

UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR  
FACULTAD DE QUÍMICA Y FARMACIA



VALIDACIÓN DEL MÉTODO MOLECULAR ASSURANCE GDS PARA LA  
DETECCIÓN DE *Listeria monocytogenes* EN LÁCTEOS PROCESADOS CONFORME A  
LA POLÍTICA DE VALIDACIÓN DE MÉTODOS MICROBIOLÓGICOS DEL  
ORGANISMO SALVADOREÑO DE ACREDITACIÓN.

TRABAJO DE GRADO EN MODALIDAD PRÁCTICA PROFESIONAL SUPERVISADA

PRESENTADO POR

MARÍA VANESSA OSORIO SOLÓRZANO

PARA OPTAR AL GRADO DE

LICENCIADA EN QUÍMICA Y FARMACIA

FEBRERO 2026

SAN SALVADOR, EL SALVADOR, CENTRO AMÉRICA.

**UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR**

**RECTOR**

MAESTRO JUAN ROSA QUINTANILLA

**SECRETARIO GENERAL**

LICENCIADO PEDRO ROSALÍO ESCOBAR CASTANEDA

**FACULTAD DE QUÍMICA Y FARMACIA**

**DECANA**

MsD. NANCY ZULEYMA GONZÁLEZ SOSA

**SECRETARIA**

LICDA. EUGENIA SORTO LEMUS

**DIRECCIÓN DE PROCESOS DE GRADO**

**DIRECTORA GENERAL**

LICENCIADA ANA LUISA CRUZ DE ALEGRÍA

**LABORATORIO DE INVESTIGACIÓN EN SALUD AMBIENTAL Y TOXICOLOGÍA  
DEL INSTITUTO NACIONAL DE SALUD**

LICENCIADA MARCELA VANEGAS DE SALAZAR

**TRIBUNAL EVALUADOR**

**ASESOR DE ÁREA EN INDUSTRIA FARMACÉUTICA, COSMÉTICOS,  
VETERINARIA Y PRODUCTOS AFINES**

MAESTRO ELISEO AYALA MEJÍA

**ASESOR**

LICENCIADO JULIO CÉSAR HENRÍQUEZ PÉREZ

**TUTORA INTERNA**

LICENCIADA CORINA IVETTE INTERIANO RAMÍREZ

## AGRADECIMIENTOS

Agradezco profundamente a Dios por brindarme la fortaleza, paciencia y sabiduría necesaria para culminar mi carrera, así como por bendecirme y acompañarme en cada etapa de mi vida.

A mis padres, José y Nery, por ser mi mayor inspiración y ejemplo de dedicación, compromiso y perseverancia. Expreso mi sincero agradecimiento por su amor, comprensión y su apoyo incondicional.

A mis hermanos, por su apoyo incondicional, sus palabras de ánimo y por acompañarme en cada etapa de mi vida.

A mis abuelos, José y Alicia, a quienes les tengo una profunda admiración y un inmenso cariño. Gracias por ser una presencia constante y significativa en mi vida, por sus enseñanzas, su ejemplo de fortaleza y por recordarme siempre que cada esfuerzo vale la pena.

Con especial amor y gratitud, extiendo un agradecimiento hasta el cielo a mis abuelos paternos, su memoria y los relatos que he recibido sobre ellos siguen siendo una inspiración que me impulsa a honrar su historia a través de mis logros.

A todo el personal de la Plataforma de Microbiología del Laboratorio de Investigación en Salud Ambiental y Toxicología del Instituto Nacional de Salud, especialmente a la Licda. Marcela Vanegas, Licda. Claudia Osorio y Tec. Jacqueline Duke, por su guía cercana, su paciencia, su compromiso y por brindarme un entorno de aprendizaje sólido, respetuoso y enriquecedor.

A mis docentes universitarios, quienes a lo largo de la carrera compartieron sus conocimientos y contribuyeron de manera significativa a mi formación profesional y personal.

A mis compañeros y amigos, por su apoyo, colaboración y compañía durante este camino que hoy culmina.

Finalmente, manifiesto mi agradecimiento a la Dirección de Procesos de Grado, Licda. Ana Luisa Cruz, a la Licda. Corina Interiano, tutora interna, a los asesores de área; por sus recomendaciones, su disposición y apoyo a lo largo de esta etapa.

## ÍNDICE GENERAL

Pág. N°

### ABREVIATURAS

### GLOSARIO

### RESUMEN

### CAPÍTULO I

#### 1.0 INTRODUCCIÓN 18

### CAPÍTULO II

#### 2.0 OBJETIVOS 20

### CAPÍTULO III

#### 3.0 MARCO TEÓRICO 22

##### 3.1. Características generales de *Listeria monocytogenes* 22

##### 3.2. Presencia de *Listeria monocytogenes* en entornos alimentarios y de producción alimentaria 23

##### 3.2.1. Contaminación por *Listeria monocytogenes* en la cadena láctea 24

##### 3.2.2. Factores que favorecen el crecimiento de *Listeria monocytogenes* 25

##### 3.2.3. Importancia del control microbiológico en la industria alimentaria 26

##### 3.3. Método tradicional de aislamiento, detección e identificación de *Listeria monocytogenes* en alimentos 27

##### 3.3.1. Ventajas y limitaciones de los métodos tradicionales para la detección de *Listeria monocytogenes* 29

##### 3.4. Metodologías de detección genética 30

##### 3.4.1. Principio de funcionamiento (PCR en tiempo real) 30

##### 3.4.2. Método Assurance GDS: Funcionamiento y características 31

##### 3.4.3. Ventajas y limitaciones de los métodos moleculares frente a los métodos tradicionales 32

##### 3.5. Fundamentos de la validación de métodos microbiológicos según la Política del Organismo Salvadoreño de Acreditación 33

##### 3.5.1. Procedimiento de validación 33

##### 3.5.2. Definición sobre método de ensayo 34

##### 3.5.3. Parámetros de desempeño de métodos cualitativos 34

##### 3.5.4. Aseguramiento de la calidad de los resultados de ensayo 35

3.6. Importancia de la validación para el aseguramiento de la calidad y seguridad alimentaria	35
<b>CAPÍTULO IV</b>	
<b>4.0 PRODUCTO FINAL</b>	38
4.1. Protocolo de la metodología para el aislamiento, detección e identificación de <i>Listeria monocytogenes</i> en alimentos, mediante método Screening Assurance GDS (Sistema de Detección Genética)	38
4.2. Informe de validación de la metodología para el aislamiento, detección e identificación de <i>Listeria monocytogenes</i> en alimentos, mediante método Screening Assurance GDS (Sistema de Detección Genética)	45
<b>CAPÍTULO V</b>	
<b>5.0 CONCLUSIONES</b>	87
<b>CAPÍTULO VI</b>	
<b>6.0 RECOMENDACIONES</b>	89
<b>REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS</b>	
<b>ANEXOS</b>	

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla N°</b>		<b>Pág. N°</b>
1	Parámetros y Criterios de Aceptación de Política para la Validación y Estimación de la Incertidumbre de Métodos Microbiológicos Cualitativos. <sup>1</sup>	39
2	Parámetros y Cálculos de Política para la Validación y Estimación de la Incertidumbre de Métodos Microbiológicos Cualitativos.	44
3	Identificación de riesgos.	44
4	Volúmenes usados para determinación de inóculos teóricos en prueba preliminar. Matriz Queso Crema.	52
5	Peso de muestra por nivel de inóculo en prueba preliminar. Matriz Queso Crema.	52
6	Recuento para la estimación de tamaño del inóculo de microorganismo diana <i>Listeria monocytogenes</i> en prueba preliminar. Matriz Queso Crema.	53
7	Determinación de inóculo real en prueba preliminar. Matriz Queso Crema.	53
8	Comparación de inóculos teóricos y reales en prueba preliminar. Matriz Queso Crema.	54
9	Recuento para la estimación de tamaño del inóculo de microorganismo no diana <i>Escherichia coli</i> en prueba preliminar. Matriz Queso Crema.	55

10	Volúmenes usados para determinación de inóculos teóricos en prueba preliminar. Matriz Queso Procesado Americano.	56
11	Peso de muestra por nivel de inóculo en prueba preliminar. Matriz Queso Procesado Americano.	56
12	Recuento para la estimación de tamaño del inóculo de microorganismo diana <i>Listeria monocytogenes</i> en prueba preliminar. Matriz Queso Procesado Americano.	57
13	Determinación de inóculo real en prueba preliminar. Matriz Queso Procesado Americano.	57
14	Comparación de inóculos teóricos y reales en prueba preliminar. Matriz Queso Procesado Americano.	58
15	Recuento para la estimación de tamaño del inóculo de microorganismo no diana <i>Escherichia coli</i> en prueba preliminar. Matriz Queso Procesado Americano.	58
16	Determinación de la concentración de prueba durante las evaluaciones preliminares.	59
17	Control de blancos por matriz en pruebas preliminares.	60
18	Recuentos para la determinación del límite de detección de <i>Listeria monocytogenes</i> . Matriz Queso Crema.	62
19	Inóculo teórico durante la validación. Matriz Queso Crema.	62

20	Inóculo real durante la validación. Matriz Queso Crema.	62
21	Recuentos para la determinación del tamaño de inóculo de <i>Escherichia coli</i> . Matriz Queso Crema.	63
22	Recuentos para la determinación del límite de detección de <i>Listeria monocytogenes</i> . Matriz Queso Procesado Americano.	64
23	Inóculo teórico durante la validación. Matriz Queso Procesado Americano.	65
24	Inóculo real durante la validación. Matriz Queso Procesado Americano.	65
25	Recuentos para la determinación del tamaño de inóculo de <i>Escherichia coli</i> . Matriz Queso Procesado Americano.	66
26	Recuentos para la determinación del límite de detección de <i>Listeria monocytogenes</i> . Matriz Queso Crema.	67
27	Inóculo teórico durante la validación. Matriz Queso Crema.	67
28	Inóculo real durante la validación. Matriz Queso Crema.	68
29	Recuentos para la determinación del tamaño de inóculo de <i>Escherichia coli</i> . Matriz Queso Crema.	68
30	Verificación de la muestra. Matriz Queso Crema.	69
31	Verificación del límite de detección. Matriz Queso Crema.	70

32	Resumen de resultados de verificación del límite de detección. Matriz Queso Crema.	71
33	Falsos positivos. Matriz Queso Crema.	71
34	Recuentos para la determinación del límite de detección de <i>Listeria monocytogenes</i> . Matriz Queso Procesado Americano.	73
35	Inóculo teórico durante la validación. Matriz Queso Procesado Americano.	73
36	Inóculo real durante la validación. Matriz Queso Procesado Americano.	73
37	Recuentos para la determinación del tamaño de inóculo de <i>Escherichia coli</i> . Matriz Queso Procesado Americano.	74
38	Verificación de la muestra. Matriz Queso Procesado Americano.	75
39	Verificación del límite de detección. Matriz Queso Procesado Americano.	75
40	Resumen de resultados de verificación del límite de detección. Matriz Queso Procesado Americano.	77
41	Falsos positivos. Matriz Queso Procesado Americano.	77
42	Resumen de los parámetros de desempeño para ambas matrices.	79
43	Resultados de siembra en agares selectivos.	80

44	Resultados de tinción de gram y catalasa para ambas matrices.	82
45	Resultados de oxidasa y movilidad para ambas matrices.	83
46	Identificación API <i>Listeria</i> .	84

## ÍNDICE DE ANEXOS

### Anexo N°

- 1 Esquema de preparación del inóculo de *Listeria monocytogenes* (microorganismo diana) y *Escherichia coli* (Microorganismo no diana). Matriz Queso Crema.
- 2 Esquema de fortificación de muestra de *Listeria monocytogenes* (microorganismo diana) y *Escherichia coli* (Microorganismo no diana). Matriz Queso Crema.
- 3 Esquema de preparación del inóculo de *Listeria monocytogenes* (microorganismo diana) y *Escherichia coli* (Microorganismo no diana). Matriz Queso Procesado Americano.
- 4 Esquema de fortificación de muestra de *Listeria monocytogenes* (microorganismo diana) y *Escherichia coli* (Microorganismo no diana). Matriz Queso Procesado Americano.
- 5 Reporte de estandarización de cepa control positivo *Listeria monocytogenes* y control negativo *Escherichia coli* durante la prueba de inóculo. Matriz Queso Crema.
- 6 Reporte de estandarización de cepa control positivo *Listeria monocytogenes* y control negativo *Escherichia coli* durante la validación. Matriz Queso Crema.
- 7 Reporte de estandarización de cepa control positivo *Listeria monocytogenes* y control negativo *Escherichia coli* durante la prueba de inóculo. Matriz Queso Procesado Americano.
- 8 Reporte de estandarización de cepa control positivo *Listeria monocytogenes* y control negativo *Escherichia coli* durante la validación. Matriz Queso Procesado Americano.

- 9 Reporte de resultados del equipo de detección genética. Matriz Queso Crema.
- 10 Reporte de resultados del equipo de detección genética. Matriz Queso Procesado Americano.
- 11 Reporte de resultados de API *Listeria* en muestra y control positivo. Matriz Queso Crema.
- 12 Reporte de resultados de API *Listeria* en muestra y control positivo. Matriz Queso Procesado Americano.
- 13 Implementación y verificación de la metodología para aislamiento, detección e identificación de *Listeria monocytogenes* mediante PCR en matrices de lácteos procesados.

## ABREVIATURAS

**GDS:** Sistema de Detección Genética

**BAM:** Manual Analítico Bacteriológico

**OSA:** Organismo Salvadoreño de Acreditación

**FDA:** Administración de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos

**LEB:** Caldo de enriquecimiento para *Listeria*

**APC:** Agar Plate Count

**OXA:** Agar Oxford

**PAL:** Agar Palcam

**TSAYe:** Agar Triptona de Soya y Extracto de Levadura

**PCR:** Reacción en cadena de la polimerasa

**PCR-RT:** Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real

**IMS:** Separación Inmunomagnética

**UFC:** Unidades formadoras de colonias

## GLOSARIO

**Validación:** Confirmación mediante el suministro de evidencia objetiva de que se han cumplido los requisitos para una utilización o aplicación específica prevista. (1)

**Método de referencia:** Método internacionalmente reconocido y ampliamente aceptado. Por ejemplo, NMKL, ISO, CEN, métodos de AOAC Internacional, métodos que se indican en la Unión Europea, en las legislaciones nacionales y ciertas normas nacionales de calidad equivalente. (1)

**Método alternativo:** Método de análisis que demuestra o estima, para una dada categoría de productos, el mismo analito que se mide utilizando el correspondiente método de referencia. (1)

**Sistema de Detección Genética (Assurance GDS):** Es un sistema automatizado de amplificación de ácido nucleico para la detección de organismos patógenos en alimentos, ingredientes y muestras ambientales. (2)

**Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (PCR-RT):** Es una técnica avanzada de biología molecular que permite la amplificación y cuantificación de secuencias específicas de ADN de manera simultánea. (3)

## RESUMEN

En el presente trabajo se desarrolló la validación de la metodología para aislamiento, detección e identificación de *Listeria monocytogenes* mediante método screening Assurance en lácteos procesados, con el propósito de migrar de un método tradicional a un método molecular que permitiera disponer de una alternativa más eficiente. Se abordó la necesidad de contar con procedimientos analíticos más rápidos, sensibles y confiables para el control microbiológico de productos lácteos.

El estudio tuvo como finalidad demostrar el desempeño del método molecular Assurance y asegurar que fuera apropiado para su aplicación en matrices lácteas. Para ello, se establecieron objetivos orientados al diseño del protocolo de validación, la evaluación de los parámetros de desempeño establecidos por la política para validación y estimación de la incertidumbre de métodos microbiológicos del Organismo Salvadoreño de Acreditación, y la elaboración de un informe de validación que recopiló los resultados obtenidos.

La metodología desarrollada incluyó la preparación y estandarización de cultivos de referencia, la fortificación de muestras con microorganismos diana y no diana, la verificación del tamaño del inóculo, la determinación del límite de detección, el análisis de interferencias y la confirmación mediante técnicas tradicionales. Todas estas actividades fueron ejecutadas siguiendo los lineamientos establecidos por la guía de validación del Organismo Salvadoreño de Acreditación.

Los resultados demostraron que la técnica presentó una alta capacidad de detección, disminuyó el tiempo total de análisis y mantuvo la confiabilidad necesaria para su aplicación en laboratorios dedicados al control de alimentos.

Se concluyó que el método validado fue adecuado para su propósito, evidenció precisión y estabilidad en los resultados y representó una alternativa eficiente frente a la metodología tradicional.

## **CAPÍTULO I**

## 1.0 INTRODUCCIÓN

La validación de un método microbiológico es un proceso fundamental para garantizar que el método utilizado sea apropiado para su propósito, proporcionando resultados confiables, precisos y reproducibles.

La presente investigación es realizada como parte del programa de Prácticas Profesionales Supervisadas, en el contexto de trabajo de grado, y está orientada a la validación de la metodología para aislamiento, detección e identificación de *Listeria monocytogenes* mediante el método screening Assurance (Sistema de Detección Genética) en lácteos procesados. La Práctica Profesional Supervisada fue realizada en la Plataforma de Microbiología del Laboratorio de Investigación en Salud Ambiental y Toxicología en el periodo de abril a noviembre de 2025, en un tiempo total de 960 horas donde se recibió la formación adecuada para realizar las actividades asignadas.

El desarrollo de la presente metodología de validación se realiza con el fin de migrar de un método tradicional, generalmente más lento y laborioso, hacia un método molecular más rápido, específico y sensible, con el propósito de disponer de una herramienta alternativa que fortalezca la precisión y confiabilidad de los resultados analíticos. De esta manera, se da respuesta a las necesidades actuales de los laboratorios analíticos, los cuales requieren tiempo de respuesta más eficientes sin comprometer la calidad, validez y confiabilidad de los resultados.

Para realizar la validación, se tomó como referencia la guía G9.4 del Organismo Salvadoreño de Acreditación, aplicable a métodos microbiológicos. Se elaboró un protocolo de validación, y posteriormente se desarrolló el proceso de validación, evaluando los parámetros de desempeño establecidos. Una vez recopilada la información, se procedió al análisis e interpretación de los resultados, culminando con la elaboración del informe de validación, en el cual se determinó que el método cumple con los criterios requeridos y es adecuado para el propósito previsto.

## **CAPÍTULO II**

## 2.0 OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo General

Validar el método molecular Assurance GDS para la detección de *Listeria monocytogenes* en lácteos procesados, conforme a la política de validación de métodos microbiológicos del Organismo Salvadoreño de Acreditación.

### 2.2 Objetivos Específicos

2.2.1 Diseñar un protocolo de validación que sirva como guía técnica estandarizada para la evaluación del método Assurance GDS aplicado a productos lácteos procesados.

2.2.2 Evaluar los parámetros de desempeño del método Assurance GDS para el aislamiento, detección e identificación de *Listeria monocytogenes* en lácteos procesados, según lo establecido en el protocolo de validación.

2.2.3 Elaborar un informe de validación que reúna la evidencia experimental del desempeño del método Assurance GDS en lácteos procesados.

## **CAPÍTULO III**

### 3.0 MARCO TEÓRICO

#### 3.1. Características generales de *Listeria monocytogenes*

*Listeria monocytogenes* es un bacilo grampositivo, catalasa positiva y anaerobio facultativo. Morfológicamente, se presenta como un bacilo corto que puede estar solo o formando cadenas cortas, no formador de esporas, que mide aproximadamente de 0.5 a 2  $\mu\text{m}$  de largo y 0.5  $\mu\text{m}$  de diámetro. Es móvil, a temperatura ambiente (20-25 °C) debido a la presencia de flagelos peritricos, pero pierde esta motilidad a 37 °C. (4)

En cuanto a su patogenicidad es un microorganismo intracelular capaz de invadir y replicarse dentro de las células del huésped, como macrófagos y células epiteliales. Para su movilidad intracelular utiliza la polimerización de actina, mecanismo que le permite desplazarse y propagarse directamente hacia células adyacentes sin exponerse al sistema inmune. (5)

##### - Epidemiología del microorganismo

*Listeria monocytogenes* es el agente causal de la enfermedad conocida como listeriosis. La listeriosis es una infección infrecuente pero potencialmente grave, la principal vía de transmisión es por el consumo de alimentos contaminados. Afecta generalmente a personas mayores, mujeres embarazadas e inmunocomprometidos (incluyendo neonatos), aunque también se describen casos en adultos y niños inmunocompetentes. A diferencia de otras infecciones asociadas al consumo de alimentos, la listeriosis presenta una elevada tasa de mortalidad (20-30%).

En adultos sanos, las infecciones causadas por *Listeria monocytogenes* suelen ser asintomáticas o manifestarse, en la mayoría de los casos, con síntomas leves similares a los de la gripe; con menor frecuencia pueden presentarse diarrea y dolor abdominal.

Sin embargo, en personas inmunocomprometidas (como aquellas con cáncer, diabetes o adultos mayores) la infección puede evolucionar a cuadros graves, provocando la presencia de bacterias en el torrente sanguíneo (bacteriemia) y afecciones del sistema nervioso central, tales como meningitis y encefalitis.

Las mujeres embarazadas pueden desarrollar el cuadro de forma asintomática, con síntomas leves, sin fiebre, que son inespecíficos (malestar general, cefalea, síntomas digestivos y dorsalgia) o pueden presentar un cuadro febril con o sin síntomas gastrointestinales.

El tiempo promedio de incubación de la listeriosis es de 3 semanas, con un rango que puede ir de 3 a 70 días, aunque esto dependerá de las características del paciente. Por ejemplo, el período de incubación para enfermedad invasora es mayor en mujeres embarazadas (2 a 4 semanas) que en no embarazadas (1 a 14 días). El período de incubación para cuadros de gastroenteritis febriles autolimitadas seguida de la ingesta de grandes inóculos es de 24 horas, durando la enfermedad en estos casos 2 a 3 días. (6)

La gravedad de la listeriosis en humanos depende de la virulencia de la cepa bacteriana. Otros factores claves son la dosis de bacterias ingeridas, la diversidad del trasfondo genético de una población, la salud general y el estado inmunitario del huésped, y cualquier atributo del alimento que altere el estado microbiano o del huésped. Hasta la fecha, no existen datos epidemiológicos concluyentes que establezcan el nivel de contaminación involucrado en la mayoría de los casos de brotes de listeriosis alimentaria. No obstante, se ha estimado que las dosis infecciosas de *Listeria monocytogenes* son de  $10^7$  a  $10^9$  unidades formadoras de colonias (UFC) en hospedadores sanos, y solo  $10^5$  a  $10^7$  UFC en individuos de alto riesgo.

Este microorganismo es ubicuo, se asocia con una gran variedad de alimentos crudos, contaminados de origen o durante su obtención y/o procesamiento.

Entre los brotes y casos esporádicos de listeriosis atribuidos a productos lácteos están:

- En 1985 en Estados Unidos, el consumo de un queso tipo mexicano fue implicado en 100 casos de listeriosis donde murieron 40 personas. La contaminación ocurrió post pasteurización o una mezcla de leche cruda y pasteurizada utilizada en su elaboración
- En 1987 en Reino Unido, una mujer embarazada inmunocomprometida, contrajo listeriosis clínica, atribuido al consumo de un queso blando.
- En 1966 en Alemania, 279 casos de abortos en mujeres embarazadas, asociado al consumo de leche pasteurizada y productos lácteos
- En 1995 en Suiza, 57 casos, asociados al consumo de queso blando (7)

### **3.2. Presencia de *Listeria monocytogenes* en entornos alimentarios y de producción alimentaria**

*Listeria monocytogenes*, es una bacteria con un impacto importante en la seguridad alimentaria y la salud pública. Es capaz de sobrevivir e incluso crecer en un rango de temperatura que va de  $-0.4$  °C a  $45$  °C, un amplio rango de pH de 4.6 a 9.5, a una actividad hídrica relativamente baja ( $w < 0.90$ ), y tolera un contenido de sal de hasta un 20%. También es resistente a la luz

ultravioleta, biocidas y metales pesados, y forma estructuras de biofilms en diversas superficies en entornos de producción alimentaria. Estas características dificultan su eliminación y permiten que persista durante mucho tiempo, aumentando el riesgo de contaminación de las instalaciones de producción de alimentos, y en última instancia, de los alimentos.

