

UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR
FACULTAD DE QUIMICA Y FARMACIA



DESARROLLO E IMPLEMENTACION DE METODOLOGIA PARA
AISLAMIENTO, DETECCION E IDENTIFICACION DE *Listeria monocytogenes*
MEDIANTE PCR EN MATRICES DE ALIMENTOS DE PRODUCTOS
LACTEOS Y CARNICOS

TRABAJO DE GRADO EN MODALIDAD DE PRACTICA PROFESIONAL
SUPERVISADA

PRESENTADO POR
MARIA ROXANA LARA ZELAYA

PARA OPTAR AL GRADO DE
LICENCIADA EN QUIMICA Y FARMACIA

JUNIO 2023

SAN SALVADOR, EL SALVADOR, CENTRO AMERICA

UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR

RECTOR

MAESTRO ROGER ARMANDO ARIAS BENITEZ

SECRETARIO GENERAL

MAESTRO FRANCISCO ANTONIO ALARCON SANDOVAL

FACULTAD DE QUIMICA Y FARMACIA

DECANA

LICDA. REINA MARIBEL GALDAMEZ

SECRETARIA

LICDA. EUGENIA SORTO LEMUS

DIRECCION DE PROCESOS DE GRADO

DIRECTORA GENERAL

MSc. Ena Edith Herrera Salazar

TRIBUNAL EVALUADOR

ASESORA DE AREA EN MICROBIOLOGIA:

PhD. Tania Ethel Cuadra Zelaya

**ASESORA DE AREA EN CONTROL DE CALIDAD DE PRODUCTOS
FARMACEUTICOS Y COSMETICOS:**

Licda. Zenia Ivonne Arévalo de Márquez

TUTORES

Licda. Corina Ivette Interiano Ramírez

AGRADECIMIENTOS.

Gracias a Dios por su infinita misericordia, por darme salud, determinación y capacidad para terminar la carrera.

A mis padres Oscar y Silvia gracias por su amor incondicional y sacrificio, a mi hermano Oscar Miguel por su apoyo y cuidados. A mi tía Reina, a mis tíos Martin, Omar, y Arturo, por siempre estar apoyándome y creer en mis capacidades; a todos mis primos. Cada uno ha sembrado en mí la esperanza y los deseos de superación en cada aspecto de mi vida, gracias familia por recordarme siempre quien soy y de dónde vengo. Este momento les pertenece a ustedes, los amo.

Agradezco a todos aquellos amigos que siempre tuvieron palabras de apoyo y cariño, me inspiraron a mantenerme firme en mis luchas.

Agradecer el apoyo de todo el plantel de trabajo del Laboratorio de Alimentos y Toxicología especialmente a la Lida. Cindy Martínez y la Licda. Claudia Osorio por su guía y esfuerzo en este trabajo, al igual que a toda la Plataforma de Microbiología por su consejo y respaldo. Agradecer también a la Jefa del Laboratorio la Licda. Celina Valle por su buena disposición para que el proyecto de las Prácticas Profesionales Supervisadas se realizara de la mejor manera.

A la Dirección de Procesos de Grado MSc. Ena Herrera, a la Licda. Corina Interiano, tutora interna, a los asesores de área Dra. Tania Cuadra y Licda. Ivonne Arévalo; por sus recomendaciones y apoyo a lo largo de este proyecto.

INDICE GENERAL

	Pág. N°
Introducción	xii
Capítulo I.	
1.0 Plan de Trabajo	14
Capitulo II.	
2.0 Informe de Prácticas Profesionales Supervisadas	61
Capitulo III.	
3.0 Producto Final	76
Capitulo IV.	
4.0 Conclusiones	88
Capítulo V.	
5.0 Recomendaciones	91
Bibliografía	
Anexos	

INDICE DE FIGURAS

Figura N°		Pág. N°
1.	Organigrama Institucional del Ministerio de Salud	16
2.	Organigrama del Laboratorio de Alimentos y Toxicología	19
3.	Microscopia de <i>Listeria monocytogenes</i>	31
4.	Cultivo de <i>Listeria monocytogenes</i> en agares a base de esculina Oxford y Palcam, y agar cromogénico para <i>Listeria monocytogenes</i> y <i>Listeria ivanovii</i>	37

INDICE DE CUADROS

Cuadro N°		Pág. N°
1.	Descripción de actividades y Funciones .	24-25
2.	Formato del Procedimiento Analítico del Laboratorio de Alimentos y Toxicología.	29-30
3.	Cuadro comparativo de tiempo estimado de análisis de <i>L. monocytogenes</i> entre metodología tradicional y metodología de detección genética por PCR	40
4.	Parámetros y Criterios de Aceptación de Políticas para la Validación y Estimación de la Incertidumbre de Métodos Microbiológicos Cualitativos	58

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla N°		Pág. N°
1.	Criterios microbiológicos para Registro Sanitario, Lácteos Procesados	22
2.	Criterios microbiológicos para Registro Sanitario, Cárnicos Curados	23
3.	Formato de Reporte de Resultados del Equipo de Detección Genética	44
4.	Formato Hoja de cotejo de datos crudos para el desarrollo de la metodología de asilamiento, detección e identificación de <i>Listeria monocytogenes</i> mediante PCR	45
5.	Informe de resultados que proporciona el sistema de detección genética	53, 83
6.	Identificación de API <i>Listeria</i>	56
7.	Cronograma de actividades de las Prácticas Profesionales supervisadas	50-60

INDICE DE TABLAS

Tabla N°		Pág. N°
8.	Informe de implementación de Metodología para Aislamiento, Detección e Identificación de <i>Listeria monocytogenes</i> mediante PCR, Matriz de Lácteos.	84-85
9.	Informe de implementación de Metodología para Aislamiento, Detección e Identificación de <i>Listeria monocytogenes</i> mediante PCR, Matriz de Cárnicos.	86-87

INDICE DE ANEXOS

1. Esquema de preparación del inóculo de *Listeria monocytogenes* (microorganismo diana) y *Escherichia coli* (microorganismo no diana).
2. Verificación de tamaños de inóculos, resultados para matriz de Lácteos.
3. Verificación de tamaños de inóculos, resultados para matriz de Cárnicos
4. Resumen de resultados de implementación de metodología para aislamiento, detección e identificación de *Listeria monocytogenes* mediante PCR, matriz de lácteos.
5. Resumen de resultados de implementación de metodología para aislamiento, detección e identificación de *Listeria monocytogenes* mediante PCR, matriz de cárnicos.
6. Reporte de estandarización de cepas, control positivo *Listeria monocytogenes* y control negativo *Escherichia coli*. Ensayo de lácteos.
7. Reporte de estandarización de cepas, control positivo *Listeria monocytogenes* y control negativo *Escherichia coli*. Ensayo de cárnicos.
8. Reporte de resultados del equipo de detección genética, ensayo de lácteos.

INDICE DE ANEXOS

9. Reporte de resultados del equipo de detección genética, ensayo de cárnicos
10. Reporte de resultados API *Listeria*, ejemplo
11. Ilustración del material usado en la implementación de metodología para aislamiento, detección e identificación de *Listeria monocytogenes* mediante PCR.
12. Implementación y verificación de metodología para aislamiento, detección e identificación de *Listeria monocytogenes* mediante PCR en matrices de alimentos de productos lácteos y cárnicos.

INTRODUCCION

La implementación de metodologías de detección molecular es una alternativa para el análisis de patógenos en alimentos debido a su rapidez y elevada sensibilidad. La presente investigación es realizada en el marco del programa de Prácticas Profesionales Supervisadas como modalidad de trabajo de grado y está orientada en el desarrollo de una metodología que permita el aislamiento, detección e identificación de *Listeria monocytogenes* mediante la técnica de PCR en tiempo real en matrices alimenticias de lácteos procesados y cárnicos curados, siendo estas matrices de alimentos de interés sanitario por el alto riesgo de contaminación con este patógeno, ya que *Listeria monocytogenes* es capaz de sobrevivir en condiciones de pH y actividad de agua bajos pudiendo causar enfermedades transmitidas por alimentos contaminados.

Con el aporte de esta investigación se tiene el primer acercamiento para la implementación de un método molecular para la determinación de *L. monocytogenes* en la Plataforma de Microbiología del Laboratorio de Alimentos y Toxicología, evaluando las modificaciones que se plantean en el desarrollo de ésta.

La práctica profesional supervisada fue realizada en la Plataforma de Microbiología del Laboratorio de Alimentos y Toxicología en el periodo de julio de 2022 a enero de 2023, en un tiempo total de 960 horas donde se recibió la capacitación necesaria para realizar las actividades delegadas, el desarrollo de la metodología y su verificación. El documento contiene el Plan de Trabajo que detalla la metodología y la manera en que se ha verificado. El Producto final es procedimiento analítico verificado mediante la evaluación de los parámetros de la Política de Validación y Estimación de Incertidumbre del Organismo Salvadoreño de Acreditación para cada matriz alimenticia, cuyos resultados están reflejados en el Informe de la Implementación de la Metodología; como la verificación del límite de detección donde se ha logrado obtener una recuperación del 83.33% de resultados positivos de un inóculo de 2 ufc/mL y 6 ufc/mL de

Listeria monocytogenes en la matriz de lácteos procesados y cárnicos curados respectivamente, confirmando que la metodología es aplicable para el fin propuesto.

CAPITULO I
PLAN DE TRABAJO

1.1 TITULO

Plan de trabajo de práctica profesional supervisada que se desarrolló en el Ministerio de Salud, Instituto Nacional de Salud, Departamento de Laboratorio Nacional de Salud Pública, Laboratorio Alimentos y Toxicología, Plataforma de Microbiología:

Desarrollo e implementación de metodología para aislamiento, detección e identificación de *Listeria monocytogenes* mediante PCR en matrices de alimentos de lácteos procesados y cárnicos curados.

1.2 DESCRIPCION DE LA ENTIDAD/ DEPARTAMENTO

El Ministerio de Salud de El Salvador es una institución estatal que tiene como objetivo principal coordinar y proveer la atención de la salud de los salvadoreños, es por ello que tiene bajo su dirección El Instituto Nacional de Salud (INS).

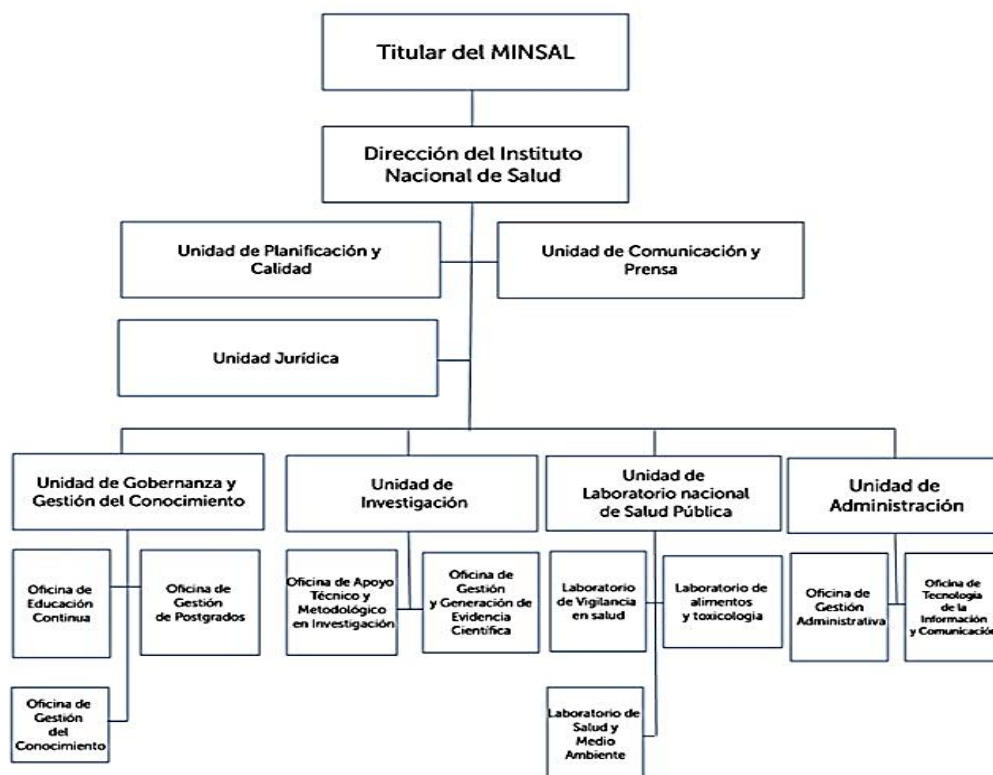


Figura N° 1. Organigrama institucional del Ministerio de Salud Pública (1)

El Instituto Nacional de Salud (INS) tiene como fin generar, transmitir y difundir conocimientos científico-tecnológicos y promover su incorporación para la solución de los problemas de salud de la población. El INS surgió para convertirse en el referente nacional de investigación en salud, que brinda rectoría y gestiona condiciones científico técnicas para la indagación de las causas de las enfermedades y sus determinantes, para la producción de evidencia científica

que permita la toma de decisiones, dirigidas a la solución de los problemas de salud pública que amenazan a la población. Para tales fines el INS ha venido estableciendo coordinaciones con otras instituciones como universidades, organismos de cooperación internacional, servicios de salud, sector público y privado.

El INS está conformado por tres áreas prioritarias: Escuela de Gobierno en Salud, Departamento de Investigaciones en Salud y el Departamento de Laboratorios Especializados, siendo el Laboratorio Nacional de Referencia (LNR), más conocido como Laboratorio Nacional de Salud Pública, la máxima figura de este último componente.

Dentro de la estructura del Laboratorio Nacional de Salud Pública se encuentran tres dependencias: Laboratorio de Vigilancia en Salud, Laboratorio de Salud y Medio Ambiente y el Laboratorio de Alimentos y Toxicología (LAT), el cual cumple una función muy importante dentro de la sociedad salvadoreña, puesto que posee la responsabilidad de velar por la calidad de los alimentos e insumos alimenticios que se comercializan y consumen a nivel nacional.

El LAT tiene como objetivo brindar servicios de análisis Físicoquímicos, Microbiológicos y Toxicológicos de calidad, en muestras de alimentos, biológicas y ambientales utilizando métodos estandarizados, manteniendo al personal capacitado, actualizado y comprometido a trabajar bajo la Norma Técnica Salvadoreña NTS ISO/IEC 17025:2017 Requisitos generales para la competencia de los laboratorios de ensayo y calibración, para obtener resultados que garanticen la precisión, exactitud, integridad, trazabilidad, confidencialidad y satisfacción de sus clientes.

Los servicios que presta este laboratorio son para programas y funciones que desarrolla el Ministerio de Salud, entre ellos se encuentran:

- Vigilancia Microbiológicos, Fisicoquímicos y Toxicológicos en Agua de Consumo Humano para dar cumplimiento al programa de la calidad del agua,
- Vigilancia de Vitamina A en azúcar, Hierro en Harina de maíz, trigo y pastas alimenticias, Yodo en Sal, para dar cumplimiento al programa de alimentos fortificados,
- Vigilancia de bebidas alcohólicas (Grado Alcohólico y Metanol)
- Vigilancia de Hielo
- Vigilancia de Agua envasada
- Vigilancia de Piscinas
- Vigilancia de Fórmulas Lácteas
- Intoxicaciones alimentarias
- Denuncias de alimentos
- Venta de servicios
- Licitaciones
- Tercería
- Registro Sanitario de Alimentos, Aguas y Bebidas Alcohólicas
- Vigilancia del Registro Sanitario
- Plomo en Sangre
- Colinesterasa en suero
- Metales en Suelo y sedimento,
- Estudios nutricionales, toxicológicos, etc.

La organización interna del laboratorio consiste en un equipo de 30 profesionales, organizados conforme al organigrama siguiente:

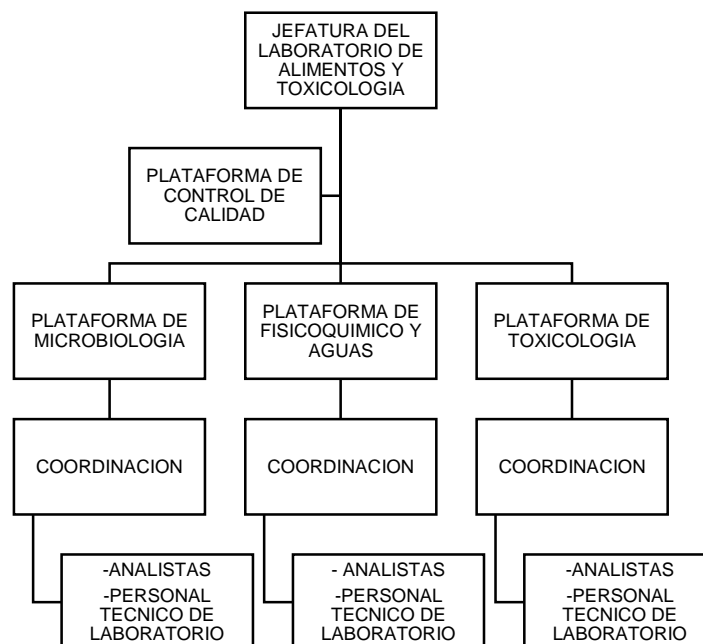


Figura N° 2. Organigrama de Laboratorio de Alimentos y Toxicología (1)

El Laboratorio de Alimentos y Toxicología del Ministerio de Salud se encuentra estructurado de manera administrativa bajo la jefatura del laboratorio y se divide organizadamente en plataformas donde se realizan las determinaciones de acuerdo a las disciplinas de los análisis; Plataforma de Físicoquímico, Plataforma de Toxicología, Plataforma de Microbiología y la Plataforma de Gestión de Calidad; a su vez cada plataforma es dirigida por una coordinación.

La Plataforma de Microbiología se encarga de los análisis de agua de consumo humano, agua envasa, productos cárnicos curados, productos de panadería, galletas, salsas, bebidas no carbonatadas y productos lácteos, ente otros; para la determinación de microorganismos considerados parámetros de calidad e inocuidad de alimentos y agua como lo son *Escherichia coli*, *Coliformes totales*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella spp*, *Listeria monocytogenes*.

El trabajo en conjunto y la coordinación de las diferentes plataformas permite mayor eficiencia del laboratorio para sus clientes, resultados en el menor tiempo posible y veracidad de los datos, permitiendo establecer una posición imparcial y confidencial dentro del margen legal que permite salvaguardar la calidad e inocuidad de los productos alimenticios que se comercializan diariamente en El Salvador y en consecuencia procurar el bienestar de la población. (1)

1.3 ANTECEDENTES

El convenio entre el Laboratorio Nacional de Salud Pública a través del Laboratorio de Alimentos y Toxicología y la Facultad de Química y Farmacia permite a los egresados que asumen el compromiso de desarrollar las prácticas profesionales supervisadas en la institución, tener un espacio donde se puedan desenvolver y asimismo adquirir conocimiento técnico-científico en las diferentes plataformas que conforman el Laboratorio de Alimentos y Toxicología abonando grandemente a la consolidación académica y calidez humana en el futuro ejercicio de la profesión.

Actualmente el Laboratorio de Alimentos y Toxicología cuenta con la acreditación vigente de la metodología para la determinación de detección de *Listeria monocytogenes* y otras especies de *Listeria spp* en matrices de productos cárnicos curados y lácteos procesados, otorgada por el Organismo Salvadoreño de Acreditación, utilizando el método modificado basado en Detección y enumeración de *Listeria monocytogenes* en alimentos y muestras ambientales capítulo 10 del Manual Analítico Bacteriológico de la Administración de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos de América que se resume en el aislamiento a partir de un caldo de enriquecimiento para el género *Listeria*, en agares diferenciales para su detección y posterior confirmación e identificación con base en pruebas bioquímicas específicas.

