



**FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES Y MATEMÁTICA**

**VERIFICACIÓN DEL MÉTODO AOAC 2016.08. DETECCIÓN MOLECULAR DE  
LISTERIA MONOCYTOGENES EN EMBUTIDOS CON TRATAMIENTO TÉRMICO**

**Línea de investigación:**

**Microbiología, parasitología e inmunología**

Trabajo de Suficiencia Profesional para optar el título profesional de Licenciado en

Biología

**Autor:**

Gonzales Cometivos, Marcos

**Asesor:**

Salas Asencios, Ramsés

ORCID: 0000-0002-4075-1736

**Jurado:**

Saez Flores, Gloria María

Murrugarra Bringas, Victoria Ysabel

Riveros Ramírez, Maribel Denisse

**Lima - Perú**

**2023**





## Reporte de Análisis de Similitud

Archivo: 1A\_Gonzales\_Cometivos\_Marcos\_Título\_Profesional\_2023

Fecha del Análisis: 18.03.2023

Operador del Programa Informático: ALAVI MAMANI BONIFACIO

Correo del Operador del Programa Informático: balavi@unfv.edu.pe

Porcentaje: 1 %

Asesor: Mg. Salas Asencios, Ramsés

Título: Trabajo académico para optar el Título Profesional de Licenciado en Biología

Enlace: <https://secure.urkund.com/old/view/154093250-807975-781727#q1bKLVayijbQMdQx0jHWMYvVUSrOTM/LTMtMTsxLTIWyMtAzMLA0MrawMDQxMzEyM7E0MzKqBQA=>

Jefe de la Oficina de Grados y Gestión del Egresado:

Sello

Firma

Mg. RODOLFO PUMACHAGUA HUERTAS



Universidad Nacional  
**Federico Villarreal**

**VRIN** | VICERRECTORADO  
DE INVESTIGACIÓN

**FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES Y MATEMÁTICA**

**VERIFICACIÓN DEL MÉTODO AOAC 2016.08. DETECCIÓN MOLECULAR DE  
LISTERIA MONOCYTOGENES EN EMBUTIDOS CON TRATAMIENTO  
TÉRMICO**

**Línea de investigación:**

Microbiología, parasitología e inmunología

Trabajo de suficiencia profesional para optar el Título Profesional de Licenciado en Biología

**Autor:**

Gonzales Cometivos, Marcos

**Asesor:**

Salas Asencios, Ramsés

ORCID: 0000-0002-4075-1736

**Jurado:**

Saez Flores, Gloria María

Murrugarra Bringas, Victoria Ysabel

Riveros Ramírez, Maribel Denisse

**Lima – Perú**

**2023**

## ÍNDICE

<b>Resumen.....</b>	<b>vi</b>
<b>Abstract.....</b>	<b>vii</b>
<b>I. INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>1</b>
1.1. Trayectoria del autor.....	3
1.2. Descripción de la empresa.....	4
1.3. Organigrama de la empresa.....	5
1.4. Áreas y funciones desempeñadas.....	5
<b>II. DESCRIPCIÓN DE UNA ACTIVIDAD ESPECÍFICA.....</b>	<b>7</b>
2.1. Verificación o validación secundaria de métodos de ensayo.....	7
2.1.1. <i>Verificación de la implementación</i> .....	8
2.1.2. <i>Verificación de las matrices</i> .....	8
2.2. La bacteria <i>Listeria monocytogenes</i> .....	9
2.3. Métodos clásicos de detección versus métodos rápidos.....	9
2.4. La técnica de amplificación isotérmica mediada por lazo (LAMP).....	10
2.5. El método AOAC 2016.08 - Detección molecular de <i>Listeria monocytogenes</i> .....	11
2.6. Materiales y métodos.....	13
2.6.1. <i>Localización del estudio</i> .....	13
2.6.2. <i>Preparación de la muestra</i> .....	13
2.6.3. <i>Ensayo de inhibición en matriz embutidos con tratamiento térmico</i> .....	14
2.6.4. <i>Preparación del inóculo</i> .....	15
2.6.5. <i>Inoculación de las muestras</i> .....	15
2.6.6. <i>Detección de Listeria monocytogenes</i> .....	15
2.6.7. <i>Técnicas de análisis y procesamiento de datos</i> .....	20
2.7. Resultados.....	22

2.7.1. Ensayo de inhibición de matriz.....	22
2.7.2. Determinación de la concentración de microorganismos .....	23
2.7.3. Inoculación de las muestras.....	23
2.7.4. Detección de <i>Listeria monocitogenes</i> .....	23
2.7.5. Determinación del límite de detección estimado .....	27
<b>III. APORTES MÁS DESTACABLES A LA EMPRESA.....</b>	<b>31</b>
<b>IV. CONCLUSIONES .....</b>	<b>32</b>
<b>V. RECOMENDACIONES.....</b>	<b>33</b>
<b>VI. REFERENCIAS .....</b>	<b>34</b>
<b>VII. ANEXOS .....</b>	<b>38</b>
Anexo A: Composición y preparación de medios de cultivos .....	38
Anexo B: Determinación del <i>eLOD</i> <sub>50</sub> del Protocolo 1 .....	39

## Índice de tablas

<b>Tabla 1</b> Matrices analizadas en la verificación de la implementación y de matrices .....	14
<b>Tabla 2</b> Resultados del ensayo de inhibición de matriz .....	22
<b>Tabla 3</b> Resultado de concentración de microorganismos.....	23
<b>Tabla 4</b> Resultados del ensayo de detección de <i>Listeria monocytogenes</i> .....	24
<b>Tabla 5</b> Tabla de contingencia teórica .....	26
<b>Tabla 6</b> Tabla de contingencia experimental .....	26
<b>Tabla 7</b> Resultados de los parámetros de sensibilidad, especificidad, exactitud relativa y tasa de falsos positivos y negativos para <i>Listeria monocytogenes</i> .....	27
<b>Tabla 8</b> Número de réplicas de matrices por cada dilución y el blanco control .....	28
<b>Tabla 9</b> Resultados del eLOD <sub>50</sub> de la verificación de la implementación.....	29
<b>Tabla 10</b> Resultados del eLOD <sub>50</sub> de la verificación de las matrices.....	29
<b>Tabla A1</b> Composición del caldo Demi Fraser .....	38
<b>Tabla B1</b> Determinación del eLOD <sub>50</sub> del protocolo 1, según la norma ISO16140-3. ....	39

## Índice de figuras

<b>Figura 1</b> Organigrama de la empresa.....	5
<b>Figura 2</b> Representación de la hibridación de los cebadores LAMP a sitios específicos.....	10
<b>Figura 3</b> Bandeja de carga rápida .....	16
<b>Figura 4</b> Bloque de calor.....	17
<b>Figura 5</b> Equipo de detección molecular 3M.....	17
<b>Figura 6</b> Tubos individuales con solución de lisis, antes y después de calentar.....	18
<b>Figura 7</b> Tubos de reacción (izquierda) y el tubo de reacción control (derecha) .....	19
<b>Figura 8</b> Resultados del software de detección molecular en 60 muestras y sus controles....	25
<b>Figura 9</b> Resultados del software de detección molecular para el ensayo del límite de detección.....	28

## Resumen

**Objetivo:** Verificar el método AOAC 2016.08. Detección Molecular de *Listeria monocytogenes* en la matriz embutidos con tratamiento térmico. **Método:** La verificación de la metodología se realizó siguiendo las recomendaciones de las normas ISO16140-2 e ISO16140-3. **Resultados:** Se logró detectar el 100% de las muestras inoculadas con *Listeria monocytogenes*. La sensibilidad, especificidad y exactitud relativa fueron de 100%, mientras que los falsos positivos y falsos negativos obtuvieron valores de 0%. El límite de detección estimado fue <2.3 ufc/25g. **Conclusiones:** El método es sensible, específico, preciso y exacto. El laboratorio demostró que tiene la capacidad de ejecutar el método de ensayo de forma correcta y emitir resultados confiables.

*Palabras clave:* *Listeria monocytogenes*, competencia técnica, verificación y LAMP.



### Abstract

**Objective:** Verify the AOAC 2016.08 method. Molecular detection of *Listeria monocytogenes* in the sausage matrix with heat treatment. **Method:** The verification of the methodology was carried out following the recommendations of the ISO16140-2 and ISO16140-3 standards. **Results:** 100% of the samples inoculated with *Listeria monocytogenes* were detected. Sensitivity, specificity, and relative accuracy were 100%, while false positives and false negatives obtained values of 0%. The estimated detection limit was <2.3 cfu/25g. **Conclusions:** The method is sensitive, specific, precise, and exact. The laboratory has made it clear that it can perform the test method correctly and deliver reliable results.

*Keywords:* *Listeria monocytogenes*, technical competence, verification, and LAMP.

## I. INTRODUCCIÓN

El sistema de gestión de los laboratorios de control de calidad está normado bajo el estándar ISO/IEC 17025, el cual establece que los métodos de análisis que son usados en el laboratorio deben ser métodos validados. La validación consiste en establecer las características de desempeño de un método y el laboratorio debe proveer evidencia objetiva de que cumple con los requisitos de desempeño para poder aplicar el método (International Organization for Standardization [ISO], 2016a).

La validación de un método de ensayo puede ser de dos tipos, validación primaria y validación secundaria o verificación. En la validación primaria se debe satisfacer las necesidades de aplicación del método (Camaró et al., 2015), se realiza una validación primaria cuando se implementa métodos desarrollados por el laboratorio o métodos normalizados usados fuera de su alcance o modificados de cierta forma (Instituto Nacional de Calidad [INACAL], 2017). Mientras que la validación secundaria o verificación es la demostración de que un método validado por un organismo internacional funciona apropiadamente cuando lo ejecuta el usuario (ISO, 2016a). Los métodos normalizados son verificados en los laboratorios de control de calidad porque su validación primaria fue realizada por un organismo internacional como la International Organization for Standardization (ISO), American Public Health Association (APHA), Food and Drug Administration (FDA), AOAC INTERNATIONAL (AOAC), International Commission on Microbiological Specifications for Foods (ICMSF), etc.

El Instituto Nacional de Calidad (INACAL), es el organismo nacional encargado de acreditar a los laboratorios de control de calidad bajo la norma ISO/IEC 17025. Los laboratorios que se encuentran acreditados bajo esta norma están obligados a verificar o validar sus métodos de ensayo acreditados. Sin embargo, es recomendable que un laboratorio no acreditado por el INACAL también debe validar o verificar sus métodos de ensayo para

garantizar que ejecuta correctamente el método y emite resultados confiables.

En el presente trabajo se realizó una verificación del método AOAC 2016.08, para la detección molecular de *Listeria monocytogenes* en la matriz embutidos con tratamiento térmico.

