



**Caracterización del procedimiento para la identificación de *Salmonella spp*, por medio de la técnica RT-PCR.**

Fabián Alexander Osorio Carmona.

Informe de Prácticas Académicas.

Asesores:

Yasmín Eliana Lopera Pérez, Magister en Ciencias de los Alimentos

Jerónimo Osorio Echavarría, Magister en Ingeniería

Universidad de Antioquia  
Facultad de Ingeniería.  
Ingeniería Bioquímica  
Carmen de Viboral, Antioquía

2022

---

<b>Cita</b>	(Osorio Carmona, F, 2022)
<b>Referencia</b>	Osorio Carmona, F. (2022). <i>Caracterización del procedimiento para la identificación de Salmonella spp, por medio de la técnica RT-PCR</i> [Práctica Académica]. Universidad de Antioquia, Carmen de Viboral, Antioquia.
<b>Estilo APA 7 (2020)</b>	

---



**Repositorio Institucional:** <http://bibliotecadigital.udea.edu.co>

Universidad de Antioquia - [www.udea.edu.co](http://www.udea.edu.co)

**Rector:** John Jairo Arboleda Céspedes.

**Decano:** Jesús Francisco Vargas Bonilla.

**Jefe departamento:** Lina María Gonzalez Rodríguez.

El contenido de esta obra corresponde al derecho de expresión de los autores y no compromete el pensamiento institucional de la Universidad de Antioquia ni desata su responsabilidad frente a terceros. Los autores asumen la responsabilidad por los derechos de autor y conexos.

## Tabla de contenido

Caracterización del procedimiento para la identificación de <i>Salmonella spp</i> , por medio de la técnica RT-PCR.....	1
Tabla de contenido .....	3
Lista de Gráficos .....	5
Siglas, acrónimos y abreviaturas .....	6
Resumen .....	7
Abstract .....	8
Introducción .....	9
Planteamiento del problema .....	11
Problema de investigación .....	15
Marco teórico .....	16
Metodología .....	21
Preparación de las muestras: .....	21
Preparación de las muestras y del Master mix. ....	22
Interpretación de resultados. ....	23
Valor Cp .....	23
Resultados .....	26
Discusión.....	30
Conclusiones .....	33
Recomendaciones.....	34
Referencias .....	35
Anexos.....	37

## Lista de Tablas

- Tabla 1.** Características del equipo RIDA CYCLER de la empresa r-biopharm. Recuperado del sitio web: <https://food.r-biopharm.com/>..... 17
- Tabla 2.** Componentes del Kit SureFast® Salmonella ONE. Información encontrada en el sitio web: <https://food.r-biopharm.com/>..... 19
- Tabla 3.** Ejemplo de preparación del master-mix para la preparación de 15 muestras.....22

## Lista de Gráficos

- Gráfico 1.** Interpretación del resultado obtenido en la RT-PCR (Aguilera, P. 2014). .....24
- Gráfico 2.** Normalización de la fluorescencia vs la cantidad de ciclos. Obtenido del Software del equipo RIDA CYCLER.....28
- Gráfico 3.** Resultados obtenidos por González-Escalona, N. (2012), en el estudio de dos genes distintos y el control interno del kit. Recuperado de: <https://acortar.link/HGxBOD>.....32

## Siglas, acrónimos y abreviaturas

<b>spp</b>	Especies no especificadas.
<b>RT-PCR</b>	Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction
<b>ADN</b>	Ácido Desoxidorribonucleico
<b>AOXLAB S.A.S.</b>	Empresa dedicada al análisis de muestras.
<b>ARN</b>	Ácido Ribonucleico
<b>invA</b>	Gen de invasividad A
<b>MIP</b>	Marijuana-Infused Products
<b>FDA</b>	Food and Drug Administration
<b>USDA</b>	United States Department of Agriculture
<b>ADNc</b>	ADN complementario
<b>qPCR</b>	PCR cuantitativa
<b>PC</b>	Personal Computer
<b>FRET</b>	Fluorescence Resonance Energy Transfer
<b>AOAC</b>	Association of Analytical Communities
<b>FAM/VIC/HEX</b>	Canales de detección de ADN
<b>Taq. Polimerasa</b>	Polimerasa termoestable de <i>Thermus aquaticus</i> .
<b>Ct o Cp</b>	Cycle threshold
<b>STEC</b>	Shiga-Toxigenica Escherichia Coli
<b>TSB</b>	Caldo Soja Tríptico
<b>TSA</b>	Agar Triptón Soja

## Resumen

Legalmente en Colombia se permite el uso de cannabis para diferentes fines, por lo que en este trabajo se identificaron los aspectos clave en la industrialización de productos a base de marihuana, gracias a la implementación del decreto 811 de 2021. Por este motivo, es necesario garantizar la inocuidad de las materias primas, que en este caso es la planta del cannabis y las posibles enfermedades que pueden llegar a ser transmitidas al ser humano, debido a la carga de diversos patógenos, tal como es el caso de *Salmonella spp*, la cual puede traer grandes afecciones al ser humano. Para poder detectar estas microorganismos de una manera más eficiente, se han diseñado diferentes técnicas, como es el caso de RT-PCR, que se detalla en el presente proyecto con todas sus condiciones de uso, además aplicada a un proveedor particular (r-biopharm), con un equipo detector de fluorescencia multicanal (RIDA CYCLER) y con el uso del kit SureFast® Salmonella ONE. Se realizó un ensayo con el equipo, donde se obtuvieron resultados negativos, pues de las 27 muestras realizadas por el personal del laboratorio, de las cuales, sólo en seis de ellas se obtuvo una amplificación de ADN, algo que no es congruente con el número de muestras contaminadas con el microorganismo (*Salmonella thypimurium*).

**Palabras clave:** RT-PCR, *Salmonella spp*, Cannabis, Caracterización

### **Abstract**

Legally in Colombia it let the use of cannabis for deferent targets, so in this work some key aspects were identified in the industrialization of products the weed based, thanks of the implementation of decree 811 of 2021. For this reason, it is necessary guarantee the safety of the raw material, which in this case in at the cannabis plant and the possible diseases that can be transmitted to humans, due to the load of diver pathogens, such as the case of *Salmonella spp*, which can be bring it a great affection for human being. To can be detected this microorganism in a way more efficiently, have been designed different techniques, such as the case of RT-PCR, which the detailed it in the present project with all its conditions for use, also applicated for a particular supplier (r-biopharm), with a multichannel fluorescence detector (RIDA CYCLER) and with the use of SureFast® Salmonella ONE kit. One assay was carried with the equipment, where the negative results were obtained, since of the 27 samples called out by the laboratory staff, of which only six of them had a DNA amplification, something that is not consistent with the number of samples contaminated with the microorganism (*Salmonella typhimurium*).

**Keywords:** RT-PCR, Salmonella spp, Cannabis, Characterization.



## Introducción

El estudio de la ingeniería bioquímica tiene como eje fundamental la solución de problemas comunes, dentro de los cuales se ve involucrada la presencia de microorganismos, lo que a su vez incluye su composición genética y la afectación de recursos ambientales del mismo. Por esto, la Universidad de Antioquia, ha diseñado dicho programa académico con diferentes cursos que son complementarios entre sí para lograr realizar aportes con valor agregado dentro de la industria.