Con el aporte de esta investigación se tiene el primer acercamiento para la implementación de un método molecular para la determinación de *L. monocytogenes* en la Plataforma de Microbiología del Laboratorio, evaluando las modificaciones que se plantean en el desarrollo de ésta, en las matrices de alimentos de las cuales ya se cuenta con la acreditación, con base en el RTCA 67.04.50:17 ALIMENTOS. CRITERIOS MICROBIOLÓGICOS PARA LA INOCUIDAD DE LOS ALIMENTOS. CLASIFICACIÓN DE LOS ALIMENTOS. La

clasificación siguiente obedece a la necesidad de priorizar los análisis microbiológicos para el registro y la vigilancia de los alimentos, basándose en la probabilidad de causar daño a la salud. (2)

Alimento tipo A: comprende los alimentos que por su naturaleza, composición, proceso, manipulación y población a la que va dirigida, tienen una alta probabilidad de causar daño a la salud.

Alimento tipo B: comprende los alimentos que por su naturaleza, composición, proceso, manipulación y población a la que va dirigida, tienen una mediana probabilidad de causar daño a la salud.

Alimento tipo C: comprende los alimentos que por su naturaleza, composición, proceso, manipulación y población a la que va dirigida, tienen una baja probabilidad de causar daño a la salud.

En los siguientes cuadros se establecen el tipo de alimento y los criterios de aceptación. (2)

Tabla N° 1. Criterios Microbiológicos para Registro Sanitario. Lácteos procesados (2)

Subgrupo del alimento 1.8: quesos madurados, procesados, sus mezclas de producto lácteo con aceite o grasa vegetal comestible y similares.			
Parámetro	Categoría	Tipo de alimento	Límite permitido
<i>Escherichia coli</i>	6	B	10 UFC/g
<i>Staphylococcus aureus</i>	8		10 ² UFC/g
<i>Listeria monocytogenes</i>	10		Ausencia/25 g
<i>Salmonella spp</i>	10		Ausencia/25 g

Tabla N° 2. Criterios Microbiológicos para Registro Sanitario. Cárnicos Curados
(2)

Subgrupo del alimento 8.3: productos cárnicos cocidos, incluyendo los curados o ahumados. Ejemplos: embutidos, formados, tocineta, paté, chuleta ahumada, costillas ahumadas, cortes cocidos de aves de corral y caza, vacunos, porcinos, entre otros			
Parámetro	Categoría	Tipo de alimento	Límite permitido
<i>Escherichia coli</i>	5	A	10 UFC/ g
<i>Salmonella spp</i>	10		Ausencia/25 g
<i>Listeria monocytogenes</i>	10		Ausencia/25 g
<i>Staphylococcus aureus</i>	8		10 ² UFC/g
<i>Clostridium perfringens</i> (productos cárnicos cocidos no curados)	8		10 ² UFC/g

1.4 DESCRIPCION DE ACTIVIDADES Y FUNCIONES

El laboratorio de Alimentos y Toxicología tiene como objetivo desarrollar la calidad, investigación y generación de evidencia científica, mediante análisis a muestras de alimentos y bebidas, para sustentar la vigilancia e inocuidad de alimentos y otorgárseles el registro sanitario. En la plataforma de microbiología se realizan las determinaciones de los patógenos considerados indicadores de inocuidad de los distintos grupos y subgrupos de alimentos clasificados en el RTCA 67.04.50:17 Alimentos. Criterios Microbiológicos para la Inocuidad de los Alimentos, el trabajo planificado permite que el desempeño del laboratorio sea eficaz, por lo que se planifican las actividades en la plataforma garantizando el seguimiento de cada determinación.

Cuadro N°1. Descripción de actividades y funciones asignadas.

Elaboración propia

ACTIVIDAD	FUNCIÓN
Inducción del reglamento interno y normas oficiales que avalan el trabajo del Laboratorio de Alimentos y Toxicología.	Conocer los lineamientos que rigen el trabajo dentro de la institución.
Firma de acuerdo de: - Confidencialidad - Imparcialidad	Generar un compromiso que garantice la NO divulgación de ningún tipo de información sobre la institución o resultados de análisis.
Asignación y delimitación del proyecto a desarrollar.	Conocer el tema a investigar, metodologías e inducción del trabajo que compete a las determinaciones de análisis
Lectura y capacitación en instrucciones técnicas y metodologías de la plataforma de microbiología.	Instruir de forma técnica-científica al desarrollo de las actividades para las determinaciones microbiológicas.

Cuadro N°1. Descripción de actividades y funciones asignadas.

Elaboración propia. (continuación)

ACTIVIDAD	FUNCIONES
Colaboración en la verificación de condiciones de temperatura de los equipos involucrados en las determinaciones de análisis y manejo de bitácoras de uso de equipos.	Garantizar la trazabilidad como parte de la validez de los resultados de análisis.
Capacitación en: <ul style="list-style-type: none"> - Manipulación y mantenimiento de cepas de trabajo. (siembra, aislamiento en medios diferenciales, tinción de Gram, pruebas bioquímicas) - Estandarización cepas de trabajo (preparación de suspensión estandarizadas de bacterias). 	Instruir de forma técnica-científica al desarrollo de las actividades para las determinaciones microbiológicas.
De acuerdo a la metodología, efectuar el pase de un medio de enriquecimiento a medios selectivos o medios diferenciales (de caldo a caldo para <i>Salmonella spp</i> o de caldo a placa para <i>L. monocytogenes</i>)	Instruir de forma técnica-científica al desarrollo de las actividades para las determinaciones microbiológicas.
Inducción en monitoreo microbiológico de ambiente y superficies	Instruir de forma técnica-científica al desarrollo de las actividades para las determinaciones microbiológicas
Apoyo en el procesamiento de muestras para la determinación de mesófilos aerobios.	Instruir de forma técnica-científica al desarrollo de las actividades para las determinaciones microbiológicas
Inducción en: <ul style="list-style-type: none"> - Uso del equipo de detección genética. - Siembra de muestras lácteas y cárnicas para determinación de <i>Listeria monocytogenes</i> - Aplicación de técnicas para extracción y manipulación de material genético. 	Conocer la teoría y técnicas orientadas al desarrollo e implementación de metodología para aislamiento, detección e identificación de <i>Listeria monocytogenes</i> mediante PCR

1.5 JUSTIFICACION

El desarrollo de estas prácticas permite que el egresado de la Facultad de Química y Farmacia de la Universidad de El Salvador, pueda aplicar sus conocimientos teóricos y prácticos adquiridos durante la carrera, afrontando problemáticas reales, fomentando la integración a ambientes de trabajo dentro de una organización y la exploración de posibles campos laborales para el ejercicio profesional. Esta experiencia enriquece notablemente al egresado, introduciéndolo a las demandas de competencias de la profesión, asimismo, el convenio entre instituciones brinda la oportunidad al Laboratorio de Alimentos y Toxicología del Instituto Nacional de Salud de fortalecer y ampliar el desarrollo y la implementación de nuevos métodos analíticos para las diferentes determinaciones que se realizan en beneficio de la salud pública. La práctica profesional supervisada realizada en la Plataforma de Microbiología del Laboratorio de Alimentos y Toxicología en el periodo de julio de 2022 a enero de 2023, cumpliendo con el Reglamento de Procesos de Grado de la Facultad de Química y Farmacia.

Esta investigación se suma a la ardua labor del laboratorio de velar por la calidad e inocuidad de los alimentos que se registran y comercializan en El Salvador, verificando que sean aptos para el consumo de la población reduciendo así la probabilidad de alzas en los índices de enfermedades por transmisión alimentaria. Siendo la listeriosis un claro ejemplo, se trata de una infección asociada al consumo de alimentos contaminados por *Listeria monocytogenes*, puede provocar desde una gastroenteritis común hasta incluso causar síntomas graves con una tasa de mortalidad del 20 al 30 % en grupos de pacientes inmunocomprometidos según datos de la Organización Mundial de la Salud. Es por eso que se ha considerado a *L. monocytogenes* un microorganismo objeto de estudio sobretodo en los alimentos listos para comer a nivel nacional e internacional. Actualmente el Laboratorio de Alimentos y Toxicología realiza el

análisis para la determinación de este patógeno de acuerdo a una metodología modificada de análisis, basada en el Manual Analítico Bacteriológico de la Administración de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos; este análisis tiene un tiempo de ejecución de 5 a 10 días hasta finalizarse. Con esta investigación se busca reducir el tiempo de obtención de resultados, aprovechar la especificidad para el microorganismo que es una de las principales ventajas de la PCR en tiempo real en comparación a la actual metodología que realiza el laboratorio, además de enriquecer al practicante en conocimiento de métodos moleculares de análisis. Se plantea verificar que las modificaciones de la metodología sean viables, ya que al demostrarse el siguiente paso para el Laboratorio será la validación de la metodología, razón por la que se emplea en este proyecto los parámetros que son usados para una validación de un método cualitativo microbiológico según la Política para la Validación y Estimación de la Incertidumbre de Métodos Microbiológicos del Organismo Salvadoreño de Acreditación. El Laboratorio establece que las matrices de alimentos que se evalúan sean las mismas en las que ya se tiene la acreditación de la metodología tradicional para la detección de *Listeria monocytogenes*.

1.6 OBJETIVOS

1.6.1 Objetivo General

Apoyar en el desarrollo e implementación de la metodología para el aislamiento, detección e identificación de *Listeria monocytogenes* mediante PCR.

1.6.2 Objetivos Específicos

1.6.2.1 Desarrollar un procedimiento analítico para el aislamiento, detección e identificación de *Listeria monocytogenes* por medio de la técnica de PCR de biología molecular.

1.6.2.2 Verificar si el método propuesto permite detectar *Listeria monocytogenes* en matrices de productos cárnicos curados y productos lácteos procesados.

1.7 RESULTADOS. PRODUCTO FINAL ESPERADO

El documento final que se entregará al Laboratorio de Alimentos y Toxicología será un procedimiento que describa de forma clara y concisa la técnica a seguir de la metodología que ha de proponerse para el aislamiento, detección e identificación de *Listeria monocytogenes* en productos cárnicos y lácteos mediante técnica de PCR de biología molecular de manera que pueda realizarse su futura validación, ampliando el desarrollo y la implementación de nuevos métodos analíticos en la plataforma de microbiología. Según las especificaciones que detalla el Procedimiento de Control de Documentos del Laboratorio de Alimentos y Toxicología.

Cuadro N°2. Formato del procedimiento analítico sugerido por el Laboratorio de Alimentos y Toxicología

Nombre de la institución			Página x de y
Nombre del instructivo			
Código del documento		Fecha de emisión	Cambio N°
Elaborado por:	Revisado por	Autorizado por:	Versión N°
<ol style="list-style-type: none"> 1. Propósito: El objetivo del procedimiento 2. Alcance: A qué muestras es aplicable el procedimiento 3. Documentos de referencia: Bibliografía consultada 4. Interferencias y limitaciones: Factores que pueden interferir en el buen desarrollo de la metodología y los resultados 5. Toma y representación de muestra: De acuerdo a los procedimientos internos del laboratorio, respetando las buenas prácticas de laboratorio y de asepsia en ensayos microbiológicos 6. Material y equipo: Necesarios para el desarrollo de la metodología analítica 7. Reactivos y medios de cultivos: Necesarios para el desarrollo de la metodología analítica. 			

Cuadro N°2. Formato del procedimiento analítico sugerido por el Laboratorio de Alimentos y Toxicología. (Continuación)

Nombre de la institución		Página x de y	
Nombre del instructivo			
Código del documento		Fecha de emisión	Cambio N°
Elaborado por:	Revisado por	Autorizado por:	Versión N°
<p>8. Procedimiento: Pasos descritos de forma clara y concisa que permitan tener la secuencia de la técnica para ejecutar la metodología</p> <p>9. Cálculos y lectura de resultados: Descripción de los posibles resultados que emitirá el sistema de detección genética y su interpretación</p> <p>10. Informe de resultados: La forma en que los resultados analíticos serán registrados y reportados.</p>			

1.8 MARCO TEORICO

1.8.1 Principales Características de *Listeria monocytogenes* y la Listeriosis.



Figura N° 3 Microscopia de *Listeria monocytogenes* (Tinción de Gram realizada 07 de noviembre de 2022, LAT)

Listeria monocytogenes una bacteria que pertenece a la familia de las *Listeriaceae*, es un bacilo gram positivo, anaerobio facultativo, presentan de 1 a 5 flagelos peritricos que les confieren movilidad a 28°C.

Los reservorios de la *Listeria monocytogenes* se encuentran generalmente en el tracto gastrointestinal de los animales, en verduras o alimentos listo para el consumo; que se encuentren contaminados o mal cocidos; derivados de los lácteos no pasteurizados, pescados o mariscos y suelo. Son capaces de sobrevivir en distintos medios, por una adaptabilidad rápida, lo que podría explicar su gran capacidad de transmisión. La transmisión de la *Listeria monocytogenes*, se da de manera vertical; de madre a hijo; por contacto con animales infectados; zoonóticos; o por adquisición hospitalaria; nosocomial; y en su gran mayoría se da por el consumo de alimentos contaminados. (3)

L. monocytogenes ha sido una seria amenaza para la industria alimentaria debido a su capacidad para sobrevivir a las condiciones de procesamiento de alimentos más comunes. Por ejemplo, es capaz de sobrevivir a pH extremo, alta

concentración de sal, baja actividad del agua y temperaturas de refrigeración. Estas condiciones son utilizadas para controlar el crecimiento de otras bacterias patógenas en los alimentos. Sin embargo, *L. monocytogenes* es particularmente sensible a las altas temperaturas, y se ha demostrado que la pasteurización es eficaz para reducir significativamente su número en los alimentos, pero es importante tener en cuenta que el proceso de pasteurización no siempre garantiza la eliminación completa de esta bacteria, por lo que es esencial que se tomen medidas adecuadas de higiene y control de la calidad en el procesamiento de alimentos para prevenir la formación de biopelículas y evitar la contaminación cruzada. Por lo que los alimentos de mayor riesgo son aquellos que provienen de lácteos no pasteurizados, carnes crudas o procesados que no contemplan las temperaturas de pasteurización en su procesamiento. (4)

Los niños y adultos sanos ocasionalmente contraen listeriosis, pero rara vez se enferman gravemente. En personas sanas que no están embarazadas, la listeriosis puede causar gastroenteritis, principalmente diarrea, acompañada de fiebre. Otros síntomas pueden incluir vómitos, dolor en las articulaciones, dolor de cabeza y dolor corporal. Esta forma de listeriosis tiene un período de incubación mucho más corto, y los síntomas generalmente ocurren dentro de las 24 horas posteriores a que una persona ingiere una gran cantidad de bacterias. La enfermedad suele ser leve y desaparece por sí sola. La diarrea puede durar hasta 5 días.

Los ancianos y las personas con sistemas inmunitarios debilitados tienen un mayor riesgo de contraer una forma más grave de listeriosis, que incluye: Inflamación del cerebro (encefalitis), inflamación de las membranas que rodean el cerebro y la médula espinal (meningitis); e Infección de la sangre. (5)

1.8.2 Método Tradicional de Aislamiento, Detección e Identificación De *L. monocytogenes* en Alimentos. (6)

A continuación, se describe la manera en la que se realizará la detección y numeración 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)

Tanto en la metodología estándar y las metodologías rápidas alternativas el aislamiento, detección e identificación de *Listeria monocytogenes* a partir de 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 a base de esculina

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 *L. 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 *L. 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 *L. 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 hidrogeno 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 purpura (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. (6)

1.8.3 Medios de cultivo y su función para aislamiento e identificación de *Listeria monocytogenes* en métodos tradicionales.

- Caldo de enriquecimiento para *Listeria* spp

Hay varios medios de cultivo y enriquecimiento selectivos que se han desarrollado y utilizado para el aislamiento y la detección de *L. monocytogenes* en alimentos y muestras ambientales. Como exige la mayoría de las agencias reguladoras, los métodos de aislamiento deben poder detectar un organismo de

Listeria por cada 25 g de alimento. Para lograr esta sensibilidad, se requieren métodos de enriquecimiento que permitan que el organismo crezca y alcance un nivel detectable. El caldo de enriquecimiento para *Listeria* amortiguado (BLEB) se recomienda en el método bacteriológico y analítico (BAM) de la Administración de Drogas y Alimentos de los Estados Unidos (FDA) para el aislamiento e identificación de *L. monocytogenes* en el que se añade fosfato di sódico al medio para aumentar la capacidad amortiguadora del medio, lo que da como resultado una mejora de las propiedades de enriquecimiento.

Los agentes antimicrobianos se emplean en medios de enriquecimiento y placas para suprimir la microbiota competidora, ya que las células de *Listeria* crecen lentamente y los competidores pueden superarlas rápidamente. En el selectivo más común los agentes son acriflavina, ácido nalidíxico y cicloheximida. La función de la acriflavina es inhibir el crecimiento de otras bacterias Gram-positivas y, a menudo, se usa en combinación con otros agentes selectivos, por ejemplo, polimixina B-sulfato, cicloheximida, tiocianato de potasio y ácido nalidíxico. El ácido nalidíxico se utiliza para la inhibición de bacterias gramnegativas, mientras que la cicloheximida se utiliza para la inhibición de hongos. (4)

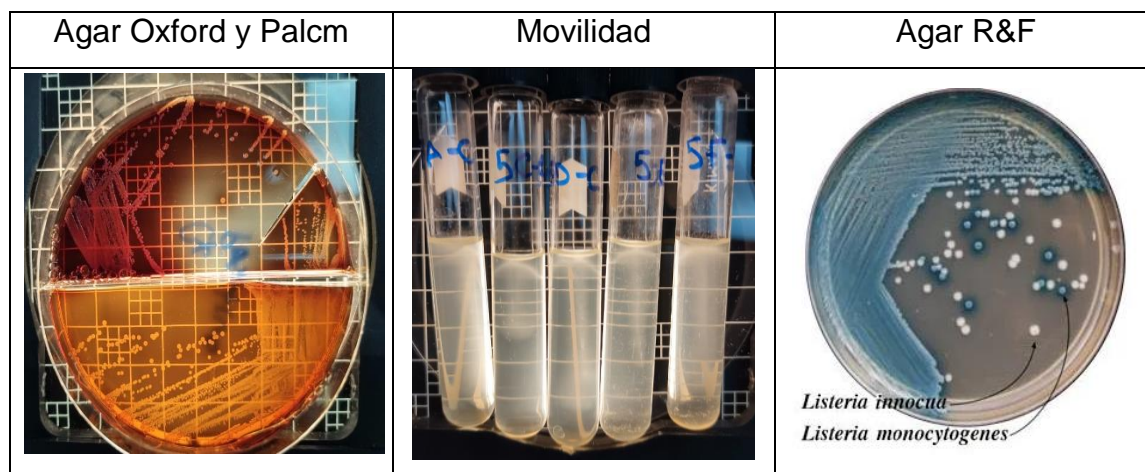
- Medios diferenciales selectivos para *Listeria spp.*

Los medios de placas diferenciales selectivos recomendados con frecuencia por (FDA-BAM, ISO y USDA) para el aislamiento de *Listeria spp.* Son PALCAM (polimixina acriflavina, cloruro de litio, ceftazidima, esculina, manitol) y Oxford PALCAM y Oxford son útiles para el aislamiento de *Listeria spp.* a partir de muestras de alimentos con células de *Listeria* lesionadas y/o ricas en microbiota competitiva. Todas las *Listeria spp.* son capaces de hidrolizar la esculina y este proceso dará como resultado la formación de un color negro intenso en el medio.