Varias investigaciones han demostrado que *Listeria monocytogenes* está ampliamente distribuida en entornos de procesamiento de alimentos, donde puede persistir durante mucho tiempo debido a una limpieza y sanidad ineficientes. Muchas cepas sobreviven en diferentes condiciones de procesamiento de alimentos, que a menudo se caracterizan por una baja humedad o contenido de oxígeno, convirtiéndose así en una fuente principal de contaminación posterior al procesamiento. La persistencia de tales cepas puede deberse a varios factores externos como malas prácticas de higiene o desinfectantes ineficaces, pero también por la presencia de genes específicos en algunas cepas de *Listeria monocytogenes* responsables de la producción de biofilms. (8)

Para controlar la transmisión de *Listeria monocytogenes* a través de los alimentos, los organismos reguladores han obligado a las industrias alimentarias a desarrollar programas de análisis de peligro en puntos críticos de control y han regulado estrictamente la contaminación de los alimentos por *Listeria monocytogenes*. La gravedad de la enfermedad, la incertidumbre asociada a la dosis infecciosa mínima y las diferencias de virulencia entre las cepas, llevarían a recomendar que los miembros de estos grupos de alto riesgo (personas inmunodeprimidas, ancianos y mujeres embarazadas) eviten el consumo de alimentos con alta probabilidad de contener altas cantidades de *Listeria monocytogenes*. Para el resto de la población, es aconsejable manipular con cuidado los alimentos de alto riesgo y almacenarlos a bajas temperaturas solo durante períodos cortos. (5)

### **3.2.1. Contaminación por *Listeria monocytogenes* en la cadena láctea**

- Leche cruda: La leche no pasteurizada puede contener *Listeria* directamente de la ubre de la vaca o por contaminación durante el ordeño y almacenamiento en la granja.
- Plantas de procesamiento: Después de la pasteurización, la contaminación puede ocurrir por manipulación inadecuada o por contacto con superficies, equipos, utensilios, desagües y pisos contaminados, especialmente en áreas húmedas donde la bacteria puede persistir. (9)

### 3.2.2. Factores que favorecen el crecimiento de *Listeria monocytogenes*

*Listeria monocytogenes* es un patógeno resistente que puede prosperar bajo condiciones que inhibirían a muchas bacterias. Entre estos factores están: (10)

#### - Amplio rango de temperatura

Es un organismo psicrótrofo, lo que significa que puede crecer incluso a temperaturas de refrigeración (tan bajas como 1 °C o -1.5 °C), lo que representa un riesgo significativo para los productos lácteos almacenados en frío. Esta bacteria posee la capacidad de desarrollarse dentro de un amplio intervalo térmico (-0.4 °C a 45 °C). A temperaturas bajas, puede sobrevivir sin cambios significativos en su población incluso bajo congelación, debido a mecanismos como la disminución del metabolismo, modificaciones en la composición de la membrana celular, expresión de proteínas de choque frío y la captación de compuestos crioprotectores. Por otro lado, a temperaturas altas, presenta una resistencia natural a valores superiores a 45 °C, por lo que su inactivación requiere tratamientos térmicos entre 55 °C por 10 minutos y 65 °C por 12 segundos. La resistencia al calor puede variar según factores como la edad celular, condiciones de estrés previas, composición del alimento y el serotipo, siendo las células en fase estacionaria generalmente más resistentes al estrés térmico que las de fase logarítmica.

#### - Formación de biopelículas

*Listeria monocytogenes* tiene la capacidad de adherirse a diversas superficies comunes en la industria alimentaria, como acero inoxidable, poliestireno y vidrio, formando biopelículas que la protegen de los procedimientos normales de limpieza y desinfección y favorecen la contaminación cruzada continua.

Estas biopelículas consisten en células bacterianas inmersas en una matriz extracelular compuesta por ADN, proteínas y polisacáridos. Su formación depende de factores como la temperatura, el tipo de superficie, la cepa bacteriana y el medio de cultivo. Se ha demostrado que la bacteria puede formar biopelículas tanto a bajas como a altas temperaturas, con variaciones según la superficie, y que la adaptación al frío puede incrementar su capacidad de adhesión y formación de biopelículas.

#### - Rangos de pH y salinidad

*Listeria monocytogenes* puede crecer en un amplio rango de pH, entre 4.0 y 9.5, y tolerar concentraciones de sal de hasta un 10%, lo que le permite sobrevivir en ambientes que suelen

considerarse seguros frente a otros microorganismos. En condiciones de pH bajo, como en alimentos acidificados por fermentación o conservación (lácteos, carnes y vegetales) o en el tracto gastrointestinal, la bacteria puede sobrevivir incluso cuando el medio ha sido acidificado artificialmente, aunque la elevada concentración de protones limite su crecimiento.

No obstante, la exposición a la acidez no solo favorece su supervivencia, sino que también incrementa su virulencia y su resistencia frente a otros factores ambientales. Por otro lado, en la industria alimentaria *Listeria monocytogenes* también se enfrenta a estrés alcalino generado por detergentes y desinfectantes, ante el cual ha desarrollado mecanismos que le permiten tolerar pH altos y, como consecuencia, adquirir mayor resistencia a factores de estrés más severos, como el calor, el etanol o los procesos de limpieza. Esta capacidad de adaptación contribuye a su persistencia en superficies, equipos y ambientes de procesamiento donde se emplean productos de limpieza alcalinos.

- Larga vida útil

Los productos lácteos frescos o listos para el consumo con una vida útil prolongada bajo refrigeración ofrecen tiempo suficiente para que *Listeria monocytogenes* aproveche su capacidad única de crecer en frío, convirtiendo una contaminación inicial menor en un riesgo significativo para la salud pública.

### **3.2.3. Importancia del control microbiológico en la industria alimentaria**

El control microbiológico es fundamental para garantizar la inocuidad de los productos lácteos y proteger la salud pública. Entre los aspectos importantes están: <sup>(11)</sup>

- Prevención de enfermedades transmitidas por alimentos:

Estas enfermedades son causadas por microorganismos patógenos presentes, en ocasiones, de forma natural en los alimentos. Detectar su presencia es crucial para prevenir la contaminación y la propagación de enfermedades.

- Garantizar la calidad y frescura de los alimentos

Controlar cada fase de producción permite la identificación de los microorganismos que pueden causar la descomposición de los alimentos y reducir su vida útil. Un programa de muestreo ambiental riguroso en las plantas de procesamiento permite detectar la presencia de la bacteria en superficies y equipos antes de que llegue a los productos finales, facilitando acciones correctivas rápidas

- Cumplimiento normativo y confianza del consumidor

El control continuo asegura que los productos cumplan con los criterios microbiológicos establecidos por las autoridades sanitarias, manteniendo la confianza del consumidor y evitando costosas retiradas de productos.

### **3.3. Método tradicional de aislamiento, detección e identificación de *Listeria monocytogenes* en alimentos**

A continuación, se describe la manera en la que se realizará la confirmación de la detección de *Listeria monocytogenes* con base en el Manual Analítico Bacteriológico (BAM) de la Administración de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos (FDA, por sus siglas en inglés) <sup>(12)</sup>

Tanto en la metodología estándar y las metodologías rápidas alternativas el aislamiento, detección e identificación de *Listeria monocytogenes* en alimentos, el tamaño de la muestra analítica para alimentos es generalmente de 25 g, en forma individual o compuesta de alimentos.

- Proceso de enriquecimiento:

Se incuba la muestra homogenizada en una concentración de 1 en 10, 25 g de muestra representativa en 225 mL de caldo de enriquecimiento para *Listeria* (LEB) por un tiempo de incubación de 24 a 48 horas a 30°C.

- Procedimiento de aislamiento:

Después de pasado el tiempo de incubación, se siembra del caldo LEB a un agar selectivo basado en esculina y agares cromogénicos, se incuba por 48 horas, se evalúan las placas después de 24 horas de incubación. Por ejemplo: Agar Oxford y Agar Palcam

Agar Oxford (OXA): después de 24 horas de incubación a 35°C, colonias típicas de especies de *Listeria* tienen aproximadamente 1 mm de diámetro, colonias de color gris a negro rodeadas por un halo negro. Después de 48 horas de incubación, las colonias típicas de especies de *Listeria* tienen aproximadamente 2-3 mm de diámetro, son negras con un halo negro y el centro hundido.

Agar Palcam (PAL): colonias de grises a verdes rodeadas de halos de color marrón oscuro a negro en el medio.

Agar cromogénico (Agar R&F): medio cromogénico en placa a 35 °C para *Listeria monocytogenes* y *L. ivanovii*, producen colonias de 1-3 mm de diámetro, suave y convexa, azul/verde y un pequeño halo azul/verde. Todas las demás especies de *Listeria* producen una colonia blanca, lisa. Convexa y sin halo de 1-2 mm.

- Procedimiento de identificación:

Seleccionar una colonia típica de agar a base de esculina y estriar en Agar Triptona de Soya y Extracto de Levadura (TSAye) para purificar; incubar a 30°C de 24 a 48 horas, después del tiempo de incubación se buscan colonias blancas, convexas lisas típicas de 1-2 mm de diámetro.

Pruebas de identificación:

- Hemolisis:

En agar sangre de carnero 5% en placas que se hayan vertido espesamente y secado bien (comprobar la humedad antes de usar), inocular abundantemente del cultivo en TSAye. Dibuje una cuadrícula de 20 a 25 espacios en el fondo de la placa. Punzar el medio de cultivo por cuadrícula, punzar el control positivo de *Listeria monocytogenes*, intente punzar lo más cerca del fondo posible de la capa de agar, sin tocarlo pues podría romper el medio. Incubar de 24 a 48 horas a 35°C Examinar las placas de agar sangre que contienen muestras de cultivo brillantemente iluminadas desde atrás de la placa *Listeria monocytogenes* produce una zona ligeramente despejada alrededor de la punción.

- Movilidad:

En un tubo para la prueba de movilidad (código M103 en el BAM), inocular por punción una colonia aislada proveniente de TSAye. Incubar a temperatura ambiente (20°C – 22°C), observar diariamente hasta que el patrón de crecimiento aislado sea evidente. *Listeria* es móvil, dando un típico patrón de crecimiento similar a un paraguas.

- Catalasa:

Probar con colonias típicas provenientes de TSAye para catalasa, colocando el crecimiento en una gota de peróxido de hidrógeno al 3%. Las especies de *Listeria* son catalasa positiva, produciendo burbujas.

- Fermentación de carbohidratos:

En tubos con campana de Durham que contengan un indicador de color púrpura (usualmente púrpura de bromocresol) y soluciones al 0.5% (p/v) de los carbohidratos Ramnosa, Manitol y Xilosa. Inocular una colonia típica proveniente de TSAye, incubar 7 días a 35°C.

Las reacciones positivas están indicadas por la producción de ácido y el medio se tornará de color amarillo sin producción de gas.

- Tinción de Gram:

Usar el crecimiento de 16 a 24 horas a partir de placas. Todas las *Listerias* son bacilos gram positivos cortos. (12)

### 3.3.1. Ventajas y limitaciones de los métodos tradicionales para la detección de *Listeria monocytogenes* (13,14)

Ventajas:

- Alta especificidad: El aislamiento en medios selectivos, seguido de la identificación bioquímica y morfológica, permite confirmar la presencia de *Listeria monocytogenes* mediante la observación directa del microorganismo. Esto reduce la probabilidad de falsos positivos y lo convierte en el método estándar para confirmar resultados presuntivos. Además, ofrecen la ventaja de permitir la obtención de cultivos puros, necesarios para pruebas posteriores como serotipificación, estudios de virulencia o análisis epidemiológicos.
- Aplicabilidad y costo: Los métodos tradicionales requieren equipamiento básico disponible en la mayoría de los laboratorios microbiológicos, lo que los hace ampliamente accesibles. Su costo suele ser menor que el de métodos moleculares o automatizados, lo que representa una ventaja para laboratorios con recursos limitados. Además, estos procedimientos cuentan con protocolos estandarizados internacionalmente, lo cual garantiza reproducibilidad y comparabilidad entre laboratorios.

Limitaciones

- Tiempo de respuesta: El proceso completo puede tomar entre 5 y 7 días, incluyendo enriquecimientos, siembra en medios selectivos y pruebas bioquímicas confirmatorias. Esta duración dificulta su aplicación en situaciones donde se necesita una respuesta rápida.
- Sensibilidad variable: Cuando *Listeria monocytogenes* se encuentra en bajas concentraciones o ha sido sometida a estrés (frío, desinfectantes, pH bajo), su recuperación en medios selectivos puede verse comprometida, lo que aumenta el riesgo de obtener falsos

negativos. Además, la microbiota acompañante puede sobrecrecer en algunos medios de cultivo, dificultando la visualización de colonias características.

- Diferenciación entre especies del género: Aunque los métodos bioquímicos permiten la identificación presuntiva del género *Listeria*, la diferenciación precisa entre especies como *L. innocua*, *L. welshimeri* y *Listeria monocytogenes* puede ser compleja, ya que comparten características fenotípicas similares.

En consecuencia, se requieren pruebas complementarias como la galería API *Listeria* o pruebas moleculares para lograr una confirmación definitiva, lo que aumenta el tiempo y recursos necesarios. (13,14)

### 3.4. Metodologías de detección genética

El método automatizado de detección rápida Assurance GDS (Sistema de Detección Genética) es un sistema basado en la reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (PCR-RT) diseñado para la detección rápida y precisa de patógenos bacterianos en alimentos y muestras ambientales.

Entre las metodologías alternativas de detección genética de *Listeria* están KITS aprobados para condiciones ambientales y alimentarias especificadas.

Los resultados negativos obtenidos con los kits rápidos se consideran definitivos y no se requieren más pruebas. Los presuntos resultados positivos con estos métodos de detección rápida deben ser confirmados sembrando en agares selectivos y confirmando los aislamientos a nivel de género y especies según las pruebas utilizadas.

- El equipo de detección genética, para *Listeria monocytogenes* Tq es un sistema automatizado de amplificación de ácidos nucleicos para la detección de *Listeria monocytogenes* en una variedad de alimentos y superficies que incluyen carnes listas para comer, pescados y mariscos, productos lácteos, vegetales quesos blandos pasteurizados, goma, plásticos, y superficies de hormigón. (15)

#### 3.4.1. Principio de funcionamiento (PCR en tiempo real) (16)

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) es una técnica de laboratorio fundamental de biología molecular cuyo fundamento principal es generar millones a miles de millones de copias de un segmento específico de ADN *in vitro* (en un tubo de ensayo). Este proceso de amplificación de ácidos nucleicos permite estudiar una región de ADN particular con mucho más detalle, incluso si la cantidad inicial de muestra es mínima.

El fundamento de la PCR se basa en simular y repetir el proceso natural de replicación del ADN, pero de forma controlada y exponencial, mediante ciclos de temperatura y componentes claves.

#### Pasos cíclicos del proceso

La PCR se lleva a cabo en un termociclador, un instrumento que cambia la temperatura de la reacción en ciclos repetidos. Cada ciclo consta de tres pasos principales:

- Desnaturalización (~95°C): El calor elevado rompe los puentes de hidrógeno que mantienen unidas las dos hebras de la doble hélice del ADN molde, separándolas en cadenas simples.
- Hibridación o Alineamiento (~50-60°C): La temperatura se reduce, permitiendo que los cebadores se unan (hibriden) a sus secuencias complementarias específicas en las cadenas simples de ADN.
- Extensión o Elongación (~72°C): La temperatura se eleva a la óptima para la ADN polimerasa. La enzima se adhiere a los cebadores y comienza a sintetizar una nueva cadena de ADN complementaria a la cadena molde, utilizando los nucleótidos disponibles. (16)

#### 3.4.2. Método Assurance GDS: Funcionamiento y características (2)

El sistema Assurance GDS combina varias tecnologías moleculares y microbiológicas avanzadas para acelerar el proceso de detección:

- Enriquecimiento de Muestras

El proceso comienza con un paso de enriquecimiento en un medio de cultivo selectivo, que permite que los organismos objetivo se multipliquen.

- Separación Inmunomagnética (IMS) con PickPen®

Una característica clave es el uso del dispositivo patentado PickPen® e IMS. Las perlas magnéticas recubiertas con anticuerpos específicos capturan y concentran selectivamente las bacterias patógenas vivas de la muestra enriquecida, separándolas de los materiales inhibidores del fondo de la matriz alimentaria.

- Amplificación y detección por PCR en tiempo real

Las células capturadas se transfieren a tubos de amplificación que contienen reactivos liofilizados (polimerasa, cebadores y sondas específicas). Un termociclador rotatorio (Rotor-Gene® Q) realiza la amplificación del ADN (PCR) en tiempo real. La detección se basa en la

emisión de señales fluorescentes cuando se amplifican las secuencias de ADN objetivo altamente conservadas, lo que garantiza una alta especificidad. (2)

### **3.4.3. Ventajas y limitaciones de los métodos moleculares frente a los métodos tradicionales** <sup>(17)</sup>

Los métodos moleculares, como PCR en tiempo real y sistemas automatizados basados en amplificación genética, ofrecen ventajas frente a los métodos tradicionales. Entre ellas se mencionan:

- Alta sensibilidad y especificidad: La PCR permite detectar cantidades mínimas de ADN de *Listeria monocytogenes* en una muestra, incluso cuando la cantidad de bacterias presentes es muy baja.
- Reducción sustancial en el tiempo de análisis: Mientras que los métodos tradicionales requieren entre 5 y 7 días para obtener resultados definitivos, las técnicas moleculares pueden ofrecer resultados en menos de 24 horas después del enriquecimiento, lo que permite tomar medidas correctivas de manera rápida y eficiente en caso de detectar la bacteria.
- Versatilidad: La PCR puede aplicarse a una amplia variedad de matrices alimentarias y muestras ambientales, lo que la convierte en una herramienta muy versátil para el control de calidad en la industria alimentaria.

A pesar de sus beneficios, los métodos moleculares presentan ciertas limitaciones:

- Diferenciación entre células viables y no viables: Estos métodos detectan ADN incluso de bacterias muertas, lo que puede afectar la interpretación de resultados.
- Alto costo: Se requiere equipos, reactivos y personal especializado, por lo que laboratorios pequeños o con recursos limitados pueden no contar con la infraestructura adecuada para implementar métodos de PCR o sistemas automatizados comercialmente disponibles.
- Inhibidores en los alimentos: Como grasas, polifenoles o componentes de matrices lácteas, puede interferir con la amplificación del ADN y generar falsos negativos si no se realiza una extracción adecuada. Este desafío hace que la calidad del proceso previo (extracción y purificación del ADN) y la experiencia en la técnica sean determinantes para obtener resultados confiables.

### **3.5. Fundamentos de la validación de métodos microbiológicos según la Política del Organismo Salvadoreño de Acreditación <sup>(1)</sup>**

La validación es la confirmación mediante el suministro de evidencia objetiva de que se han cumplido los requisitos para una utilización o aplicación específica prevista.

Cada método de análisis debe contar con un protocolo de validación en concordancia con el procedimiento de validación del laboratorio. El procedimiento de validación debe corresponder al tipo de método y matriz en la que se realicen los ensayos.

El protocolo de validación debe contener suficiente información sobre el procedimiento para cada prueba, el tratamiento estadístico de la información generada y los criterios de evaluación. Debe incluirse detalles sobre preparación de las muestras, inóculos y de cualquier insumo relevante en las actividades detalladas. Este documento debe contener suficiente información que permita identificar los elementos de cada validación (equipo, reactivos, personal, condiciones ambientales y métodos). Debe incluir la conclusión sobre la evaluación del desempeño.

#### **3.5.1. Procedimiento de validación <sup>(1)</sup>**

Cada método de análisis debe evaluarse de acuerdo al diseño presentado en el protocolo de validación y demostrar que es adecuado para la o las matrices de interés.

- Análisis de alimentos:

Dada la cantidad de matrices en las que los métodos pueden aplicarse se establece que los laboratorios deben demostrar competencia en los tipos o grupos de alimentos objeto del alcance. El laboratorio deberá demostrar la validación correspondiente por tipo de alimento en al menos 2 matrices. Cada vez que el laboratorio desee ampliar el ensayo en otro tipo de alimento, este deberá aplicar la validación correspondiente.

En el caso, de la presente validación:

- Grupo de alimento: Productos lácteos
- Tipo de alimento: Procesados
- Matrices: Queso crema y queso procesado americano

### **3.5.2. Definición sobre método de ensayo <sup>(1)</sup>**

La norma ISO/IEC 17025 en su apartado 5.4.2 establece que “*El laboratorio debe utilizar métodos de ensayo que satisfagan las necesidades del cliente y sean apropiados para el uso previsto*”. Por tanto, debe tenerse en cuenta el ámbito de aplicación, tanto por el laboratorio en cuanto a la selección de los procedimientos de ensayo y su validación.

La norma establece que “*cuando el cliente no especifique el método a utilizar, el laboratorio debe seleccionar los métodos apropiados que hayan sido publicados en normas internacionales, regionales o nacionales, por organizaciones técnicas reconocidas o en libros o revistas científicas especializados o especificados por el fabricante de equipos*”. Por tanto, en el caso de elegir un procedimiento de ensayo interno, es recomendable que se parta de métodos de referencia que sean ampliamente aceptados, conocidos y aplicados en el sector.

En el caso, de la presente validación:

- Método de ensayo: Métodos basados en métodos de referencia

Son métodos descritos en procedimientos internos del laboratorio, que están basados claramente en métodos de referencia y que no suponen una modificación técnica respecto del método de referencia que ponga en cuestión su validez técnica. Deben mantenerse actualizados en relación con el método de referencia en que se fundamentan.

### **3.5.3. Parámetros de desempeño de métodos cualitativos <sup>(1)</sup>**

Los métodos cualitativos son métodos de análisis cuya respuesta es la presencia o ausencia del analito, detectado de forma directa o indirecta en una cierta cantidad de muestra.

El límite de detección es el número mínimo de microorganismos que pueden ser detectados, pero en cantidades que no pueden estimarse con precisión. La estimación del límite de detección requiere del empleo de suspensiones de inóculo con niveles de concentración bajos. El propio intervalo de confianza a estos bajos niveles hace que, desde un punto de vista estadístico, no se pueda conocer de forma exacta si un determinado inóculo contiene o no el microorganismo a detectar.

Por tanto, es aceptable comprobar el método con bajos niveles de inóculos de microorganismos diana de forma que se evalúen diferencias entre las distintas matrices, analistas, equipos etc., verificándose la capacidad del laboratorio para obtener resultados reproducibles a estos niveles.

- Parámetros de desempeño:

1. Verificación del tamaño del inóculo: Al verificar el tamaño del inóculo por lo menos seis veces, en promedio se obtienen cuentas de menos de 10 UFC (preferentemente menores o iguales a 5 UFC) y ninguna de 10 UFC o más.
2. Verificación de la muestra: Se espera que en ninguna repetición se obtenga un resultado positivo.
3. Verificación del límite de detección: Se espera que al menos en el 80%, es decir en 5 repeticiones se obtenga un resultado positivo.
4. Falsos positivos: Se espera obtener en las repeticiones un 100% de resultados positivos verdaderos y ningún resultado falso positivo.
5. Incertidumbre: No es de aplicación a métodos cualitativos

#### **3.5.4. Aseguramiento de la calidad de los resultados de ensayo <sup>(1)</sup>**

En la norma ISO IEC 17025: 2005 se establece que el laboratorio debe disponer de un control de calidad para realizar el seguimiento de la validez de los ensayos.

