

**UNIVERSIDAD PERUANA CAYETANO HEREDIA**

**FACULTAD DE CIENCIAS Y FILOSOFIA**

**“ALBERTO CAZORLA TALLERI”**



**EVALUACIÓN DE LA COMPETENCIA TÉCNICA DEL ANALISTA SEGÚN  
LA ISO/IEC 17025:2017 EN LA DETECCIÓN DE SALMONELLA Y  
LISTERIA EN PALTA Y ARÁNDANO**

**TRABAJO DE SUFICIENCIA PROFESIONAL PARA OPTAR EL TÍTULO  
DE LICENCIADO EN BIOLOGÍA.**

**AUTOR:**

Jessica Andrea Wu Kohatsu

**ASESOR:**

MSc. Ruth Cristóbal Delgado

**Lima – Perú**

**2021**



## CONTENIDO

I.	INTRODUCCION .....	1
II.	MARCO TEORICO .....	2
	A. Producción de paltas y arándanos en el Perú .....	2
	B. <i>Listeria</i> y <i>Salmonella</i> .....	5
	C. Patogenicidad: Salmonelosis y Listeriosis .....	5
	D. Normativas, directrices y procedimientos internos .....	7
	E. Métodos convencionales y métodos moleculares para detección de patógenos .....	10
	a. Método molecular vs método convencional .....	10
	b. Métodos moleculares .....	11
	F. Tecnología usada: LAMP .....	12
	G. Método de detección .....	13
	a. Detección de <i>Salmonella</i> mediante el método AOAC 2016.01 .....	14
	b. Detección de <i>Listeria sp</i> mediante el método AOAC 2016.07 .....	15
III.	OBJETIVOS .....	17
	a. Objetivo general .....	17
	b. Objetivos específicos .....	17
IV.	METODOLOGÍA .....	18
	A. Destreza técnica .....	18

a.	Réplicas negativas .....	18
b.	Control de reactivo .....	18
c.	Control de pipeteo .....	19
B.	Evaluación de requisitos del método de ensayo .....	21
a.	Límite de detección .....	21
b.	Especificidad .....	22
c.	Exactitud Relativa .....	22
C.	Evaluación de conocimiento .....	23
V.	RESULTADOS .....	25
A.	Destreza técnica .....	25
B.	Evaluación de requisitos del método de ensayo .....	28
a.	Límite de detección .....	28
b.	Especificidad .....	28
c.	Exactitud Relativa: .....	30
C.	Evaluación de conocimiento .....	31
VI.	DISCUSION .....	32
VII.	CONCLUSIÓN .....	36
VIII.	RECOMENDACIONES .....	37
IX.	REFERENCIAS .....	38
X.	ANEXOS .....	43
	<b>ANEXO 1: Resultados en MDA2 .....</b>	<b>43</b>

**ANEXO 2:** Protocolos del método de detección de *Salmonella*. AOAC 2016.01.44

**ANEXO 3:** Protocolos del método de detección de *Listeria spp.* AOAC 2016.07.46

## **ILUSTRACIONES Y TABLAS**

Ilustración 1. Exportación de palta (millones de US\$) anual. 2016-2020.....	4
Ilustración 2 Exportación de arándanos (millones de US\$) anual. 2016-2020.....	4
Ilustración 3. Diagrama de espina de pescado .....	14
Ilustración 4. Resultado negativo (A), resultados positivos considerados: (B) Excelentes y (C) Buenos.....	20
Ilustración 5. Resultado de corrida de 8 pocillos negativos. ....	26
Ilustración 6. Resultado de control de reactivo para (A) Salmonella y (B) Listeria...	27
Ilustración 7. Resultado de prueba de pipeteo .....	27
Tabla 1. Producción de palta (miles de toneladas) .....	3
Tabla 2. Criterios de aceptación y resultados para la calificación operativa 3M MDA2 .....	21
Tabla 3. Contenido de la evaluación escrita para detección de Salmonella .....	23
Tabla 4. Contenido de la evaluación escrita para detección de Listeria .....	24
Tabla 5. Resultados de la evaluación de especificidad .....	29
Tabla 6. Resultados de exactitud relativa para Salmonella.....	30
Tabla 7. Resultados de exactitud relativa para Listeria .....	31

## RESUMEN

La salmonelosis es una de las enfermedades más comunes transmitida por contaminación de alimentos, y la listeriosis es mortal para fetos de mujeres embarazadas. La identificación de estos patógenos en frutas, verduras y hortalizas frescas es una medida preventiva para evitar estos contagios, por lo que es necesaria la obtención de resultados que reflejen de forma fiable su ausencia como parte del control de calidad de producción y procesamiento. Bajo los lineamientos de la ISO/IEC 17025:2017 y las directrices de la entidad acreditadora, la autorización al personal para la ejecución de análisis en laboratorio es un requisito indispensable para asegurar la exactitud y confiabilidad de los resultados emitidos. Es por ello, que este trabajo tiene como objetivo determinar la capacidad del analista en los ensayos AOAC 2016.01 y AOAC 2016.07 para la detección de *Salmonella* y *Listeria sp.* respectivamente, mediante el Sistema 3M<sup>tm</sup> de Detección Molecular (MDA-2) en palta y arándano.

La competencia del analista se evalúa en 3 puntos que son destreza técnica, requisitos del método de ensayo y conocimiento teórico del método y del patógeno. Las referencias bibliográficas a consultar son los métodos estandarizados mencionados previamente, ISO/IEC 17025:2017, y guías de funcionamiento e interpretación del MDA2, y los procedimientos propios del laboratorio en donde se realizará el trabajo. Esta información puede servir como pauta para el análisis de resultados en otros métodos o para emplearlo como punto de comparación para la autorización de otros analistas.

**PALABRAS CLAVE:** COMPETENCIA TÉCNICA, ISO IEC/17025, SALMONELLA, LISTERIA, MICROBIOLOGÍA

## I. INTRODUCCION

El laboratorio [REDACTED], el cual se encuentra acreditado bajo la norma ISO/IEC 17025: 2017 para ensayos en agua, alimentos, cultivos, superficies vivas y superficies inertes en ensayos de detección de *Salmonella*, *Listeria sp* y *Listeria monocytogenes*, recuento en Petrifilm de Aerobios Mesófilos, Mohos y Levaduras, coliformes y *Escherichia coli*, Enterobacterias y *Staphylococcus aureus*, entre otros ensayos. La empresa se encuentra comprometida con la emisión de resultados confiables para todos estos métodos. Es por eso que realiza diversas pruebas para determinar la competencia de los analistas que realizan los ensayos. Se evalúa la destreza para realizar el ensayo, el cumplimiento de lo establecido en el método de referencia, y el conocimiento teórico y las características del patógeno a detectar.

La importancia de emitir resultados confiables en métodos de detección de *Salmonella* y *Listeria* recae en el ámbito social, ya que un falso negativo podría generar distribución de alimentos contaminados que puede servir como vector para iniciar un brote de Salmonelosis o Listeriosis. Estas son enfermedades transmitidas que tienen como consecuencia trastornos gastrointestinales, infecciones e incluso pueden ser mortales.

El presente trabajo muestra el proceso para otorgar la autorización de ejecución de los ensayos de detección de *Salmonella* y *Listeria* en muestras de alimentos frescos mediante el ensayo en paltas y arándanos bajo la norma ISO/IEC 17025: 2017.

## II. MARCO TEORICO

### A. Producción de paltas y arándanos en el Perú

En el año 2020, pese a los impactos económicos de la pandemia causada por el COVID- 19, la exportación en el mercado agroindustrial ha aumentado en un 14% en relación a Agosto del año 2019. Los principales productos de exportación de productos no tradicionales incluye en primer lugar a la palta fresca representando un 18 % del total, 11% corresponde a uvas frescas, 5.5% a mangos, 5% a espárrago y 4.5% a arándanos frescos (MINAGRI, 2020).

Desde el 2005, la producción de palta tiende a elevarse anualmente. De acuerdo con el Banco Central de Reserva del Perú en el año 2019 la producción fue de 537.8 miles de toneladas, que equivale a un aumento del 6.6% en comparación con el año 2018 (Ver Tabla 1) (BCR, s.f. a<sup>1</sup>). El palto muestra estacionalidad en su producción de frutos, por lo que los meses de mayor exportación son entre Mayo y Setiembre. Se ve en la Ilustración 1 lo mencionado anteriormente, así como el comportamiento en el año 2020, el cual muestra el segundo pico más alto de exportación en los últimos 5 años.