Para tener habilidades en herramientas biotecnológicas que nos permitan estudiar los organismos presentes en un ecosistema, es necesario poseer conocimientos sobre biología, cultivos celulares y prácticas de ingeniería genética, dentro de estas últimas se incluye la PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa), técnica que permite la identificación de cadenas de ADN (Ácido Desoxiribonucleico), por medio de compuestos enzimáticos, pares de bases y ciclos térmicos (Díaz, A. 2014).

Por otra parte, la PCR en tiempo real también permite la cuantificación de los genes, y debido a que es un procedimiento eficaz se ha convertido en uno de los métodos de cuantificación de genes más utilizados porque tiene un amplio rango dinámico, y una gran sensibilidad, por lo que puede ser muy específico en la secuencia a codificar, además que tiene poco o ningún procesamiento posterior a la amplificación y es susceptible a aumentar el rendimiento de la muestra (Wong, M. 2005).

Una mejoría para la amplificación por medio de RT-PCR (Reacción en cadena de la polimerasa con retrotranscriptasa reversa) de algún tipo de ADN, es el empleo de un fluoróforo, por lo cual es necesario un equipo que permita detectar señales fluorescentes que realicen el monitoreo de la reacción de amplificación, en este caso, el termociclador debe ser capaz de mantener una temperatura uniforme en cada una de las diferentes etapas (desnaturalización del ADN molde, alineamiento de oligonucleótidos y síntesis) (Aguilera, P. 2014).

En este sentido, se propone una solución para la contaminación de microorganismos en la planta de cannabis. La Salmonella ha sido considerada como una de las especies patógenas alimentarias más importantes, esto debido a que sus principales huéspedes son de origen animal como la carne de res, aves, productos derivados como huevo, leche. En especial los productos avícolas son los principales causantes de enfermedades humanas debido a la infección con este patógeno (Jamshidi, A. 2009).

Gracias a la petición de sus clientes, el laboratorio AOXLAB S.A.S., se ha puesto en la tarea de realizar análisis microbiológicos para la identificación de Salmonella en Cannabis. Cabe resaltar que aparte de ofrecer este servicio por medio de herramientas de microbiología, AOXLAB S.A.S. También ofrece soluciones integrales en el análisis de cannabis, tales como terpeno, solventes residuales, micotoxinas, metales pesados, pesticidas y validaciones.

El laboratorio en su interés de satisfacer la necesidad del mercado, cuenta como alianza estratégica con el proveedor r-biopharm®, empresa que suministra tanto los equipos necesarios para la realización de los procedimientos, así como los kits necesarios para la caracterización de los microorganismos.

## Planteamiento del problema

Las especies de *Salmonella* han sido consideradas como uno de los patógenos alimentarios más importantes en todo el mundo siendo el principal reservorio de este microorganismo las fuentes animales como la res, la carne de las aves, los huevos y la leche. Así como la mayoría de los portadores de este microorganismo son los productos avícolas, se tendría que tener un mayor cuidado en el trato de los mismo, algo que usualmente no se considera como un problema de salud pública.

Se ha identificado, gracias a el aislamiento en distintos brotes en todo el mundo, diversos tipos de serovariedad de la *Salmonella*, entre ellos podemos encontrar la *Salmonella entérica*, *Salmonella bongori*, además de muchos otros subgéneros. Por lo tanto, es necesario reconocerlos y aislarlos, para lo cual se han empleado cultivos convencionales que se basan en el enriquecimiento previo no selectivo, seguido de el cultivo selectivo y diferenciado para la detección de colonias sospechosas que luego sean identificadas por medio de la bioquímica y la serología. La gran desventaja de este tipo de técnicas es que toman entre tres y cuatro días la detección presuntiva de las colonias, y entre cinco y seis días la confirmación con sus respectivos resultados definitivos. Por tal motivo, se ha visto la necesidad de diseñar métodos más rápidos de detección que permitan realizar un sondeo de ADN o ARN, aunque estos no han tenido la suficiente sensibilidad y especificidad.

De allí que cobra mayor importancia la detección por medio de la técnica PCR, pues gracias al gen *invA* se ha podido determinar las secuencias exclusivas del gen de *Salmonella*, algo que ha sido potenciado gracias a la amplificación de este gen y aplicado a al diagnóstico de enfermedades parasitarias mucho más rápido que con los métodos tradicional. El gen *invA* se detectó gracias a que codifica para una proteína en la membrana interna de las bacterias, responsable de la invasión de células epiteliales del huésped (Jamshidi, A. 2009).

Algunos autores afirman que es poco probable que la *Salmonella* esté presente en los cultivos de *Cannabis* modernos y tecnificados, esto debido a que la *Salmonella* es un patógeno intestinal, que en un cultivo, no tendría un ambiente beneficioso para su crecimiento; incluso para que la *Salmonella* pueda sobrevivir a un proceso industrial, debería pasar por procesos de extracción como el calor de la descarboxilación, por lo que si un cultivo cuenta con las pautas

estándar de higiene y bioseguridad es muy posible que la gran mayoría de cultivos puedan evitar la contaminación con *Salmonella* (Holmes, M. 2015).

La gran problemática es que a diferencia de las pruebas en alimentos, las pruebas de cannabis tienen que considerar varias vías de administración más allá de la administración oral, algo que fue demostrado en 2018 (Mckernan, K. 2018), cuando gracias a un estudio se estimó que el 50% del consumo de cannabis es por vías inhalatorias, ya sea fumado con vaporizador, con aceites esenciales o con flores, mientras que la otra mitad es consumido en Productos de Infusiones de Marihuana (MIP), dentro de los cuales encontramos los parches transdérmicos, ungüentos y supositorios.

Otros estudios han encontrado otra gran variedad de microorganismos en flores de cannabis, tales como: *Aspergillus niger*, *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus terreus*, *Penicillium paxilli* y *Penicillium citrinum*, *Clostridium botulinum*, *Eschericia coli*, y *Staphylococcus*, de hecho, se ha documentado muertes por Aspergilosis en pacientes inmunocomprometidos (Mckernan, K. 2018).

## **Justificación**

En Colombia el uso de cannabis tenía una política prohibitiva hasta la llegada del decreto 811 de 2021, que regularizó el uso medicinal de la planta, además de su uso farmacéutico e industrial. A su vez, la Resolución 227 del 2022, plantea los requisitos correspondientes con las licencias, cupos y usos de la planta en productos industriales destinados al consumo humano.

Como parte de la calidad que debe tener los productos derivados del Cannabis, los cuidados en cuanto a las infecciones bacterianas con patógenos son un vértice fundamental para la obtención de las licitaciones a nivel industrial. Por mencionar uno de los muchos ejemplos que existen, podemos traer a colación el caso de Canada (Pusiak, R. 2021), donde se ha llegado a la creación de una cadena distribución, un ambiente minorista, el desarrollo de protocolos de calidad y de elaboración adecuados además de muchas otras tareas auxiliares que ponen el listón alto para que Colombia alcance los estándares requeridos para que el mejor producto llegue a los consumidores.

Varios de los Estados de Estados Unidos, son más ejemplos de que el cannabis se está volviendo cada vez mas legal, luchando con la tecnología para poder garantizar la seguridad de los productos regulados por agencias federales como la FDA, el USDA, entre otras (Holmes, M. 2015).

