




aoxlab	Procedimiento para la detección molecular de <i>Listeria monocytogenes</i> AOXLAB S.A.S	Identificación: PROC-TC-119
		Revisión: 2
		Inicio de vigencia: 2025-10-13

Procedimiento para la detección molecular de *Listeria monocytogenes*

AOXLAB S.A.S


	Procedimiento para la detección molecular de <i>Listeria monocytogenes</i> AOXLAB S.A.S	Identificación: PROC-TC-119
		Revisión: 2
		Inicio de vigencia: 2025-10-13

Copia controlada No. :1

	Nombre	Puesto o función	Firma	Fecha
Elaboró:	Yeris Mercedes Rinaldy Mojica	Líder microbiología		2025-10-13
Revisó:	Yesica Lorena Correa Restrepo	Coordinadora Operativa		2025-10-13
Aprobó:	Jonatan Zarate	Director técnico		2025-10-13
Localización del documento:		Plataforma SGC		


Control de Cambios

Estado	Fecha de Inicio de vigencia	Revisión	Descripción del cambio realizado	Realizó	Revisó	Aprobó
Obsoleto	2024-05-09	1	Ninguno (versión original).	YMRM	YLCR	LSGF
Vigente	2025-10-13	2	Se incorporan los pasos para el análisis y reporte de resultados de superficies muestreadas con esponjas rehidratadas en los numerales 4.6.5 y 4.7 del procedimiento. Se modifican las condiciones ambientales del área de ensayo.	YMRM	APPP	DPP

	Procedimiento para la detección molecular de <i>Listeria monocytogenes</i> AOXLAB S.A.S	Identificación: PROC-TC-119
		Revisión: 2
		Inicio de vigencia: 2025-10-13

Contenido

1.	OBJETIVO Y ALCANCE.....	4
1.1	OBJETIVO	4
1.2	Alcance.....	4
2.	DEFINICIONES Y NOTACIONES.....	4
2.1	Definiciones	4
2.2	Notaciones	5
3.	REFERENCIAS	5
4.	DESARROLLO	6
4.1	Actividades previas.....	6
4.1.1	Inspección de la muestra	6
4.1.2	Estabilización	6
4.1.3	Verificación de equipos y áreas de ensayo	7
4.1.6	Medidas de seguridad	8
4.2	Patrones y equipos de medición.....	8
4.3	Materiales y consumibles	9
4.4	Reactivos y/o soluciones	9
4.5	INSTRUCCIONES DE ENSAYO.....	10
4.5.1	Preparación de soluciones.....	10
4.5.2	Preparación de Solución de cloro 1-5 %	10
4.5.3	Pre - enriquecimiento en medio líquido	11
4.5.4	Proceso de lisis y amplificación:	15
4.5.4.1	Organización de flujo de trabajo:	15
4.5.4.2	Pasos durante el proceso de lisis y amplificación de ADN.....	15
4.5.4.3	Apéndice:.....	17
4.5.4.4	Descarte de puntas y reactivos usados en el proceso	17
4.5.4.5	Confirmación de muestras con resultado positivo	18
4.6	INFORME	19
4.7	Aseguramiento de la calidad.....	19
5	RESPONSABILIDADES	19
6	FORMATOS RELACIONADOS.....	20
7	ANEXOS	20

	Procedimiento para la detección molecular de <i>Listeria monocytogenes</i> AOXLAB S.A.S	Identificación: PROC-TC-119
		Revisión: 2
		Inicio de vigencia: 2025-10-13

1. OBJETIVO Y ALCANCE

1.1 OBJETIVO

Determinar la presencia de *Listeria monocytogenes* mediante ampliación isotérmica de ADN (Detección molecular)

1.2 Alcance

Prueba o ensayo	Norma o método de referencia	Técnica o Método
Determinar la presencia/ausencia de <i>Listeria monocytogenes</i>	AOAC 2016.08 22nd Ed. 2023 [6]	Amplificación isotérmica de DNA (Detección molecular)

Este método se aplica en muestras enriquecidas ambientales y de alimentos.

2. DEFINICIONES Y NOTACIONES

2.1 Definiciones


***Listeria monocytogenes* [1]:** es un bacilo corto Gram-positivo, móvil, mesófilo y/o psicrófilo, aerobio o anaerobio facultativo que forma colonias típicas en medios solidos selectivos y que presenta las características morfológicas y biológicas descritas cuando se llevan a cabo los ensayos de la norma ISO 11290-1.

Detección de *Listeria monocytogenes* [1]: determinación de la presencia o ausencia de este microorganismo en un cantidad, peso o volumen, dado de un producto, cuando se realizan los ensayos de la norma ISO 11290.

Molecular Detection System (MDS): El Sistema 3M™ de Detección Molecular, basado en una innovadora combinación de tecnologías, la amplificación isotérmica de ácidos nucleicos (ADN) y detección por bioluminiscencia, para proporcionar una solución rápida, precisa y fácil de usar.

Análisis microbiológico [2]: Procedimiento que se sigue para determinar la presencia, identificación, y cantidad de microorganismos patógenos e indicadores de contaminación en una muestra.

Límites microbiológicos [2]: Son los valores permisibles de microorganismos presentes en una muestra, que indican la aceptabilidad higiénico-sanitaria de una superficie.