El alcance de la implementación del método en el laboratorio de control de calidad de la empresa sólo es hasta la obtención de resultados negativos o presuntivos. No se realiza la confirmación de resultados presuntivos, porque ante un resultado presuntivo se activan los protocolos de seguridad, se envía una alerta a la gerencia de operaciones, jefatura de producción y jefatura de calidad, quienes proceden a bloquear los productos y enviar muestras a un laboratorio externo acreditado por el INACAL para su confirmación.

### 1.1. Trayectoria del autor

Al culminar los estudios de Biología, me desempeñé como asistente de investigación en el laboratorio de microbiología experimental del Instituto de Medicina Tropical Alexander von Humboldt, realizando análisis microbiológico de *Bartonella bascilliformis*, producción del controlador biológico *Bacillus thuringiensis* y la crianza del vector *Aedes aegyptii*.

Dos años después empecé a trabajar en el laboratorio de control de calidad de la empresa CHR Hansen S.A. cuyo rubro es la producción de colorantes naturales extraídas del *Dactylopius coccus* (cochinilla del carmín), mis actividades se centraban en realizar los análisis microbiológicos del producto terminado, superficies, agua y ambientes.

Al cabo de un año entré a trabajar en el laboratorio de Genética vegetal de la Universidad Nacional Agraria la Molina, donde realizaba análisis moleculares por reacción en cadena de la polimerasa punto final para la detección de maíz transgénico, cultivo in vitro de orquídeas, mantenimiento del banco de germoplasma y producción de Taq polimerasa.

Al siguiente año empecé a trabajar en los laboratorios acreditados por el INACAL de la empresa SGS del Perú, en donde me desempeñe como analista de laboratorio y estaba encargado de realizar los análisis microbiológicos de alimentos, aguas, superficies y ambientes por métodos normalizados AOAC, ICMSF, FDA, APHA AWWA y APHA CMMEF, reporte de resultados, implementación de métodos de ensayo, testificar en las auditorías de seguimiento del INACAL, del Organismo Nacional de Sanidad Pesquera (SANIPES) y de clientes, participar en los ensayos de interlaboratorios, verificación de equipos, aseguramiento de la calidad, estudios de incertidumbre y programación de calibración de equipos.

Seis años después ingresé a trabajar en los laboratorios acreditados ante el INACAL de la empresa ALS del Perú, desempeñándome como Analista 1 y estaba encargado de la coordinación del laboratorio de microbiología. Mis actividades consistían en implementar y mantener el sistema de gestión de calidad ISO 17025 del laboratorio de microbiología,

implementar métodos de ensayo, atender auditorías, validar los reportes de resultados, capacitar a los Analistas 2 y brindar soporte técnico al área de ventas de la empresa.

Al cabo de tres años me incorporé al equipo de control de calidad de la empresa de embutidos Braedt SA, desempeñándome como Supervisor del Laboratorio de Control de Calidad, el laboratorio contaba con ambientes para análisis microbiológicos, físico-químicos y sensoriales. Como supervisor tenía que implementar el sistema de gestión de calidad del laboratorio, implementar métodos de ensayo, emitir los informes de ensayo, asistir a la jefatura de calidad en las auditorías de clientes o entidades del estado, manejar el presupuesto del laboratorio, controlar el almacén del laboratorio, controlar los reactivos fiscalizados, solicitar la calibración de equipos, atender proveedores, realizar el aseguramiento del laboratorio y capacitar a los analistas en el análisis de la materia prima, producto terminado, superficie, agua y ambientes.

## **1.2. Descripción de la empresa**

Braedt SA. es una empresa de producción de embutidos que inició sus operaciones en 1885 en la ciudad de Bistritz, Alemania, luego en 1953 trasladaron la planta a Perú y desde entonces viene posicionándose en el mercado peruano como una de las mejores marcas de embutidos. En el año 2008 se incorpora a Sigma Alimentos, una compañía global con presencia en 18 países (Braedt, 2022).

La planta presenta la certificación HACCP desde 1999 y con ello asegura la calidad de sus insumos, procesos y producto final, su producción asciende a más de 100 toneladas por mes.

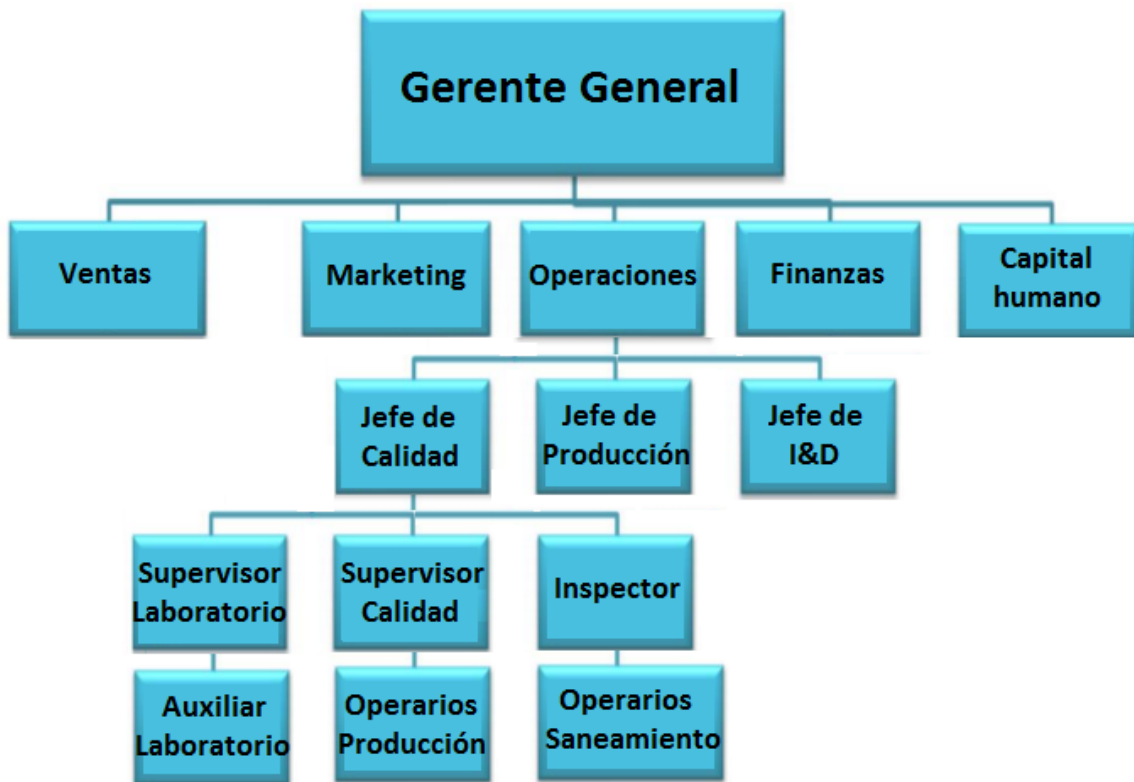
Presenta dos líneas de productos, la línea de lácteos con diferentes tipos de quesos y la línea de embutidos con productos pre cocidos, frescos y madurados.

### 1.3. Organigrama de la empresa

En la Figura 1 se presenta el organigrama de la empresa con las principales áreas y un despliegue de las jefaturas que responden a la gerencia de operaciones.

**Figura 1**

*Organigrama de la empresa*



*Nota.* Esta figura muestra el organigrama de la empresa, el supervisor del laboratorio tiene a su cargo a los auxiliares de laboratorio y responde al jefe de calidad, quien a su vez responde al gerente de operaciones y el gerente de operaciones responde al gerente general.

### 1.4. Áreas y funciones desempeñadas

El proceso central de la fábrica está organizado en tres áreas principales que reportan a la gerencia de operaciones. Estas áreas son: producción, investigación y desarrollo; y aseguramiento y control de calidad.

La jefatura de producción abarca toda la planificación y ejecución de la producción de embutidos y lácteos, limpieza de ambientes, capacitación a operarios y la coordinación del

almacenamiento de la materia prima y producto terminado.

La jefatura de investigación y desarrollo está encargada de formular nuevos productos y/o mejorar fórmulas antiguas.

La jefatura de aseguramiento y control de calidad, está encargada de coordinar el cumplimiento de los requisitos legales para el funcionamiento de la planta, además, de realizar las verificaciones de la limpieza, verificaciones de la calidad de la materia prima, de los puntos de control, de evaluar la conformidad de los parámetros físico-químicos, sensoriales y microbiológicos del producto terminado; y también está encargada de asumir las auditorías que realizan algunas instituciones del estado como la Dirección General de Salud Ambiental (DIGESA) del Ministerio de Salud (MINSA), auditorías internas de nuestra casa matriz y auditorías o visitas de clientes.

El laboratorio de control de calidad reporta a la jefatura de control y aseguramiento de la calidad y está a cargo del Supervisor del Laboratorio de Control de Calidad. Según el manual de operaciones y funciones de la empresa, las funciones del supervisor son:

- Implementar métodos de ensayo de acuerdo con las necesidades de la empresa.
- Supervisar los análisis de laboratorio del producto terminado, de la materia prima, del agua, ambiente, superficie inerte y superficie viva.
- Emitir los informes de ensayo de los estudios de vida útil y análisis de conformancia.
- Implementar y mantener el sistema de gestión del laboratorio y el programa HACCP.
- Asistir a la Jefatura de Aseguramiento y Control de Calidad con los documentos del laboratorio durante las auditorías que realizan los clientes o entidades estatales.
- Controlar el almacén de reactivos, reactivos fiscalizados y realizar los pedidos de acuerdo con el presupuesto asignado.
- Registrar la verificación de los equipos y cumplir con el programa de calibraciones.
- Alertar al área de producción ante desviaciones en la conformidad de los productos.

## II. DESCRIPCIÓN DE UNA ACTIVIDAD ESPECÍFICA

### 2.1. Verificación o validación secundaria de métodos de ensayo

La calidad microbiológica de los alimentos y bebidas que se expenden en nuestro país está regulado por la NTS N°071, Norma Técnica de Salud que establece los criterios microbiológicos de calidad sanitaria e inocuidad para los alimentos y bebidas de consumo humano (Dirección General de Salud Ambiental [DIGESA], 2008). En esta norma se encuentran los análisis microbiológicos que se realizan a los alimentos para poder solicitar su registro sanitario o como control de calidad al finalizar su producción. Los métodos de ensayo pueden ser cualitativos como un método de detección, cuantitativos como los métodos de recuento en placa o semicuantitativos como los métodos de número más probable. Estos métodos son implementados en los laboratorios de control de calidad mediante una validación primaria o mediante una validación secundaria también denominada verificación, la elección de una u otra dependerá del método de ensayo a implementar, si es un método normalizado o no.