Por lo anterior, el laboratorio AOXLAB S.A.S., ha puesto su empeño en ofrecer un servicio de calidad para aquellas industrias que deseen adentrarse en este nuevo mundo de la manufactura de productos derivados del Cannabis, ofreciendo dentro de su catálogo de análisis microbiológicos, la detección de aquellos microorganismos que afecten la calidad de los productos en sus diferentes matrices (Cola, Hojas, Tallo), con técnicas que llegan incluso a la detección molecular, como es el caso de RT-PCR.

## **Objetivos**

### **Objetivo general**

Referenciar las características del procedimiento de identificación de *Salmonella spp* por medio de la técnica RT-PCR empleando el equipo RIDA®CYCLER y el kit SureFast® Salmonella One, ambos suministrados por la empresa r-biopharm®.

### **Objetivos específicos**

Realizar una caracterización bibliográfica de procedimientos similares que anteceden el presente trabajo.

Describir el equipo RIDA CYCLER y el kit utilizado para la detección de *Salmonella spp* en Cannabis.

Detallar el procedimiento utilizado para la identificación de *Salmonella* en una matriz vegetal, como el cannabis en el equipo RIDA CYCLER.

### **Problema de investigación**

Para realizar la caracterización de un proceso, es indispensable aplicar la metodología correspondiente al mismo y determinar la validez de este. El presente trabajo investigativo se basa en el estudio experimental del proceso de identificación gracias al equipo RT-PCR, cuya marca comercial es RIDA®CYCLER y al uso del kit de detección del microorganismo específico, administrado por el mismo proveedor del equipo (r-biopharm), de nombre SureFast® Salmonella ONE. Lo anterior estará soportado en la búsqueda bibliográfica de cada etapa del proceso.

### **Marco teórico**

La reacción en cadena de la polimerasa es una técnica que permite la obtención in vitro de millones de copias de un fragmento de ácido desoxirribonucleico a partir de una sola molécula, esto mediante un proceso de replicación celular en el que actúan varias proteínas para poder unir dos nuevas hebras de ADN a partir de otra que sirve de molde. La síntesis de esta nueva cadena se lleva a cabo mezclando el ADN que contiene los fragmentos que se van a amplificar, la polimerasa, los iniciadores, que son fragmento de 15 a 30 nucleótidos de ADN que flanquean la región que se va a amplificar desde el extremo 3' libre para que se inicie la transcripción. También se mezclan en este proceso los desoxinucleótidos, el co-factor necesario para que trabaje la polimerasa y la solución buffer que sirve como amortiguador de pH apropiado para llevar a cabo la síntesis (Díaz, A. 2014).

En el caso de la técnica RT-PCR es necesario emplear un fluoróforo, el cual es necesario para realizar ensayos cuantitativos que permitirán detectar el número de moléculas de ARNm, por lo que es necesario realizar la reacción de transcripción reversa (RT) del ARNm (ácido ribonucleico mensajero) a ADNc (ADN complementario), para esto es necesario contar con un equipo termociclador que debe ser capaz de mantener una temperatura uniforme para todas las muestras y ser lo suficientemente rápido en la transición de temperaturas de una etapa a otra.

El termociclador utilizado en este caso para realizar el método es RIDA®CYCLER, el cual es un ciclador de PCR en tiempo real basado en inducción magnética con cuatro canales. El software es fácil de usar, preinstalado con todos los perfiles térmicos SureFast® y SureFood®, permite un inicio rápido del análisis de una o más pruebas simultáneamente. Dentro de sus características y beneficios podemos encontrar:

**Compacto:** Es un instrumento qPCR portátil y compacto.

**Modular:** sus múltiples instrumentos se conectan de forma inalámbrica a una PC.

**Rápido:** resultados rápidos de qPCR a través de un calentamiento y enfriamiento rápidos, utilizando una tecnología de inducción magnética patentada y aire forzado por ventilador.



Fácil: la centrifugación de alta velocidad garantiza que las muestras se centrifugan al comienzo de una ejecución, sin necesidad de una centrífuga adicional. El software es fácil de usar configurado con termoperfiles precargados.

Confiable: Validado para todos los kits de PCR en tiempo real: SureFast® y SureFood®.  
Accesorios productos:

Otras características relacionadas con el equipo se detallan en la Tabla 1.

OTRAS CARACTERISTICAS	
Nombre del equipo	ZRCYCLER
Peso	2,1 kg
Dimensiones	15x15x13 cm
Nº de canales	4
Volumen de reacción	De 5 a 20 uL
Cantidad de muestras por dispositivo.	48

**Tabla 1.** Características del equipo RIDA CYCLER de la empresa r-biopharm. Recuperado del sitio web: <https://food.r-biopharm.com/>.

Los fluoruros utilizados para este tipo de PCR suelen ser de dos tipos. La primera clase, son los que tienen afinidad con el ADN, pues al entrar en contacto con este, la intensidad de la fluorescencia se incrementa proporcionalmente a la concentración del ADN de doble cadena. El segundo de los sistemas fluoruros utilizados es el de sondas específicas, y tal como lo indica su nombre, suele ser para secuencias de interés, las cuales se pueden dividir en tres tipos: sondas de hidrólisis, sondas de hibridación y sondas de horquilla, cuyo principio básico consiste en utilizar el sistema FRET (Fluorescence Resonance Energy Transfer), el cual se encarga de la transferencia de energía entre dos fluoruros, el reportero y el apagador, emitiendo fluorescencia a diferente longitud de onda (Aguilera, P. 2014).

El kit utilizado por el equipo RIDA®CYCLER es SureFast® Salmonella ONE, el cual puede aplicarse para el aislamiento y la detección rápida y sencilla de *Salmonella spp.* en diferentes tipos de alimentos y está destinado a ser utilizado por todo tipo de laboratorios de análisis de alimentos.

El método consta de los siguientes pasos:

Enriquecimiento del cultivo,

Extracción del ADN,

Detección específica por PCR en tiempo real y

Análisis e interpretación de datos.

Por otra parte, el kit SureFast® Salmonella ONE ha sido validado y certificado por MicroVal (número de licencia 2014LR43) y AOAC (Association of Analytical Communities) número de licencia 081803.

Además, cada reacción contiene un control interno de amplificación para que los ensayos de PCR en tiempo real puedan utilizarse con instrumentos de PCR ya establecidos y equipados para la detección de dos emisiones de fluorescencia en el canal FAM y VIC/HEX al mismo tiempo.

El límite de detección del kit Salmonella ONE es de cinco copias de ADN. Sin embargo, el límite de detección del ensayo depende de la matriz de la muestra, el grado de procesamiento, la preparación del ADN y el contenido de ADN.

Los componentes del kit pueden ser consultados directamente desde el sitio web del proveedor r-biopharm y en el presente informe se presentan en la Tabla 2.