	Procedimiento para la detección molecular de <i>Listeria monocytogenes</i> AOXLAB S.A.S	Identificación: PROC-TC-119
		Revisión: 2
		Inicio de vigencia: 2025-10-13

Incubadora [2]: cámara aislada que permite que la temperatura se mantenga estable y uniformemente distribuida dentro del rango de error de temperatura máximo permisible especificado en el método de ensayo.

Calibración [2]: Proceso de comparar los valores obtenidos por un instrumento de medición con la medida correspondiente de un patrón de referencia (o estándar).

2.2 Notaciones

Para propósitos de este documento, se hacen las siguientes consideraciones:


“Laboratorio”: se refiere al laboratorio AOXLAB S.A.S.

“Informe de resultados”: se refiere a los informes de ensayo que emite el Laboratorio.

“Servicios”: para referir a los servicios de ensayo que el Laboratorio ofrece.

3. REFERENCIAS

- [1] NORMA TECNICA COLOMBIANA - NTC 4666 /Microbiología de alimentos y alimentos para animales. método horizontal para la detección de *Listeria monocytogenes*. PARTE 1. METODO DE DETECCION.
- [2] Vocabulario internacional de metrología: conceptos fundamentales y generales, y términos asociados (VIM). 1er edición en español, 2008.
- [3] ISO 11133:2014/ Adm 1:2018. Microbiology of food, animal feed and water. Preparation, production, storage and performance testing of culture media.
- [4] ISO 11290-1:2017 Standard. Microbiology of the food chain. Horizontal method for the detection and enumeration of *Listeria monocytogenes* and for *Listeria* spp.- Part 1: Detection Method
- [5] ISO 11290-2:2017 Standard. Microbiology of the food chain. Horizontal method for the detection and enumeration of *Listeria monocytogenes* and for *Listeria* spp.- Part 2: Enumeration Method.
- [6] AOAC Official Method 2016.08 *Listeria monocytogenes*. in Select Foods and Environmental Surfaces 3M™ Molecular Detection Assay (MDA) 2 – *Listeria monocytogenes* Method

	Procedimiento para la detección molecular de <i>Listeria monocytogenes</i> AOXLAB S.A.S	Identificación: PROC-TC-119
		Revisión: 2
		Inicio de vigencia: 2025-10-13

4. DESARROLLO

4.1 Actividades previas

4.1.1 Inspección de la muestra

Al recibirse la muestra en el Laboratorio, éste es inspeccionado a fin de asegurar que se garantizan las condiciones conforme lo indicado en el procedimiento PROC-TC-008 "Procedimiento de aseguramiento de integridad de los ítems bajo servicio".

Antes de iniciar el análisis, se debe verificar que la muestra se encuentra empacada y sellada adecuadamente y etiquetada con el sticker de identificación interna del laboratorio. Que las muestras que requieran refrigeración se entreguen en neveras con pilas de hielo. Se debe contar con al menos 50 gramos de muestra para realizar este análisis, para el caso de cannabis puede ser de 5 a 10 g en el caso de material vegetal y de 1 a 2 gramos para cristales y extractos.

En caso de que la muestra no presente alguna de estas condiciones, notificar de inmediato al del Líder de laboratorio para informar al área comercial y se le indique al cliente.

4.1.2 Estabilización

Una vez revisada la muestra, se aplican las siguientes instrucciones:


Los patrones y equipos de referencia del laboratorio a intervenir en el ensayo como son las balanzas se mantienen en el lugar de ensayo encendidas, antes de realizar las mediciones, a fin de lograr su operación óptima o estabilización térmica. Las muestras que están en congelación deben retirarse del congelador y atemperarse hasta que adquieran un estado adecuado para realizar la toma de la porción analítica. Los ítems que no requieren refrigeración se mantienen en el lugar de ensayo para que tengan una estabilidad térmica. Las soluciones usadas para el ensayo deben atemperarse por 1 hora o colocarlas entre 15 y 20 minutos en la incubadora a 37 °C.

Para los kits de ensayo se debe realizar la estabilización térmica de acuerdo con las siguientes instrucciones:

1. De 20 a 25 °C de 16 a 18 horas (Mínimo 2 horas)
2. Colocarlos dentro de la incubadora a 37 °C por una hora
3. Colocarlos dentro del bloque de calentamiento a 100 °C por 30 segundos

Se deben invertir los tubos durante 3 veces para lograr hidratación de las paredes y re suspender todos los ingredientes de los reactivos de lisis

Debe verificarse que las condiciones ambientales del lugar de ensayo se encuentren en los intervalos que se muestran a continuación:

	Procedimiento para la detección molecular de <i>Listeria monocytogenes</i> AOXLAB S.A.S	Identificación: PROC-TC-119
		Revisión: 2
		Inicio de vigencia: 2025-10-13

Condición ambiental	Mínima	Máxima	Observación
Temperatura ambiente	15,00	25,00	Condiciones establecidas por el laboratorio
Humedad relativa	30,00	80,00	Condiciones establecidas por el laboratorio

Estas condiciones son monitoreadas y registradas automáticamente por el software 3sense del laboratorio y en caso de que se encuentren fuera de estos rangos deben suspenderse los análisis.

