3M Science. Applied to Life.™

3M ℠ Health Care Academy

3M Food Safety

Uso y ventajas de amplificación isotérmica en la detección de microorganismos patógenos en alimentos y control ambiental

Introducción

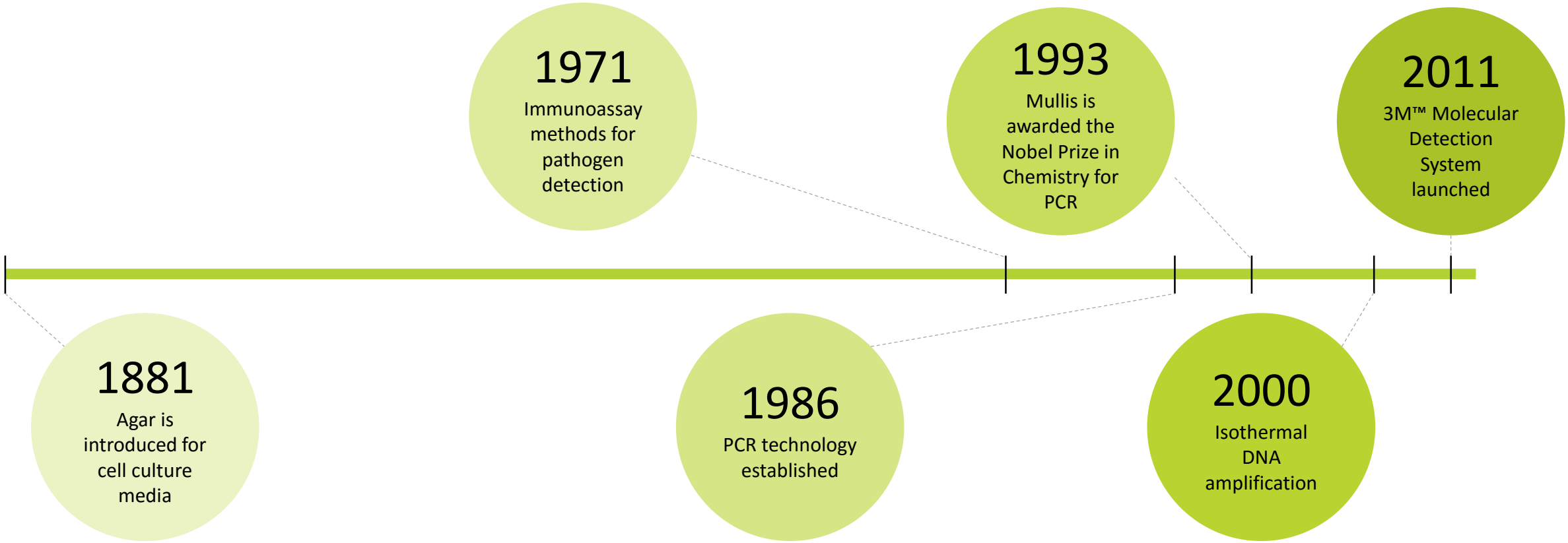
Los avances en biología molecular han permitido desarrollar varias técnicas de detección basados en genomas, en general la mayoría de estas técnicas requiere alta capacidad analítica, personal altamente capacitado y son elevadas en costo.

Dentro de los criterios que se evalúan al implementar una técnica tanto en laboratorios de planta de proceso como en laboratorios de servicio destacan la sensibilidad, especificidad, costo, simplicidad y rapidez

La técnica de amplificación isotérmica medida por bucle o LAMP destaca por ser eficaz y fácil de realizar a pesar de que el principio y mecanismo de acción es complejo

Ha sido utilizada con éxito para detectar enfermedades virales así como de agentes bacterianos

Un poco de historia…



Pirámide de metodologías actuales

TIER 1

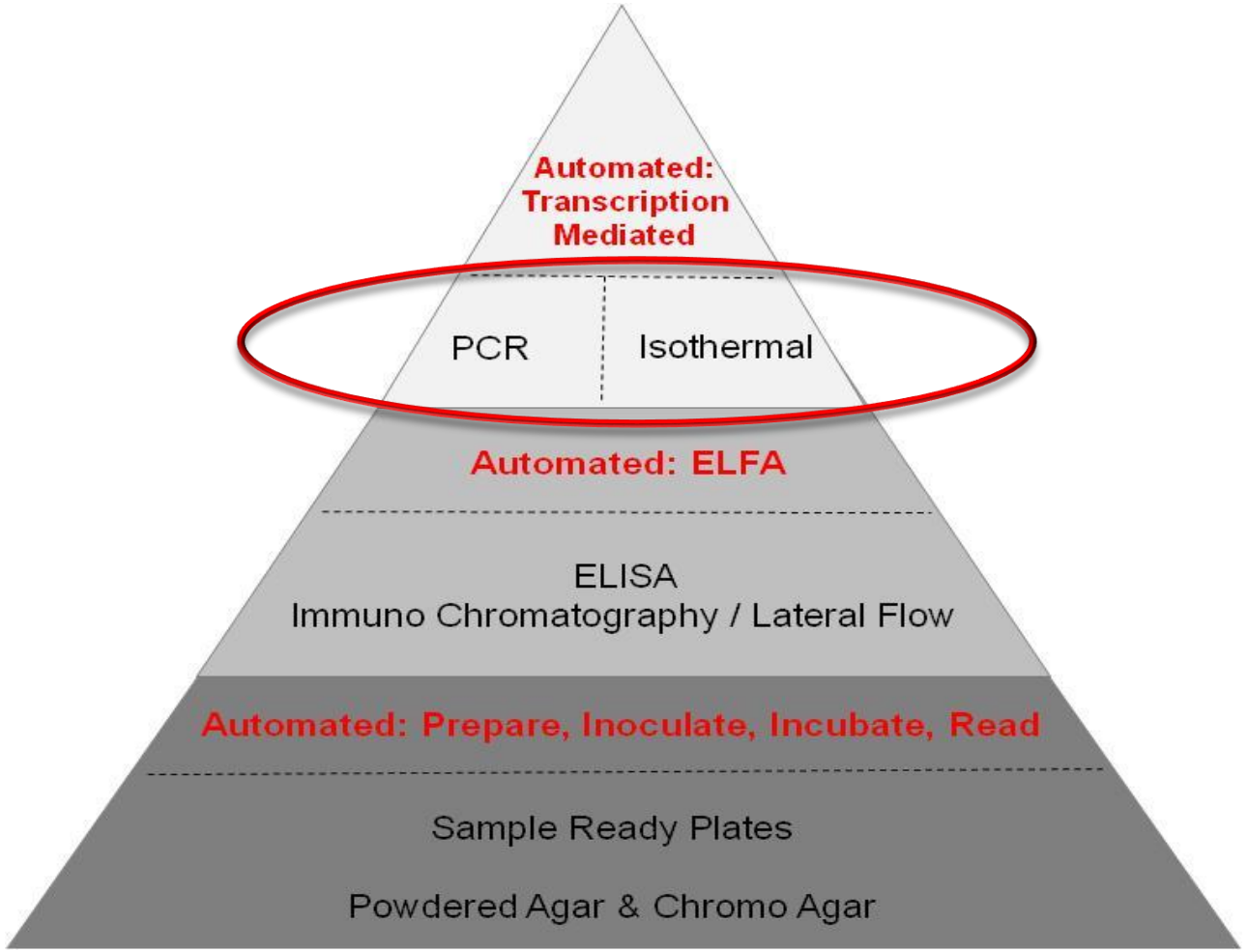
Genético/ Molecular

TIER 2

Inmunoensayo

TIER 3

Cultivo, Bioquimica



Migrando hacia sistemas moleculares…

- ✓ Rapidez
  - Resultados más rápidos que los de método tradicional
- ✓ Alta especificidad
  - Detección basada en identificadores genéticos
- ✓ Sensibilidad
  - Capacidad de detectar muy bajas concentraciones del patógeno target
- ✓ Facilidad de uso
  - Opciones de contar con un sistema automatizado
- ✓ Mayor potencial de desarrollo
  - Nuevas tecnologías prometen flexibilidad y versatilidad en los ensayos

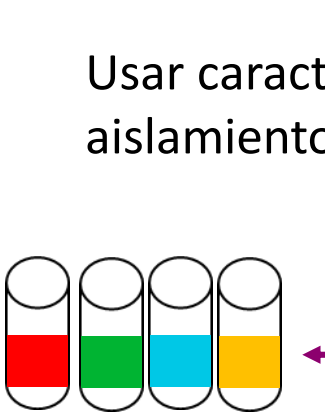
Ref: Food Safety Info, www.rapidmicrobiology.com

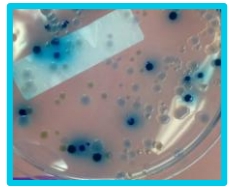
Lo que se espera es que los metodos moleculares sobrepasen a los metodos tradicionales y se conviertan en los Gold Standar o metodos de referencia!

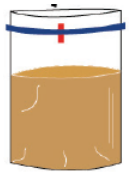
Métodos de detección

Métodos tradicionales

Usar características metabólicas para su aislamiento e identificación.

