



UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS
ESCUELA DE CIENCIAS VETERINARIAS

**IMPLEMENTACIÓN Y VERIFICACIÓN DE UN MÉTODO
CUALITATIVO Y UNO CUANTITATIVO PARA EL ANÁLISIS DE
Listeria monocytogenes EN PRODUCTOS HIDROBIOLÓGICOS**

Catalina Paz Martínez Hartung

Memoria para optar al Título
Profesional de Médico Veterinario
Departamento de Medicina
Preventiva Animal

PROFESOR GUÍA: JAVIERA CORNEJO KELLY
Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias. Universidad de Chile

SANTIAGO, CHILE
2016



UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS
ESCUELA DE CIENCIAS VETERINARIAS

**IMPLEMENTACIÓN Y VERIFICACIÓN DE UN MÉTODO
CUALITATIVO Y UNO CUANTITATIVO PARA EL ANÁLISIS DE
Listeria monocytogenes EN PRODUCTOS HIDROBIOLÓGICOS**

Catalina Paz Martínez Hartung

Memoria para optar al Título
Profesional de Médico Veterinario
Departamento de Medicina
Preventiva Animal

NOTA FINAL:

FIRMA

PROFESOR GUÍA : DRA. JAVIERA CORNEJO KELLY

PROFESOR CONSEJERO : DRA. PILAR OVIEDO HANNING

PROFESOR CONSEJERO : DRA. LISETTE LAPIERRE ACEVEDO

SANTIAGO, CHILE

2016

ÍNDICE DE CAPÍTULOS

RESUMEN	v
ABSTRACT	vi
INTRODUCCIÓN	1
REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	2
<i>Listeria monocytogenes</i>	2
Listeriosis	2
Sector pesquero en Chile	4
Métodos estandarizados y su verificación en un laboratorio.....	5
OBJETIVOS	7
OBJETIVO GENERAL	7
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	7
MATERIALES Y MÉTODOS	8
1. Cepa bacteriana.....	8
2. Normas de bioseguridad	8
3. Matrices alimentarias.....	8
4. Implementación de metodologías analíticas.....	9
4.1 Metodología Cualitativa	9
4.2 Metodología Cuantitativa	9
4.3 Procedimiento para la contaminación artificial de las muestras.....	10
4.4 Preparación del inóculo	10
5. Verificación de metodologías analíticas.....	11
RESULTADOS	12
1. Verificación Metodología Cualitativa	12

1.1 Verificación Metodología Cualitativa en Salmón del Atlántico (Salmo salar)	12
1.2 Verificación Metodología Cualitativa en Chorito (Mytilus chilensis)	13
2. Verificación Metodología Cuantitativa	14
2.1 Cuantificación en Salmón del Atlántico (Salmo salar)	15
2.2 Cuantificación en Chorito (Mytilus chilensis)	16
2.3 Repetibilidad y reproducibilidad intralaboratorio del método cuantitativo.....	17
2.4 Incertidumbre del método cuantitativo.....	19
2.5 Exactitud del método cuantitativo	20
3. Resumen resultados y promedios	21
DISCUSIÓN	22
CONCLUSIÓN	24
BIBLIOGRAFÍA	26
ANEXOS	31
ANEXO 1	31
ANEXO 2	32
ANEXO 3	33
ANEXO 4	34
ANEXO 5	35
ANEXO 6	38
ANEXO 7	41