Código del Kit	Reactivo	Cantidad	Color de la tapa.
1	Reaction Mix	2x1100 uL	Amarilla
2	Taq polimerasa	1x 80 uL	Rojo oscuro
3	Control positivo	1x 200 uL	Azul claro
L	Buffer de Lisis	2 x 25 mL	Transparente

**Tabla 2.** Componentes del Kit SureFast® Salmonella ONE. Información encontrada en el sitio web: <https://food.r-biopharm.com/>

La empresa r-biopharm establece unos parámetros de almacenamiento específicos para el kit, cuyos reactivos deben estar a -20 °C y protegidos de la luz. La Taq Polimerasa puede almacenarse entre +2 y +8 °C para su uso múltiple en el mismo día. El tampón de lisis debe almacenarse entre -20 y +8 °C. Los reactivos deben utilizarse hasta la fecha de caducidad indicada en la etiqueta.

El proveedor establece que para la utilización del kit, es necesario un instrumento de PCR en tiempo real, equipado con dos canales de detección (canal FAM y VIC/HEX), además de los siguientes consumibles:

- Pipetas con puntas de filtro
- Tubos de 2 mL
- Guantes desechables
- Mezclador vortex
- Centrífuga con rotor para los tubos de reacción
- Termomezclador/bloque de calentamiento (hasta 95 °C)
- Caldo de enriquecimiento no selectivo (por ejemplo, agua de peptona tamponada)

Por otra parte, la empresa que suministra el kit también establece unas condiciones mínimas de uso, detalladas a continuación:

- La extracción, la preparación de la PCR y la ejecución de la PCR deben estar separadas en salas diferentes para evitar contaminaciones cruzadas.
- Esta prueba sólo debe ser realizada por personal de laboratorio formado en métodos de biología molecular.
- Seguir estrictamente las instrucciones de trabajo.
- Al manipular las muestras, utilice guantes desechables. Tras finalizar la prueba, lávese las manos.
- No fume, ni coma, ni beba en las zonas donde se utilicen las muestras o los reactivos de la prueba.
- Las muestras de alimentos y los cultivos de enriquecimiento deben tratarse como potencialmente infecciosos, así como todos los reactivos y materiales que se exponen a las muestras, y deben manipularse de acuerdo con las normas nacionales de seguridad.
- No utilice el kit después de la fecha de caducidad.

Estas condiciones mínimas de uso garantizarán el uso adecuado del equipo para la detección de *Salmonella spp* en Cannabis. La alta demanda de productos derivados de Cannabis en el país ha abierto la posibilidad de que el laboratorio realice análisis para detectar diferentes contaminantes, entre estos la *Salmonella*, el cual es una bacteria de interés para la salud pública. Generalmente, la *Salmonella* es un microorganismo que se asocia principalmente a alimentos, de allí es donde se pueden encontrar la mayoría de los estudios donde se usa la técnica de RT-PCR o PCR convencional. Es importante considerar que la *Salmonella* es una bacteria gram negativa, anaerobia facultativa que no forma spora y que su género estos compuestos por dos grandes especies, como lo son la *S. bongori* y la *S. entérica* (Lee, JI. 2022); Sin embargo, otros estudios determinan la presencia de *Salmonella spp*, a través de una sonda específica Taqman® como es el caso de Bundidamorn, D. (2022); cuyas pruebas dieron positivas para el inv A, el cual es el gen diana para este tipo de bacteria, al igual que a Hernandez, O. (2022), quienes utilizaron este gen para detectar la *Salmonella spp* en alimentos frescos como mora, cilantro, lechuga y fresa.

---

## Metodología

### Preparación de las muestras:

La preparación de las muestras de matrices de alimentos y piensos debe aplicarse a las normas ISO 6887 e ISO 6579. Para el enriquecimiento, se homogeneiza un volumen de 25 g o 25 ml de material de muestra con 225 ml de un caldo de enriquecimiento no selectivo (por ejemplo, agua de peptona tamponada). Si las porciones de la prueba se desvían de los 25 g, el volumen del caldo de enriquecimiento debe elegirse en una proporción de 1:10. El enriquecimiento se realiza durante  $18 \text{ h} \pm 2 \text{ h}$  a  $37 \text{ °C} \pm 1 \text{ °C}$ .

Como alternativa, pueden utilizarse otros procedimientos de enriquecimiento adecuados y validados.

Para evaluar el proceso de crecimiento bacteriano, se recomienda comparar las muestras al principio y al final del cultivo (crecimiento bacteriano con una diferencia de  $C_p > 3$ ).

Si el cultivo de enriquecimiento ha sido agitado o revuelto, se debe dejar que los sólidos se asienten durante 5 a 10 minutos. Luego se debe transferir 500  $\mu\text{l}$  del tercio superior del cultivo de enriquecimiento a un tubo de 2,0 mL (no suministrado con el kit). Luego, añadir 500  $\mu\text{l}$  de tampón de lisis (código L) a los 500  $\mu\text{l}$  del cultivo de enriquecimiento. Agitar brevemente el tubo y colocar el tubo en el bloque de calentamiento. Incubar durante 10 minutos a  $95 \text{ °C}$  sin agitar. Retirar el tubo del bloque de calentamiento y dejar el tubo a temperatura ambiente durante 1 minuto.

El pre-enriquecimiento de las muestras se realizó pesando 5 g aproximadamente de material vegetal de cannabis en una dilución 1:10, usando caldo caso como diluyente.

El control de extracción se realizó incubando el caldo caso utilizado en el pre-enriquecimiento a  $37 \text{ °C}$  durante 20 horas aproximadamente, posterior a esto se tomaron 5uL y se llevaron a 20uL del master mix.

Antes de llevar a cabo la contaminación de las muestras, se sembraron por duplicado varias diluciones seriadas de la suspensión de *Salmonella thypimurium*. Con base en los recuentos obtenidos se calculó el volumen necesario para trabajar con nivel intermedio de contaminación. Ahora bien, la contaminación de las muestras se llevó a cabo a un nivel intermedio, con una concentración estimada de 10 a 15 UFC; para esto, se tuvieron cuatro tratamientos, en los cuales, uno correspondía a seis muestras de material vegetal de cannabis contaminadas con la suspensión de *Salmonella thypimurium*, otras seis muestras se contaminaron con *Klebsiella aerogenes* como microorganismo interferente, otras seis muestras se contaminaron con el pool de microorganismos (*Salmonella thypimurium*, *Klebsiella aerogenes*, *Escherichia coli*) y por último se dejaron 6 muestras sin contaminar.

**Nota:** Es necesario asegurarse de que el sedimento no se agita y de que no se pipeteen partículas en la reacción de PCR.

### **Preparación de las muestras y del Master mix.**

El lisado debe estar listo para ser utilizado para la PCR. Si el lisado no se utiliza inmediatamente en la PCR o está destinado a un almacenamiento más prolongado, transfiera 100 µl del lisado en un nuevo tubo (no suministrado con el kit) y consérvelo a -20 °C.

Para preparar el Master Mix, se debe calcular el número total de reacciones necesarias (muestras y reacciones de control). Las reacciones de control recomendadas son: control negativo, control positivo y control de extracción. La mezcla maestra incluye un control interno de amplificación (control de inhibición). control de amplificación interno (control de inhibición) para cada reacción. También se recomienda preparar la master-mix con un 10 % de volumen adicional para compensar la pérdida de reactivos (ver ejemplo de la Tabla 3 para la preparación de 15 reacciones). Dejar descongelar, mezclar y centrifugar los reactivos antes de abrirlos y utilizarlos. Mezclar bien cada master-mix y centrifugar poco antes de su uso.

