 2  $\mu\text{L}$  de muestra de ADN y el resto de volumen hasta llegar a 20  $\mu\text{L}$  por reacción es completado con agua libre de nucleasas como podemos observar en la Tabla 9.

**Tabla 9.** Componentes y volúmenes de mezcla de reacción para LAMP.

<b>Componentes de mezcla de reacción</b>	<b>Volumen en reacción (<math>\mu\text{L}</math>)</b>
Fast Master Mix	12
Mix Primers 20X	1
ROX	0,3 (50 nM)
Agua libre de nucleasas	4,7
ADN	2

Añadidos todos los componentes de la mezcla de reacción en los pocillos de la placa de 96, estos se taparon con un film de calidad óptica. Las muestras se analizaron por duplicado. Los experimentos fueron realizados a 65° C durante 30 minutos y la fluorescencia se midió cada 30 segundos. Después de la amplificación, se realizó la curva de fusión, cuyo análisis es realizado con muestras calentadas a 95°C durante 1 segundo, 80°C durante 20 segundos y calentadas hasta 95°C con incrementos de temperatura de 0,05 °C/s, donde la adquisición de fluorescencia se adquiere después de cada incremento de temperatura.

#### 4.2.1. LAMP colorimétrico

Por otro lado, el LAMP colorimétrico que se realizó en microtubos de 1,5 mL en un termobloque (Thermomix) a 65°C durante 30 minutos. Los componentes de la reacción fueron los mismos que para el ensayo en tiempo real pero sin el ROX.

Después de añadir la mezcla de reacción a los tubos, estos se cubrieron parcialmente con Parafilm®. Se añadió 1  $\mu\text{L}$  de SYBR Green I 1,000X (Invitrogen™, ThermoFisher Scientific) a la cara interna de la tapa y se cerraron con cuidado. Una vez transcurrida la incubación a 65°C durante 30 minutos, los tubos se mezclaron vigorosamente con el SYBR Green I y centrifugado durante 10 segundos en una centrífuga. En este caso, a simple vista podemos observar los resultados, en el caso de las muestras positivas se podrá observar el color verde, mientras que en las negativas observaremos el color naranja. Otro modo de verlo es a través de la luz UV, donde las muestras positivas emiten fluorescencia.

## 5. Resultados y discusión

### 5.1. Pureza y concentración del ADN extraído

Se cuantificó y se determinó la calidad del ADN aislado mediante lisis térmica (Tabla 10). La pureza del ADN extraído fue analizada en función de la relación de absorbancia 260/230 asociada a contaminación de compuestos orgánicos e inorgánicos o de la relación 260/280 asociada a contaminación proteica (Santos, Nielsen, Hansen, & Winding, 2015).

La pureza es adecuada cuando el ratio 260/280 está entre 1,8 y 2. Valores superiores a 2 estarían relacionados con contaminación con compuestos fenólicos, pero si es inferior a 1,8 podría ser debido a una contaminación por proteínas (Ramatla et al., 2024). Mientras que los valores de la relación 230/260 se esperan superiores a 0,5 (O'Neill, McPartlin, Arthure, Riedel, & McMillan, 2011).

En la Tabla 10, se observa como la mayoría de resultados en las proporciones 260/280 no superan el 1,8 por lo que indicaría cierta contaminación en las muestras. Aunque los valores se sitúan alrededor de 1,7, pudiendo asociarlo con un valor puro según afirman algunos estudios (O'Neill, McPartlin, Arthure, Riedel, & McMillan, 2011). Por otra parte, las proporciones 260/230 observadas superan todas el 0,5 de modo que afirma la pureza de las muestras.

El ADN también fue cuantificado usando el fluorímetro comercial Qubit<sup>TM</sup> empleando un kit comercial. Este kit contiene una molécula que al unirse a la doble hebra de ADN emite fluorescencia la cual es determinada por el equipo. La cuantificación del ADN total mostró algunas fluctuaciones dentro de las distintas inoculaciones (Tabla 10).

Comparando los resultados dados por ambos métodos, observamos como NanoDrop midió concentraciones superiores a las medidas por Qubit. La mayor ventaja del NanoDrop Lite Plus es que es un proceso más rápido y económico por la gran reducción de consumo de muestra y reactivos, ya que con 1  $\mu$ L obtienes el resultado, además, no necesita calibración, solo realizar un blanco empleando el tampón el que se encuentra eluido el ADN, en este caso agua. Sin embargo, mediante Qubit<sup>TM</sup> se necesita el empleo de reactivos específicos, lo que aumenta los costes y el tiempo.

En oposición, Nanodrop posee la desventaja de ser un método más inespecífico debido a las interferencias de nucleótidos o fragmentos de ADN producidos por contaminación (Ponti et al., 2018). Mientras que Qubit es un método específico para los distintos ácidos nucleicos dependiendo del kit comercial que se emplee. Así mismo, los métodos fluorométricos tienen un límite de detección más bajo en comparación con los métodos basados en absorbancia y, por lo

tanto, se puede utilizar una muestra más diluida (Bruijns, Hoekema, Oomens, Tiggelaar, & Gardeniers, 2022).

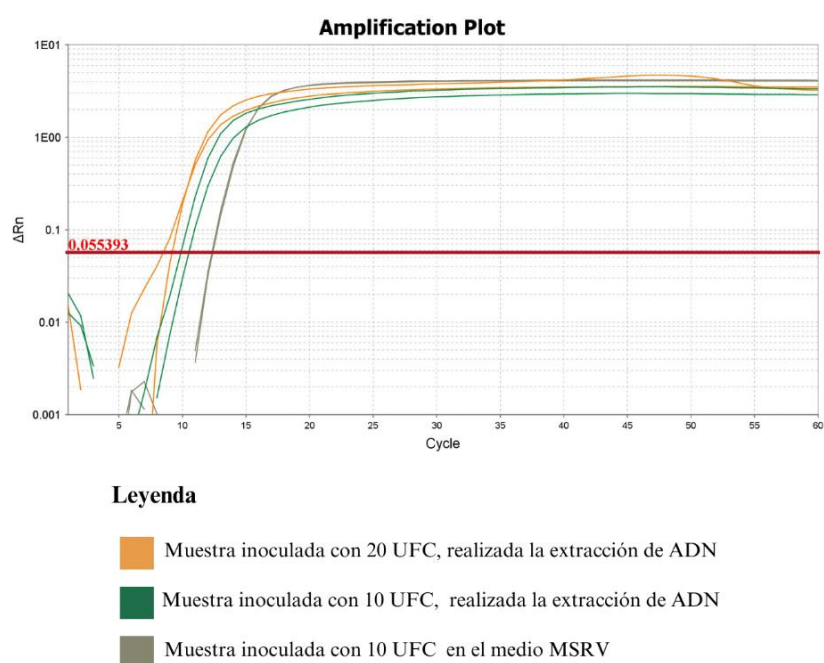
**Tabla 10.** Resultados de absorbancia y concentración de ADN medidos con NanoDrop Lite Plus y Qubit.