4.1.3 Verificación de equipos y áreas de ensayo

A fin de confirmar que los equipos a utilizar en el ensayo se encuentran en condiciones adecuadas para realizar el servicio, se inspecciona que se haya realizado la verificación diaria de los equipos de pesaje como la balanza gramera y el diluctor gravimétrico, de acuerdo con el procedimiento PROC-TC-005, se debe garantizar la desinfección de la cabina y que haya permanecido al menos 60 minutos con luz-UV encendida, se debe garantizar que antes de cada ensayo se realice una adecuada limpieza y desinfección de mesones e implementos a utilizar, además haber realizado una aspersion en los ambientes de acuerdo al PROC-TC-031.


4.1.4 Manejo de la muestra

Para la identificación, manejo, transporte, almacenamiento y descarte de la muestra, se siguen las instrucciones dadas en el procedimiento PROC-TC-008 Procedimiento de aseguramiento de integridad de las muestras bajo servicio.

Al tomar de la porción de análisis, la muestra debe estar a temperatura ambiente y correctamente homogenizada a excepción de las muestras que requieran almacenarse en refrigeración.

4.1.5 Almacenamiento y vida útil del kit de ensayo de *Listeria monocytogenes*

Almacene los kits ensayo de detección Molecular 2 para *Listeria monocytogenes* 3M entre 2 °C y 8 °C. No lo congele. Durante el almacenamiento, mantenga el kit fuera del alcance de la luz. Después de abrir el kit, verifique que la bolsa de aluminio no esté dañada. Si la bolsa está dañada, no use el producto. Después de abrir el embalaje, los tubos de reactivo no utilizados se deberán guardar siempre en la bolsa resellable junto con el desecante para conservar la estabilidad de los reactivos liofilizados. Almacene las bolsas cerradas a una temperatura entre 2 °C y 8 °C durante 60 días como máximo o verificar si después de este tiempo los reactivos todavía se encuentren en las condiciones adecuadas.

	Procedimiento para la detección molecular de <i>Listeria monocytogenes</i> AOXLAB S.A.S	Identificación: PROC-TC-119
		Revisión: 2
		Inicio de vigencia: 2025-10-13

No utilice el Ensayo de Detección Molecular 2 para *Listeria monocytogenes* 3M después de su fecha de vencimiento. La fecha de vencimiento y el número de lote están impresos en la etiqueta externa de la caja. Después de usarlos, el medio de enriquecimiento y los tubos del Ensayo de Detección Molecular 2 para *Listeria monocytogenes* 3M podrían contener materiales patógenos. Una vez terminada la prueba, proceda de acuerdo con los estándares actuales de la industria para el desecho de residuos contaminados. Consulte la Hoja de Datos de Seguridad para obtener más información y conocer las normativas locales para el desecho de materiales.

4.1.6 Medidas de seguridad

Se deben seguir las siguientes medidas de seguridad antes y durante la realización del servicio: Verificar que el sticker de calibración y mantenimiento del equipo se encuentre vigente (ubicados en el módulo 1 del laboratorio) y no requiere alguna intervención. Verificar que todos los reactivos preparados en el laboratorio al momento de realizar el ensayo o los que se encontraban almacenados se encuentren identificados conforme al formato FOR-TC-024 "Formato para rotular reactivos elaborados en el laboratorio" y garantizar que ninguno se encuentre vencido. En caso de que se encuentre alguna anomalía al respecto, avisar a la Dirección Técnica a través del Líder de Laboratorio.


Durante el análisis tener en cuenta que se debe seguir el procedimiento aquí descrito sin modificar ningún parámetro.

Tener en cuenta las instrucciones dadas en el reglamento interno de trabajo PROC-GC-015 Reglamento Interno AOXLAB S.A.S, capítulo XV.

4.2 Patrones y equipos de medición

Para realizar el ensayo se utilizan los siguientes equipos y componentes clave:

- Balanza gramera con resolución de 0.01 g
- Vortex
- Transfer pipeta de 1000 µl
- Pipeta multicanal 20-50 µl
- Transfer pipeta de 100 µl
- Baño de agua a 45 °C
- Cabina de bioseguridad
- Incubadora a 37° ± 1°C
- Equipo MDS
- Bloque de calentamiento 100 °C ± 1 °C
- Bloque de enfriamiento (temperatura ambiente 18-25 °C)
- Homogenizador de muestras (Stomacher)
- Dilucult con resolución de 0.01 g (Equipo de pesaje y dilución de muestras)
- Nevera almacenamiento de medios entre 0-8 °C
- Computador

	Procedimiento para la detección molecular de <i>Listeria monocytogenes</i> AOXLAB S.A.S	Identificación: PROC-TC-119
		Revisión: 2
		Inicio de vigencia: 2025-10-13

- Termómetro de inmersión parcial 100 °C ± 1 °C
- Cronómetro

4.3 Materiales y consumibles

- Puntas para transfer pipeta de 1000 µL
- Puntas con filtro para transfer pipeta de 100 µL
- Bolsas whirl pak estériles 24 onzas
- Clic de ajuste para bolsas stomacher
- Gradillas
- Cajas de Petri plásticas estériles de 90 a 100 mm
- Asa y/o rastrillo microbiológico
- Probeta de 250 ml previamente esterilizada
- Herramientas encapuchado/desencapuchado
- Guantes de látex sin talco
- Aspersion