Los métodos de ensayo que se utilizan en los análisis pueden ser métodos normalizados o no normalizados. Los métodos normalizados son aquellos que tienen una validación primaria realizado por un organismo internacional como Food and Drug Administration (FDA), AOAC International, American Public Health Association (APHA), Association française de Normalisation (AFNOR), etc. Mientras que los métodos no normalizados son métodos desarrollados por el propio laboratorio, desarrollados a partir de un artículo de investigación o modificaciones realizadas a métodos normalizados.

La verificación o validación secundaria se aplica a métodos normalizados, es decir métodos ya validados por un organismo internacional y el laboratorio sólo debe verificar que puede desarrollar apropiadamente el método y asegurar que alcanza el desempeño requerido (Camaró et al., 2015). Por lo tanto, si el laboratorio usa métodos no normalizados, deberá



realizar un estudio de validación primaria para su aplicación y si usa métodos normalizados tiene que realizar un estudio de verificación para evidenciar que puede realizar el ensayo.

La validación o verificación de métodos de ensayo en un laboratorio de control de calidad obedece a la necesidad que tiene la empresa de estar seguro de los resultados del laboratorio para tomar decisiones importantes en base a esos resultados. En nuestro caso, los embutidos con tratamiento térmico tienen una vida útil promedio de 30 días, siendo necesario contar con el informe microbiológico lo más pronto posible para que puedan ser comercializados. El análisis del producto terminado es la última etapa de una serie de monitoreos que se realizan en la planta de producción, como el monitoreo microbiológico de las operaciones de limpieza y desinfección de superficies, análisis de materias primas, control de calidad del agua, control microbiológico ambiental y análisis microbiológico de los manipuladores de alimentos.

La norma ISO 16140-3 describe el protocolo para la verificación en un solo laboratorio de métodos de referencia y métodos alternativos validados, esta verificación se lleva cabo en dos etapas: Verificación de la implementación y verificación de matrices (ISO, 2021).

### ***2.1.1. Verificación de la implementación***

En la verificación de la implementación, el laboratorio usuario demuestra su capacidad de implementar el método validado, al alcanzar los resultados esperados en una matriz alimentaria. Para la verificación, el laboratorio debe leer el informe de validación del método y seleccionar una matriz que fue probada en el estudio de validación (ISO, 2021). El laboratorio realiza la verificación en esa matriz y compara sus resultados con los datos del informe de validación.

### ***2.1.2. Verificación de las matrices***

En la verificación de matrices, el laboratorio usuario demuestra su capacidad para implementar el método validado, usando matrices que se trabajan en el laboratorio (ISO, 2021).

El número de matrices a utilizar en la verificación depende del alcance del método que aplica el laboratorio, si se aplica en una amplia gama de alimentos, en una gama limitada de alimentos, en otras categorías como muestras ambientales, alimentos de animales o una mezcla de categorías. Cuando el alcance es para una “gama limitada de alimentos”, la verificación se realiza en  $\leq 4$  matrices.

De acuerdo con el tipo de método, si es cuantitativo como los métodos de recuento en placa o cualitativo como los métodos de detección, las características de performance para la verificación pueden variar. En los métodos cuantitativos la norma ISO 16140-3 solicita realizar un estudio de la desviación estándar de reproducibilidad intralaboratorio y evaluación del sesgo estimado, mientras que, en los métodos cualitativos la norma ISO 16140-3 solicita sólo un estudio del LOD50 estimado en la verificación de la implementación y en la verificación de las matrices.

## **2.2. La bacteria *Listeria monocytogenes***

El género *Listeria* está formado por seis especies: *Listeria monocytogenes*, *Listeria innocua*, *Listeria ivanovii*, *Listeria seeligeri*, *Listeria welshimeri* y *L.marthii*. Sin embargo, sólo *Listeria monocytogenes* es considerada patogénica para el hombre, es una bacteria de tipo bacilo gran positivo, anaerobio facultativo, no esporulados y móvil (Rodríguez-Auad, 2018).

## **2.3. Métodos clásicos de detección versus métodos rápidos**

Entre los métodos normalizados para la detección de *Listeria monocytogenes*, podemos encontrar métodos clásicos como FDA/BAM (Hitchins et al., 2022) e ISO11290-1 (ISO, 2017) que involucran pasos de enriquecimiento, aislamiento en placa e identificación bioquímica, con estos métodos un resultado negativo lo podemos obtener en 96 horas aproximadamente. Otros métodos validados podemos encontrar en la norma AOAC, estos se caracterizan por ser métodos rápidos como los ensayos de inmunoprecipitado visual (VIP por sus siglas en inglés) cuyo resultado negativo se obtiene en 48 horas (Feldsine et al., 2002) o métodos más rápidos

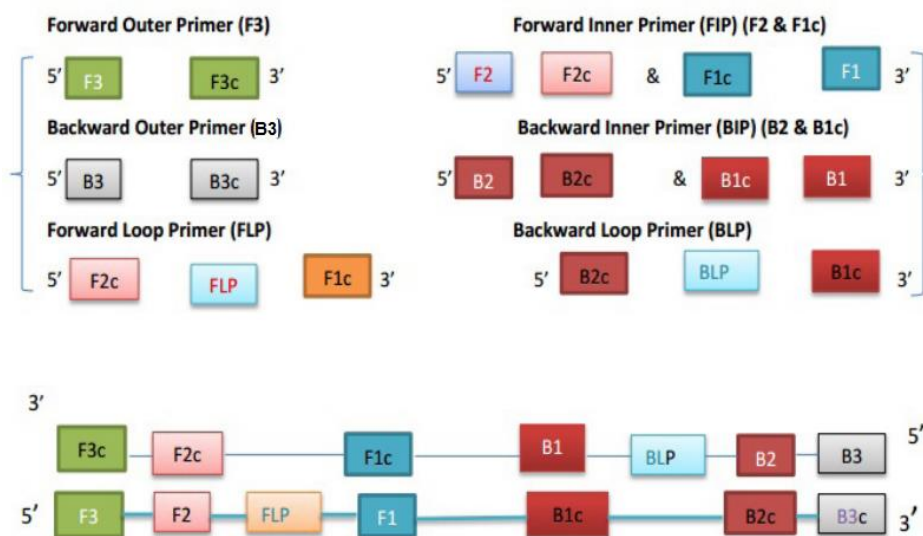
basados en análisis moleculares como la reacción en cadena de la polimerasa (en inglés, polymerase chain reaction o PCR) que puede entregar resultados negativos en 24 horas (Silbernagel et al., 2004). La desventaja del PCR es que se requiere equipos costosos que aumentan considerablemente los costos del ensayo. Una alternativa es el método de ensayo basado en la técnica de amplificación isotérmica mediada por lazo, este ensayo también es una prueba molecular (Bird et al., 2017), con resultados en 30 horas y equipos accesibles.

#### 2.4. La técnica de amplificación isotérmica mediada por lazo (LAMP)

La técnica de amplificación isotérmica mediada por lazo (LAMP por sus siglas en inglés), tiene la capacidad de amplificar secciones específicas del ADN. En la Figura 2 se observa la hibridación de los cebadores a sitios específicos del ADN.

**Figura 2**

*Representación de la hibridación de los cebadores LAMP a sitios específicos*



*Nota.* Esta figura muestra la técnica de LAMP donde se utilizan de 4 a 6 de cebadores que permitirán la amplificación formando bucles. Adaptada de “*Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP), An Innovation in Gene Amplification: Bridging the Gap in Molecular Diagnostics; A Review*”, por Umar et al., 2015, *Indian Journal of Science and Technology*, 8. Bajo licencia internacional Creative Commons Attribution 4.0.

La técnica LAMP utiliza de 4 a 6 cebadores (cebador Forward interno FIP, cebador

reverse interno BIP, cebador Forward externo F3, cebador reverse externo B3 y dos cebadores bucle que son opcionales) (Notomi et al., 2000). Para amplificar el ADN, utiliza la enzima ADN polimerasa (Bst ADN polimerasa del *Bacillus stearothermophilus*) que presenta actividad de desplazamiento de cadena, esto evita requerir el paso de desnaturalizar el ADN a 90°C muy necesario en un PCR. La técnica LAMP es isotérmica porque toda la reacción ocurre a la misma temperatura de 60°C y es tolerante a sustancias inhibidoras (Neogen, 2020).

Entre otras aplicaciones, la técnica de LAMP también se ha usado para la detección del virus Zika, obteniendo 99.3% de sensibilidad y 100% de especificidad (Escalante et al., 2019). Y en los últimos años, para hacer frente a la pandemia del Covid 19, La técnica de LAMP se ha usado acoplado a un sistema de transcripción inversa para la detección del virus del SARS Cov2 (Ali et al., 2020).

Para observar la amplificación, se pueden usar técnicas colorimétricas basados en el indicador rojo de fenol, que ante el cambio de pH producida por la actividad de la polimerasa se torna de color amarillo en medio ácido (menor o igual a 6.8), rojo oscuro en un pH de 8.2 y rojo anaranjado entre los pH de 6.8 y 8.2 (Covarrubias, 2021). Una opción novedosa fue la aplicación de LAMP acoplado con el sistema CRISPR-Cas 12 para evidenciar las amplificaciones en la detección del virus del SARS Cov2 (Ali et al., 2020).

## **2.5. El método AOAC 2016.08 - Detección molecular de *Listeria monocytogenes***

El método AOAC 2016.08 es un método de detección por lo tanto es un método cualitativo porque no indica la concentración de *Listeria monocytogenes* existente en el alimento sino la presencia o ausencia de este microorganismo en determinada porción de alimento, está basado en la técnica molecular de amplificación isotérmica mediada por lazo, la secuencia de ADN amplificada es única, esto permite una alta especificidad y sensibilidad. Previo a la amplificación, hay una etapa de pre - enriquecimiento de las muestras con caldo Demi Frazer suplementado con Citrato Férrico de Amonio, esta etapa de enriquecimiento sirve

para favorecer la multiplicación de *Listeria monocytogenes* que puede encontrarse en la muestra de alimento, las condiciones de la etapa de enriquecimiento es una incubación a 37°C por un periodo entre 24 y 30 horas, terminado el periodo de enriquecimiento se procede con la lisis y amplificación (Bird et al., 2017).

El método AOAC 2016.08 realiza la amplificación del ADN a una temperatura constante dirigida por la enzima Bst ADN Polimerasa usando 6 cebadores específicos, durante la amplificación los nucleótidos se unen liberando Pirofosfato Inorgánico que es convertido a Adenosin Tri Fosfato (ATP) por la enzima ATP-Sulfurilasa, luego la enzima Luciferasa utiliza el ATP para producir una reacción de bioluminiscencia, la luz producida por esta reacción es detectada por el sensor del equipo y a partir de los 15 minutos el software de 3M interpreta las señales de luz como un resultado presuntivo para *Listeria monocytogenes*, cuando no reacción y no hay señales de luz, el software interpreta como un resultado negativo (Neogen, 2020). En el software de 3M la posición de las muestras presuntivas se colorea de rojo con un signo positivo y las muestras negativas se colorean de verde con un signo negativo. Para la matriz general carnes y productos cárnicos, hay reportes de 94% de especificidad y 100% de sensibilidad, con un límite de detección de 10 ufc (Yushina, 2019).