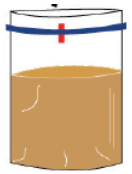


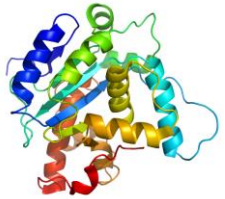


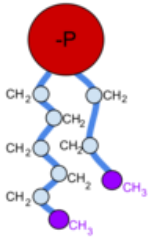


- Capacidad para crecer en presencia de ciertos nutrientes, sales, químicos o antibióticos

Moleculares





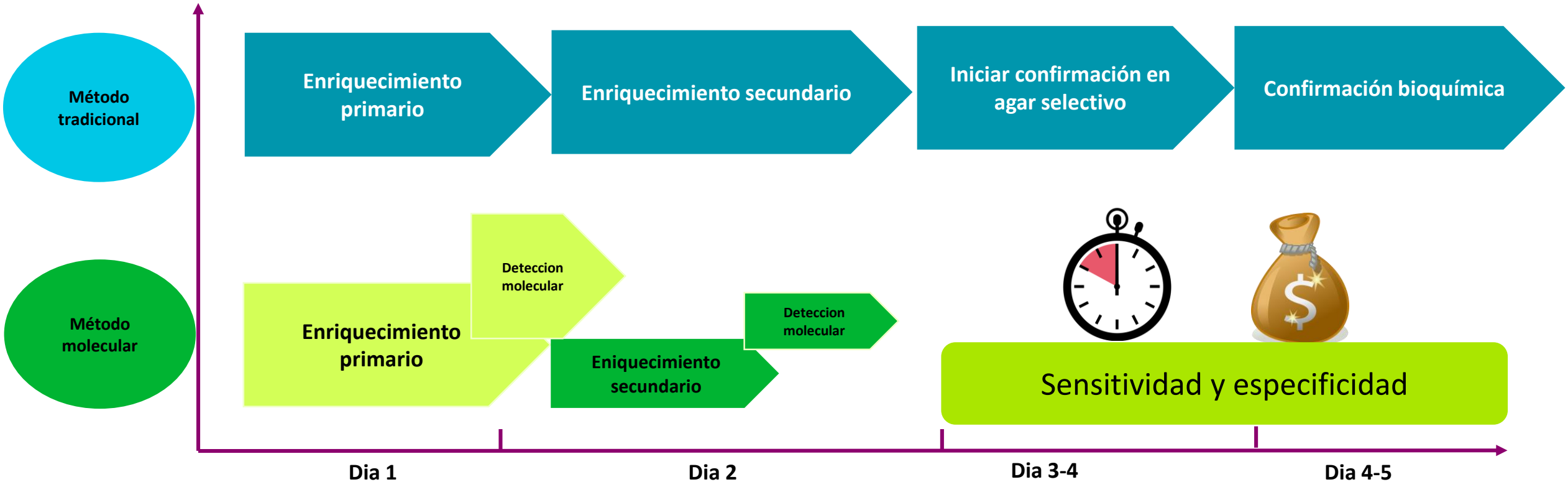


Busca la presencia de moléculas específicas que solo se encuentran en un microorganismo o grupo de microorganismos

Métodos rápidos de detección molecular

- *Permiten liberación de producto más rapido*
- *Permiten identificar rápidamente la posible presencia de contaminación microbiana*
- *Implementación rápida de medidas correctivas*

Beneficio de métodos moleculares para la detección de patógenos



LAMP Amplificación Isotérmica de Ácidos nucleícos

LAMP (Loop mediated isothermal amplification)

- ✓ La técnica LAMP al igual que PCR tiene la capacidad de amplificar fragmentos específicos de ADN lo que permite la detección altamente sensible de patógenos.
- ✓ La efectividad de LAMP se basa en el diseño de primers que deben ser muy específicos. A diferencia de PCR, LAMP requiere de 4 a 6 primers
- ✓ El método utiliza una ADN polimerasa con actividad de desplazamiento de cadena. Esta propiedad de amplificación por desplazamiento no requiere el paso de PCR para denaturalizar (90°C)
- ✓ Es isotérmica, es decir la reacción ocurre a una misma temperatura 60°C en forma continua, lo que es una importante ventaja sobre PCR tradicional
- ✓ Alta eficiencia de amplificación: ADN se amplifica 109 – 1010 veces en 15 a 75 minutos
- ✓ Una de las grandes ventajas está relacionado con la mayor tolerancia a inhibidores

Notomi et al; 2000 Loop mediated isothermal amplification of DNA

LAMP en la comunidad científica

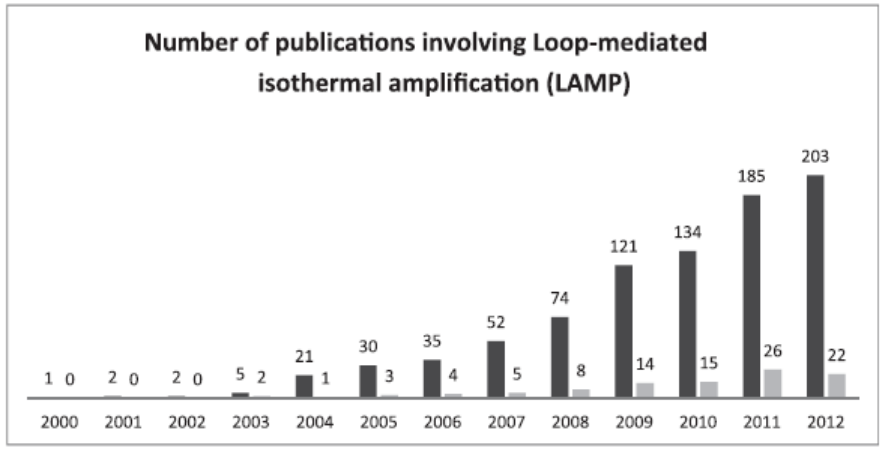
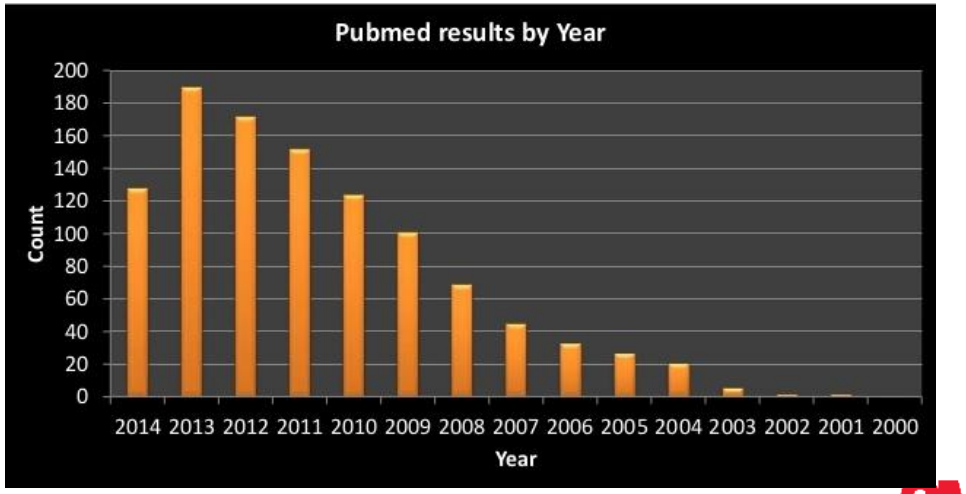


Fig. 1. Total annual number of English speaking publications (patents excluded) involving loop-mediated isothermal amplification (LAMP) (black bar) and number of publications involving LAMP in food sources (grey bar), patents excluded, between 1. January 2000 through 31 December 2012 according to Science Citation Index Expanded as of 12. March 2013.



Contents lists available at SciVerse ScienceDirect

Food Microbiology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/fm

Review

The application of loop-mediated isothermal amplification (LAMP) in food testing for bacterial pathogens and fungal contaminants

Ludwig Niessen*, Jie Luo, Carla Denschlag, Rudi F. Vogel

Technische Universität München, Lehrstuhl für Technische Mikrobiologie, Weihenstephaner Steig 16, 85350 Freising, Germany

ARTICLE INFO

Article history:
Received 17 October 2012
Received in revised form
23 April 2013
Accepted 25 April 2013
Available online 9 May 2013

Keywords:
Food safety
Nucleic acid amplification

ABSTRACT

Bacterial pathogens and toxicants, parasites as well as mycotoxin producing fungi are the major biotic factors influencing the safety of food. Moreover, viral infections and prions may be present as quasi biotic challenging factors. A vast array of culture dependent analytical methods and protocols for food safety testing has been developed during the past decades. Presently, protocols involving molecular biological techniques such as PCR-based nucleic acid amplification and hybridization have become available for many of the known pathogens with their major advantages being rapidness, high sensitivity and specificity. However, this type of assays is still quite labor- and cost intensive and mostly cannot be operated directly in the field. Recently, loop-mediated isothermal amplification (LAMP) of DNA has emerged as an alternative to the use of PCR-based methods not only in food safety testing but also in a wide array of

Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP)

Especificidad

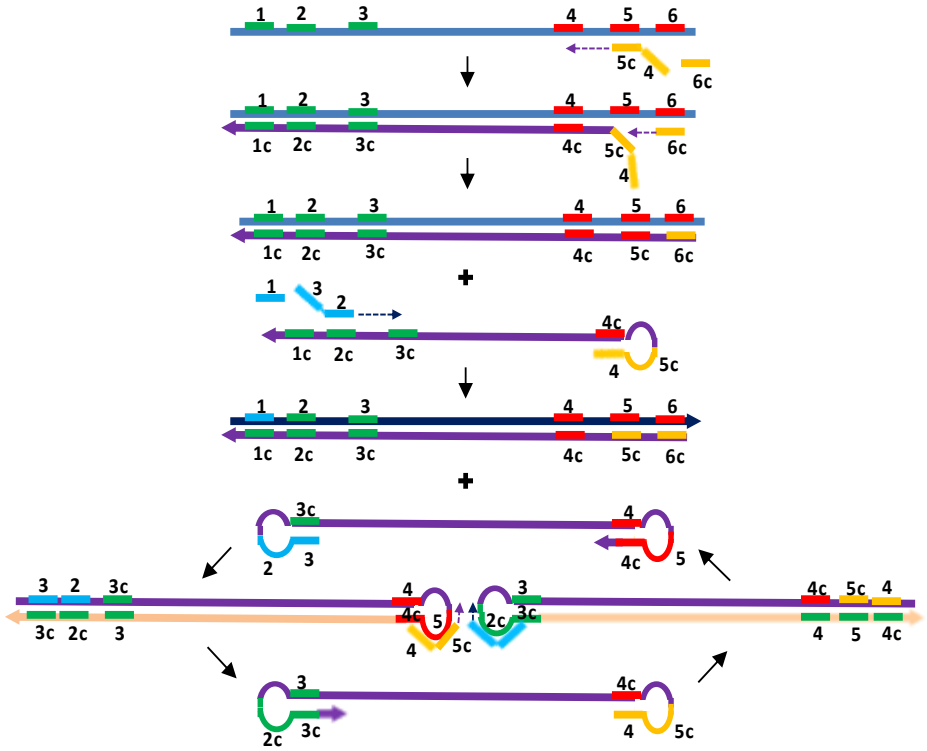
- + de 6 (primers) capaces de reconocer 8 regiones diferentes del AND target
- Bst DNA polymerasa, 5´ → 3´ polymerase y desplazamiento de la cadena de ADN