El aseguramiento de la calidad debe ser tanto interno como externo y puede aplicarse de diferentes formas:

- Control de las condiciones de trabajo: Proporciona información sobre la esterilidad de los medios y materiales auxiliares utilizados y en general, sobre la buena práctica en la realización de los ensayos.
- Ensayos cualitativos: El control de calidad interno debe incluir actividades que garanticen un adecuado control del método a niveles bajos de contaminación

Estas actividades de control de calidad deben realizarse en la medida de lo posible con muestras naturales tanto positivas (inoculadas o contaminadas naturalmente) como negativas.

#### **3.6. Importancia de la validación para el aseguramiento de la calidad y seguridad alimentaria <sup>(17)</sup>**

La validación es crucial para el aseguramiento de la calidad porque:

- Proporciona confiabilidad en los datos: Confirma que los métodos de prueba son precisos y reproducibles.

- Facilita la conformidad regulatoria: Permite demostrar que cumple con los estándares y criterios microbiológicos o químicos establecidos por las normativas nacionales e internacionales
- Estandariza los procesos: Asegura que el método funcione consistentemente sin importar quién realice la prueba o dónde se realice, si se siguen los parámetros validados

En el contexto de la seguridad alimentaria, la validación es vital debido a que:

- Evita resultados inexactos: Minimiza el riesgo de falsos negativos (permitiendo que alimentos contaminados lleguen al mercado) y falsos positivos (causando desperdicio de alimentos y pérdidas económicas).
- Permite la detección oportuna de patógenos: Asegura que los métodos rápidos, como la PCR, detecten eficazmente organismos peligrosos (*Listeria*, *Salmonella*, etc.) en concentraciones bajas, permitiendo acciones correctivas rápidas.
- Protege la salud pública y la confianza del consumidor: Al garantizar que solo los productos seguros lleguen a los consumidores, la validación protege la salud humana y mantiene la confianza en la industria alimentaria en general. <sup>(17)</sup>

## **CAPÍTULO IV**

## 4.0 PRODUCTO FINAL

A continuación, se presenta el primer producto elaborado:

### 4.1. Protocolo de validación de la metodología para el aislamiento, detección e identificación de *Listeria monocytogenes* en alimentos, mediante método Screening Assurance GDS (Sistema de Detección Genética)

#### 1. OBJETIVO

Establecer los parámetros requeridos para la validación de la metodología para el aislamiento, detección e identificación de *Listeria monocytogenes* mediante el método Screening Assurance GDS y demostrar que el método es adecuado para su aplicación en alimentos pertenecientes al grupo de lácteos procesados.

#### 2. ALCANCE

La presente validación se realizará en la matriz de lácteos procesados, tomando muestras comerciales provenientes del mercado nacional. Utilizando un método modificado, basado en el AOAC Performance Tested Method 070702 y en el Bacteriological Analytical Manual BAM cap. 10 Detección y enumeración de *Listeria monocytogenes* en alimentos y muestras ambientales.

Fecha propuesta de inicio de la validación: Agosto 2025

Fecha propuesta de finalización de la validación: Octubre 2025

#### 3. RESPONSABLES

La validación es responsabilidad de Licda. Claudia Osorio, analista titular; Téc. Jacqueline Duke, analista; Licda. Marcela Vanegas, coordinadora de la plataforma de microbiología; Br. Vanessa Solórzano, estudiante en práctica profesional supervisada, Licda. Claudia Alberti, encargada de calidad de plataforma de microbiología; Licda. Regina Alvarenga, coordinadora de plataforma de calidad y Lic. Abel Godoy, jefe de laboratorio.

#### 4. PARÁMETROS DE DESEMPEÑO Y CRITERIOS DE ACEPTACIÓN

El método a validar es de carácter cualitativo; por lo tanto, los parámetros a considerar para evaluar su desempeño son los siguientes:

**Tabla No. 1** Parámetros y Criterios de Aceptación de Política para la Validación y Estimación de la Incertidumbre de Métodos Microbiológicos Cualitativos.<sup>1</sup>

Parámetro	Criterio de aceptación y especificación
Verificación del tamaño del inóculo	Al verificar el tamaño del inóculo por lo menos seis veces, en promedio se obtienen cuentas de menos de 10 UFC (preferentemente menores o iguales a 5 UFC) y ninguna de 10 UFC o más. Analistas: 1 Número de repeticiones: 6
Verificación de la muestra	Se espera que en ninguna repetición se obtenga un resultado positivo. Número de repeticiones: 3 Analistas: 1 Resultados positivos: 0%
Verificación del límite de detección	Se espera que al menos en el 80%, es decir en 5 repeticiones se obtenga un resultado positivo. Número de repeticiones: 6 Analistas: 3 Resultados positivos: al menos el 80% Tamaño del inóculo: menos de 10 UFC (microorganismo diana)
Falsos positivos	Se espera obtener en las repeticiones un 100% de resultados positivos verdaderos y ningún resultado falso positivo. Número de repeticiones: al menos 6 por analista Analistas: 3 Resultados positivos verdaderos: 100% Falsos positivos: 0% Tamaño del inóculo: más de 100 UFC (microorganismo no diana)
Incertidumbre	No es de aplicación a métodos cualitativos.

## 5. EQUIPOS Y MATERIALES

Todos los equipos se encuentran en condiciones adecuadas para su uso. Para garantizar su correcta operación, se revisó previamente los manuales de usuario de cada equipo.

### 5.1. EQUIPOS

- Contador de colonias
- Mezclador Vortex
- Stomacher o equivalente
- Incubadora de (30±1) °C, (35±1) °C y (60-64) °C
- Cabinas de bioseguridad clase A
- Balanza semianalítica
- Mechero Bunsen

- Microscopio
- Autoclave
- Assurance GDS Rotor-Gene
- Computador, software de trabajo e impresor
- Espectrofotómetro UV-VIS

## 5.2. REACTIVOS Y MEDIOS DE CULTIVO

- Medio de enriquecimiento para *Listeria* (caldo LEB)
- Kit de *Listeria monocytogenes* Tq que contiene:
  - Reactivo de concentración de *Listeria*
  - Buffer de re suspensión de *Listeria*
  - Solución de lavado
  - Tubos de amplificación de *Listeria*
- Agar Oxford
- Agar Palcam
- Suplemento para agar Oxford
- Suplemento para agar Palcam
- Agar Movilidad
- Agar EMB
- Agar Tripticasa Soya
- Agar Tripticasa Soya con 0.6% de Extracto de Levadura
- Caldo Infusión Cerebro Corazón
- Método de identificación rápida API *Listeria*
- Etanol al 70%
- Lejía 0.5 %
- Lejía/ hipoclorito de sodio al (5-10) %
- Solución salina 0.85%
- Agua libre de DNASAS
- Solución de limpieza libre de DNASAS

## 5.3. MATERIALES EN GENERAL

- Pipetas estériles de 1 mL, 2mL, 5 mL, 10 mL, 25 mL (descartables o de vidrio)
- Auxiliar de Pipeteado
- Cajas de Petri 100 x 15 mm, de una cavidad y dos cavidades.

- Tubos con rosca de (13 x 120) mm, (16 x 125) mm y (20 x 150) mm
- Frascos de vidrio con tapón de rosca con capacidad para 250 ml, 500 mL o 1000 mL
- Asas bacteriológicas en anillo (de 3mm o 10µL)
- Asas bacteriológicas en punta o palillos estériles
- Gradilla
- Pipeta de separación inmunomagnética
- Puntas para pipeta de separación inmunomagnética
- Cinta adhesiva para plato de re suspensión
- Base de polipropileno para preparación de muestras
- Papel adhesivo estéril
- Placa de re suspensión
- Bloque de enfriamiento de gel
- Micropipeta de 8 canales capaz de dispensar 30 µL
- Micropipetas con capacidad de dispensación de (20µL, 30µL, 45µL, 1000 µL)
- Guantes de nitrilo
- Bolsas estériles de polietileno de calidad alimentaria para triturador de alimentos
- Gas propano
- Bajalenguas estériles
- Tijeras y cuchillos estériles
- Portaobjeto y cubreobjeto
- Puntas con volumen de dispensación (20µL, 30µL, 45µL y 1000µL)

#### **5.4. CULTIVOS DE REFERENCIA**

- Cepa de *Listeria monocytogenes* ATCC 19114
- Cepa de *Escherichia coli* ATCC 25922

#### **5.5. MUESTRAS**

Las muestras a utilizar en esta validación son:

- Productos Lácteos Procesados

### **6. PROCEDIMIENTO**

#### **6.1. DESCRIPCIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO**

El Sistema de Detección Genética (Assurance GDS) es un método molecular automatizado que permite la detección rápida y específica de *Listeria monocytogenes* en alimentos y superficies

ambientales. El procedimiento comienza con el enriquecimiento de la muestra en un medio selectivo a (30-35) °C, por 24-48 horas, según el tipo de muestra. Después del enriquecimiento, se extrae el ADN bacteriano utilizando un proceso de lisis térmica y purificación magnética. Posteriormente, se lleva a cabo una amplificación específica por PCR en tiempo real, dirigida a secuencias genéticas exclusivas de *Listeria monocytogenes*. El sistema detecta la amplificación mediante fluorescencia, generando resultados objetivos y confiables en pocas horas.

Seguidamente, se procede a la confirmación mediante la metodología tradicional. Para ello, se siembran alícuotas de las muestras que resultaron positivas en el método Assurance GDS en medios diferenciales selectivos, tales como Agar Oxford y Agar Palcam. Estos medios permiten la detección de colonias sospechosas por su morfología característica, generalmente descrita como colonias grisáceas con halo negro. Las colonias que presenten este crecimiento típico se seleccionan para la realización de pruebas confirmatorias, entre las que se incluyen catalasa, oxidasa, tinción de Gram, prueba de movilidad y el uso de kits de identificación rápida, entre otras.

## **6.2. PREPARACIÓN DE REACTIVOS Y MEDIOS DE CULTIVO**

Los reactivos y medios de cultivo que serán utilizados, deben prepararse de acuerdo a las instrucciones y especificaciones de los fabricantes

## **6.3. CONDICIONES AMBIENTALES**

La temperatura ambiente y la limpieza del área de trabajo al ser puntos críticos en los análisis microbiológicos deben controlarse y mantenerse en condiciones óptimas.

## **6.4. PREPARACIÓN DE CULTIVO DE REFERENCIA A PARTIR DEL ESTÁNDAR MCFARLAND**

Adicionar el contenido del criovial de la cepa de trabajo *Listeria monocytogenes* (microorganismo diana) en 5 mL de BHI, seguidamente incubar a (35 ±1) °C por 24h. Posteriormente, con ayuda de una asa estéril, sembrar por estriado en una placa de TSA e incubar a (35 ±1) °C por 24h.

Una vez transcurrido el tiempo de incubación, tomar con asa estéril una pequeña cantidad del crecimiento bacteriano fresco obtenido en la placa de TSA de la cepa diana (*Listeria monocytogenes*) y transferirla a un tubo con solución salina estéril. Homogenizar mecánicamente la suspensión y proceder a realizar las lecturas mediante espectrofotometría, utilizando una longitud de onda de 625 nm, hasta obtener una absorbancia en el rango de 0.08–0.10, correspondiente a una concentración aproximada de  $10^8$  UFC/mL en la escala de McFarland. Seguidamente realizar diluciones seriadas a partir de la suspensión bacteriana estandarizada hasta obtener una concentración estimada de 200 UFC/mL o la concentración de prueba establecida.

Se debe realizar el mismo procedimiento descrito para la cepa no diana (*Escherichia coli*). Antes de cada prueba se deberá repetir la preparación del inóculo de forma idéntica a la determinación de la concentración de la suspensión bacteriana. Cada inóculo deberá ser verificado por vertido en placa en sextuplicado con un agar de conteo general (Agar Plate Count) y con uno o dos agares selectivos/diferenciales: Agar Oxford y Agar Palcam para *Listeria monocytogenes*, y Agar EMB para *Escherichia coli*.

## 6.5. FORTIFICACIÓN DE LA MUESTRA

Se debe utilizar muestras contaminadas artificialmente con el microorganismo diana (*Listeria monocytogenes*), las cuales previo al proceso de fortificación deben ser analizadas por triplicado para considerar la flora acompañante e interferente.

Luego de este tratamiento serán pesadas de manera aséptica en porciones de 25g a los que se debe adicionar la alícuota del microorganismo en estudio *Listeria monocytogenes* ATCC 19114 correspondiente a cada porción de muestra y el microorganismo no diana *Escherichia coli* ATCC 25922 en una concentración mayor a 100 UFC/ porción de muestra.

## 6.6. DESARROLLO

A partir de 6 porciones de muestra asignadas a cada analista, para cada tipo de alimento, se procede como se indica en el método de prueba AOAC Performance Tested Method 070702.

## 7. CÁLCULOS

**Tabla No. 2** Parámetros y Cálculos de Política para la Validación y Estimación de la Incertidumbre de Métodos Microbiológicos Cualitativos.

Parámetros	Cálculos
Verificación del tamaño del inóculo	El analista titular inocula por sextuplicado un mililitro de la solución madre del inóculo de prueba en cada una de las placas para verter el agar seleccionado. El inóculo final será menor a 5 UFC/porción de muestra. Se debe utilizar el promedio de los recuentos en el agar nutritivo y los agares diferenciales para calcular lo que corresponde al inóculo real de la prueba, el cual debe ser menor de 10 UFC y ninguno de 10 UFC o más
Verificación de la muestra	El analista titular analizará 3 porciones de muestra por tipo de alimento, previo a su contaminación artificial siguiendo el método de prueba. La muestra sin inocular no deberá dar ningún resultado positivo a <i>Listeria monocytogenes</i>
Verificación del límite de detección	Los 3 analistas deben analizar 6 porciones de muestra fortificada a 4UFC/25g, logrando recuperar al menos el 80% del inóculo por cada tipo de alimento siguiendo el método de prueba
Falsos positivos	Los 3 analistas deben analizar 6 porciones de muestra por cada tipo de alimento, a cada porción se le agregara un inóculo menor de 5 UFC/25g del microorganismo diana y 10000 UFC/25g del microorganismo no diana. Se espera el 100% de resultados positivos verdaderos y 0% de resultados falsos positivos ya que se debe demostrar que el método es apto a pesar de las posibles interferencias en la muestra

Fuente: Elaboración propia.

Los datos obtenidos de cada uno de los parámetros de desempeño evaluados se vaciarán en tablas e ingresarán en el informe de validación.

## 8. IDENTIFICACIÓN DE RIESGOS

Es de vital importancia detectar y gestionar de forma oportuna los riesgos que puedan comprometer la integridad de la validación del método Assurance GDS en muestras de lácteos procesados.

**Tabla No. 3** Identificación de riesgos.

Riesgo identificado	Acciones preventivas	Acciones correctivas
1. <u>Falla de Equipo</u> (Interrupción o suspensión del funcionamiento)	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Verificar que esté funcionando el aire acondicionado</li> <li>- UPS del equipo en óptimas condiciones y conectado a planta de emergencia</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Detener el análisis y documentar el incidente</li> <li>- Evaluar si las muestras pueden conservarse temporalmente bajo condiciones seguras para reiniciar el ensayo</li> <li>- Notificar al supervisor y al área de aseguramiento de calidad para activar procedimientos de contingencia</li> </ul>

<p>2. <u>Contaminación cruzada</u> (Transferencia accidental de material genético, manipulación inadecuada de pipetas, puntas, superficies o equipo.</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Uso de áreas de trabajo separadas</li> <li>- Cambio frecuente de guantes</li> <li>- Limpieza y desinfección de superficies y equipos antes y después de cada uso.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Realizar análisis de control ambiental para verificar que las condiciones están dentro de los rangos estimados y revisión de bitácoras de uso previo de equipo.</li> <li>- Volver a iniciar o repetir el ensayo</li> <li>- Hacer un análisis de causa para tomar medidas y prevenir en la siguiente ejecución del ensayo.</li> </ul>
<p>3. <u>Resultados inesperados</u> (Obtención de resultados positivos en controles negativos o viceversa, datos atípicos que no corresponden a los perfiles esperados)</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Incorporación obligatoria de controles internos y externos en cada corrida.</li> <li>- Lectura comprensiva de metodología y del protocolo del ensayo</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Realizar un análisis de causa y efecto con el fin de detectar la causa raíz, realizar acciones correctivas eficaces y fortalecer la evidencia de que el método es confiable</li> <li>- Retroalimentación de buenas prácticas de laboratorio</li> <li>- Controles internos y externos de la técnica y utilización de agua libre de ADNAsas</li> </ul>

Fuente: Elaboración propia.

A continuación, se presenta el segundo producto elaborado:

#### **4.2. Informe de validación de la metodología para el aislamiento, detección e identificación de *Listeria monocytogenes* en alimentos, mediante método Screening Assurance GDS (Sistema de Detección Genética)**

##### **1. OBJETIVO**

Establecer los parámetros requeridos para la validación de la metodología para el aislamiento, detección e identificación de *Listeria monocytogenes* mediante el método Screening Assurance GDS y demostrar que el método es adecuado para su aplicación en alimentos pertenecientes al grupo de lácteos procesados

##### **2. ALCANCE**

La presente validación se realizó en la matriz de lácteos procesados, tomando muestras comerciales provenientes del mercado nacional. Utilizando un método modificado, basado en el AOAC Performance Tested Method 070702 y en el Bacteriological Analytical Manual BAM cap. 10 Detección y enumeración de *Listeria monocytogenes* en alimentos y muestras ambientales.

Fecha de inicio de la validación: Agosto 2025

Fecha de finalización de la validación: Octubre 2025

### **3. RESPONSABLES**

La validación es responsabilidad de Licda. Claudia Osorio, analista titular; Téc. Jacqueline Duke, analista; Licda. Marcela Vanegas, coordinadora de la plataforma de microbiología; Br. Vanessa Solórzano, estudiante en práctica profesional supervisada; Licda. Claudia Alberti, encargada de calidad de plataforma de microbiología; Licda. Regina Alvarenga, coordinadora de plataforma de calidad y Lic. Abel Godoy, jefe de laboratorio.

### **4. EQUIPOS Y MATERIALES**

Todos los equipos se encuentran en condiciones adecuadas para su uso. Para garantizar su correcta operación, se revisó previamente los manuales de usuario de cada equipo utilizado en la presente validación.

#### **4.1. EQUIPOS**

- Contador de colonias
- Mezclador Vortex
- Stomacher o equivalente
- Incubadora de  $(30\pm 1)$  °C
- Incubadora de  $(35\pm 1)$  °C
- Incubadora de  $(60\pm 1)$  °C
- Cabinas de bioseguridad clase A
- Balanza semianalítica
- Mechero Bunsen
- Microscopio
- Autoclave
- Assurance GDS Rotor- Gene
- Computador, software de trabajo e impresor
- Espectrofotómetro UV-VIS

#### **4.2. REACTIVOS Y MEDIOS DE CULTIVO**

Los reactivos y medios de cultivo que fueron utilizados, se prepararon de acuerdo a las instrucciones del fabricante.

**PRUEBAS PRELIMINARES-DETERMINACIÓN DE INÓCULO- PRUEBA 1,  
MATRIZ: QUESO CREMA (QC)**

- **Queso crema pasteurizado:** Lote de fábrica: QCR0063447 2N JM
- **Suplemento para Agar OXA:** Lote de fábrica: 6166193
- **Suplemento para Agar PAL:** Lote de fábrica: 3763800
- **Kit Assurance GDS *Listeria monocytogenes*:** Lote de fábrica: 031422-26
- **Caldo Infusión Cerebro Corazón:** Lote interno: 010925BHI
- **Caldo de Enriquecimiento para *Listeria*:** Lote interno: 080925LEB
- **Agar Trypticosa Soya:** Lote interno: 010925TSA
- **Agar Palcam:** Lote interno: 080925PAL
- **Agar Oxford:** Lote interno: 080925OXA
- **Agar Plate Count:** Lote interno:080925APC
- **Agar EMB:** Lote interno: 080925EMB
- **Agar Movilidad:** Lote interno:090925AM
- **Solución salina al 0.85%:** Lote interno: 090925SS

**PRUEBAS PRELIMINARES-DETERMINACIÓN DE INÓCULO- PRUEBA 2,  
MATRIZ: QUESO PROCESADO AMERICANO (QPA)**

- **Queso procesado americano:** Lote de fábrica: REB48735 J
- **Suplemento para Agar OXA:** Lote de fábrica: 6166193
- **Suplemento para Agar PAL:** Lote de fábrica: 3763800
- **Kit Assurance GDS *Listeria monocytogenes*:** Lote de fábrica: 031422-26
- **Caldo Infusión Cerebro Corazón:** Lote interno: 010925BHI
- **Caldo de Enriquecimiento para *Listeria*:** Lote interno: 220925LEB
- **Agar Trypticosa Soya:** Lote interno: 160925TSA
- **Agar Palcam:** Lote interno: 220925PAL
- **Agar Oxford:** Lote interno: 220925OXA
- **Agar Plate Count:** Lote interno:220925APC
- **Agar EMB:** Lote interno: 220925EMB
- **Agar Movilidad:** Lote interno:090925AM
- **Solución salina al 0.85%:** Lote interno: 220925SS

**EJECUCIÓN DE LA VALIDACIÓN- MATRIZ: QUESO CREMA (QC)**

- **Queso crema pasteurizado:** Lote de fábrica: QCR0063447 2N JM
- **Suplemento para Agar OXA:** Lote de fábrica: 6166193
- **Suplemento para Agar PAL:** Lote de fábrica: 3763800
- **Kit Assurance GDS *Listeria monocytogenes*:** Lote de fábrica: 031422-26
- **Cristal violeta:** Lote interno: 1
- **Lugol para gram:** Lote interno: 1
- **Alcohol cetona:** Lote interno:2
- **Safranina:** Lote interno: 2
- **Oxidasa:** Lote de fábrica: L58041302 825
- **Peróxido de hidrogeno:** Lote interno: 1249965010806
- **Aceite de inmersión:** Lote de fábrica: 051799
- **Ampolla de API suspensión:** Lote de fábrica: 1010376760
- **API *Listeria*:** Lote de fábrica: 1010674500
- **Reactivo ZYM B:** Lote de fábrica: 1008595820
- **Caldo Infusión Cerebro Corazón:** Lote interno: 010925BHI
- **Caldo de Enriquecimiento para *Listeria*:** Lote interno: 220925LEB
- **Agar Tripticasa Soya:** Lote interno: 160925TSA
- **Agar Tripticasa Soya con 0.6% de Extracto de Levadura:** Lote interno: 250925TSAye
- **Agar Palcam:** Lote interno: 220925PAL
- **Agar Oxford:** Lote interno: 220925OXA
- **Agar Plate Count:** Lote interno: 220925APC
- **Agar EMB:** Lote interno: 220925LEB
- **Agar Movilidad:** Lote interno: 250925AM
- **Solución salina al 0.85%:** Lote interno: 220925SS

**EJECUCIÓN DE LA VALIDACIÓN- MATRIZ: QUESO PROCESADO AMERICANO (QPA)**

- **Queso procesado americano:** Lote de fábrica: REB49538 G
- **Suplemento para Agar OXA:** Lote de fábrica: 6166193
- **Suplemento para Agar PAL:** Lote de fábrica: 3763800
- **Kit Assurance GDS *Listeria monocytogenes*:** Lote de fábrica: 031422-26