## **2.6. Materiales y métodos**

### **2.6.1. Localización del estudio**

La producción de embutidos con tratamiento térmico se desarrolló en las instalaciones de la fábrica ubicada en Ate, Lima - Perú. En la fábrica, el laboratorio de control de calidad no trabaja con cepas, por razones de seguridad se busca evitar que estas migren a las instalaciones de la planta. Las actividades experimentales se desarrollaron en un laboratorio externo, en el Laboratorio MARPALAB.

### **2.6.2. Preparación de la muestra**

En la normativa nacional NTS N°071-MINSA/DIGESA, el subgrupo X11 (Embutidos con tratamiento térmico) pertenece al grupo X (Carnes y productos cárnicos). Las matrices analizadas están limitadas a “embutidos con tratamiento térmico” y la norma ISO16140-3 establece que el alcance de la verificación con pocas matrices es “gama limitada de alimentos”.

La verificación de la implementación se realizó con una matriz usada en la validación del método por la empresa desarrolladora. Entre las matrices que usó la empresa 3M para validar el método y que además está relacionado con nuestro tipo de alimento, encontramos hot dog, por ello se usó hot dog en la verificación de la implementación.

Para la verificación de las matrices, la norma indica que se debe analizar  $\leq 4$  matrices diferentes. En la fábrica, los embutidos con tratamiento térmico son agrupados en jamones, jamonadas, morcillas, salchichas y chorizos precocidos. Como hot dog está dentro del grupo de salchichas y esta se usó en la verificación de la implementación, para la verificación de las matrices se usó un producto representante de cada uno de los grupos restantes.

En total se trabajaron cinco matrices alimentarias, una matriz para la verificación de la implementación y cuatro para la verificación de las matrices. Se eligieron 12 muestras de cada matriz para hacer un total de 60 análisis como lo solicita la norma ISO16140-2 (Yushina, 2019) (ISO, 2016b).

Para la verificación, del grupo de salchichas se usó hot dog en presentación de 500g, del grupo de jamones se usó jamón pizzero en presentación de 250g, del grupo de jamonadas se usó jamonada de pollo en presentación de 100g, del grupo de morcillas se usó morcilla en presentación de 500g y del grupo chorizo precocido se usó chorizo parrillero precocido en presentación de 500g. En la Tabla 1 se muestran las matrices analizadas y el número de muestras por cada matriz.

**Tabla 1**

*Matrices analizadas en la verificación de la implementación y de matrices*

<b>Alcance de la aplicación de la validación</b>	<b>Verificación de implementación 1 matriz</b>	<b>Verificación de matrices ≤ 4 matrices</b>	<b>Total</b>
“gama limitada de alimentos”  Carnes y productos cárnicos – Embutidos con tratamiento térmico	Salchichas (Hot dog)	Jamonadas (Jamonada de pollo)	5 matrices
		Jamones (Jamón pizzero)	
		Morcillas (Morcilla)	
		Chorizos precocidos (Chorizo parrillero precocido)	

*Nota.* Esta tabla muestra las matrices usadas en la verificación de la implementación (Hot dog) y verificación de las matrices (jamonada de pollo, jamón pizzero, morcilla y chorizo parrillero precocido), del alcance gama limitada de alimentos según la norma ISO 16140-3.

### **2.6.3. Ensayo de inhibición en matriz embutidos con tratamiento térmico**

Para confirmar que no existen componentes en la matriz embutidos con tratamiento térmico que puedan inhibir la reacción de amplificación, se realizó una prueba de inhibición con el kit 3M Molecular Detection Matrix Control a cada grupo de productos.

Se siguió los mismos pasos de incubación y lisis, pero se configuró el software para un ensayo de control matriz y la amplificación se realizó con el kit 3M Molecular Detection Matrix Control, este kit tiene tubos de reacción conteniendo ADN que amplifica cuando los componentes de la matriz no provocan inhibición en la reacción.

#### **2.6.4. Preparación del inóculo**

A partir de las cepas de trabajo de *Listeria monocytogenes* ATCC 13932 y *Listeria innocua* ATCC 33090, se procedió a estriar en una placa de TSA y se incubó por 24 horas a 37°C. De la placa de 24 horas se transfirió una colonia en 10 mL de caldo BHI y se incubó por 24 horas a 37°C. A partir de este cultivo se realizaron diluciones seriadas con el fin de obtener la concentración de microorganismos a las 24 horas de incubación.

#### **2.6.5. Inoculación de las muestras**

Para el ensayo de detección molecular se inocularon 30 muestras con *Listeria monocytogenes* y 30 muestras con *Listeria innocua*.

Para la determinación estimada del límite de detección 50%, se inocularon *Listeria monocytogenes* en tres niveles de concentración (superior, intermedio e inferior) y un blanco control sin inóculo, siguiendo las indicaciones del protocolo 1 de la norma ISO 16140-3.

#### **2.6.6. Detección de *Listeria monocytogenes***

Para la detección de *Listeria monocytogenes*, se siguió el protocolo de trabajo recomendado por el fabricante del método (Bird et al., 2017).

**2.6.6.1. Enriquecimiento de la muestra.** Para el enriquecimiento se utilizó el Caldo Demi Fraser (DF), este medio de cultivo se esterilizó en una autoclave a 121°C por 15 minutos, luego se dejó enfriar a temperatura ambiente del laboratorio (20 – 25°C) y una vez enfriado se suplementó con Citrato Férrico de Amonio (FAC) según indicación del fabricante (Anexo A). Para el análisis se procedió a combinar 225 mL del caldo DF/FAC con 25 g de muestra, se homogenizó durante 2 +/- 0.2 min y se llevó a una incubadora a 37 +/- 1°C durante 24 – 30 horas. Después del enriquecimiento se continuó con la lisis y amplificación de las muestras analizadas.

**2.6.6.2. Preparación de la bandeja de carga rápida.** La bandeja de carga rápida se limpió con una solución de lejía a una concentración del 5%, v/v en agua (6500 ppm). Se utilizó



papel toalla mojado con la solución de lejía, se enjuagó con abundante agua y se secó con papel toalla. En la Figura 3 se muestra la bandeja de carga rápida.

### Figura 3

#### *Bandeja de carga rápida*



*Nota.* Esta figura muestra la bandeja de carga con los orificios donde se colocan las muestras, las filas son identificadas de la letra A al H y las columnas son numeradas del 1 al 12. Las posiciones que ocupan las muestras son correspondidas en el software para su identificación.

**2.6.6.3. Preparación del bloque de calor.** Se encendió el bloque de calor y se configuró la temperatura a  $100 \pm 1^\circ\text{C}$ , la temperatura del bloque de calor fue verificado con un termómetro calibrado, adicionalmente se configuró el tiempo de exposición al calor por 15 minutos. En la Figura 4 se muestra el bloque de calor calentado previamente.

**Figura 4***Bloque de calor*

*Nota.* Esta figura muestra el bloque de calor que se programó a 100°C por 15 minutos.

**2.6.6.4. Preparación del equipo de detección.** Se inició sesión con el software de detección molecular 3M, se encendió el equipo y se editó una corrida. El equipo tardó unos 20 minutos en alcanzar y mantener una temperatura de 60°C, esto fue indicado mediante una luz naranja que cambia a luz verde cuando alcanza los 60°C. Una vez alcanzada la temperatura de trabajo, se procedió a iniciar el proceso de amplificación, el equipo cambia de luz verde a luz azul cuando está realizando la amplificación. En la Figura 5 se muestra las diferentes luces que indicaron el estado del equipo.

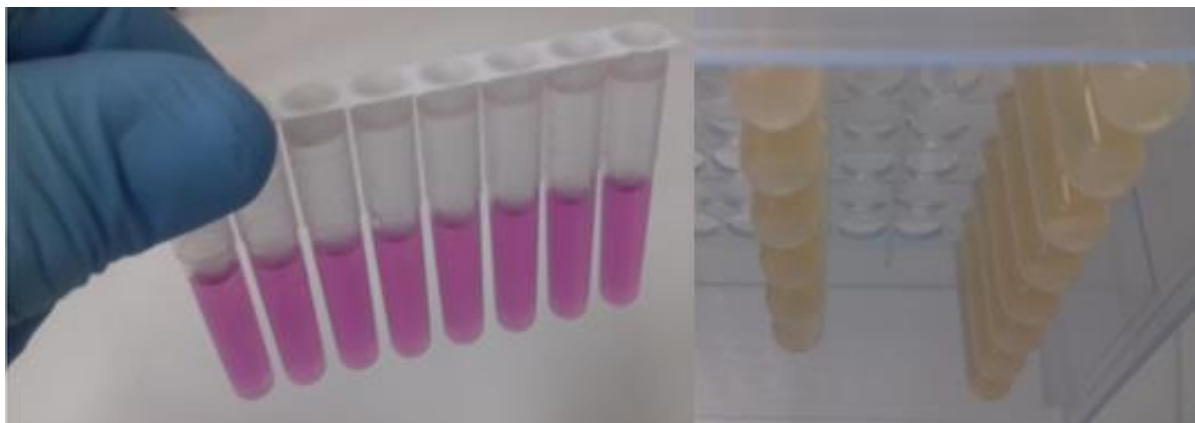
**Figura 5***Equipo de detección molecular 3M*

*Nota.* Esta figura muestra el equipo de detección molecular, el cual emite una luz naranja cuando comienza a subir la temperatura, cambia a verde cuando alcanza la temperatura programada de 60°C y pasa a azul cuando está realizando la amplificación.

**2.6.6.5. Lisis.** Se usó los tubos de solución de lisis provistas en el kit MDA2LMO96, los cuales fueron temperados a temperatura ambiente en la mesa del laboratorio por 2 horas, luego se invirtieron los tubos de lisis para mezclarlos. Se retiraron los caldos de enriquecimiento de la incubadora y se transfirió 20 uL de cada muestra a tubos individuales de solución de lisis, también se transfirió 20 uL de la muestra control negativo (NC, medio de enriquecimiento estéril) a un tubo de solución de lisis. Se colocó la gradilla de tubos de lisis en el bloque térmico y se calentó durante 15 +/- 1 minuto. Durante el calentamiento, la solución de lisis cambió de color rosa (frío) a amarillo (caliente). Se retiró la gradilla de tubos de lisis del bloque de calentamiento y se dejó enfriar en la mesa del laboratorio a temperatura ambiente (20 – 25°C) entre 5 minutos y 10 minutos. Una vez enfriado, los tubos de lisis volvieron a ser de color rosa, en la Figura 6 se muestra el cambio de color de la solución de lisis, antes y después del calentamiento.