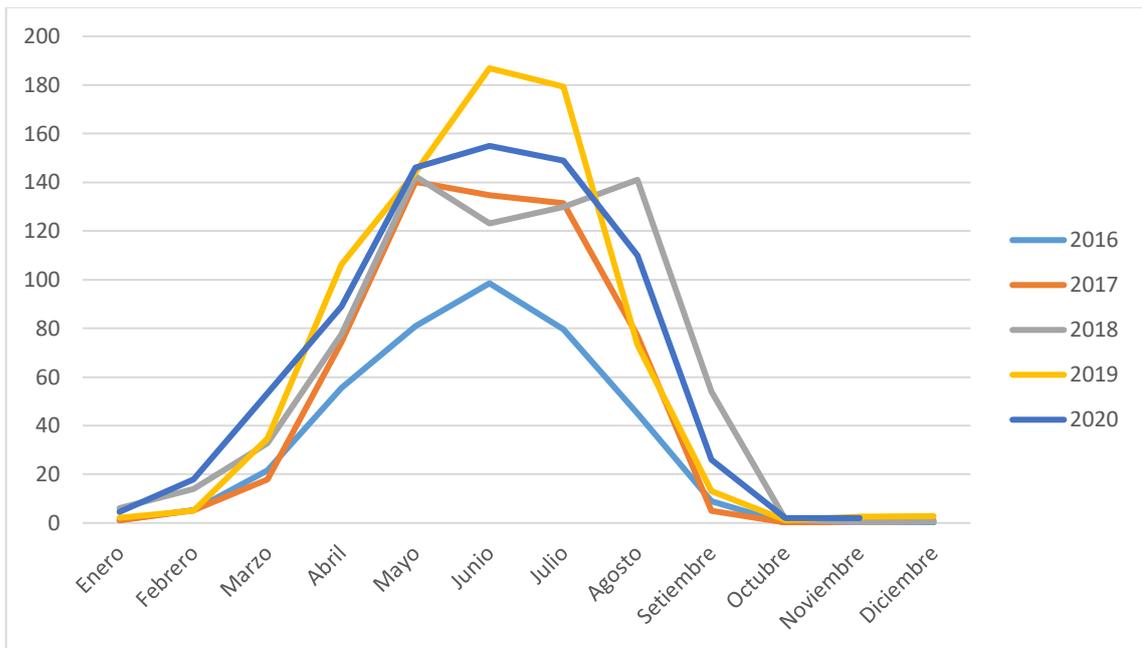
En el caso de arándanos representado en la Ilustración 2 , la mayor exportación se da entre los meses de Agosto y Diciembre. En comparación a los años anteriores, la exportación del año 2020 se muestra por encima de los demás. (BCR, s.f. b)

Tabla 1. Producción de palta (miles de toneladas)

Año	Producción de palta (miles de toneladas)
2005	103,4
2006	113,3
2007	121,7
2008	136,3
2009	157,4
2010	184,4
2011	213,7
2012	268,5
2013	289,0
2014	349,3
2015	376,6
2016	455,4
2017	466,8
2018	504,5
2019	537,8

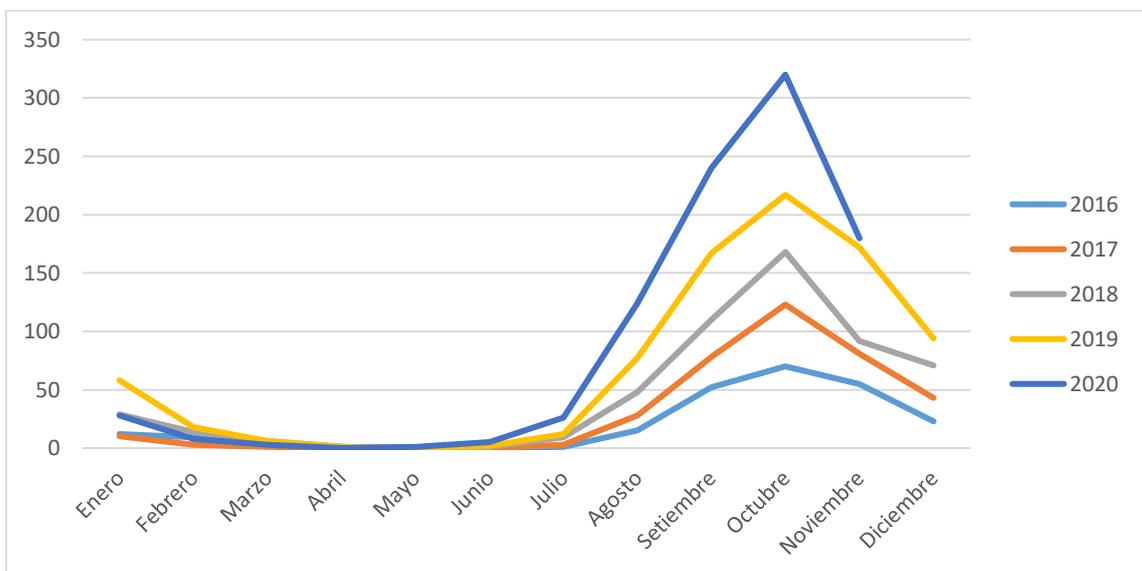
Fuente: Banco Central de Reserva del Perú (a)

Ilustración 1. Exportación de palta (millones de US\$) anual. 2016-2020



Modificado desde: Banco central de Reserva del Perú (c)

Ilustración 2 Exportación de arándanos (millones de US\$) anual. 2016-2020



Modificado desde: Banco central de Reserva del Perú (b)

## B. *Listeria* y *Salmonella*

El género *Salmonella* se encuentra ampliamente distribuido en la naturaleza. Pertenece a la familia Enterobacteriaceae, son bacilos gram negativos y anaerobios facultativos. Varios producen gas al fermentar glucosa, son catalasa positivos y oxidasa negativos. Su crecimiento óptimo se da en un pH 6.6-8.2 (Linder E., 1995). La estructura antigénica es similar a otras enterobacterias: antígeno O que se encuentra en la pared bacteriana, antígeno H correspondiente a la flagelina, y el antígeno K único para *S.typhi*, *S. paratyphi* y *S. dublin*. (Parra M., Durango J. y Mattar S.; 2002)

*Listeria monocytogenes* es una bacteria gram positiva, con temperatura de crecimiento óptimo entre 30°C y 37°C, reacciona positivo a catalasa y oxidasa, hidroliza esculina, e induce beta-hemólisis en agar sangre. Puede permanecer viva y reproducirse a temperatura de refrigeración de 4°C y puede vivir en salmueras o medios ácidos. *Listeria* es un género ubicuo, se encuentra en suelos, materia vegetal y animales. Dentro de este género se han identificado 17 especies, de las cuales 2 causan zoonosis en humanos y mamíferos de granja: *Listeria monocytogenes* y excepcionalmente *Listeria ivanovii*. La transmisión se da por vía alimentaria o transplacentaria, siendo las principales fuentes de contaminación leche cruda o no pasteurizada, carnes, pescados y verduras crudas. (Lourenço J., Leclercq A., Lecuit M., y Charlier C.; 2018)

## C. Patogenicidad: Salmonelosis y Listeriosis

*Salmonella* afecta a nivel mundial a 550 millones de personas, siendo una de las 4 causas principales de enfermedades diarreicas. Muchas de las especies de

*Salmonella* causan gastroenteritis y puede llegar a complicaciones en caso de infectados jóvenes, ancianos o inmunosuprimidos (OMS, 2018). Esta bacteria puede formar biopelículas y desarrollar resistencia a ciertos desinfectantes (De Los Santos et al., 2012)

Los síntomas comunes de una infección por *Salmonella* son diarrea, fiebre y calambres estomacales, que se manifiestan de 6 a 72 horas posterior al consumo del alimento contaminado. Cuando estos síntomas terminan, la persona infectada puede excretar la bacteria hasta por 3 meses. (Salyers A.,2002)

Generalmente, las rutas de transmisión en humanos son mediante alimentos contaminados de origen animal o vegetales crudos manipulados, también puede transmitirse mediante vía fecal-oral o contacto con animales asintomáticos contaminados. La salmonelosis en un 60 - 80% de los casos no es diagnosticada y puede tomarse como una diarrea común, sin embargo, han existido los brotes a grandes escalas. (OMS, 2018)

La tasa de mortalidad para listeriosis es de 20 a 30% de los infectados, y los recién nacidos pueden tener consecuencias serias a partir de esta infección (FDA, 2020). El potencial infeccioso de *Listeria* radica en que puede atravesar barreras intestinales, placentarias, y hematoencefálicas, provocando gastroenteritis, infección neonatal o meningoencefalitis (Rodríguez-Auad JP, 2018). Los síntomas de esta enfermedad varían dependiendo la severidad de la infección, que pueden durar desde algunos días hasta varias semanas. Estos síntomas pueden ser dolor muscular, náuseas, vómitos, diarreas, dolores de cabeza, confusión, pérdida de balance y convulsiones (CDC, 2017).

En el mundo, los brotes de *Listeria* se relacionan con el consumo de alimentos crudos, como leche, helado, vegetales o carne (CDC, 2017). En Perú se ha encontrado presencia de *Listeria monocytogenes* en 3.34% de muestras de quesos en la provincia de Trujillo. Este estudio también evaluó la presencia en leche, resultando negativo (Díaz M, Chávez M y Saucedo E; 2013). Una tesis realizada en el 2018, documentó la frecuencia de presencia de *Listeria* en paltas congeladas en el departamento de La Libertad. Se procesaron 340 muestras resultando en un 15.9% de paltas que contenía especies de *Listeria*, de las cuales casi el 30% de éstas fueron identificadas como *Listeria monocytogenes* en la variedad de palta Hass. (Monteza AR, 2018)

#### D. Normativas, directrices y procedimientos internos

Debido a las tendencias de crecimiento en la exportación, es importante la detección de patógenos que permitan demostrar la inocuidad alimentaria de estos productos. Los valores máximos de organismos microbiológicos presentes en alimentos se encuentran en la Resolución Ministerial 591-2008/MINSA (2008), en donde separa por grupos de alimentos los criterios de calidad sanitaria e inocuidad. En este documento indica que para frutas y hortalizas frescas semiprocessadas, se analizan 4 agentes microbianos en los que se incluye *Salmonella* y *Listeria monocytogenes* cuyo límite por 25 g debe resultar en ausencia.

Por otro lado, la norma ISO/IEC 17025 (2017), bajo la cual está acreditado el laboratorio [REDACTED], desarrolla procedimientos para generar resultados confiables y válidos aplicables a laboratorios de ensayo y calibración.

La versión vigente de la norma es la emitida en el año 2017, reemplazando la segunda edición emitida en 2005.