- **Cristal violeta:** Lote interno: 1
- **Lugol para gram:** Lote interno: 1
- **Alcohol cetona:** Lote interno:2
- **Safranina:** Lote interno: 2
- **Oxidasa:** Lote de fábrica: L58041302 825
- **Peróxido de hidrogeno:** Lote interno: 1249965010806
- **Aceite de inmersión:** Lote de fábrica: 051799
- **Ampolla de API suspensión:** Lote de fábrica: 1010376760
- **API *Listeria*:** Lote de fábrica: 1010674500
- **Reactivo ZYM B:** Lote de fábrica: 1008595820
- **Caldo Infusión Cerebro Corazón:** Lote interno: 010925BHI
- **Caldo de Enriquecimiento para *Listeria*:** Lote interno: 021025LEB
- **Agar Trypticosa Soya:** Lote interno: 290925TSA
- **Agar Trypticosa Soya con 0.6% de Extracto de Levadura:** Lote interno: 250925TSAye y 091025TSAye
- **Agar Palcam:** Lote interno: 071025PAL
- **Agar Oxford:** Lote interno: 071025OXA
- **Agar Plate Count:** Lote interno: 071025APC
- **Agar EMB:** Lote interno: 071025LEB
- **Agar Movilidad:** Lote interno: 091025AM
- **Solución salina al 0.85%:** Lote interno: 031025SS

#### 4.3.MATERIALES EN GENERAL

- Pipetas estériles de 1mL, 2 mL, 5 mL, 10 mL y 25 mL (descartables o de vidrio)
- Auxiliar de pipeteado
- Cajas de Petri 100 x 15 mm, de una cavidad y dos cavidades
- Tubos con rosca de (13 x 120) mm, (16 x 125) mm y (20 x 150) mm
- Frascos de vidrio con tapón de rosca con capacidad para 250 mL, 500 mL o 1000 mL
- Asas bacteriológicas en anillo (de 3 mm o 10  $\mu$ L)
- Asas bacteriológicas en punta o palillos estériles
- Pipeta de separación inmunomagnética
- Puntas para pipeta de separación inmunomagnética
- Cinta adhesiva para plato de re suspensión
- Base de polipropileno para preparación de muestras

- Papel adhesivo estéril
- Placa de re suspensión
- Bloque de enfriamiento de gel
- Micropipeta de 8 canales capaz de dispensar 30  $\mu\text{L}$
- Micropipetas con capacidad de dispensación de (20  $\mu\text{L}$ , 30  $\mu\text{L}$ , 45  $\mu\text{L}$  y 1000  $\mu\text{L}$ )
- Puntas con volumen de dispensación (20  $\mu\text{L}$ , 30  $\mu\text{L}$ , 45  $\mu\text{L}$  y 1000  $\mu\text{L}$ )
- Bolsas estériles de polietileno de calidad alimentaria para triturador de alimentos
- Gas propano
- Guantes de nitrilo
- Gradilla
- Bajalenguas estériles
- Tijeras y cuchillos estériles
- Portaobjeto y cubreobjeto

#### 4.4. MUESTRAS

Las muestras que se utilizaron para la validación fueron:

- **Productos lácteos procesados, prueba 1: Queso crema procesado (QC):**

Queso crema pasteurizado, adquirido comercialmente con número de lote QCR0063447 2N JM (tanto para la prueba de inóculo como para la validación fue el mismo lote); fecha de vencimiento: 09/12/25; contenido neto: 230g; Reg. San. N°. 2949 D.G.S. El Salvador. C.A. Dicha muestra, se ingresó el 05/09/25, y fue analizada inicialmente al ingresó de la misma del 08/09/25 al 01/10/25. Para la validación, la muestra fue dividida en fracciones de 25g las cuales fueron identificadas con las iniciales de los analistas responsables de la prueba.

- **Productos lácteos procesados, prueba 2: Queso procesado americano (QPA):**

Queso procesado americano, adquirido comercialmente con número de lote REB48735 J, fecha de vencimiento 24/10/25 (prueba de inóculo) y REB49538, fecha de vencimiento 04/12/25 (ejecución de la validación); contenido neto 150g; Reg. San. N°. 2191 D.G.S. El Salvador. C.A. Dicha muestra, se ingresó el 19/09/25, y fue analizada inicialmente al ingresó de la misma del 22/09/25 al 15/10/25. Para la validación, la muestra fue dividida en fracciones de 25g las cuales fueron identificadas con las iniciales de los analistas responsables de la prueba

#### 4.5. CEPAS DE REFERENCIAS

- *Listeria monocytogenes* ATCC 19114 (microorganismo diana)
- *Escherichia coli* ATCC 25922 (microorganismo no diana)

#### 4.6. PRUEBAS PRELIMINARES

##### 4.6.1. Determinación del tamaño del inóculo. Prueba 1: QUESO CREMA (QC)

Se realizaron pruebas a diferentes concentraciones del microorganismo de interés, *Listeria monocytogenes*, considerando el efecto de la matriz de ensayo y la presencia del microorganismo interferente. Esta prueba se realizó en fechas de 08/09/25 al 12/09/25.

En primer lugar, se adicionó la respectiva cepa de trabajo (*Listeria monocytogenes* y *Escherichia coli*) en BHI con el fin de proporcionar un entorno nutritivo para su reactivación y enriquecimiento. Posteriormente, se sembró por estriado en TSA y después del tiempo de incubación se procedió a realizar diluciones seriadas con solución salina estéril al 0.85% hasta obtener una absorbancia en el rango de 0.08-0.10 a una longitud de onda de 625nm, correspondiente a una concentración de  $10^8$  UFC/mL en la escala de McFarland para cada microorganismo en análisis.

Partiendo de dicha suspensión bacteriana estandarizada, para el microorganismo diana (*Listeria monocytogenes*) se realizaron diluciones seriadas hasta obtener una concentración de prueba de 200 UFC/mL la cual se verificó por sextuplicado en agar OXA, PAL y APC.

Dado que los lineamientos vigentes del Organismo Salvadoreño de Acreditación recomiendan inóculos menores de 10 UFC/porción de muestra, se establece para esta validación, trabajar con concentraciones estimadas de (2, 4 y 6) UFC/25g para las matrices ensayadas.

Partiendo de esta afirmación, de la concentración de  $10^8$  UFC/mL del microorganismo diana, se realizaron diluciones sucesivas hasta llegar a la dilución  $10^2$  (concentración teórica de 200 UFC/mL), de la cual se tomó 1 mL y se adiciono en 99 mL de solución salina estéril al 0.85% obteniendo una concentración teórica estimada de 2 UFC/mL.

Para la concentración teórica de 4 UFC/mL, tomando 2 mL de la dilución  $10^2$  (concentración teórica de 200 UFC/mL) y diluyéndolos en 98 mL de solución salina estéril al 0.85%

Para la concentración teórica de 6 UFC/mL, tomando 3 mL de la dilución  $10^2$  (concentración teórica de 200 UFC/mL) y diluyéndolos en 97 mL de solución salina estéril al 0.85%

**Tabla No. 4** Volúmenes usados para determinación de inóculos teóricos en prueba preliminar. Matriz Queso Crema.

Dilución	Alícuota a partir de la solución madre (mL)	Volumen de solución salina estéril (mL)	Inóculo teórico
1	1	99	2 UFC/25g
2	2	98	4 UFC/25g
3	3	97	6 UFC/25g

Fuente: Elaboración propia.

De cada uno de los frascos donde se tienen los estimados de (2, 4 y 6) UFC/mL se inocularon con 1 mL las muestras de ensayo por triplicado.

Las porciones de muestras utilizadas para la prueba de inóculo fueron las siguientes:

**Tabla No. 5** Peso de muestra por nivel de inóculo en prueba preliminar. Matriz Queso Crema.

Inóculo de prueba teórico estimado por porción de muestra	Muestra (Matriz: Queso crema)	Peso de muestra de ensayo (g)
2 UFC/mL	MxB 2.1	25.02
	MxB 2.2	25.68
	MxB 2.3	25.04
4 UFC/mL	MxB 4.1	25.13
	MxB 4.2	25.03
	MxB 4.3	25.05
6 UFC/mL	MxB 6.1	25.09
	MxB 6.2	25.12
	MxB 6.3	25.04

Fuente: Elaboración propia.

### Inóculo real en pruebas preliminares: Matriz: Queso Crema

#### *Listeria monocytogenes* (Microorganismo Diana)

Para poder determinar el inóculo real utilizado en las pruebas preliminares se verificó mediante sextuplicado en los agares correspondientes OXA, PAL y APC.

**Tabla No. 6** Recuento para la estimación de tamaño del inóculo de microorganismo diana *Listeria monocytogenes* en prueba preliminar. Matriz Queso Crema.

Repetición	Recuento (UFC/mL) APC	Recuento (UFC/mL) PAL	Recuento (UFC/mL) OXA
1	128	108	122
2	124	104	129
3	134	117	132
4	131	103	123
5	129	121	132
6	136	110	120
<b>Promedio por agar</b>	<b>130.33</b>	<b>110.50</b>	<b>126.33</b>
<b>Promedio general</b>	<b>122.39 <math>\approx</math> 120 UFC/mL</b>		

Fuente: Elaboración propia.

Se calculó el promedio general, y partiendo de ello, se ejecutó la determinación del inóculo real para cada nivel de prueba

**Tabla No. 7** Determinación de inóculo real en prueba preliminar. Matriz Queso Crema.

Promedio general	Inóculo en alícuota (mL)	Inóculo en dilución final (mL)	Inóculo real
<b>122.39 <math>\approx</math> 120 UFC/mL</b>	122.39	1.22	1 UFC/25g
	244.78	2.45	2 UFC/25g
	367.17	3.67	4 UFC/25g

Fuente: Elaboración propia.

Partiendo de lo anteriormente expresado, los inóculos reales comprobados experimentalmente fueron:

**Tabla No. 8** Comparación de inóculos teóricos y reales en prueba preliminar. Matriz Queso Crema.

Inóculo teórico estimado	Inóculo real obtenido
2 UFC	1 UFC
4 UFC	2 UFC
6 UFC	4 UFC

Fuente: Elaboración propia.

### **Inóculo real en pruebas preliminares: Matriz: Queso Crema**

#### ***Escherichia coli* (Microorganismo No Diana)**

El esquema de dilución planteado para estimar teóricamente la concentración de la solución a inocular del microorganismo no diana, *Escherichia coli*, fue el siguiente:

Partiendo de la suspensión bacteriana estandarizada (concentración de  $10^8$  UFC/mL en la escala de McFarland), se realizaron diluciones seriadas hasta llegar a la dilución  $10^4$  (concentración teórica 10,000 UFC/mL), de esta dilución se tomaron 2 mL los cuales se diluyeron en 98 mL de solución salina estéril al 0.85% para tener en dicha etapa un estimado de 200 UFC/mL, y procedió a verificar por sextuplicado en los agares correspondientes (EMB y APC).

Para verificar el desempeño del método cuando el microorganismo diana (*Listeria monocytogenes*) está presente en una baja concentración y posee una flora interferente en una concentración mayor (*Escherichia coli*), se planteó el siguiente esquema de dilución para estimar teóricamente dicha concentración:

Partiendo de la suspensión bacteriana estandarizada (concentración de  $10^8$  UFC/mL en la escala de McFarland), se realizó una dilución para llegar a la concentración de  $10^6$  (concentración teórica 1,000,000 UFC/mL), de esta dilución se tomó 1 mL el cual se diluyó en 99 mL de solución salina estéril al 0.85% para tener en dicha etapa un estimado de 10,000 UFC/mL, de esta dilución se inóculo 1 mL en cada porción de muestra ensayado.

Los resultados del sextuplicado de *Escherichia coli* (concentración teórica 10,000 UFC/mL) fueron los siguientes:

**Tabla No. 9** Recuento para la estimación de tamaño del inóculo de microorganismo no diana *Escherichia coli* en prueba preliminar. Matriz Queso Crema.

Repetición	Recuento (UFC/mL) APC	Recuento (UFC/mL) EMB
1	143	130
2	141	132
3	139	132
4	140	130
5	135	128
6	129	127
<b>Promedio por agar</b>	<b>137.83</b>	<b>129.83</b>
<b>Promedio general</b>	<b>133.83 <math>\approx</math> 130 UFC/mL</b>	
<b>Inóculo real</b>	<b>130.00 UFC/ 25g</b>	

Fuente: Elaboración propia.

Por lo que, el inóculo real del microorganismo no diana (*Escherichia coli*) fue de 130 UFC/25g. Mientras que la concentración real añadida fue de **6,500 UFC/mL**

200 UFC/mL----- 130 UFC/mL

10,000 UFC/mL----- X

$$X = 6,500 \text{ UFC/mL}$$

#### 4.6.2. Determinación del tamaño del inóculo. Prueba 2: QUESO PROCESADO AMERICANO (QPA)

Realizando el mismo proceso, se ejecutó la prueba con la segunda matriz, queso procesado americano.

Se establece para esta validación, trabajar con concentraciones estimadas de (2, 4 y 6) UFC/25g. Se procedió a realizar diluciones sucesivas partiendo de la dilución  $10^2$  (concentración teórica de 200 UFC/mL) para obtener los inóculos teóricos establecidos. Esta prueba se realizó en fechas de 22/09/25 al 26/09/25.

**Tabla No. 10** Volúmenes usados para determinación de inóculos teóricos en prueba preliminar. Matriz Queso Procesado Americano.

Dilución	Alícuota a partir de solución madre (mL)	Volumen de solución salina estéril (mL)	Inóculo teórico
1	1	99	2 UFC/25g
2	2	98	4 UFC/25g
3	3	97	6 UFC/25g

Fuente: Elaboración propia.

De cada uno de los frascos donde se tienen los estimados de (2, 4 y 6) UFC/mL se inocularán con 1 mL las muestras de ensayo por triplicado.

Las porciones de muestras utilizadas para la prueba de inóculo fueron las siguientes:

**Tabla No. 11** Peso de muestra por nivel de inóculo en prueba preliminar. Matriz Queso Procesado Americano.

Inóculo de prueba teórico estimado por porción de muestra	Muestra (Matriz: Queso procesado americano)	Peso de muestra de ensayo (g)
2 UFC/mL	MxC 2.1	25.01
	MxC 2.2	25.02
	MxC 2.3	25.01
4 UFC/mL	MxC 4.1	25.07
	MxC 4.2	25.15
	MxC 4.3	25.02
6 UFC/mL	MxC 6.1	25.28
	MxC 6.2	25.04
	MxC 6.3	25.46

Fuente: Elaboración propia.

**Inóculo real en pruebas preliminares: Matriz: Queso Procesado Americano (QPA)**

***Listeria monocytogenes* (Microorganismo Diana)**

Para poder determinar el inóculo real utilizado en las pruebas preliminares se verificó mediante sextuplicado en los agares correspondientes OXA, PAL y APC.

**Tabla No. 12** Recuento para la estimación de tamaño del inóculo de microorganismo diana *Listeria monocytogenes* en prueba preliminar. Matriz Queso Procesado Americano.

Repetición	Recuento (UFC/mL) APC	Recuento (UFC/mL) PAL	Recuento (UFC/mL) OXA
1	128	103	119
2	137	116	113
3	121	101	114
4	123	112	120
5	110	116	121
6	113	119	115
<b>Promedio por agar</b>	<b>122.00</b>	<b>111.17</b>	<b>117.00</b>
<b>Promedio general</b>	<b>116.72 <math>\approx</math> 120 UFC/mL</b>		

Fuente: Elaboración propia.

Se calculó el promedio general, y partiendo de ello, se ejecutó la determinación del inóculo real para cada nivel de prueba

**Tabla No. 13** Determinación de inóculo real en prueba preliminar. Matriz Queso Procesado Americano.

Promedio general	Inóculo en alícuota (mL)	Inóculo en dilución final (mL)	Inóculo real
<b>116.72 <math>\approx</math> 120 UFC/mL</b>	116.72	1.17	1 UFC/25g
	233.44	2.33	2 UFC/ 25g
	350.17	3.50	3 UFC/25g

Fuente: Elaboración propia.

Partiendo de lo anteriormente expresado, los inóculos reales comprobados experimentalmente fueron:

**Tabla No. 14** Comparación de inóculos teóricos y reales en prueba preliminar. Matriz Queso Procesado Americano.

Inóculo teórico estimado	Inóculo real obtenido
2 UFC	1 UFC
4 UFC	2 UFC
6 UFC	3 UFC

Fuente: Elaboración propia.

**Inóculo real en pruebas preliminares: Matriz: Queso Procesado Americano (QPA)**

***Escherichia coli* (Microorganismo No Diana)**

Partiendo de la suspensión bacteriana estandarizada (concentración de  $10^8$  UFC/mL en la escala de McFarland), se realizaron diluciones seriadas hasta llegar a la dilución  $10^4$  (concentración teórica 10,000 UFC/mL), de la cual se tomaron 2 mL y se diluyeron en 98 mL de solución salina estéril al 0.85% para tener en dicha etapa un estimado de 200 UFC/mL, y se procedió a verificar por sextuplicado en los agares correspondientes (EMB y APC).

Para estimar teóricamente la concentración alta del microorganismo *Escherichia coli* como microorganismo interferente se planteó el siguiente esquema de dilución:

Partiendo de la suspensión bacteriana estandarizada (concentración de  $10^8$  UFC/mL en la escala de McFarland), se realizó una dilución para llegar a la concentración de  $10^6$  (concentración teórica 1,000,000 UFC/mL), se tomó 1 mL el cual se diluyó en 99 mL de solución salina estéril al 0.85% para tener en dicha etapa un estimado de 10,000 UFC/mL; de esta dilución se inóculo 1 mL en cada porción de muestra ensayado.

Los resultados del sextuplicado de *Escherichia coli* (concentración teórica 10,000 UFC/mL) fueron los siguientes:

**Tabla No. 15** Recuento para la estimación de tamaño del inóculo de microorganismo no diana *Escherichia coli* en prueba preliminar. Matriz Queso Procesado Americano.

Repetición	Recuento (UFC/mL) APC	Recuento (UFC/mL) EMB
1	153	148
2	159	120

3	157	141
4	150	138
5	156	136
6	159	127
<b>Promedio por agar</b>	155.67	135.00
<b>Promedio general</b>	<b>145.33 <math>\approx</math> 150 UFC/mL</b>	
<b>Inóculo real</b>	<b>150.00 UFC/ 25 g</b>	

Fuente: Elaboración propia.

Por lo que, el inóculo real del microorganismo interferente de *Escherichia coli* fue de 150 UFC/25g. Mientras que la concentración real añadida fue **de 7,500 UFC/mL**

200 UFC/mL----- 150 UFC/mL

10,000 UFC/mL----- X

$$X = 7,500 \text{ UFC/mL}$$

#### Determinación de concentración de prueba de ambas matrices

Se inocularon por triplicado, porciones de muestra de 25g para ambas matrices, en 3 niveles diferentes de concentración, obteniendo los siguientes resultados:

**Tabla No. 16** Determinación de la concentración de prueba durante las evaluaciones preliminares.

Queso Crema (QC)			Queso Procesado Americano (QPA)		
Inóculo de prueba real por porción de muestra	Muestra	Resultado	Inóculo de prueba real por porción de muestra	Muestra	Resultado
1 UFC	MxB 2.1	Presencia	1 UFC	MxC 2.1	Presencia
	MxB 2.2	Presencia		MxC 2.2	Presencia
	MxB 2.3	Ausencia		MxC 2.3	Presencia
2 UFC	<b>MxB 4.1</b>	<b>Presencia</b>	2 UFC	<b>MxC 4.1</b>	<b>Presencia</b>
	<b>MxB 4.2</b>	<b>Presencia</b>		<b>MxC 4.2</b>	<b>Presencia</b>
	<b>MxB 4.3</b>	<b>Presencia</b>		<b>MxC 4.3</b>	<b>Presencia</b>

4 UFC	MxB 6.1	Presencia	3 UFC	MxC 6.1	Presencia
	MxB 6.2	Presencia		MxC 6.2	Presencia
	MxB 6.3	Presencia		MxC 6.3	Ausencia

Fuente: Elaboración propia.

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos, se considera que, para ambas matrices, se partiría de una concentración teórica de 4 UFC/porción de muestra (concentración real de 2 UFC/porción de muestra), dado que en el ensayo se obtuvieron resultados esperados en este nivel de prueba ensayado.

Para la verificación de la muestra, en ambas matrices, se llevaron dos blancos de muestra para descartar interferencias derivadas de la matriz, garantizando que cualquier señal detectada provenga exclusivamente del analito de interés. Así mismo, para ambas matrices, se emplearon controles de calidad adicionales, entre ellos un blanco reactivo, que permitió confirmar el adecuado estado de los reactivos, y un pocillo con agua libre de ADNAsas, que aseguró la integridad del ADN y la ausencia de degradación por contaminación.

Todos estos controles (blanco de muestra, blanco reactivo y agua libre de ADNAsas) fueron analizados bajo las mismas condiciones que las muestras positivas fortificadas, estos controles debían presentar un resultado negativo, lo cual se cumplió, ya que todos reportaron resultados negativos.

**Tabla No. 17** Control de blancos por matriz en pruebas preliminares.

Queso Crema (QC)			Queso Procesado Americano (QPA)		
Muestra	Peso (g)	Resultado	Muestra	Peso (g)	Resultado
BL MxB 1	25.08	<b>Ausencia</b>	BL MxC 1	25.06	<b>Ausencia</b>
BL MxB 2	25.19	<b>Ausencia</b>	BL MxC 2	25.18	<b>Ausencia</b>

Fuente: Elaboración propia.

#### 4.7. CONTROLES AMBIENTALES

Dado que en microbiología el control del ambiente es de vital importancia dentro del proceso, los controles durante las pruebas preliminares fueron los siguientes:

**Prueba 1. Matriz: Queso Crema (QC)**

- Mechero: 5 UFC
- Cabina: 0 UFC
- Lotes de placas APC: 080925APC

**Prueba 2. Matriz: Queso Procesado Americano (QPA)**

- Mechero: 4 UFC
- Cabina: 0 UFC
- Lotes de placas APC: 290925APC

**5.0. EJECUCIÓN DE LA VALIDACIÓN DE LA METODOLOGÍA DE ANÁLISIS PARA LA DETERMINACIÓN DE *Listeria monocytogenes* EN PRODUCTOS LÁCTEOS PROCESADOS.****Primera matriz: QUESO CREMA (QC)****Determinación del límite de detección**

**Microorganismo diana:** *Listeria monocytogenes*

Tomando como base, los resultados obtenidos en las pruebas preliminares, se diseñó la realización del presente ensayo, considerando una concentración teórica de 4 UFC/25g (concentración real de 2 UFC/25g).

**Fortificación de las muestras**

El analista titular, preparó las respectivas diluciones, partiendo de una solución madre de  $10^2$  (concentración teórica 200 UFC/mL), de dicha solución se tomó el sextuplicado en los agares correspondientes (OXA, PAL y APC).

Tomando de dicha dilución ( $10^2$  UFC/mL), una alícuota de 2 mL y llevando a un volumen final de 98 mL con solución salina estéril al 0.85%, para tener un estimado teórico de 4 UFC/mL. De esta dilución, se adicionó 1 mL a cada una de las porciones de muestra asignadas para cada analista participante de la validación.

Para determinar el inóculo real, y con ello el límite de detección, se realizó el sextuplicado del inóculo contenido en la solución madre de  $10^2$  (concentración teórica de 200 UFC/mL)

Fecha de realización: 22/09/25 al 26/09/25

**Tabla No. 18** Recuentos para la determinación del límite de detección de *Listeria monocytogenes*. Matriz Queso Crema.