### Figura 6

*Tubos individuales con solución de lisis, antes y después de calentar*



*Nota.* Esta figura muestra los tubos de lisis, los cuales tienen una coloración rosa cuando están frías, luego del calentamiento a 100°C por 15 minutos adquieren una coloración amarilla y al enfriarse recuperan el color rosa.

**2.6.6.6. Amplificación.** Para la amplificación se usó el kit MDA2LMO96 y se requirió un tubo de reacción por cada muestra más el control negativo (NC). Se transfirió 20 uL del lisado de muestras al tubo de reacción correspondiente, se dispensó en ángulo para evitar perturbar los gránulos y se mezcló pipeteando suavemente hacia arriba y hacia abajo 5 veces. Los tubos se cubrieron con las tapas extras, cuando se terminó de transferir todos los lisados de muestras, se procedió a transferir 20 uL del lisado control negativo (NC) a un tubo de reacción, luego se transfirió 20 uL del lisado NC a un tubo de reacción control (RC). Todos los tubos se colocaron en la bandeja de carga rápida, este se introdujo en el equipo de detección molecular 3M y se inició la corrida. El resultado final de los análisis fue proporcionado en 75 minutos.

En la Figura 7 se muestran los tubos de reacción a la izquierda y el tubo de reacción control a la derecha, cada tubo de reacción contiene perlas reactivas liofilizadas de la enzima Bst ADN polimerasa, dNTPs y cebadores, el tubo de reacción control adicionalmente contiene ADN de *Listeria monocytogenes*.

### Figura 7

*Tubos de reacción (izquierda) y el tubo de reacción control (derecha)*



*Nota.* Esta figura muestra los reactivos para la amplificación (la enzima Bst ADN polimerasa, los dNTPs y los cebadores) que vienen en forma de perlas liofilizadas.

### **2.6.7. Técnicas de análisis y procesamiento de datos**

Para el análisis estadístico se calculó el eLOD<sub>50</sub>, la sensibilidad, especificidad, exactitud relativa, tasa de falsos positivos y tasa de falsos negativos.

**2.6.7.1. Determinación estimada del límite de detección 50% (eLOD<sub>50</sub>).** La norma ISO16140-3 recomienda evaluar el eLOD<sub>50</sub> en lugar del LOD<sub>50</sub> debido al pequeño número de muestras. La detección de *Listeria monocytogenes*, al ser un método cualitativo se debe evaluar el LOD<sub>50</sub> estimado en la verificación de la implementación y en la verificación de matrices. Para la determinación del eLOD<sub>50</sub> se siguió el protocolo 1 de los 3 protocolos recomendados por la norma ISO16140-3. Se decidió usar el protocolo 1 porque en la contaminación no se usó material de referencia con una concentración conocida, sino cultivos sin un conocimiento exacto del nivel del inóculo.

Para realizar la contaminación de cada nivel según el protocolo 1 de la norma ISO 16140-3, el nivel superior se contaminó como máximo con nueve veces el LOD<sub>50</sub>, a partir del nivel superior se realizó diluciones 1:3 para obtener el nivel intermedio y el nivel inferior se obtuvo al realizar diluciones 1:3 el nivel intermedio. El blanco correspondió a una muestra sin inóculo, en total se obtuvieron 10 réplicas para el protocolo 1.

Para la evaluación de los resultados del protocolo 1, la norma ISO 16140-3 indica que el nivel de mayor inóculo (9xLOD<sub>50</sub>) debe producir sólo resultados positivos, en caso contrario se debe repetir la prueba en todos los niveles. Para determinar el eLOD<sub>50</sub>, se comparó las combinaciones obtenidas (nivel superior, intermedio, inferior y blanco) con la tabla de determinación del eLOD<sub>50</sub> (Anexo B) de la norma ISO16140-3.

**2.6.7.2. Sensibilidad.** Se calculó como la fracción del número total de muestras positivas que son identificadas correctamente con el método de ensayo utilizado ISO/TR 13843 (Organismo Argentino de Acreditación [OAA], 2013).

**2.6.7.3. Especificidad.** Se calculó como la fracción del número total de muestras

negativos que son identificadas correctamente con el método de ensayo utilizado ISO/TR 13843 (OAA, 2013).

**2.6.7.4. Exactitud Relativa.** Se evaluó como el grado de concordancia entre los resultados del método que se está evaluando y los resultados obtenidos con un método de referencia conocido ISO 16140 (OAA, 2013).

**2.6.7.5. Tasa de Falsos Positivos.** Se calculó como la probabilidad de obtener como resultado de un ensayo, un resultado positivo cuando en realidad es negativo. La incidencia es  $1 - \text{especificidad}$  AOAC INTERNATIONAL (OAA, 2013).

**2.6.7.6. Tasa de Falsos Negativos.** Se calculó como la probabilidad de obtener como resultado de un ensayo, que una muestra positiva obtenga un resultado negativo. La incidencia es  $1 - \text{sensibilidad}$  AOAC INTERNATIONAL (OAA, 2013).

## 2.7. Resultados

### 2.7.1. Ensayo de inhibición de matriz

No se observó inhibición de la amplificación en ninguno de los cinco grupos de matrices analizadas (jamones, jamonadas, morcilla, salchichas y chorizo precocido). En la Tabla 2 se observan los resultados del ensayo de inhibición de matriz.

**Tabla 2**

*Resultados del ensayo de inhibición de matriz*

<b>Nro</b>	<b>Muestra</b>	<b>Resultado Amplificación / Inhibición</b>
1	Jamón pizzero	Amplificación
2	Jamón pizzero	Amplificación
3	Jamón pizzero	Amplificación
4	Jamón pizzero	Amplificación
5	Jamón pizzero	Amplificación
6	Jamonada de pollo	Amplificación
7	Jamonada de pollo	Amplificación
8	Jamonada de pollo	Amplificación
9	Jamonada de pollo	Amplificación
10	Jamonada de pollo	Amplificación
11	Morcilla	Amplificación
12	Morcilla	Amplificación
13	Morcilla	Amplificación
14	Morcilla	Amplificación
15	Morcilla	Amplificación
16	Hot dog	Amplificación
17	Hot dog	Amplificación
18	Hot dog	Amplificación
19	Hot dog	Amplificación
20	Hot dog	Amplificación
21	Chorizo parrillero precocido	Amplificación
22	Chorizo parrillero precocido	Amplificación
23	Chorizo parrillero precocido	Amplificación
24	Chorizo parrillero precocido	Amplificación
25	Chorizo parrillero precocido	Amplificación

*Nota.* Esta tabla muestra el análisis de inhibición de matriz, que amplifica un ADN control cuando no hay inhibidores de la reacción entre los ingredientes de los embutidos. El resultado para los cinco grupos de muestras analizadas fue amplificación.

### 2.7.2. Determinación de la concentración de microorganismos

Se determinó la concentración de los microorganismos al promediar el recuento de tres repeticiones de un cultivo de 24 horas. La concentración promedio de *Listeria monocytogenes* fue de  $63 \times 10^7$  UFC/mL y de *Listeria innocua* fue de  $72 \times 10^7$  UFC/ml. En la Tabla 3 se presentan las concentraciones en tres recuentos sucesivos.

**Tabla 3**

*Resultado de concentración de microorganismos*

Repeticiones	<i>L. monocytogenes</i> (UFC/mL)	<i>L. innocua</i> (UFC/mL)
1	$71 \times 10^7$	$86 \times 10^7$
2	$54 \times 10^7$	$62 \times 10^7$
3	$65 \times 10^7$	$68 \times 10^7$
Promedio	$63 \times 10^7$	$72 \times 10^7$

*Nota.* Esta tabla muestra los recuentos por triplicado de *L. monocytogenes* y *L. innocua* que se realizaron para obtener un recuento aproximado por mililitro de cultivo.

### 2.7.3. Inoculación de las muestras

La concentración de un cultivo de 24 horas de *Listeria monocytogenes* fue de  $63 \times 10^7$  UFC/mL. Por lo tanto, en 1 mL de esta dilución había 63 UFC y en 0.5 mL teníamos alrededor de 30 UFC. La contaminación se realizó en el diluyente, con un inóculo de 0.5 mL de cultivo en 225 mL de diluyente, obteniéndose una contaminación aproximada de 30 UFC por muestra.

La concentración de un cultivo de 24 horas de *Listeria innocua* fue de  $72 \times 10^7$  UFC/mL. Por lo tanto, en 1 mL de esta dilución había 72 UFC y en 0.5 mL teníamos 36 UFC. La contaminación se realizó en el diluyente, con un inóculo de 0.5 mL de cultivo en 225 mL de diluyente, obteniéndose una contaminación aproximada de 36 UFC en cada muestra.

### 2.7.4. Detección de *Listeria monocitogenes*

De las 60 muestras analizadas, el resultado de las 30 muestras inoculadas con *Listeria monocytogenes* fue Presencia/25g y en las 30 muestras inoculadas con *Listeria innocua* el



resultado fue Ausencia/25g. En la Tabla 4 se muestran los resultados obtenidos.