Esto se debe a la presencia de esculina y hierro férrico en el medio, en el que el hierro férrico forma un complejo con 6,7-dihidroxicumarina, el producto de la lisis

de la esculina por la D-glucosidasa, lo que da como resultado el precipitado negro (4)

Figura N° 4. Cultivo de *Listeria monocytogenes* en agares Oxford y Palcam (cultivo del 03 de noviembre, LAT), prueba de agar movilidad (cultivo 14 de enero, LAT) y Agar R&F: medio cromogénico para *L. monocytogenes* y *L. ivanovii*. (7)



1.8.4 Metodologías de Detección Genética.

- PCR En Tiempo Real.

La enumeración de patógenos transmitidos por alimentos es un aspecto principal del diagnóstico molecular microbiológico. La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) es la técnica de diagnóstico molecular más ampliamente utilizada debido a su protocolo rápido y de fácil uso. Por lo general, 2-3 h son necesarias para completar una PCR, pero hoy en día se están desarrollando sistemas de PCR más avanzados para generar un resultado en cuestión de minutos (8)

La PCR en tiempo real (RT-PCR) también se denomina PCR cuantitativa o qPCR. La característica clave de la RT-PCR es que la amplificación del ADN se detecta en tiempo real mientras la PCR está en curso mediante el uso de un indicador fluorescente. La intensidad de la señal del indicador fluorescente es directamente proporcional al número de moléculas de ADN amplificadas.

Hay dos métodos de detección de RT-PCR, el primero se basa en una sonda específica de secuencia, como la sonda TaqMan, la baliza molecular; el segundo se basa en un tinte genérico de unión a ADN de doble cadena no específico de secuencia, como SYBR green. RT-PCR es una herramienta de análisis de ADN muy sensible y potente. La RT-PCR se puede dividir en cuatro etapas: fase fundamental lineal, fase exponencial temprana, fase exponencial lineal (fase logarítmica) y fase de meseta. En la primera fase, la PCR acaba de comenzar, la señal fluorescente no se ha elevado por encima del fondo. La segunda fase es donde la señal fluorescente apenas se eleva significativamente por encima del fondo, el ciclo en el que se produce se denomina umbral de ciclo (Ct). En la fase exponencial lineal, la PCR se encuentra en su etapa de amplificación óptima con la duplicación de los productos de la PCR en cada ciclo. La última fase es cuando los sustratos se agotan y la ADN-polimerasa Taq está al final de su vida útil, la señal fluorescente no aumentará por mucho tiempo. (9)

El ensayo Taqman es un ensayo de RT-PCR ampliamente utilizado debido a su sensibilidad y especificidad. El ensayo TaqMan se basa en la actividad exonucleasa 5'-3' de la ADN-polimerasa Taq. La sonda TaqMan es un oligonucleótido específico de secuencia con un colorante fluorescente informador en el extremo 5' y un colorante extintor en el extremo 3'. Cuando el ADN polimerasa Taq no hidroliza la sonda, la luz fluorescente emitida por el colorante informador es absorbida por el colorante extintor debido a la transferencia de energía de resonancia fluorescente. Cuando la sonda es hidrolizada por el ADN polimerasa Taq, el colorante indicador 5' se separa del colorante extintor, el efecto de extinción desaparece y, por lo tanto, la luz fluorescente del colorante indicador 5' será detectada por el instrumento RT-PCR. La señal del colorante informador 5' liberada es proporcional a la cantidad de productos de PCR. (9)

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.

- Equipo de detección genética para *Listeria monocytogenes* Tq El equipo de detección genética, para *Listeria monocytogenes* Tq es un sistema automatizado de amplificación de ácidos nucleicos para la detección *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. (10)

1.8.5 Comparación de tiempos estimados de análisis entre el Método Tradicional de Aislamiento, Detección e Identificación De *L. monocytogenes* en Alimentos y la Metodología para Aislamiento, Detección e Identificación de *Listeria monocytogenes* mediante PCR y la posterior confirmación de presuntos resultados positivos.

Cuadro N° 3. Cuadro comparativo de tiempo estimado de análisis de *L. monocytogenes* entre metodología tradicional y metodología de detección genética por PCR. Elaboración propia

Días	Etapa	Metodología tradicional	PCR
1	Siembra/pre-enriquecimiento	x	x
2	Incubación	X	x
3	Corrida PCR / Siembra en agar diferencial	x	x -
4	Incubación	x	-
5	Lectura de siembra en agar diferencial	x	-
7	Aislamiento y purificación	-	-
8	API <i>Listeria</i> , movilidad, catalasa, tinción de Gram	-	-
9	Lectura de API <i>Listeria</i>	-	-
10	Observación de movilidad	-	-

x: Indica las etapas que conlleva el análisis hasta la obtención de un resultado de Ausencia de *Listeria monocytogenes*.

--: Indica las etapas en las que usualmente se extiende el análisis si se obtienen colonias con crecimiento características del género *Listeria* en los medios diferenciales en la metodología tradicional o los resultados es positivo para la detección de *Listeria monocytogenes* en la metodología de detección genética por PCR.

1.9 DISEÑO METODOLÓGICO

Esta investigación se realiza mediante la recolección y revisión de información referente al tema, para esto se utilizan diferentes medios como lo son normas nacionales, literatura oficial e información complementaria. Asimismo, esta metodología es basada en el protocolo del kit comercial que pertenece al fabricante del sistema de detección genética. Se propone la adaptación de la metodología de acuerdo a los insumos con los que cuenta el Laboratorio y se comprueba una vez por cada matriz de alimentos, con el objetivo verificar que cumpla con los criterios de aceptación de la Política de Validación y Estimación de Incertidumbre de Métodos Microbiológicos del Organismo Salvadoreño de Acreditación, sin embargo, no se trata de una validación propiamente.

Por tanto, se considera que este trabajo es de carácter Bibliográfico-Experimental y de tipo prospectivo.

1.9.1 Universo

Muestras de productos lácteos procesados y productos cárnicos curados ingresadas para análisis a la Plataforma de Microbiología del Laboratorio de Alimentos y Toxicología., la recepción de muestras se realiza bajo cumplimiento de protocolos de vigilancia en salud, realizados por personal competente, además de clientes que desean tramitar el registro sanitario de su producto. Posteriormente las muestras son distribuidas y almacenadas según instrucciones técnicas internas del laboratorio y especificaciones del fabricante para el análisis posterior.

1.9.2 Muestra

Se tomará una muestra aleatoriamente por cada tipo de matriz alimenticia que cumpla con el peso suficiente (500 g) para poder ejecutar las repeticiones para la verificación de la metodología. Dentro de las condiciones necesarias que debe

cumplir la muestra están: empaque herméticamente sellado, reporte del contenido neto, fecha de caducidad lejana, aspecto típicamente normal del producto, es decir, sin partículas extrañas ni otras características que indiquen el posible deterioro del alimento.

Matrices de productos cárnicos cocidos, incluyendo los curados o ahumados. Ejemplos: embutidos, formados, tocineta, paté, chuleta ahumada, costillas ahumadas, cortes cocidos de aves de corral y caza, vacunos, porcinos, entre otros. Productos lácteos procesados como quesos madurados, procesados, sus mezclas de producto lácteo con aceite o grasa vegetal comestible y similares.

1.9.3 Variables

- Grupos alimenticios a analizar (La matriz alimenticia de Lácteos procesados y la matriz de Cárnicos curados).
- Concentración del inóculo.
- Reactivos y medios de cultivos que se han reemplazado con respecto al protocolo del kit comercial de *Listeria Tq*.

1.9.4 Fuentes de Información

Este trabajo se respalda en fuentes oficiales de información nacionales e internacionales como:

- Norma Técnica Salvadoreña Norma ISO/IEC 17025:2017 Requisitos Generales para la Competencia de los Laboratorios de Ensayo y Calibración ISO/IEC 17025:2017: Esta norma permite entender los requerimientos que deben cumplirse para el desempeño del Laboratorio de Alimentos y Toxicología orientado a la calidad de los procesos.
- Capítulo 10 del Manual Analítico Bacteriológico de la Administración de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos: Es la fuente base de información para la determinación de *Listeria monocytogenes* en alimentos.

- Sistema de detección genética para *Listeria monocytogenes* Tq: Es la guía de uso del kit para la detección de *Listeria monocytogenes* con el sistema de detección genética.
- RTCA 67.04.50:17 Alimentos. Criterios Microbiológicos para la Inocuidad de los Alimentos: Define los criterios de aceptación para la determinación de *L. monocytogenes*.
- PO 9.4 Política para la Validación y Estimación de la incertidumbre de Métodos Microbiológicos del Organismo Salvadoreño de Acreditación: Esta política brinda los parámetros que debe cumplir la metodología cualitativa que se plantea en esta investigación.

1.9.5 Técnicas de Obtención de Información

- Análisis documental: Revisión bibliográfica de literatura referente al tema y de esta manera proponer congruentemente la metodología analítica que pueda desarrollarse según las condiciones con las que cuente el Laboratorio.
- Observación experimental: La información se centra en los resultados experimentales de la metodología analítica que se pretende desarrollar para el aislamiento, detección e identificación de *Listeria monocytogenes* mediante la técnica de PCR de biología molecular en muestras naturales y muestras fortificadas, comprobándose mediante la metodología tradicional.

1.9.6 Herramientas para la Obtención de Información

- El equipo de detección genética es un sistema automatizado de amplificación de ácidos nucleicos (termociclador) para la detección de organismos patógenos en alimentos, ingredientes y muestras.
- Software del sistema de detección genética.
- Reporte de resultados que emite el equipo: información de la corrida.

Tabla N°3 Formato de Reporte de resultados del equipo de detección genética
(10)

	Run name	-			
	Run Start	-			
	Run finish	-			
	Operator	-			
	Notes	-			
	Run On Software versión	-			
	Run signature	-			
	Machine serial No.	-			
No.	Color	Name	Result	Description	Kit lot number

- Formato de hoja cotejo de datos crudos de la metodología, se consideran los datos desde el peso muestra, resultados del ensayo PCR y la verificación por metodología tradicional.

Los lotes de reactivos, lotes de medios de cultivo, hora de inicio y finalización de usos de equipo se registrará en bitácoras internas del LAT con el fin de tener trazabilidad en cada ensayo.

Tabla N°4. Formato de Hoja de cotejo de datos crudos para desarrollo e implementación de metodología para aislamiento, detección e identificación de *Listeria monocytogenes* mediante PCR. Elaboración propia

HOJA DE COTEJO DE DATOS CRUDOS PARA DESARROLLO E IMPLEMENTACION DE METODOLOGÍA PARA AISLAMIENTO, DETECCION E IDENTIFICACION DE *Listeria monocytogenes* MEDIANTE PCR

Muestra	Peso (g)	Resultados PCR	Lectura de siembra en Agares Oxford y Palcam	Movilidad	Pruebas de Identificación Tradicionales

1.9.7 PROCEDIMIENTOS

1.9.7.1 Prueba de Inóculo de *Listeria monocytogenes*.

Preparación de la Suspensión Bacteriana de *Listeria monocytogenes*

Material a utilizar:

- Tubos con tapa estériles de capacidad de 20 mL
- Erlenmeyer con tapa estériles de capacidad de 250 mL
- Pipetas de 1.0 mL
- Pipetas de 25.0 mL
- Frascos con tapa de capacidad de 250 mL
- 480 mL de solución salina estéril al 0.85 %

Procedimiento:

- Tomar con asa estéril una cantidad de crecimiento bacteriano fresco de una placa de TSA que contenga *Listeria monocytogenes* (microorganismo

Diana) y depositarlo en un tubo con solución salina estéril. De igual forma tomar con asa estéril una cantidad de crecimiento bacteriano fresco de una placa de TSA que contenga *Escherichia coli* (microorganismo No Diana) y depositarlo en un tubo con solución salina estéril.

- Homogenizar mecánicamente.
- Realizar las lecturas de la suspensión bacteriana preparada del microorganismo Diana y la suspensión bacteriana del microorganismo No Diana mediante espectrofotometría de manera aséptica, hasta obtener aproximadamente 10^8 UFC/mL en la escala de MacFarland para cada microorganismo.

Obtención de la Dilución Equivalente a 100 UFC/mL de *Listeria monocytogenes*.

Nota: A continuación, se prepararán diluciones seriadas de la suspensión bacteriana en estudio hasta obtener una concentración estimada de 100 ucf/mL. (ver Anexo N°1)

- Tomar 0.1 mL de suspensión bacteriana y agregarlo a un tubo con 9.9 mL de solución salina estéril, para obtener una concentración de 10^6 ucf/mL.
- Homogenizar mecánicamente el contenido del tubo.
- Del tubo anteriormente homogenizado tomar 0.1 mL agregarlo a un tubo nuevo con 9.9 mL de solución salina estéril, para obtener una concentración de 10^4 ucf/mL.
- Homogenizar mecánicamente el contenido del tubo.
- Del tubo anteriormente homogenizado tomar 1.0 mL y agregarlo a un frasco con 99.0 mL de solución salina estéril, para obtener una concentración de 10^2 ucf/mL.
- Homogenizar mecánicamente el contenido del frasco, se obtiene la concentración de 100 ucf/mL de *Listeria monocytogenes*.

Obtención de los niveles de inóculos de prueba de *Listeria monocytogenes*

- Tomar 2.0 mL de la suspensión de 100 ufc/mL de *Listeria monocytogenes* y agregarlo a un frasco que contienen 98.0 mL de solución salina estéril, para obtener una concentración estimada de 2 ufc/mL.
- Homogenizar mecánicamente el contenido del frasco.
- Tomar 3.0 mL de la suspensión de 100 ufc/mL de *Listeria monocytogenes* y agregarlo a un frasco que contenga 97.0 mL de solución salina estéril, para obtener una concentración estimada de 3 ufc/mL.
- Homogenizar mecánicamente el contenido del frasco.
- Tomar 5.0 mL de la suspensión de 100 ufc/mL de *Listeria monocytogenes* y agregarlo a un frasco que contienen 95.0 mL de solución salina estéril, para obtener una concentración estimada de 5 ufc/mL.
- Homogenizar mecánicamente el contenido del frasco.

1.9.7.2 Prueba del Inóculo *Listeria monocytogenes*

- Rotular por sextuplicado placas Petri estériles para los medios de cultivo: Agar Conteo en Placa, Agar Oxford y Agar Palcam.
- Inocular asépticamente 1.0 mL de la dilución de 100 UFC/mL de *Listeria monocytogenes* cada una de las placas previamente identificadas como agar de conteo en placa (APC) y agares Oxford (OXA) y Palcam (PAL).
- Verter el medio según corresponda a cada grupo de placas. Esperar a que solidifique el medio en las placas e incubar.
- Proceder al conteo del crecimiento en cada uno de los medios de cultivo, observar la morfología de las colonias.

Obtención de la dilución equivalente a 300 UFC/mL de *Escherichia coli*.

Nota: A continuación, se prepararán diluciones seriadas de la suspensión bacteriana (no diana) hasta obtener una concentración estimada de 300 ufc/mL (ver Anexo N°1).

- Tomar 0.1 mL de suspensión bacteriana y agregarlo a un tubo con 9.9 mL de solución salina estéril, para obtener una concentración de 10^6 ufc/mL.
- Homogenizar mecánicamente el contenido del tubo.
- Del tubo anteriormente homogenizado tomar 0.1 mL, agregarlo a un tubo nuevo con 9.9 mL de solución salina estéril, para obtener una concentración de 10^4 ufc/mL.
- Homogenizar mecánicamente el contenido del tubo.
- Del tubo anteriormente homogenizado tomar 3.0 mL y agregarlo a un frasco con 97.0 mL de solución salina estéril, para obtener una concentración de 300 ufc/mL.
- Homogenizar mecánicamente el contenido del frasco, se obtiene la concentración de 300 ufc/mL de *Escherichia coli*.

Prueba del Inóculo *Escherichia coli*.

- Inocular asépticamente bajo cabina de flujo laminar 1.0 mL de la dilución de 300 UFC/mL de *Escherichia coli* cada una de las placas previamente identificadas como agar de conteo en placa APC y agar EMB.
- Verter el medio según corresponda a cada grupo de placas. Esperar a que solidifique el medio en las placas e incubar.
- Proceder al conteo del crecimiento en agar cada uno de los medios de cultivo, observar la morfología de las colonias.

1.9.7.3 Ensayo Metodología para Aislamiento, Detección e Identificación de *Listeria monocytogenes* mediante PCR en Matrices de Alimentos de Productos Lácteos y Cárnicos

Se desea desarrollar la metodología basada en el método de prueba de rendimiento AOAC 070702. Las matrices aprobadas incluyen fiambres rebanado, salchichas para hotdogs, pescado crudo, leche líquida, pasta blanda

pasteurizada, queso y superficies ambientales del kit de detección genética *Listeria Tq* (10)

Componentes del equipo:

Cada kit del sistema de detección genética, *Listeria monocytogenes* contiene lo siguiente:

- Tubos de amplificación
- Reactivo de concentración de *Listeria*
- Buffer de re-suspensión de *Listeria*
- Solución de lavado

Equipo, material y medio de cultivo requerido:

- Medio de enriquecimiento para *Listeria* (caldo LEB), este medio de enriquecimiento es la principal modificación al protocolo de *Listeria Tq* (kit comercial)
- Agares Oxford y Palcam
- Pipeta de separación inmunomagnética
- Puntas para pipeta de separación inmunomagnética
- Mezclador Vortex
- Cinta adhesiva para plato de re-suspensión.
- Pozos de muestra y base de pozos de muestras
- Placa de re-suspensión
- Bloque de enfriamiento de gel
- Micropipeta de 8 canales capaz de dispensar 30 μ L
- Pipeta repetidora
- Puntas de pipetas repetidoras (0.5 μ L y 1.0 μ L)
- Stomacher o equivalente
- Incubadoras de (30 \pm 1) $^{\circ}$ C y (60-64) $^{\circ}$ C

Ver anexo N°11 Ilustración de material usado en la metodología para aislamiento, detección e identificación de *Listeria monocytogenes* mediante PCR en matrices de alimentos de productos lácteos y cárnicos.

Procedimiento de Método de prueba de Rendimiento AOAC 070702

Preparación de la muestra

Preparación de la Muestra y Pre-Enriquecimiento en Medio Líquido No Selectivo

Nota: Se utilizará como medio de enriquecimiento Caldo de enriquecimiento para *Listeria* (caldo LEB) como alternativa al que se propone en el protocolo del kit comercial.

- Pesar 25 g de muestra y agregar 225 mL de medio de cultivo de enriquecimiento para *Listeria*
Este proceso será repetido 21 veces (3 muestras blanco, 18 para que cada nivel de prueba del microorganismo diana sea analizado por sextuplicado), con el fin de cumplir la verificación de los parámetros de la Política de Validación y Estimación de Incertidumbre de Métodos Microbiológicos del Organismo Salvadoreño de Acreditación.
- Inocular cada nivel de inóculos de prueba de *Listeria monocytogenes* (2 ufc/mL, 3 ufc/mL y 5 ufc/mL por sextuplicado) e inocular cada repetición con la suspensión del microorganismo interferente *E. coli* 300 ufc/mL.
- Protocolo de enriquecimiento de 30 horas: incube las muestras durante 30 a 48 horas a 30°C.

Protocolo de Preparación de Muestras.