Como requisitos de la norma, se indica lo relacionado a los requisitos generales, los relativos a la estructura, los relativos a los recursos, los requisitos del proceso, y los requisitos del sistema de gestión. En el punto 6.2 se precisan los puntos relativos al personal, que indica:

*“6.2.3 El laboratorio debe asegurarse de que el personal tiene la competencia para realizar las actividades de laboratorio de las cuales es responsable y para evaluar la importancia de las desviaciones” (ISO, 2017).*

Bajo este punto, es requerido por la norma que el analista de laboratorio sea evaluado para determinar si posee la competencia adecuada para ejecutar los ensayos bajo el método establecido en el certificado de acreditación.

De acuerdo con el procedimiento general [REDACTED] "Formación" de [REDACTED] [REDACTED] (2019a), cuando ingresa un personal nuevo luego de haber pasado por el proceso de selección este debe iniciar un proceso de inducción, capacitación y/o entrenamiento, lo cual debe garantizar que sea competente para la función que va a desempeñar. Se inicia con un Plan de Acogida, cuya finalidad es brindar una visión general de las labores de la empresa, la misión, visión, sistema de gestión, sistema de seguridad, y un entendimiento en general de las áreas de Microbiología, Fisicoquímica, Compras y Gestión de muestras, independientemente al área que haya postulado. Posterior a eso, se realiza la formación de procedimientos y métodos que consta de la lectura de la documentación relevante para su función.

Además, en cuanto a la formación para los métodos de ensayo se requiere que el personal en inducción observe el procedimiento o método que va a desempeñar. Luego de esto, el personal nuevo realizará una repetición a partir de lo analizado por personal autorizado. La última etapa para el personal nuevo es la prueba de competencia, que incluye la ejecución de los métodos que ha observado y repetido, cuyos resultados son comparados con los analistas autorizados. La muestra a usar para este punto puede incluir muestras de ensayos interlaboratorio restantes, materiales de referencia certificados, controles positivos o muestras de cliente retenidas. Se puede complementar o sustituir la prueba de competencia con una evaluación oral o escrita, para actividades en las que no se pueda medir un resultado.

A partir de las actividades de formación y las pruebas de competencia, se puede determinar si el analista se encuentra apto para brindar la autorización para la realización de ensayos en [REDACTED].

El departamento de acreditación del INACAL (2020), indica en la Directriz DA-acr-13D "Criterios de Participación de Ensayos de Aptitud Comparaciones Interlaboratorio", que los ensayos de aptitud demuestran competencia del laboratorio para realizar los ensayos, de esta forma previo a la acreditación y máximo cada dos años posterior a esta se debe pasar por una prueba de interlaboratorio y obtener una participación satisfactoria medido por el Z-score. Por su parte, [REDACTED] (2019b) tiene establecido en el procedimiento general "Proficiency test" la ejecución de los ensayos interlaboratorio dos veces al año en el cual los analistas demuestran la capacidad para realizar el método

evaluado, sin embargo, no está establecido que el personal nuevo requiera pasar por esta evaluación previo a la autorización.

Un factor importante en la ejecución de un método radica en la estimación de la incertidumbre, como lo indica INACAL-DA (2018) en la Directriz DA-acr-09D "Directriz para la evaluación de la incertidumbre de la medición" sin embargo también se indica en el punto 2 "Alcance" que los correspondientes a la Categoría I que incluyen ensayos cualitativos y semi-cuantitativos quedan fuera del alcance de acreditación, por lo que para los ensayos de detección la estimación de la incertidumbre queda excluida.

E. Métodos convencionales y métodos moleculares para detección de patógenos

a. Método molecular vs método convencional

De acuerdo a la comparación del método convencional con el método PCR, se aprecian resultados con alta sensibilidad y especificidad en ambos métodos con la diferencia de una reducción del tiempo de respuesta en el método PCR (Malkawi HI, 2003). Adicionalmente, un estudio realizado en huevos indica que el qPCR es un método más eficiente que los métodos convencionales (Moraes D. Duarte S, Azeredo T y Rezende C; 2020).

En el caso del método molecular LAMP representado por el método MDA-2, la validación para *Salmonella* de este método fue ejecutada por ADRIA Développement (2019a) quien realizó la comparación con el método convencional ISO 6579-2 (2012). Este estudio tuvo como resultado los

valores de sensibilidad LAMP, sensibilidad del método convencional, exactitud relativa del método LAMP así como el ratio de falsos positivo, con valores de 90%, 86.7%, 89% y 0% respectivamente. En cuanto al tiempo de respuesta de resultados, para una detección negativa, el método convencional brinda resultados en 3 días y el molecular en 1 día; y en el caso de resultados positivos, 5 días para el convencional y 3 días para el LAMP. El método LAMP para la detección de *Salmonella* brinda resultados en menor tiempo que los métodos convencionales. (Sarowska J, Frej-Mądrzak M, Jama-Kmiecik A, Kilian A, Teryks-Wołyniec D,...; 2016)

En el caso del estudio de validación para *Listeria* (ADRIA D., 2019b) se realizó de igual forma la comparación del método convencional ISO 1129-1 (2017). Los resultados de sensibilidad del método molecular es de 85.5%, el método convencional es de 86.9%, la exactitud relativa es de 86.7% y el ratio de falsos positivos de la prueba molecular es de 0.8% Los resultados negativos se obtienen máximo en el día 2 y en el día 5 según método molecular o convencional respectivamente, y para los positivos en el día 4 para molecular mientras que para el método ISO puede llegar a extenderse hasta 11 días. Ambos estudios de validación cumplen con los requisitos del protocolo de validación ISO 16140 (2016) y los requerimientos técnicos de AFNOR.

#### b. Métodos moleculares

El procedimiento molecular LAMP posee características distintas a la reacción de cadena de polimerasa (PCR) en cuanto a la enzima, el *primer*,

el comportamiento ante los interferentes y el tiempo necesario para la detección (3M, 2020) En comparación con el PCR, LAMP muestra tolerancia a sustancias biológicas como sangre u orina, y otros inhibidores o interferentes como suelo y medios de cultivo, por lo que muestra una robustez mayor que PCR (Yang Q, Domesle KJ, Ge B; 2018). En cuanto a la sensibilidad, una comparación en la detección de ADN de *Salmonella* indica que PCR puede detectar 50 ng, mientras que LAMP puede detectar 50 pg del mismo. Sin embargo, qLAMP puede detectar 500 fg de ADN, lo cual indica que este método tiene mayor sensibilidad (Vichaibun V, y Kanchanaphum P; 2020).

#### F. Tecnología usada: LAMP

La técnica molecular utilizada en el Sistema de Detección Molecular 3M™ (MDA) es la Amplificación isotérmica mediada por bucle (LAMP) el cual permite detectar fragmentos específicos de ADN de los patógenos buscados. LAMP técnica fue desarrollada en el año 2000 (Notomi T, Okayama H, Masubuchi H, Yonekawa T, Watanabe K,... ; 2020).

En el mercado hay diversos tipos de equipos capaces de detectar patógenos mediante la técnica LAMP. Esta detección se refleja a partir de la turbidez, proveniente del pirofosfato de magnesio que es subproducto de la síntesis de ADN; o sistemas de fluorescencia, mediante reacciones de quelación. (Notomi T, Mori Y, Tomita N, y Kanda, H; 2015).

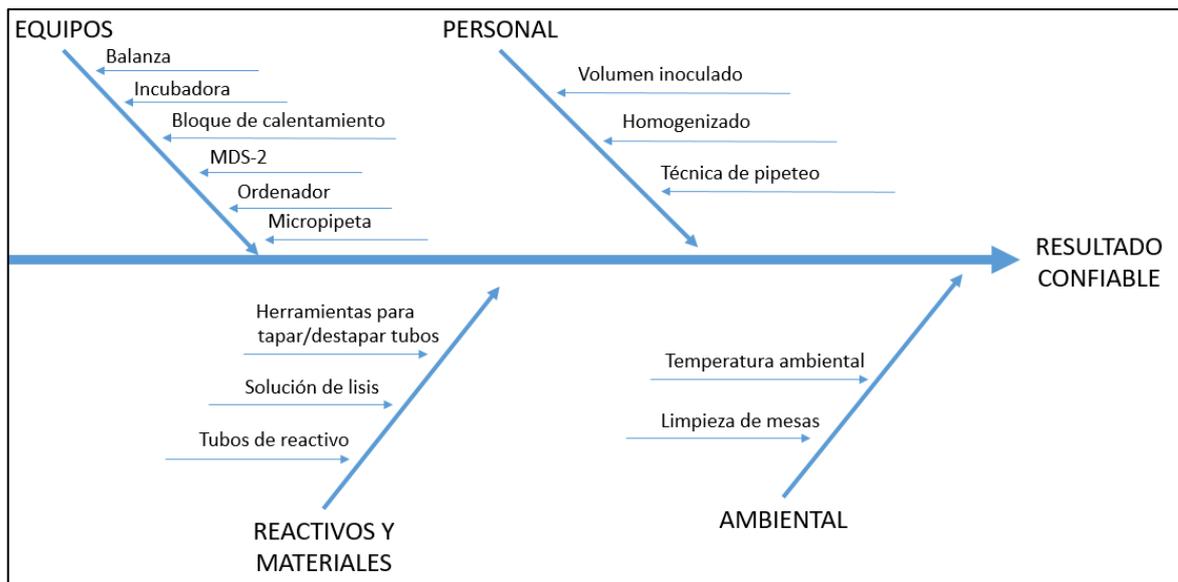
Para el caso del MDA-2, la detección es mediante bioluminiscencia (3M, 2018) Esta tecnología requiere 3 elementos a analizar: la muestra, tubo de reacción negativo (control negativo/blanco) y un tubo de reacción positivo (control positivo) brindado como parte del kit. (3M, 2011)

#### G. Método de detección

Para cada patógeno se utilizará un método estandarizado. Se ha elaborado un diagrama de espina de pescado en la Ilustración 3 en donde se muestran los distintos factores que pueden afectar a la detección del patógeno objetivo. Este trabajo se centra en la parte de control al personal.