El material reutilizable debe haber sido previamente lavado, secado y esterilizado (Ver PROC-TC 026-027)

4.4 Reactivos y/o soluciones

- Caldo Demi Fraser contiene citrato de amonio férrico
- Caldo Fraser media concentración que contiene citrato de amonio férrico
- Suplemento para Caldo Fraser: (Ingredientes por vial de 10 ml. Se agrega un vial a un litro de medio basal) que contiene Citrato de amonio férrico 0,5 g/10 ml
- Agar selectivo para *Listeria monocytogenes* (Agar cromogénico Listeria ALOA).
- Kit de detección molecular de *Listeria monocytogenes* 2
- Solución de Hipoclorito de sodio 1-5 %
- Tirilla oxidasa bactident
- Peróxido de hidrogeno
- Placas preparadas de agar sangre de cordero

CONTROLES REQUERIDOS

- Control negativo (CN): se usa para evaluar contaminación de los reactivos. Se debe realizar con medio de enriquecimiento estéril, p. ej., el Caldo Demi-Fraser o Caldo Fraser, nunca usar agua sola. Mezcla de detección y amplificación específica, no contiene ADN molde.
- Control de reactivos (RC): se usa para garantizar que el kit funciona correctamente, es una mezcla de detección y amplificación específica de un fragmento de ADN molde que se amplifica durante la reacción. No es ADN del patógeno.
- Control de matriz (MC): Se usa para verificar si existe o no inhibición de la reacción, se realiza cada vez que se vaya a correr una matriz nueva.

	Procedimiento para la detección molecular de <i>Listeria monocytogenes</i> AOXLAB S.A.S	Identificación: PROC-TC-119
		Revisión: 2
		Inicio de vigencia: 2025-10-13

4.5 INSTRUCCIONES DE ENSAYO

4.5.1 Preparación de soluciones

Tabla 1. Soluciones utilizadas en el ensayo

Solución	Cantidad reactivo	Cantidad diluyente (Agua destilada)	Observaciones
Caldo Demi-Fraser	Según especificaciones de casa comercial	Según especificaciones de casa comercial	Preparar 1000 mL y se adiciona asépticamente 1 vial de suplemento de citrato férrico de amonio (1 vial de 10 mL).
Caldo Fraser media concentración	Según especificaciones de casa comercial	Según especificaciones de casa comercial	Preparar 1000 mL y se adiciona asépticamente 1 vial de suplemento de citrato férrico de amonio (1 vial de 10 mL).
Agar cromogénico para <i>Listeria</i> (ALOA) CHROMagar™	Según especificaciones de casa comercial	Según especificaciones de casa comercial	Preparar 15 a 20 ml por cada caja de Petri.
Agar de identificación de <i>Listeria</i> CHROMagar™	Según especificaciones de casa comercial	Según especificaciones de casa comercial	Preparar 10 a 15 ml por cada placa de 55 mm
Caldo Lethen	Según especificaciones de casa comercial	Según especificaciones de casa comercial	Preparar tubos de 10 o 20 mL

El registro de la preparación de estas soluciones se diligencia en el FOR-TC 045

4.5.2 Preparación de Solución de cloro 1-5 %

Se prepara de acuerdo con la siguiente formula


$$V = \frac{Cd \times Vd}{Cc}$$

Donde: Cd= concentración deseada

Vd= volumen deseado

Cc= concentración conocida

$$V = \frac{3 \% \times 500 \text{ mL}}{15 \%}$$

	Procedimiento para la detección molecular de <i>Listeria monocytogenes</i> AOXLAB S.A.S	Identificación: PROC-TC-119
		Revisión: 2
		Inicio de vigencia: 2025-10-13

$$V = 100 \text{ mL}$$

$$500 \text{ mL} - 100 \text{ mL} = 400 \text{ mL agua}$$

Solución de hipoclorito al 3% = 400 mL agua + 100 mL de cloro al 15%

NOTA: La solución de hipoclorito se debe preparar cada vez que se realice el proceso de detección molecular, se almacena máximo por 24 horas.

- Control positivo: Suspensión bacteriana de *Listeria monocytogenes* ATCC 19115 de aproximadamente 20- 80 UFC
- Control negativo: Suspensión bacteriana de *Escherichia coli* ATCC 25922 de aproximadamente 20-80 UFC


Preparadas según “procedimiento para la preparación de suspensiones microbianas” PROCT-TC-207

4.5.3 Pre - enriquecimiento en medio líquido

- Permita que el medio de enriquecimiento (Caldo Demi-Fraser o Caldo Fraser media concentración , enriquecidas con Citrato férrico de amonio) alcance un equilibrio en la temperatura ambiente del laboratorio o a $41,5 \pm 1$ °C según la matriz analizada. Consulte las Tablas 2 o 3.