**Tabla 4**

*Resultados del ensayo de detección de Listeria monocytogenes*

<b>Nro</b>	<b>Analista</b>	<b>Producto</b>	<b>Inóculo</b>	<b><i>L. monocytogenes</i>/25 g</b>
1	1	Jamón pizzero	<i>L. innocua</i>	Ausencia
2	1	Jamón pizzero	<i>L. monocytogenes</i>	Presencia
3	1	Jamón pizzero	<i>L. monocytogenes</i>	Presencia
4	1	Jamón pizzero	<i>L. innocua</i>	Ausencia
5	1	Jamón pizzero	<i>L. monocytogenes</i>	Presencia
6	1	Jamón pizzero	<i>L. innocua</i>	Ausencia
7	2	Jamón pizzero	<i>L. monocytogenes</i>	Presencia
8	2	Jamón pizzero	<i>L. monocytogenes</i>	Presencia
9	2	Jamón pizzero	<i>L. innocua</i>	Ausencia
10	2	Jamón pizzero	<i>L. innocua</i>	Ausencia
11	2	Jamón pizzero	<i>L. monocytogenes</i>	Presencia
12	2	Jamón pizzero	<i>L. innocua</i>	Ausencia
13	1	Jamonada de pollo	<i>L. monocytogenes</i>	Presencia
14	1	Jamonada de pollo	<i>L. innocua</i>	Ausencia
15	1	Jamonada de pollo	<i>L. monocytogenes</i>	Presencia
16	1	Jamonada de pollo	<i>L. innocua</i>	Ausencia
17	1	Jamonada de pollo	<i>L. monocytogenes</i>	Presencia
18	1	Jamonada de pollo	<i>L. innocua</i>	Ausencia
19	2	Jamonada de pollo	<i>L. monocytogenes</i>	Presencia
20	2	Jamonada de pollo	<i>L. monocytogenes</i>	Presencia
21	2	Jamonada de pollo	<i>L. innocua</i>	Ausencia
22	2	Jamonada de pollo	<i>L. innocua</i>	Ausencia
23	2	Jamonada de pollo	<i>L. innocua</i>	Ausencia
24	2	Jamonada de pollo	<i>L. monocytogenes</i>	Presencia
25	1	Hot dog	<i>L. innocua</i>	Ausencia
26	1	Hot dog	<i>L. innocua</i>	Ausencia
27	1	Hot dog	<i>L. monocytogenes</i>	Presencia
28	1	Hot dog	<i>L. monocytogenes</i>	Presencia
29	1	Hot dog	<i>L. innocua</i>	Ausencia
30	1	Hot dog	<i>L. monocytogenes</i>	Presencia
31	2	Hot dog	<i>L. innocua</i>	Ausencia
32	2	Hot dog	<i>L. innocua</i>	Ausencia
33	2	Hot dog	<i>L. monocytogenes</i>	Presencia
34	2	Hot dog	<i>L. monocytogenes</i>	Presencia
35	2	Hot dog	<i>L. innocua</i>	Ausencia
36	2	Hot dog	<i>L. monocytogenes</i>	Presencia
37	1	Morcilla	<i>L. innocua</i>	Ausencia
38	1	Morcilla	<i>L. monocytogenes</i>	Presencia
39	1	Morcilla	<i>L. innocua</i>	Ausencia
40	1	Morcilla	<i>L. monocytogenes</i>	Presencia
41	1	Morcilla	<i>L. innocua</i>	Ausencia
42	1	Morcilla	<i>L. monocytogenes</i>	Presencia
43	2	Morcilla	<i>L. innocua</i>	Ausencia
44	2	Morcilla	<i>L. innocua</i>	Ausencia
45	2	Morcilla	<i>L. monocytogenes</i>	Presencia

46	2	Morcilla	<i>L. innocua</i>	Ausencia
47	2	Morcilla	<i>L. monocytogenes</i>	Presencia
48	2	Morcilla	<i>L. monocytogenes</i>	Presencia
49	1	Chorizo parrillero precocido	<i>L. innocua</i>	Ausencia
50	1	Chorizo parrillero precocido	<i>L. innocua</i>	Ausencia
51	1	Chorizo parrillero precocido	<i>L. monocytogenes</i>	Presencia
52	1	Chorizo parrillero precocido	<i>L. monocytogenes</i>	Presencia
53	1	Chorizo parrillero precocido	<i>L. innocua</i>	Ausencia
54	1	Chorizo parrillero precocido	<i>L. monocytogenes</i>	Presencia
55	2	Chorizo parrillero precocido	<i>L. innocua</i>	Ausencia
56	2	Chorizo parrillero precocido	<i>L. monocytogenes</i>	Presencia
57	2	Chorizo parrillero precocido	<i>L. monocytogenes</i>	Presencia
58	2	Chorizo parrillero precocido	<i>L. innocua</i>	Ausencia
59	2	Chorizo parrillero precocido	<i>L. innocua</i>	Ausencia
60	2	Chorizo parrillero precocido	<i>L. monocytogenes</i>	Presencia

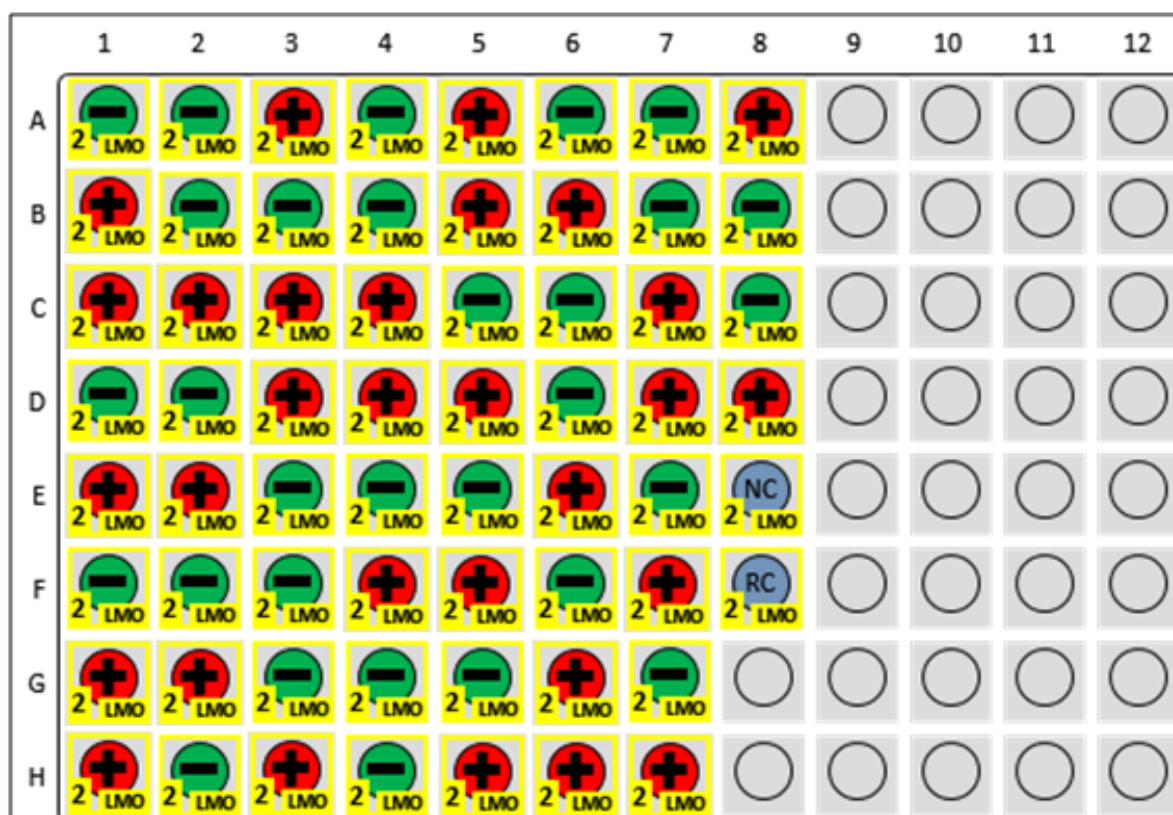
Nota. Esta tabla muestra el resultado del análisis de detección de *Listeria monocytogenes* en

25g de embutidos inoculados con cepas de *Listeria monocytogenes* o *Listeria innocua*.

En la Figura 8 se muestran los resultados que el software de 3M emite al finalizar el análisis.

### Figura 8

Resultados del software de detección molecular en 60 muestras y sus controles



Nota. Esta figura muestra el resultado que entrega el software de detección molecular, como presencia (+), ausencia (-), control negativo (NC) y reacción control (RC).

La Tabla 5 muestra la tabla de contingencia teórica y la Tabla 6 muestra la tabla de contingencia experimental obtenida después de realizar el ensayo de detección de *Listeria monocytogenes*.

**Tabla 5**

*Tabla de contingencia teórica*

<b>Resultado del método</b>	<b>Resultados esperados</b>		<b>Total</b>
	<b>Positivo</b>	<b>Negativo</b>	
Positivo (Presencia)	N11	N12	N11 + N12
Negativo (Ausencia)	N21	N22	N21 + N22
<b>Total</b>	$N+ = N11+N21$	$N- = N12 + N22$	<b>N</b>

*Nota.* Se muestra la tabla de contingencia teórica entre el resultado del método y los resultados esperados.

**Tabla 6**

*Tabla de contingencia experimental*

<b>Resultado del método</b>	<b>Resultados esperados</b>		<b>Total</b>
	<b>Positivo</b>	<b>Negativo</b>	
Positivo (Presencia)	30	0	30
Negativo (Ausencia)	0	30	30
<b>Total</b>	<b>30</b>	<b>30</b>	<b>60</b>

*Nota.* Se muestra la tabla de contingencia experimental entre el resultado del método y los resultados esperados.

La sensibilidad, especificidad, exactitud relativa, tasa de falsos negativos y tasa de falsos positivos evidencian que se logró detectar las muestras contaminadas con el microorganismo objetivo. En la Tabla 7 se muestran los resultados de estos parámetros.

**Tabla 7**

*Resultados de los parámetros de sensibilidad, especificidad, exactitud relativa y tasa de falsos positivos y negativos para Listeria monocytogenes*

<b>Matriz</b>	<b>Sensibilidad %</b>	<b>Especificidad %</b>	<b>Exactitud relativa %</b>	<b>Tasa de falsos positivos %</b>	<b>Tasa de falsos negativos %</b>
Embutidos con tratamiento térmico	100	100	100	0	0

*Nota.* Esta tabla muestra que la sensibilidad, especificidad y exactitud relativa dieron 100%; y las tasas de falsos positivos y tasas de falsos negativos dieron 0%.

#### **2.7.5. Determinación del límite de detección estimado**

Para obtener el eLOD50 se usó el protocolo 1 de la norma ISO 16140-3. A partir de la dilución del cultivo de 24 horas cuyo recuento fue de 63 UFC/mL (dilución A), se hicieron diluciones sucesivas de 1:3 para obtener las diluciones B, C y D. Se trabajó un blanco sin inóculo, una dilución B y cuatro repeticiones para las diluciones C y D.

En la Tabla 8 se muestra el número de réplicas de matrices por cada dilución, en la Figura 9 se observan los resultados del software de detección molecular para el ensayo del límite de detección estimado, en la Tabla 9 se presenta el resultado del eLOD50 de la verificación de la implementación y en la Tabla 10 se muestra el resultado del eLOD50 de la verificación de las matrices.