Los otros factores involucrados en un resultado confiable son los equipos, que se pueden controlar mediante su verificación según los requisitos de la norma ISO/IEC 17025 (2017) que incluyen calibraciones, mantenimientos y verificaciones de las mismas. En cuanto a los materiales y reactivos, se verifica mediante los controles positivos y negativos en cada corrida de los ensayos, así como la revisión de la vigencia de los reactivos y su apariencia física de acuerdo a lo establecido en los certificados de calidad. En el caso del factor ambiental, este está controlado realizando muestreos de patógenos, conservando la limpieza según buenas prácticas de laboratorio y controlando las condiciones ambientales periódicamente.

Ilustración 3. Diagrama de espina de pescado



Fuente: Elaboración propia

El equipo usado es el MDS2, el cual brinda como resultado del análisis un símbolo positivo o negativo, indicando presencia o ausencia del patógeno. Además, se puede realizar un seguimiento a lo largo del tiempo de corrida de la intensidad de bioluminiscencia mediante una gráfica. La interpretación de los resultados y del informe final se encuentra en el Anexo 1.

a. Detección de *Salmonella* mediante el método AOAC 2016.01

El procedimiento para realizar el ensayo de *Salmonella* utilizado en el laboratorio es un método estandarizado AOAC (2016a), y el instructivo como documento interno de [REDACTED] (2020a) de ubica con el código [REDACTED]. Este método indica los diluyentes a usar, la temperatura y tiempo de incubación, dependiendo del producto a analizar

(ver Anexo 2). Para los alimentos crudos y no procesados se usa el protocolo 2, como es el caso de las paltas y los arándanos. En este protocolo indica que se realiza una dilución 1:10 del alimento en Agua peptona tamponada, pesando 25 g. Se incuba por  $22 \pm 2$  h a  $41.5 \pm 1^\circ\text{C}$ . Luego se procede a transferir 20  $\mu\text{L}$  de esta suspensión a los tubos con caldo de lisis. Se calientan a  $100 \pm 1^\circ\text{C}$  por 15 minutos, se deja enfriar en los bloques de enfriamiento. Se transfiere 20  $\mu\text{L}$  de los tubos de lisis a los tubos de reacción. Finalmente, se coloca en el equipo MDA-2. Al transcurrir 60 minutos se tienen los resultados negativos o presuntivos positivos. En el caso de los presuntivos positivos, se requiere una fase confirmatoria con caldo Rappaport, agar XLD, agar nutritivo y pruebas serológicas.

b. Detección de *Listeria sp* mediante el método AOAC 2016.07

En el caso de la detección de *Listeria*, se utiliza el método AOAC 2016.07 (2016b), y el instructivo como documento interno de [REDACTED] (2020b) de ubica con el código [REDACTED], en el cual se indica el uso del “Protocolo general” destinado a alimentos en general y muestras ambientales (Ver Anexo 3). De acuerdo con esto, se pesan 25 g del alimento a ensaya y se añade 225 mL del medio Half Frasser. Se incuba a  $37^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$  por  $27 \text{ h} \pm 3\text{h}$ . Luego se procede a transferir 20  $\mu\text{L}$  de esta suspensión a los tubos con caldo de lisis. Se calientan a  $100 \pm 1^\circ\text{C}$  por 15 minutos, se deja enfriar en los bloques de enfriamiento. Se transfiere 20  $\mu\text{L}$  de los tubos de lisis a los tubos de reacción. Se coloca en el equipo

MDA-2 previamente configurado. Al transcurrir 90 minutos se tienen los resultados negativos o presuntivos positivos. De igual forma que en la detección de *Salmonella*, a los presuntivos positivos se realiza una prueba de confirmación. En este caso se realiza con caldo Frasser con suplementos, agar ALOA, agar PALCAM, agar Sangre y Agar TSAYE. También se utilizan las pruebas de catalasa y la prueba de tinción gram.

### III. OBJETIVOS

#### a. Objetivo general

Evaluar la competencia técnica del analista de acuerdo a lo establecido en la norma ISO/IEC 17025:2017 en los métodos de detección de *Salmonella* y *Listeria* en palta y arándano mediante la descripción de los resultados obtenidos de la ejecución de los ensayos.

#### b. Objetivos específicos

1. Describir datos de destreza técnica en la detección de *Salmonella* y *Listeria* mediante el uso del Sistema De Detección Molecular 2- 3M.
2. Determinar el cumplimiento de los requisitos del método de ensayo según los métodos AOAC 2016.01 y AOAC 2016.07.
3. Evaluar el conocimiento relacionado a la interpretación de las pruebas bioquímicas características de *Salmonella* y *Listeria*, y la secuencia de los métodos AOAC 2016.01 y 2016.07.

#### IV. METODOLOGÍA

Este estudio se realizó en las instalaciones de [REDACTED], el cual se encuentra acreditado bajo la norma ISO/IEC 17025:2017 por la entidad ANAB (ANSI National Accreditation Board) hasta mayo 2021. Los ensayos son ejecutados por el personal en evaluación, y también por un analista capacitado para realizar la comparación cuando se requiera.

##### A. Destreza técnica

Este punto evalúa la capacidad técnica para realizar el pipeteo, que involucra el dispensado del volumen correcto y la homogenización con la perla del reactivo, y también la capacidad para usar el software MDA-2.

##### a. Réplicas negativas

Se realizan ocho repeticiones de muestras de paltas y arándanos confirmados negativos por el analista de referencia. (Ver (A) en Ilustración 4)

El cumplimiento de este punto se dará si todas las muestras brindan un resultado negativo, es decir ausencia de patógeno.

##### b. Control de reactivo

Se realiza el análisis del control de reactivo que está incluido en el kit y es necesario por cada corrida de acuerdo al manual del uso del equipo (3M, 2011).

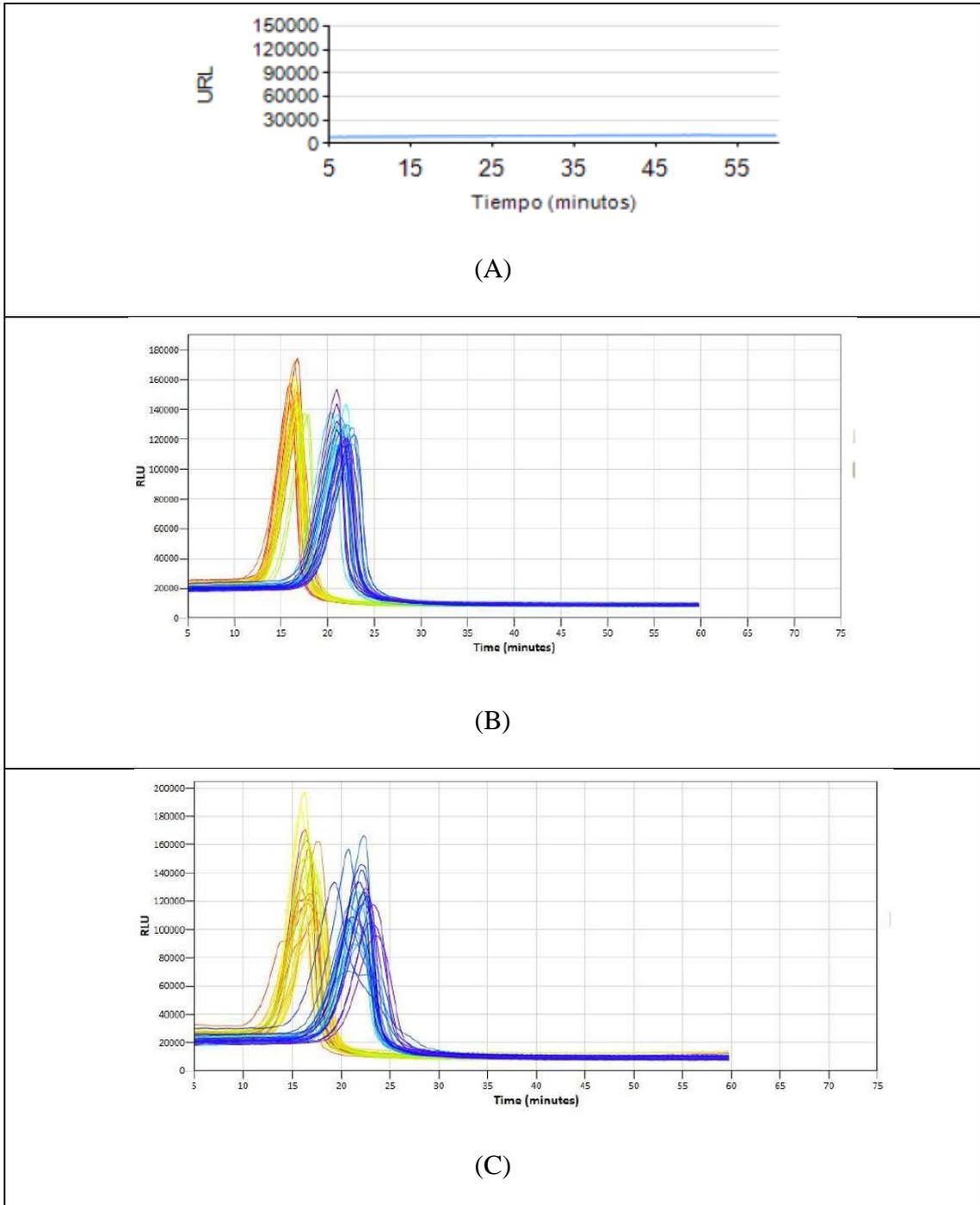
El cumplimiento se da si los picos de las curvas se presentan entre el minuto 15 y 21 para detección de *Salmonella*, y del 15 y 25 para *Listeria*.

c. Control de pipeteo

Se realizan 16 repeticiones con la pipeta monocanal, y 5 repeticiones con la pipeta multicanal, que son los dos tipos de micropipetas utilizadas en el laboratorio.