Para el pesaje y dilución de muestras se puede realizar usando la balanza o el dilucult (ver PROC-TC-199)

- Pesar asépticamente (prendiendo un mechero al lado de la balanza) en una bolsa whirl pak 25 ± 5 % gramos o mililitros del producto a analizar, añadir 225 ml de medio de enriquecimiento mencionados anteriormente para obtener una solución 1:10. Llevar al stomacher por 1 minuto e incubar a $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ durante 18 a 24 horas.
- Reportar los pesos en el FOR-TC-075 “Formato datos primarios de resultados de análisis Microbiológicos”.
- Recomendaciones en el pesaje de muestras:
 - a. Para todas las muestras con alto contenido de partículas y carne, se recomienda utilizar bolsas con filtro.
 - b. Si es necesario (ver Tablas 2, 3 o 4), transfiera 0,1 ml del enriquecimiento primario en 10 ml de Caldo Fraser. Incube a 37 ± 1 °C durante 20 a 24 horas.

	Procedimiento para la detección molecular de <i>Listeria monocytogenes</i> AOXLAB S.A.S	Identificación: PROC-TC-119
		Revisión: 2
		Inicio de vigencia: 2025-10-13


- Incube como se indica en la tabla del protocolo correspondiente (consulte las tablas 2 y 3) además revisar el PROC-TC-199.

Muestras ambientales

Los dispositivos de recolección de muestras pueden ser esponjas hidratadas con una solución neutralizante para desactivar los efectos de los desinfectantes. 3M recomienda el uso de una esponja de celulosa libre de biocidas. La solución neutralizante puede ser el caldo neutralizante Dey-Engley (D/E) o el caldo Letheen con un volumen de 10 a 20 mL. La etapa de enriquecimiento se lleva a cabo adicionando 100 mL de Half Fraser o Demi Fraser y se incuba a $37 \pm 1^\circ\text{C}$ de 18 a 24 horas.

Si se usan tubos con hisopos, se transfiere el contenido y la punta del hisopo a una bolsa Whirl-Pak® con 100 mL de caldo Half Fraser o Demi Fraser, siguiendo la misma incubación. Se recomienda desinfectar el área después de la toma.

Tabla 2. Protocolos generales de enriquecimiento mediante enriquecimiento con Caldo Demi-Fraser y Caldo Frases a $37 \pm 1^\circ\text{C}$ según sea necesario.

	Procedimiento para la detección molecular de <i>Listeria monocytogenes</i> AOXLAB S.A.S	Identificación: PROC-TC-119
		Revisión: 2
		Inicio de vigencia: 2025-10-13

Matriz de la muestra	Tamaño de la muestra	Volumen del caldo de enriquecimiento (ml)	Tiempo de enriquecimiento (h)		
Carnes, aves, mariscos y pescados procesados con calor, cocidos, curados Productos lácteos procesados con calor/pasteurizados Productos agrícolas y vegetales Alimentos con múltiples componentes	25 g	225	24 a 30		
Muestras ambientales ^(a)	1 esponja	100 o 225	24 a 30		
	1 hisopo	10	24 a 30		
Carnes, aves, mariscos y pescados crudos	25 g	475	28 a 32		
Matriz de la muestra	Enriquecimiento primario (Caldo Demi-Fraser)			Enriquecimiento secundario (Caldo Fraser)	Volumen de análisis de la muestra ^(a)
	Tamaño de la muestra	Volumen del caldo de enriquecimiento (ml)	Tiempo de enriquecimiento (h)	Tamaño de la muestra Tiempo de enriquecimiento (h)	
Productos lácteos crudos	25 g	225	20 a 24	Transfiera 0,1 ml a 10 ml de Caldo Fraser 20 a 24	10 µl

(a) Volumen de la muestra transferida a los tubos de solución de Lisis. Consulte el paso 4.6 de la sección Lisis.


	Procedimiento para la detección molecular de <i>Listeria monocytogenes</i> AOXLAB S.A.S	Identificación: PROC-TC-119
		Revisión: 2
		Inicio de vigencia: 2025-10-13

Tabla 3. Para los protocolos de enriquecimiento según AOAC 2016.08 y el certificado Performance TestedSM n.º081501.


Matriz de la muestra	Tamaño de la muestra	Volumen del caldo de enriquecimiento (ml)	Tiempo de enriquecimiento (h)	
Salchichas de res, queso fresco, helado de vainilla, queso cottage con leche con un 4 % de grasa, leche entera con 3 % de chocolate, lechuga romana, espinaca cruda en bolsas, salmón ahumado frío	25 g	225	24 a 30	
Pollo crudo	25 g	475	28 a 32	
Pavo estilo deli	125 g	1125	24 a 30	
Melón	Melón entero	Volumen suficiente para que el melón flote	26 a 30	
Muestras ambientales:	Acero inoxidable	1 esponja	225	24 a 30
	Concreto sellado	1 esponja	100	24 a 30
	Plástico	1 hisopo	10	24 a 30