**Tabla 8**

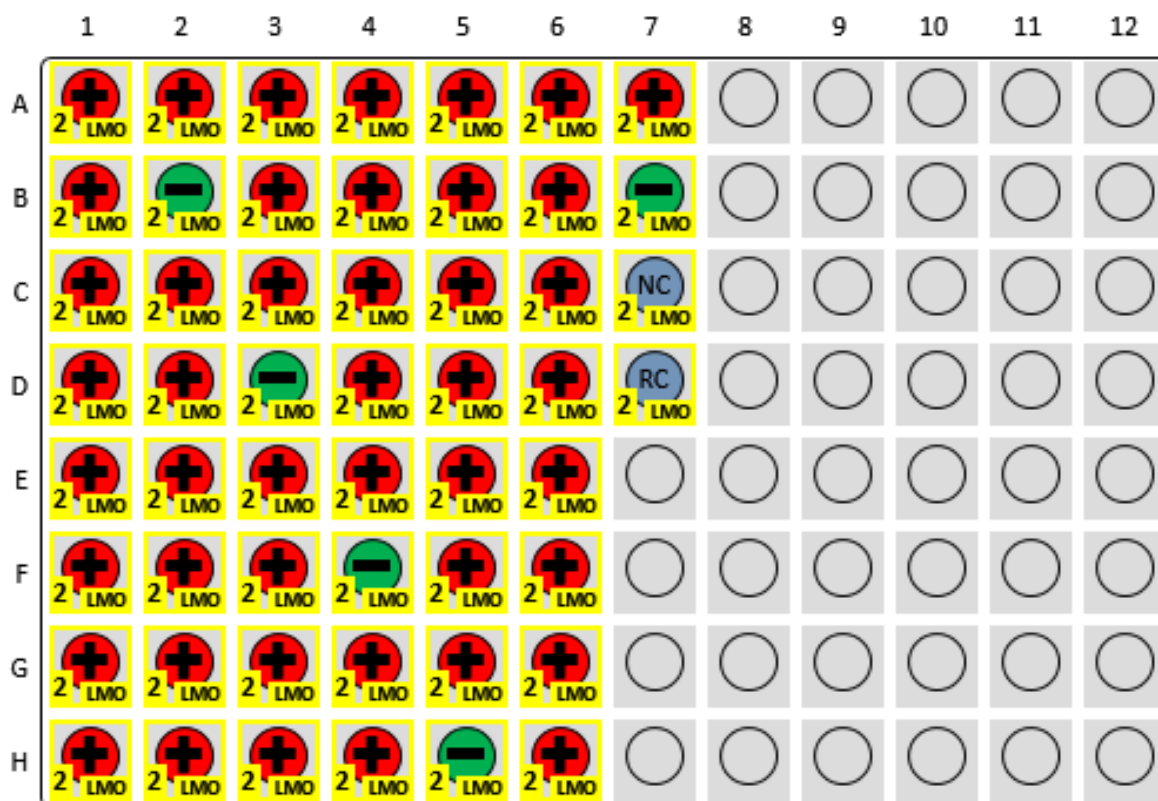
*Número de réplicas de matrices por cada dilución y el blanco control*

Matriz	Superior Dilución B 21 ufc/mL	Intermedio Dilución C 7.0 ufc/mL	Inferior Dilución D 2.3 ufc/mL	Blanco Sin inóculo
Hot dog	1	4	4	1
Jamonada de pollo	1	4	4	1
Jamón pizzero	1	4	4	1
Morcilla	1	4	4	1
Chorizo parrillero precocido	1	4	4	1

*Nota.* Esta tabla muestra las réplicas de las diluciones superior, intermedio, inferior y blanco, que de acuerdo a la norma ISO 16140-3 deben ser 1-4-4-1 respectivamente.

**Figura 9**

*Resultados del software de detección molecular para el ensayo del límite de detección*



*Nota.* En la figura se muestra el resultado del software de detección molecular para determinar el límite de detección estimado, presencia (+), ausencia (-), control negativo (NC) y reacción control.

**Tabla 9***Resultados del eLOD50 de la verificación de la implementación*

<b>Matriz</b>	<b>Superior Dilución B 21 ufc/mL</b>	<b>Intermedio Dilución C 7.0 ufc/mL</b>	<b>Inferior Dilución D 2.3 ufc/mL</b>	<b>Blanco Sin inóculo</b>	<b>eLOD50</b>
Hot dog	Presencia	Presencia	Presencia	Ausencia	
Hot dog		Presencia	Presencia		
Hot dog		Presencia	Presencia		
Hot dog		Presencia	Presencia		
Resultado	1/1	4/4	4/4	0/1	<2.3 UFC/25g

*Nota.* Esta tabla muestra la lectura del resultado de cada repetición en determinada dilución y

el blanco en la verificación de la implementación, también se muestra el valor del eLOD50

correspondiente a esa lectura de acuerdo a la norma ISO 16140-3.

**Tabla 10***Resultados del eLOD50 de la verificación de las matrices*

<b>Matriz</b>	<b>Superior Dilución B 21 ufc/mL</b>	<b>Intermedio Dilución C 7.0 ufc/mL</b>	<b>Inferior Dilución D 2.3 ufc/mL</b>	<b>Blanco Sin inóculo</b>	<b>eLOD50</b>
Jamonada de pollo	Presencia	Presencia	Presencia	Ausencia	
Jamonada de pollo		Presencia	Presencia		
Jamonada de pollo		Presencia	Presencia		
Jamonada de pollo		Presencia	Presencia		
Resultado	1/1	4/4	4/4	0/1	<2.3 UFC/25g
Jamón pizzero	Presencia	Presencia	Presencia	Ausencia	
Jamón pizzero		Presencia	Presencia		
Jamón pizzero		Presencia	Presencia		
Jamón pizzero		Presencia	Presencia		
Resultado	1/1	4/4	4/4	0/1	<2.3 UFC/25g
Morcilla	Presencia	Presencia	Presencia	Ausencia	
Morcilla		Presencia	Presencia		
Morcilla		Presencia	Presencia		
Morcilla		Presencia	Presencia		
Resultado	1/1	4/4	4/4	0/1	<2.3 UFC/25g
Chorizo parrillero	Presencia	Presencia	Presencia	Ausencia	
Chorizo parrillero		Presencia	Presencia		
Chorizo parrillero		Presencia	Presencia		
Chorizo parrillero		Presencia	Presencia		
Resultado	1/1	4/4	4/4	0/1	<2.3 UFC/25g

*Nota.* Esta tabla muestra la lectura del resultado de cada repetición en determinada dilución y

el blanco en la verificación de las matrices, también se muestra el valor del eLOD<sub>50</sub> correspondiente a esa lectura de acuerdo a la norma ISO 16140-3.

Las diluciones B, C y D se consideraron apropiadas porque 1 mL de la dilución D es el más cercano del LOD<sub>50</sub> del método (2.5 UFC/mL). En todas las matrices el nivel superior B detectó la muestra positiva, en el nivel intermedio C también se logró detectar las muestras positivas en las cuatro repeticiones y en el nivel inferior D también se alcanzó a detectar las cuatro muestras positivas, por último, los blancos control sin inóculo no amplificaron dando un resultado negativo. Las lecturas de los resultados de los niveles superior, intermedio, inferior y blanco, fueron de 1 – 4 – 4 – 0, estas lecturas en la tabla de determinación del eLOD<sub>50</sub> (Anexo B) correspondieron a  $< 1.0 \times$  Nivel de siembra inferior. Como el nivel de siembra inferior es 2.3, el resultado final del eLOD<sub>50</sub> es  $< 2.3$  UFC/25g.

### **III. APORTES MÁS DESTACABLES A LA EMPRESA**

- 3.1. Se generó los documentos de gestión requeridos por auditorías de clientes, entidades estatales como La Dirección General de Salud Ambiental (DIGESA) y de certificaciones como Global Food Safety Initiative (GFSI).
- 3.2. Se revisó los protocolos de trabajo y actualizaciones de métodos microbiológicos, físico químicos y sensoriales, enviando un informe a la jefatura de calidad.
- 3.3. Se elaboró y actualizó los formatos de control de calidad usados en el laboratorio.
- 3.4. Se reportó oportunamente los productos fiscalizados, evitando multas por incumplimiento.
- 3.5. Se cumplió con toda la programación anual de muestreos y análisis, entregando todos los informes de ensayo y estudios de vida útil dentro del tiempo estimado.
- 3.6. Se cumplió con la actualización semanal de la base de datos de conformidad de productos.
- 3.7. Se cumplió con los análisis solicitados por las fábricas asociadas al grupo Sigma dentro del plazo estimado.
- 3.8. Se brindó apoyo técnico a las áreas de marketing, producción y diseño, no tuvimos quejas por parte de otras áreas de la empresa hacia el laboratorio, el cliente interno para nosotros siempre fue muy importante y nos encargamos de entregar los documentos solicitados dentro del menor tiempo posible, promoviendo un buen clima laboral.
- 3.9. Se capacitó a todos los analistas del laboratorio en análisis microbiológicos, físico químicos y sensoriales.



#### IV. CONCLUSIONES

- 4.1. El método AOAC 2016.08, detección molecular de *Listeria monocytogenes* aplicado a la matriz embutidos con tratamiento térmico, presenta una sensibilidad 100%, especificidad 100%, falsos positivos 0%, falsos negativos 0%, exactitud relativa de 100% y límite de detección de 2.3 UFC/25g. Por lo cual el método es sensible, específico, preciso y exacto.
- 4.2. El método fue implementado hasta la obtención de resultados negativos o presuntivos, no se realiza la confirmación bioquímica porque ante un resultado presuntivo se activan los protocolos de seguridad de la empresa, procediendo a inmovilizar los productos afectados y enviar muestras de los productos a un laboratorio acreditado por el INACAL para su análisis y confirmación.
- 4.3. Se concluye que el laboratorio demostró que tiene la capacidad de ejecutar el método de ensayo de forma correcta y emitir informes de ensayo con resultados confiables.

## V. RECOMENDACIONES

- 5.1. Las recomendaciones son principalmente evitar contaminaciones cruzadas, se debe definir las áreas de procesamiento de muestras, análisis, incubación, amplificación y descarte de materiales.
- 5.2. Una vez finalizado el ensayo, se recomienda retirar la bandeja de carga rápida del equipo de detección molecular 3M y proceder a desechar los tubos remojándolos en una solución de lejía (5 %, v/v en agua; 6500 ppm) durante una hora y lejos del área de preparación del ensayo.
- 5.3. Para minimizar el riesgo de falsos positivos debido a la contaminación cruzada, se recomienda nunca abrir los tubos de reactivos usados porque contienen amplicones que podrían contaminar el área de análisis.