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Resultados obtenidos en las muestras de Salmón del Atlántico (<i>Salmo Salar</i>) inoculadas con menos de 30 ufc.....	12
Tabla 2. Resultados obtenidos en los dos controles negativos de Salmón del Atlántico (<i>Salmo salar</i>).	13
Tabla 3. Resultados obtenidos en las muestras de Chorito (<i>Mytilus chilensis</i>) inoculadas con menos de 30 ufc.....	13
Tabla 4. Resultados obtenidos en los dos controles negativos de Chorito (<i>Mytilus chilensis</i>).	14
Tabla 5. Resultados obtenidos en las muestras de Salmón del Atlántico (<i>Salmo salar</i>) inoculadas con tres niveles contaminación.....	15
Tabla 6. Resultados obtenidos en las muestras de Chorito (<i>Mytilus chilensis</i>) inoculadas con tres niveles contaminación.....	16
Tabla 7. Repetibilidad en Salmón del Atlántico (<i>Salmo salar</i>) inoculado con 10^2 , 10^3 y 10^4 ufc/g y analizado bajo la norma ISO 11290-2:1998/FDAM 1:2004(E).....	18
Tabla 8. Repetibilidad en Chorito (<i>Mytilus chilensis</i>) inoculado con 10^2 , 10^3 y 10^4 ufc/g y analizado bajo la norma ISO 11290-2:1998/FDAM 1:2004(E).	18
Tabla 9. Reproducibilidad en Salmón del Atlántico (<i>Salmo salar</i>) inoculado con 10^2 , 10^3 y 10^4 ufc/g y analizado bajo la norma ISO 11290-2:1998/FDAM 1:2004(E).....	18
Tabla 10. Reproducibilidad en Chorito (<i>Mytilus chilensis</i>) inoculado con 10^2 , 10^3 y 10^4 ufc/g y analizado bajo la norma ISO 11290-2:1998/FDAM 1:2004(E).....	19
Tabla 11. Incertidumbre en Salmón del Atlántico (<i>Salmo salar</i>) inoculado con 10^2 , 10^3 y 10^4 ufc/g y analizado bajo la norma ISO 11290-2:1998/FDAM 1:2004(E).....	19

Tabla 12. Incertidumbre en Chorito (<i>Mytilus chilensis</i>) inoculado con 10^2 , 10^3 y 10^4 ufc/g y analizado bajo la norma ISO 11290-2:1998/FDAM 1:2004(E).	20
Tabla 13. Exactitud en Salmón del Atlántico (<i>Salmo salar</i>) inoculado con 10^2 , 10^3 y 10^4 ufc/g y analizado bajo la norma ISO 11290-2:1998/FDAM 1:2004(E).	20
Tabla 14. Exactitud en Chorito (<i>Mytilus chilensis</i>) inoculado con 10^2 , 10^3 y 10^4 ufc/g y analizado bajo la norma ISO 11290-2:1998/FDAM 1:2004(E).	21
Tabla 15. Resumen de resultados y promedios de la verificación del método cuantitativo en Salmón del Atlántico (<i>Salmo salar</i>).	21
Tabla 16. Resumen de resultados y promedios de la verificación del método cuantitativo en Chorito (<i>Mytilus chilensis</i>).	21

RESUMEN

Listeria monocytogenes es la bacteria causante de la enfermedad transmitida por alimentos conocida como listeriosis, la cual se ha visto asociada principalmente a alimentos listos para consumo (LPC). Dentro de los brotes de listeriosis se han visto involucrados los productos hidrobiológicos. En los últimos años, Chile ha aumentado la producción y exportación de este tipo de productos, llegando a diferentes mercados que tienen requisitos sanitarios, los cuales Chile debe cumplir. Los laboratorios, para demostrar que son capaces de realizar un método de análisis microbiológico de manera satisfactoria, pueden realizar un Proceso de Verificación, a través del cual se evalúa el rendimiento del método en un laboratorio específico.

Para analizar *L. monocytogenes* en alimentos, existen diferentes métodos, entre los cuales se encuentran los descritos en las normas ISO 11290-1 para análisis cualitativo, e ISO 11290-2 para análisis cuantitativo. Ambos métodos fueron implementados y verificados en Salmón del Atlántico y en Chorito, en el Laboratorio de Inocuidad de los Alimentos del Departamento de Medicina Preventiva Animal de la Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias de la Universidad de Chile. El proceso de verificación se realizó en base a la norma ISO/WD 16140-3. En el método cualitativo, se evaluó si este es capaz de detectar un nivel suficientemente bajo de *L. monocytogenes*. Como resultado se obtuvo la detección positiva de la bacteria en un 100% de las muestras contaminadas. En el método cuantitativo, las muestras fueron contaminadas con tres niveles de inóculos (10^2 , 10^3 y 10^4) de *L. monocytogenes*, y se evaluó la repetibilidad, reproducibilidad intralaboratorio, exactitud e incertidumbre del método.

Los resultados obtenidos en ambos métodos cumplieron con los criterios para la verificación de éstos. Así, el Laboratorio de Inocuidad de los Alimentos del Departamento de Medicina Preventiva Animal de la Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias de la Universidad de Chile, demuestra que tiene las capacidades para realizar ambos métodos en las matrices que fueron probadas, siendo capaz de entregar resultados confiables.