El cumplimiento se brinda mediante la detección positiva del patógeno entre los minutos establecidos en el punto anterior, y las curvas muestran repetibilidad y uniformidad entre ellas (Ver (B) y (C) en Ilustración 4).

Ilustración 4. Resultado negativo (A), resultados positivos considerados: (B) Excelentes y (C) Buenos.



(B) y (C) En tonos amarillos y anaranjados para *Salmonella*, en tonos azules y morados para *Listeria*.

Fuente: (A) Elaboración propia. (B) y (C) (Dallos R, 2019)

Tabla 2. Criterios de aceptación y resultados para la calificación operativa 3M MDA2

	<b>Prueba</b>	<b>Criterio de aprobación</b>
<b>1</b>	8 réplicas de muestras negativas	Pocillos con resultado negativo.
<b>2</b>	Incluir en la prueba 1 un control de reactivo RC	Debe obtenerse dentro de los 15 a 21 min para <i>Salmonella</i> . Debe obtenerse dentro de los 15 a 25 min para <i>Listeria</i> .
<b>3</b>	16 pruebas en 2 franjas con pipeta individual + 40 pruebas en 5 franjas con pipeta multicanal	Pocillos con resultado positivo.

B. Evaluación de requisitos del método de ensayo

Se toman en consideración los valores descritos en los informes de validación de los métodos de detección de *Salmonella* y *Listeria* según AOAC 2016.1 y 2016.07, respectivamente. Se comparan los datos indicados en el método de ensayo con los obtenidos en la ejecución del ensayo bajo los mismos criterios de concentración del patógeno, posibles interferentes bacterianos, y la exactitud del ensayo.

a. Límite de detección

Se determina si el analista es capaz de detectar el número mínimo de microorganismos objetivo, en este caso es 5 UFC/ml para las detecciones de *Salmonella* y *Listeria*.

Se inoculó 5 UFC/ml a una muestra de 25 g con 225 ml de diluyente correspondiente al ensayo a realizar, inoculando la dilución  $10^{-8}$  a partir del liofilizado. Se realizaron dos corridas por ensayo, una en palta y otra en arándanos.

b. Especificidad

Determina la capacidad del analista en evaluación de detectar el patógeno objetivo a pesar de la presencia de otras bacterias.

Se inoculó *Escherichia coli*: 1 ml dilución  $10^{-6}$  a partir del liofilizado para obtener 100 -1000 UFC/ml: 25 g+ 225 ml diluyente. Este inóculo se realizó en las bolsas homogenizadas de arándanos y diluyente.

c. Exactitud Relativa

Evalúa el grado de concordancia entre los resultados del analista evaluado y los obtenidos por el analista cualificado de referencia tomando en cuenta si las muestras han sido inoculadas, o no. Se calcula mediante la siguiente fórmula (ADRIA D., 2019):

$$Exactitud\ relativa\% = \frac{PV + NV}{PV + NV + DN + DP} \times 100$$

Donde: PV= Positivo verdadero, NV= Negativo Verdadero, DN= Falso

Negativo y DP= Falso Positivo

Un mayor porcentaje de exactitud relativa, indica un mayor número de muestras con un resultado confiable.

### C. Evaluación de conocimiento

Se aplica un examen de conocimientos generales y la norma evaluada de forma escrita, cuya finalidad es calificar numéricamente el entendimiento del método de referencia y las características de las bacterias en análisis. El detalle del contenido se muestra en Tabla 3 y Tabla 4.

Este examen comprende esquematizar el método, así como fundamentos básicos de las pruebas bioquímicas que se realizan en la parte confirmatoria del ensayo.

Tabla 3. Contenido de la evaluación escrita para detección de *Salmonella*

<b>CONTENIDO</b>	<b>Criterio de aceptación</b>
Secuencia lógica del método AOAC 2016.01	Según lo descrito en la sección II.G.a
Identificación de curvas típicas para <i>Salmonella</i> +	Según lo descrito en Tabla 2, ítem 2
Reconocimiento de colonias típicas en XLD	Colonias rosadas con/sin centro negro
Reconocimiento de colonias típicas en Bismuto Sulfito	Colonias marrón-negras con brillo verde metálico
Reconocimiento resultado positivo en la serología	Autoaglutinación (-) Aglutinación con antisuero H (+)

Tabla 4. Contenido de la evaluación escrita para detección de *Listeria*

<b>CONTENIDO</b>	<b>Criterio de aceptación</b>
Secuencia lógica del método AOAC 2016.07	Según lo descrito en la sección II.G.b
Identificación de curvas típicas para <i>Listeria</i> +	Según lo descrito en Tabla 2, ítem 2
Reconocimiento de colonias típicas en ALOA	Color azul- verde
Reconocimiento de colonias típicas en PALCAM	Colonias gris-negras con halo
Reconocimiento de colonias típicas en Agar Sangre	Beta hemolisis
Reconocimiento reacción a prueba de catalasa	Positivo
Tinción Gram	Bacilos gram positivos

## V. RESULTADOS

### A. Destreza técnica

A partir de los resultados obtenidos, se comparan con los resultados óptimos aceptables establecidos en la Tabla 2.

Las gráficas resultantes de las corridas se muestran en la Ilustración 5, Ilustración 6 e Ilustración 7. En ellas se tiene en el eje X el tiempo transcurrido, y en el eje Y las unidades relativas a la luz (URL) el cual indica la intensidad de bioluminiscencia de la muestra.

En la Ilustración 5 se muestran las curvas correspondientes a la prueba de réplicas negativas. Estas reflejan un resultado negativo a la detección del patógeno objetivo.

En la Ilustración 6 se muestran las curvas de los controles de reactivos, cuyas curvas se muestran positivas para *Salmonella* (A) y *Listeria* (B). En ambos casos, el pico se encuentra entre los minutos 15 - 20 aproximadamente. Las curvas se encuentran estables en los primeros minutos, y también posteriores al pico. La presencia de picos indica que es un resultado positivo.

La Ilustración 7 muestra el resultado de la prueba de pipeteo. Estas curvas mostraron una curva positiva que indica detección del patógeno. De igual forma, se ve el inicio estable y de la misma forma la parte posterior al pico.

Ilustración 5. Resultado de corrida de 8 pocillos negativos.

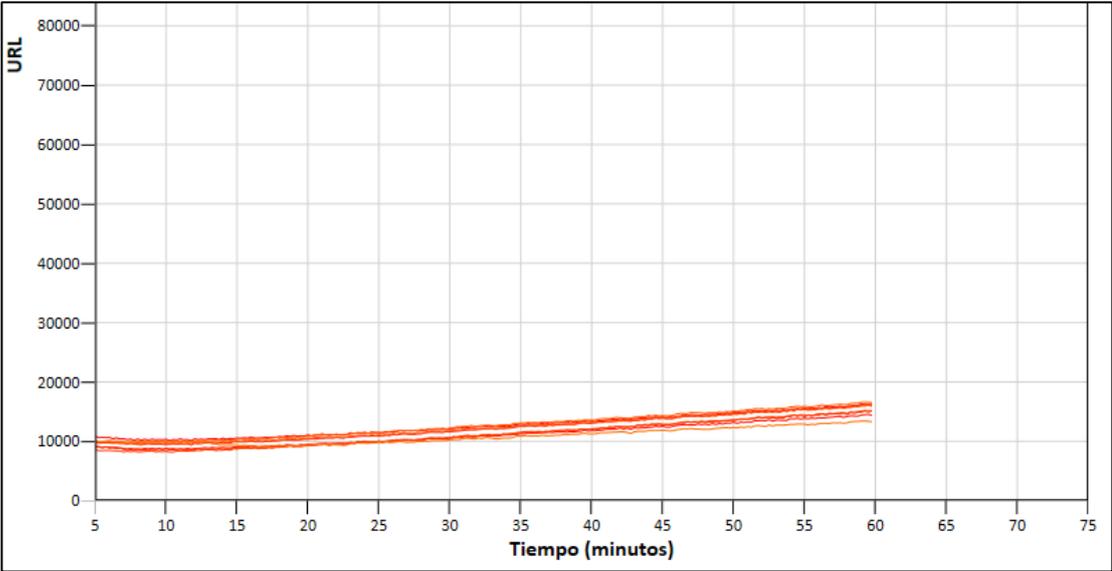


Ilustración 6. Resultado de control de reactivo para (A) Salmonella y (B) Listeria