Componentes del master-mix	Cantidad por reacción	15 reacciones (con 10% de exceso=
Reaction Mix	19,3 uL	318,5 uL
Taq Polimerasa	0,7 uL	11,55 uL
Volumen total	20 uL	330,05 uL

**Tabla 3.** Ejemplo de preparación del master-mix para la preparación de 15 muestras.

Nota: La Taq Polimerasa puede estar en estado congelado o descongelado. Esto no afecta a la calidad de la Taq Polimerasa o el rendimiento de la PCR en tiempo real.

**Interpretación de resultados.**

Durante el proceso de ampliación, la sonda genera una fluorescencia que refleja la cantidad de producto amplificado. Para entender la cinética de amplificación por medio de la presente técnica podemos hablar de 4 momentos fundamentales en para la obtención de la gráfica (ver Gráfica 1). El primero de ellos es el estado basar o estado inicial, la cual, se da en los primero 10 a 15 ciclos, estado en el cual la fluorescencia es insuficiente para lograr discriminar el ruido generado por la ampliación del ADN, el segundo es la amplificación geométrica, fase en la que los reactivos se encuentran de forma abundante por lo que la amplificación tiene una eficiencia cercana al 100%, y debido a que es una fase exponencial, el comportamiento del ADN es de  $2^n$ , a partir de allí comienza la fase lineal, donde los reactivos empiezan a escasear, por lo tanto la actividad enzimática también decrece. Al final nos encontramos la fase estacionaria que muestra una señal saturada, donde la amplificación se detiene, gracias a que los reactivos se agotaron

**Valor Cp**

Para el Valor Cp, también llamado valor Ct (cycle threshold), equivale al número de ciclos que se necesitan para que cada curva alcance la señal de la fluorescencia. Este valor es comparado entre las muestras del análisis y los distintos controles, y permite determinar la diferencia entre la cantidad de moléculas del ADN o ADNc específico que se desea evaluar. Para determinar esta cantidad de ADN, partiremos del ejemplo más sencillo donde se asume una eficiencia del 100%, ya que este se da durante la fase exponencial, con lo cual la representación matemática para este caso es:

$$(N_0)_A / (N_0)_B = 2^{\Delta Ct}$$

Ecuación 1

Dónde:

(No)A: Número inicial de moléculas del ADN en la muestra A

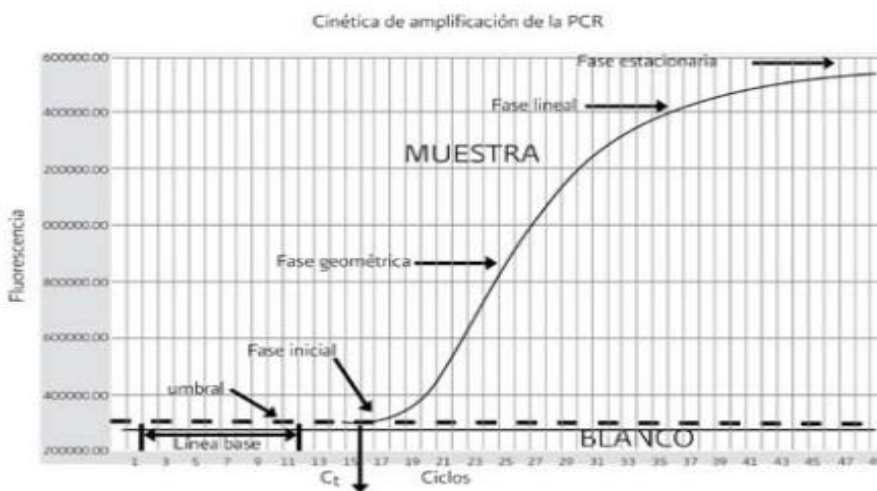
(No)B: Número inicial de moléculas de ADN en la muestra B

 $\Delta Ct$ : Diferencia entre CtB - CtA

Ahora para un caso real, donde la eficiencia no es del 100%, la eficiencia de la reacción se determina con la siguiente fórmula:

$$(N_o)A/(N_o)B=(1+E)(\Delta Ct) \quad \text{Ecuación 2}$$

Donde E es la eficiencia de la reacción.



**Gráfico 1.** Interpretación del resultado obtenido en la RT-PCR (Aguilera, P. 2014).

La evaluación de los resultados debe realizarse según el programa de análisis habitual recomendado por el fabricante del instrumento de PCR en tiempo real. Las reacciones de control deben dar resultados correctos. Una muestra se considera positiva si en el ADN de la muestra, se nota una amplificación en el sistema de detección (FAM). Una muestra se declara negativa, si el ADN de la muestra no muestra amplificación en el sistema de detección y el control de amplificación interno (control de inhibición) de la muestra es positivo (VIC/HEX) con un desplazamiento del Cp Value  $\leq 2$  en comparación con el control negativo.

Si el ADN de la muestra en el canal VIC/HEX no muestra amplificación o un desplazamiento del valor Cp  $> 2$  en comparación con el control negativo, contiene sustancias inhibitoras de la PCR. Una disminución significativa de la señal de fluorescencia también puede mostrar la presencia de sustancias inhibitoras de la PCR. En estas circunstancias es necesario



mejorar el aislamiento del ADN y la purificación de la muestra. Como alternativa, el ADN puede diluirse (recomendación 1:2 en agua PCR) y analizarse de nuevo para detectar la inhibición. Tenga en cuenta que el factor de dilución también afecta al límite de detección del ensayo PCR específico de Salmonella.

Nota: Durante el estudio de MicroVal se observaron mayores niveles de inhibición en el caso de las hierbas frescas, el cacao, las especias y las sustancias aromáticas y los productos de huevo. En estos casos, por favor, proceda como se recomienda más arriba.

## Resultados

El montaje se realizó calculando el valor necesario de la polimerasa y el reaction mix para poder realizar el master mix (Incluyendo el 10% de Volumen de pérdida por pipeteo). Previamente se lisaron las muestras a analizar, tomando un volumen de 500 uL para cada una de las muestras y 500 uL del buffer de lisis, se llevó a 95°C por 10 minutos, después se dejó por un minuto a temperatura ambiente (Aproximadamente 25°C). A partir de la muestra lisada, se tomó 5uL y se añadieron a los microtubos que contenían 20 uL del master mix , se taparon todas las muestras de cada tratamiento y se organizaron en orden ascendente en el equipo antes de la corrida. En el software, se procedió a configurar tal como se dan las instrucciones en el manual con el comando “Run for template”, luego se escogen las opciones: “Porfile-SureFast” – “MICROBIOLOGY\_V1.0”, después se seleccionó el método de “F5211 SureFast Salmonella ONE”, por último, se nombraron y organizaron las muestras en la opción “Sample-Name” (ver Tabla 4).