- Mezclar en vortex el reactivo de concentración de muestra y Transferir inmediatamente 20 μ L de reactivo de concentración de muestra a cada uno de los pocillos vacíos del bloque de preparación de muestra (un pocillo por muestra), utilizando una pipeta repetidora y puntas de pipeta de 0.5 mL, cubra los pocillos de muestra con cinta adhesiva.
- Añadir 1.0 mL de muestra incubada en caldo de pre-enriquecimiento a cada pocillo de muestra que contenga reactivo de concentración de la muestra evite transferir partículas de alimentos. Cubra los pocillos de muestras con una nueva cinta adhesiva.
- Colocar los pocillos de muestras sellados que contienen el reactivo de concentración de muestra y la muestra en el mezclador vortex y agite durante 10 min.
- Transferir 1.0 mL de **solución de lavado** a pocillos adicionales en el bloque de lavado (un pocillo por muestra) utilizando una pipeta repetidora, cubra los pocillos con cinta adhesiva.
- Agregar 45 μ L **buffer de re-suspensión** a los pocillos de muestras en la placa de re-suspensión usando una pipeta repetidora y una punta de 0.5 mL, cubra la placa de re-suspensión preparada con cinta adhesiva. Retirar con precaución la cinta adhesiva.

Preparación de la Muestra: Extracción de Material Genético

- Cargar las puntas de la pipeta de separación inmunomagnética asegurando de que esté firmemente en su lugar. Extender los imanes de la pipeta e insertar en la primera tira de pocillos de muestra. Agitar suavemente por 30 segundos mientras se mueve continuamente hacia arriba y hacia abajo desde la superficie hasta el fondo del pocillo. Golpear ligeramente las puntas de la pipeta contra el lateral de los pocillos de muestras para eliminar el exceso de medios.

- Retirar la cinta adhesiva de los pocillos correspondientes a la solución de lavado. Transferir la pipeta de separación inmunomagnética a la solución de lavado. Con las puntas sumergidas, revolver suavemente la pipeta de separación de lado a lado durante 5 a 10 segundos. Golpear ligeramente la pipeta contra el costado de los pocillos de muestra para eliminar el exceso de gotas de solución de lavado.
- Retirar la cinta adhesiva de la placa de re-suspensión. Transferir la pipeta de separación inmunomagnética a la fila correspondiente de la placa de re-suspensión preparada. Con las con las puntas sumergidas retirar los imanes de la pipeta y golpear suavemente para liberar las partículas en el buffer de re-suspensión (en este paso se está liberando el ADN de las partículas magnéticas)
- Repetir los pasos de a) a c) para todas las muestras usando puntas nuevas para cada fila de muestras.
- Cubrir la placa de re-suspensión con una nueva cinta adhesiva.
- Coloque la placa de re-suspensión sellada que contiene las muestras en una incubadora a 60 – 64°C durante 15 min – 1 h.

Amplificación y Detección Genética.

Preparación del Bloque de Enfriamiento.

- Antes del uso inicial, el bloque de enfriamiento de gel debe almacenarse en el congelador (-25 a -15 °C) durante 6 horas. Cuando se congela, el bloque de enfriamiento de gel cambiará de rosa a púrpura. Cuando no está en uso, el bloque de congelamiento de gel debe de continuar almacenado entre -25 y -15°C.
- Entre cada uso el bloque de enfriamiento de gel debe devolverse al congelador hasta que se haya girado por completo a morado, lo que indica que está listo para usar. Esto puede tardar hasta 2 horas.

Preparación de Tubos de Amplificación.




- La configuración del sistema de detección genética y la entrada de datos en el software del termociclador debe realizarse antes de transferir las muestras de la placa de re-suspensión a los tubos de amplificación (esto se realizará en la computadora).
- Retirar los tubos de amplificación de la bolsa de aluminio y colocarlos en el bloque de enfriamiento de gel congelado en la disposición
- Transferir 30 µL de muestra de los pocillos de la placa de re-suspensión a cada tubo de amplificación utilizando una pipeta multicanal y puntas de barrera con filtro. Presionar firmemente hacia abajo la tapa de cada uno de los tubos de amplificación para cerrar. Inspeccionar visualmente cada tubo para asegurar que la tapa esté bien sellada.
- Coloque los tubos de amplificación en el equipo de detección genética en orden secuencial, comenzando con la posición 1.

Nota: El equipo de detección genética debe iniciarse dentro de los 20 minutos posteriores a la adición de las muestras a los tubos de amplificación.

Resultados

Una vez finalizado el ensayo, el software del sistema de detección genética proporcionará todos los resultados. Cada muestra se identificará como positiva, negativa o no amplificada. Se realiza la confirmación de los resultados mediante la vía convencional de análisis.

Tabla N°5: Informe de Resultados que proporciona el Sistema de Detección Genética (10)

No.	Color	Name	Result	Description	Kit lot number
1		Sample 1	Positive	L. monocytogenes	1234567
2		Sample 2	Negative	L. monocytogenes	1234567
3		Sample 3	No Amp	L. monocytogenes	1234567

Positivo: Las muestras son positivas para *L. monocytogenes*

Negativo: Las muestras son negativas para *L. monocytogenes*

No Amp: No se produjo amplificación.

Control positivo: Se utilizará la cepa de referencia ATCC de *Listeria monocytogenes*, se llevará este control en medios de pre-enriquecimiento y aislamiento al igual que las muestras de prueba en todas las etapas del ensayo

Control negativo: Se utilizará la cepa de referencia ATCC de *Escherichia coli*, se llevará este control en medios de pre-enriquecimiento y aislamiento en toda etapa del ensayo

1.9.7.4 Confirmación de Presuntos Positivos por Método Modificado Tradicional, Basado en Detección y Enumeración De *Listeria monocytogenes* en Alimentos y Muestras Ambientales Capítulo 10 Del Manual Analítico Bacteriológico, FDA.

Procedimiento de aislamiento:

- Sembrar las muestras presuntamente positivas que fueron incubadas en caldo LEB (procedimiento de enriquecimiento) en placas con agar Oxford y Palcam. Incubar las placas a 35°C por 48 h.
- Observar si existe crecimiento característico, colonias verdes grisáceas con centro hundido y halo negro a su alrededor. Si el crecimiento es característico, continuar con el procedimiento de identificación.

Procedimiento de identificación (6)

- Prueba de movilidad:
- Tomar una colonia característica con un asa en punta estéril y sembrar por punción en un tubo que contenga agar movilidad. Incubar, después del tiempo de incubación, el crecimiento que se espera en el tubo en forma de paraguas o forma de champiñón.

De manera paralela tomar una colonia característica del cultivo en agares Oxford y Palcam y sembrar por estriado en agar Triptona de soya (TSA). Incubar a 35°C de 18 a 24 horas.

Del cultivo fresco e TSA se realizarán las pruebas:

- Prueba de la catalasa:

Depositar sobre un portaobjeto una gota de peróxido de hidrogeno al 3% y con asa estéril tomar una colonia del cultivo de TSA e incorporar suavemente. Las especies de *Listeria* son catalasa positiva, produciendo burbujas.

- Fermentación de carbohidratos:

Elegir una colonia típica de un tubo de TSBye, inocular en tubos con campana de Durham con soluciones al 0.5% de Ramnosa, Manitol y Xilosa e indicador púrpura de bromocresol. 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.

- Pruebas bioquímicas miniaturizadas API *Listeria* (11)

Preparación de la galería:

Crear atmosfera húmeda en el fondo, colocar la galería y preparar el inóculo en la ampolla de médium 2 depositando con asa estéril crecimiento suficiente del cultivo de TSA para generar turbidez de la suspensión bacteriana, agitar.

Repartir la suspensión bacteriana en los tubos de la galería, evitando la formación de burbujas, en el tubo de DIM llenar el tubo y cúpula evitando que se forme un menisco convexo. Incubar a 35°C de 18 a 24 horas.

- Lectura e interpretación:

Tabla No. 6 Tabla de identificación API *Listeria* (11)

Pruebas	Resultados	
	Negativo	Positivo
DIM Agregar una gota de reactivo ZYM B, esperar 3 min	Naranja pálido, rosa, gris	Naranja
ESC	Amarillo pálido	Negro
α MAN	Incoloro	Amarillo
DARL	Rojo / rojo anaranjado	Amarillo / amarillo anaranjado
XYL		
RHA		
MDG		
ROB		
G1P		
TAG		

Anotar las reacciones +/- en la hoja de resultados, la identificación se obtiene a partir del perfil numérico. Luego es ingresado al software del APIWEB para hacer la validación y obtener la identificación en género y especie.

- Tinción de Gram

Se coloca una pequeña gota de solución salina en el centro de un portaobjetos, tomar en condiciones asépticas, con ayuda de un asa estéril, una pequeña cantidad del cultivo bacteriano en medio sólido y se transferirá a la gota de solución salina. Mezclar con el asa de siembra hasta formar una suspensión homogénea que quede bastante extendida, dejando un fijado delgado. Flamear con cuidado el portaobjeto conteniendo la suspensión hasta sequedad y dejar enfriar. Se añadirá cristal violeta colocando suficiente colorante y dejar que actúe durante 1 minuto. Lavar suavemente con agua

estéril. Se aplica el mordiente, lugol y dejar actuar durante 1 minuto. Lavar suavemente con agua estéril.

Decolorar aplicando alcohol-acetona, dejar actuar por 20 – 25 segundos y lavar suavemente con agua estéril. Se agrega safranina para la tinción de contraste, dejando actuar por 1 minuto. Lavar suavemente con agua estéril. Se deja secar la preparación y se examinara en el microscopio la morfología de bacilos Gram positivo.

1.9.8 Pruebas estadísticas

La metodología que se desea probar y experimentar es de carácter cualitativo y de acuerdo con la Política para la Validación Y Estimación de la Incertidumbre de Métodos Microbiológicos. (12)

El método cualitativo requiere verificar las características del funcionamiento del método por lo que se realizara el desarrollo bajo la estimación del límite de detección, mediante los siguientes parámetros:

Cuadro No. 4 Parámetros y Criterios de Aceptación de Política para la Validación y Estimación de la Incertidumbre de Métodos Microbiológicos Cualitativos (12)

Parámetros	Criterios de aceptación
Verificación del tamaño de inóculo	Al verificar el tamaño del inóculo por lo menos seis veces en un agar de conteo, en promedio se deben obtener cuentas de menos de 10 UFC y ninguna de 10 UFC o más.
Verificación de la muestra	Numero de repeticiones: 3 Analistas: uno Resultados positivos: 0% lo que significa que la muestra no debe tener el microorganismo diana (<i>L. monocytogenes</i>)
Verificación del límite de detección	Numero de repeticiones: al menos 6 por analista Analistas: al menos dos Resultados positivos: al menos el 80%, es decir 5 repeticiones deben ser positivas Tamaño del inóculo: menos de 10 UFC
Falsos positivos	Numero de repeticiones: al menos 6 por analista Analistas: al menos dos Resultados positivos verdaderos: 100% Falso positivo: 0 Tamaño del inóculo: más de 100 UFC. En este sentido se debe agregar un microorganismo de Interferencia (no diana) y se debe comprobar que no interfiera en la detección del microorganismo diana
Incertidumbre	No es de aplicación a métodos cualitativos

1.9.8 CRONOGRAMA DE ACTIVIDADES

Tabla N° 7: Cronograma de actividades de la Práctica Profesional Supervisada

E t a p a	Actividad	CRONOGRAMA DE ACTIVIDADES PPS											
		2022						2023					
		Jul	Ago	Sep	Oct	Nov	Dic	Ene	Feb	Mar	Abr	May	
I	Capacitación en instrucciones técnicas y metodologías de las determinaciones	x	x										
	Elaboración del plan de trabajo		x	x	X								
	Revisión de informe por tutores Internos y Externos	x	x	x	X	x	x	x					
	Presentación del plan de trabajo						x						
II	Ejecución de prácticas profesionales supervisadas	x	x	x	X	x	x	x					
	Redacción del procedimiento de implementación de la metodología					x	x	x					
	Redacción del informe de las PPS					x	x	x					

CAPITULO II
INFORME DE PRACTICAS
PROFESIONALES SUPERVISADAS



UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR
FACULTAD DE QUIMICA Y FARMACIA
PRACTICA PROFESIONAL SUPERVISADA

F-1 PPS



REGISTRO DE ASISTENCIA DEL EGRESADO

Nombre Egresado: María Roxana Lara Zelaya

N° de Grupo: 40-22

Tutor Externo: Cindy Rebeca Martínez Linares

Mes: Julio/Agosto

Fecha	Hora de inicio	Hora de finalización	Tiempo total	Firma de Tutor Externo
15/07/2022	7:30 a.m.	3:30 p.m.	8 horas	<i>C. Martínez Linares</i>
18/07/2022	7:30 a.m.	3:30 p.m.	8 horas	<i>C. Martínez Linares</i>
19/07/2022	7:30 a.m.	3:30 p.m.	8 horas	<i>C. Martínez Linares</i>
20/07/2022	7:30 a.m.	3:30 p.m.	8 horas	<i>C. Martínez Linares</i>
21/07/2022	7:30 a.m.	3:30 p.m.	8 horas	<i>C. Martínez Linares</i>
22/07/2022	7:30 a.m.	3:30 p.m.	8 horas	<i>C. Martínez Linares</i>
25/07/2022	7:30 a.m.	3:30 p.m.	8 horas	<i>C. Martínez Linares</i>
26/07/2022	7:30 a.m.	3:30 p.m.	8 horas	<i>C. Martínez Linares</i>
27/07/2022	7:30 a.m.	3:30 p.m.	8 horas	<i>C. Martínez Linares</i>
28/07/2022	7:30 a.m.	3:30 p.m.	8 horas	<i>C. Martínez Linares</i>
29/07/2022	7:30 a.m.	3:30 p.m.	8 horas	<i>C. Martínez Linares</i>
08/08/2022	7:30 a.m.	3:30 p.m.	8 horas	<i>C. Martínez Linares</i>
09/08/2022	7:30 a.m.	3:30 p.m.	8 horas	<i>C. Martínez Linares</i>
10/08/2022	7:30 a.m.	3:30 p.m.	8 horas	<i>C. Martínez Linares</i>
11/08/2022	7:30 a.m.	3:30 p.m.	8 horas	<i>C. Martínez Linares</i>
12/08/2022	7:30 a.m.	3:30 p.m.	8 horas	<i>C. Martínez Linares</i>
15/08/2022	7:30 a.m.	3:30 p.m.	8 horas	<i>C. Martínez Linares</i>
16/08/2022	7:30 a.m.	3:30 p.m.	8 horas	<i>C. Martínez Linares</i>
17/08/2022	7:30 a.m.	3:30 p.m.	8 horas	<i>C. Martínez Linares</i>
18/08/2022	7:30 a.m.	3:30 p.m.	8 horas	<i>C. Martínez Linares</i>
19/08/2022	7:30 a.m.	3:30 p.m.	8 horas	<i>C. Martínez Linares</i>
22/08/2022	7:30 a.m.	3:30 p.m.	8 horas	<i>C. Martínez Linares</i>
23/08/2022	7:30 a.m.	3:30 p.m.	8 horas	<i>C. Martínez Linares</i>
24/08/2022	7:30 a.m.	3:30 p.m.	8 horas	<i>C. Martínez Linares</i>
25/08/2022	7:30 a.m.	3:30 p.m.	8 horas	<i>C. Martínez Linares</i>
26/08/2022	7:30 a.m.	3:30 p.m.	8 horas	<i>C. Martínez Linares</i>
Total de horas realizadas			208 horas	<i>C. Martínez Linares</i>





UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR
FACULTAD DE QUIMICA Y FARMACIA
PRACTICA PROFESIONAL SUPERVISADA

F-1 PPS



REGISTRO DE ASISTENCIA DEL EGRESADO

Nombre Egresado: María Roxana Lara Zelaya

N° de Grupo: 40-22

Tutor Externo: Cindy Rebeca Martínez Linares

Mes: Agosto/Septiembre

Fecha	Hora de inicio	Hora de finalización	Tiempo total	Firma de Tutor Externo
29/08/2022	7:30 a.m.	3:30 p.m.	8 horas	<i>[Firma]</i>
30/08/2022	7:30 a.m.	3:30 p.m.	8 horas	<i>[Firma]</i>
31/08/2022	7:30 a.m.	3:30 p.m.	8 horas	<i>[Firma]</i>
01/09/2022	7:30 a.m.	3:30 p.m.	8 horas	<i>[Firma]</i>
02/09/2022	7:30 a.m.	3:30 p.m.	8 horas	<i>[Firma]</i>
05/09/2022	7:30 a.m.	3:30 p.m.	8 horas	<i>[Firma]</i>
06/09/2022	7:30 a.m.	3:30 p.m.	8 horas	<i>[Firma]</i>
07/09/2022	7:30 a.m.	3:30 p.m.	8 horas	<i>[Firma]</i>
08/09/2022	7:30 a.m.	3:30 p.m.	8 horas	<i>[Firma]</i>
09/09/2022	7:30 a.m.	3:30 p.m.	8 horas	<i>[Firma]</i>
12/09/2022	7:30 a.m.	3:30 p.m.	8 horas	<i>[Firma]</i>
13/09/2022	7:30 a.m.	3:30 p.m.	8 horas	<i>[Firma]</i>
14/09/2022	7:30 a.m.	3:30 p.m.	8 horas	<i>[Firma]</i>
16/09/2022	7:30 a.m.	3:30 p.m.	8 horas	<i>[Firma]</i>
19/09/2022	7:30 a.m.	3:30 p.m.	8 horas	<i>[Firma]</i>
20/09/2022	7:30 a.m.	3:30 p.m.	8 horas	<i>[Firma]</i>
21/09/2022	7:30 a.m.	3:30 p.m.	8 horas	<i>[Firma]</i>
22/09/2022	7:30 a.m.	3:30 p.m.	8 horas	<i>[Firma]</i>
23/09/2022	7:30 a.m.	3:30 p.m.	8 horas	<i>[Firma]</i>
26/09/2022	7:30 a.m.	3:30 p.m.	8 horas	<i>[Firma]</i>
27/09/2022	7:30 a.m.	3:30 p.m.	8 horas	<i>[Firma]</i>
28/09/2022	7:30 a.m.	3:30 p.m.	8 horas	<i>[Firma]</i>
29/09/2022	7:30 a.m.	3:30 p.m.	8 horas	<i>[Firma]</i>
30/09/2022	7:30 a.m.	3:30 p.m.	8 horas	<i>[Firma]</i>
03/10/2022	7:30 a.m.	3:30 p.m.	8 horas	<i>[Firma]</i>
Total de horas realizadas			200 horas	





UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR
FACULTAD DE QUIMICA Y FARMACIA
PRACTICA PROFESIONAL SUPERVISADA

F-1 PPS



REGISTRO DE ASISTENCIA DEL EGRESADO

Nombre Egresado: María Roxana Lara Zelaya

N° de Grupo: 40-22

Tutor Externo: Cindy Rebeca Martínez Linares

Mes: Octubre/Noviembre

Fecha	Hora de inicio	Hora de finalización	Tiempo total	Firma de Tutor Externo
04/10/2022	7:30 a.m.	3:30 p.m.	8 horas	<i>[Firma]</i>
05/10/2022	7:30 a.m.	3:30 p.m.	8 horas	<i>[Firma]</i>
06/10/2022	7:30 a.m.	3:30 p.m.	8 horas	<i>[Firma]</i>
07/10/2022	7:30 a.m.	3:30 p.m.	8 horas	<i>[Firma]</i>
10/10/2022	7:30 a.m.	3:30 p.m.	8 horas	<i>[Firma]</i>
11/10/2022	7:30 a.m.	3:30 p.m.	8 horas	<i>[Firma]</i>
12/10/2022	7:30 a.m.	3:30 p.m.	8 horas	<i>[Firma]</i>
13/10/2022	7:30 a.m.	3:30 p.m.	8 horas	<i>[Firma]</i>
14/10/2022	7:30 a.m.	3:30 p.m.	8 horas	<i>[Firma]</i>
17/10/2022	7:30 a.m.	3:30 p.m.	8 horas	<i>[Firma]</i>
18/10/2022	7:30 a.m.	3:30 p.m.	8 horas	<i>[Firma]</i>
19/10/2022	7:30 a.m.	3:30 p.m.	8 horas	<i>[Firma]</i>
20/10/2022	7:30 a.m.	3:30 p.m.	8 horas	<i>[Firma]</i>
21/10/2022	7:30 a.m.	3:30 p.m.	8 horas	<i>[Firma]</i>
24/10/2022	7:30 a.m.	3:30 p.m.	8 horas	<i>[Firma]</i>
25/10/2022	7:30 a.m.	3:30 p.m.	8 horas	<i>[Firma]</i>
26/10/2022	7:30 a.m.	3:30 p.m.	8 horas	<i>[Firma]</i>
27/10/2022	7:30 a.m.	3:30 p.m.	8 horas	<i>[Firma]</i>
28/10/2022	7:30 a.m.	3:30 p.m.	8 horas	<i>[Firma]</i>
31/10/2022	7:30 a.m.	3:30 p.m.	8 horas	<i>[Firma]</i>
01/11/2022	7:30 a.m.	3:30 p.m.	8 horas	<i>[Firma]</i>
03/11/2022	7:30 a.m.	3:30 p.m.	8 horas	<i>[Firma]</i>
04/11/2022	7:30 a.m.	3:30 p.m.	8 horas	<i>[Firma]</i>
07/11/2022	7:30 a.m.	3:30 p.m.	8 horas	<i>[Firma]</i>
08/11/2022	7:30 a.m.	3:30 p.m.	8 horas	<i>[Firma]</i>
Total de horas realizadas			200 horas	





UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR
FACULTAD DE QUIMICA Y FARMACIA
PRACTICA PROFESIONAL SUPERVISADA

F-1 PPS



REGISTRO DE ASISTENCIA DEL EGRESADO

Nombre Egresado: María Roxana Lara Zelaya

N° de Grupo: 40-22

Tutor Externo: Cindy Rebeca Martínez Linares

Mes: Noviembre/Diciembre

Fecha	Hora de inicio	Hora de finalización	Tiempo total	Firma de Tutor Externo
09/11/2022	7:30 a.m.	3:30 p.m.	8 horas	<i>[Firma]</i>
10/11/2022	7:30 a.m.	3:30 p.m.	8 horas	<i>[Firma]</i>
11/11/2022	7:30 a.m.	3:30 p.m.	8 horas	<i>[Firma]</i>
14/11/2022	7:30 a.m.	3:30 p.m.	8 horas	<i>[Firma]</i>
15/11/2022	7:30 a.m.	3:30 p.m.	8 horas	<i>[Firma]</i>
16/11/2022	7:30 a.m.	3:30 p.m.	8 horas	<i>[Firma]</i>
17/11/2022	7:30 a.m.	3:30 p.m.	8 horas	<i>[Firma]</i>
18/11/2022	7:30 a.m.	3:30 p.m.	8 horas	<i>[Firma]</i>
21/11/2022	7:30 a.m.	3:30 p.m.	8 horas	<i>[Firma]</i>
22/11/2022	7:30 a.m.	3:30 p.m.	8 horas	<i>[Firma]</i>
23/11/2022	7:30 a.m.	3:30 p.m.	8 horas	<i>[Firma]</i>
24/11/2022	7:30 a.m.	3:30 p.m.	8 horas	<i>[Firma]</i>
25/11/2022	7:30 a.m.	3:30 p.m.	8 horas	<i>[Firma]</i>
28/11/2022	7:30 a.m.	3:30 p.m.	8 horas	<i>[Firma]</i>
29/11/2022	7:30 a.m.	3:30 p.m.	8 horas	<i>[Firma]</i>
30/11/2022	7:30 a.m.	3:30 p.m.	8 horas	<i>[Firma]</i>
01/12/2022	7:30 a.m.	3:30 p.m.	8 horas	<i>[Firma]</i>
02/12/2022	7:30 a.m.	3:30 p.m.	8 horas	<i>[Firma]</i>
05/12/2022	7:30 a.m.	3:30 p.m.	8 horas	<i>[Firma]</i>
06/12/2022	7:30 a.m.	3:30 p.m.	8 horas	<i>[Firma]</i>
07/12/2022	7:30 a.m.	3:30 p.m.	8 horas	<i>[Firma]</i>
08/12/2022	7:30 a.m.	3:30 p.m.	8 horas	<i>[Firma]</i>
09/12/2022	7:30 a.m.	3:30 p.m.	8 horas	<i>[Firma]</i>
12/12/2022	7:30 a.m.	3:30 p.m.	8 horas	<i>[Firma]</i>
13/12/2022	7:30 a.m.	3:30 p.m.	8 horas	<i>[Firma]</i>
14/12/2022	7:30 a.m.	3:30 p.m.	8 horas	<i>[Firma]</i>
Total de horas realizadas			208 horas	





UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR
FACULTAD DE QUIMICA Y FARMACIA
PRACTICA PROFESIONAL SUPERVISADA

F-1 PPS



REGISTRO DE ASISTENCIA DEL EGRESADO

Nombre Egresado: María Roxana Lara Zelaya

N° de Grupo: 40-22

Tutor Externo: Cindy Rebeca Martínez Linares

Mes: Diciembre/Enero

Fecha	Hora de inicio	Hora de finalización	Tiempo total	Firma de Tutor Externo
15/12/2022	7:30 a.m.	3:30 p.m.	8 horas	<i>[Firma]</i>
16/12/2022	7:30 a.m.	3:30 p.m.	8 horas	<i>[Firma]</i>
19/12/2022	7:30 a.m.	3:30 p.m.	8 horas	<i>[Firma]</i>
20/12/2022	7:30 a.m.	3:30 p.m.	8 horas	<i>[Firma]</i>
21/12/2022	7:30 a.m.	3:30 p.m.	8 horas	<i>[Firma]</i>
22/12/2022	7:30 a.m.	3:30 p.m.	8 horas	<i>[Firma]</i>
23/12/2022	7:30 a.m.	3:30 p.m.	8 horas	<i>[Firma]</i>
03/01/2023	7:30 a.m.	3:30 p.m.	8 horas	<i>[Firma]</i>
04/01/2023	7:30 a.m.	3:30 p.m.	8 horas	<i>[Firma]</i>
05/01/2023	7:30 a.m.	3:30 p.m.	8 horas	<i>[Firma]</i>
06/01/2023	7:30 a.m.	3:30 p.m.	8 horas	<i>[Firma]</i>
09/01/2023	7:30 a.m.	3:30 p.m.	8 horas	<i>[Firma]</i>
10/01/2023	7:30 a.m.	3:30 p.m.	8 horas	<i>[Firma]</i>
11/01/2023	7:30 a.m.	3:30 p.m.	8 horas	<i>[Firma]</i>
12/01/2023	7:30 a.m.	3:30 p.m.	8 horas	<i>[Firma]</i>
13/01/2023	7:30 a.m.	3:30 p.m.	8 horas	<i>[Firma]</i>
16/01/2023	7:30 a.m.	3:30 p.m.	8 horas	<i>[Firma]</i>
17/01/2023	7:30 a.m.	3:30 p.m.	8 horas	<i>[Firma]</i>
Total de horas realizadas			144 horas	



F-3 PPS



UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR
FACULTAD DE QUIMICA Y FARMACIA
PRACTICA PROFESIONAL SUPERVISADA



BITÁCORA DE ACTIVIDADES PRACTICAS PROFESIONALES SUPERVISADAS




Nombre Egresado: Maria Roxana Lara Zelaya Grupo: 40-22

Tutor Externo: Cindy Rebeca Martínez Linares

1. Anexe el Cronograma de actividades aprobado en el PLAN DE TRABAJO

Cronograma de actividades de la Práctica Profesional Supervisada

Actividad	CRONOGRAMA DE ACTIVIDADES PPS						
	2022						2023
	Julio	Agosto	Septiembre	Octubre	Noviembre	Diciembre	Enero
Capacitación en instrucciones técnicas y metodologías de las determinaciones	x	x					
Elaboración del plan de trabajo		x					
Revisión de informe de por tutores externos e interno.			x	x	x		
Presentación del plan de trabajo						x	
Ejecución de prácticas profesionales supervisadas	x	x	x	x	x	x	x
Redacción del procedimiento de implementación de la metodología			x	x	x	x	
Presentación informe de PPS						x	
Redacción del Informe final					x	x	x
Presentación del informe final							x

Etapa I 
 Etapa II 
 Etapa III 

Tiempo total estimado: **28 semanas**

2. Describa detalladamente las actividades realizadas en sus PPS			
Área o departamento	Periodo (fechas)	N°	Actividad
Oficina Jefatura	Julio 2022 (del 15 al 22) Días laborables	1	Lectura e inducción en documentación interna y normas oficiales que avalan el trabajo del Laboratorio de Alimentos y Toxicología. <ul style="list-style-type: none"> - Norma ISO 11133 Microbiología de Alimentos y Aguas - Norma Técnica Salvadoreña Norma ISO/IEC 17025:2017 Requisitos Generales para la Competencia de los Laboratorios de Ensayo y Calibración - Instrucción Técnica de Preparación de Medios de Cultivos y Reactivos. - Instrucción de Técnica para el manejo y mantenimiento de cultivos de referencia. - Instrucción Técnica de Preparación de Muestras. - Metodología para la detección de <i>Listeria monocytogenes</i> y otras especies de <i>Listeria spp</i> en alimentos
		2	Firma de acuerdo de: <ul style="list-style-type: none"> - Confidencialidad - Imparcialidad
Plataforma de Microbiología	Julio 2022 (del 25 al 29) Días laborables	1	Lectura y capacitación en instrucciones técnicas y metodologías analíticas de la plataforma de microbiología.
Plataforma de Microbiología	Agosto 2022 (del 08 al 31) Días laborables	1	Colaboración en la verificación de condiciones de temperatura de los equipos involucrados en las determinaciones de análisis y manejo de bitácoras de uso de equipos.
		2	Asignación y delimitación del proyecto a desarrollar. Revisión bibliográfica y asesoría con tutor externo para la elaboración del plan de trabajo de la PPS "DESARROLLO E IMPLEMENTACION DE METODOLOGÍA PARA AISLAMIENTO, DETECCION E IDENTIFICACION DE <i>Listeria monocytogenes</i> MEDIANTE PCR EN MATRICES DE ALIMENTOS DE PRODUCTOS LACTEOS Y CARNICOS"
		3	Capacitación en: <ul style="list-style-type: none"> - Manipulación y mantenimiento de cepas de trabajo. - Análisis microbiológico de alimentos. - Técnicas de estriado en agar. - Aislamiento en medios selectivos y diferenciales. - Tinción de Gram

			<ul style="list-style-type: none"> - Pruebas bioquímicas tradicionales - Pruebas bioquímicas miniaturizadas - Estandarización cepas de trabajo (por método espectrofotométrico) - Preparación de suspensiones bacterianas para controles de calidad de las metodologías analíticas. - Preparación de medios de cultivo - Datos teóricos de técnica PCR en equipo de detección genética - Uso de equipo de laboratorio de microbiología - Contención de derrames bioinfecciosos.
		4	Inducción en monitoreo microbiológico de ambiente y superficies
Plataforma de Microbiología	Septiembre 2022 (del 01 al 30) Días laborables	1	Apoyo en el procesamiento de muestras para la determinación mesófilos aerobios.
		2	Preparación de material y medios de cultivos necesario para resiembras requeridos en las determinaciones analíticas de <i>Salmonella spp</i> , <i>Escherichia coli</i> y <i>Listeria monocytogenes</i>
		3	De acuerdo a la metodología, efectuar el pase de un medio de enriquecimiento a medios selectivos o medios diferenciales
		4	Incubación de resiembras en las determinación de <i>Salmonella spp</i> , <i>Listeria monocytogenes</i> , <i>Escherichia coli</i> por NMP
		5	Apoyo en registro de incubación de muestras.
Plataforma de Microbiología	Octubre 2022 (del 03 al 31) Días laborables	1	Acompañamiento en la determinación de <i>Salmonella spp</i> en muestras por metodología de detección genética. Para adquirir el conocimiento base de la técnica PCR.
		2	De acuerdo a la metodología, efectuar el pase de un medio de enriquecimiento a medios selectivos o medios diferenciales.
		3	Planificación del ensayo preliminar de verificación del inóculo para conocer el comportamiento de los microorganismos <i>Listeria monocytogenes</i> y <i>E. coli</i> en agar de conteo en placa y agares diferenciales.
		4	Preparación de material e insumos para el ensayo preliminar de verificación del inóculo en medio diferenciales y de recuento.
		5	Estandarización de cepa control <i>Listeria monocytogenes</i> y <i>E. coli</i> por método espectrofotométrico para el ensayo preliminar de verificación del inóculo a utilizar en el desarrollo de metodología.
		6	Preparación de la solución madre de la suspensión estandarizada de <i>L.</i>

			<i>monocytogenes</i> 100 UFC/mL (teórico) y suspensión de <i>E. coli</i> 300 UFC/mL
		7	Inoculación de placas con la suspensión madre de <i>L. monocytogenes</i> y suspensión de <i>E. coli</i> y vertido en placa de agar conteo en placa APC y medios diferenciales EMB, OXA/PAL para la estimación cuantitativa del inóculo.
		8	Lectura de las placas inoculadas con las soluciones madres de <i>L.monocytogenes</i> y <i>E. coli</i> del ensayo preliminar de verificación del inóculo.
Plataforma de Microbiología	Noviembre 2022 (del 01 al 30) Días laborables	1	Monitoreo microbiológico de superficies (hisopados)
		2	Siembra del monitoreo de ambiente (vertido en placa)
		3	Preparación de material y medios de cultivos necesario para resiembras requeridos en las determinaciones analíticas de <i>Salmonella spp</i> , <i>Escherichia coli</i> y <i>Listeria monocytogenes</i>
		4	Preparación de material e insumos para el ensayo de verificación del inóculo para matriz de lácteos procesados para el desarrollo e implementación de metodología para aislamiento, detección e identificación de <i>Listeria monocytogenes</i> mediante PCR
		5	Estandarización de cepa control <i>Listeria monocytogenes</i> y <i>E. coli</i> para el ensayo de verificación del inóculo en matriz de lácteos procesados para el desarrollo e implementación de metodología para aislamiento, detección e identificación de <i>Listeria monocytogenes</i> mediante PCR
		6	Preparación de la solución madre de la suspensión estandarizada de <i>L. monocytogenes</i> a una concentración de 100 UFC/mL (teórico) y suspensión de <i>E. coli</i> a una concentración 300 UFC/mL (teórico)
		7	Inoculación de placas con la suspensión madre de <i>L. monocytogenes</i> y suspensión de <i>E. coli</i> y vertido en placa de agar conteo en placa (APC) (para verificación del tamaño del inóculo)
		8	Preparación de material e insumos a utilizar en el ensayo del desarrollo metodología para aislamiento, detección e identificación de <i>L. monocytogenes</i> mediante PCR en una muestra de la matriz de Lácteos Procesados
		9	Ensayo del desarrollo metodología para aislamiento, detección e identificación de <i>L. monocytogenes</i> mediante PCR en una muestra de la matriz de Lácteos Procesados: - Pre enriquecimiento e incubación de la muestra

			<ul style="list-style-type: none"> - Procesamiento de muestra (extracción y amplificación de material genético) - Estriado de las muestras de los niveles de inóculos con resultados positivos y negativos en PCR a agares Oxford y Palcam - Realización de la prueba de movilidad - Realización de pruebas bioquímicas miniaturizadas.
Plataforma de Microbiología	Diciembre (del 01 al 23) Días laborables	1	Asesoría y revisión con tutor externo para la corrección del plan de trabajo de la PPS
		2	Apoyo en el procesamiento de muestras para la determinación mesófilos aerobios.
		3	Preparación de material y medios de cultivos necesario para resiembras requeridos en las determinaciones analíticas de <i>Salmonella</i> spp, <i>Escherichia coli</i> y <i>Listeria monocytogenes</i>
		4	De acuerdo a la metodología, efectuar el pase de un medio de enriquecimiento a medios selectivos o medios diferenciales.
		5	Incubación de resiembras de muestras para las determinación de <i>Salmonella</i> spp, <i>Listeria monocytogenes</i> , <i>Escherichia coli</i> NMP
		6	Apoyo en registro de incubación de muestras (entrada y salida de incubación).
		7	Defensa de Etapa I Plan de Trabajo de Practica Profesional Supervisada
		8	Recopilación de documentación del año vigente, preparación de formatos para el año siguiente
		9	Monitoreo ambiental de superficies
Plataforma de Microbiología	Enero 2023 (del 03 al 17) Días laborables	1	Estandarización y preparación de suspensiones bacterianas para ser usados como controles positivos y negativos en las determinaciones de la plataforma.
		2	Recopilación de documentación del año vigente, preparación de formatos para el año siguiente
		3	Monitoreo ambiental de superficies
		4	Preparación de material e insumos para el ensayo de verificación del inóculo para matriz de cárnicos curados para el desarrollo e implementación de metodología para aislamiento, detección e identificación de <i>Listeria monocytogenes</i> mediante PCR
		5	Estandarización de cepa control <i>Listeria monocytogenes</i> y <i>E. coli</i> para el ensayo de verificación del inóculo en matriz de cárnicos curados para el desarrollo e implementación de metodología para aislamiento, detección e identificación de <i>Listeria monocytogenes</i> mediante PCR

		6	Preparación de la solución madre de la suspensión estandarizada de <i>L. monocytogenes</i> a una concentración de 100 UFC/mL (teórico) y suspensión de <i>E. coli</i> a una concentración 300 UFC/mL (teórico)
		7	Inoculación de placas con la suspensión madre de <i>L. monocytogenes</i> y suspensión de <i>E. coli</i> y vertido en placa de agar conteo en placa (APC) (para verificación del tamaño del inóculo)
		8	Preparación de material e insumos a utilizar en el ensayo del desarrollo metodología para aislamiento, detección e identificación de <i>L. monocytogenes</i> mediante PCR en una muestra de la matriz de cárnicos curados
		9	Ensayo del desarrollo metodología para aislamiento, detección e identificación de <i>L. monocytogenes</i> mediante PCR en una muestra de la matriz de cárnicos curados: <ul style="list-style-type: none"> - Pre enriquecimiento e incubación de muestra - Procesamiento de muestra (extracción y amplificación de material genético) - Estriado de las muestras de los niveles de inóculos con resultados positivos y negativos en PCR a agares Oxford y Palcam - Realización de la prueba de movilidad - Realización de pruebas bioquímicas miniaturizadas.
		10	Preparación de material y medios de cultivos necesario para resiembras requeridos en las determinaciones analíticas de <i>Salmonella spp</i> , <i>Escherichia coli</i> y <i>Listeria monocytogenes</i>
		11	De acuerdo a la metodología, efectuar el pase de un medio de enriquecimiento a medios selectivos o medios diferenciales
		12	Colaboración en la verificación de condiciones de temperatura de los equipos involucrados en las determinaciones de análisis y manejo de bitácoras de uso de equipos

3. Observaciones del egresado respecto a la PPS	Debido a la experiencia adquirida en la PPS se afianza el criterio analítico como profesional Químico Farmacéutico.
4. Limitantes presentadas	Ante la falta de insumos que dicta protocolo de la metodología se debió hacer la modificación de ésta de acuerdo a los insumos existentes en el Laboratorio.