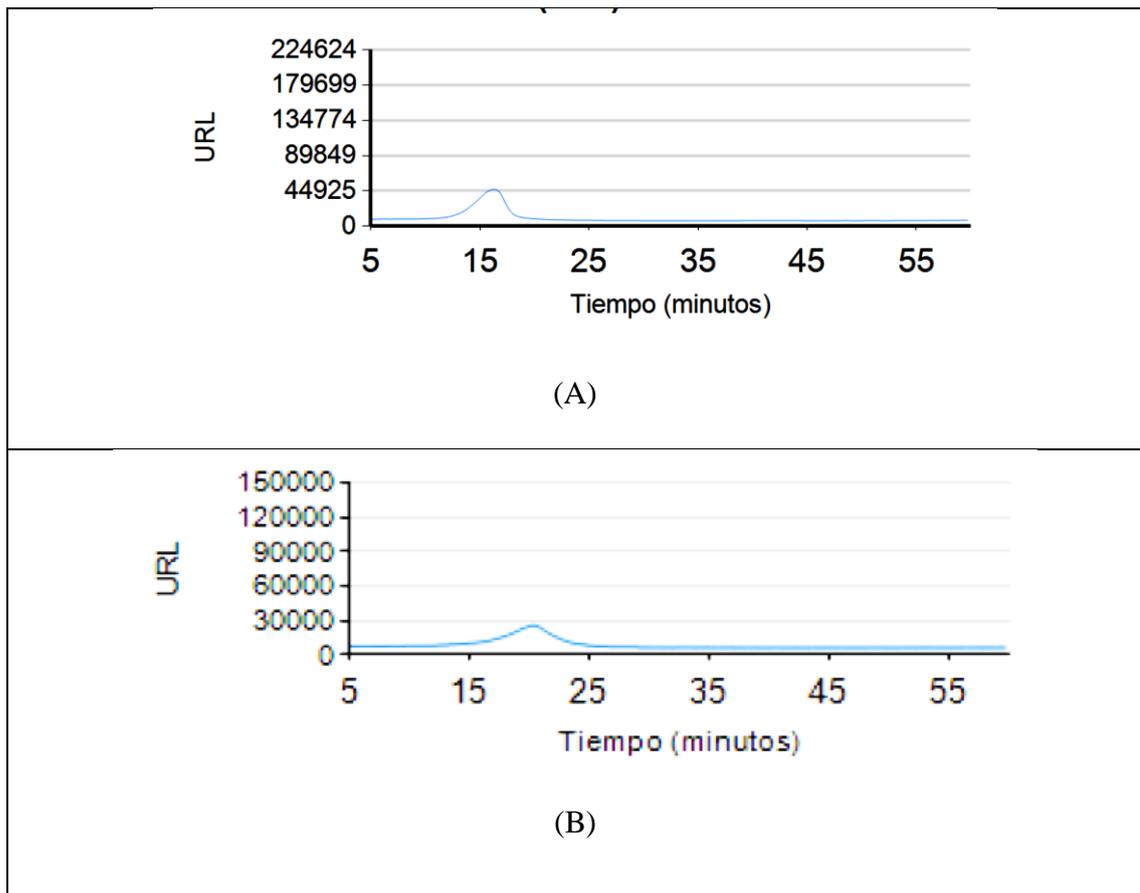
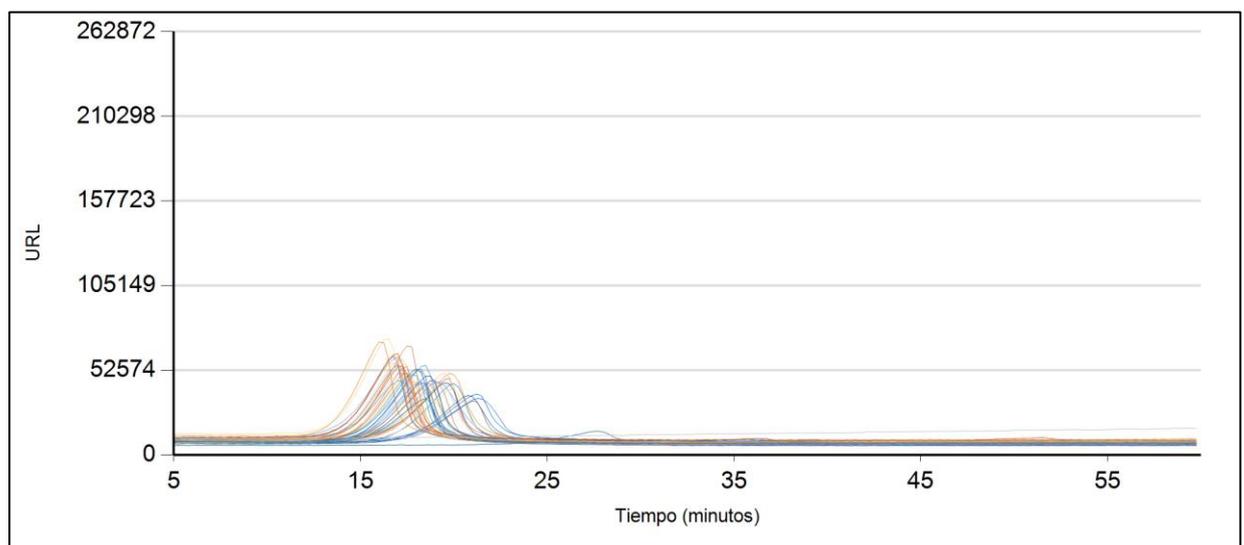


Ilustración 7. Resultado de prueba de pipeteo



B. Evaluación de requisitos del método de ensayo

a. Límite de detección

Posterior a la inoculación, las corridas mostraron detección del patógeno objetivo.

- Inóculo de *Salmonella* en palta: Detección positiva
- Inóculo de *Salmonella* en arándanos: Detección positiva
- Inóculo de *Listeria* en palta: Detección positiva
- Inóculo de *Listeria* en arándanos: Detección positiva

b. Especificidad

Se realizó la inoculación en muestras de arándanos, los resultados se muestran en la *Tabla 5*.

Esta tabla refleja el método de ensayo utilizado para la detección del patógeno, la inoculación de las bacterias por muestras, y el resultado de la detección. En el caso del ensayo de detección *Salmonella*, se detectó el patógeno únicamente en la muestra inoculada con este. Sucede lo mismo con el ensayo de detección de *Listeria*.

Tabla 5. Resultados de la evaluación de especificidad

Muestra	Patógeno objetivo	Método de ensayo	Inóculo			Resultado
			<i>Salmonella enterica</i>	<i>Listeria monocytogenes</i>	<i>Escherichia. Coli</i>	
1	<i>Salmonella</i>	AOAC 2016.01	+		+	Presencia
2	<i>Salmonella</i>		-		+	Ausencia
3	<i>Salmonella</i>		-		+	Ausencia
4	<i>Salmonella</i>		-		+	Ausencia
5	<i>Salmonella</i>		-		+	Ausencia
6	<i>Listeria</i>	AOAC 2016.07		+	+	Presencia
7	<i>Listeria</i>			-	+	Ausencia
8	<i>Listeria</i>			-	+	Ausencia
9	<i>Listeria</i>			-	+	Ausencia
10	<i>Listeria</i>			-	+	Ausencia

c. Exactitud Relativa:

Evalúa el grado de concordancia entre los resultados del analista evaluado y los obtenidos por el analista cualificado y considerando los inóculos de *Salmonella* en la Tabla 6 y *Listeria sp.* en la Tabla 7.

Se realizaron 9 ensayos en total para *Salmonella*, 5 con resultado positivo verdadero y 4 con resultado negativo. El analista en evaluación detectó presencia de este patógeno en las 5 muestras positivas, y reportó ausencia en las 4 muestras negativas. Esto resulta en una exactitud relativa del 100%.

En el caso de *Listeria*, se realizaron 8 ensayos de detección divididos 4 muestras positivas y 4 negativas. El analista en evaluación detectó presencia en 4 muestras, y ausencia en otras 4. De igual modo, la exactitud relativa resulta en un 100%.

Tabla 6. Resultados de exactitud relativa para *Salmonella*

<b>Resultados</b>	<b>Resultado Asignado POSITIVO</b>	<b>Resultado Asignado NEGATIVO</b>	<b>Exactitud Relativa</b>
<b>Detección POSITIVA</b>	5	0	<b>100 %</b>
<b>Detección NEGATIVA</b>	0	4	

Tabla 7. Resultados de exactitud relativa para *Listeria*

<b>Resultados</b>	<b>Resultado Asignado POSITIVO</b>	<b>Resultado Asignado NEGATIVO</b>	<b>Exactitud Relativa</b>
<b>Detección POSITIVA</b>	4	0	<b>100 %</b>
<b>Detección NEGATIVA</b>	0	4	

C. Evaluación de conocimiento

El examen escrito tuvo en ambos casos una nota aprobatoria, equivalente a 16 para el caso del método AOAC 2016.01 y 17 para el método 2016.07. Los temas desarrollados en el examen se muestran en la Tabla 3 y *Tabla 4*. La sustracción de puntos en la evaluación se debe a errores relacionados a los componentes indicadores presentes en los agares, que se evalúan en los puntos de reconocimiento de las colonias.

## VI. DISCUSION

De acuerdo a los requisitos de ISO/IEC 17025 (2017) la evaluación del personal analista previo a su autorización es necesaria. En este caso, esta evaluación se ha dividido en 3 partes, que son la destreza manual que involucra técnicas de pipeteo y manejo de los materiales; obtención de resultados esperados según el método; y una evaluación de conocimientos.