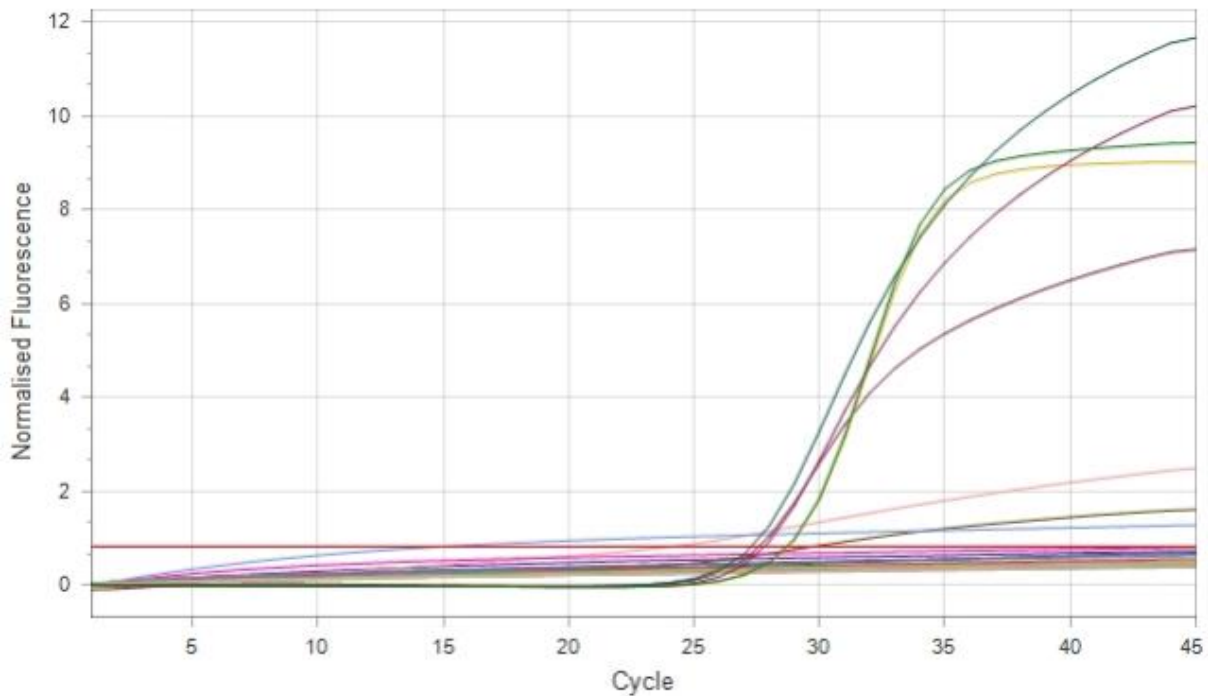
Well	Colour	Sample Name	Cq	Efficiency	Efficiency R <sup>2</sup>	Result
1		Material vegetal contaminado con Salmonella 15 UFC	-	-	-	Excluded
2		Material vegetal contaminado con Salmonella	-	-	-	Excluded
3		Material vegetal contaminado con Salmonella	-	-	-	Excluded
4		Material vegetal contaminado con Salmonella	-	-	-	Excluded
5		Material vegetal contaminado con Salmonella	-	-	-	Excluded
6		Material vegetal contaminado con Salmonella	23,80	-	-	Excluded from WOL
7		Material vegetal contaminado con Klebsiella	-	-	-	Excluded
8		Material vegetal contaminado con Klebsiella	-	-	-	Excluded
9		Material vegetal contaminado con Klebsiella	27,52	0,96	0,99785	
10		Material vegetal contaminado con Klebsiella	28,68	1,09	0,99870	
11		Material vegetal contaminado con Klebsiella	-	-	-	Excluded
12		Material vegetal contaminado con Klebsiella	-	-	-	Excluded
13		Material vegetal contaminado con el pool	-	-	-	Excluded
14		Material vegetal contaminado con el pool	-	-	-	Excluded
15		Material vegetal contaminado con el pool	-	-	-	Excluded
16		Material vegetal contaminado con el pool	-	-	-	Excluded
17		Material vegetal contaminado con el pool	-	-	-	Excluded
18		Material vegetal contaminado con el pool	-	-	-	Excluded
19		Material vegetal sin contaminar	-	-	-	Excluded
20		Material vegetal sin contaminar	-	-	-	Excluded
21		Material vegetal sin contaminar	-	-	-	Excluded
22		Material vegetal sin contaminar	-	-	-	Excluded
23		Material vegetal sin contaminar	-	-	-	Excluded
24		Material vegetal sin contaminar	-	-	-	Excluded
25		Control Negativo	27,23	1,00	0,99872	
26		Control positivo	27,74	1,14	0,99520	
27		Control de extracción	28,63	1,04	0,99911	

Tabla 4. Resultados obtenidos del Software del equipo RIDA CYCLER.

El té verde también se incluyó en el montaje debido a que se ha estudiado que es una matriz de hierbas y especias que tiene resultados similares a los obtenidos con el cannabis, debido a que el fin es verificar la reproducibilidad del ensayo para luego evaluar el efecto que pueda tener la matriz sobre el microorganismo, así como también por disponibilidad de esta muestra. Se contaminó con *Salmonella thypimurium* y con los demás microorganismos, tal y como se explicó anterior mente.

**NOTA:** Los ensayos se realizaron a la par por metodología tradicional y se lograron recuperar colonias típicas de Salmonella en cada una de las muestras analizadas que se había contaminado.



**Gráfico 2.** Normalización de la fluorescencia vs la cantidad de ciclos. Obtenido del Software del equipo RIDA CYCLER.

La curva de la Gráfica 2 se observa la amplificación que muestra el equipo en los diferentes ciclos que dura el ensayo, donde se detecta amplificación en seis de los 27 ensayos realizados, tal como se ve en la Tabla 4 de los tratamientos que no quedaron excluidos. Dentro de las muestras que tuvieron amplificación del ADN, podemos encontrar cuatro muestras que fueron utilizadas como ruido estadístico para comprobar la especificidad del ensayo, dos de estas muestras fueron el material contaminado con *Klebsiella aerogenes*, las otras dos son el control negativo y el control de extracción. De los resultados positivos, que dieron según lo que se esperaba del ensayo, podemos encontrar el control positivo que aparte de amplificar tuvo una eficiencia superior a 1,14, mientras que una de las muestras contaminadas con *Salmonella thypimurium* tuvo una amplificación corta, pues el equipo no alcanzó a identificar la eficiencia de la amplificación, necesaria para determinar la presencia del ADN de Salmonella.

Los ensayos de PCR en general requieren de estrategias de planeación y múltiples intentos con el fin de desarrollar la técnica adecuada para cada caso en particular. Por tal motivo, es necesario identificar los diferentes fallos que puede llegar a tener esta técnica, principalmente si es basada en la detección por medio de multicanales para amplificar distintos ADN diana.

Una de estas dificultades es que la técnica suele ser su alta sensibilidad a las contaminaciones del producto, pues se pueden dar amplificaciones inespecíficas, lo que a su vez genera reacciones de falsos positivos, para lo cual es necesario tomar medidas de control que garanticen una correcta utilización de los reactivos necesarios para la implementación de la técnica, incluyendo la inocuidad con la aplicación de la reacción en ambientes aislados, con tubos, guantes y pipetas esterilizados, en áreas apropiadas que no estén expuestas a algunos agentes que puedan reaccionar como los químicos de limpieza o material que pueda contener ARNasa, además, que esté libre de radiaciones ultravioleta que generen alteraciones a las moléculas que son objeto de estudio.