Repetición	Recuento (UFC/mL) APC	Recuento (UFC/mL) PAL	Recuento (UFC/mL) OXA
1	128	103	119
2	137	116	113
3	113	101	114
4	121	112	120
5	123	116	121
6	110	119	115
<b>Promedio por agar</b>	<b>122.00</b>	<b>111.17</b>	<b>117.00</b>
<b>Promedio general</b>	<b>116.72 <math>\approx</math> 120 UFC/mL</b>		

Fuente: Elaboración propia.

**Tabla No. 19** Inóculo teórico durante la validación. Matriz Queso Crema.

Dilución	Alícuota a partir de solución madre (mL)	Volumen de solución salina estéril (mL)	Inóculo teórico
2	2	98	4 UFC/25 g

Fuente: Elaboración propia.

**Tabla No. 20** Inóculo real durante la validación. Matriz Queso Crema.

Promedio general	Inóculo en alícuota	Inóculo en dilución final	Inóculo real
116.72	233.44	2.33	2 UFC/25g

Fuente: Elaboración propia.

Partiendo de los resultados anteriores, la concentración real utilizada para *Listeria monocytogenes* ATCC 19114 fue de 2 UFC/25g

**Para la preparación del inóculo de *Escherichia coli* (microorganismo no diana) se realizó lo siguiente:**

A partir del estándar de McFarland, donde se tiene un estimado de  $10^8$  UFC/mL, se realizaron diluciones sucesivas hasta obtener la concentración de  $10^4$  UFC/mL, de la cual se tomaron 2 mL y se llevaron a un volumen de 98 mL de solución salina estéril al 0.85%, teniéndose así una concentración teórica de 200 UFC/mL, la cual se verificó por sextuplicado en agar EMB y APC para cuantificar el inóculo real de *Escherichia coli*.

A su vez, a partir del estándar de McFarland, donde se tiene un estimado de  $10^8$  UFC/mL, se realizó una dilución para llegar a la concentración de  $10^6$  UFC/mL, de la cual se tomó 1 mL y se llevó a un volumen de 99 mL de solución salina estéril al 0.85%, teniéndose una concentración teórica de  $10^4$  UFC/mL (concentración teórica de 10,000 UFC/mL), de esta dilución se inoculó 1 mL en cada porción de muestra, donde ya se había adicionado a *Listeria monocytogenes* (en una concentración real de 2 UFC/mL).

Se obtuvieron los siguientes resultados:

**Tabla No. 21** Recuentos para la determinación del tamaño de inóculo de *Escherichia coli*. Matriz Queso Crema.

Repetición	Recuento (UFC/mL) APC	Recuento (UFC/mL) EMB
1	153	148
2	159	120
3	157	141
4	150	127
5	156	138
6	159	136
<b>Promedio por agar</b>	155.67	135.00
<b>Promedio general</b>	<b>145.33 <math>\approx</math> 150 UFC/mL</b>	
<b>Inóculo real</b>	<b>150.00 UFC/ 25 g</b>	

Fuente: Elaboración propia.

Partiendo de los resultados anteriores, el inóculo real utilizado de *Escherichia coli* ATCC 25922 fue de 150 UFC/25 g.

Mientras que la concentración real añadida fue **de 7,500 UFC/mL**

200 UFC/mL----- 150 UFC/mL

10,000 UFC/mL----- X

$$X = 7,500 \text{ UFC/mL}$$

## Segunda matriz: QUESO PROCESADO AMERICANO (QPA)

### Determinación del límite de detección

#### Microorganismo diana: *Listeria monocytogenes*

Tomando como base, los resultados obtenidos en las pruebas preliminares, se diseñó la realización del presente ensayo, considerando una concentración teórica de 4 UFC/25g (concentración real de 2 UFC/25 g).

#### Fortificación de las muestras

El analista titular, preparó las respectivas diluciones, partiendo de una solución madre de  $10^2$  (concentración teórica 200 UFC/mL), de dicha solución se tomó el sextuplicado en los agares correspondientes (OXA, PAL y APC).

Tomando de dicha dilución ( $10^2$  UFC/mL), una alícuota de 2 mL y llevando a un volumen final de 98 mL con solución salina estéril al 0.85%, para tener un estimado teórico de 4 UFC/mL. De esta dilución, se adicionó 1 mL a cada una de las porciones de muestra asignadas para cada analista participante de la validación.

Para determinar el inóculo real, y con ello el límite de detección, se realizó el sextuplicado del inóculo contenido en la solución madre de  $10^2$  (concentración teórica de 200 UFC/mL)

Fecha de realización: 06/10/25 al 10/10/25

**Tabla No. 22** Recuentos para la determinación del límite de detección de *Listeria monocytogenes*. Matriz Queso Procesado Americano.

Repetición	Recuento (UFC/mL) APC	Recuento (UFC/mL) PAL	Recuento (UFC/mL) OXA
1	137	108	130
2	144	120	129
3	148	117	130
4	129	115	116
5	132	111	126
6	146	105	124

<b>Promedio por agar</b>	<b>139.33</b>	<b>112.67</b>	<b>125.83</b>
<b>Promedio general</b>	<b>126.00 <math>\approx</math> 130 UFC/mL</b>		

Fuente: Elaboración propia.

**Tabla No. 23** Inóculo teórico durante la validación. Matriz Queso Procesado Americano.

<b>Dilución</b>	<b>Alicuota a partir de sln madre (mL)</b>	<b>Volumen de solución salina estéril (mL)</b>	<b>Inóculo teórico</b>
2	2	98	4 UFC/25 g

Fuente: Elaboración propia.

**Tabla No. 24** Inóculo real durante la validación. Matriz Queso Procesado Americano.

<b>Promedio general</b>	<b>Inóculo en alícuota</b>	<b>Inóculo en dilución final</b>	<b>Inóculo real</b>
126.00	252.00	2.52	2 UFC/25g

Fuente: Elaboración propia.

Partiendo de los resultados anteriores, la concentración real utilizada para *Listeria monocytogenes* ATCC 19114 fue de 2 UFC/25g

**Para la preparación del inóculo de *Escherichia coli* (microorganismo no diana) se realizó lo siguiente:**

A partir del estándar de McFarland, donde se tiene un estimado de  $10^8$  UFC/mL, se realizaron diluciones sucesivas hasta obtener la concentración de  $10^4$  UFC/mL, de la cual se tomaron 2 mL y se llevaron a un volumen de 98 mL de solución salina estéril al 0.85%, teniendo así una concentración teórica de 200 UFC/mL, con la cual se verificó por sextuplicado en agar EMB y APC para cuantificar el inóculo real de *Escherichia coli*.

A su vez, a partir del estándar de McFarland, donde se tiene un estimado de  $10^8$  UFC/mL, se realizó una dilución para llegar a la concentración de  $10^6$  UFC/mL, de la cual se tomó 1 mL y se llevó a un volumen de 99 mL de solución salina estéril al 0.85%, teniendo una concentración teórica de  $10^4$  UFC/mL (concentración teórica de 10,000 UFC/mL), de esta dilución se inculó 1 mL en cada porción de muestra, donde ya se había adicionado a *Listeria monocytogenes* (en una concentración real de 2 UFC/mL).

Se obtuvieron los siguientes resultados:

**Tabla No. 25** Recuentos para la determinación del tamaño de inóculo de *Escherichia coli*. Matriz Queso Procesado Americano.

Repetición	Recuento (UFC/mL) APC	Recuento (UFC/mL) EMB
1	137	162
2	148	168
3	150	161
4	146	165
5	138	163
6	142	157
<b>Promedio por agar</b>	143.50	162.67
<b>Promedio general</b>	<b>153.08 <math>\approx</math> 150 UFC/mL</b>	
<b>Inóculo real</b>	<b>150.00 UFC/25g</b>	

Fuente: Elaboración propia.

Partiendo de los resultados anteriores, el inóculo real utilizado de *Escherichia coli* ATCC 25922 fue de 150 UFC/25 g.

Mientras que la concentración real añadida fue de **7,500 UFC/mL**

200 UFC/mL----- 150 UFC/mL

10,000 UFC/mL----- X

$$X = 7,500 \text{ UFC/mL}$$

## 6.0. RESULTADOS POR PARÁMETRO DE DESEMPEÑO Y CONFIRMACIÓN DE VIABILIDAD E IDENTIFICACIÓN

### 6.1.1. PRIMERA MATRIZ: QUESO CREMA (QC)

Los parámetros de desempeño se realizaron, según lo establecido en el protocolo de la metodología para el aislamiento, detección e identificación de *Listeria monocytogenes* en alimentos, mediante método Screening Assurance GDS (Sistema de Detección Genética)

## VERIFICACIÓN DEL TAMAÑO DEL INÓCULO

### Microorganismo diana

Se obtuvieron los siguientes resultados:

#### *Listeria monocytogenes*

**Matriz: Queso Crema (QC)**

**Analista: Licda. Claudia Osorio**

**Fecha de realización: 24/09/25 al 01/10/25**

**Tabla No. 26** Recuentos para la determinación del límite de detección de *Listeria monocytogenes*. Matriz Queso Crema.

Repetición	Recuento (UFC/mL) APC	Recuento (UFC/mL) PAL	Recuento (UFC/mL) OXA
1	128	103	119
2	137	116	113
3	113	101	114
4	121	112	120
5	123	116	121
6	110	119	115
<b>Promedio por agar</b>	<b>122.00</b>	<b>111.17</b>	<b>117.00</b>
<b>Promedio general</b>	<b>116.72 <math>\approx</math> 120 UFC/mL</b>		

Fuente: Elaboración propia.

**Tabla No. 27** Inóculo teórico durante la validación. Matriz Queso Crema.

Dilución	Alicuota a partir de solución madre (mL)	Volumen de solución salina estéril (mL)	Inóculo teórico
2	2	98	4 UFC/25g

Fuente: Elaboración propia.

**Tabla No. 28** Inóculo real durante la validación. Matriz Queso Crema.

Promedio general	Inóculo en alícuota	Inóculo en dilución final	Inóculo real
116.72	233.44	2.33	<b>2 UFC/25g</b>

Fuente: Elaboración propia.

Siendo, por tanto, el inóculo real utilizado de 2 UFC/25g para la matriz del queso crema.

### Microorganismo no diana

Se obtuvieron los siguientes resultados:

#### *Escherichia coli*

**Matriz: Queso Crema (QC)**

**Analista: Licda. Claudia Osorio**

**Fecha de realización: 24/09/25 al 01/10/25**

**Tabla No. 29** Recuentos para la determinación del tamaño de inóculo de *Escherichia coli*. Matriz Queso Crema.

Repetición	Recuento (UFC/mL) APC	Recuento (UFC/mL) EMB
1	153	148
2	159	120
3	157	141
4	150	127
5	156	138
6	159	136
<b>Promedio por agar</b>	155.67	135.00
<b>Promedio general</b>	<b>145.33 <math>\approx</math> 150 UFC/mL</b>	
<b>Inóculo real</b>	<b>150.00 UFC/ 25 g</b>	

Fuente: Elaboración propia.

*Escherichia coli*, como microorganismo interferente, se trabajó con un inóculo real de 150 UFC/25g.

Mientras que la concentración real añadida fue **de 7,500 UFC/mL**

200 UFC/mL----- 150 UFC/mL

10,000 UFC/mL----- X

**X = 7,500 UFC/mL**

### VERIFICACIÓN DE LA MUESTRA

Para este parámetro se analizó 3 porciones de muestra por tipo de alimento, siguiendo el método de prueba AOAC Performance Tested Method 070702.

**Tabla No. 30** Verificación de la muestra. Matriz Queso Crema.

Muestra	Fecha de ingreso	Motivo de ingreso	Fecha de análisis	Peso de la muestra (g)	Resultado	Analista
Queso crema (QC)	No aplica	Obtenida comercialmente	24/09/25-01/10/25	25.42	Sin crecimiento	Licda. Claudia Osorio
				25.25		
				25.03		

Fuente: Elaboración propia.

Tal como se observa, ninguna de las muestras analizadas, utilizadas en los ensayos respectivos reportaron presencia de *Listeria monocytogenes*, dando cumplimiento a lo establecido en el protocolo correspondiente.

Durante la ejecución de la validación, se llevaron tres blancos de muestra para descartar interferencias derivadas de la matriz. Así mismo, se emplearon controles de calidad adicionales, entre ellos un blanco reactivo, que permitió confirmar el adecuado estado de los reactivos, y un pocillo con agua libre de ADNAsas, que aseguró la integridad del ADN y la ausencia de degradación por contaminación. Todos estos controles se trabajaron bajo las mismas condiciones que las muestras positivas fortificadas.

### VERIFICACIÓN DEL LÍMITE DE DETECCIÓN

Cada analista realizó el análisis de 6 porciones de muestra fortificada con 2 UFC/mL del microorganismo diana (*Listeria monocytogenes*), logrando recuperar al menos el 80% del inóculo por cada tipo de alimento, siguiendo el método de prueba AOAC Performance Tested Method 070702.

**Tabla No. 31** Verificación del límite de detección. Matriz Queso Crema.

Muestra	Repetición	Peso de muestra (g)	Analista	Fecha de análisis	Inóculo real	Resultado	Conclusión
Queso crema (QC)	1	25.10	Br. Vanessa Solórzano	1/10/25	2 UFC /25g	<i>Listeria monocytogenes</i>	El método es capaz de recuperar <i>Listeria monocytogenes</i> al estar presente en una concentración menor a 5 UFC/25g
	2	25.02					
	3	25.05					
	4	25.17					
	5	25.06					
	6	25.00					
Queso crema (QC)	1	25.01	Tec. Jacqueline Duke	24/09/25-1/10/25	2 UFC /25g	<i>Listeria monocytogenes</i>	El método es capaz de recuperar <i>Listeria monocytogenes</i> al estar presente en una concentración menor a 5 UFC/25g
	2	25.04					
	3	25.07					
	4	25.03					
	5	25.01					
	6	25.01					
Queso crema (QC)	1	25.34	Licda. Claudia Osorio	24/09/25-1/10/25	2 UFC /25g	<i>Listeria monocytogenes</i>	El método es capaz de recuperar <i>Listeria monocytogenes</i> al estar presente en una concentración menor a 5 UFC/25g
	2	25.15					
	3	25.42					
	4	25.05					
	5	25.27					
	6	25.63					

Fuente: Elaboración propia.

**Tabla No. 32** Resumen de resultados de verificación del límite de detección. Matriz Queso Crema.

Analista	Límite de detección en 100% de las muestras	Conclusión
	Queso Crema (QC)	
Br. Vanessa Solórzano	2 UFC/25g	Se tiene un límite de detección menor a 5 UFC/25g en el 100% de las muestras, con lo que se cumple con lo establecido en el protocolo correspondiente
Tec. Jacqueline Duke	2 UFC/25g	
Licda. Claudia Osorio	2 UFC/25g	

Fuente: Elaboración propia.

### FALSOS POSITIVOS

Para este parámetro, cada analista fortificó 6 porciones de muestra, ya que estas no presentaron crecimiento alguno de microorganismos propios de la muestra, con el microorganismo interferente *Escherichia coli* ATCC 25922 a una concentración de 150 UFC/25g (concentración real añadida fue de 7,500 UFC/mL) y adicionando la alícuota de *Listeria monocytogenes* indicada (inóculo real de 2 UFC/25g) a la misma muestra para determinar la acción del microorganismo interferente y garantizar que su presencia no genera un resultado falso positivo. Se debe obtener un 100% de resultados positivos verdaderos y un 0% de resultados falsos positivos, con el fin de demostrar que el método es apto a pesar de las posibles interferencias en la muestra.

**Tabla No. 33** Falsos positivos. Matriz Queso Crema.

Muestra	Analista	Microorganismo interferente	Microorganismo de interés añadido	Resultado	Conclusión
1	Br. Vanessa Solórzano	<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	<i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 19114	<i>Listeria monocytogenes</i>	Se tiene un 100% de resultados positivos verdaderos, un 0% de resultados falsos positivos. Por lo que el método demuestra la identificación de <i>Listeria monocytogenes</i> en alimentos lácteos
2					
3					
4					
5					
6					
1	Tec. Jacqueline Duke				
2					
3					
4					
5					
6					

1	Licda. Claudia Osorio				procesados pese a la presencia de microorganismos interferentes competitivos
2					
3					
4					
5					
6					

Fuente: Elaboración propia.

## ESTIMACIÓN DE INCERTIDUMBRE

El concepto de incertidumbre no puede ser aplicado directamente a métodos cualitativos en pruebas microbiológicas por lo que solo se mencionan las fuentes:

- Homogenización
- Diluciones y volúmenes
- Temperatura de incubación
- Tiempo transcurrido hasta la inoculación
- Personal operativo
- Mediciones (pesada o medición de la muestra)
- Distribución del microorganismo dentro de la muestra
- Efecto de la matriz
- Calidad de los medios de cultivo y reactivos

### 6.1.2. SEGUNDA MATRIZ: QUESO PROCESADO AMERICANO (QPA)

Los parámetros de desempeño se realizaron, según lo establecido en el protocolo de la metodología para el aislamiento, detección e identificación de *Listeria monocytogenes* en alimentos, mediante método Screening Assurance GDS (Sistema de Detección Genética)

## VERIFICACIÓN DEL TAMAÑO DEL INÓCULO

### Microorganismo diana

Se obtuvieron los siguientes resultados:

*Listeria monocytogenes*

**Matriz: Queso Procesado Americano (QPA)**

**Analista: Licda. Claudia Osorio**

**Fecha de realización: 08/10/25 al 15/10/25**

**Tabla No. 34** Recuentos para la determinación del límite de detección de *Listeria monocytogenes*. Matriz Queso Procesado Americano.

Repetición	Recuento (UFC/mL) APC	Recuento (UFC/mL) PAL	Recuento (UFC/mL) OXA
1	137	108	130
2	144	120	129
3	148	117	130
4	129	115	116
5	132	111	126
6	146	105	124
<b>Promedio por agar</b>	<b>139.33</b>	<b>112.67</b>	<b>125.83</b>
<b>Promedio general</b>	<b>126.00 <math>\approx</math> 130 UFC/mL</b>		

Fuente: Elaboración propia.

**Tabla No. 35** Inóculo teórico durante la validación. Matriz Queso Procesado Americano.

Dilución	Alicuota a partir de solución madre (mL)	Volumen de solución salina estéril (mL)	Inóculo teórico
2	2	98	<b>4 UFC/25g</b>

Fuente: Elaboración propia.

**Tabla No. 36** Inóculo real durante la validación. Matriz Queso Procesado Americano.

Promedio general	Inóculo en alicuota	Inóculo en dilución final	Inóculo real
126.00	252.00	2.52	<b>2 UFC/25g</b>

Fuente: Elaboración propia.

### Microorganismo no diana

Se obtuvieron los siguientes resultados:

#### *Escherichia coli*

**Matriz: Queso Procesado Americano (QPA)**

**Analista: Licda. Claudia Osorio**

**Fecha de realización: 08/10/25 al 15/10/25**

**Tabla No. 37** Recuentos para la determinación del tamaño de inóculo de *Escherichia coli*. Matriz Queso Procesado Americano.

Repetición	Recuento (UFC/mL) APC	Recuento (UFC/mL) EMB
1	137	162
2	148	168
3	150	161
4	146	165
5	138	163
6	142	157
<b>Promedio por agar</b>	143.50	162.67
<b>Promedio general</b>	<b>153.08 <math>\approx</math> 150 UFC/mL</b>	
<b>Inóculo real</b>	<b>150.00 UFC/ 25 g</b>	

Fuente: Elaboración propia.

*Escherichia coli*, como microorganismo interferente, se trabajó con un inóculo real de 150 UFC/25g.

Mientras que la concentración real añadida fue **de 7,500 UFC/mL**

200 UFC/mL----- 150 UFC/mL

10,000 UFC/mL----- X

$$X = 7,500 \text{ UFC/mL}$$

## VERIFICACIÓN DE LA MUESTRA

Para este parámetro se analizó 3 porciones de muestra por tipo de alimento, siguiendo el método de prueba AOAC Performance Tested Method 070702.

**Tabla No. 38** Verificación de la muestra. Matriz Queso Procesado Americano.

Muestra	Fecha de ingreso	Motivo de ingreso	Fecha de análisis	Peso de la muestra (g)	Resultado	Analista
Queso procesado americano (QPA)	No aplica	Obtenida comercialmente	08/10/25-15/10/25	25.08	Sin crecimiento	Licda. Claudia Osorio
				25.02		
				25.11		

Fuente: Elaboración propia.

Tal como se observa, ninguna de las muestras analizadas, utilizadas en los ensayos respectivos reportaron presencia de *Listeria monocytogenes*, dando cumplimiento a lo establecido en el protocolo correspondiente.

Durante la ejecución de la validación, se llevaron tres blancos de muestra para descartar interferencias derivadas de la matriz. Así mismo, se emplearon controles de calidad adicionales, entre ellos un blanco reactivo, que permitió confirmar el adecuado estado de los reactivos, y un pocillo con agua libre de ADNAsas, que aseguró la integridad del ADN y la ausencia de degradación por contaminación. Todos estos controles se trabajaron bajo las mismas condiciones que las muestras positivas fortificadas.

#### VERIFICACIÓN DEL LÍMITE DE DETECCIÓN

Cada analista realizó el análisis de 6 porciones de muestra fortificada con 2 UFC/mL del microorganismo diana (*Listeria monocytogenes*), logrando recuperar al menos el 80% del inóculo por cada tipo de alimento, siguiendo el método de prueba AOAC Performance Tested Method 070702.

**Tabla No. 39** Verificación del límite de detección. Matriz Queso Procesado Americano.

Muestra	Repetición	Peso de muestra (g)	Analista	Fecha de análisis	Inóculo real	Resultado	Conclusión
	1	25.14					

<b>Queso procesado americano (QPA)</b>	2	25.11	Br. Vanessa Solórzano	08/10/25-15/10/25	2 UFC /25g	<i>Listeria monocytogenes</i>	El método es capaz de recuperar <i>Listeria monocytogenes</i> al estar presente en una concentración menor a 5 UFC/25g
	3	25.14					
	4	25.03					
	5	25.28					
	6	25.05					
<b>Queso procesado americano (QPA)</b>	1	25.08	Tec. Jacqueline Duke	08/10/25-15/10/25	2 UFC /25g	<i>Listeria monocytogenes</i>	El método es capaz de recuperar <i>Listeria monocytogenes</i> al estar presente en una concentración menor a 5 UFC/25g
	2	25.06					
	3	25.03					
	4	25.04					
	5	25.08					
	6	25.05					
<b>Queso procesado americano (QPA)</b>	1	25.09	Licda. Claudia Osorio	08/10/25-15/10/25	2 UFC /25g	<i>Listeria monocytogenes</i>	El método es capaz de recuperar <i>Listeria monocytogenes</i> al estar presente en una concentración menor a 5 UFC/25g
	2	25.10					
	3	25.06					
	4	25.08					
	5	25.07					
	6	25.02					

Fuente: Elaboración propia.

**Tabla No. 40** Resumen de resultados de verificación del límite de detección. Matriz Queso Procesado Americano.

Analista	Límite de detección en 100% de las muestras	Conclusión
	Queso Procesado Americano (QPA)	
Br. Vanessa Solórzano	2 UFC/25g	Se tiene un límite de detección menor a 5 UFC/25g en el 100% de las muestras, con lo que se cumple con lo establecido en el protocolo correspondiente
Tec. Jacqueline Duke	2 UFC/25g	
Licda. Claudia Osorio	2 UFC/25g	

Fuente: Elaboración propia.

### FALSOS POSITIVOS

Para este parámetro, cada analista fortificó 6 porciones de muestra, ya que estas no presentaron crecimiento alguno de microorganismos propios de la muestra, con el microorganismo interferente *Escherichia coli* ATCC 25922 a una concentración de 150 UFC/25g (concentración real añadida fue de 7,500 UFC/mL) y adicionando la alícuota de *Listeria monocytogenes* indicada (inóculo real de 2 UFC/25g) a la misma muestra para determinar la acción del microorganismo interferente y garantizar que su presencia no genera un resultado falso positivo.