Lic. Cindy Martinez



F-4 PPS



UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR
FACULTAD DE QUIMICA Y FARMACIA
PRACTICA PROFESIONAL SUPERVISADA



**INFORME TUTOR EXTERNO. EVALUACION GLOBAL DEL DESEMPEÑO
 DEL EGRESADO EN EL PROGRAMA DE PRACTICA PROFESIONAL
 SUPERVISADA.**

Indicación: este formato deberá ser completado por el Tutor Externo al finalizar la etapa II.

Nombre del egresado: María Roxana Lara Zelaya		Grupo N°.	40-22
Nombre Tutor Externo: Licda. Cindy Rebeca Martínez Linares		Fecha de evaluación:	28 de febrero 2023
Instrucciones: Asigne la nota que corresponda a cada criterio de evaluación. Tomando en consideración lo siguiente: Siempre (10-8), Casi siempre (7-6) o Nunca (5-0).			
Área del desempeño	Criterio a evaluar	Nota	Observación
CALIDAD DE TRABAJO Ponderación: 0.25	1. Refleja uso apropiado de conocimientos y habilidades en las prácticas realizadas.	8	
	2. Refleja uso apropiado de los recursos humanos y materiales de la institución en el desarrollo de las prácticas.	7	
CAPACIDAD DE TRABAJO Ponderación: 0.25	3. Aplica en la práctica los conocimientos adquiridos de manera efectiva en relación con los objetivos.	6	
	4. Cumple con las actividades programadas y las obligaciones asignadas en las fechas previstas.	8	
	5. Acata las instrucciones que le son impartidas.	8	

ORGANIZACIÓN DEL TRABAJO Ponderación: 0.20	6. Demuestra habilidad para sistematizar y organizar las tareas asignadas.	8	
	7. Demuestra facilidad para seleccionar los procedimientos más apropiados en su desarrollo.	8	
CUALIDADES PERSONALES Ponderación: 0.15	8. Demuestra iniciativa, interés y responsabilidad con la institución.	7	
	9. Demuestra seguridad en si mismo	7	
	10. Posee capacidad de relacionarse apropiadamente con otros dentro de la institución.	7	
	11. Posee un aspecto personal y vestimenta acordes con la actividad que desempeña.	10	
RESPONSABILIDAD Ponderación: 0.15	12. Cumple con puntualidad y asistencia en el horario establecido.	10	
	13. Mantiene un comportamiento adecuado a las normas generales de la institución.	7	
Indicación: La nota promedio obtenida en cada área del desempeño deberá multiplicarse con la ponderación correspondiente y luego sumar.		Nota Total	7.7



Licda. Cindy Rebeca Martínez Linares



F-5 PPS



UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR
FACULTAD DE QUIMICA Y FARMACIA
PRACTICA PROFESIONAL SUPERVISADA



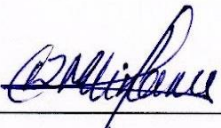
RESULTADO EVALUACION ETAPA II.

EJECUCION DE PRACTICAS PROFESIONALES SUPERVISADAS.

Indicación: este formato deberá ser completado por el Tutor Externo al finalizar la etapa II.

INFORMACION GENERAL			
Nombre del Egresado:	María Roxana Lara Zelaya	N° Grupo	40-22
Nombre Tutor Externo:	Licda. Cindy Rebeca Martínez Linares		

EVALUACION EJECUCION DE PRACTICAS PROFESIONALES SUPERVISADAS. ETAPA II 10%.			
A. EVALUACION TUTOR EXTERNO			
	Aspecto evaluado	Ponderación	Nota obtenida
1	Nota evaluación de bitácora.	5.0%	8.0
2	Nota Evaluación Global del Desempeño.	5.0%	7.7
PROMEDIO TOTAL		10.0%	8.0



 Lic. Cindy Rebeca Martínez



CAPITULO III
PRODUCTO FINAL

A continuación, se presenta la descripción de la metodología propuesta e implementada en formato aprobado por el Laboratorio de Alimentos y Toxicología.

LABORATORIO DE ALIMENTOS Y TOXICOLOGÍA			Página x de y
METODOLOGÍA PARA AISLAMIENTO, DETECCIÓN E IDENTIFICACIÓN DE <i>Listeria monocytogenes</i> MEDIANTE PCR			
Código del documento: Asignado por el laboratorio		Fecha de emisión: Asignado por el Laboratorio	Cambio N°: Asignado por el Laboratorio
Elaborado por: Asignado por el Laboratorio	Revisado por: Asignado por el Laboratorio	Autorizado por: Asignado por el Laboratorio	Versión N°: Asignado por el Laboratorio

1. Propósito:

El propósito de esta metodología de análisis es el aislamiento, detección e identificación de *Listeria monocytogenes*, permitiendo su determinación de Presencia o Ausencia a través de un sistema de detección genética en matrices de alimentos de productos lácteos y cárnicos.

2. Alcance:

Este procedimiento es aplicable a muestras de quesos madurados, procesados, sus mezclas de producto lácteo con aceite o grasa vegetal comestible y similares; productos cárnicos cocidos, incluyendo los curados o ahumados. Ejemplos: embutidos, formados, tocineta, paté, chuleta ahumada, costillas ahumadas, cortes cocidos de aves de corral y caza, vacunos, porcinos, entre otros.

3. Documentos de referencia:

- Alimentos. Criterios microbiológicos para la inocuidad de Los Alimentos RTCA 67.04.50:17

- Manual de usuario, equipo de detección genética, *Listeria monocytogenes* Tq.
- Método modificado, basado en AOAC performance tested method 070702
- Bacteriological Analytical Manual BAM, FDA, CP. 10,8th Edition. Rev March 2017. Detección y enumeración de *Listeria monocytogenes* en alimentos y muestras ambientales.

4. Interferencias y limitaciones:

El equipo de detección genética debe iniciarse dentro de los 20 minutos posteriores a la adición de las muestras a los tubos de amplificación.

El elemento clave de un laboratorio de biología molecular es la separación de las áreas y un flujo de trabajo unidireccional, por esta razón se ejecutará el trabajo en el orden siguiente, y así reducir riesgos de contaminación cruzada de material genético.

Para la manipulación de reactivos, se debe usar guantes estériles y habrá que cambiarlos después de haber trabajado en la cabina de flujo laminar, para evitar contaminación cruzada.

5. Toma y representación de muestra

La toma de muestras es responsabilidad de los inspectores de saneamiento ambiental y estas deben estar en contenedores limpios y sellados. Cuando sean muestras cuyos análisis se utilizarán para registro sanitario, deben estar contenidos en el envase tal cual será comercializado y cumplir con el procedimiento de manipulación ítems de ensayos. Según procedimientos internos del laboratorio.

6. Material y equipo

- Pipeta de separación inmunomagnética
- Puntas para pipeta de separación inmunomagnética
- Mezclador Vortex
- Cinta adhesiva para plato de re-suspensión.
- Pozos de muestra y base de pozos de muestras
- Placa de re-suspensión
- Bloque de enfriamiento de gel
- Micropipeta de 8 canales capaz de dispensar 30 μ L
- Pipeta repetidora
- Puntas de pipetas repetidoras (0.5 mL y 1.0 mL)
- Stomacher o equivalente
- Incubadoras de (30 \pm 1) $^{\circ}$ C y (60-64) $^{\circ}$ C

7. Reactivos y medios de cultivos:

- Caldo de enriquecimiento para *Listeria* (LEB)
- Agar Oxforfd
- Agar Palcam

Cada Kit del sistema de detección genética, *Listeria monocytogenes* contiene lo siguiente:

- Reactivo de concentración de *Listeria*
- Buffer de re-suspensión de *Listeria*
- Solución de lavado
- Tubos de amplificación.

8. Procedimiento:

Procedimiento de Método de prueba de Rendimiento AOAC 070702

Preparación de la muestra

A. Preparación de la Muestra y Pre-Enriquecimiento en Medio Líquido No Selectivo

- a) Agregue 25 g de muestra a 225 mL de medio de cultivo de enriquecimiento apropiado
- b) Protocolo de enriquecimiento de 30 horas: incube las muestras durante 30 a 48 horas a 30°C.

I. Protocolo de Preparación de Muestras.

- Mezclar en vortex el reactivo de concentración y Transferir inmediatamente 20 μ L de reactivo de concentración de muestra a cada uno de los pocillos vacíos del bloque de preparación de muestra (un pocillo por muestra), utilizando una pipeta repetidora y puntas de pipeta de 0.5 mL, cubra los pocillos de muestra con cinta adhesiva.
- Añadir 1.0 mL de muestra incubada en caldo de pre-enriquecimiento a cada pocillo de muestra que contenga reactivo de concentración de la muestra evite transferir partículas de alimentos. Cubra los pocillos de muestras con una nueva cinta adhesiva.
- Colocar los pocillos de muestras sellados que contienen el reactivo de concentración de muestra y la muestra en el mezclador vortex y agite a 900 rpm durante 10 min. Si es necesario ajustar las rpm para asegurar de que el líquido no entre en contacto con la cinta adhesiva.
- Transferir 1.0 mL de solución de lavado a pocillos adicionales en el bloque de lavado (un pocillo por muestra) utilizando una pipeta repetidora, cubra los pocillos con cinta adhesiva.

- Agregar 45 μ L buffer de re-suspensión a los pocillos de muestras en la placa de re-suspensión usando una pipeta repetidora y una punta de 0.5 mL, cubra la placa de re-suspensión preparada con cinta adhesiva. Retirar con precaución la cinta adhesiva.

II. Preparación de la Muestra: Extracción de Material Genético

- Cargar las puntas de la pipeta de separación inmunomagnética asegurando de que esté firmemente en su lugar. Extender los imanes de la pipeta e insertar en la primera tira de pocillos de muestra. Revolver suavemente por 30 segundos mientras se mueve continuamente hacia arriba y hacia abajo desde la superficie hasta el fondo del pocillo. Golpear ligeramente las puntas de la pipeta contra el lateral de los pocillos de muestras para eliminar el exceso de medios.
- Retirar la cinta adhesiva de los pocillos correspondientes a la solución de lavado. Transferir la pipeta de separación inmunomagnética a la solución de lavado. Con las puntas sumergidas, revolver suavemente la pipeta de separación de lado a lado durante 5 a 10 segundos. Golpear ligeramente la pipeta contra el costado de los pocillos de muestra para eliminar el exceso de gotas de solución de lavado.
- Retirar la cinta adhesiva de la placa de re-suspensión. Transferir la pipeta de separación inmunomagnética a la fila correspondiente de la placa de re-suspensión preparada. Con las puntas sumergidas retraer los imanes de la pipeta y golpear suavemente para liberar las partículas en el buffer de re-suspensión.
- Repetir los pasos de a) a c)) para todas las muestras usando puntas nuevas para cada fila de muestras.
- Cubrir la placa de re-suspensión con una nueva cinta adhesiva.

- Coloque la placa de re-suspensión sellada que contiene las muestras en una incubadora a 60 – 64°C durante 15 min – 1 h

III. Amplificación y Detección Genética.

A. Preparación del Bloque de Enfriamiento.

- Antes del uso inicial, el bloque de enfriamiento de gel debe almacenarse en el congelador (-25 a -15 °C) durante 6 horas. Cuando se congela, el bloque de enfriamiento de gel cambiará de rosa a púrpura. Cuando no está en uso, el bloque de congelamiento de gel debe de continuar almacenado entre -25 y -15°C.
- Entre cada uso el bloque de enfriamiento de gel debe devolverse al congelador hasta que se haya girado por completo a morado, lo que indica que está listo para usar. Esto puede tardar hasta 2 horas.

B. Preparación de Tubos de Amplificación.




- La configuración del sistema de detección genética y la entrada de datos en el software del termociclador debe realizarse antes de transferir las muestras de la placa de re-suspensión a los tubos de amplificación.
- Retirar los tubos de amplificación de la bolsa de aluminio y colocarlos en el bloque de enfriamiento de gel congelado.
- Transferir 30 µL de muestra de los pocillos de la placa de re-suspensión a cada tubo de amplificación utilizando una pipeta multicanal y puntas de barrera con filtro. Presionar firmemente hacia abajo la tapa de cada uno de los tubos de amplificación para cerrar. Inspeccionar visualmente cada tubo para asegurar que la tapa esté bien sellada.
- Coloque los tubos de amplificación en el equipo de detección genética en orden secuencial, comenzando con la posición 1.

Nota: El equipo de detección genética debe iniciarse dentro de los 20 minutos posteriores a la adición de las muestras a los tubos de amplificación.

9. Cálculos y lectura de Resultados

Una vez finalizado el ensayo, el software del sistema de detección genética proporcionará todos los resultados. Cada muestra se identificará como positiva, negativa o no amplificada. Se realiza la confirmación de los presuntos resultados positivos mediante la vía tradicional de análisis.

Tabla N°5: Informe de Resultados que proporciona el Sistema de Detección Genética (10)

No.	Color	Name	Result	Description	Kit lot number
1		Sample 1	Positive	<i>L. monocytogenes</i>	1234567
2		Sample 2	Negative	<i>L. monocytogenes</i>	1234567
3		Sample 3	No Amp	<i>L. monocytogenes</i>	1234567

Positivo: Las muestras son positivas para *L. monocytogenes*

Negativo: Las muestras son negativas para *L. monocytogenes*

No Amp: No se produjo amplificación.

10. Informe de Resultados

Se presenta el informe de resultados del ensayo de la implementación de la metodología propuesta de acuerdo con los parámetros verificados según la Política para la Validación y Estimación de la Incertidumbre de Métodos Microbiológicos del Organismo Salvadoreño de Acreditación.

(Ver anexos del 2 al 5 con cálculos complementarios)

TABLA N°8. Informe de Implementación de Metodología para Aislamiento, Detección e Identificación de *Listeria monocytogenes* mediante PCR, Matriz de Lácteo. Elaboración propia

LABORATORIO DE ALIMENTOS Y TOXICOLOGIA PLATAFORMA DE MICROBIOLOGIA						
INFORME DE IMPLEMENTACION DE METODOLOGIA PARA AISLAMIENTO, DETECCION E IDENTIFICACION DE <i>Listeria monocytogenes</i> MEDIANTE PCR						
Fecha 25/01/2023	Elaborado por: María Roxana Lara		Revisado por:		Autorizado por:	
MATRIZ DE LACTEOS						
Parámetro de política de validación	Niveles del Inoculo de Prueba			Muestras blanco	Criterios de Aceptación	Conformidad
	2 ufc/mL	3 ufc/mL	5 ufc/mL			
Verificación del tamaño del inóculo	2 ufc/mL	2 ufc/mL	4 ufc/mL	No aplica	En promedio se deben obtener cuentas de menos de 10 UFC y ninguna de 10 UFC o más.	Conforme
Verificación del límite de detección	66.66%	83.33%	83.33%	No aplica	Resultados positivos: al menos el 80%	Conforme para los niveles 2ufc/mL y 4ufc/mL

TABLA N°8. Informe de Implementación de Metodología para Aislamiento, Detección e Identificación de *Listeria monocytogenes* mediante PCR, Matriz de Lácteo. Elaboración propia. (Continuación)

LABORATORIO DE ALIMENTOS Y TOXICOLOGIA PLATAFORMA DE MICROBIOLOGIA						
INFORME DE IMPLEMENTACION DE METODOLOGIA PARA AISLAMIENTO, DETECCION E IDENTIFICACION DE <i>Listeria monocytogenes</i> MEDIANTE PCR						
Fecha 25/01/2023	Elaborado por: María Roxana Lara		Revisado por:		Autorizado por:	
MATRIZ DE LACTEOS						
Parámetro de política de validación	Niveles del Inoculo de Prueba			Muestras blanco	Criterios de Aceptación	Conformidad
Falsos positivos	0%	0%	0%	No aplica	Resultados positivos verdaderos 100%, falso positivo 0%. Tamaño de inoculo más de 100 UFC	Conforme
Verificación de la muestra	No aplica	No aplica	No aplica	Negativo	0% resultados positivos	Conforme
Conclusiones: En general, los resultados indican que la metodología implementada es conforme con los criterios de aceptación establecidos en la Política para la Validación y Estimación de la Incertidumbre de Métodos Microbiológicos del Organismo Salvadoreño de Acreditación, observándose el límite de detección en el nivel de prueba real de 2 ufc/mL en la matriz de lácteo procesado (queso tipo americano)						

TABLA N°9. Informe de Implementación De Metodología para Aislamiento, Detección e Identificación de *Listeria monocytogenes* mediante PCR, Matriz de Cárnicos. Elaboración propia

LABORATORIO DE ALIMENTOS Y TOXICOLOGIA PLATAFORMA DE MICROBIOLOGIA						
INFORME DE IMPLEMENTACION DE METODOLOGIA PARA AISLAMIENTO, DETECCION E IDENTIFICACION DE <i>Listeria monocytogenes</i> MEDIANTE PCR						
Fecha 25/01/2023	Elaborado por: María Roxana Lara		Revisado por:		Autorizado por:	
MATRIZ DE CARNICOS						
Parámetro de política de validación	Niveles del Inoculo de Prueba			Muestras blanco	Criterios de Aceptación	Conformidad
	2 ufc/mL	3 ufc/mL	5 ufc/mL			
Verificación del tamaño del inóculo	2 ufc/mL	4 ufc/mL	6 ufc/mL	No aplica	En promedio se deben obtener cuentas de menos de 10 UFC y ninguna de 10 UFC o más.	Conforme
Verificación del límite de detección	50.0%	33.33%	83.33%	No aplica	Resultados positivos: al menos el 80%	Conforme para el nivel 5ufc/mL

TABLA N°9. Informe de Implementación De Metodología para Aislamiento, Detección e Identificación de *Listeria monocytogenes* mediante PCR, Matriz de Cárnicos. Elaboración propia. (Continuación)

LABORATORIO DE ALIMENTOS Y TOXICOLOGIA PLATAFORMA DE MICROBIOLOGIA						
INFORME DE IMPLEMENTACION DE METODOLOGIA PARA AISLAMIENTO, DETECCION E IDENTIFICACION DE <i>Listeria monocytogenes</i> MEDIANTE PCR						
Fecha 25/01/2023	Elaborado por: María Roxana Lara		Revisado por:		Autorizado por:	
MATRIZ DE CARNICOS						
Falsos positivos	0%	0%	0%	No aplica	Resultados positivos verdaderos 100%, falso positivo 0%. Tamaño de inculo más de 100 UFC	Conforme
Verificación de la muestra	No aplica	No aplica	No aplica	Negativo	0% resultados positivos	Conforme
Conclusiones: Los resultados indican que la metodología implementada es conforme con los criterios de aceptación establecidos en la Política para la Validación y Estimación de la Incertidumbre de Métodos Microbiológicos del Organismo Salvadoreño de Acreditación observándose el límite de detección en el nivel de prueba real de 6 ufc/mL en la matriz de Cárnicos (muestra de salchicha).						

CAPITULO IV
CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

Respecto a las Prácticas Profesionales supervisadas:

1. La modalidad de graduación de Prácticas Profesionales Supervisadas es una oportunidad para los egresados de adentrarse a ambientes de trabajo, donde es posible aplicar de manera directa el aprendizaje adquirido durante los años de estudio en la carrera y adquirir nuevos conocimientos basados en la experiencia, entendiendo de primera mano los retos a los que se enfrenta el profesional Químico Farmacéutico.
2. Durante el ejercicio del programa de Prácticas Profesionales Supervisadas fue posible conocer directamente nuevas áreas como lo es la biología molecular, específicamente la metodología de detección genética por PCR gracias al desarrollo de esta investigación, generando aptitudes que permiten ampliar el futuro desempeño profesional.