La amplificación del ADN específico es una de las grandes cualidades de la implementación de la PCR, sin embargo, es probable que se de la amplificación de ADN inespecífico, esto debido a el aumento del número de pares de Primers o cebadores que pudieran llegar a atrapar ADN que no hace parte del objeto de estudio, por lo cual generaría ineficiencia a la hora de la lectura del multicanal.

Otros tipos de alteraciones en las amplificaciones pueden ser dadas por otros dos procesos; el primero de ellos es el proceso de deriva, el cual hace referencia a las fluctuaciones durante los ciclos iniciales, donde existen bajas concentraciones del ADN molde y donde las rampas térmicas suelen ser muy desiguales. Por otra parte, tenemos el proceso de selección de blancos, que deben de ser muy específicos para producir las amplificaciones adecuadas, para lo cual los Primers son fundamentales, ya sea por aumento en el numero de pares como se mencionó anteriormente o por el alto contenido de guanina-citocina que también puede afectar la eficiencia del diseño (Bolívar, A.M. 2014).

---

## Discusión

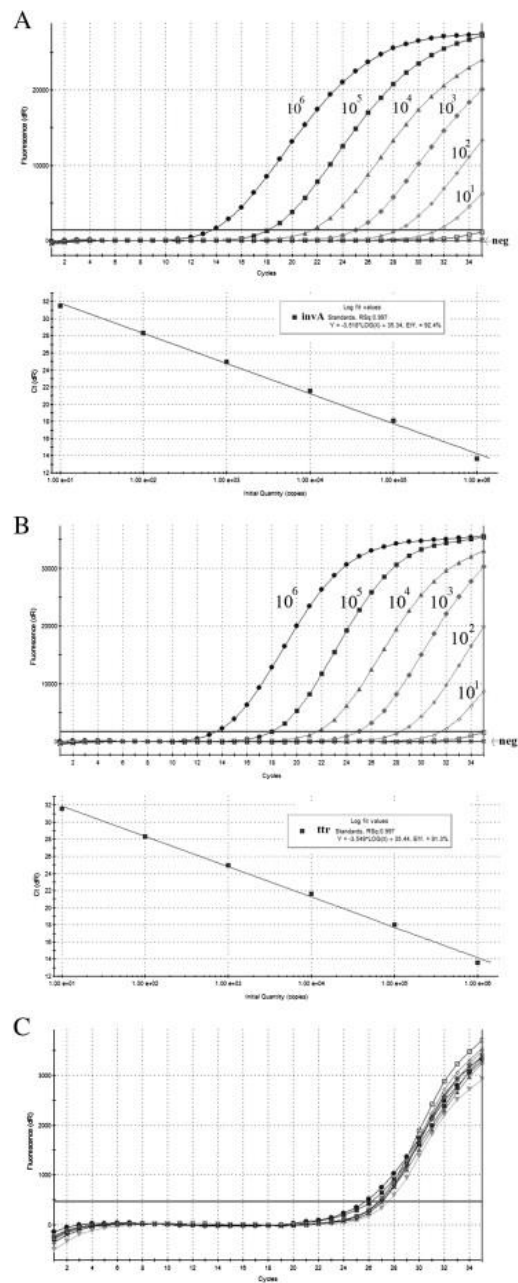
Como se pudo evidenciar en los resultados, es posible que se hallan dado casos de falsos positivos o de falsos negativos en los resultados obtenidos, ya que la amplificación de ADN se dio en canales inespecíficos y diferentes al ADN diana, que se pretendía amplificar, además de amplificación de ADN en aquellos canales donde no se pretendía que hubiera esta amplificación, por lo cual es necesario realizar validaciones que establezcan la idoneidad del proceso al corregir los inconvenientes presentados actualmente.

De tal manera, como se menciona dentro del marco teórico, el kit SureFast® Salmonella ONE ha sido validado y certificado por MicroVal (número de licencia 2014LR43) y AOAC (Association of Analytical Communities) número de licencia 081803, por lo que es contradictorio el resultado obtenido dentro del ensayo experimental realizado por personal de la empresa AOXLAB S.A.S. En contraste, se realizó una búsqueda de estudios similares y así comprender los resultados presentados. El primero que guarda una correlación con el ensayo realizado, es el estudio citado por Delbeke, S. (2015), en el que se estudió la presencia de distintas sepas de Salmonella en las hojas de albahaca y de cilantro. Este estudio analizó alrededor 100 muestras de 25 g cada una para cada tipo de hierba (albahaca y cilantro), en tres países distintos (Bélgica, Israel y Chipre). El estudio realizado en 51 semanas y 592 muestras, encontró Salmonella en 10 casos aislados por medio de cultivo y 11 casos analizados gracias a la técnica PCR.

Caso similar al anterior, es el estudio de asd, que analizó la infección por *Escherichia coli* productora de toxina Shiga (STEC) y *Salmonella spp* en fresas, lechuga y albahaca. Esta vez el estudio se reprodujo en PCR múltiplex GeneDisc y con cepas aisladas en perlas de vidrio y cultivada en 10 mL de caldo de soja tríptico (TSB), para luego ser pasado a un subcultivo de agar triptón soja (TSA). Para este estudio hubo una recuperación total de *Salmonella thomson* del primer día, sin embargo, al pasar los días, la recuperación va disminuyendo. Lo anterior se debe a que la cantidad de ADN a amplificar del patógeno va siendo menor cada día. El estudio realizó pruebas con el kit de detección Taqman *S. entérica* de Life Technologies, Carlsblad, EE.UU.

El último de los casos que aporta datos relevantes para el análisis de los resultados obtenidos, es el estudio de González-Escalona, N. (2012), que tenía como objetivo el desarrollo de un método rápido para la detección de *Salmonella spp* con un ensayo de PCR en tiempo real

utilizando el kit TaqMan multiplex dirigido al gen *invA* y al locus *ttrRSBCA*, estos genes están contenidos en 101 cepas de *Salmonella*, por lo cual el resultado indicó que hubo amplificación para todas las señales que arrojó el equipo. Estos resultados los podemos observar en la Gráfica 3, cuyas gráficas muestran la amplificación de los genes. En este caso la parte A de la gráfica se puede observar la amplificación del gen *invA*, con 13 copias del ADN diluido a una concentración de  $1,3 \cdot 10^6$  copias de genoma sobre la disolución. En la parte B encontramos las mismas disoluciones, pero esta vez para el gen *ttrRSBCA*. Por último, encontramos la amplificación para los controles internos en cada disolución. La gráfica de la recta que acompaña a cada gráfica de amplificación hace referencia a la eficiencia, cuya pendiente negativa para todos los casos es de -1.



**Gráfico 3.** Resultados obtenidos por González-Escalona, N. (2012), en el estudio de dos genes distintos y el control interno del kit. Recuperado de: <https://acortar.link/HGxB0d>



## Conclusiones

La biotecnología desarrolla técnicas que permiten la identificación de microorganismos cada vez con mayor eficiencia, pero eso sí, con toda la confiabilidad que podemos tener en términos científicos. De eso se ha ampliado en el presente proyecto, presentando una técnica que permite la identificación de un microorganismo específicos como es la *Salmonella spp* utilizando la técnica de RT-PCR.