Sensibilidad

- Amplificación rápida y continua de las secuencias target de ADN
- Detección de 1-5 zonas o secuencias lógicas target por reacción

Consistencia

- Excelente tolerancia a frecuentes sustancias inhibidoras para PCR
- Reacción continua y temperatura constante



http://loopamp.eiken.co.jp/e/lamp/anim.html

LAMP

- Reacción isotérmica (60 to 65 ^{0}C)
- Usa de 4 a 6a primers
- **4 primers reconocen 6 regiones distintas del gen target**
- Primers “loop” aceleran la reacción e incrementan la especificadas (**reconocimiento de 2 sitios adicionales**)
- Simple, equipo alta tecnología menor costo
- Menos interferencia causado por inhibidores
- LAMP-Bioluminiscencia permite una fácil detección (puede detectar la amplificación durante la reacción)

PCR

- Reacción cíclica
- Tempertaura Variable
  - Denaturación (95 ^{0}C)
  - Alineamiento/extension (50 to 60 ^{0}C)
- **Usa solo 2 primers**
- Requiere termociclados (heating and cooling)
- Utiliza sondas en el Real-time PCR que permite mayor especificidad

Tecnología superior al PCR

TABLE 3 | Advantages and limitations of molecular methods for the detection a

Molecular methods	Advantages	Lim	
Simple PCR	• High sensitivity and specificity • Accurate and reliable results	• Se and • Re	011; al., , 2015
Multiplex PCR	• High sensitivity and specificity • Enables simultaneous detection of multiple foodborne pathogens	• Se PCR • Pri	l., al., , 2015
Real-time/ quantitative PCR	• Higher sensitivity and specificity tha • More rapid than simple P post-amplificati • As		2005; 011; al., , 2015
LAMP	• Higher sensitivity and specificity than PCR • Cost-effective • Simple • Operates without thermal cycling system	• Co	al., 2014; Zhao et al., 2014; Law et al., 2015

Ventajas de LAMP:

- Mayor sensibilidad y especificidad que PCR
- Económico
- Simple
- Funciona sin termociclador

An insight into the isolation, enumeration, and molecular detection of Listeria monocytogenes *in food. Law et al., Frontiers in Microbiology, November 2015, Volume 6, Article 1227*

3M Sistema de Detección Molecular

3M ha desarrollado una Avanzada Tecnología de Amplificación Isotérmica (LAMP) y de Detección a través de la Bioluminiscencia, para brindarte un Sistema de Detección Molecular de 3M™ fiable, preciso que incrementará su productividad.

Mejor tecnología…

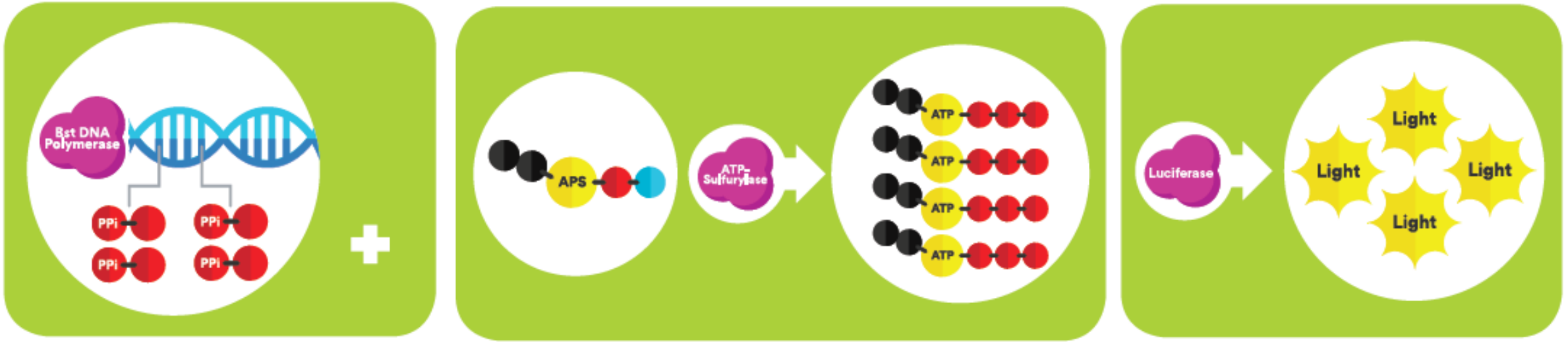
Amplificación
Isotérmica ADN

Bioluminiscencia
Detección

Combinación de 2 tecnologías para brindar la precisión, rapidez esperada de una forma costo efectiva.

¿Cómo funciona?

Amplificación Isotérmica del ADN → **Detección de la Bioluminiscencia** →



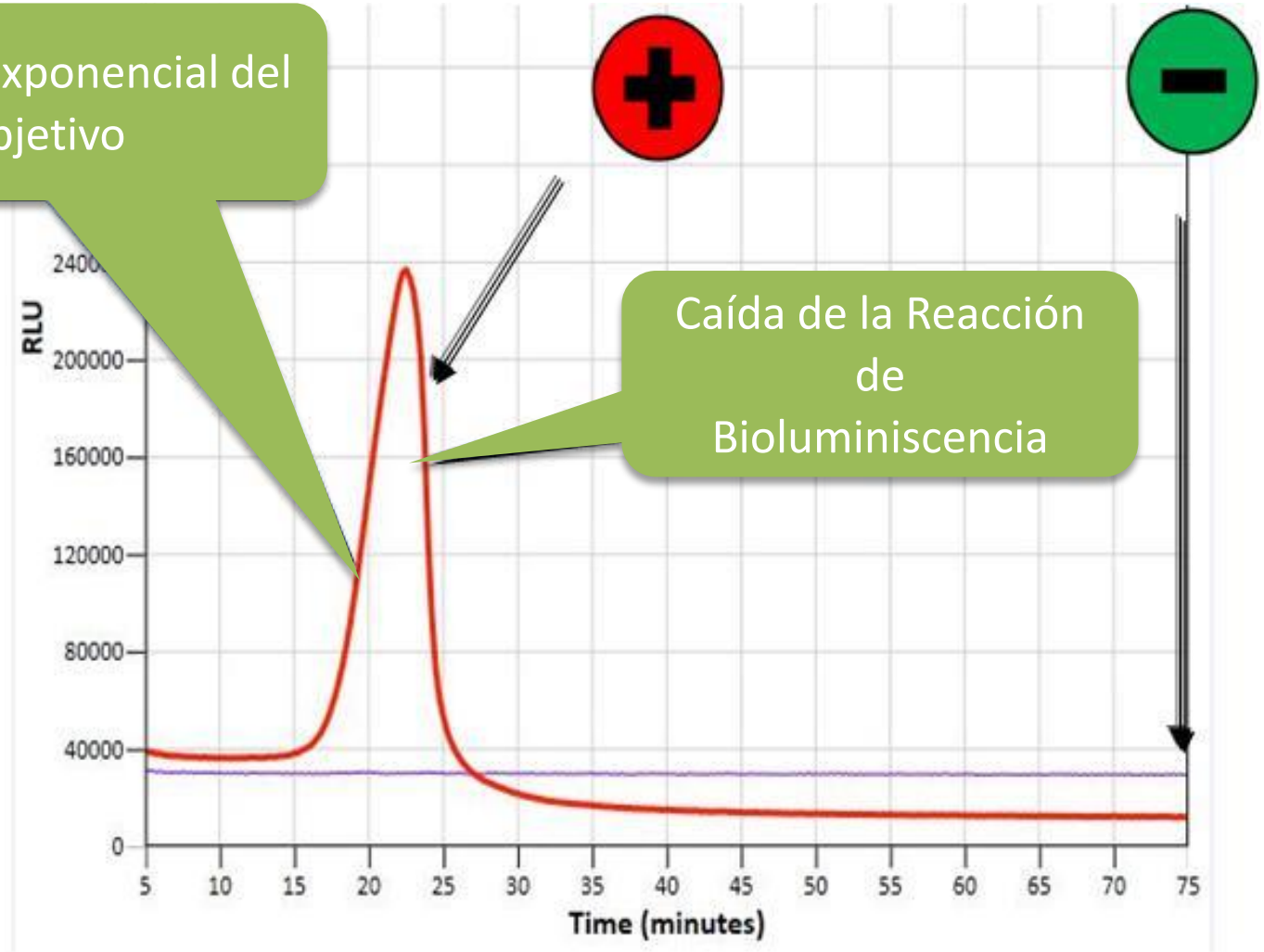
Amplificación Isotérmica Mediada por Bucle (LAMP) de ácidos nucleicos. Dirigida por la enzima Bst ADN Polimerasa y el uso de 6 diferentes cebadores para permitir una alta especificidad.

Generación Exponencial de Pirofosfatos Inorgánicos (Ppi) son convertidos a Adenosine Tri Fosfato (ATP) mediado para la enzima ATP-Sulfurilasa.

La enzima luciferasa permite mediar la reacción de bioluminiscencia en presencia de ATP, permitiendo la generación de luz y su detección en tiempo real a partir de los 15 min.