Validación NF con Certificación AFNOR

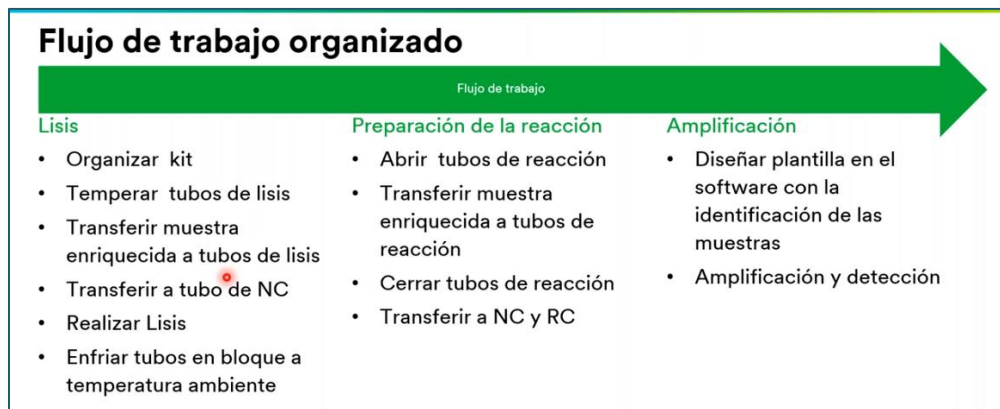
Tabla 4. Protocolos de enriquecimiento según el método certificado de VALIDACIÓN NF 3M 01/15-09/16

Protocolo general	Tamaño de la muestra	Volumen del caldo de enriquecimiento (ml)	Temperatura de enriquecimiento (±1 °C)	Tiempo de enriquecimiento (h)	Volumen de análisis de la muestra ^(a)	Punto de interrupción recomendado			
Todas las muestras de alimentos (excepto carnes crudas, mariscos crudos y productos lácteos crudos)	25 g	225	37	24 a 30	20 µl	- Demi-Fraser hasta 72 horas - lisado a -20 °C - lisado a 4 °C hasta 72 horas			
Muestras ambientales	25 g, 1 hisopo o 1 paño								
Protocolo específico	Enriquecimiento primario (Caldo Demi-Fraser)				Enriquecimiento secundario (Caldo Fraser)				
	Tamaño de la muestra	Volumen del caldo de enriquecimiento (ml)	Temperatura de enriquecimiento (±1 °C)	Tiempo de enriquecimiento (h)	Tamaño de la muestra	Temperatura de enriquecimiento (±1 °C)	Tiempo de enriquecimiento (h)	Volumen de análisis de la muestra ^(a)	Punto de interrupción recomendado
Carnes crudas, mariscos crudos y productos lácteos crudos	25 g	225	37	20 a 24	Transfiera 0,1 ml a 10 ml de Caldo Fraser	37	20 a 24	10 µl	- Demi-Fraser hasta 72 horas - lisado a -20 °C - lisado a 4 °C hasta 72 horas

(a) Volumen de la muestra transferida a los tubos de solución de Lisis. Consulte el paso 4.6 de la sección Lisis.

	Procedimiento para la detección molecular de <i>Listeria monocytogenes</i> AOXLAB S.A.S	Identificación: PROC-TC-119
		Revisión: 2
		Inicio de vigencia: 2025-10-13

4.5.4 Proceso de lisis y amplificación:




4.5.4.1 Organización de flujo de trabajo:

Después del tiempo de pre-enriquecimiento de acuerdo con el numeral 5.3, organizar el flujo de trabajo para el proceso de amplificación de ADN

4.5.4.2 Pasos durante el proceso de lisis y amplificación de ADN

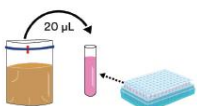
En cada una de las corridas se debe tener un tubo de lisis y un tubo de reacción para cada muestra, además de un tubo de lisis para el control de reactivo y el control negativo y un tubo de control de reactivo.

Se debe asegurar que las perlas de los tubos de reacción se encuentren en el fondo y no se encuentren rotas o dañadas. Se debe usar una punta con filtro para cada muestra. Durante esta etapa se debe apagar los aires acondicionado o flujos de aires directo en el área para evitar contaminación cruzada por circulación de ADN.




1

Invierta los tubos de lisis tapados para mezclar.






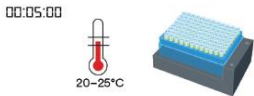

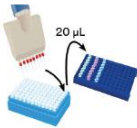



2

Destape los tubos de lisis. No vuelva a taparlos. Transfiera 20 µL de la muestra al tubo de lisis en la cabina de bioseguridad con el ventilador apagado. Si se conserva el lisado para volver a analizar, coloque las tapas en un recipiente limpio para un uso posterior.









El líquido es de color rosado

	Procedimiento para la detección molecular de <i>Listeria monocytogenes</i> AOXLAB S.A.S	Identificación: PROC-TC-119
		Revisión: 2
		Inicio de vigencia: 2025-10-13

	3	Coloque el rack con los tubos de lisis en el bloque de calentamiento a 100 °C (± 1 °C) durante 15 \pm 1 minutos No vuelva a colocar la tapa del rack de tubo LS.		El líquido vira a un color amarillo durante el calentamiento
	4	Coloque el rack con los tubos de lisis sin tapa en el bloque de enfriamiento a temperatura ambiente (20-25 °C) durante 5 minutos máximo 10 minutos No congele el bloque de enfriamiento ni use la bandeja		El líquido vuelve a ser de color rosado
	5	Transfiera 20 µL del lisado al tubo de reactivo en la cabina de bioseguridad con el ventilador apagado. Si son muchas muestras, usar la pipeta multicanal. Pipetee hacia arriba y hacia abajo 5 veces para mezclar. Se debe destapar una sola fila a la vez y el control de reactivo se adiciona cuando ya se tengan todos los tubos de reactivo tapados		
	6	Transfiera los tubos cerrados a la bandeja de carga rápida.		
	7	Comience la corrida usando el software. Coloque la bandeja de carga rápida en el equipo y cierre la tapa.		
	8	Los resultados presuntivos positivos pueden aparecer a partir de los 15 minutos. Resultados negativos a los 60 minutos. Si conservara el lisado para reexaminar, lávese las manos, vuelva a ponerse guantes y tape los tubos de lisis. Almacénelos de 4 a 8°C.		