Cepa	Serotipo	Inoculación (UFC/mL)	NanoDrop Lite			Qubit
			A260/28 0	A260/230	ng/μL	Concentración (ng/μL)
C12/20	<i>S. Infantis</i>	2,2 x 10 <sup>3</sup>	1,79	0,82	386,4	1,79
		46,2	1,66	0,73	323,5	6,31
		23,1	1,79	0,77	292,4	4,92
		4,6	1,68	0,70	399,5	4,96
		2,5	1,73	0,78	183,3	3,95
C11/21	<i>S. Hadar</i>	2,5 x 10 <sup>3</sup>	1,87	0,97	496,4	13,9
		40	1,62	0,64	508,9	1,21
		20	1,75	0,76	348,8	9,12
		10	1,65	0,70	356,2	3,99
		5,5	1,71	0,75	80,4	4,21
C2/22	<i>S. Enteritidis</i>	3,1 x 10 <sup>3</sup>	1,76	0,77	304,3	4,61
		50	1,75	0,76	410,6	10,6
		25	1,84	0,87	355,7	9,56
		5	1,77	0,80	377,7	4,83
		4,9	1,68	0,79	90,8	8,94
C4/22	<i>S. Typhimurium</i>	3,4 x 10 <sup>3</sup>	1,76	0,81	314,7	7,13
		40	1,75	0,79	336,3	10,5
		20	1,75	0,73	324,9	4,49
		10	1,71	0,75	313,6	5,92
		19,9	1,68	0,77	96,4	5,39
C11/22	<i>S. Virchow</i>	3,0 x 10 <sup>3</sup>	1,75	0,79	286,1	4,16
		39	1,72	0,75	339,5	2,96
		19,5	1,80	0,82	300,7	5,62
		9,8	1,74	0,75	303,4	4,56
		3,3	1,69	0,75	95	4,59

Existen varios estudios con opiniones opuestas, científicos como O'Neill y colaboradores (O'Neill, McPartlin, Arthur, Riedel, & McMillan, 2011) o investigadores que recomiendan emplear las técnicas fluorimétricas por un posible caso de contaminación biológica en las muestras (García-Alegria, Anduro-Corona, Pérez-Martínez, Guadalupe Corella-Madueño, & Rascón-Durán, 2020), mientras que otros como Haque y colaboradores favorecen la espectrofotometría (Haque et al., 2003). Por otra parte, existen estudios que afirman que sólo la combinación de ambas técnicas permite un correcto y completo análisis (Simbolo et al., 2013).

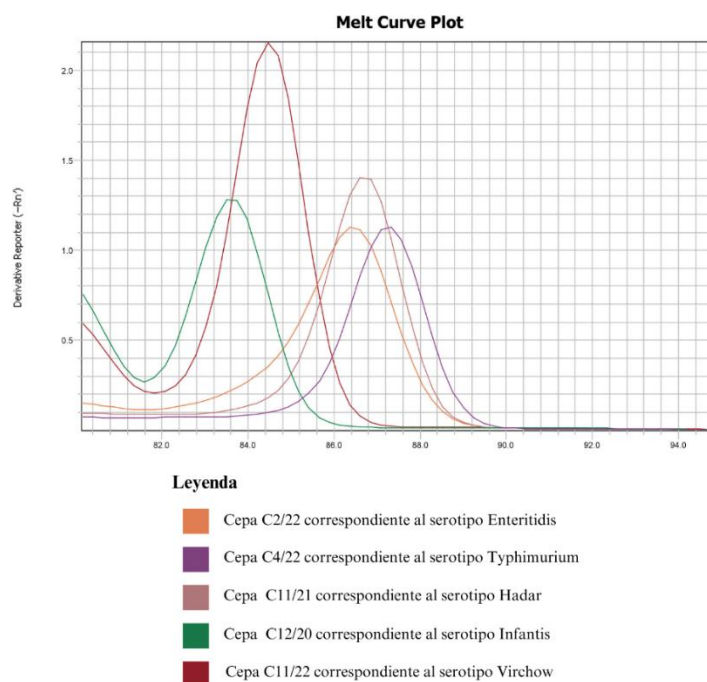
## 5.2. LAMP en tiempo real

El objetivo de esta técnica es evaluar la presencia de *Salmonella* mediante la amplificación isotérmica mediada por bucle en muestras de heces inoculadas con diferentes concentraciones de *Salmonella* (Figura 8).



**Figura 8.** Amplificación por LAMP de la muestra de la cepa C11/21 correspondiente al serotipo Hadar.

Otro parámetro medido es la temperatura de melting o fusión ( $T_m$ ), esta hace referencia al punto en el que el ADN se desnaturaliza al 50%, es decir, cuando la mitad de ADN es bicatenario y la otra mitad monocatenario (Thermo Fisher Scientific, 2013). Este parámetro es relevante para la hibridación de sondas de ácidos nucleicos, se determina durante la fase de calentamiento lento a  $65^\circ\text{C}$  donde se produce la desnaturalización y en consecuencia una disminución de la fluorescencia. Se realiza una curva de fusión como la mostrada en la Figura 9 que muestra la  $T_m$  del objetivo, permitiendo identificar amplificaciones inespecíficas en el caso de que la  $T_m$  observada no coincida con la esperada (Thermo Fisher Scientific, 2013).