Respecto a la investigación:

3. Se elaboró un documento que describe el procedimiento analítico que permite el aislamiento, detección e identificación de *Listeria monocytogenes* mediante PCR aplicable a matrices de alimentos de lácteos procesados y cárnicos curados.
4. En la verificación del límite de detección se ha logrado obtener una recuperación del 83.33% de resultados positivos de un inóculo de 2 ufc/mL y 6 ufc/mL de *Listeria monocytogenes* en la matriz de lácteos procesados y cárnicos curados respectivamente.

5. En síntesis, el desarrollo e implementación de la metodología propuesta y con base a los resultados de la verificación de los parámetros evaluados se puede afirmar que la metodología es aplicable y funcional, ya que cumple con los criterios de aceptación de la Política de Validación y Estimación de Incertidumbre del Organismo Salvadoreño de Acreditación con la cual fue comparada.

CAPITULO V
RECOMENDACIONES

RECOMENDACIONES

Respecto a las Prácticas Profesionales Supervisadas:

1. A la Facultad de Química y Farmacia de la Universidad de El Salvador continuar en la búsqueda de convenios con instituciones afines a la carrera con el fin de promover espacios donde los egresados puedan realizar su trabajo de grado, así como desarrollar y adquirir nuevos conocimientos.
2. Delimitar los tiempos considerados para la evaluación de cada etapa del proceso con el fin de que la modalidad de Prácticas Profesionales Supervisadas se realice en rangos de tiempo para los que ha sido diseñada.

Respecto a la investigación:

3. El Laboratorio de Alimentos y Toxicología puede evaluar con base a esta investigación, realizar un ensayo de la metodología con mayor número de repeticiones para definir el límite de detección para las matrices de lácteos procesados y cárnicos curados, con el fin de tener datos de mayor robustez que respalden la implementación de esta metodología.

BIBLIOGRAFIA

BIBLIOGRAFIA

1. Portal de Transparencia - El Salvador [Internet]. Gob.sv. [citado el 25 de mayo de 2023]. Disponible en: <https://www.transparencia.gob.sv/institutions/minsal/documents/manuales-basicos-de-organizacion>.
2. OMC.org-Alimentos. Criterios microbiológicos para la inocuidad de Los Alimentos RTCA 67.04.50:17 [citado el 3 de julio de 2022]. Disponible en: https://members.wto.org/crnattachments/2017/SPS/SLV/17_2504_00_s.pdf
3. Granda, F. Listeria monocytogenes: transmisión, formas y tratamientos efectivos. Elsevier [Internet] 2018. [agosto de 2022]. Disponible en: <https://www.elsevier.com/es-es/connect/medicina/listeria-monocytogenes-listeriosis-transmision-tratamiento>
4. Law JW-F, Ab Mutalib NS, Chan KG, Lee LH. Una idea del aislamiento, la enumeración y la detección molecular de Listeria monocytogenes en los alimentos. Frente Microbiol [Internet]. 2015;6:1227. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.3389/fmicb.2015.01227>
5. Center for Veterinary Medicine. Get the facts about Listeria [Internet]. U.S. Food and Drug Administration. FDA; [citado el 21 de junio de 2023]. Disponible en: <https://www.fda.gov/animal-veterinary/animal-health-literacy/get-facts-about-listeria>

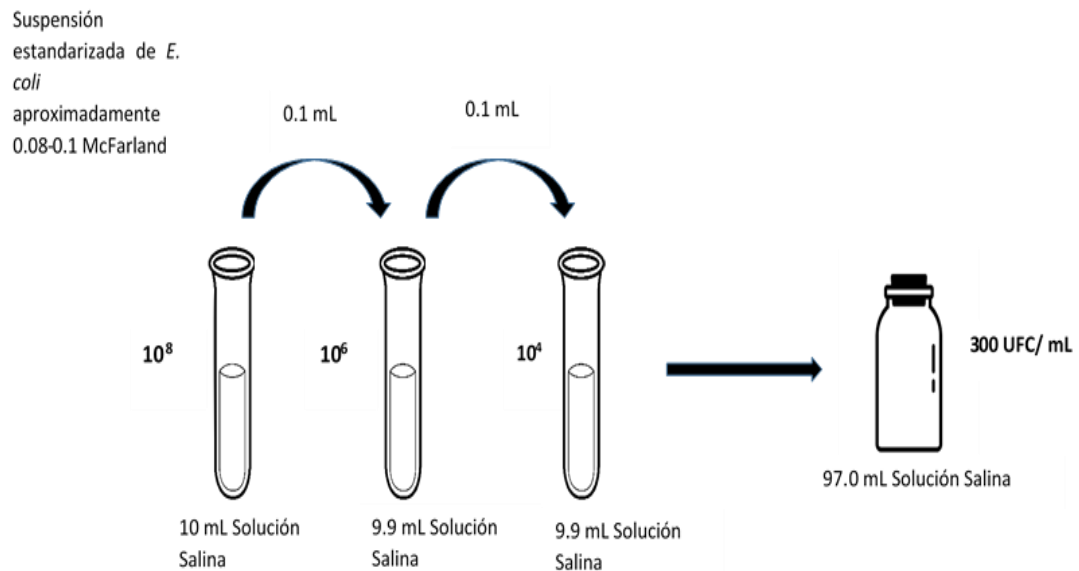
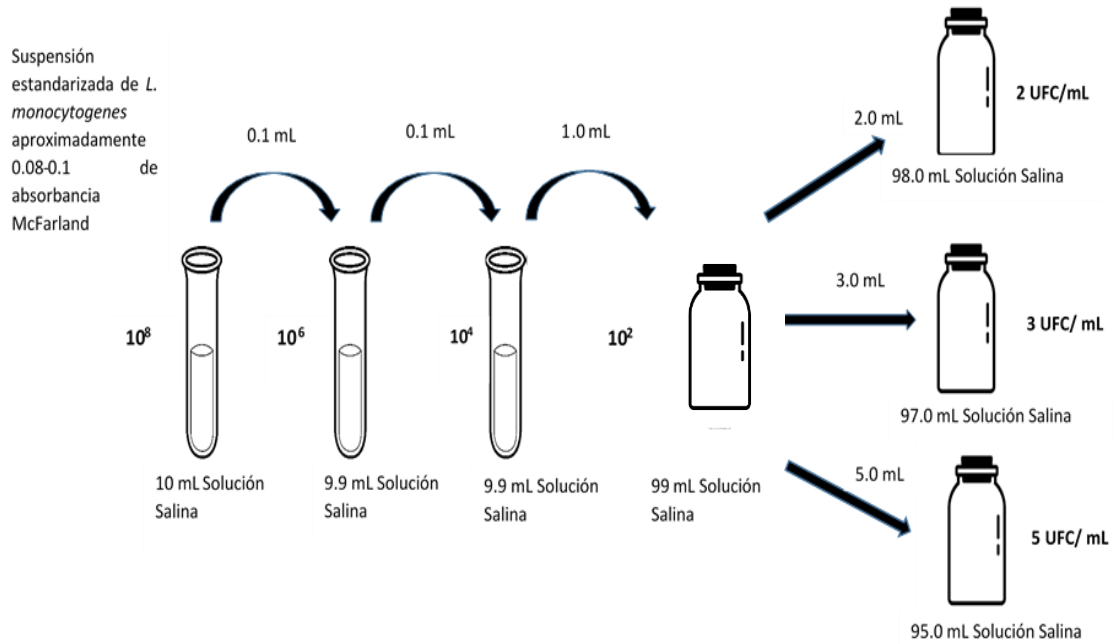
6. BAM Chapter 10: Detection of *Listeria monocytogenes* in Foods and Environmental Samples, and Enumeration of *Listeria monocytogenes* in Foods [Internet]. U.S. Food and Drug Administration. FDA; [citado diciembre de 2022]. Disponible en: <https://www.fda.gov/food/laboratory-methods-food/bam-chapter-10-detection-listeria-monocytogenes-foods-and-environmental-samples-and-enumeration>
7. R&F products [Internet]. Rf-products.net. [citado el 15 de junio de 2023]. Disponible en: <https://www.rf-products.net/listeria-monocytogenes-chromogenic>
8. Palomino-Carmago C, Gonzales-Muñoz Y. Técnicas moleculares para la detección e identificación de patógenos en alimentos: ventajas y limitaciones. [Internet] 2014, [diciembre 2022]. Disponible en http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1726-46342014000300020
9. Jia Y. Real-Time PCR. En: Conn PM, editor. *Methods in Cell Biology*. San Diego, CA, Estados Unidos de América: Elsevier; 2012. p. 55–68.] [citado en julio de 2022]; Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/B978012405914600032>
10. MERCK. Assurance® GDS, *Listeria monocytogenes* Tq [Internet], marzo de 2020; [julio de 2022]. Disponible en: <https://www.sigmaaldrich.com/deepweb/assets/sigmaaldrich/product/documents/474/289/71010bc-dfu-ug6412en-mk.pdf>
11. Biomeriux, Documento técnico para el uso de API *Listeria* y el software APIWEB Y ATB, septiembre de 2019; [enero 2023]

12. Organismo Salvadoreño de Acreditación. PO. 9.4 Política para la Validación y Estimación de la Incertidumbre de Métodos Microbiológicos. [Internet], 2014 [julio de 2022]. Disponible en: <http://www.osa.gob.sv/descarga/po-9-4-politica-para-la-validacion-y-estimacion-de-la-incertidumbre-de-metodos-microbiologicos/>

ANEXOS

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

Elaboración propia



ANEXO N°2. Verificación de tamaño de inóculos, resultados de ensayo para matriz de lácteos. Elaboración propia

Resultados del recuento para la estimación de tamaño del inóculo microorganismo no diana *Escherichia coli*.

COMPROBACION DE TAMAÑO DEL INOCULO <i>Escherichia coli</i>		
Repeticiones	Recuento en APC (UFC/mL)	Promedio (inóculo real en la muestra)
1	282	$\bar{x} = \frac{x_1 + x_2 + \dots + x_n}{n}$ $\bar{x} = \frac{1,686}{6}$ $\bar{x} = 281 \text{ ufc/mL}$
2	284	
3	286	
4	287	
5	284	
6	263	
Total	1,686	

Resultados de recuento para la estimación de tamaño del inóculo de microorganismo diana *Listeria monocytogenes*

COMPROBACION DEL TAMAÑO DEL INOCULO <i>Listeria monocytogenes</i> suspensión madre (100 UFC/mL)		
Repeticiones	Recuento en APC (UFC/mL)	Promedio del recuento
1	71	$\bar{x} = \frac{x_1 + x_2 + \dots + x_n}{n}$ $\bar{x} = \frac{496}{6}$ $\bar{x} = 82.33 \text{ ufc/mL}$
2	83	
3	97	
4	96	
5	72	
6	75	
Total	494	

Cálculo para la verificación del tamaño del inóculo en los niveles de prueba.

VERIFICACIÓN DEL TAMAÑO DEL INOCULO EN LOS NIVELES DE PRUEBA		
Inóculo teórico	Factor de dilución	Inóculo real en la muestra es igual a $\frac{(\text{promedio del recuento de la suspensión madre})(\text{Inóculo teórico})}{\text{factor de dilución}}$
2 ufc/mL	100	Inoculo real = $\frac{(82.33)(2 \text{ ufc/mL})}{100} = 1.65 \approx \mathbf{2 \text{ ufc/mL}}$
3 ufc/mL	100	Inoculo real = $\frac{(82.33)(3 \text{ ufc/mL})}{100} = 2.47 \approx \mathbf{2 \text{ ufc/mL}}$
5 ufc/mL	100	Inoculo real = $\frac{(82.33)(5 \text{ ufc/mL})}{100} = 4.11 \approx \mathbf{4 \text{ ufc/mL}}$

ANEXO N°3. Verificación de tamaño de inóculos, resultados de ensayo para matriz de cárnicos. Elaboración propia

Resultados del recuento para la estimación de tamaño del inóculo de microorganismo no diana *Escherichia coli*.

COMPROBACION DE TAMAÑO DEL INOCULO <i>Escherichia coli</i>		
Repeticiones	Recuento en APC (UFC/mL)	Promedio (inóculo real en la muestra)
1	280	$\bar{x} = \frac{x_1 + x_2 + \dots + x_n}{n}$ $\bar{x} = \frac{1,591}{6}$ $\bar{x} = 265.16 \text{ ufc/mL} \approx \mathbf{265 \text{ ufc/mL}}$
2	252	
3	254	
4	269	
5	277	
6	259	
Total	1,591	

Resultados de recuento para la estimación de tamaño del inóculo de microorganismo diana *Listeria monocytogenes*

COMPROBACION DEL TAMAÑO DEL INOCULO <i>Listeria monocytogenes</i> suspensión madre (100 UFC/mL)		
Repeticiones	Recuento en APC (UFC/mL)	Promedio del recuento
1	123	$\bar{x} = \frac{x_1 + x_2 + \dots + x_n}{n}$ $\bar{x} = \frac{731}{6}$ $\bar{x} = 121.83 \text{ ufc/mL} \approx \mathbf{122 \text{ ufc/mL}}$
2	121	
3	123	
4	120	
5	119	
6	125	
Total	731	

Cálculo para la verificación del tamaño del inóculo en los niveles de prueba.

VERIFICACIÓN DEL TAMAÑO DEL INOCULO EN LOS NIVELES DE PRUEBA		
Inóculo teórico	Factor de dilución	Inóculo real en la muestra es igual a $\frac{(\text{promedio del recuento de la suspensión madre})(\text{Inóculo teórico})}{\text{factor de dilución}}$
2 ufc/mL	100	Inoculo real = $\frac{(122)(2 \text{ ufc/mL})}{100} = 2.44 \approx \mathbf{2 \text{ ufc/mL}}$
3 ufc/mL	100	Inoculo real = $\frac{(122)(3 \text{ ufc/mL})}{100} = 3.66 \approx \mathbf{4 \text{ ufc/mL}}$
5 ufc/mL	100	Inoculo real = $\frac{(122)(5 \text{ ufc/mL})}{100} = 6.1 \approx \mathbf{6 \text{ ufc/mL}}$

ANEXO N°4. Resumen de resultados de implementación de metodología para aislamiento, detección e identificación de *Listeria monocytogenes* mediante PCR. Matriz de lácteos. Elaboración propia

HOJA DE COTEJO DE DATOS CRUDOS PARA DESARROLLO E IMPLEMENTACION DE METODOLOGÍA PARA AISLAMIENTO, DETECCION E IDENTIFICACION DE <i>Listeria monocytogenes</i> MEDIANTE PCR					
Muestra	Peso (g)	Resultados PCR	Lectura de siembra en Agares Oxford y Palcam	Movilidad	Pruebas de Identificación API <i>Listeria</i> ID
Muestras blanco					
BL-1	25.24	Negativo	SC	No aplica	No aplica
BL-2	25.32	Negativo	SC	No aplica	No aplica
Inoculo teórico de 2 UFC/mL					
2A-L	25.26	Positivo	CC	CC	L. m. 98.5% ID
2B-L	25.01	Negativo	SC	No aplica	No aplica
2C-L	25.23	Negativo	SC	No aplica	No aplica
2D-L	25.44	Positivo	CC	CC	L. m. 98.5% ID
2E-L	25.19	Positivo	CC	CC	L. m. 98.5% ID
2F-L	25.15	Negativo	SC	No aplica	No aplica
Inoculo teórico de 3 UFC/mL					
3A-L	25.21	Positivo	CC	CC	L. m. 98.5% ID
3B-L	25.05	Negativo	SC	No aplica	No aplica
3C-L	25.29	Positivo	CC	CC	L. m. 98.5% ID
3D-L	25.27	Positivo	CC	CC	L. m. 98.5% ID
3E-L	25.35	Positivo	SC	CC	L. m. 98.5% ID
3F-L	25.22	Positivo	CC	CC	L. m. 98.5% ID
Inoculo teórico de 5 UFC/mL					
5A-L	25.08	Negativo	CNC	No aplica	No aplica
5B-L	25.04	Positivo	CC	CC	L. m. 98.5% ID
5C-L	25.35	Positivo	CC	CC	L. m. 98.5% ID

Resumen de resultados de implementación de metodología para aislamiento, detección e identificación de *Listeria monocytogenes* mediante PCR. Matriz de lácteos. Elaboración propia. (Continuación)

HOJA DE COTEJO DE DATOS CRUDOS PARA DESARROLLO E IMPLEMENTACION DE METODOLOGÍA PARA AISLAMIENTO, DETECCION E IDENTIFICACION DE <i>Listeria monocytogenes</i> MEDIANTE PCR					
Muestra	Peso (g)	Resultados PCR	Lectura de siembra en Agares Oxford y Palcam	Movilidad	Pruebas de Identificación API <i>Listeria</i> ID
Inoculo teórico de 5 UFC/mL					
5D-L	25.50	Positivo	CC	CC	L. m. 98.5% ID
5E-L	25.36	Positivo	CC	CC	L. m. 98.5% ID
5F-L	25.17	Positivo	CC	CC	L. m. 98.5% ID
Controles					
C. positivo	No aplica	Positivo	CC	CC	L. m. 98.5% ID
C. negativo	No aplica	Negativo	SC	No aplica	No aplica

OBSERVACIONES: Se realizó la muestra blanco por duplicado ya que había sido previamente analizada.

CC: crecimiento característico

SC: sin crecimiento

CNC: crecimiento no característico.

ANEXO N°5. Resumen de resultados de implementación de metodología para aislamiento, detección e identificación de *Listeria monocytogenes* mediante PCR. Matriz de cárnicos. Elaboración propia

HOJA DE COTEJO DE DATOS CRUDOS PARA DESARROLLO E IMPLEMENTACION DE METODOLOGÍA PARA AISLAMIENTO, DETECCION E IDENTIFICACION DE <i>Listeria monocytogenes</i> MEDIANTE PCR					
Muestra	Peso (g)	Resultados PCR	Lectura de siembra en Agares Oxford y Palcam	Movilidad	Pruebas de Identificación API <i>Listeria</i> ID
Muestras blanco					
BC-1	25.46	Negativo	SC	No aplica	No aplica
BC-2	25.06	Negativo	SC	No aplica	No aplica
BC-3	25.27	Negativo	SC	No aplica	No aplica
Inoculo teórico de 2 UFC/mL					
2A-C	25.42	Positivo	CC	CC	L. m. 98.5% ID
2B-C	25.50	Positivo	CC	CC	L. m. 98.5% ID
2C-C	25.02	Negativo	SC	No aplica	No aplica
2D-C	25.26	Negativo	SC	No aplica	No aplica
2E-C	25.26	Positivo	CC	CC	L. m. 98.5% ID
2F-C	25.16	Negativo	SC	No aplica	No aplica
Inoculo teórico de 3 UFC/mL					
3A-C	25.14	Negativo	SC	No aplica	No aplica
3B-C	25.09	Positivo	CC	CC	L. m. 98.5% ID
3C-C	25.42	Negativo	SC	No aplica	No aplica
3D-C	25.14	Negativo	SC	No aplica	No aplica
3E-C	25.18	Negativo	SC	No aplica	No aplica
3F-C	25.17	Positivo	CC	CC	L. m. 98.5% ID
Inoculo teórico de 5 UFC/mL					
5A-C	25.20	Positivo	CC	CC	L. m. 98.5% ID
5B-C	25.12	Negativo	SC	No aplica	No aplica
5C-C	25.04	Positivo	CC	CC	L. m. 98.5% ID

Resumen de resultados de implementación de metodología para aislamiento, detección e identificación de *Listeria monocytogenes* mediante PCR. Matriz de cárnicos. Elaboración propia. (Continuación)

HOJA DE COTEJO DE DATOS CRUDOS PARA DESARROLLO E IMPLEMENTACION DE METODOLOGÍA PARA AISLAMIENTO, DETECCION E IDENTIFICACION DE <i>Listeria monocytogenes</i> MEDIANTE PCR					
Muestra	Peso (g)	Resultados PCR	Lectura de siembra en Agares Oxford y Palcam	Movilidad	Pruebas de Identificación API <i>Listeria</i> ID
Inoculo teórico de 5 UFC/mL					
5D-C	25.21	Positivo	CC	CC	L. m. 98.5% ID
5E-C	25.27	Positivo	CC	CC	L. m. 98.5% ID
5F-C	25.13	Positivo	CC	CC	L. m. 98.5% ID
Controles					
C. positivo	No aplica	Positivo	CC	CC	L. m. 98.5% ID
C. negativo	No aplica	No amplificada	SC	No aplica	No aplica

OBSERVACIONES: Error (humano) de suministro del C. negativo en tubos de amplificación

CC: crecimiento característico

SC: sin crecimiento

CNC: crecimiento no característico.