La destreza y manejo de materiales se evalúa por recomendación del proveedor (Dallos R, 2019) y se realiza mediante una repetición de ensayos, iniciando con la ejecución de resultados negativos, el cual consiste en agregar solución de lisis no inoculado a un tubo de reactivo. Se espera un resultado negativo luego de la corrida en el equipo MDA-2. En el caso que hubiera algún pico que indique un positivo presuntivo, esto indicaría que en algún punto del proceso ha habido una desviación y el resultado de esta corrida y todas las muestras que están relacionadas con ella se dan como inválidas. Las causas de este falso positivo pueden estar relacionadas con una contaminación cruzada, por lo que el proveedor recomienda el uso de guantes y el cambio de estos, el uso de puntas de pipetas estériles y únicas por muestra, asepsia en el área de trabajo y su posterior descontaminación, y un buen tratamiento en general de los residuos utilizados por corrida para reducir el riesgo de esta contaminación cruzada. (3M, 2011)

Las curvas mostradas en la Ilustración 5 indican que el resultado de las 8 repeticiones es conforme el resultado de la corrida de los controles negativos. Es decir que la ejecución se ha realizado de manera correcta. Este control es indiferente para la detección de *Salmonella* o *Listeria*, por lo que se realiza solamente una vez y es válido para ambos ensayos.

Como segundo control, se evalúa el comportamiento del control de reactivo que está incluido como un elemento de cajas de los kit de MDA-2. Su finalidad es brindar una curva positiva y es requerido para la conformidad de cada corrida de MDA-2. Este control positivo permite visualizar en el pico y la curva positiva característica. Para realizar este control se añade solución de lisis al tubo de control. El resultado negativo indicaría un mal manejo de los insumos, inadecuada ejecución del método, o uso incorrecto de los materiales. Es un control de calidad requerido por el fabricante (3M, 2011). Ilustración 6 el pico de Salmonella se ubica entre los minutos 15 y 21, lo que se encuentra acorde a lo esperado del método. Esto indica conformidad de este punto. En el caso de detección de *Listeria*, la conformidad se encuentra entre el minuto 15 y 25, indicando igualmente la conformidad para este patógeno (Dallos R, 2019).

La destreza en el pipeteo, se refleja en la *Ilustración 7* en la que se compara las curvas obtenidas de resultados positivos, y se espera que estas muestren uniformidad en cuanto al tiempo en el que se obtiene el pico de bioluminiscencia. La poca uniformidad indica fallas en el pipeteo expresándose de la siguiente manera (Dallos R, 2019).:

- Si la pipeta no dispensa el volumen correspondiente de 20  $\mu$ l y dispensa menos, la curva aparecerá antes de los 15 minutos; en cambio, si se dispensa más de el volumen requerido, el pico de la curva aparecerá pasados 21 - 25 minutos.
- Si las curvas presentan valles, indica una homogenización incompleta de la perla de reactivo con la muestra.
- Si se rompe la perla de reactivo, la curva aparecerá deforme.
- Si se dispensa precipitado luego de la lisis, la curva aparecerá a destiempo y sin la forma característica.

-Si la curva muestra en los primeros minutos un comportamiento errante y no horizontal, podrían existir burbujas de aire en el fondo del tubo o gotas de reacción en las paredes de los tubos.

En el caso del resultado mostrado en la *Ilustración 7*, en donde se aprecia que a pesar de que todas las curvas se aparecen en el tiempo esperado de 15 - 25 minutos, no se ve una clara repetibilidad en cuanto al pico de las curvas. Esto indicaría cumplimiento del requisito pero a su vez muestra cierta deficiencia en la técnica de pipeteo el cual refleja falta de pericia para esta actividad.

Para los resultados de la evaluación de los requerimientos del método, el límite de detección, especificidad y exactitud, el analista en evaluación alcanzó satisfactoriamente los resultados deseados.

Con respecto a los criterios de evaluación evaluados, se ha realizado la comparación con el programa de validación de los métodos según ADRIA Developpement (2019a) (2019b). Para estos métodos de detección se ha realizado esta validación en 3 partes, la comparación con el método convencional, la practicidad, y estudios interlaboratorio. En la sección de la comparación de métodos, se ha estudiado la sensibilidad, el nivel de detección del estudio, y la inclusividad y exclusividad. Realizando la analogía con lo que se ha evaluado en este trabajo se tiene en común la detección mínima del estudio y la inclusividad y exclusividad que se evalúan mediante la especificidad. La sensibilidad no se evalúa al realizar la competencia al personal debido a que en el estudio de validación se compara el método de referencia con el propuesto. En su reemplazo, se mide la exactitud que analiza la concordancia de los resultados entre un analista ya autorizado y que ha pasado por evaluaciones de aptitud, con los el analista en proceso.

Como tercer ítem de evaluación, el examen escrito resultó satisfactorio. Los resultados de las pruebas bioquímicas cumplen con la descripción de los medios establecidos en el FDA/BAM (2020) *Salmonella* y FDA/BAM (2017) *Listeria* . Los errores relacionados a los componentes de los medios de cultivo fueron discutidos y aclarados posterior a la corrección de la evaluación.

## VII. CONCLUSIÓN

1. Los resultados obtenidos en la ejecución de los ensayos de detección de Salmonella en cuanto a la destreza técnica se encuentra dentro de los parámetros que se han establecido como aceptables por el laboratorio.
2. Para los resultados de la evaluación del método; el límite de detección, especificidad y exactitud; el analista en evaluación alcanzó satisfactoriamente los resultados deseados.  
  
En su mayoría, los requisitos de evaluación de la competencia del analista se encuentran cubiertos en comparación con los que se utilizan para la validación de métodos.
3. Los resultados de conocimiento para este analista en evaluación refleja el manejo teórico del método y las características de las pruebas bioquímicas para cada patógeno.
4. Los resultados obtenidos en la ejecución de los ensayos de detección de Salmonella según AOAC 2016.01 y detección de Listeria según AOAC 2016.07 evidencia que el analista se encuentra competente para su autorización de acuerdo con los parámetros de evaluación del laboratorio

████████████████████.

## VIII. RECOMENDACIONES

- Evaluar la implementación del método qLAMP que ofrece una mayor sensibilidad que la tecnología LAMP usada actualmente.
- Evaluar la relevancia de incorporación del nivel medio de inoculación en el proceso de autorización del personal, estableciendo los 3 niveles; bajo, medio, alto; tal y como se muestra en los estudios de validación de los métodos.
- Es necesario hacer un posterior seguimiento a la técnica de pipeteo, el cual se espera una mejora con el aumento de la ejecución de los ensayos.

La experiencia laboral luego de egresar de la universidad ha presentado varios retos. Estos podrían minimizarse si se enfocaran dentro del plan de estudios en la universidad. Los temas que se podrían reforzar se mencionan a continuación:

- Mediante un curso obligatorio, reforzar la importancia de las normas ISO relacionados a las actividades de laboratorio, por ejemplo la ISO/IEC 17025; las normas AOAC correspondientes a métodos de ensayo: requisitos de validación de métodos, y un panorama general del trabajo en un laboratorio comercial.
- Dentro del transcurso de la carrera, brindar horarios flexibles para poder realizar prácticas pre-profesionales y tener un acercamiento real a la vida laboral en el país.

## IX. REFERENCIAS

3M. (2011) Manual del Usuario del Sistema de Detección Molecular.

3M. (2018). The 3Mtm molecular detection system- enabling control for food-borne pathogen detection

3M. (2020) From PCR to LAMP: The evolution of rapid-testing in food safety.

<https://food-safety-news.3m.com/fsn/lamp-vs-pcr/>

ADRIA Développement (2019a). Summary Report 3M MDA 2 Salmonella. Version 0.

ADRIA Développement (2019b). Summary Report 3M MDA 2 *Listeria*. Version 0.

AOAC Official Method 2016.01 (2016a). *Salmonella spp* in select foods and environmental surfaces.

AOAC Official Method 2016.07 (2016b). Detection of *Listeria* species in select foods and environmental surfaces.

BCR (Banco Central de Reserva del Perú). (S.F. a). Agrícola - agroexportación e industrial - palta.

<https://estadisticas.bcrp.gob.pe/estadisticas/series/anuales/resultados/PM05089AA/html/2005/2020/>

BCR (Banco Central de Reserva del Perú). (S.F. b). Agropecuario - arándanos.

<https://estadisticas.bcrp.gob.pe/estadisticas/series/mensuales/resultados/PN37532BM/html>

BCR (Banco Central de Reserva del Perú). (S.F. c). Agropecuario - paltas.

<https://estadisticas.bcrp.gob.pe/estadisticas/series/mensuales/resultados/PN37530BM/html>

- CDC (Centros para el Control y Prevención de Enfermedades). (2017) *Listeria* (Listeriosis). <https://www.cdc.gov/spanish/listeria/symptoms.html>
- Dallos, R. (2019). Calificación operacional (OQ) sistema 3Mtm de detección molecular.
- Díaz, M., Chávez, M., & Saucedo, E. (2013). *Listeria monocytogenes* en leche y queso fresco como vehículo transmisor de listeriosis humana en la provincia de Trujillo, Perú. *Revista Ciencia y Tecnología*, 9(2), 23-38.
- FDA (Food and Drug Administration) (2020). Get the facts about *Listeria*. <https://www.fda.gov/animal-veterinary/animal-health-literacy/get-facts-about-listeria>
- FDA/BAM (2017). Chapter 10: Detection of *Listeria monocytogenes* in foods and environmental samples, and enumeration of *Listeria monocytogenes* in foods.
- FDA/BAM (2020). Chapter 5: *Salmonella*.
- INACAL-DA (2018) DA-acr-09D: Directriz para la evaluación de la incertidumbre de la medición.
- INACAL-DA (2020) DA-acr-13D: Participación en Ensayos de Aptitud/ Comparaciones Interlaboratorio.
- ISO 1129 (2017). Microbiology of the food chain- Horizontal method for the detection and enumeration of *Listeria monocytogenes* and of *Listeria spp.*
- ISO 6579 (2012). Microbiology of food and animal feed- horizontal method for the detection, enumeration and serotyping *Salmonella*
- ISO 16140 (2016) Microbiology of the food chain - Method validation

ISO/IEC 17025 (2017). Requisitos generales para la competencia de los laboratorios de ensayo y de calibración

Linder, E. (1995). Toxicología de alimentos. Zaragoza, España Acribia.