**Figura 9.** Curva de melting de muestra de ADN extraído inoculada con 10 UFC de *Salmonella*.

Se realizó un control negativo para cada serotipo de modo que si este amplificase sería a causa de contaminaciones, ya que en esta reacción no habría ADN de *Salmonella*, por lo que no debería amplificar nada. Del mismo modo, la curva de melting del blanco no debería mostrar picos de amplificación ni una Tm similar a la de la muestra, si esto ocurriese los resultados serían invalidados.

En primer lugar, se realizó el análisis de LAMP de 2 cepas de cada uno de los 5 serotipos incluidos en el estudio Tabla 11. Por otro lado, los valores de Cq SD hacen referencia a la desviación estándar en la medición de la muestra, siendo relevante por la realización de duplicados de muestras para asegurar la precisión y reproducibilidad de la amplificación.

**Tabla 11.** Resultados LAMP fluorimétrico de muestras de ADN de un cultivo puro.

Cepa	Serotipo	Media Cq	Cq SD	Tm (°C)
C6/21	VIR	28,88	1,24	83,66
C11/22	VIR	21,44	0,39	83,96
C2/22	SEN	15,48	1,20	86,74
C1/21	SEN	Undetermined	Undetermined	81,41
C12/20	INF	9,60	1,85	86,62
C2/21	INF	9,75	0,39	86,62
C3/22	HAD	8,52	0,31	83,42
C11/21	HAD	12,33	5,10	83,13
C4/22	STM	8,60	1,81	87,34
C3/21	STM	9,24	0,90	87,22

El color azul marca las cepas finalmente empleadas para el estudio.

Los métodos basados en la detección de ácidos nucleicos incluyen un paso de extracción, y en algunos casos, purificación de ADN. Este paso suele enlentecer el proceso y según el método empleado puede incrementar el precio del análisis. Por lo tanto, en este trabajo se evaluó la posibilidad de realizar el LAMP sin realizar una extracción previa del ADN. La reacción de LAMP se realizó a 65°C, una temperatura a la que empiezan a lisarse las células de *Salmonella* (Ko & Yoo, 2019). De forma que se combina en el mismo paso la lisis de las células y la amplificación del ADN. Este método solo fue aplicado a partir del enriquecimiento selectivos y las placas diferenciales y selectivas. La razón de no realizarlo directamente sobre el agua de peptona incubada fue la alta contaminación de estas muestras. Los resultados de las muestras contaminadas con los diferentes serotipos, tanto a partir del ADN extraído como el análisis directo a partir de los medios MSR/V Agar, XLD y RAPID' *Salmonella* agar se presentan en la Tabla 12. Se observa amplificación en todas las muestras realizadas a diferentes concentraciones, serotipos y medios.

El nivel más bajo de bacterias detectado mediante LAMP en tiempo real fue de 2,5 UFC por muestra. Otros estudios muestran límites de detección de LAMP entre 1,9 o 2,2 UFC/reacción (Hara-Kudo, Yoshino, Kojima, & Ikeda, 2005) o 1,3 a 28 UFC/reacción para seis cepas de diversos serotipos en cultivos puros, mientras que para muestras simuladas fue de 50 UFC/mL (Xu et al., 2019). Las muestras con mayores concentraciones iniciales de *Salmonella*, como era esperable, presentaron un menor tiempo de amplificación. Además, se observa en cada serotipo que las muestras con niveles de inoculación similares presentaron tiempos de amplificación similares.

Los valores obtenidos de C<sub>q</sub> fueron más bajos en las muestras de ADN extraído que en las obtenidas directamente de los medios. Esto probablemente se debe a que en el caso de la muestra directa primero tiene que producirse una lisis de las células durante la reacción, lo que ralentiza la fase exponencial de amplificación. Otros trabajos también observaron el potencial de LAMP para trabajar con muestras biológicas donde el ADN está poco purificado, demostrando mayor resistencia a la presencia de sustancias inhibitorias en comparación con otras técnicas moleculares (Francois et al., 2011). La mayoría de amplificaciones en ADN extraído que tienen menor tiempo de amplificación se corresponden con aquellas que tenían una concentración de ADN más alta (Tabla 10).

Los tiempos de amplificación en MRSV fueron mayores en este medio en comparación con los medios sólidos diferenciales. La selectividad del MSR/V está basada en varios de sus componentes como el suplemento antibiótico novobiocina, el oxalato verde malaquita o su bajo pH alrededor de 5,2. (*Difco & BBL manual: Manual of microbiological culture media second edition* 2009). Su pH es bajo, minimizando así la capacidad de migración a través del agar de enterobacterias

móviles, exceptuando *Salmonella*, *Enterobacter cloacae* y *Citrobacter freundii* (Worcmann-Barninka, Destro, Fernandes, & Landgraf, 2001). Al recoger la muestra a partir del MRVS, debido a su consistencia semisólida, junto con la bacteria también se arrastra parte del medio. Por tanto, la presencia de estas sustancias inhibidoras del medio y el bajo pH podrían afectar al tiempo de amplificación de la reacción de LAMP.

Se observaron menores tiempos de detección en las colonias obtenidas del RAPID' *Salmonella* agar en comparación al XLD. Esto puede ser debido a que este medio presente determinadas sustancias que causen cierta inhibición en la reacción de LAMP.

El principio del medio XLD está basado en el uso de un componente inhibidor selectivo desoxicolato de sodio, inhibiendo el crecimiento de microorganismos no deseados, y tres indicadores como xilosa, lactosa y sacarosa combinados con rojo de fenol. En la detección de *Salmonella*, es relevante la xilosa siendo esta fermentada. Cuando se agota, *Salmonella* descarboxila la lisina a cadaverina aumentando el pH y formando las colonias típicas de *Salmonella* cuyo característico color es rojo con el centro negro debido a la metabolización del tiosulfato de sodio perteneciente al medio. Mediante su metabolización se convierte en sulfuro de hidrógeno (H<sub>2</sub>S) dando lugar al depósito en la superficie de las colonias de sulfuro de hierro responsable del color negro. (Bio-Rad Laboratories, 2020).