Detección Y Resultados en Tiempo Real

Amplificación Exponencial del ADN objetivo



Resultados Positivos a partir de los 15 min. Te permite decidir rápidamente las acciones correctivas y correcciones en tus procesos.

¿Cómo se obtiene el Sistema de Detección Molecular?

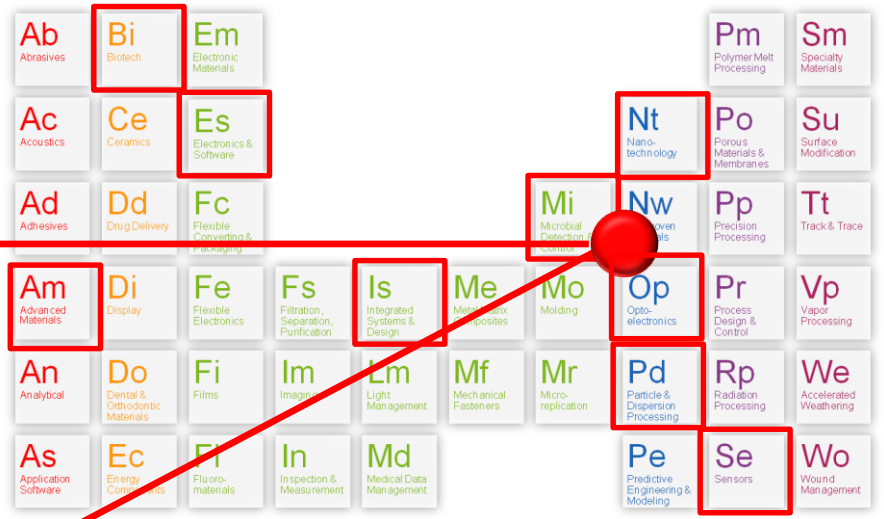
Pd
Proceso
Dispensación
Partículas

Nt
Nanotecnología

Op
Detección
Óptica

Is
Sistema y
Diseño
Integrado

Se
Sensores



Las Placas Petrifilm™ aprovechan las 9 plataformas tecnológicas de 3M.

¿Qué sigue?

Propuesta de Valor

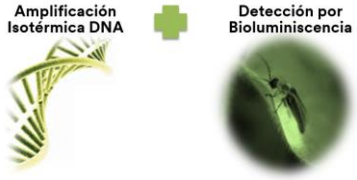
3M™ Sistema de Detección Molecular Next Gen (2)

Fácil de usar
menos traspasos
Reactivos listos para usar

TTR – Resultados al día siguiente

Amplio Portafolio
Protocolo único

Alcance: diferentes alimentos y muestras ambientales



Tecnología de avanzada

Equivalente a ISO, medios estándares

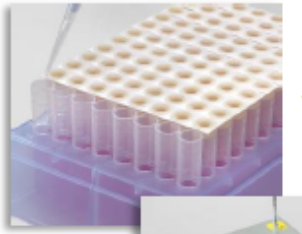
Sustentabilidad

Provee una detección cualitativa en 24 horas con un protocolo único y eficiente

Simplified for Productivity

3M Method *Salmonella*	3M Method *E. coli* O157 (including H7)	3M Method *Listeria*	3M Method *Listeria monocytogenes*	3M Method *Cronobacter*	3M Method *Campylobacter*
37°C ±1°C or 41.5°C ±1°C 18-30 hrs	41.5°C ±1°C 8-24 hrs	37°C ±1°C 24-32 hrs	37°C ±1°C 24-32 hrs*	37°C ±1°C 18-24 hrs	41.5°C ±1°C 22-28 hrs

*Raw dairy matrices require 40 hrs.



Transfer 20 µL enriched sample to lysis tube.

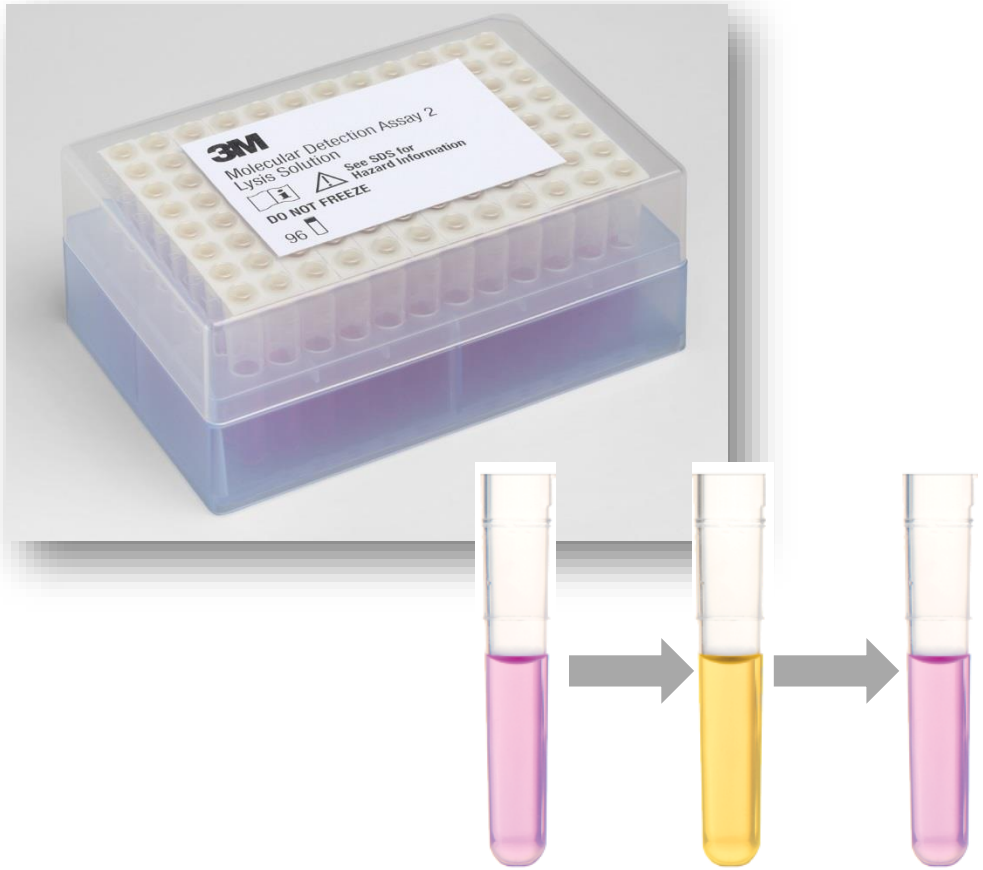
Heat 15 minutes – 100°C ±1°C.
Cool 5 minutes on block at room temperature.

Transfer 20 µL lysate to reagent tubes containing lyophilized pellet.

Place tubes in instrument.
Start run.
Amplification & detection in 15-75 minutes.
Automated & color-coded real-time results.

One Protocol for All Pathogen Targets

Nueva Química de Lisis

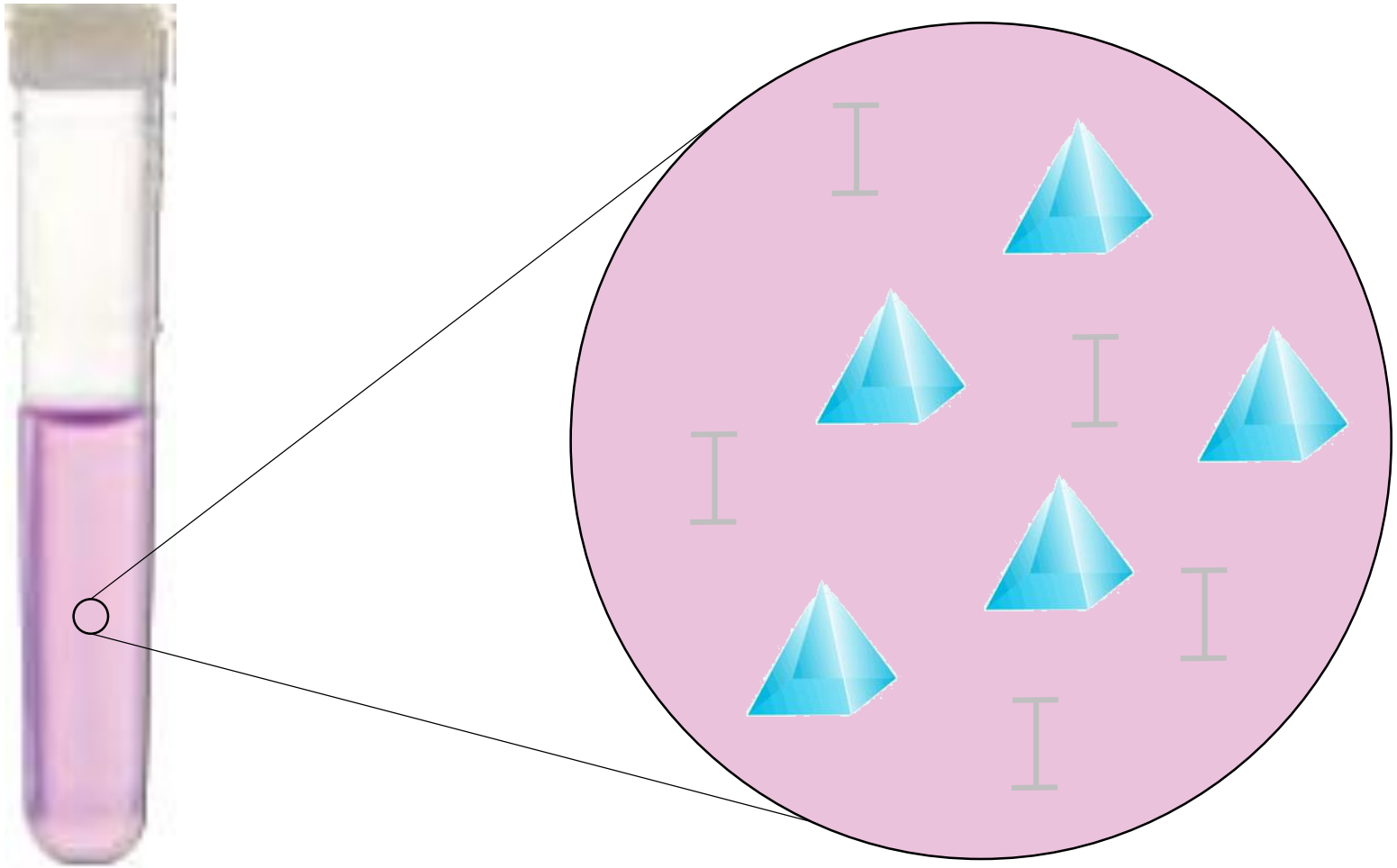


Nueva Bioquímica de lisis basada en la nanotecnología de 3M

- Soluciones listas para usar
- Fase líquida de quelación – no requiere uso resinas
- Asociación efectiva con inhibidores