Lourenço, J., Leclercq, A., Lecuit, M., & Charlier, C. (2018). Listeriosis. EMC - Tratado De Medicina, 22(3), 1-9.

Malkawi, H. I. (2003). Molecular identification of *Salmonella* isolates from poultry and meat products in Irbid City, Jordan. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 19, 455–459.

<https://link.springer.com/article/10.1023/A:1025113912366>

[REDACTED] (2020a) [REDACTED] Detección molecular de *Salmonella spp.*

[REDACTED] (2020b) [REDACTED] Detección molecular de *Listeria spp.*

[REDACTED] (2019a) [REDACTED] Formación.

[REDACTED] (2019b) [REDACTED] Proficiency test.

MINAGRI (Ministerio de Desarrollo Agrario y Riego) (2020). Exportaciones de paltas sumaron US\$ 636 millones en los primeros siete meses del año.

<https://www.gob.pe/institucion/midagri/noticias/305745-exportaciones-de-paltas-sumaron-us-636-millones-en-los-primeros-siete-meses-del-ano>

Monteza, A. R. (2018). Frecuencia de *Listeria spp.* en palta congelada. provincia de Viru - departamento de La Libertad - noviembre 2015- mayo 2016. Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo). 49.

Moraes, D., Duarte, S., Azeredo, T., & Rezende, C. (2020). Detection of *Salmonella* spp. by conventional bacteriology and by quantitative polymerase-chain reaction

in commercial egg structures. *Brazilian Journal of Poultry Science*, 18(1), 117-124.

Notomi, T., Okayama, H., Masubuchi, H., Yonekawa, T., Watanabe, K., Amino, N., & Hase, T. (2000). Loop-mediated isothermal amplification of DNA. *Nucleic acids research*, 28(12), E63.

Notomi, T., Mori, Y., Tomita, N., & Kanda, H. (2015). Loop-mediated isothermal amplification (LAMP): Principle, features, and future prospects. *The Journal of Microbiology*, 53(1), 1-5.

Organización Mundial de la Salud (OMS). (2018). *Salmonella* (no tifoidea).  
[https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/salmonella-\(non-typhoidal\)](https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/salmonella-(non-typhoidal))

Parra, M., Durango, J., & Mattar, S. (2002). Microbiología, patogénesis, epidemiología clínica y diagnóstico de las infecciones producidas por *Salmonella*. *MVZ Córdoba*, 7(2), 187-200.

Resolución Ministerial N°591-2008/MINSA. “Norma Sanitaria que establece los criterios microbiológicos de calidad sanitaria e inocuidad para los alimentos y bebidas de consumo humano”. Perú.

Rodríguez-Auad, J. P. (2018). Panorama de la infección por *Listeria monocytogenes*. *Revista Chilena De Infectología*, 35(6), 649-657.

Salyers, A., & Witt, D. (2002). *Bacteria pathogenesis: A molecular approach*. 2da edición. Washinton.

De los Santos, V.; Alfricia, A., Hernández, A. M.; Eslava, C. A., Landa, P., Mora, G., & Bernard, J. (2012). Producción de biopelículas y resistencia a desinfectantes en

cepas de *Salmonella* aisladas de nopal, agua y suelo. Revista Mexicana De Ciencias Agrícolas. México. 3(6), 1063-1074.

Sarowska, J., Frej-Mądrzak, M., Jama-Kmiecik, A., Kilian, A., Teryks-Wołyniec, D., & Choroszy-Król, I. (2016). Detection of *Salmonella* in foods using a reference PN-ISO method and an alternative method based on loop-mediated isothermal amplification coupled with bioluminescence. Advances in Clinical and Experimental Medicine: Official Organ Wroclaw Medical University, 25(5), 945-950.

Vichaibun, V., & Kanchanaphum, P. (2020). Quantitative LAMP and PCR detection of *Salmonella* in chicken samples collected from local markets around Pathum Thani province, Thailand. International Journal of Food Science, 2020(3), 1-6.

Yang, Q., Domesle, K. J., & Ge, B. (2018). Loop-mediated isothermal amplification for *Salmonella* detection in food and feed: Current applications and future directions. Foodborne Pathogens and Disease, 15(6), 309-331.

## X. ANEXOS

### ANEXO 1: Resultados en MDA2

El equipo MDA2 brinda como resultado de la corrida un informe. Este incluye la identificación de la muestra, el ensayo que se ejecutó, el resultado de esta corrida, unos gráficos generales y gráficos por pocillos. El resultado se expresa mediante un símbolo ubicado sobre cada pocillo de la gradilla el resultado. Estos símbolos y su interpretación se muestran en la imagen siguiente.

Tipo de hoyo	Símbolo de resultado del hoyo	Resultado	Interpretación
Muestra		Positivo	La muestra es presuntiva positiva para el patógeno objetivo.
Muestra		Negativo	La muestra es negativa para el patógeno objetivo.
Muestra		Inhibido	La matriz de la muestra fue inhibidora para el análisis. Es posible que se deba repetir la prueba. Para obtener más información, consulte la sección de Diagnóstico de fallas y las Instrucciones del producto para el kit de análisis.
Muestra		Inspeccionar	La presencia o ausencia del patógeno objetivo era indeterminada. Es posible que se deba repetir la prueba. Para obtener más información, consulte la sección de Diagnóstico de fallas y las Instrucciones del producto para el kit de análisis.
Muestra		Error	No se detectó bioluminiscencia. Es posible que se deba repetir la prueba. Para obtener más información, consulte la sección de Diagnóstico de fallas y las Instrucciones del producto para el kit de análisis.

Extraído de “Manual del Usuario del Sistema de Detección Molecular” 3M.

**ANEXO 2:** Protocolos del método de detección de *Salmonella*. AOAC 2016.01

Extraído de: ██████████

Protocolo 1: Para productos alimenticios procesados de amplio rango (excluyendo la producción de huevos, frutas y verduras procesadas y productos especificados en los otros protocolos) comidas listas para consumir, todos los productos de pescado y productos del mar.

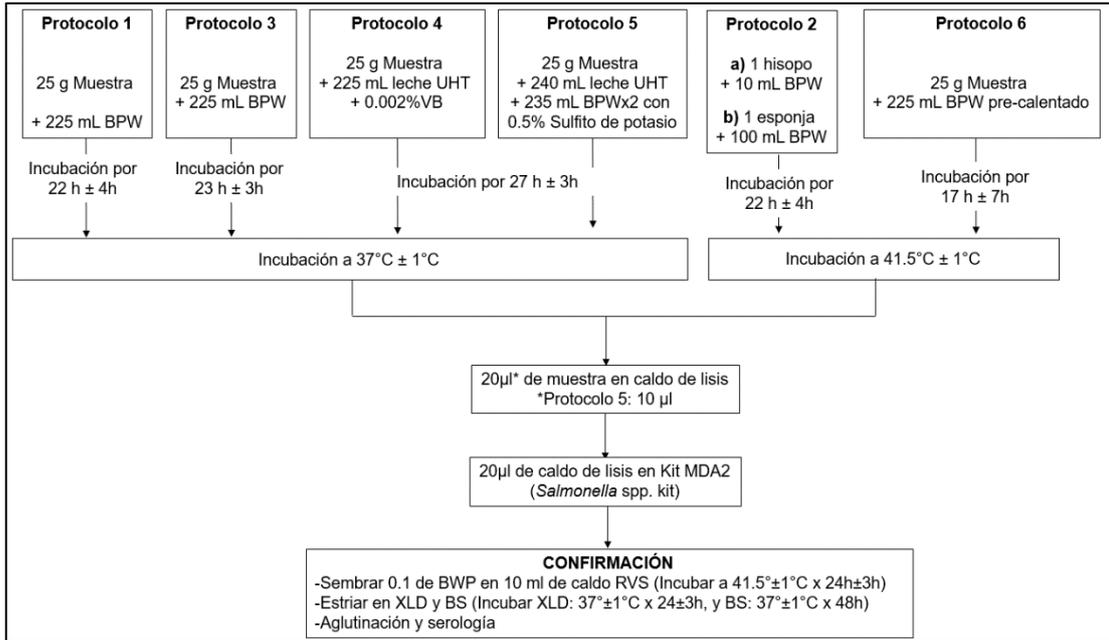
Protocolo 2: Amplia gama de alimentos crudos y no procesados (pescado crudo y mariscos crudos, y productos especificados en los otros protocolos) comida preparada, huevos en polvo, todas las frutas y verduras y muestras ambientales de producción de alimentos.

Protocolo 3: Productos lácteos en polvo

Protocolo 4: Productos a base de cacao que contienen más del 20% de cacao.

Protocolo 5: Especias, hierbas aromáticas, concentrados, infusiones, café, preparaciones culinarias.

Protocolo 6: Carnes crudas



**ANEXO 3:** Protocolos del método de detección de *Listeria spp.* AOAC 2016.07

Modificado de: XXXXXXXXXX

Protocolo 1: Carnes crudas y mariscos crudos

Protocolo 2: Lácteos crudos

Protocolo general: Otros alimentos y muestras ambientales (Excluye protocolo 1 y 2)