Se definió gracias a diversas fuentes bibliográficas, las características propias de la técnica que pretende utilizar el laboratorio AOXLAB S.A.S. mostrando sus ventajas, ya que, en el mercado actual, es necesario contar con herramientas más eficientes para el creciente volumen de análisis a realizar por la industria, esto con el fin de garantizarle a los seres humanos una mejor calidad de vida.

Se mostró los resultados de uno de los ensayos realizados por el laboratorio, utilizando esta técnica, con el equipo RIDA CYCLER, de la empresa “r-biopharm”, del cual se desglosó sus especificaciones y las ventajas que tiene un equipo que permite determinar la amplificación de ADN, gracias a la capacidad de detectar fluorescencia por diversos canales de detección. También se incluyó en el presente informe los atributos del kit SureFast® Salmonella ONE, del mismo proveedor, con el fin de dejar en claro la metodología de uso y capacidad de amplificación de genes propios de *Salmonella spp*.

En cuanto a los resultados esperados, no se obtuvo características claras de la presencia de *Salmonella* en las muestras analizadas, a pesar de que el equipo humano de laboratorio siguiera la metodología, tal y como se sugería en los procedimientos descritos por la empresa y el proveedor.

Por lo anterior, se realizó una comparación con diferentes estudios, en los cuales hubo resultados satisfactorios, con el fin de comparar los métodos y se evidenció que son muy similares a los realizados por el personal de la empresa.

Finalmente, se llega a la conclusión de que se debe validar la metodología ampliando el rango de ensayos que permitan tener una prueba estadística contundente para la detección del microorganismo en Cannabis, llevando estricto control del procedimiento para esclarecer la causa de que los resultados esperados no se den tal como se esperan.

### **Recomendaciones**

Se insta al laboratorio a continuar con la búsqueda de las causas que no permitieron tener los resultados esperados por el equipo RIDA CYCLER, basándose en la importancia del uso de técnicas biotecnológicas, para mejorar en la eficiencia de los procesos de análisis microbiológicos.

---

## Referencias

Aguilera, P., Tachiquín, M. R., Graciela, M., Munive, R., & Olvera, B. P. (2014). PCR en tiempo real. Herramientas moleculares aplicadas en ecología: aspectos teóricos y prácticos. México DF: SEMARNAT, INECC, UAM-I, 175-201. Recuperado: <http://www2.inecc.gob.mx/publicaciones2/libros/710/pcrtiempo.pdf>

Bolivar, A. M., Rojas, A., & Lugo, P. G. (2014). PCR y PCR-Múltiple: parámetros críticos y protocolo de estandarización. Avances en biomedicina, 3(1), 25-33. Recuperado: <https://dialnet.unirioja.es/descarga/articulo/4796903.pdf>

Bundidamorn, D., Supawasit, W., & Trevanich, S. (2021). Taqman® probe based multiplex RT-PCR for simultaneous detection of *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* spp. and Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in foods. LWT, 147, 111696. Recuperado de: <https://acortar.link/Ti90pb>

Delbeke, S., Ceuppens, S., Jacxsens, L., & Uyttendaele, M. (2015). Microbiological analysis of pre-packed sweet basil (*Ocimum basilicum*) and coriander (*Coriandrum sativum*) leaves for the presence of *Salmonella* spp. and Shiga toxin-producing *E. coli*. International journal of food microbiology, 208, 11-18. Recuperado de: <https://acortar.link/tN7eXt>

Delbeke, S., Ceuppens, S., Holvoet, K., Samuels, E., Sampers, I., & Uyttendaele, M. (2015). Multiplex real-time PCR and culture methods for detection of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* and *Salmonella* Thompson in strawberries, a lettuce mix and basil. International journal of food microbiology, 193, 1-7. Recuperado de: <https://acortar.link/PiGnXh>

Díaz, A. S., Rentería, L. F., Cortez, J. A., & Palacios, E. S. (2014). PCR: reacción en cadena de la polimerasa. Herramientas moleculares aplicadas en ecología: aspectos teóricos y prácticos, 53. Recuperado de: <https://acortar.link/xx7qnX>

González-Escalona, N., Brown, E. W., & Zhang, G. (2012). Development and evaluation of a multiplex real-time PCR (qPCR) assay targeting *ttrRSBCA* locus and *invA* gene for accurate detection of *Salmonella* spp. in fresh produce and eggs. Food Research International, 48(1), 202-208. Recuperado de: <https://acortar.link/HGxBOD>

Hernández, O. H., Gutiérrez-Escolano, A. L., Cancio-Lonches, C., Iturriaga, M. H., Pacheco-Aguilar, J. R., Morales-Rayas, R., & Arvizu-Medrano, S. M. (2022). Multiplex PCR method for the detection of human norovirus, *Salmonella* spp., *Shigella* spp., and shiga toxin

producing *Escherichia coli* in blackberry, coriander, lettuce and strawberry. *Food Microbiology*, 102, 103926. Recuperado de: <https://acortar.link/IeixJH>

Holmes, M., Vyas, J. M., Steinbach, W., & McPartland, J. (2015). Microbiological safety testing of cannabis. Cannabis Safety Institute. <http://cannabissafetyinstitute.org/wp-content/uploads/2015/06/Microbiological-Safety-Testing-of-Cannabis.pdf> [accessed 29 July 2019]. Recuperado de: <https://cdn.technologynetworks.com/tn/Resources/pdf/microbiological-safety-testing-of-cannabis.pdf>

Jamshidi, A. E., Basami, M., & Afshari, N. S. (2009). Identification of *Salmonella* spp. and *Salmonella typhimurium* by a multiplex PCR-based assay from poultry carcasses in Mashhad-Iran. Recuperado de: <https://acortar.link/Pipn0b>

Lee, JI, Kim, SS, Park, JW y Kang, DH (2022). Detección de *Salmonella enterica* serovar Montevideo en productos alimenticios utilizando cebadores específicos de PCR desarrollados por genómica comparativa. *LWT*, 165, 113677. Recuperado de: <https://acortar.link/LUi8JL>

McKernan, K., Helbert, Y., Ebling, H., Cox, A., Kane, L., & Zhang, L. (2018). Microbiological examination of nonsterile cannabis products: molecular microbial enumeration tests and the limitation of colony forming units. Charlottesville, VA: OSF. Recuperado de: <https://osf.io/vpxe5>

Pusiak, R. J., Cox, C., & Harris, C. S. (2021). Growing pains: An overview of cannabis quality control and quality assurance in Canada. *International Journal of Drug Policy*, 93, 103111. Recuperado de: <https://acortar.link/WKm7RI>

Wong, M. L., & Medrano, J. F. (2005). Real-time PCR for mRNA quantitation. *Biotechniques*, 39(1), 75-85. Recuperado de: <https://acortar.link/Zy1Tjz>

### **Anexos**

El presente informe tuvo con fin, la caracterización de un proceso para el cual sólo se tuvo un ensayo realizado por la empresa AOXLAB S.A.S., por lo cual, el presente informe no presenta más adicionales a la presentación de los costos y de el cronograma de trabajo que podrá encontrar a través de siguiente link:

Anexo A: <https://acortar.link/AS9sNQ>