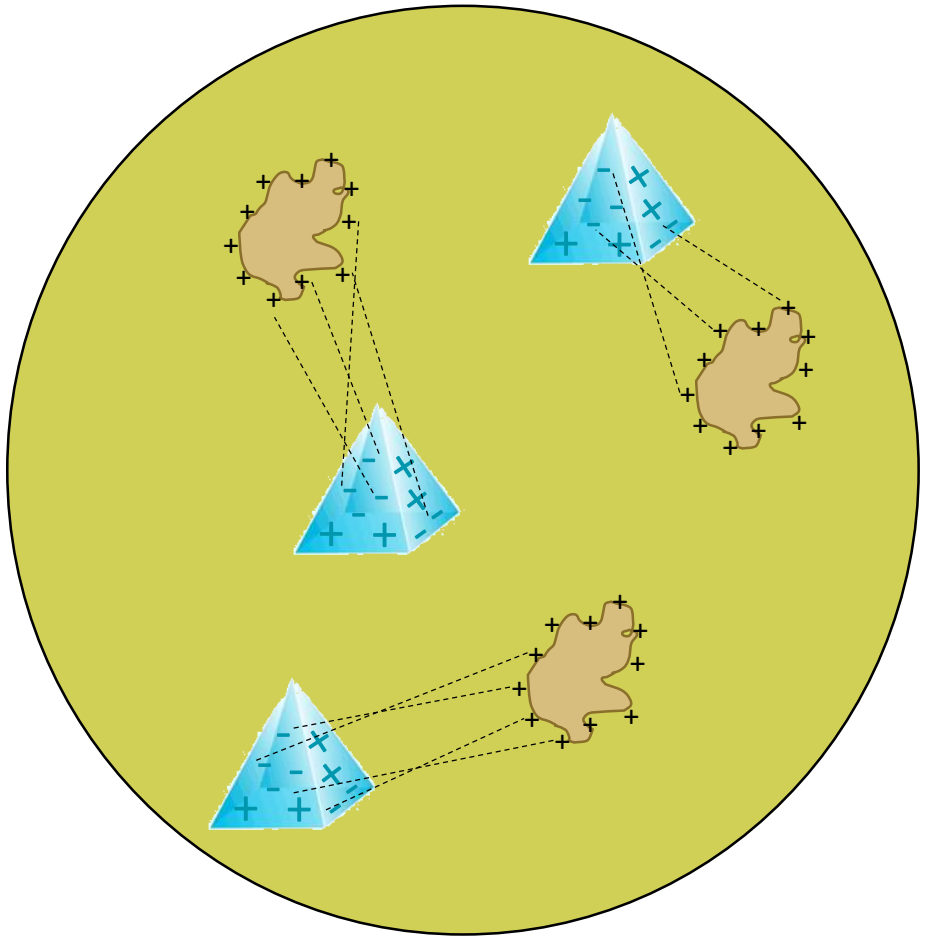
Control de proceso por especial cambio de color

- Indicador temperatura: Frío (Rosado) y caliente (Amarillo)
- Muestra visual indica cuándo pasar al siguiente paso de la reacción



3M Nanotechnology

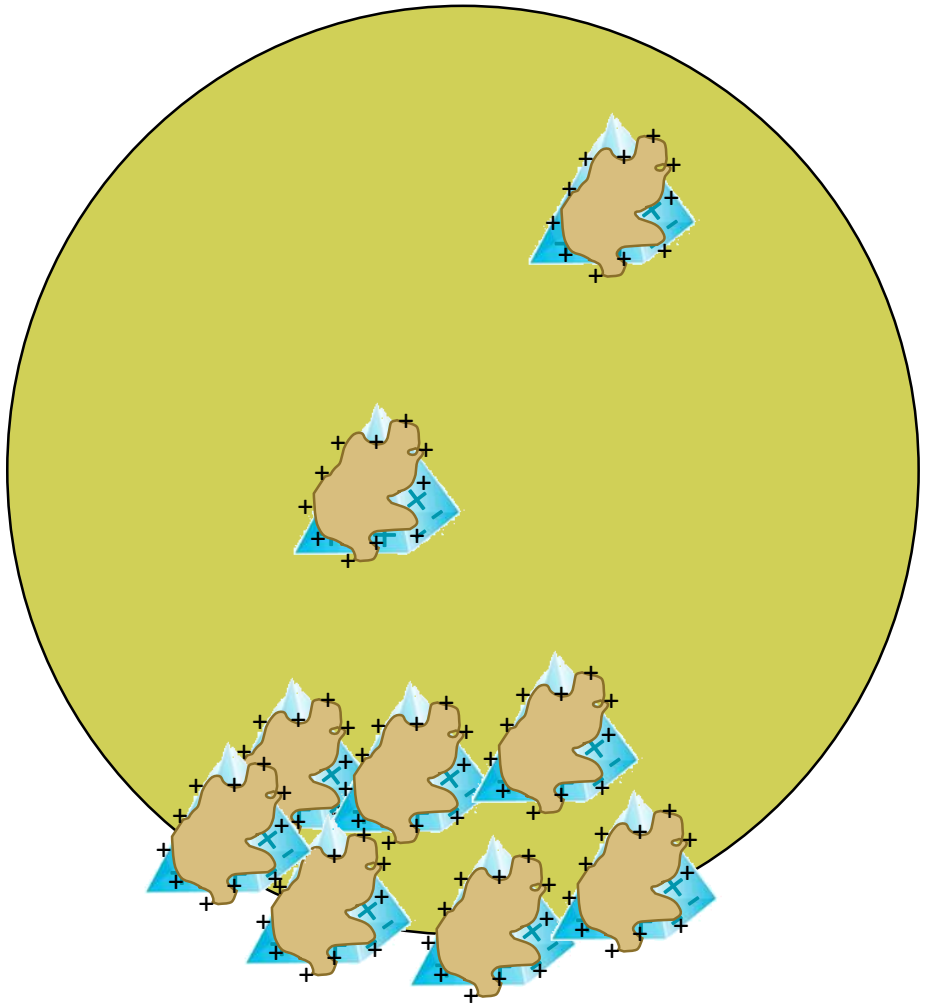
3. 3M Nanotechnology



a) Hace que las proteinas que se encuentran en la muestra y que podrian interferer con la amplificacion del ADN