Mientras que el medio RAPID' *Salmonella* agar (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) detecta *Salmonella* móvil e inmóvil, así como *Salmonella* lactosa positiva. Su principio se basa en la expresión de actividad enzimática durante su incubación durante 24 horas a 37 °C, donde *Salmonella* crece en colonias color magenta a causa de la esterasa C8 (Bio-Rad Laboratories., ).

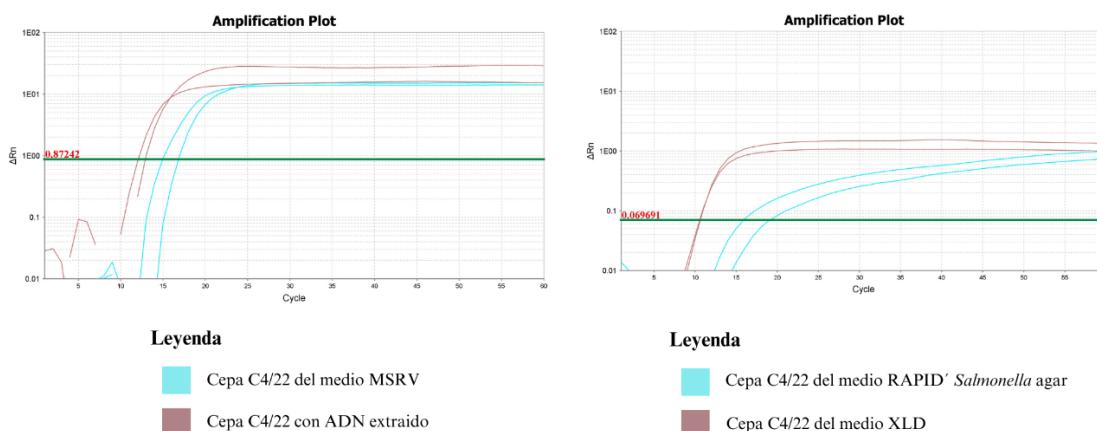
Por otro lado, en el medio selectivo, RAPID' *Salmonella* agar se observa una mejor amplificación en Hadar, pudiéndose deber a una mala homogeneización de la muestra antes del realizar la extracción de ADN. Del mismo modo el serotipo Enteritidis se detectó mejor en los medios selectivos RAPID' *Salmonella* agar y XLD.

**Tabla 12.** Resultados LAMP fluorimétricos de muestras de ADN extraído y obtenidas de los distintos medios: MSRV, RAPID' *Salmonella* y XLD.

Cepa	Serotipo	Inóculo (UFC/mL)	Cq ADN extraído	Cq SD ADN extraído	Tm ADN extraído	Cq medio MSRV	Cq SD Medio MRSV	Tm medio MSRV	Cq medio RAPID' <i>Salmonella</i>	Cq SD medio RAPID' <i>Salmonella</i>	Tm RAPID' <i>Salmonella</i>	Cq medio XLD	Cq SD medio XLD	Tm medio XLD
C12/20	INF	2,2 x 10 <sup>3</sup>	9,09	0,18	86,51	-	-	-	12,78	0,19	86,80	16,56	0,29	86,80
		46,2	13,92	0,41	86,33	-	-	-	15,52	-	86,80	18,30	0,27	86,92
		23,1	11,83	0,16	86,23	15,98	0,25	86,67	11,97	0,01	86,74	13,58	0,51	86,32
		4,6	17,09	0,02	86,92	15,76	0,07	86,73	10,67	0,10	86,55	14,98	1,15	86,38
		2,5	11,82	0,65	86,74	13,84	0,002	86,80	10,92	0,06	86,74	11,92	0,51	86,50
C11/21	HAD	2,5 x 10 <sup>3</sup>	9,42	0,08	83,13	-	-	-	8,46	0,07	83,61	9,95	0,46	83,51
		40	8,92	0,31	83,50	-	-	-	9,01	0,03	83,72	9,90	-	83,60
		20	10,18	0,40	83,62	12,45	0,09	83,56	8,48	0,53	83,42	11,61	0,45	82,71
		10	9,07	0,19	83,84	17,48	10,74	84,07	8,19	0,12	83,71	10,16	0,12	83,47
		5,5	9,44	0,23	83,54	10,90	0,42	83,48	6,59	0,01	83,00	13,48	1,04	82,82
C2/22	ENT	3,1 x 10 <sup>3</sup>	25,46	2,14	86,21	-	-	-	9,81	0,03	81,30	19,29	1,20	86,44
		50	18,45	0,82	86,09	-	-	-	12,54	-	85,38	18,19	0,38	86,32
		25	22,06	2,65	86,09	21,58	0,45	86,49	14,79	0,06	85,61	16,31	0,30	83,71
		5	14,04	0,91	86,50	20,84	0,94	86,55	13,74	0,13	85,72	20,53	0,43	86,08
		4,9	15,94	0,37	86,56	21,26	2,29	86,56	9,54	0,33	81,22	17,70	0,06	86,32
C4/22	TYP	3,4 x 10 <sup>3</sup>	11,66	0,33	86,86	-	-	-	11,47	0,03	87,21	12,37	0,14	87,27
		40	12,82	0,08	86,68	-	-	-	13,02	0,11	87,33	11,99	0,78	87,10
		20	13,15	0,28	86,68	15,15	0,24	87,21	10,27	0,30	86,92	12,30	0,40	86,80
		10	14,60	0,49	87,27	9,67	-	87,21	11,75	2,52	87,21	11,59	0,27	87,21
		19,9	12,40	0,64	86,78	15,87	1,26	87,04	10,50	0,07	86,50	17,48	2,27	86,44
C11/22	VIR	3,0 x 10 <sup>3</sup>	17,55	0,23	84,31	-	-	-	27,73	0,34	83,81	25,93	1,25	83,99
		39	21,16	0,36	84,40	-	-	-	16,65	1,36	81,23	20,47	0,93	83,48
		19,5	23,27	1,54	84,52	24,59	0,09	84,46	22,03	0,32	84,07	17,92	4,28	83,77
		9,8	26,64	0,24	84,31	25,04	1,54	84,13	18,39	2,72	83,71	21,78	2,73	83,95
		3,3	24,62	3,21	84,19	24,33	0,23	84,19	16,54	0,30	84,07	17,28	1,62	83,95

Los “-“ observados en las columnas “CT medio MSRV” y “Tm medio MSRV” hacen referencia a muestras que no fueron procesadas.