ANEXO N° 6. Reporte de estandarización de cepa control positivo *Listeria monocytogenes* y control negativo *E. coli*. Ensayo de lácteos

Laboratorio de Alimentos y Toxicología

Plataforma de Microbiología

Analista : Claudia Osorio

Fecha : 01 /11/2022

Estandarización de controles positivos y negativos y estandarización para prueba de Lácteos Procesados para Desarrollo de Metodología de Detección de *Listeria monocytogenes* por GDS con pasante Roxana Lara

Sample Table

	Sample ID	Type	Ex	Conc	WL625.0	Comments
1	Salmonella1	Unknown		*****	0.1581	
2	Salmonella2	Unknown		*****	0.1271	
3	Salmonella3	Unknown		*****	0.1103	
4	Salmonella4	Unknown		*****	0.0935	
5	Salmonella5	Unknown		*****	0.0936	
6	S. aureus1	Unknown		*****	0.1502	
7	S. aureus2	Unknown		*****	0.1152	
8	S.aureus3	Unknown		*****	0.0940	
9	S. aureus4	Unknown		*****	0.0942	
10	S.aureus5	Unknown		*****	0.0942	
11	E. coli1	Unknown		*****	0.1320	
12	E. coli2	Unknown		*****	0.0998	
13	E. coli3	Unknown		*****	0.1000	
14	E. coli4	Unknown		*****	0.1001	
15	E.coli5	Unknown		*****	0.1000	
16	L. monocytogenes1	Unknown		*****	0.1288	
17	L. monocytogenes2	Unknown		*****	0.1087	
18	L. monocytogenes3	Unknown		*****	0.1023	
19	L. monocytogenes4	Unknown		*****	0.1026	
20	L. monocitogenes5	Unknown		*****	0.1026	
21	P. aeruginosa1	Unknown		*****	0.1330	
22	P. aeruginosa2	Unknown		*****	0.1057	
23	P. aeruginosa3	Unknown		*****	0.1036	
24	P. aeruginosa4	Unknown		*****	0.1028	
25	P. aeruginosa5	Unknown		*****	0.1004	
26						

ANEXO N°7 Reporte de estandarización de cepa control positivo *Listeria monocytogenes* y control negativo *E. coli*. Ensayo de cárnicos

LABORATORIO DE ALIMENTOS Y TOXICOLOGIA

Plataforma de Microbiología

Analista: Lic. Claudia Osorio

Fecha: 17/01/2023

Lotes

Sin Salina 0.85% L-100123

TSA L-050123

Estandarización de controles e inoculos de prueba metodo L monocytogenes en carnicos por GDS

Handwritten signature and date 17/01/23

Sample Table

	Sample ID	Type	Ex	Conc	WL625.0	Comments
1	Escherichia coli 1	Unknown		****	0.2729	
2	Escherichia coli 2	Unknown		****	0.1609	
3	Escherichia coli 3	Unknown		****	0.1089	
4	Escherichia coli 4	Unknown		****	0.0850	
5	Escherichia coli 5	Unknown		****	0.0851	
6	St. aureus 1	Unknown		****	0.1324	
7	St. aureus 2	Unknown		****	0.1014	
8	St. aureus 3	Unknown		****	0.1015	
9	St. aureus 4	Unknown		****	0.1016	
10	St. aureus 5	Unknown		****	0.1016	
11	Salmonella typhi 1	Unknown		****	0.2028	
12	Salmonella typhi 2	Unknown		****	0.1223	
13	Salmonella typhi 3	Unknown		****	0.1038	
14	Salmonella typhi 4	Unknown		****	0.1038	
15	Salmonella typhi 5	Unknown		****	0.1039	
16	L monocytogenes 1	Unknown		****	0.1047	
17	L monocytogenes 2	Unknown		****	0.1046	
18	L monocytogenes 3	Unknown		****	0.1046	
19	L monocytogenes 4	Unknown		****	0.1046	
20	L monocytogenes 5	Unknown		****	0.1046	
21	Cronobacter m 1	Unknown		****	0.1150	
22	Cronobacter m 2	Unknown		****	0.0866	
23	Cronobacter m 3	Unknown		****	0.0863	
24	Cronobacter m 4	Unknown		****	0.0862	
25	Cronobacter m 5	Unknown		****	0.0862	
26	P aeruginosa 1	Unknown		****	0.1196	
27	P aeruginosa 2	Unknown		****	0.0829	
28	P aeruginosa 3	Unknown		****	0.0829	
29	P aeruginosa 4	Unknown		****	0.0830	
30	P aeruginosa 5	Unknown		****	0.0831	
31						

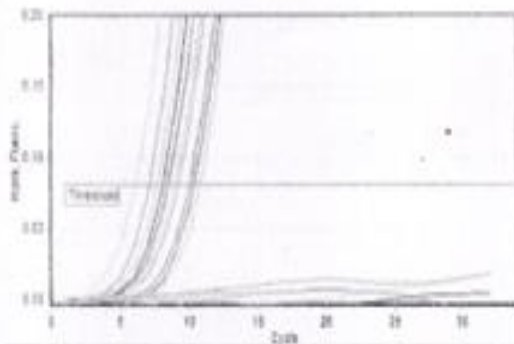
ANEXO N° 8. Reporte de resultados del equipo de detección genética, Lácteos
1/2

Run Information

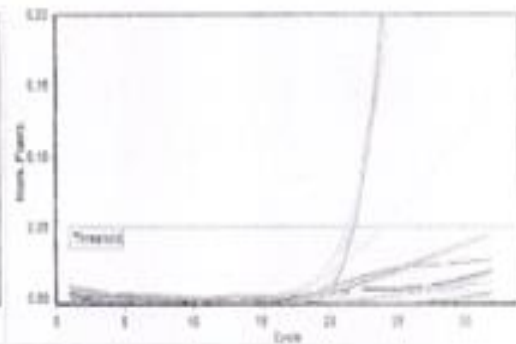
Run Name	BioControl Assay 36 Wells 2022-11-03 LISTERIA-LACTEOS
Run Start	3/11/2022 11:15:18
Run Finish	3/11/2022 12:44:44
Operator	Claudia Osorio/ Roxana Lara
Notes	Prueba de desarrollo metodología para Listeria monocytogenes en matriz Lácteos por técnica PCR.
Run On Software Version	Rotor-Gene Q Software 2.3.103
Run Signature	The Run Signature is valid.
Machine Serial No.	0412519

Assay: Listeria monocytogenes

Listeria monocytogenes



Internal Control



Listeria monocytogenes























Run	Sample Name	Listeria monocytogenes	L. mono. Result	Listeria monocytogenes Ct	Assay	Kit Lot Number	Description

(Continued on next page)...

Reporte de resultados del equipo de detección genética, lácteos 2/2

BioControl Assay 36 Weils 2022-11-03 LISTERIA-LACTEOS.TEX

Page 2 of 2

1		BL-1	Negative	-		Listeria monocytogenes	123120-03
2		BL-2	Negative	-		Listeria monocytogenes	123120-03
3		2A-L	Positive	+	10.35	Listeria monocytogenes	123120-03
4		2B-L	Negative	-		Listeria monocytogenes	123120-03
5		2C-L	Negative	-		Listeria monocytogenes	123120-03
6		2D-L	Positive	+	7.10	Listeria monocytogenes	123120-03
7		2E-L	Positive	+	8.45	Listeria monocytogenes	123120-03
8		2F-L	Negative	-		Listeria monocytogenes	123120-03
9		3A-L	Positive	+	8.49	Listeria monocytogenes	123120-03
10		3B-L	Negative	-		Listeria monocytogenes	123120-03
11		3C-L	Positive	+	8.09	Listeria monocytogenes	123120-03
12		3D-L	Positive	+	9.23	Listeria monocytogenes	123120-03
13		3E-L	Positive	+	7.74	Listeria monocytogenes	123120-03
14		3F-L	Positive	+	7.67	Listeria monocytogenes	123120-03
15		5A-L	Negative	-		Listeria monocytogenes	123120-03
16		5B-L	Positive	+	8.61	Listeria monocytogenes	123120-03
17		5C-L	Positive	+	8.99	Listeria monocytogenes	123120-03
18		5D-L	Positive	+	6.10	Listeria monocytogenes	123120-03
19		5E-L	Positive	+	9.99	Listeria monocytogenes	123120-03
20		5F-L	Positive	+	10.06	Listeria monocytogenes	123120-03
21		CONTROL NEGATIVO	Negative	-		Listeria monocytogenes	123120-03
22		CONTROL POSITIVO	Positive	+	10.79	Listeria monocytogenes	123120-03

ANEXO N°9 Reporte de resultados del equipo de detección genética, cárnicos

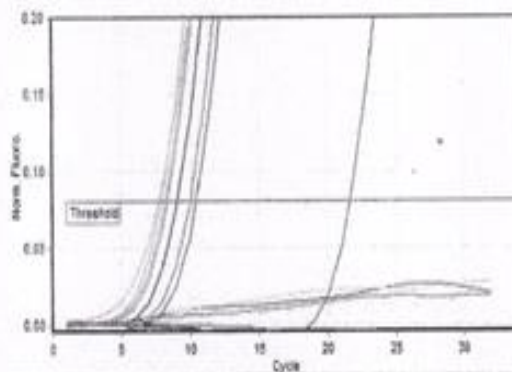
1/2

Run Information

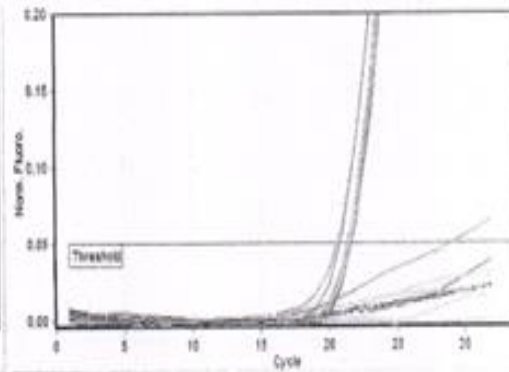
Run Name	BioControl Assay 36 Wells 2023-01-19 PBA CARNICOS LM
Run Start	1/2023 10:54:45
Run Finish	1/2023 12:25:21
Operator	Lic Claudia Osorio/ pasante Roxana Lara
Notes	Prueba de desarrollo metodología para Listeria monocytogenes en matriz cárnica por técnica de PCR
Run On Software Version	Rotor-Gene Q Software 2.3.103
Run Signature	The Run Signature is valid.
Machine Serial No.	0412519

Assay: Listeria monocytogenes

Listeria monocytogenes



Internal Control


























Listeria monocytogenes

No.	C	Name	Listeria monocytogenes	L mono. Result	Listeria monocytogenes Ct	Assay	Kit Lot Number	Description
-----	---	------	------------------------	----------------	---------------------------	-------	----------------	-------------

(Continued on next page)...

Reporte de resultados del equipo de detección genética, cárnicos 2/2

BioControl Assay 36 Wells 2023-01-19 PBA CARNICOS LM.rex

1		BC-1	Negative	-		Listeria monocytogenes	123120-03
2		BC-2	Negative	-		Listeria monocytogenes	123120-03
3		BC-3	Negative	-		Listeria monocytogenes	123120-03
4		2A-C	Positive	+	10.46	Listeria monocytogenes	123120-03
5		2B-C	Positive	+	9.11	Listeria monocytogenes	123120-03
6		2C-2	Negative	-		Listeria monocytogenes	123120-03
7		2D-C	Negative	-		Listeria monocytogenes	123120-03
8		2E-C	Positive	+	8.31	Listeria monocytogenes	123120-03
9		2F-C	Negative	-		Listeria monocytogenes	123120-03
10		3A-C	Negative	-		Listeria monocytogenes	123120-03
11		3B-C	Positive	+	9.08	Listeria monocytogenes	123120-03
12		3C-C	Negative	-		Listeria monocytogenes	123120-03
13		3D-C	Negative	-		Listeria monocytogenes	123120-03
14		3E-C	Negative	-		Listeria monocytogenes	123120-03
15		3F-C	Positive	+	7.91	Listeria monocytogenes	123120-03
16		5A-C	Positive	+	7.77	Listeria monocytogenes	123120-03
17		5B-C	Negative	-		Listeria monocytogenes	123120-03
18		5C-C	Positive	+	8.21	Listeria monocytogenes	123120-03
19		5D-C	Positive	+	7.92	Listeria monocytogenes	123120-03
20		5E-C	Positive	+	21.68	Listeria monocytogenes	123120-03
21		5F-C	Positive	+	8.39	Listeria monocytogenes	123120-03
22		CONTROL NEGATIVO	No Amp	-		Listeria monocytogenes	123120-03
23		CONTROL POSITIVO	Positive	+	10.01	Listeria monocytogenes	123120-03

ANEXO N° 10. Reporte de resultados API *Listeria*, ejemplo

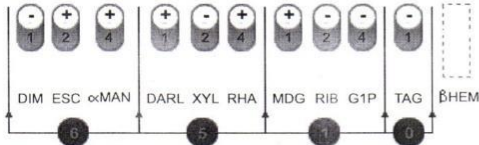
17/1/23, 13:58

apiweb™ - Resultado de identificación

TECNO DIAGNOSTICA - SAN SALVADOR

APIWEB™

API LISTERIA V2.0



REFERENCIA
2E-L

FECHA
11/11/2022

COMENTARIO

AISLADO DE COLONIAS VERDES CON CENTRO HUNDIDO Y HALO NEGRO EN AGAR OXFORD Y PALCAM

BUENA IDENTIFICACION	
Galería	API LISTERIA V2.0
Perfil	6 5 1 0
Nota	PATÓGENO CRÍTICO

Taxón significativo	% ID	T	Pruebas en contra
Listeria monocytogenes	98.5	1.0	

Taxón siguiente	% ID	T	Pruebas en contra
Listeria innocua	1.3	0.58	DIM 99%

REF: 2E-L | 2.0.2.2 / 1.1 / 1.1

Origine / Source / Herkunft /
 Origen / Origen / Προέλευση
 Ursprung / Oprindelse / Pochodzenie: Muestra de Lacteos para desarrollo de metodologias L. monocytogenes en PCR

BIOMERIEUX

Autres tests / Other tests / Andere Tests /
 Otras pruebas / Altri test / Outros testes /
 Άλλες εξετάσεις / Άλλα tester /
 Andre tests / Inne testy: Catalasa positiva -

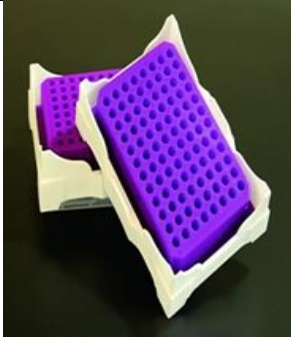
Ident. / Ταυτοποίηση
98.5% Listeria monocytogenes

Anexo N°11. Ilustración de material usado en la metodología para aislamiento, detección e identificación de listeria monocytogenes mediante PCR en matrices de alimentos de productos lácteos y cárnicos.

Ilustración	Material y funciones
	<p>Pozos de muestra y base de pozos de muestras:</p> <ul style="list-style-type: none"> - Para la concentración de la muestra - Para el buffer de lavado de muestra
	<p>Placa de re-suspensión de la muestra</p>
	<p>Pipeta de separación inmunomagnética</p>



Mezclador Vortex para la base de de
pozos de muestra



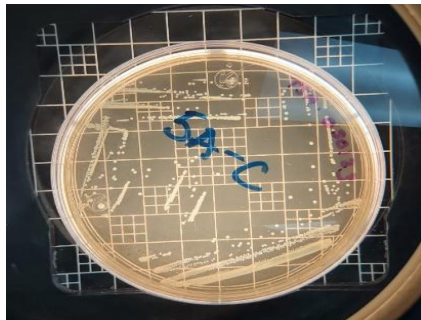
Bloque de enfriamiento de gel, donde
se colocan los tubos de amplificación
con la enzima polimerasa liofilizada



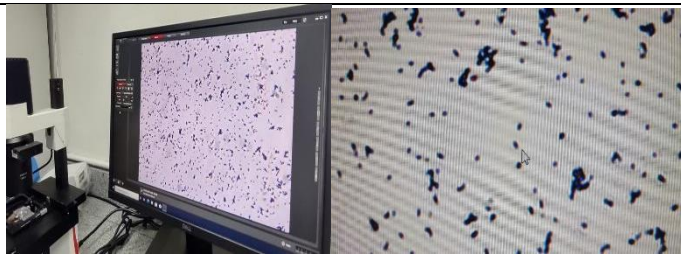
Carrusel del termociclador (equipo de
detección genética)

ANEXO N°12 Implementación y verificación de la metodología para aislamiento, detección e identificación de listeria monocytogenes mediante PCR en matrices de alimentos de productos lácteos y cárnicos

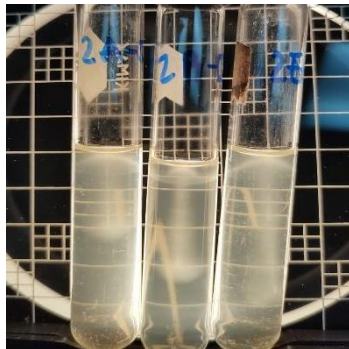
 A photograph showing a grid of 12 petri dishes arranged in 4 rows and 3 columns. Each dish contains a white agar medium with visible bacterial growth, appearing as small, dark, circular colonies. Some dishes have handwritten blue markings on their lids.	<p>VERIFICACIÓN DEL TAMAÑO DEL INÓCULO</p>
 A photograph of a person wearing a blue lab coat, a hairnet, and gloves, working in a biosafety cabinet. The person is using a pipette to transfer liquid into small containers. The cabinet has a glass front and a metal surface.	<p>EXTRACCIÓN DEL MATERIAL GENÉTICO</p>
 A photograph showing a tray of 18 petri dishes arranged in 3 rows and 6 columns. The dishes contain agar with various colors, including yellow, orange, red, and black. Some dishes have handwritten labels in blue ink.	<p>PASES DEL CALDO DE ENRIQUECIMINETO A AGAR OXFORD Y PALCAM</p>



PURIFICACIÓN DE LA COLONIA EN AGAR TSA



TINCIÓN DE GRAM



PRUEBA DE MOVILIDAD



API LISTERIA
(Pruebas bioquímica
miniaturizadas)