b) Se unan a travez de las cargas superficiales a estas proteinas inhibidoras

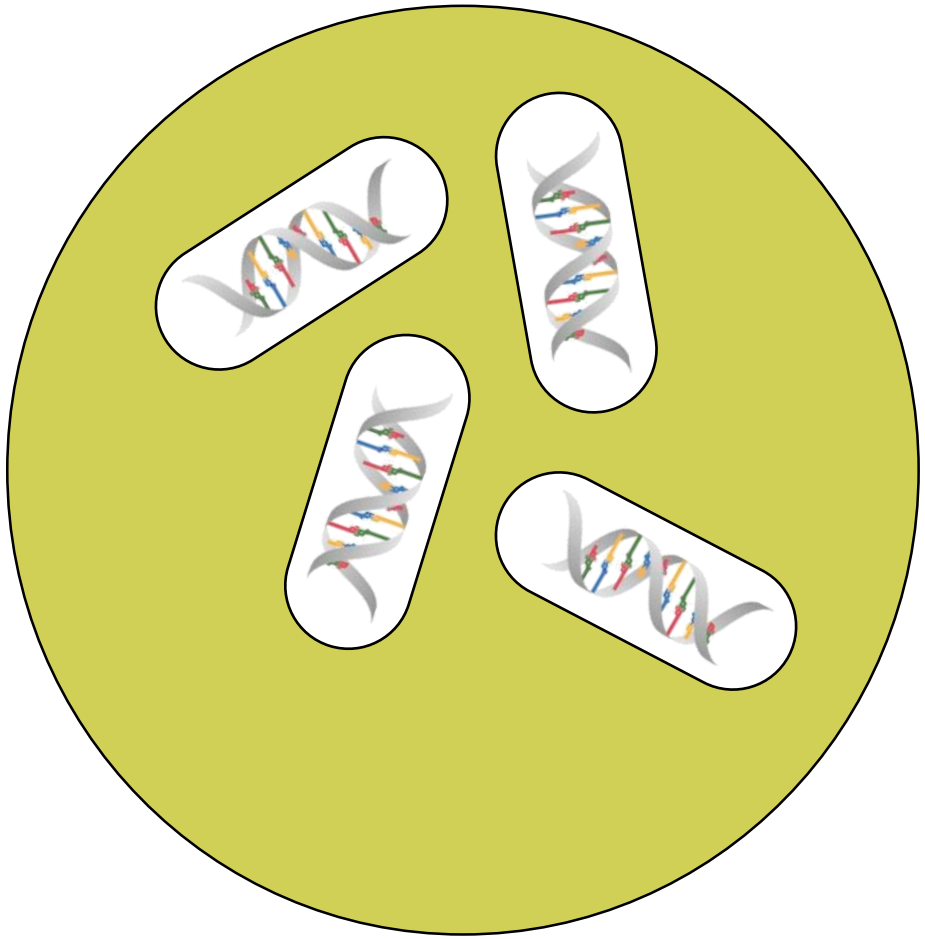
3. 3M Nanotechnology



c) Haciendo que se inactiven y agrupen

d) Y que precipiten al fondo del tubo y no interfieran en el ensayo

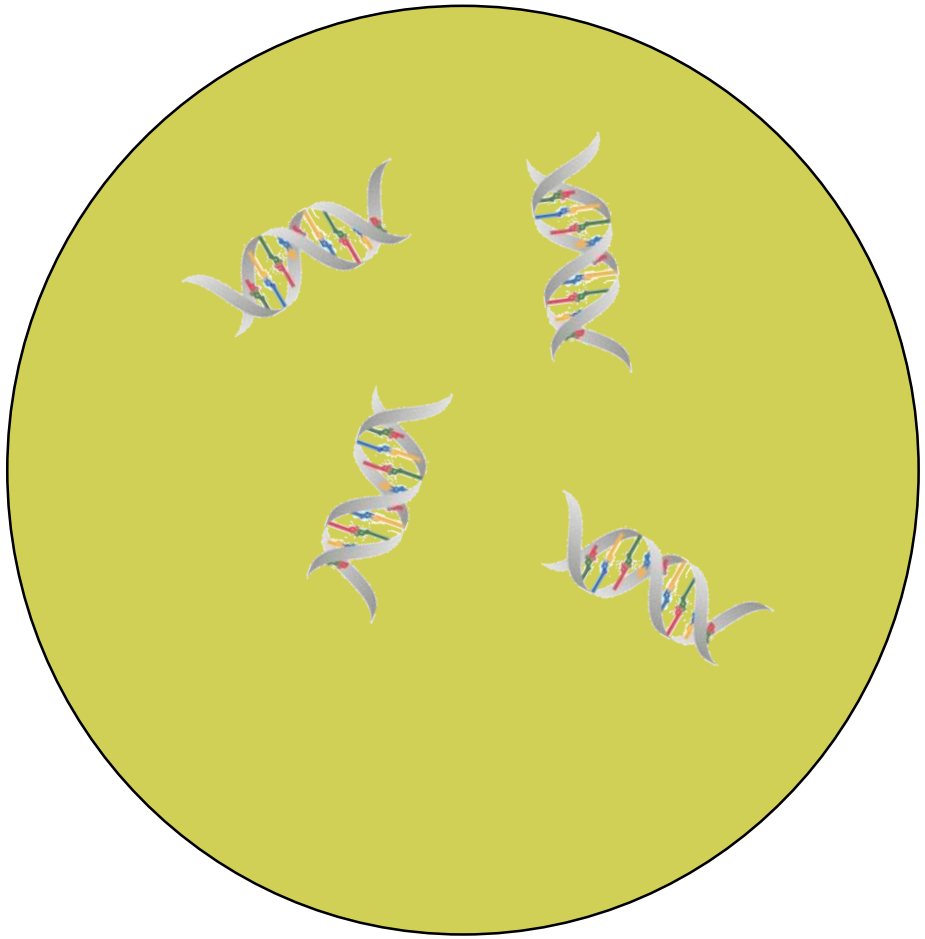
4. Cell Lysis



a) El ADN del patogeno objetivo que se encuentra dentro de la celula bacteriana

b) Es liberado al romperce la pared celular

4. Cell Lysis



c) Quedando libre y dirigiendose a la parte superior de la solución en el tubo

3M Molecular Detection System gives you more control with:

Control your...

- ✔ Time
- ✔ Protocol
- ✔ Process
- ✔ Productivity
- ✔ Quality
- ✔ Brand

Environmental zoning conversation – 3M Environmental Monitoring Webinars with Dr. Wiedmann on [3M Food Safety Environmental Monitoring Landing Page]

✓ Zoning concept is in webinar 3.

Method certifications & validations

Recognized by organizations and government agencies around the world

International recognition

AOAC® Performance Tested Method℠

MDA2 – *Salmonella*
••Certificate #091501

MDA2 – *Listeria*
••Certificate #111501

MDA2 – *Listeria monocytogenes*
••Certificate #081501

Salmonella
••Certificate #031208

E. coli O157
••Certificate #71202

Listeria
••Certificate #081203

Listeria monocytogenes
••Certificate #051401

Cronobacter
••Certificate #101703

AOAC® Official Method of Analysis℠

MDA2 – *Salmonella*
••AOAC 2016.01

MDA2 – *Listeria*
••AOAC 2016.07

MDA2 – *L. monocytogenes*
••AOAC 2016.08

MDA2 –*E. coli* O157
••AOAC 2017.01

Salmonella
••AOAC 2013.09

Listeria
••AOAC 2014.06

Listeria monocytogenes
••AOAC 2014.07

NF VALIDATION certificate granted by AFNOR Certification

MDA 2 – *Salmonella*
••3M 01/16-11/16

MDA 2 – *Listeria*
••3M 01/14-05/16

MDA 2 – *Listeria monocytogenes*
••3M 01/15-09/16

MDA 2 – *E. coli* O157
••3M 01/18-05/17

Salmonella
••3M 01/11-11/12

E. coli O157
••3M 01/12-03/13

Recognition by country

Australia

Department of Agriculture/Australian Quarantine and Inspection Service Approved Methods.

Salmonella
••AOAC 031208

E. coli O157
••AOAC 71202

Listeria
••AOAC 081203

Brazil

Ministry of Agriculture, Livestock and Supply (MAPA) Official Method.

Salmonella

Canada

Heath Canada Compendium of Analytical Methods.

Salmonella
••MFLP-06

E. coli O157

Listeria
••MFLP-05

Listeria monocytogenes

AOAC INTERNATIONAL
The Scientific Association Dedicated to Analytical Excellence®

PERFORMANCE TESTED AOAC RESEARCH INSTITUTE

BY AFNOR CERTIFICATION NF VALIDATION

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA

Health Canada

Australian Government
Department of Agriculture, Fisheries and Forestry

3M wins USDA-FSIS contract for pathogen detection

USDA-FSIS has awarded 3M the contract for pathogen detection instruments. (photo: 3M)

07.10.2018 *By Bob Sims*

ST. PAUL, Minn. – After thorough evaluations of many commercially available methods of pathogen detection, the US Dept. of Agriculture Food Safety and Inspection Service (USDA FSIS) has awarded 3M the contract for pathogen detection instruments. 3M's Molecular Detection System will be used to detect *Salmonella*, *Listeria monocytogenes* and *E. coli* O157 (including H7), the three major pathogenic organisms threatening the safety of meat, poultry and egg-related products.

"Protecting food, consumers and businesses with innovative and reliable technologies has been at the core of everything we do, so the USDA FSIS' selection of 3M as a partner is validation of the science and the spirit of our work," Polly Foss, 3M Food Safety global vice president, said in a statement. "The 3M Molecular Detection System has proven to be a highly accurate and efficient tool for many food producers globally."

FDA U.S. FOOD & DRUG ADMINISTRATION
CENTER FOR FOOD SAFETY & APPLIED NUTRITION

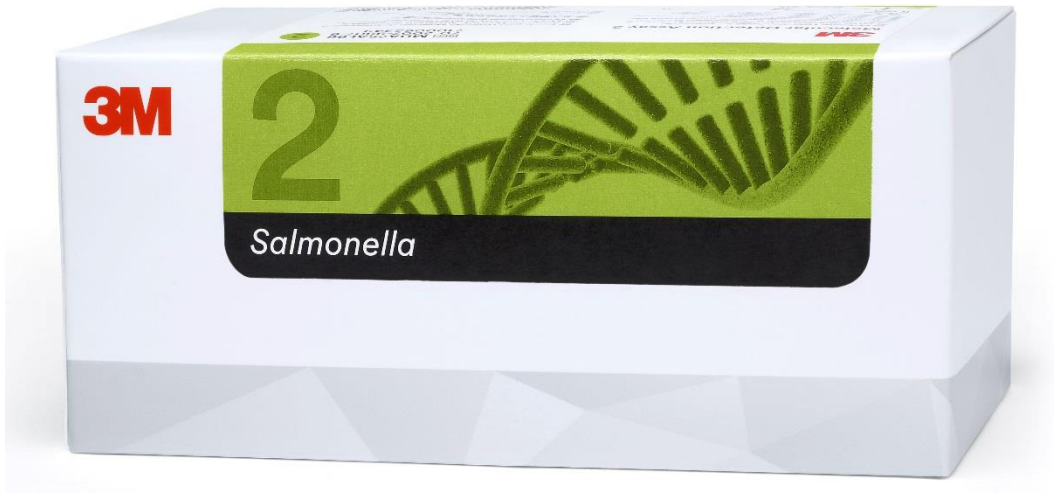
Equivalent Testing Methodologies for *Listeria* species and *Listeria monocytogenes* in Environmental Samples

FDA has determined that the following methods are "scientifically valid" and "at least equivalent to the method of analysis in § 112.152(a) in accuracy, precision, and sensitivity"[1] in detecting *Listeria* species and *L. monocytogenes*. The method of analysis in § 112.152(a) is "Testing Methodology for *Listeria* species or *L. monocytogenes* in Environmental Samples" (October 2015, Version 1).