En la Figura 10 se observa las distintas amplificaciones según las muestras empleadas, donde la que antes amplifica es la de ADN extraído, y la que más tiempo requeriría para amplificar sería la del medio MSR.V.



**Figura 10.** Amplificaciones de la cepa C4/22 correspondiente al serotipo Typhimurium en los distintos métodos de análisis empleados: mediante extracción de ADN o obtenidos de los 3 distintos medios.

Debido a los exhaustivos planes de control implementados para *Salmonella* en granjas avícolas, la mayoría de muestras suelen ser negativas. Por esta razón, la estrategia propuesta para implementar la técnica de LAMP en los planes nacionales de control de *Salmonella* sería la siguiente. Inicialmente, se realizaría un cribado empleando un primer general para la detección de *Salmonella* spp. a partir de las muestras enriquecidas de la bolsa con agua de peptona. En el caso de obtener un resultado positivo, se procedería a realizar el serotipado de las cepas mediante LAMP usando primers específicos de los serotipos de interés en la industria avícola.

Por tanto en este estudio las muestras de ADN extraído a partir del agua de peptona enriquecida fueron analizadas mediante LAMP usando unos primers generales para la detección de *Salmonella* spp previamente validados en el laboratorio, en este caso dirigidos a la detección del gen *ttr*. En la Tabla 13 se observa la amplificación de todos los serotipos, a excepción de Hadar, en la inoculación más baja. La amplificación producida es más lenta que con los primers específicos. No se observa una gran diferencia de amplificación entre los distintos serotipos ya que amplifican a tiempos similares, tampoco muestran una diferencia relevante en relación a la cantidades inoculadas.

**Tabla 13.** Resultados de LAMP mediante el empleo de un primer general *ttr* con muestras de ADN extraído.

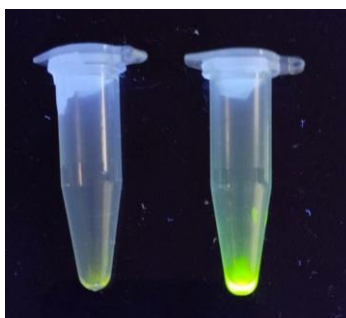
Cepa	Serotipo	Inóculo (UFC/mL)	Cq	Tm (°C)
C12/20	Infantis	2,2 x 10 <sup>3</sup>	11,34	88,93
		46,2	17,97	88,93
		23,1	11,95	88,93
		4,6	15,72	88,69
		2,5	13,14	88,81
C11/21	Hadar	2,5 x 10 <sup>3</sup>	14,33	88,69
		40	16,25	88,69
		20	18,20	88,93
		10	14,57	88,69
		5,5	-	81,22
C2/22	Enteritidis	3,1 x 10 <sup>3</sup>	13,32	88,93
		50	15,96	88,81
		25	14,79	88,81
		5	16,21	88,69
		4,9	12,62	88,81
C4/22	Typhimurium	3,4 x 10 <sup>3</sup>	12,94	88,93
		40	11,64	88,81
		20	11,23	88,81
		10	16,13	88,69
		19,9	11,42	88,81
C11/22	Virchow	3,0 x 10 <sup>3</sup>	15,37	88,81
		39	16,55	88,69
		19,5	18,85	88,81
		9,8	18,58	88,69
		3,3	16,70	88,69

LAMP es una prueba de amplificación isotérmica de ácidos nucleicos que ha ganado popularidad en comparación con la PCR convencional para la detección de patógenos. Se determinó que las condiciones óptimas para la detección de *Salmonella* mediante LAMP eran 65 °C durante 30 min, aunque la amplificación de los productos comenzó alrededor de los 20 ciclos o antes, es decir, a los 10 minutos. Este método requiere aproximadamente 24 horas, mientras que el método convencional con cultivos requiere de 5 a 7 días.

El método LAMP presenta varias ventajas respecto a la PCR convencional o a qPCR, las principales son que tienen mayor sensibilidad, especificidad y requieren menos tiempo (Li, Fan, Zhou, & Zhang, 2017). Esta disminución de tiempos son cruciales en la detección de patógenos para sostener la inocuidad y asegurar la seguridad e higiene en la industria alimentaria. Los factores limitantes de este método es su alto riesgo de contaminación cruzada, conduciendo así a falsos positivos, por lo que se recomienda visualizar los resultados con el tubo de reacción cerrado (Karthik et al., 2014) o el requerimiento de conocimientos para realizar el diseño de cebadores (Kokkinos, Ziros, Bellou, & Vantarakis, 2014).