Se debe obtener un 100% de resultados positivos verdaderos y un 0% de resultados falsos positivos, con el fin de demostrar que el método es apto a pesar de las posibles interferencias en la muestra.

**Tabla No. 41** Falsos positivos. Matriz Queso Procesado Americano.

Muestra	Analista	Microorganismo interferente	Microorganismo de interés añadido	Resultado	Conclusión
1	Br. Vanessa Solórzano				Se tiene un 100% de resultados positivos verdaderos, un 0% de resultados falsos positivos. Por lo que el método
2					
3					
4					
5					
6					

1	Tec. Jacqueline Duke	<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	<i>Listeria</i> <i>monocytogenes</i> ATCC 19114	<i>Listeria</i> <i>monocytogenes</i>	demuestra la identificación de <i>Listeria</i> <i>monocytogenes</i> en alimentos lácteos procesados pese a la presencia de microorganismos interferentes competitivos				
2									
3									
4									
5									
6									
1	Licda. Claudia Osorio					<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	<i>Listeria</i> <i>monocytogenes</i> ATCC 19114	<i>Listeria</i> <i>monocytogenes</i>	demuestra la identificación de <i>Listeria</i> <i>monocytogenes</i> en alimentos lácteos procesados pese a la presencia de microorganismos interferentes competitivos
2									
3									
4									
5									
6									

Fuente: Elaboración propia.

## ESTIMACIÓN DE INCERTIDUMBRE

El concepto de incertidumbre no puede ser aplicado directamente a métodos cualitativos en pruebas microbiológicas por lo que solo se mencionan las fuentes:

- Homogenización
- Diluciones y volúmenes
- Temperatura de incubación
- Tiempo transcurrido hasta la inoculación
- Personal operativo
- Mediciones (pesada o medición de la muestra)
- Distribución del microorganismo dentro de la muestra
- Efecto de la matriz
- Calidad de los medios de cultivo y reactivos

**Tabla No. 42** Resumen de los parámetros de desempeño para ambas matrices.

Parámetros	Criterios de aceptación	Resultados		Conclusión
		Queso Crema (QC)	Queso Procesado Americano (QPA)	
<b>Verificación del inóculo</b>	Al verificar el tamaño del inóculo por lo menos 6 veces, en promedio, se obtiene cuentas de menos 10 UFC y ninguna de 10 UFC o mas	2 UFC (Licda. Claudia Osorio)	2 UFC (Licda. Claudia Osorio)	<b>Cumple criterio</b>
<b>Verificación de la muestra</b>	Las muestras sin inocular que se analizaron no deberán dar ninguno resultado positivo a <i>Listeria monocytogenes</i>	Muestras sin crecimiento alguno (Licda. Claudia Osorio)	Muestras sin crecimiento alguno (Licda. Claudia Osorio)	<b>Cumple criterio</b>
<b>Verificación del límite de detección</b>	El tamaño del inóculo debe ser menor a 5 UFC	2 UFC/25g (Br. Vanessa Solórzano, Tec. Jacqueline Duke y Licda. Claudia Osorio)	2 UFC/25g (Br. Vanessa Solórzano, Tec. Jacqueline Duke y Licda. Claudia Osorio)	<b>Cumple criterio</b>
<b>Falsos positivos</b>	Ninguna de las porciones de muestra en análisis deben dar como resultado un falso positivo	100% positividad 0% falsos positivos (Br. Vanessa Solórzano, Tec. Jacqueline Duke y Licda. Claudia Osorio)	100% positividad 0% falsos positivos (Br. Vanessa Solórzano, Tec. Jacqueline Duke y Licda. Claudia Osorio)	<b>Cumple criterio</b>

Fuente: Elaboración propia.

### 6.1.3. CONFIRMACIÓN DE VIABILIDAD E IDENTIFICACIÓN

El método GDS (Sistema de Detección Genética) es un método de detección rápido y altamente sensible, pero una de sus desventajas es que indica la presencia del material genético (ADN) incluso si las bacterias ya no son viables.

Es decir, un resultado positivo en GDS indica la posible presencia de *Listeria monocytogenes*. Por esta razón, se debe realizar la confirmación de la viabilidad e identificación del microorganismo de la siguiente manera:

- **Aislamiento:**

Cada muestra positiva en GDS se sembró por estriado en Agar Oxford (OXA) y Agar Palcam (PAL) que son medios altamente especializados diseñados para aislar e identificar a *Listeria monocytogenes* mediante la combinación de propiedades selectivas (inhibir a otros microorganismos) y diferenciales (mostrar características específicas).

En Agar OXA, el crecimiento característico es una colonia de color negro rodeada por un halo negro, y un ennegrecimiento del medio debido a la capacidad de *Listeria* para hidrolizar la esculina en un compuesto fenólico negro.

Mientras que en Agar PAL, el crecimiento característico es una colonia de color verde grisáceo rodeadas por un halo negro. Una diferenciación clave del medio, es que contiene manitol y rojo fenol, *Listeria monocytogenes* no fermenta el manitol, por lo que el color rojo inicial del medio se mantiene sin cambios. Al igual que en el agar Oxford, el ennegrecimiento del medio se produce por la hidrólisis de la esculina.

Los resultados obtenidos para ambas matrices fueron los siguientes:

**Tabla No. 43** Resultados de siembra en agares selectivos.

Queso Crema (QC)				Queso Procesado Americano (QPA)			
Analista	Muestra	Agar OXA	Agar PAL	Analista	Muestra	Agar OXA	Agar PAL
Br. Vanessa Solórzano	QC 1	Crecimiento característico	Crecimiento característico	Br. Vanessa Solórzano	QC 1	Crecimiento característico	Crecimiento característico
	QC 3				QC 2		
	QC 4				QC 3		
	QC 5				QC 4		
	QC 6				QC 5		
	QC 7				QC 6		
Tec. Jacqueline Duke	QC 1 JD	Crecimiento característico	Crecimiento característico	Tec. Jacqueline Duke	QC 1 JD	Crecimiento característico	Crecimiento característico
	QC 2 JD				QC 2 JD		
	QC 4 JD				QC 3 JD		
	QC 5 JD				QC 4 JD		
	QC 6 JD				QC 5 JD		

	QC 7 JD				QC 6 JD		
Licda. Claudia Osorio	QC 1 CO	Crecimiento característico	Crecimiento característico	Licda. Claudia Osorio	QC 1 CO	Crecimiento característico	Crecimiento característico
	QC 2 CO				QC 2 CO		
	QC 3 CO				QC 3 CO		
	QC 4 CO				QC 4 CO		
	QC 5 CO				QC 6 CO		
	QC 6 CO				QC 7 CO		

Fuente: Elaboración propia.

A su vez, por cada matriz se llevaron 3 blancos de muestra, los cuales no presentaron crecimiento alguno en agar OXA y en agar PAL. Estos fueron realizados bajo las mismas condiciones que las demás muestras.

- **Confirmación de viabilidad e identificación**

Las muestras de cada analista estriadas en agar OXA y agar PAL se inocularon en agar TSAye con la finalidad de obtener colonias aisladas y puras. Este paso permitió disponer de cultivos libres de interferencia de otros microorganismos al momento de efectuar las pruebas bioquímicas, asegurando así la confiabilidad de los resultados.

A continuación, se realizaron las pruebas bioquímicas para confirmar que el microorganismo aislado correspondía *Listeria monocytogenes* viable:

- **Tinción de Gram:** Es una técnica de tinción diferencial que permite clasificar las bacterias en dos grandes grupos (gram positivas y gram negativas) basándose en las diferencias en la composición de su pared celular. En el caso, de las muestras presuntivas de *Listeria monocytogenes* en las matrices de queso crema y queso procesado americano, la morfología característica bajo el microscópico fue una bacteria de color morado o violeta (es decir, es una bacteria gram positiva), en forma de bacilo corto.
- **Catalasa:** Esta prueba detecta la presencia de la enzima catalasa, que descompone el peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno gaseoso. El resultado positivo es la formación inmediata de burbujas visibles a simple vista (efervescencia), estas burbujas son el oxígeno liberado. En el caso de las muestras presuntivas de *Listeria monocytogenes* en las matrices queso crema y queso procesado americano, se obtuvo un resultado positivo a esta prueba.

- **Oxidasa:** Esta prueba detecta la presencia de la enzima citocromo c oxidasa, un componente de la cadena de transporte de electrones en la respiración aeróbica. El resultado positivo es la visualización de un cambio de color en el área donde se aplicó la bacteria, el cual se vuelve de color púrpura intenso en un plazo de 10 segundos. En el caso de las muestras presuntivas de *Listeria monocytogenes* en las matrices de queso crema y queso procesado americano, se obtuvo un resultado negativo a esta prueba, ya que no ocurre ningún cambio de color.
- **Movilidad:** La prueba de movilidad es un método utilizado para determinar si una bacteria es capaz de moverse activamente por sí misma mediante el uso de flagelos. En la presente validación, esta prueba se realizó en un medio semisólido (en tubo) donde se inoculó la bacteria mediante una punción recta con una asa en el centro del tubo que contiene agar movilidad. En el caso de las muestras presuntivas de *Listeria monocytogenes* en las matrices de queso crema y queso procesado americano, se presentó un resultado positivo, la bacteria se mueve activamente fuera de la línea de punción, creando turbidez difusa en forma de “paraguas”.

**Tabla No. 44** Resultados de tinción de gram y catalasa para ambas matrices.

Queso Crema (QC)				Queso Procesado Americano (QPA)			
Analista	Muestra	Tinción de gram	Catalasa	Analista	Muestra	Tinción de gram	Catalasa
Br. Vanessa Solórzano	QC 1	Bacilo corto (gram positiva)	Positiva	Br. Vanessa Solórzano	QC 1	Bacilo corto (gram positiva)	Positiva
	QC 3				QC 2		
	QC 4				QC 3		
	QC 5				QC 4		
	QC 6				QC 5		
	QC 7				QC 6		
Tec. Jacqueline Duke	QC 1 JD		Positiva	Tec. Jacqueline Duke	QC 1 JD		Positiva
	QC 2 JD				QC 2 JD		

	QC 4 JD	Bacilo corto (gram positiva)			QC 3 JD	Bacilo corto (gram positiva)	
	QC 5 JD				QC 4 JD		
	QC 6 JD				QC 5 JD		
	QC 7 JD				QC 6 JD		
Licda. Claudia Osorio	QC 1 CO	Bacilo corto (gram positiva)	Positiva	Licda. Claudia Osorio	QC 1 CO	Bacilo corto (gram positiva)	Positiva
	QC 2 CO				QC 2 CO		
	QC 3 CO				QC 3 CO		
	QC 4 CO				QC 4 CO		
	QC 5 CO				QC 6 CO		
	QC 6 CO				QC 7 CO		

Fuente: Elaboración propia.

**Tabla No. 45** Resultados de oxidasa y movilidad para ambas matrices.

Queso Crema (QC)				Queso Procesado Americano (QPA)			
Analista	Muestra	Oxidasa	Movilidad	Analista	Muestra	Oxidasa	Movilidad
Br. Vanessa Solórzano	QC 1	Negativa	Positiva	Br. Vanessa Solórzano	QC 1	Negativa	Positiva
	QC 3				QC 2		
	QC 4				QC 3		
	QC 5				QC 4		
	QC 6				QC 5		
	QC 7				QC 6		
Tec. Jacqueline Duke	QC 1 JD	Negativa	Positiva	Tec. Jacqueline Duke	QC 1 JD	Negativa	Positiva
	QC 2 JD				QC 2 JD		
	QC 4 JD				QC 3 JD		
	QC 5 JD				QC 4 JD		
	QC 6 JD				QC 5 JD		
	QC 7 JD				QC 6 JD		
	QC 1 CO				QC 1 CO		Positiva

Licda. Claudia Osorio	QC 2 CO	Negativa	Positiva	Licda. Claudia Osorio	QC 2 CO	Negativa	
	QC 3 CO				QC 3 CO		
	QC 4 CO				QC 4 CO		
	QC 5 CO				QC 6 CO		
	QC 6 CO				QC 7 CO		

Fuente: Elaboración propia.

- **Galería API *Listeria*:** Consiste en un sistema estandarizado y miniaturizado de pruebas bioquímicas diseñado específicamente para la identificación rápida y precisa de especies del género *Listeria*. El método emplea una tira plástica que contiene 10 pocillos o microtubos, cada uno con un sustrato bioquímico deshidratado diferente. Esta prueba nos permitió definir el género y especie de la bacteria en análisis mediante la generación de un perfil bioquímico completo lo que facilitó la diferenciación de *Listeria monocytogenes* frente a otras especies del género *Listeria* y frente a bacterias con características similares.

El procedimiento implicó la preparación del inóculo; para ello se realizó un subcultivo desde las colonias con crecimiento característico obtenidas en las placas de agar OXA y PAL a una placa de agar TSAye, con el objetivo de obtener un cultivo puro y viable en un medio de enriquecimiento general. Después de sembrar por estría en una placa de agar TSAye, se incubó a 35 °C por 24h y se utilizaron las colonias frescas de esta placa para preparar la suspensión bacteriana que se empleó para inocular la galería API *Listeria*. Cada analista registró los resultados obtenidos en cada pocillo (positivo o negativo), con lo cual se obtuvo un código numérico que permitió una identificación probabilística a nivel de género y especie.

**Tabla No. 46** Identificación API *Listeria*.

Queso Crema (QC)			Queso Procesado Americano (QPA)		
Analista	Muestra	Galería API <i>Listeria</i>	Analista	Muestra	Galería API <i>Listeria</i>
Br. Vanessa Solórzano	QC 1	98.5% <i>Listeria</i> <i>monocytogenes</i>	Br. Vanessa Solórzano	QC 1	98.5% <i>Listeria</i> <i>monocytogenes</i>
	QC 3			QC 2	
	QC 4			QC 3	
	QC 5			QC 4	

	QC 6			QC 5	
	QC 7			QC 6	
Tec. Jacqueline Duke	QC 1 JD	98.5% <i>Listeria</i> <i>monocytogenes</i>	Tec. Jacqueline Duke	QC 1 JD	98.5% <i>Listeria</i> <i>monocytogenes</i>
	QC 2 JD			QC 2 JD	
	QC 4 JD			QC 3 JD	
	QC 5 JD			QC 4 JD	
	QC 6 JD			QC 5 JD	
	QC 7 JD			QC 6 JD	
Licda. Claudia Osorio	QC 1 CO	98.5% <i>Listeria</i> <i>monocytogenes</i>	Licda. Claudia Osorio	QC 1 CO	98.5% <i>Listeria</i> <i>monocytogenes</i>
	QC 2 CO			QC 2 CO	
	QC 3 CO			QC 3 CO	
	QC 4 CO			QC 4 CO	
	QC 5 CO			QC 6 CO	
	QC 6 CO			QC 7 CO	

Fuente: Elaboración propia.

En conclusión, fue fundamental realizar la confirmación de los resultados inicialmente positivos obtenidos mediante GDS, ya que el método detecta el material genético de la bacteria, sin distinguir entre células viables y no viables, por lo que se requiere la confirmación mediante métodos tradicionales. La confirmación de dichos resultados se realizó mediante pruebas bioquímicas (tinción de gram, catalasa, oxidasa, movilidad y galería API *Listeria*), las cuales demostraron la viabilidad, ya que se evidenció metabólicamente activa para crecer y producir las reacciones enzimáticas que permitieron su identificación.

## 7.0. CONCLUSIÓN

De acuerdo a los resultados obtenidos mediante la evaluación de cada uno de los parámetros de desempeño para la validación de la metodología para el aislamiento, detección e identificación de *Listeria monocytogenes* en alimentos, mediante método Screening Assurance GDS en la matriz de lácteos procesados, se evidencia de forma objetiva la aptitud del método, ya que se ha demostrado ser idónea para el fin previsto. Mediante los resultados obtenidos, se concluye, que el laboratorio puede determinar la presencia de *Listeria monocytogenes* a partir de 2 UFC/25g para las matrices de lácteos procesados.

## **CAPÍTULO V**

## 5.0 CONCLUSIONES

1. La modalidad de graduación mediante Prácticas Profesionales Supervisadas brinda a los futuros profesionales la posibilidad de incorporarse a entornos laborales reales, donde pueden poner en práctica los conocimientos adquiridos a lo largo de la carrera. Al mismo tiempo, permite obtener aprendizajes nuevos derivados de la experiencia cotidiana, comprendiendo directamente los desafíos que enfrenta el Químico Farmacéutico en su ejercicio profesional.
2. El diseño del protocolo de validación permitió establecer una guía técnica estandarizada que orientó de manera clara y sistemática la ejecución y evaluación del método Assurance GDS aplicado a productos lácteos procesados, asegurando uniformidad en los procedimientos, adecuada supervisión de las etapas del ensayo y confiabilidad en los resultados obtenidos.
3. La aplicación del protocolo de validación permitió evaluar de manera sistemática los parámetros de desempeño del método Assurance GDS, evidenciando resultados satisfactorios y una reducción significativa en el tiempo total de análisis en comparación con los métodos tradicionales.
4. El proceso de validación permitió estandarizar una metodología aplicable a matrices de lácteos procesados, productos de alta relevancia en el mercado nacional, consolidando al método validado como una herramienta eficaz para fortalecer la vigilancia microbiológica, mejorar la capacidad de respuesta ante riesgos sanitarios y apoyar la toma de decisiones en el control de calidad.
5. Los resultados obtenidos mediante la evaluación de cada parámetro de desempeño, evidencia la aptitud del método, ya que se ha demostrado ser idónea para el fin previsto. Por lo que, el laboratorio puede determinar la presencia de *Listeria monocytogenes* a partir de 2 UFC/25g para las matrices de lácteos procesados.
6. La elaboración del informe de validación permitió consolidar de manera sistemática la evidencia experimental del desempeño del método Assurance GDS en lácteos procesados, asegurando la trazabilidad y validez de los resultados, y estableciéndose como un documento técnico clave para la evaluación objetiva y el respaldo metodológico del método.

## **CAPÍTULO VI**

## 6.0 RECOMENDACIONES

1. A la Universidad de El Salvador se recomienda gestionar diversos programas de Prácticas Profesionales Supervisadas en instituciones afines a la carrera, con el objetivo de brindar a los egresados espacios adecuados para desarrollar su trabajo de grado y enriquecer su formación académica y profesional.
2. A la plataforma de Microbiología del Laboratorio de Investigación en Salud Ambiental y Toxicología, al elaborar futuros protocolos de validación considerar la realización de una evaluación de riesgos que puedan comprometer la integridad de la validación, con el fin de asegurar la confiabilidad, trazabilidad y validez de los resultados obtenidos.
3. A la plataforma de Microbiología del Laboratorio de Investigación en Salud Ambiental y Toxicología, mantener una revisión periódica de las políticas de validación de métodos microbiológicos, con el propósito de asegurar la actualización continua de los parámetros de desempeño que deben considerarse en futuras validaciones.
4. A la plataforma de Microbiología del Laboratorio de Investigación en Salud Ambiental y Toxicología, sistematizar los datos obtenidos durante el proceso de validación mediante el uso de plantillas y hojas de cálculo, con el propósito de organizar de manera estructurada la información, minimizar errores de cálculo y facilitar el análisis, interpretación y presentación de los resultados en el informe de validación.
5. A la plataforma de Microbiología del Laboratorio de Investigación en Salud Ambiental y Toxicología, considerar la ampliación futura de la validación hacia otras matrices alimentarias, con el fin de extender el alcance del método.

## **REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Organismo Salvadoreño de Acreditación. PO 9.4 Política para la validación y estimación de la incertidumbre de métodos microbiológicos [Internet]. San Salvador: Organismo Salvadoreño de Acreditación; 2014 [citado 2025 dic 6]. Disponible en: <http://www.osa.gob.sv/descarga/po-9-4-politica-para-la-validacion-y-estimacion-de-la-incertidumbre-de-metodos-microbiologicos/>
2. MilliporeSigma. Molecular detection for rapid food pathogen testing: Assurance® GDS genetic detection system [Internet]. Burlington (MA): Merck KGaA; 2023 [citado 2025 dic 6]. Disponible en: <https://www.sigmaaldrich.com>
3. Fortalecimiento de la seguridad alimentaria mediante PCR en tiempo real para la detección rápida de patógenos [Internet]. ResearchGate; 2025 [citado 2025 dic 6]. Disponible en: [https://www.researchgate.net/publication/395415912\\_Strengthening\\_Food\\_Safety\\_through\\_RealTime\\_PCR\\_for\\_Rapid\\_Pathogen\\_Detection](https://www.researchgate.net/publication/395415912_Strengthening_Food_Safety_through_RealTime_PCR_for_Rapid_Pathogen_Detection)
4. Ryan KJ, Ray CG. *Sherris medical microbiology*. 7th ed. New York: McGraw-Hill Education; 2018.
5. Quereda JJ, Morón-García A, Palacios-Gorba C, Dessaux C, García-Del Portillo F, Pucciarelli MG, et al. Patogenicidad y virulencia de *Listeria monocytogenes*: un viaje de la microbiología ambiental a la médica. *Virulence*. 2021;12(1):2509-2545. doi:10.1080/21505594.2021.1975526.
6. Rodríguez-Auad JP. Panorama de la infección por *Listeria monocytogenes*. *Revista Chilena de Infectología* [Internet]. 2018 [citado 2025 dic 5];35(6):649-657. Disponible en: [http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0716-10182018000600649&lng=es](http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0716-10182018000600649&lng=es)
7. Tovar Pérez GI, Castillo Ramírez I, Quiñónez Ramírez EI, Rodas Suárez OR. *Listeria*: una aproximación práctica al microorganismo. *Revista Digital Universitaria* [Internet]. 2005 [citado 2025 nov 14];6(4). Disponible en: <http://www.revista.unam.mx>

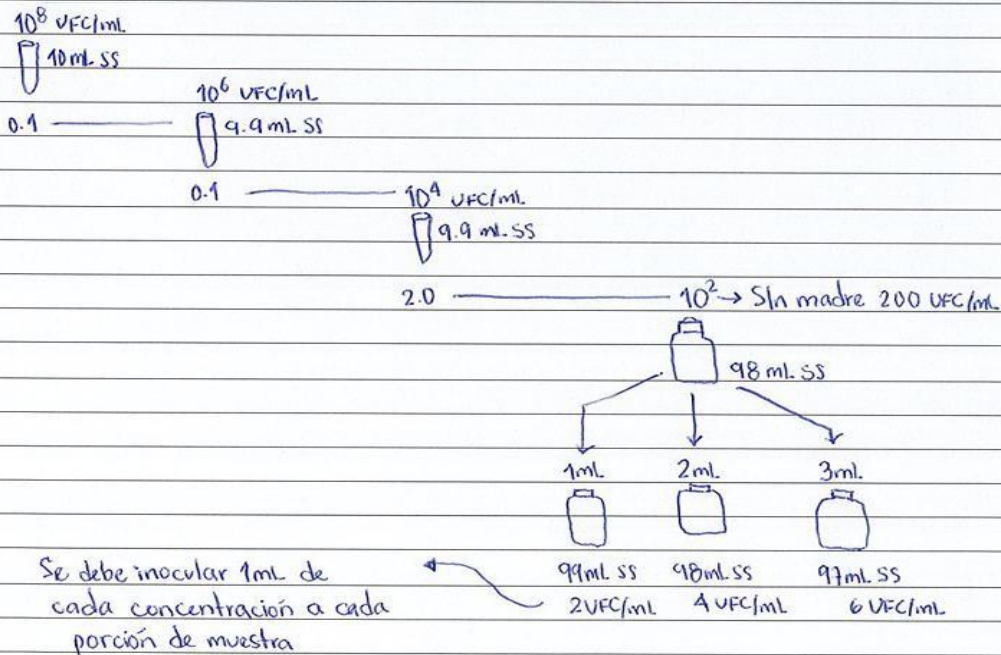
8. Osek J, Wieczorek K. Why does *Listeria monocytogenes* survive in food and food production environments? *Journal of Veterinary Research*. 2023;67(4):537-544. doi:10.2478/jvetres-2023-0068.
9. Camargo AC, Woodward JJ, Call DR, Nero LA. *Listeria monocytogenes* in food-processing facilities, food contamination, and human listeriosis: the Brazilian scenario. *Foodborne Pathogens and Disease*. 2017;14(11):623-636. doi:10.1089/fpd.2016.2274.
10. Osek J, Lachtara B, Wieczorek K. *Listeria monocytogenes* – how does this pathogen survive in food production environments? *Frontiers in Microbiology*. 2022;13:866462. doi:10.3389/fmicb.2022.866462.
11. Terra Food-Tech. ¿Para qué sirven los controles microbiológicos en la industria alimentaria? [Internet]. Terrassa (Barcelona): Terra Food-Tech; 2025 ene 27 [citado 2025 dic 6]. Disponible en: <https://www.terrafoodtech.com/para-que-sirven-los-controles-microbiologicos-en-la-industria-alimentaria/>
12. U.S. Food and Drug Administration. BAM Chapter 10: Detection of *Listeria monocytogenes* in foods and environmental samples, and enumeration of *Listeria monocytogenes* in foods [Internet]. Silver Spring (MD): FDA; [citado 2025 dic]. Disponible en: <https://www.fda.gov/food/laboratory-methods-food/bam-chapter-10-detection-listeria-monocytogenes-foods-and-environmental-samples-and-enumeration>
13. Ryser ET, Donnelly CW. *Listeria monocytogenes*. In: Salfinger Y, Tortorello ML, editors. *Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods*. 4th ed. Washington (DC): APHA Press; 2015.
14. International Organization for Standardization. ISO 11290-1:2017. Microbiology of the food chain — Horizontal method for the detection and enumeration of *Listeria monocytogenes* and of *Listeria* spp. Geneva: ISO; 2017.