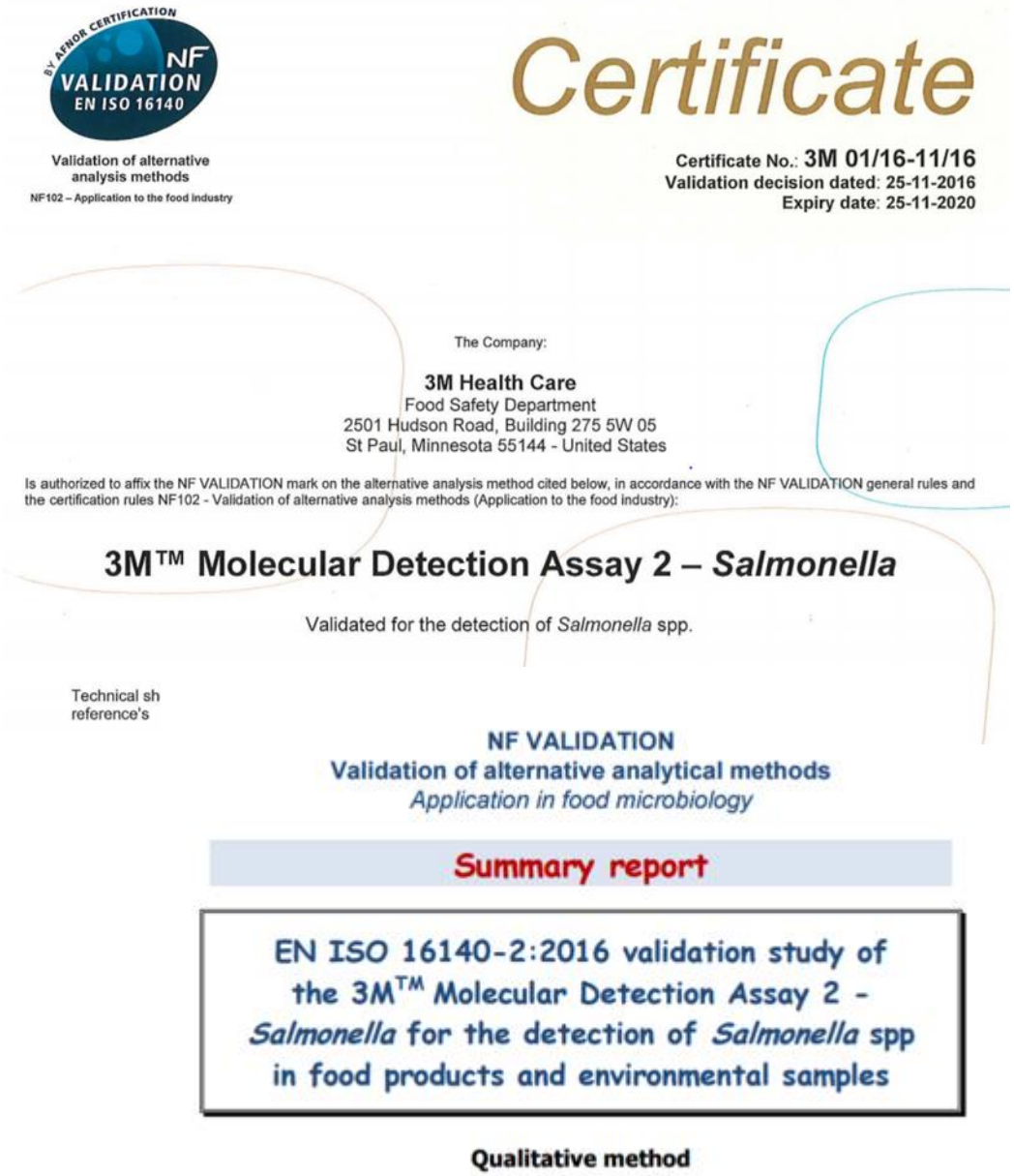
1. AOAC Official Method 2013.10. VIDAS® UP *Listeria* (LPT), *Listeria* in select foods and environmental surfaces.
2. AOAC Official Method 2016.07. 3M Molecular Detection Assay (MDA) 2, *Listeria* in select foods and environmental surfaces.
3. AOAC Official Method 996.14. Assurance polyclonal enzyme immunoassay method (EIA), *Listeria* in select foods and environmental surfaces.

AOAC® *Official Method of Analysis*℠

Ensayo Detección Molecular 2 3M MDA2 – Salmonella



AOAC OMA 2016.01



AOAC® *Official Method of Analysis*℠

Ensayo Detección Molecular 2 3M MDA2 – Listeria monocytogenes

AOAC OMA 2016.08

PERFORMANCE TESTED AOAC RESEARCH INSTITUTE LICENSE NUMBER 081501

NF VALIDATION EN ISO 16140 — By AFNOR CERTIFICATION

Validation of alternative analysis methods

NF102 – Application to the food industry

Certificate

Certificate No.: 3M 01/15-09/16
Validation decision dated: 30-09-2016
Expiry date: 30-09-2020

The Company:

3M Health Care
Food Safety Department
2501 Hudson Road, Building 275 5W 05
St Paul, Minnesota 55144 - United States

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

3M™ Molecular Detection Assay 2 – *Listeria monocytogenes*

Validated for the detection of *Listeria monocytogenes*

Summary report

EN ISO 16140-2:2016 validation study of the 3M™ Molecular Detection Assay 2 - *Listeria monocytogenes* for detection of *Listeria monocytogenes* in food products and environmental samples

Qualitative method

ES (Español)

Instrucciones específicas para los Métodos validados de Performance Tested Method℠ de AOAC® #091501

PERFORMANCE TESTED AOAC RESEARCH INSTITUTE LICENSE NUMBER 091501

En los estudios de PTM de AOAC, se descubrió que el Ensayo de Detección Molecular 2 para *Salmonella* 3M era un método efectivo para la detección de la *Salmonella*. Las matrices que se analizaron en el estudio se muestran en la Tabla 3.

Tabla 3. Protocolos de enriquecimiento conforme a PTM de AOAC #091501.

El volumen de la muestra transferida a los tubos de Solución de Lisis (LS) es de 20 µl.

Matriz de la muestra		Tamaño de la muestra	Volumen del caldo de enriquecimiento	Temperatura de enriqueci-miento (±1°C)	Tiempo de enriqueci-miento (h)
Carne de res molida cruda		25 g	225 ml de BPW ISO (precalentada)	41,5	10-24
		325 g	975 ml de BPW ISO (precalentada)		
Carne de pollo molida cruda		25 g	225 ml de BPW ISO (precalentada)	41,5	10-24
		325 g	975 ml de BPW ISO (precalentada)	41,5	14-24
Pollo empanizado cocido		325 g	2925 ml de BPW ISO	37	18-24
Alimento seco para perros		25 g	225 ml de BPW ISO	37	18-24
		375 g	1500 ml de BPW ISO		
Pimienta negra, langostino entero crudo, espinaca cruda en bolsa, queso estadounidense procesado pasteurizado		25 g	225 ml de BPW ISO	37	18-24
Enjuague de carcasa de pollo		30 ml	30 ml de BPW ISO (precalentada)	41,5	18-24
Esponja de carcasa de pollo		1 esponja	50 ml de BPW ISO (precalentada)	41,5	18-24
Leche en polvo descremada instantánea		25 g	225 ml de BPW ISO	37	20-24
Cacao en polvo		25 g	225 ml de BPW ISO	37	24-28
Huevo entero líquido pasteurizado		100 ml	900 ml de BPW ISO	37	18-24
Agua de riego de brote gastado		375 ml	3375 ml de BPW ISO	37	18-24
Mantequilla de maní cremosa		25 g	225 ml de BPW ISO	37	18-24
		375 g	3375 ml de BPW ISO		
Ambiental	Hormigón sellado	1 esponja	225 ml de BPW ISO (precalentada)	41,5	18-24
	Acero inoxidable	1 hisopo	10 ml de BPW ISO (precalentada)	41,5	18-24
	Azulejos de cerámica sellados	1 esponja	50 ml de BPW ISO (precalentada)	41,5	18-24

EN (English)

Table 2: Enrichment protocols according to AOAC Official MethodsSM 2014.07 and AOAC Performance TestedSM Certificate #051401.

	Sample Matrix		Sample Size	Primary Enrichment Demi-Fraser Broth (no FAC) Enrichment Broth Volume (mL)	Enrichment Temperature (±1°C)	Enrichment Time (hr)	Secondary Enrichment Fraser Broth Base (no FAC) Enrichment Medium (mL)	Enrichment Temperature (±1°C)	Enrichment Time (hr)
AOAC OMA 2014.07 AOAC PTM #051401	Full fat cottage cheese		25 g	225	37	24-28	Not required		
	Chocolate milk		25 g	225	37	24-28	Not required		
	Beef hot dogs		25 g	225	37	26-30	Not required		
			125 g	1225					
	Deli turkey		25 g	225	37	26-30	Not required		
			125 g	1225					
	Cold smoked salmon		25 g	225	37	26-30	Not required		
	Environmental surfaces	Concrete	1 sponge	100	37	26-30	Not required		
		Concrete, Stainless Steel	1 sponge	225					
AOAC PTM #051401	Raw bagged Spinach		25 g	225	37	24-26	Transfer 0.1 mL into 10 mL Fraser Broth Base	37	24-26
	Romaine lettuce		25 g	225	37	24-26	Transfer 0.1 mL into 10 mL Fraser Broth Base	37	24-26
	Whole cantaloupe		1 melon	Enough volume to allow melon to float [volume may be 1.5 times the weight of the cantaloupe]	37	24-26	Transfer 0.1 mL into 10 mL Fraser Broth Base	37	24-26
For Other Matrices	Environmental		1 swab	10	37	26-30	Not required*		
			1 sponge	100					
			1 sponge	225					
	Heat-processed dairy		25 g	225	37	24-28	Not required*		
	Other foods**		25 g	225	37	24-26	Fraser Broth Base: 0.1 mL into 10 mL	37	24-26

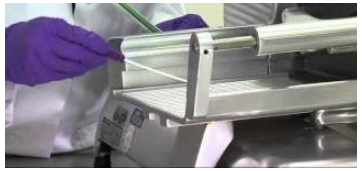
* A 24-26 hr primary enrichment in Demi-Fraser Broth Base (no FAC) followed by a 24-26 hr secondary enrichment in Fraser Broth Base (no FAC) is also acceptable for these matrices.

** Other Foods includes meat, poultry, fish, seafood, produce, vegetable and vegetable-based products, and raw dairy.

Validaciones oficiales para métodos moleculares como NF y AOAC OMA están ligadas al proceso de enriquecimiento.