Una vez finalizada la corrida verificar que los iconos que aparecen no presenten ninguna falla de acuerdo con la siguiente tabla. Si alguna muestra queda con algún error se debe revisar el proceso y volver a analizar estas muestras. Si por algún motivo se requiere cancelar el proceso se debe tener en cuenta lo mencionado en el Apéndice mencionado en el numeral 5.4.3

	Procedimiento para la detección molecular de <i>Listeria monocytogenes</i> AOXLAB S.A.S	Identificación: PROC-TC-119
		Revisión: 2
		Inicio de vigencia: 2025-10-13

Tipo de Pocillo	Símbolo del resultado del pocillo	Resultado	Interpretación
Muestra		Positivo	Se presume que la muestra dio positivo para el patógeno estudiado.
Muestra		Negativo	Se presume que la muestra dio negativo para el patógeno estudiado.
Muestra		Inhibido	La matriz de muestra fue inhibitoria al ensay. Puede que se requiera un nuevo estudio. Consulte la sección de solución de problemas y las Instrucciones del Producto del kit de ensayos para obtener más información.
Muestra		Inspeccionar	Es indeterminada la presencia o ausencia del patógeno estudiado. Puede que se requiera un nuevo estudio. Consulte la sección de solución de problemas y las Instrucciones del Producto del kit de ensayos para obtener más información.
Muestra		Error	No se detectó bioluminiscencia. Puede que se requiera un nuevo estudio. Consulte la sección de solución de problemas y las Instrucciones del Producto del kit de ensayos para obtener más información.


4.5.4.3 Apéndice:

Interrupción por protocolo: Almacenamiento y repetición de pruebas de lisados tratados con calor:

1. Para almacenar un lisado tratado con calor, vuelva a tapar el tubo de lisis con una tapa limpia (consulte Lisis, sección 4.5).
2. Almacene entre 4 °C y 8 °C por hasta 72 horas.
3. Prepare una muestra almacenada para amplificación invirtiéndola 2 a 3 veces para mezclar.
4. Destape los tubos.
5. Coloque los tubos de lisados mezclados en el Bloque de Calor para el Sistema de Detección Molecular 3M y caliéntelos a 100 °C ± 1 °C durante 5 ± 1 minutos.
6. Retire la gradilla de tubos Solución de Lisis 3M del bloque de calentamiento y deje que se enfríe en la Inserción del Bloque de Frío para el Sistema de Detección Molecular 3M al menos durante 5 minutos y por un máximo de 10 minutos.
7. Siga el protocolo en la sección Amplificación que se detalla arriba.

4.5.4.4 Descarte de puntas y reactivos usados en el proceso

Las puntas y reactivos de lisis y amplificación usadas en el proceso se deben descartar en un recipiente que contenga solución de hipoclorito de sodio del 1 al 5 % preparada de acuerdo con el numeral 5.2 durante 1 a 2 horas. Pasado este tiempo se descartan en caneca roja.

	Procedimiento para la detección molecular de <i>Listeria monocytogenes</i> AOXLAB S.A.S	Identificación: PROC-TC-119
		Revisión: 2
		Inicio de vigencia: 2025-10-13

4.5.4.5 Confirmación de muestras con resultado positivo

Para los resultados positivos obtenidos en la amplificación de ADN se debe realizar a partir del pre-enriquecimiento inicial usado para la detección en el equipo, este pre-enriquecimiento se puede guardar máximo 72 h entre 4-8 °C. Seguir los siguientes pasos para la confirmación:

- Transferir una asada de 10 uL del caldo pre-enriquecimiento y estriar por agotamiento en placa de agar cromogénico (según Ottaviani Agosti descrito en ISO 11290).
- Incubar a 37°C ±1°C a 48±2 h.
- Las colonias que presenten características positivas en agar ALOA, se pueden confirmar con medio cromogénico para la confirmación de *L. monocytogenes* (CHROMagar™), tomando una colonia típica y realizar de uno a 3 líneas en forma de zigzag en la superficie del medio.
- Incubar de 18 h a 24 h a 37 °C ±1 °C
- Las reacciones en agar se pueden consultar en la siguiente tabla:

DIFERENCIACIÓN DE LAS U.F.C. TÍPICAS DE *Listeria monocytogenes*

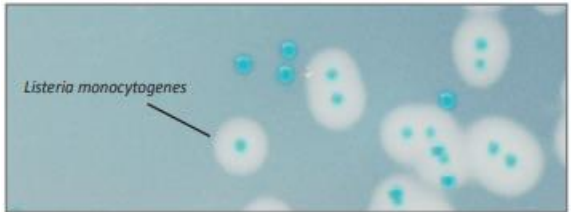


MEDIO DE CULTIVO	CARATERÍSTICAS U.F.C. TÍPICAS	IMAGENES
Agar cromogénico para <i>Listeria</i> (ALOA) CHROMagar™	colonias azules rodeadas de un halo blanco	
Agar cromogénico de identificación para <i>Listeria</i> CHROMagar™	mancha rosada rodeada de un halo blanco	

Tabla 4: Colonias típicas de *Listeria monocytogenes* en medios sólidos selectivos.