## VI. REFERENCIAS

- Ali, Z., Aman, R., Mahas, A., Rao, G. S., Tehseen, M., Marsic, T., Salunke, R., Subudhi, A. K., Hala, S. M., Hamdan, S. M., Pain, A., Alofi, F. S., Alsomali, A., Hashem, A. M., Khogeer, A., Almontashiri, N. A. M., Abedalthagafi, M., Hassan, N., & Mahfouz, M. M. (2020). iSCAN: An RT-LAMP-coupled CRISPR-Cas12 module for rapid, sensitive detection of SARS-CoV-2. *Virus research*, 288 (198129), pp. 2-4. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2020.198129>
- Bird, P., Flannery, J., Crowley, E., Agin, J., Goins, D., y Monteroso, L. (2017). Evaluation of the 3M™ Molecular Detection Assay (MDA) 2 - *Listeria monocytogenes* for the Detection of *Listeria monocytogenes* in a Variety of Foods and Select Environmental Surfaces: Collaborative Study, First Action 2016.08. *Journal of AOAC International*, 100(2), pp. 454–469. <https://doi.org/10.5740/jaoacint.16-0234>
- Braedt (20 de julio de 2022). Historia. <https://www.braedt.com.pe/>
- Camaró, M., Martínez, R., Olmos, P., Catalá, V., Ocete, M. y Gimeno, C. (2015). Validación y verificación analítica de métodos microbiológicos. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología*, 33(7), pp. 31-36. <https://doi.org/10.1016/j.eimc.2013.11.010>
- Covarrubias, C. (2021). *Estandarización y validación de la técnica de amplificación isotérmica de ADN mediado por asa para el diagnóstico precoz de la infección congénita por Trypanosoma cruzi*. [Tesis de pregrado, Universidad de Chile]. Repositorio Universidad de Chile. <https://repositorio.uchile.cl>
- Dirección General de Salud Ambiental [DIGESA]. (2008). *Norma sanitaria que establece los criterios microbiológicos de calidad sanitaria e inocuidad para los alimentos y bebidas de consumo humano. V01. NTS N° 071. DIGESA*.
- Escalante, O., Gavilán, R., García, M., Marcelo, A., Pacheco, E., Cabezas, C. y Yamazaki, W. (2019). Development and validation of loop-mediated isothermal amplification for the

detection of the Zika virus. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública*, 36(3), pp. 442-447. <https://dx.doi.org/10.17843/rpmesp.2019.363.3941>

Feldsine, P. T., Lienau, A. H., Leung, S. C., y Mui, L. A. (2002). Method extension study to validate applicability of AOAC Official Method 997.03 visual immunoprecipitate assay (VIP) for *Listeria monocytogenes* and related *Listeria* spp. from environmental surfaces: collaborative study. *Journal of AOAC International*, 85(2), pp. 470–478. <https://doi.org/10.1093/jaoac/85.2.470>

Hitchins, A., Jinneman, K. y Chen, Y. (22 de abril de 2022). BAM Chapter 10: Detection of *Listeria monocytogenes* in Foods and Environmental Samples, and Enumeration of *Listeria monocytogenes* in Foods. *FDA*. <https://www.fda.gov/food/laboratory-methods-food/bam-chapter-10-detection-listeria-monocytogenes-foods-and-environmental-samples-and-enumeration>

Instituto Nacional de Calidad [INACAL]. (2017). *Requisitos generales para la competencia de los laboratorios de ensayo y calibración. 3ra.* NTP ISO/IEC17025. INACAL.

International Organization for Standardization. (2017). *Microbiology of the food chain - Horizontal method for the detection and enumeration of Listeria monocytogenes and of Listeria spp.-Part 1: Detection method.* ISO 11290-1. <https://www.iso.org/standard/60313.html>

International Organization for Standardization. (2016a). *Microbiology of the food chain — Method validation — Part 1: Vocabulary.* ISO 16140-1. <https://www.iso.org/standard/54869.html>

International Organization for Standardization. (2016b). *Microbiology of the food chain — Method validation — Part 2: Protocol for the validation of alternative (proprietary) methods against a reference method.* ISO 16140-2. <https://www.iso.org/standard/54870.html>

- International Organization for Standardization. (2021). *Microbiology of the food chain — Method validation — Part 3: Protocol for the verification of reference methods and validated alternative methods in a single laboratory*. ISO 16140-3. <https://www.iso.org/standard/66324.html>
- Neogen (01 de julio de 2020). *3M. Product Instructions MDA2LMO96*. <https://www.neogen.com/49ee8e/globalassets/pim/assets/original/10050/3m-molecular-detection-assay-2-l-monocytogenes-update.pdf>
- Notomi, T., Okayama, H., Masubuchi, H., Yonekawa, T., Watanabe, K., Amino, N., Y Hase, T. (2000). Loop-mediated isothermal amplification of DNA. *Nucleic acids research*, 28(12), pp. 1-7. <https://doi.org/10.1093/nar/28.12.e63>
- Organismo Argentino de Acreditación [OAA]. (2013). *Guía para la validación de métodos microbiológicos*. GUI-LE-05. OAA. [https://www.academia.edu/23339061/OAA\\_Organismo\\_Argentino\\_de\\_Acreditaci%C3%B3n\\_GUIA\\_PARA\\_LA\\_VALIDACI%C3%93N\\_DE\\_M%C3%89TODOS\\_MICROBIOL%C3%93GICOS\\_GU%C3%8DA\\_PARA\\_LA\\_VALIDACI%C3%93N\\_DE\\_M%C3%89TODOS\\_MICROBIOL%C3%93GICOS](https://www.academia.edu/23339061/OAA_Organismo_Argentino_de_Acreditaci%C3%B3n_GUIA_PARA_LA_VALIDACI%C3%93N_DE_M%C3%89TODOS_MICROBIOL%C3%93GICOS_GU%C3%8DA_PARA_LA_VALIDACI%C3%93N_DE_M%C3%89TODOS_MICROBIOL%C3%93GICOS)
- Rodríguez-Auad, J. P. (2018). Panorama de la infección por *Listeria monocytogenes*. *Revista chilena de infectología*, 35(6), pp. 649-657. <https://doi.org/10.4067/S0716-10182018000600649>
- Silbernagel, K.M., Jechorek, R.P., Barbour, W.M., Mrozinski, P., Alejo, W., Aleo, V., Andaloro, B., Beacorn, F., Benzinger, J., Bogar, S., Brayman, C., Broom, J.W., Carson, M.O., Carver, C.N., Cheng, C.J., Centrella, B., Clayborn, J.J., Collins, C.M., Deibel, C., ...Woodruff, T. (2004). Evaluation of the BAX system for detection of *Listeria monocytogenes* in foods: collaborative study. *Journal of AOAC International*, 87 (2), pp. 395-410. <https://doi.org/10.1093/jaoac/87.2.395>

- Umar, A., Rochman, N., Wan, T., Ahmadu, S., Anas, M., Sani, A., y Atif, B. (2015) Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP), An Innovation in Gene Amplification: Bridging the Gap in Molecular Diagnostics; A Review. *Indian Journal of Science and Technology*, 8(17), pp. 3-5. <https://doi.org/10.17485/ijst/2015/v8i17/55767>
- Yushina, Y. M. (2019). Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) for rapid detection of *L. monocytogenes* in meat. *Potravinarstvo Slovak Journal of Food Sciences*, 13(1), pp. 800-805. <https://doi:10.5219/1165>

## VII. ANEXOS

### Anexo A: Composición y preparación de medios de cultivos

#### Suplemento caldo Fraser

La presentación es de 10 mL por vial, un vial se adiciona para 1 litro de caldo Demi Fraser. El suplemento está compuesto por citrato férrico de amonio 0.5 g/10 mL.

#### Preparación del caldo Demi Fraser

Suspenda 55 g del polvo en 1 L de agua purificada, mezcle bien y esterilice en autoclave a 121 °C durante 15 minutos, enfríe a temperatura ambiente, el pH final debe ser de  $7,2 \pm 0,2$  a 25 °C. En la tabla A1 se muestra la composición del caldo Demi Fraser.

#### Tabla A1

##### *Composición del caldo Demi Fraser*

<b>Fórmula Típica Caldo Base Demi-Fraser</b>	<b>(g/L)</b>
Cloruro de sodio	20 g
Fosfato de sodio, dibásico, anhidro	9.6 g
Extracto de carne	5.0 g
Digerido pancreático de caseína	5.0 g
Digerido péptico de tejido animal	5.0 g
Extracto de lavadura	5.0 g
Cloruro de litio	3.0 g
Fosfato de potasio monobásico	1.35 g
Esculina	1.0 g
Clorhidrato de acriflavina	0.0125 g
Ácido nalidíxico	0.01 g

*Nota.* En la tabla se muestra la composición del medio caldo base Demi Fraser. Adaptada de *Composición del caldo base demi fraser*, por 3M, 2022, *Ficha técnica*, 1. Todos los derechos reservados 3M 2022.

## Anexo B: Determinación del $eLOD_{50}$ del Protocolo 1

**Tabla B1**

*Determinación del  $eLOD_{50}$  del protocolo 1, según la norma ISO16140-3.*

High inoculation level targeted $9 \times LOD_{50}$ / test portion	Intermediate inoculation level targeted $3 \times LOD_{50}$ / test portion	Low inoculation level targeted $1 \times LOD_{50}$ / test portion	Blank level	$eLOD_{50}$  cfu/test portion
1/1	4/4	4/4	0/1	$< 1,0 \times LIL^a$
1/1	4/4	3/4	0/1	$= 0,5 \times LIL$
1/1	4/4	2/4	0/1	$= 0,7 \times LIL$
1/1	4/4	1/4	0/1	$= 1,0 \times LIL$
1/1	4/4	0/4	0/1	$= 1,5 \times LIL$
1/1	3/4	4/4	0/1	$= 0,7 \times LIL$
1/1	3/4	3/4	0/1	$= 1,0 \times LIL$
1/1	3/4	2/4	0/1	$= 1,3 \times LIL$
1/1	3/4	1/4	0/1	$= 1,7 \times LIL$
1/1	3/4	0/4	0/1	$= 2,3 \times LIL$
1/1	2/4	4/4	0/1	$= 1,1 \times LIL$
1/1	2/4	3/4	0/1	$= 1,5 \times LIL$
1/1	2/4	2/4	0/1	$= 1,9 \times LIL$
1/1	2/4	1/4	0/1	$= 2,6 \times LIL$
1/1	2/4	0/4	0/1	$= 3,7 \times LIL$
1/1	1/4	4/4	0/1	Unreliable MPN result <sup>b</sup>
1/1	1/4	3/4	0/1	$= 2,1 \times LIL$
1/1	1/4	2/4	0/1	$= 2,8 \times LIL$
1/1	1/4	1/4	0/1	$= 4,0 \times LIL$
1/1	1/4	0/4	0/1	$= 6,3 \times LIL$
1/1	0/4	4/4	0/1	Unreliable MPN result <sup>b</sup>
1/1	0/4	3/4	0/1	$= 3,0 \times LIL$
1/1	0/4	2/4	0/1	$= 4,3 \times LIL$
1/1	0/4	1/4	0/1	$= 6,7 \times LIL$
1/1	0/4	0/4	0/1	$= 14,0 \times LIL$

<sup>a</sup> LIL = low inoculation level.

<sup>b</sup> Unreliable MPN result: MPN combination is very unlikely to occur. The experiment shall be repeated.

*Nota.* En la tabla se muestran las combinaciones de lecturas de número más probable y su correspondiente valor  $eLOD_{50}$ . Tomado de “*Microbiología de la cadena alimentaria.*

*Validación de métodos. Parte 3: Protocolo para la verificación en un único laboratorio de métodos de referencia y de métodos alternativos validados*”, por ISO, 2021, *ISO16140-3, 1.*

(<https://www.iso.org/standard/66324.html>). Todos los derechos reservados ISO 2021.