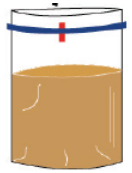
Detección de patógenos en alimentos y muestras ambientales

1. Coleccion de la muestra



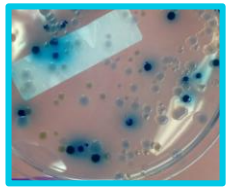
Colectar el analito y asegurar que se mantiene intacto hasta el analisis

2. Enriquecimiento



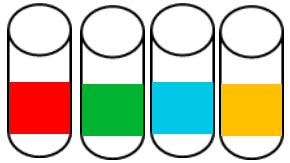
Permitir la multiplicacion del organismo patogeno para facilitar la deteccion y permitir su recuperacion si esta dañado

3. Detección



Determinar a traves de un metodo especifico si el organismo patogeno podria estar presente

4. Confirmación



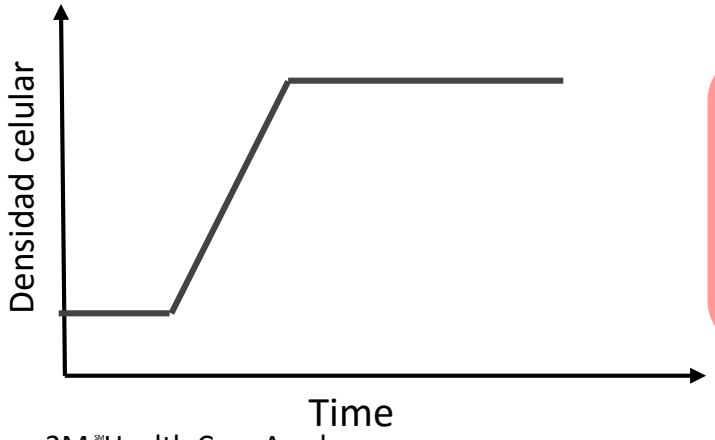
Confirmar el resultado obtenido en el paso de Deteccion

Enriquecimiento

Objetivo

Permitir la recuperación y multiplicación de células

- Dañadas
- Estresadas
- En presencia de otros microorganismos que están de manera natural en el producto (microflora asociada)
  - Mayor población
  - Mejor estado fisiológico
- En presencia de factores, inherentes al producto, que pueden tener un impacto en el crecimiento microbiano



La mayoría de los métodos moleculares requieren que la densidad celular del patógeno, después del enriquecimiento, llegue a 10^3 -10^4 UFC/mL para poder ser detectado

Buenas practicas que permiten tener un adecuado crecimiento microbiano

Asegurarse que las condiciones requeridas para el crecimiento microbiano sean óptimas

b. Cuando se utilicen volúmenes de muestra grandes >100 g

- Asegurar que la temperatura requerida para la incubación no es afectada debido al uso de un mayor volumen de caldo de enriquecimiento.

United States Department of Agriculture
Food Safety And Inspection Service, Office of Public Health Science

MLG 4.09		Page 6 of 19
Title: Isolation And Identification of *Salmonella* From Meat, Poultry, Pasteurized Egg, and Siluriformes (Fish) Products and Carcass and Environmental Sponges		
Revision: .09	Replaces: .08	Effective: 1/2/17

Table 1. Sample Preparation and Enrichment Guide

Product	Sample Preparation		Incubation
	Portion Size	Enrichment Amount determined by volume or weight	Cultural or PCR rapid screen
Ready-to-Eat Meat, Poultry and Siluriformes Foods	325 ± 6.5 g	975 ± 19.5 ml BPW	35 ± 2°C for 18-24 h
Raw Poultry Products	325 ± 32.5 g or 25 ± 2.5 g	1625 ± 32.5ml BPW or 225 ± 4.5 ml BPW	35 ± 2°C for 20-24 h
Raw Meat and Raw Beef Mixed Products	325 ± 32.5 g or 25 ± 2.5 g	975± 19.5 ml mTSB or 75 ± 1.5 ml mTSB	42 ± 1°C for 15-24 h
Poultry Carcass and Environmental Sponges	1 sponge pre-moistened with 10 ml buffer	50 ± 1 ml BPW to bring total volume to 60 ml*	35 ± 2°C for 20-24 h
Meat Carcass and Environmental Sponges	1 sponge pre-moistened with 10 ml buffer	50 ± 1 ml mTSB to bring total volume to 60 ml*	42 ± 1°C for 15-24 h
Whole Bird and Parts Rinses	30 ± 0.6 ml sample rinse fluid	30 ± 0.6 ml BPW	35 ± 2°C for 20-24 h
Pasteurized Liquid, Frozen or Dried Egg Products	100 ± 2 g	900 ± 18 ml BPW	35 ± 2°C for 18-24 h
Raw Siluriformes Products	25 ± 2.5 g	225 ± 4.5 ml BPW	35 ± 2°C for 22-26 h
Fermented Products	325 ± 6.5 g + 10 g of sterilized calcium carbonate	2925 ± 58.5 ml of BPW with 1 ml of a 1% aqueous solution of crystal violet per liter	35 ± 2°C for 18-24 h
Dried Products (Breading Mix, Dehydrated Sauce, Soup Mix, Dried Milk)	325 ± 6.5 g	2925 ± 58.5 ml BPW	35 ± 2°C for 18-24 h

* or maintain a 1:6 ratio for different project buffer volumes, e.g., 25 ml buffer + 125 ml enrichment

325 g + 2925 mL de BPW a 35 °C / 18 h

Nota: Evaluar si se requiere el uso de medio precalentado antes del enriquecimiento.

Tabla 2. Protocolos generales de enriquecimiento

Matriz de la muestra	Tamaño de la muestra[1]	Volumen del caldo de enriquecimiento[1,2]	Temperatura de enriquecimiento (±1 °C)	Tiempo de enriquecimiento (h)	Volumen de análisis de la muestra
La fórmula en polvo para lactantes (Powdered infant formula, PIF) y materias primas tales como leche en polvo, polvo de soja, suero en polvo, lactosa, harina de arroz y maltodextrina.	Muestra de 1X gramos	9X ml BPW ISO (1:10)	37	18-24	20 µl
Materias primas tales como sales, minerales, aminoácidos, vitaminas y DHA (ácido docosahexaenoico).	Muestra de 1X gramos	99X ml BPW ISO (1:100)	37	18-24	20 µl
Muestras ambientales secas como polvo, barreduras y suciedad aspirada	Muestra de 1X gramos	9X ml BPW ISO (1:10)	37	18-24	20 µl
Esponja ambiental con 10 ml de caldo de Letheen o D/E Caldo Neutralizante	1 dispositivo de muestreo	90 ml BPW ISO (1:10)	37	18-24	20 µl

1. 3M ha evaluado el Ensayo de Detección Molecular 2 3M - *Cronobacter* usando las proporciones de dilución que se indican en la Tabla 2 hasta 300 g. Es responsabilidad del usuario validar las proporciones de dilución o los protocolos alternativos para garantizar que este método de prueba satisface los criterios del usuario.
2. Use caldo de enriquecimiento BPW ISO **precalentado** si el volumen del caldo de enriquecimiento supera los 300 ml.

Buenas practicas que permiten tener un adecuado crecimiento microbiano

Asegurarse que las condiciones requeridas para el crecimiento microbiano sean óptimas

b. Cuando se utilicen volúmenes de muestra grandes >100 g

- Asegurar que la temperatura requerida para la incubación no es afectada debido al uso de un mayor volumen de caldo de enriquecimiento.

Muy bien

Bien

!Porfavor NO!

Tener bolsas de enriquecimiento muy juntas disminuye la distribución de calor

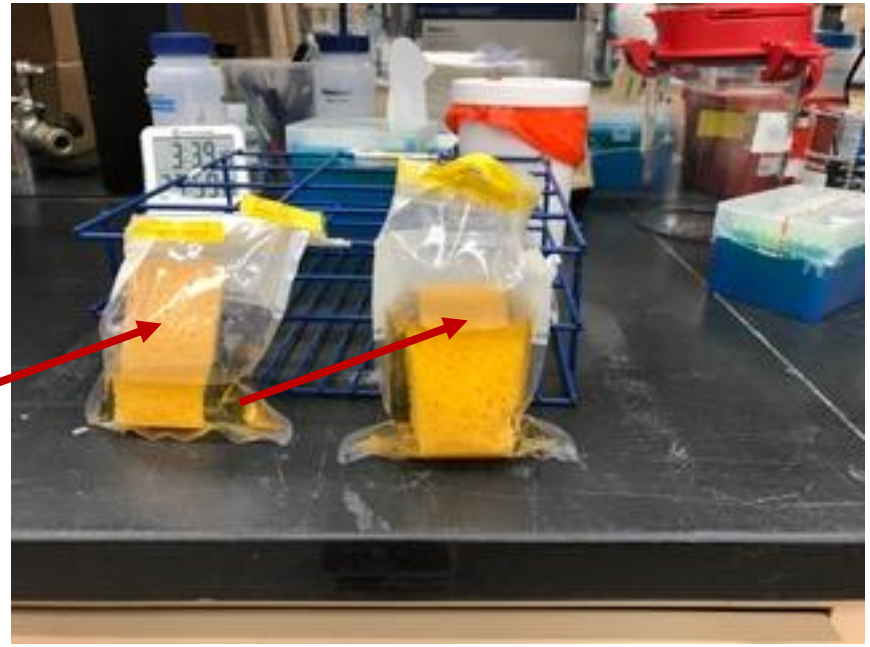
Bien

✓

Super bien

Entre mas espacio exista entre las bolsas y contenedores hay mejor distribución de calor

Asegurar que la muestra queda completamente sumergida en el caldo de enriquecimiento



Común en esponjas, leche en polvo, vegetales frondosos, alimentos poco densos

Gracias!

Veronica Yáñez
Key Account Leader 3M Food Safety
vfyanez@mmm.com