NOTA: Dado que la *L. monocytogenes* y la *L. innocua* tienen propiedades bioquímicas similares, éstas se diferencian fácilmente por las colonias son azules rodeadas de un halo blanco debido a una actividad específica de fosfolipasa en agar CHROMagar™

	Procedimiento para la detección molecular de <i>Listeria monocytogenes</i> AOXLAB S.A.S	Identificación: PROC-TC-119
		Revisión: 2
		Inicio de vigencia: 2025-10-13

4.6 INFORME

Después de realizar las pruebas confirmativas de *Listeria monocytogenes* se reportará como Ausencia o Presencia de *Listeria monocytogenes*, en el FOR-TC-075 "formato datos primarios de resultados de análisis Microbiológicos". Para muestras ambientales tomadas con esponjas, en las que se evidencie la toma en un área de 100 cm², el resultado se reportará como 'Presencia' o 'Ausencia' por cada 100 cm².

4.7 Aseguramiento de la calidad

Para asegurar y controlar la validez de los resultados, por cada lote nuevo del kit se debe realizar un control positivo con Suspensión de *Listeria monocytogenes* ATCC 14028 y un control negativo usando suspensión de *Escherichia coli* ATCC 25922, se debe realizar un control positivo a una muestra adicionada con Suspensión de *Listeria monocytogenes* ATCC 14028 cada semana en una matriz diferente. Así mismo, para cada lote de agar o caldo preparado se debe realizar control de esterilidad poniéndolos a incubar sin inocular, también se puede realizar como control negativo una siembra por superficie del caldo empleado en el agar a usar.

5 RESPONSABILIDADES.

Director técnico


- Asegurar la aplicación del presente documento y tomar decisiones en casos especiales no contemplados.
- Revisar y aprobar los informes técnicos una vez han sido revisados por el Líder de Laboratorio.
- Asesorar y orientar los analistas en la resolución de dudas e inconvenientes surgidos durante el desarrollo de los ensayos.
- Realizar o revisar las investigaciones pertinentes a los trabajos no conformes derivados de la ejecución del método y autorizar las indicaciones a seguir.
- Establecer los casos en los cuales se realiza la retención de muestras.

Dirección de Calidad

- Asegurar la aplicación del presente documento y tomar decisiones en casos especiales no contemplados.
- Realizar y registrar las investigaciones pertinentes a los trabajos no conformes derivados de la ejecución del método.
- Archivar los registros técnicos relacionados con los ensayos.

Líder de Microbiología

- Asegurar la aplicación del presente documento por el personal subordinado o supervisado.

	Procedimiento para la detección molecular de <i>Listeria monocytogenes</i> AOXLAB S.A.S	Identificación: PROC-TC-119
		Revisión: 2
		Inicio de vigencia: 2025-10-13

- Revisar los resultados ingresados por el analista, haciendo seguimiento de la trazabilidad del análisis (Cuadros de mando, formato de solicitud de servicio y salvaguardia de muestras, formatos de datos primarios) antes de enviar el informe final al director técnico.
- Realizar la revisión de resultados teniendo en cuenta la normativa vigente si esta aplica.
- Informar al director técnico las desviaciones que se den durante el desarrollo del método.
- Reportar y registrar los trabajos no conformes derivados del análisis al líder de calidad y al director técnico.
- Informar los casos en los que se deben de retener las muestras.
- Supervisar el cumplimiento de las actividades de aseguramiento de calidad.

Analista.

- Seguir todas las instrucciones establecidas en este procedimiento y en el reglamento del laboratorio
- Ingresar y entregar todos los resultados en los tiempos pactados.
- Entregar formatos de datos primarios completamente diligenciados al líder del laboratorio.
- Realizar revisión de datos primarios y cálculos realizados en los cuadros de mandos, informar al líder del laboratorio en caso de observar alguna desviación en los resultados obtenidos teniendo en cuenta las cartas control.
- Registrar los resultados de los ensayos de control de calidad y hacer el análisis de tendencias de estos.
- Realizar la revisión de resultados teniendo en cuenta la normativa vigente si esta aplica.
- Informar al líder de laboratorio las desviaciones que se den durante el desarrollo del método.
- Reportar y registrar los trabajos no conformes derivados del análisis al líder del laboratorio.
- Informar cualquier incidente que suceda durante la realización del método.
- Revisar que los equipos usados en el desarrollo del método tengan mantenimiento, calibración y/o verificación vigente, de acuerdo con el programa de mantenimiento y calibración.

6 FORMATOS RELACIONADOS.

FOR-TC-075 "Formato para el registro de datos primarios de análisis microbiológicos"

SOFT-TC-048 "Cuadro de mando para ensayos microbiológicos cualitativos"

FOR-TC-045 "Formato para el registro de información y asignación de lote de las soluciones preparadas para uso en los ensayos"

7 ANEXOS

No aplica