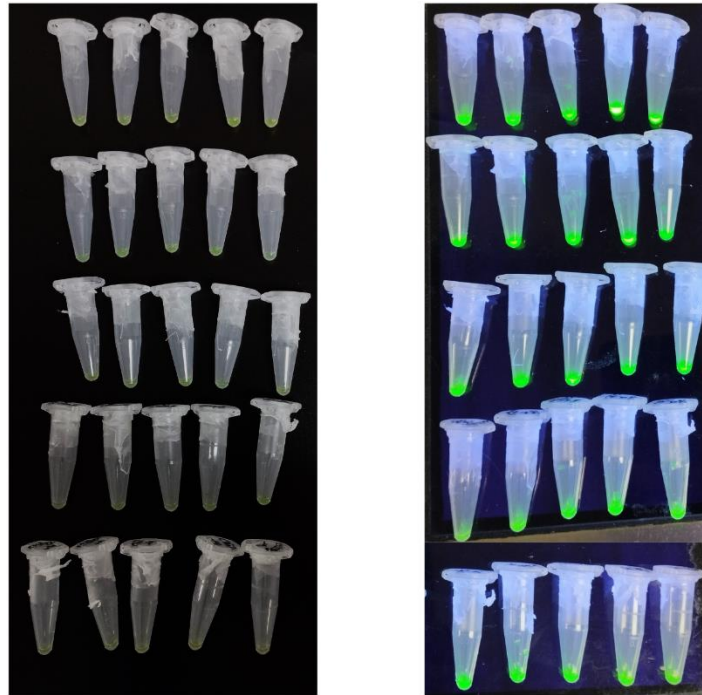
### 5.3. LAMP colorimétrico

En la Figura 12 se observan los resultado del LAMP colorimétrico. La concentración de SYBR Green necesaria para observar a simple vista muestras positivas es elevada. Esto hace que si se añade directamente a la reacción de LAMP esta pueda ser inhibida. Para evitar esto, los microtubos fueron cubiertos con Parafilm® donde se añadió 1  $\mu$ L de SYBR Green, y posteriormente fueron cerrados. Una vez transcurrido el tiempo de incubación los tubos fueron agitados para mezclar la reacción con el SYBR y así visualizar el resultado. Las muestras negativas adquieren un color naranja y son poco visibles en el UV, mientras que las muestras positivas adquieren un color verde y son visibles en el UV como se observa en la Figura 11.



**Figura 11.** Comparación en muestras procesadas por LAMP colorimétrico con una muestra negativa (izquierda) y otra positiva (derecha).

Se observan los microtubos con los resultados del LAMP colorimétrico correspondientes a cada cepa e inoculación. Para la realización de esta metodología, el ADN extraído empleado para la reacción fue obtenido de las muestras correspondientes con las inoculaciones mostradas en Tabla 5.



**Figura 12.** Resultado LAMP colorimétrica en luz blanca (izquierda) y a luz ultravioleta (derecha). Cada fila de tubos, de izquierda a derecha corresponde con las cepas C11/22, C12/20, C4/22, C2/22 y C11/21. Mientras que de arriba abajo las concentraciones inoculadas van de mayor a menor indicadas por la Tabla 5.

Comparando estos resultados con los del LAMP fluorimétrico en tiempo real hubo una correspondencia completa, obteniendo todos resultados positivos. De este modo, se logra un método con aplicación simple a condiciones del campo donde personas no especializadas y con equipos limitados pueden obtener resultados a simple vista en forma de fluorescencia visual. Hay un factor muy importante a tener en cuenta cuando se realizan ensayos de LAMP. Es especialmente relevante no abrir el tubo de LAMP para evitar contaminaciones que conduzcan a resultados de falsos positivos (Karthik et al., 2014).

## 6. Conclusión

*Salmonella* es un problema zoonótico global en la industria avícola, que requiere de una rápida detección para poder realizar análisis rutinarios. Los productos avícolas son una de las principales fuentes de *Salmonella* en la cadena alimentaria. El desarrollo de métodos moleculares que ayuden a reducir los tiempos de detección de la cadena alimentaria ayuda a mantener la seguridad alimentaria al tiempo que agilizada los procesos de la cadena alimentaria. Las conclusiones obtenidas del presente trabajo son las siguientes.

-El diseño de primers específicos permitió realizar una identificación de los cinco principales serotipos de *Salmonella* spp. en muestras ambientales de granjas de pollo.

-La identificación de los serotipos se pueden realizar en diferentes puntos del protocolo de aislamiento de *Salmonella*. Desde el enriquecimiento en agua de peptona hasta en cualquiera de los métodos selectivos que forman parte del método de referencia. Esto permite acortar los tiempos que requiere la realización del serotipado mediante el empleo de antisueros.

-Fue posible realizar la identificación de los serotipos a partir de las placas de agar selectivo sin realizar una extracción previa de ADN, lo que permite acortar los pasos del flujo de trabajo y acelerar los tiempos de detección.

-El empleo de LAMP colorimétrico permite realizar la detección de los serotipos mediante el empleo de equipamiento sencillo como un simple termobloque.

## 7. Bibliografía

- Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición. (2022). *Salmonella*. Retrieved from [https://www.aesan.gob.es/AECOSAN/web/seguridad\\_alimentaria/subdetalle/salmonela.htm](https://www.aesan.gob.es/AECOSAN/web/seguridad_alimentaria/subdetalle/salmonela.htm)
- Azineiro Sarah, Carvalho, J., Prado, M., & Garrido-Maestu, A. (2018). Evaluation of different genetic targets for *Salmonella* enterica serovar enteritidis and typhimurium, using loop-mediated isothermal AMPLification for detection in food samples. *Frontiers in Sustainable Food Systems*, 2(5) doi:10.3389/fsufs.2018.00005
- Bio-Rad Laboratories. (2020). XLD agar: Detection of *Salmonella*. Retrieved from <https://www.biokar-diagnostics.com/sites/default/files/webroot/web/pdf/fsd/literature/10000126748.pdf>
- Bio-Rad Laboratories. Rapid' *Salmonella* agar: Chromogenic media for the detection of *Salmonella* spp. in the analysis of food products for human consumption, animal feed, and in environmental samples. Retrieved from <https://www.bio-rad.com/sites/default/files/webroot/web/pdf/fsd/literature/10000126748.pdf>
- Brizuela, M. E., Goñi, S. E., Cardama, G. A., Zinni, M. A., Castello, A. A., Sommese, L. M., & Farina, H. G. (2022). Correlation of SARS-CoV-2 viral load and clinical evolution of pediatric patients in a general hospital from buenos aires, argentina. *Frontiers in Pediatrics*, 10 Retrieved from <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fped.2022.883395>
- Bruijns, B., Hoekema, T., Oomens, L., Tiggelaar, R., & Gardeniers, H. (2022). Performance of spectrophotometric and fluorometric DNA quantification methods . *Analytica*, 3(3), 371-384. doi:<https://doi.org/10.3390/analytica3030025>