15. Merck KGaA. Assurance® GDS, *Listeria monocytogenes* Tq [Internet]. Darmstadt: Merck KGaA; [citado 2025 dic]. Disponible en: <https://www.sigmaaldrich.com/deepweb/assets/sigmaaldrich/product/documents/474/289/71010bc-dfu-ug6412en-mk.pdf>
  
16. Khehra N, Padda IS, Zubair M. Polymerase chain reaction (PCR) [Internet]. In: StatPearls. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2025 [actualizado 2025 jul 7; citado 2025 dic 6]. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK589663/>
  
17. Analytica Alimentaria. Estrategias clave para el control de *Listeria monocytogenes* en la industria alimentaria [Internet]. Valencia (ES): Poscosecha.com; 2025 abr 25 [citado 2025 dic 7]. Disponible en: <https://www.poscosecha.com/analytica-alimentaria/estrategias-clave-para-en-control-de-listeria-monocytogenes-en-la-industria-alimentaria>

## **ANEXOS**

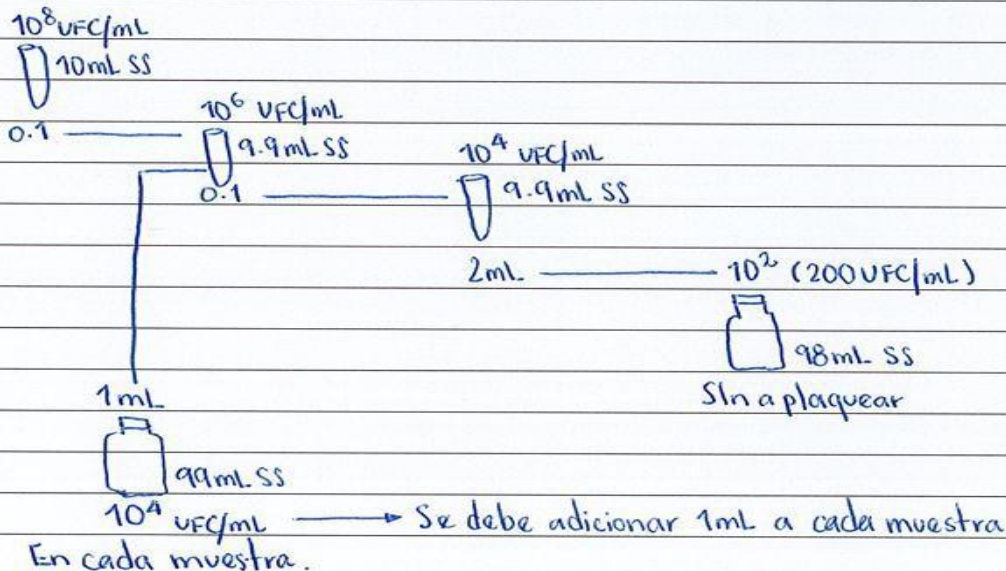
**ANEXO N° 1** Esquema de preparación del inóculo de *Listeria monocytogenes* (microorganismo diana) y *Escherichia coli* (Microorganismo no diana). Matriz Queso Crema.

Microorganismo Diana (Target): *Listeria monocytogenes* ATCC 19114



Los sextuplicados se tomaron de la solución madre de 10<sup>2</sup>, se realizaron en OXA, PAL y APC

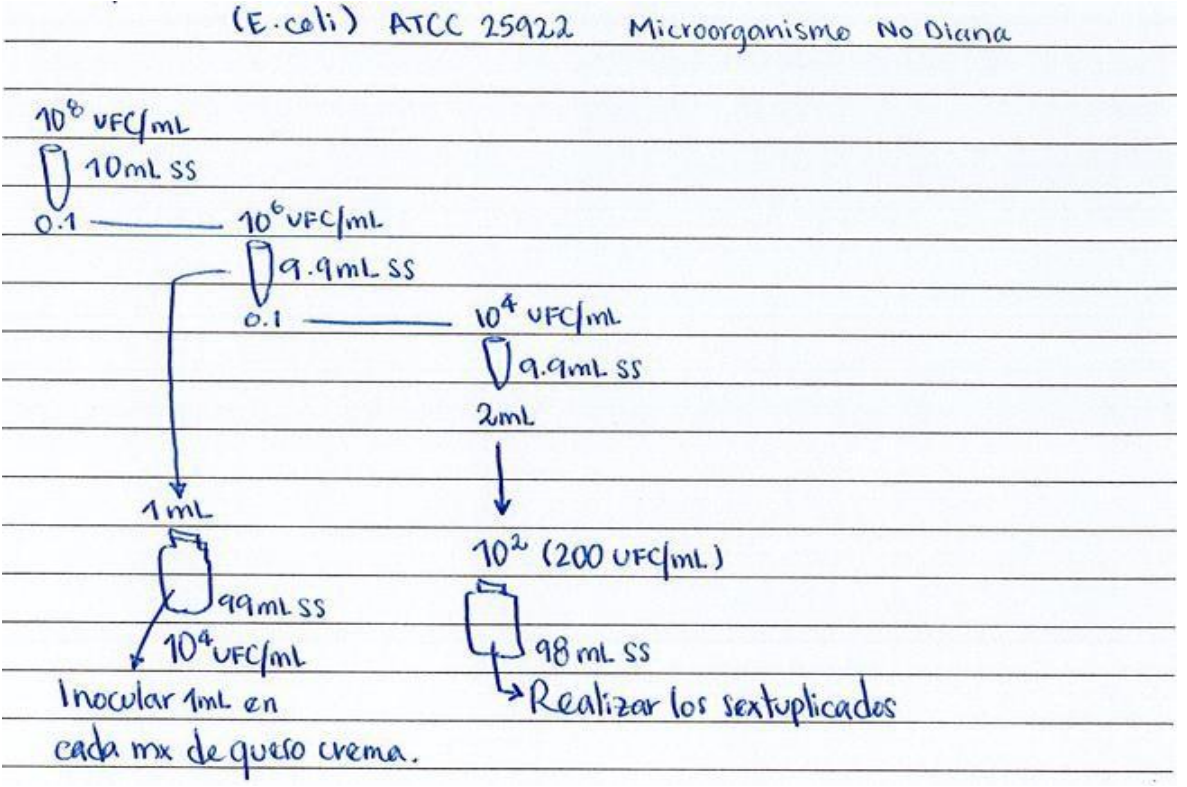
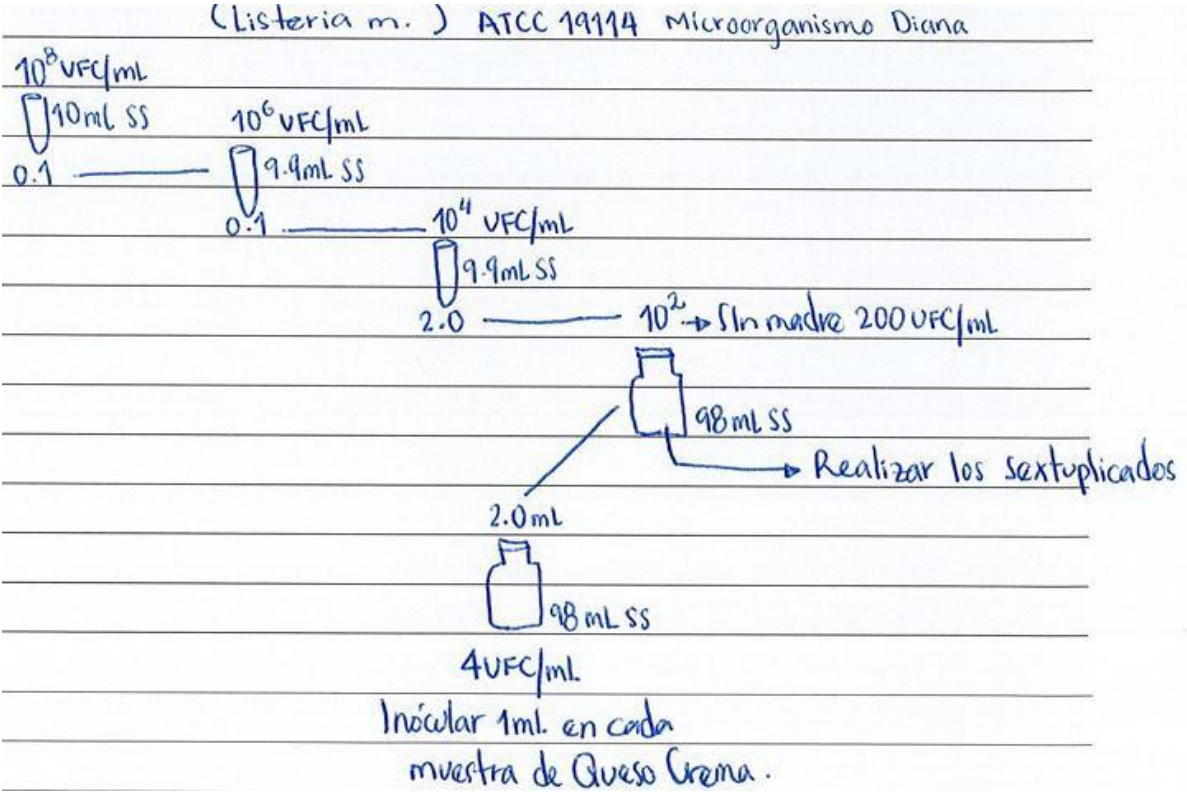
Microorganismo No Diana (No target): *Escherichia coli* ATCC 25922



Los sextuplicados se tomaron de la solución 10<sup>2</sup>, se realizaron en EMB y APC

Fuente: Elaboración propia.

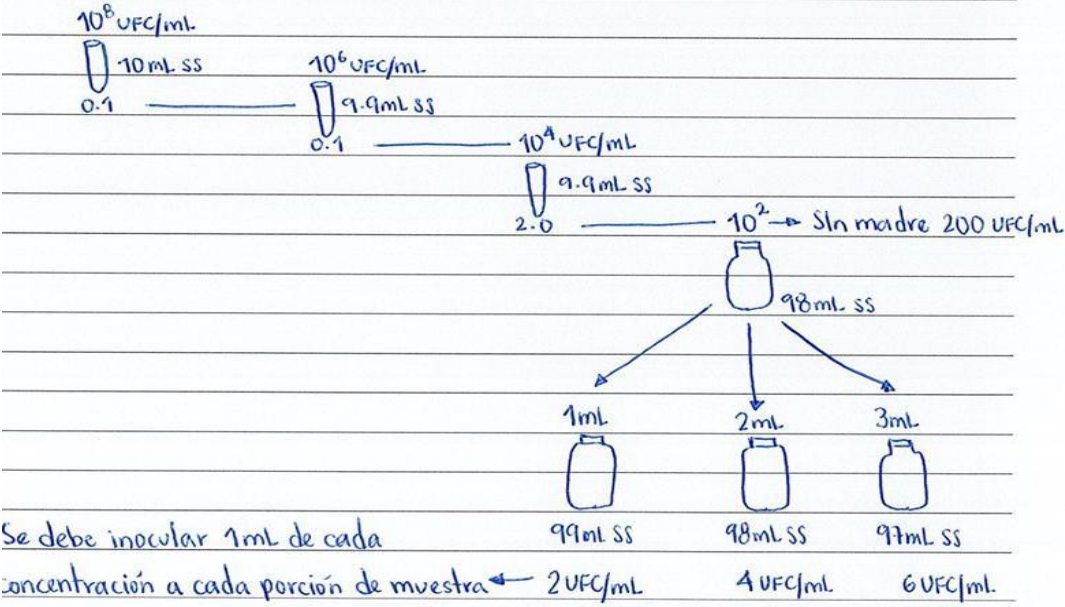
ANEXO N° 2 Esquema de fortificación de muestra de *Listeria monocytogenes* (microorganismo diana) y *Escherichia coli* (Microorganismo no diana). Matriz Queso Crema.



Fuente: Elaboración propia.

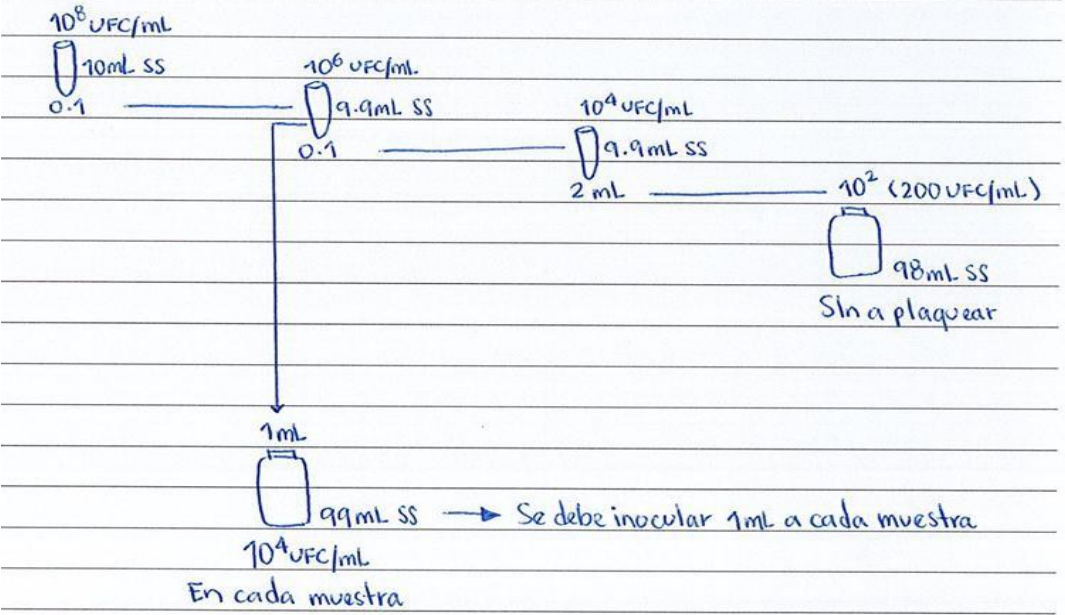
ANEXO N° 3 Esquema de preparación del inóculo de *Listeria monocytogenes* (microorganismo diana) y *Escherichia coli* (Microorganismo no diana). Matriz Queso Procesado Americano.

Microorganismo Diana (Target) : *Listeria monocytogenes* ATCC 19114



Los sextuplicados se tomaron de la solución madre de  $10^2$  se realizaron en OXA, PAL y APC

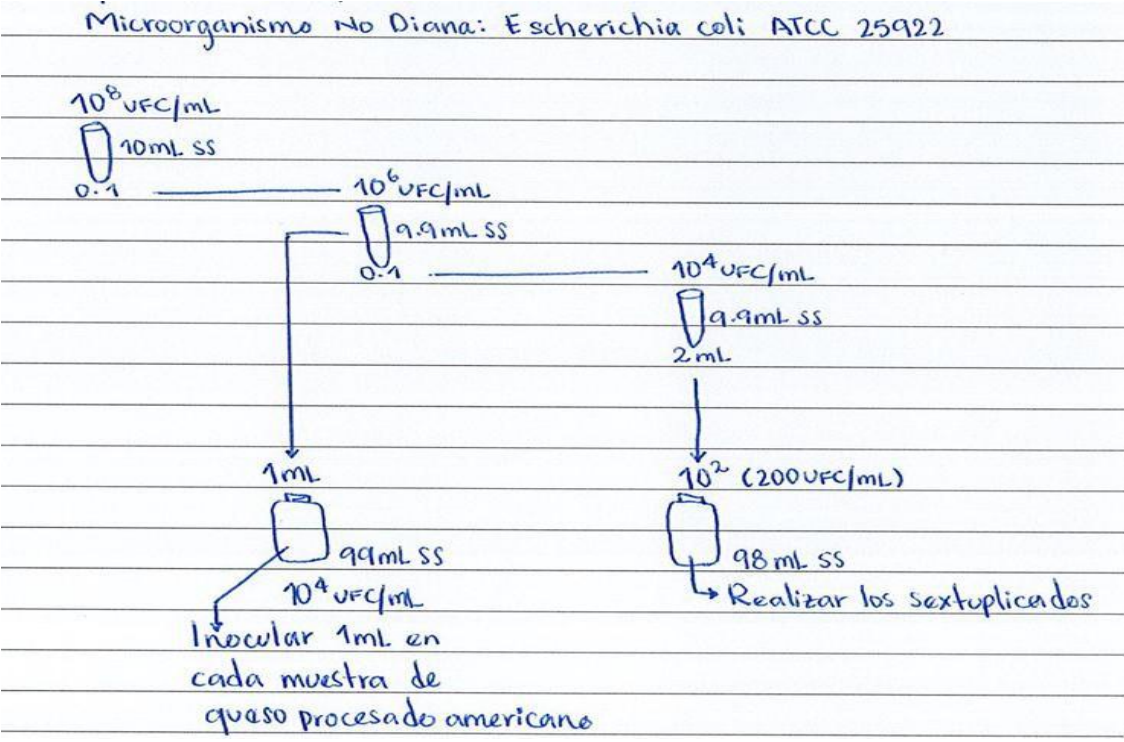
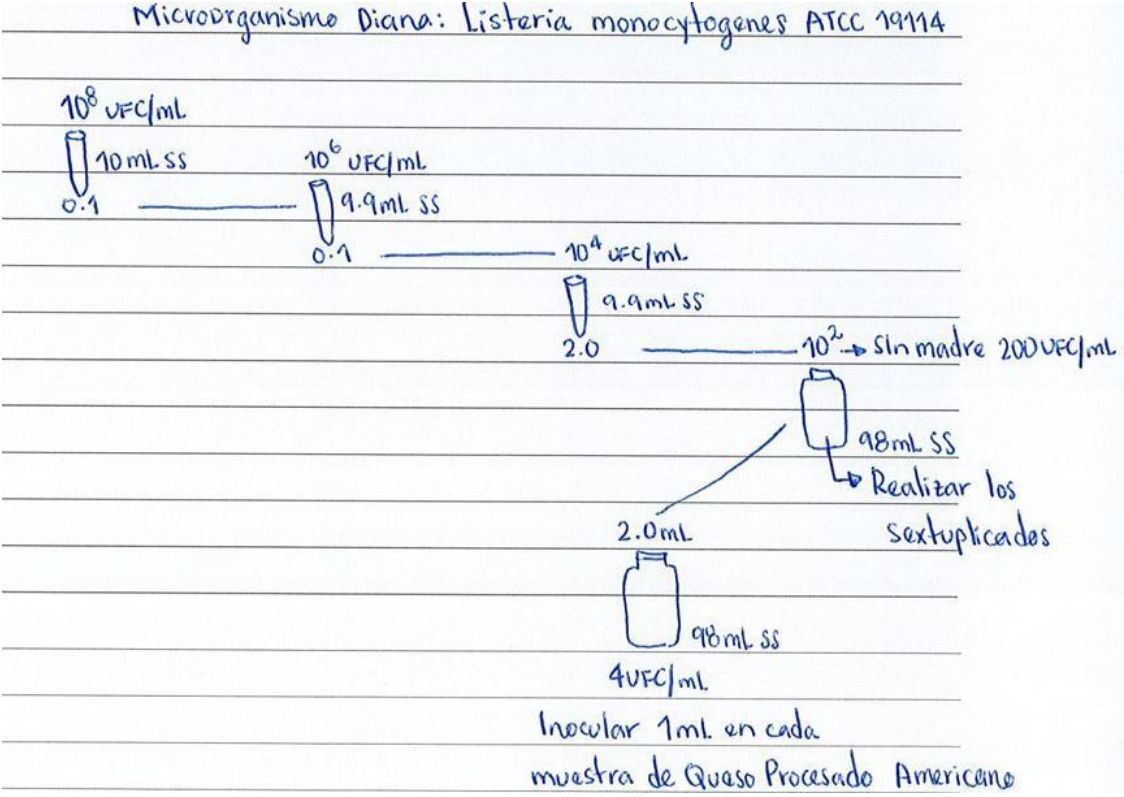
Microorganismo No Diana (No target) : *Escherichia coli* ATCC 25922



Los sextuplicados se tomaron de la solución  $10^2$  se realizaron en EMB y APC

Fuente: Elaboración propia.

**ANEXO N° 4** Esquema de fortificación de muestra de *Listeria monocytogenes* (microorganismo diana) y *Escherichia coli* (Microorganismo no diana). Matriz Queso Procesado Americano.



Fuente: Elaboración propia.

**ANEXO N° 5** Reporte de estandarización de cepa control positivo *Listeria monocytogenes* y control negativo *Escherichia coli* durante la prueba de inculo. Matriz Queso Crema.

LABORATORIO DE INVESTIGACION EN SALUD Y TOXICOLOGIA  
 Plataforma de Microbiología  
 Analista: Lic. Claudia Osorio  
 Fecha: 10/09/2025  
 Lotes  
 Sin Salina 0.85% L-080925  
 TSAL-010925

prueba de inculo 1, LISTERIA MONOCYTOGENES GUS

Sample Table

	Sample ID	Type	Ex	Conc	WL625.0	Comments
1	E. coli 1	Unkno		*****	0.0965	Escherichia coli ATCC 25922 L335-533-3
2	E. coli 2	Unkno		*****	0.0968	
3	E. coli 3	Unkno		*****	0.0969	
4	E. coli 4	Unkno		*****	0.0970	
5	E. coli 5	Unkno		*****	0.0969	
6	L. monocytogenes 1	Unkno		*****	0.0716	Listeria monocytogenes ATCC 19114 L686-53-10
7	L. monocytogenes 2	Unkno		*****	0.0824	
8	L. monocytogenes 3	Unkno		*****	0.0823	
9	L. monocytogenes 4	Unkno		*****	0.0823	
10	L. monocytogenes 5	Unkno		*****	0.0822	
11						

ANEXO N° 6 Reporte de estandarización de cepa control positivo *Listeria monocytogenes* y control negativo *Escherichia coli* durante la validación. Matriz Queso Crema.

LABORATORIO DE INVESTIGACION EN SALUD Y TOXICOLOGIA

Plataforma de Microbiología

Analista: Lic. Claudia Osorio

Fecha: 24/09/2025

Lotes

Slr Salina 0.85% L-220925

TSAL-160925

VALIDACION PRIMERA MATRIZ LM GDS

PRUEBA DE INOCULO SEGUNDA MATRIZ

Sample Table

	Sample ID	Type	Ex	Conc	WL625.0	Comments
1	E. coli 1	Unknow		*****	0.1295	Escherichia coli ATCC 25922 L335-533-3
2	E. coli 2	Unknow		*****	0.1007	
3	E. coli 3	Unknow		*****	0.0901	
4	E. coli 4	Unknow		*****	0.0906	
5	E. coli 5	Unknow		*****	0.0908	
6	L. monocytogenes 1	Unknow		*****	0.0804	Listeria monocytogenes ATCC 10114 L696 53 10
7	L. monocytogenes 2	Unknow		*****	0.0808	
8	L. monocytogenes 3	Unknow		*****	0.0808	
9	L. monocytogenes 4	Unknow		*****	0.0810	
10	L. monocytogenes 5	Unknow		*****	0.0810	
11						

ANEXO N° 7 Reporte de estandarización de cepa control positivo *Listeria monocytogenes* y control negativo *Escherichia coli* durante la prueba de inculo. Matriz Queso Procesado Americano.

LABORATORIO DE INVESTIGACION EN SALUD Y TOXICOLOGIA  
 Plataforma de Microbiología  
 Analista: Lic. Claudia Osorio  
 Fecha: 24/09/2025  
 Lotes  
 Sin Salina 0.85% L-220925  
 TSAL-160925  
 VALIDACION PRIMERA MATRIZ LM GDS  
 PRUEBA DE INOCULO SEGUNDA MATRIZ

Sample Table

	Sample ID	Type	Ex	Conc	WL625.0	Comments
1	E. coli 1	Unknow		*****	0.1295	Escherichia coli ATCC 25922 L335-533-3
2	E. coli 2	Unknow		*****	0.1007	
3	E. coli 3	Unknow		*****	0.0901	
4	E. coli 4	Unknow		*****	0.0906	
5	E. coli 5	Unknow		*****	0.0908	
6	L. monocytogenes 1	Unknow		*****	0.0804	Listeria monocytogenes ATCC 10114 L698 53 10
7	L. monocytogenes 2	Unknow		*****	0.0808	
8	L. monocytogenes 3	Unknow		*****	0.0808	
9	L. monocytogenes 4	Unknow		*****	0.0810	
10	L. monocytogenes 5	Unknow		*****	0.0810	
11						

**ANEXO N° 8** Reporte de estandarización de cepa control positivo *Listeria monocytogenes* y control negativo *Escherichia coli* durante la validación. Matriz Queso Procesado Americano.

LABORATORIO DE INVESTIGACION EN SALUD Y TOXICOLOGIA  
 Plataforma de Microbiología  
 Analista: Lic. Claudia Osorio  
 Fecha: 08/10/2025  
 Lotes  
 Sin Salina 0.85% L-031025  
 TSAL-290925

VALIDACION LISTERIA M. GDS SEGUNDA MATRIZ

Sample Table

	Sample ID	Type	Ex	Conc	WL625.0	Comments
1	E. coli 1	Unknow		*****	0.1196	Escherichia coli ATCC 25922 L335-533-3
2	E. coli 2	Unknow		*****	0.1063	
3	E. coli 3	Unknow		*****	0.0933	
4	E. coli 4	Unknow		*****	0.0940	
5	E. coli 5	Unknow		*****	0.0943	
6	L. monocytogenes 1	Unknow		*****	0.0719	Listeria monocytogenes ATCC 19114 L686-53-10
7	L. monocytogenes 2	Unknow		*****	0.1008	
8	L. monocytogenes 3	Unknow		*****	0.1009	
9	L. monocytogenes 4	Unknow		*****	0.1008	
10	L. monocytogenes 5	Unknow		*****	0.1007	
11						

ANEXO N° 9 Reporte de resultados del equipo de detección genética. Matriz Queso Crema.










1/2

**Run Information**

Run Name	BioControl Assay 36 Wells 2025-09-26 (1)
Run Start	26/9/2025 09:33:46
Run Finish	26/9/2025 11:06:28
Operator	Assurance GDS User
Notes	VALIDACION MATRIZ QUESO CREMA
Run On Software Version	Rotor-Gene Q Software 2.3.103
Run Signature	The Run Signature is valid.
Machine Serial No.	0412519

**Assay: Listeria monocytogenes**






















**Listeria monocytogenes**

No.	C	Name	Listeria monocytogenes	L. mono. Result	Listeria monocytogenes Ct	Assay	Kit Lot Number	Description
1		BL REACTIVO	Negative	-		Listeria monocytogenes	031422-26	
2		ALDNASAS	Negative	-		Listeria monocytogenes	031422-26	
3		BL QC 1	Negative	-		Listeria monocytogenes	031422-26	
4		BL QC 2	Negative	-		Listeria monocytogenes	031422-26	
5		BL QC 3	Negative	-		Listeria monocytogenes	031422-26	
6		QC 1	Positive	+	19.21	Listeria monocytogenes	031422-26	
7		QC 2	Negative	-		Listeria monocytogenes	031422-26	
8		QC 3	Positive	+	18.12	Listeria monocytogenes	031422-26	
9		QC 4	Positive	+	22.22	Listeria monocytogenes	031422-26	

(Continued on next page)...

Reporte de resultados del equipo de detección genética. Matriz Queso Crema.

2/2

10		QC 5	Positive	+	19.30	Listeria monocytogenes	031422-26	
11		QC 6	Positive	+	14.30	Listeria monocytogenes	031422-26	
12		QC 7	Positive	+	16.99	Listeria monocytogenes	031422-26	
13		QC 8	Positive	+	25.38	Listeria monocytogenes	031422-26	
14		QC 1 JD	Positive	+	15.99	Listeria monocytogenes	031422-26	
15		QC 2 JD	Positive	+	17.09	Listeria monocytogenes	031422-26	
16		QC 3 JD	Negative	-		Listeria monocytogenes	031422-26	
17		QC 4 JD	Positive	+	23.87	Listeria monocytogenes	031422-26	
18		QC 5 JD	Positive	+	18.36	Listeria monocytogenes	031422-26	
19		QC 6 JD	Positive	+	19.05	Listeria monocytogenes	031422-26	
20		QC 7 JD	Positive	+	18.13	Listeria monocytogenes	031422-26	
21		QC 8 JD	Positive	+	21.12	Listeria monocytogenes	031422-26	
22		QC 1 CO	Positive	+	18.78	Listeria monocytogenes	031422-26	
23		QC 2 CO	Positive	+	20.56	Listeria monocytogenes	031422-26	
24		QC 3 CO	Positive	+	20.02	Listeria monocytogenes	031422-26	
25		QC 4 CO	Positive	+	19.03	Listeria monocytogenes	031422-26	
26		QC 5 CO	Positive	+	19.06	Listeria monocytogenes	031422-26	
27		QC 6 CO	Positive	+	22.03	Listeria monocytogenes	031422-26	
28		QC 7 CO	Positive	+	20.68	Listeria monocytogenes	031422-26	
29		QC 8 CO	Positive	+	17.92	Listeria monocytogenes	031422-26	
30		CX NEG	No Amp	-		Listeria monocytogenes	031422-26	
31		CX POS	Positive	+	8.26	Listeria monocytogenes	031422-26	

**ANEXO N° 10** Reporte de resultados del equipo de detección genética. Matriz Queso Procesado Americano.










1/2

**Run Information**

Run Name	BioControl Assay 36 Wells 2025-10-10 (1)
Run Start	10/10/2025 09:56:50
Run Finish	10/10/2025 11:30:06
Operator	Assurance GDS User
Notes	VALIDACION MATRIZ QUESO PROCESADO AMERICANO
Run On Software Version	Rotor-Gene Q Software 2.3.103
Run Signature	The Run Signature is valid.
Machine Serial No.	0412519

**Assay: Listeria monocytogenes**























**Listeria monocytogenes**

No.	C	Name	Listeria monocytogenes	L. mono. Result	Listeria monocytogenes Ct	Assay	Kit Lot Number	Description
1		BL REACTIVO	Negative	-		Listeria monocytogenes	031422-26	
2		ALDNASAS	Negative	-		Listeria monocytogenes	031422-26	
3		BL QPA 1	Negative	-		Listeria monocytogenes	031422-26	
4		BL QPA 2	Negative	-		Listeria monocytogenes	031422-26	
5		BL QPA 3	Negative	-		Listeria monocytogenes	031422-26	
6		QPA 1	Positive	+	13.62	Listeria monocytogenes	031422-26	
7		QPA 2	Positive	+	14.99	Listeria monocytogenes	031422-26	
8		QPA 3	Positive	+	15.24	Listeria monocytogenes	031422-26	
9		QPA 4	Positive	+	15.96	Listeria monocytogenes	031422-26	

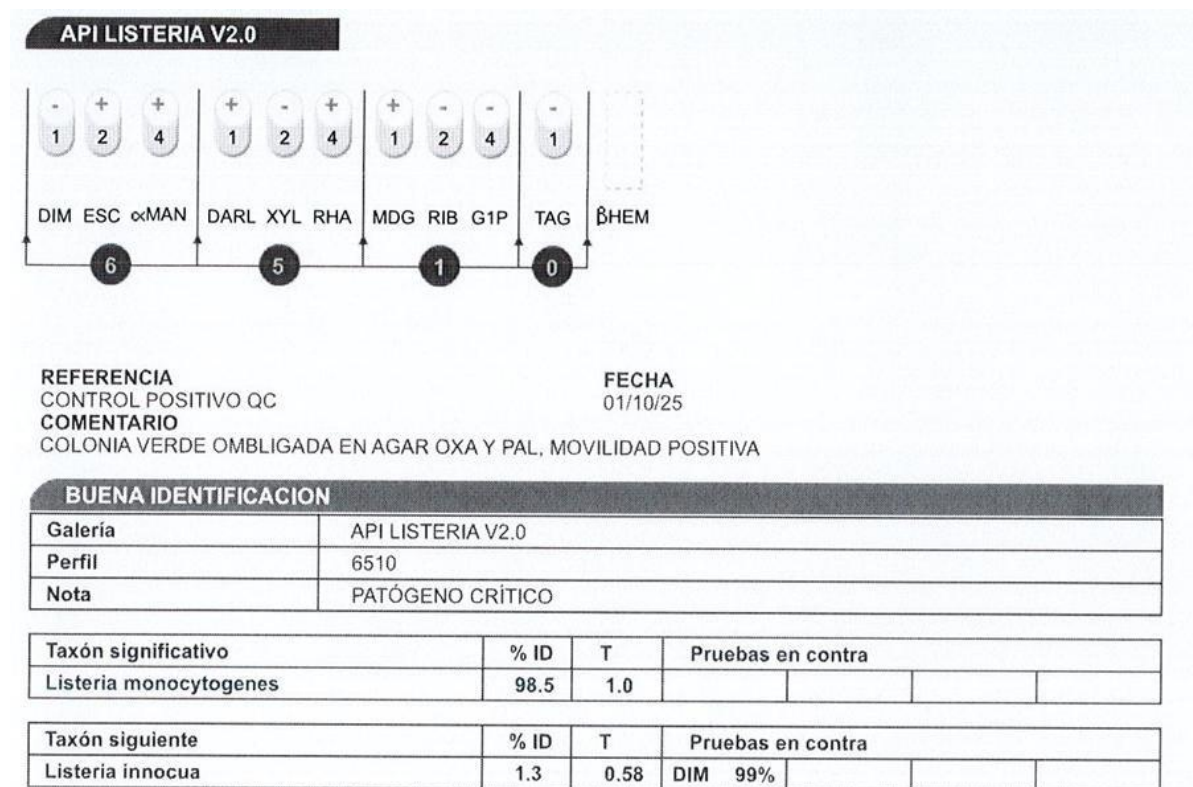
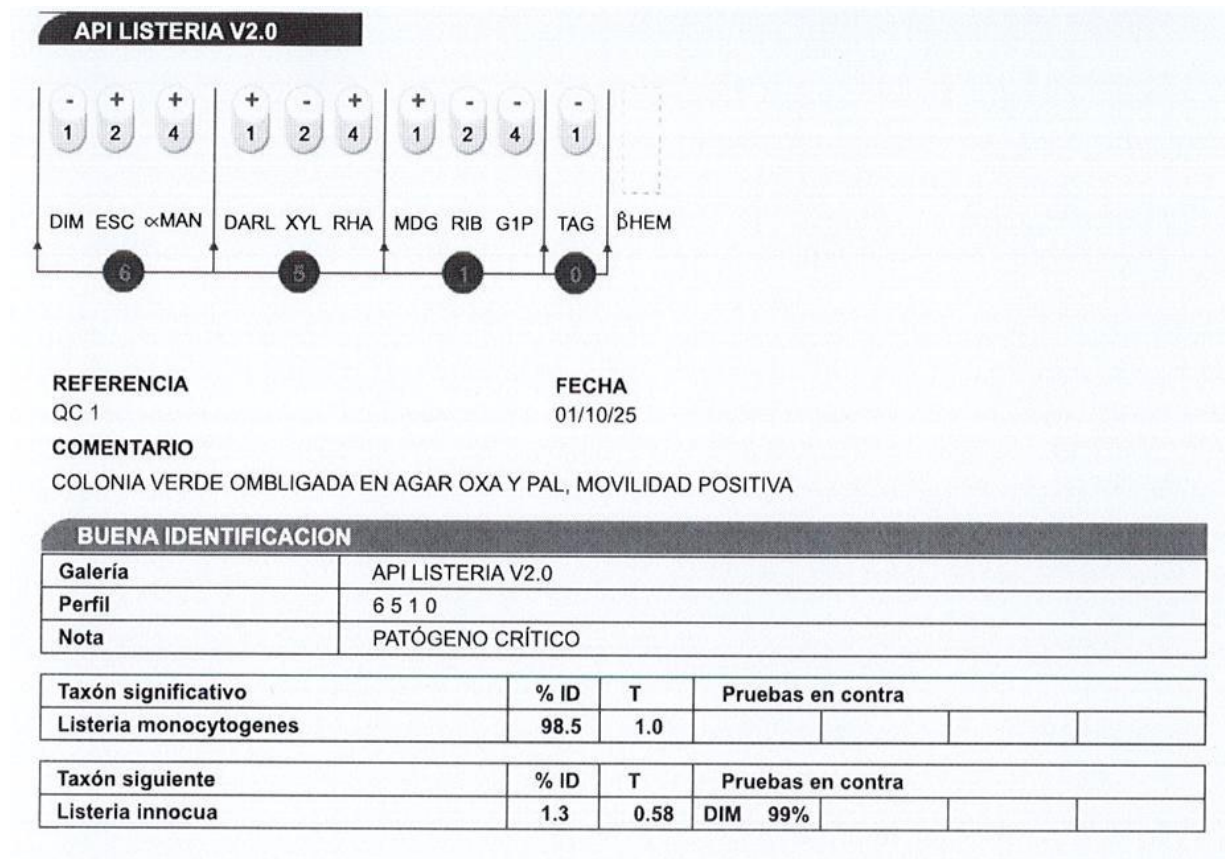
(Continued on next page)...

Reporte de resultados del equipo de detección genética. Matriz Queso Procesado Americano.

2/2

10		QPA 5	Positive	+	12.95	Listeria monocytogenes	031422-26
11		QPA 6	Positive	+	12.33	Listeria monocytogenes	031422-26
12		QPA 7	Positive	+	13.66	Listeria monocytogenes	031422-26
13		QPA 8	Positive	+	11.84	Listeria monocytogenes	031422-26
14		QPA 1 JD	Positive	+	11.67	Listeria monocytogenes	031422-26
15		QPA 2 JD	Positive	+	14.64	Listeria monocytogenes	031422-26
16		QPA 3 JD	Positive	+	13.43	Listeria monocytogenes	031422-26
17		QPA 4 JD	Positive	+	12.64	Listeria monocytogenes	031422-26
18		QPA 5 JD	Positive	+	12.33	Listeria monocytogenes	031422-26
19		QPA 6 JD	Positive	+	11.51	Listeria monocytogenes	031422-26
20		QPA 7 JD	Positive	+	11.87	Listeria monocytogenes	031422-26
21		QPA 8 JD	Positive	+	11.43	Listeria monocytogenes	031422-26
22		QPA 1 CO	Positive	+	14.16	Listeria monocytogenes	031422-26
23		QPA 2 CO	Positive	+	15.92	Listeria monocytogenes	031422-26
24		QPA 3 CO	Positive	+	17.23	Listeria monocytogenes	031422-26
25		QPA 4 CO	Positive	+	14.37	Listeria monocytogenes	031422-26
26		QPA 5 CO	Negative	-		Listeria monocytogenes	031422-26
27		QPA 6 CO	Positive	+	13.20	Listeria monocytogenes	031422-26
28		QPA 7 CO	Positive	+	13.60	Listeria monocytogenes	031422-26
29		QPA 8 CO	Positive	+	12.27	Listeria monocytogenes	031422-26
30		CX NEG	Negative	-		Listeria monocytogenes	031422-26
31		CX POS	Positive	+	8.99	Listeria monocytogenes	031422-26

ANEXO N° 11 Reporte de resultados de API *Listeria* en muestra y control positivo. Matriz Queso Crema.



ANEXO N° 12 Reporte de resultados de API *Listeria* en muestra y control positivo. Matriz Queso Procesado Americano.

**API LISTERIA V2.0**

REFERENCIA: QPA 1  
FECHA: 15/10/25  
COMENTARIO: COLONIA VERDE OMBLIGADA EN AGAR OXA Y PAL. MOVILIDAD POSITIVA

BUENA IDENTIFICACION				
Galería	API LISTERIA V2.0			
Perfil	6510			
Nota	PATÓGENO CRÍTICO			
Taxón significativo	% ID	T	Pruebas en contra	
<i>Listeria monocytogenes</i>	98.5	1.0		
Taxón siguiente	% ID	T	Pruebas en contra	
<i>Listeria innocua</i>	1.3	0.58	DIM 99%	


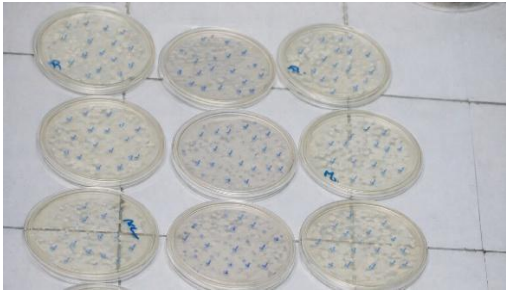

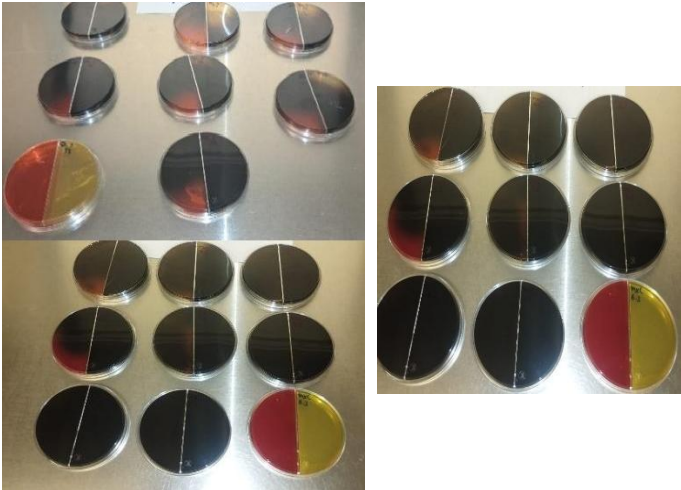
**API LISTERIA V2.0**

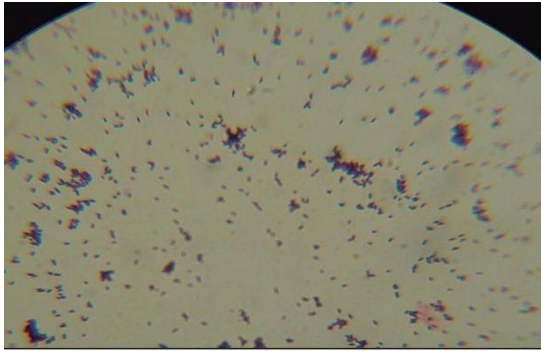
REFERENCIA: CONTROL POSITIVO QPA  
FECHA: 15/10/25  
COMENTARIO: COLONIA VERDE OMBLIGADA EN AGAR OXA Y PAL. MOVILIDAD POSITIVA

BUENA IDENTIFICACION				
Galería	API LISTERIA V2.0			
Perfil	6510			
Nota	PATÓGENO CRÍTICO			
Taxón significativo	% ID	T	Pruebas en contra	
<i>Listeria monocytogenes</i>	98.5	1.0		
Taxón siguiente	% ID	T	Pruebas en contra	
<i>Listeria innocua</i>	1.3	0.58	DIM 99%	

**ANEXO N° 13 IMPLEMENTACIÓN Y VERIFICACIÓN DE LA  
METODOLOGÍA PARA AISLAMIENTO, DETECCIÓN E IDENTIFICACIÓN  
DE *LISTERIA MONOCYTOGENES* MEDIANTE PCR EN MATRICES DE  
LÁCTEOS PROCESADOS.**

## ANEXO N° 13

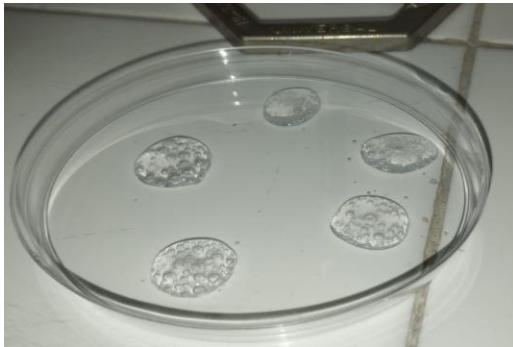
	<p>MATRICES ANALIZADAS</p>
	<p>VERIFICACIÓN DEL TAMAÑO DEL INÓCULO</p>
	<p>METODO ASSURANCE GDS (SISTEMA DE DETECCIÓN GENÉTICO)</p>
	<p>PASES DEL CALDO DE ENRIQUECIMIENTO A AGAR OXFORD Y PALCAM</p>



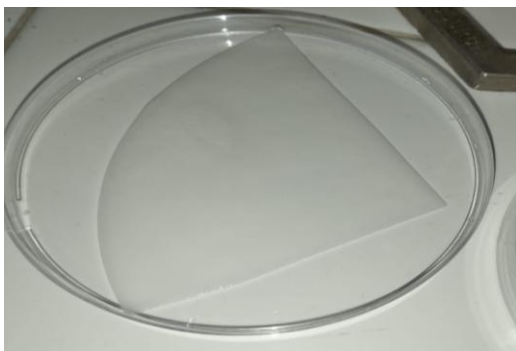
TINCIÓN DE GRAM



MOVILIDAD



CATALASA



OXIDASA



API *Listeria*  
(PRUEBAS BIOQUÍMICAS  
MINIATURDAS)