- Costa-Ribeiro, A., Lamas, A., & Garrido-Maestu, A. (2024). Evaluating commercial loop-mediated isothermal amplification master mixes for enhanced detection of foodborne pathogens. *Foods*, 13(11), 1635. doi:<https://doi.org/10.3390/foods13111635>
- Costa-Ribeiro, A., Lamas, A., Mora, A., Prado, M., & Garrido-Maestu, A. (2024). Moving towards on-site detection of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in ready-to-eat leafy greens. *Current Research in Food Science*, 8, 100716. doi:10.1016/j.crfs.2024.100716
- da Silva, E. C., de Oliveira, C. D., Ribeiro, L. F. M., Ribeiro Tiba Casas, M., Gonçalves Pereira, J., Sossai Possebon, F., & Pessoa Araújo Junior, J. (2023). *Salmonella* detection with LAMP and qPCR and identification of serovars of interest by multiplex qPCR in poultry carcasses. *54*, 2173-2182. doi:<https://doi.org/10.1007/s42770-023-01095-y>
- Difco & BBL manual: Manual of microbiological culture media second edition* (2009). (Segunda Edición ed.) BD Diagnostics - Diagnostic System.
- European Commission. (2011). Commission regulation (EU) no 1086/2011 of 27 october 2011 amending annex II to regulation (EC) no 2160/2003 of the european parliament and of the council and annex I to commission regulation (EC) no 2073/2005 as regards *Salmonella* in fresh poultry meat.
- European Commission. (2003). Regulation (EC) no 2160/2003 of the european parliament and of the council of 17 november 2003 on the control of *Salmonella* and other specified food-borne zoonotic agents. *Off.J.Eur.Un.*,
- European Commission. (2010). Commission regulation (EU) no 200/2010 of 10 march 2010 implementing regulation (EC) no 2160/2003 of the european parliament and of the council as regards a union target for the reduction of the prevalence of *Salmonella* serotypes in adult breeding flocks of gallus gallus. *Official Journal of the European Union L61*, , 1-9.

European Commission. (2011). Commission regulation (EU) no 517/2011 of 25 may 2011 implementing regulation (EC) no 2160/2003 of the european parliament and of the council as regards a union target for the reduction of the prevalence of certain *Salmonella* serotypes in laying hens of gallus gallus and amending regulation (EC) no 2160/2003 and commission regulation (EU) no 200/2010. *Official Journal of the European Union L138*, , 45-51.

European Commission. (2012). Commission regulation (EU) no 200/2012 of 8 march 2012 concerning a union target for the reduction of *Salmonella enteritidis* and *Salmonella typhimurium* in flocks of broilers, as provided for in regulation (EC) no 2160/2003 of the european parliament and of the council.

European Food Safety Authority. (2022). *The european union one health 2021 zoonoses report*. (). doi:<https://doi.org/10.2903/j.efsa.2022.7666>

Francois, P., Tangomo, M., Hibbs, J., Bonetti, E., Boehme, C. C., Notomi. T, Perkins. M. D., Schrenzel, J. (2011). Robustness of a loop-mediated isothermal amplification reaction for diagnostic applications. *FEMS Immunology & Medical Microbiology*, 62(1), 41-48. doi:<https://doi.org/10.1111/j.1574-695X.2011.00785.x>

García-Alegría, A. M., Anduro-Corona, I., Pérez-Martínez, C. J., Guadalupe Corella-Madueño, M. A., & Rascón-Durán, M. L. (2020). Quantification of DNA through the NanoDrop spectrophotometer: Methodological validation using standard reference material and sprague dawley rat and human DNA . *International Journal of Analytical Chemistry*, 2020, 1-9. doi:<https://doi.org/10.1155/2020/8896738>

Ghorashi, M. S., Pant, S. D., & Ghorashi, S. A. (2022). Comparison of colourimetric loop-mediated isothermal amplification (LAMP), PCR and high-resolution melt curve analysis and culture-based diagnostic assays in the detection of three *Salmonella* serotypes in poultry. *Avian Pathology*, 51(5), 476-487. doi:10.1080/03079457.2022.2101916

- Haque, K. A., Pfeiffer, R. M., Beerman, M. B., Struewing, J. P., Chanock, S. J., & Bergen, A. W. (2003). Performance of high-throughput DNA quantification methods . *BMC Biotechnology*, 3(20) doi:<https://doi.org/10.1186/1472-6750-3-20>
- Hara-Kudo, Y., Yoshino, M., Kojima, T., & Ikedo, M. (2005a). Loop-mediated isothermal amplification for the rapid detection of *Salmonella*. *FEMS Microbiology Letters*, 253(1), 155-161. doi:10.1016/j.femsle.2005.09.032
- Hara-Kudo, Y., Yoshino, M., Kojima, T., & Ikedo, M. (2005b). Loop-mediated isothermal amplification for the rapid detection of *Salmonella*. *FEMS Microbiology Letters*, 253(1), 155-161. doi:10.1016/j.femsle.2005.09.032
- International Organisation for Standardisation. (2014, ISO/TR 6579-3:2014; microbiology of the food Chain—Horizontal method for the detection, enumeration and serotyping of *Salmonella*— part 3: Guidelines for serotyping of *Salmonella* spp.
- International Organization for Standardization. (2021). ISO 6579–1:2017/A1:2021 microbiology of the food chain - horizontal method for the detection, enumeration and serotyping of *Salmonella* - part 1: Detection of *Salmonella* spp. - amendment 1 broader range of incubation temperatures, amendment to the status of annex D, and correction of the composition of MSRV and SC (ISO 6579-1:2017/amd 1:2020).
- Karthik, K., Rathore, R., Thomas, P., Arun, T. R., Viswas, K. N., Dhama, K., & Agarwal, R. K. (2014). *New closed tube loop mediated isothermal amplification assay for prevention of product cross-contamination*. Amsterdam : Elsevier B.V. doi:10.1016/j.mex.2014.08.009
- Kim, E., Yang, S., & Kim, H. (2024). Rapid on-site authentication of three cockle species using real-time loop-mediated isothermal amplification (LAMP) assay. *Food Bioscience*, 60, 104318. doi:10.1016/j.fbio.2024.104318

- Kokkinos, P. A., Ziros, P. G., Bellou, M., & Vantarakis, A. (2014). Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) for the detection of *Salmonella* in food. *Food Analytical Methods*, 7(2), 512-526. doi:10.1007/s12161-013-9748-8
- Le, T. H., Nguyen, N. T. B., Truong, N. H., & De Nguyen Van. (2012). Development of mitochondrial loop-mediated isothermal amplification for detection of the small liver fluke *opisthorchis viverrini* (opisthorchiidae; trematoda; platyhelminthes). *American Society for Microbiology*, 16(11) doi:10.1128/jcm.06277-11
- Li, Y., Fan, P., Zhou, S., & Zhang, L. (2017). Loop-mediated isothermal amplification (LAMP): A novel rapid detection platform for pathogens. *Microbial Pathogenesis*, 107, 54-61. doi:10.1016/j.micpath.2017.03.016
- Merino, L., Procura, F., Trejo, F. M., Bueno, D. J., & Golowczyc, M. A. (2019). Biofilm formation by *Salmonella* sp. in the poultry industry: Detection, control and eradication strategies. *Food Research International*, 119, 530-540. doi:10.1016/j.foodres.2017.11.024
- Ministerio de Agricultura, P. y. A. (2024). *Salmonella*. Retrieved from [https://www.mapa.gob.es/es/ganaderia/temas/sanidad-animal-higiene-ganadera/sanidad-animal/enfermedades/salmonella/salmonella\\_general.aspx](https://www.mapa.gob.es/es/ganaderia/temas/sanidad-animal-higiene-ganadera/sanidad-animal/enfermedades/salmonella/salmonella_general.aspx)
- O'Neill, M., McPartlin, J., Arthure, K., Riedel, S., & McMillan, M. (2011). Comparison of the TLDA with the nanodrop and the reference qubit system. *Journal of Physics. Conference Series*, 307 012047 doi:<https://doi.org/10.1088/1742-6596/307/1/012047>
- Ponti, G., Maccaferri, M., Manfredini, M., Kaleci, S., Mandrioli, M., Pellacani, G., Ozben, T., Depenni, R., Bianchi, G., Pirola, G. M., Tomasi, A. (2018). The value of fluorimetry (qubit) and spectrophotometry (NanoDrop) in the quantification of cell-free DNA (cfDNA) in malignant melanoma and prostate cancer patients. *Clinica Chimica Acta*, 479, 14-19. doi:10.1016/j.cca.2018.01.007

- Ramatla, T., Khasapane, N. G., Mlangeni, L. N., Mokgokong, P., Ramaili, T., Ndou, R., Nkhebenyane, J. S., Lekota, K., Thekiso, O. (2024). Detection of *Salmonella* pathogenicity islands and antimicrobial-resistant genes in *Salmonella enterica* serovars enteritidis and typhimurium isolated from broiler chickens. *Antibiotics*, 13(5), 458. doi:<https://doi.org/10.3390/antibiotics13050458>
- Santos, S. S., Nielsen, T. K., Hansen, L. H., & Winding, A. (2015). Comparison of three DNA extraction methods for recovery of soil protist DNA. *Journal of Microbiological Methods*, 115, 13-19. doi:10.1016/j.mimet.2015.05.011
- Seguridad Alimentaria Erika. (2023). *Salmonella*. Retrieved from <https://seguridadalimentaria.elika.eus/fichas-de-peligros/salmonella/>
- Shaji, S., Selvaraj, R. K., & Shanmugasundaram, R. (2023). *Salmonella* infection in poultry: A review on the pathogen and control strategies.11, 2814. doi:<https://doi.org/10.3390/microorganisms11112814>
- Simbolo, M., Gottardi, M., Corbo, V., Fassin, M., Mafficini, A., Malpeli, G., Lawlor, R. T., Scarpa, A. (2013). DNA qualification workflow for next generation sequencing of histopathological samples . *PLoS ONE*, 8(6) doi:<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0062692>
- Thermo Fisher Scientific. (2013). QS12K flex maintenance and administration user guide. Retrieved from [https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/LSG/manuals/4470689\\_QS12K\\_Flex\\_Maint\\_Admin\\_UG.pdf](https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/LSG/manuals/4470689_QS12K_Flex_Maint_Admin_UG.pdf)
- Thermo Fisher Scientific. (2022). NanoDrop lite plus user guide (rev. C). thermo fisher scientific inc. . Retrieved from <https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/MSD/Product-Guides/nanodrop-lite-plus-user-guide-en-s120.pdf>

Thermo Fisher Scientific. (2014). Qubit dsDNA BR assay kits (user guide). Retrieved from [https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/LSG/manuals/Qubit\\_dsDNA\\_BR\\_Assay\\_UG.pdf](https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/LSG/manuals/Qubit_dsDNA_BR_Assay_UG.pdf)

Vichaibun, V., & Kanchanaphum, P. (2020). Quantitative LAMP and PCR detection of *Salmonella* in chicken samples collected from local markets around pathum thani province, thailand. *International Journal of Food Science*, 2020(1) doi:<https://doi.org/10.1155/2020/8833173>

Vittal, R., Mohanraj, J. R., & Chakraborty, G. (2022). Detección rápida de *Salmonella* spp en la carne: Amplificación isotérmica mediada por bucle (LAMP). *Pure Appl Microbiol.*, 16(2), 929-936. doi:10.22207/JPAM.16.2.13

Wong, Y. -, Othman, S., Y.-L. Lau, Radu., S., & Chee, H. -. (2018). Loop-mediated isothermal amplification (LAMP): A versatile technique for detection of micro-organisms . *Journal of Applied Microbiology*, 124(3), 626-643.

Worcman-Barninka, D., Destro, M. T., Fernandes, S. A., & Landgraf, M. (2001). Evaluation of motility enrichment on modified semi-solid Rappaport–Vassiladis medium (MSRV) for the detection of *Salmonella* in foods. *International Journal of Food Microbiology*, 64(3), 387-393. doi:10.1016/S0168-1605(00)00484-0

World Health Organization. (2015). *WHO estimates of the global burden of foodborne diseases: Foodborne disease burden epidemiology reference group 2007-2015*. . (). Switzerland:

Xu, W., Gao, J., Zheng, H., Yuan, C., Hou, J., Zhang, L., & Wang, G. (2019). Establishment and application of polymerase spiral reaction amplification for *Salmonella* detection in food .

*Journal of Microbiology and Biotechnology*, 29(10), 1543-1552.

doi:<https://doi.org/10.4014/jmb.1906.06027>