Palabras claves: *Listeria monocytogenes*, implementación, verificación.

ABSTRACT

Listeria monocytogenes is the bacterium that causes the foodborne disease known as listeriosis, which has been mainly linked to ready-to-eat (RTE) foods. Hydrobiological products have been involved in listeriosis outbreaks. In recent years, Chile has increased production and export of this type of products, reaching various markets with their own health requirements, which Chile must meet. In order to prove they are capable of performing a microbiological analysis method, laboratories can go through a Verification Process, which evaluates the method's performance in a specific lab.

There are various methods to analyze *L. monocytogenes* in food, among which are those described in the ISO 11290-1 standard, for qualitative analysis, and ISO 11290-2, for quantitative analysis. Both methods were implemented and verified in the Atlantic Salmon and the Mussel, in the Food Harmlessness Laboratory of the Department of Preventative Animal Medicine of the Faculty of Veterinary and Animal Sciences of the University of Chile. The verification process was carried out according to the ISO/WD 16140-3 standard. It evaluated whether the qualitative method is able to detect a low enough level of *L. monocytogenes*. The results showed positive bacteria detection in 100% of the contaminated samples. For the quantitative method, the samples were contaminated with three inocula levels (10^2 , 10^3 and 10^4) of *L. monocytogenes*, and it evaluated the method's repeatability, within-laboratory reproducibility, accuracy and uncertainty.

The results obtained for both methods satisfied their verification criteria. This way, the Food Harmlessness Laboratory of the Department of Preventative Animal Medicine of the Faculty of Veterinary and Animal Sciences of the University of Chile demonstrates it has the capabilities to perform both methods in the tested matrices.

Key words: *Listeria monocytogenes*, implementation, verification.

INTRODUCCIÓN

Las enfermedades transmitidas por alimentos (ETA) constituyen uno de los mayores problemas en salud pública. Además de tener un efecto sobre la salud de los consumidores, tienen un costo para autoridades sanitarias y repercusiones a nivel económico debido a que provocan un impacto en los productores por pérdida de alimentos, desconfianza por parte del consumidor, obstaculizan el comercio, entre otras. Sin embargo, dichas consecuencias, tanto en Chile como en otros países, son difíciles de cuantificar ya que los brotes notificados se encuentran subestimados. Dentro de las ETA más importantes se encuentra la listeriosis, la cual es causada por *Listeria monocytogenes*, que se caracteriza por su alta letalidad, la cual puede llegar hasta 30%. Según la FDA (U.S Food and Drug Administration), esta bacteria, se encuentra dentro de los 14 patógenos principales involucrados en las enfermedades asociadas a patógenos alimentarios. En 1983 fue publicado el primer brote de listeriosis asociado a alimentos y desde entonces se han seguido produciendo, asociados a diferentes alimentos, incluidos los productos hidrobiológicos.

En Chile, en los últimos años se ha observado un crecimiento en la producción de alimentos y la incorporación de nuevas tecnologías. En particular el sector pesquero, ha aumentado su desembarque total de manera considerable, alcanzando en los últimos años, según la ODEPA, 4 millones de toneladas por año, en comparación al año 1951 en donde el desembarque fue de 90 mil toneladas. Las exportaciones del sector pesquero han aumentado notablemente, llegando productos chilenos a distintos mercados. Para poder exportar, es obligación contar con la certificación de los productos conforme al Programa de Aseguramiento de Calidad, elaborado por el Servicio Nacional de Pesca. Por otra parte, los laboratorios de control de calidad microbiológica para poder implementar los métodos de análisis deben realizar la verificación de cada método, ya que a través de dicho proceso, el laboratorio puede demostrar que es competente para realizar el método seleccionado.

En la presente memoria de título se implementaron y verificaron dos métodos de análisis de *Listeria monocytogenes* aplicados a productos hidrobiológicos, en el Laboratorio de Inocuidad de los Alimentos de la Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias de la Universidad de Chile.

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

Listeria monocytogenes

El género *Listeria* consta de seis especies, dentro de las cuales *Listeria monocytogenes* es la principal especie patógena tanto en animales como en el humano (Jewell *et al.*, 2004). *Listeria monocytogenes* corresponde a un bacilo gram positivo, no formador de esporas, anaerobio facultativo. Es catalasa positivo, oxidasa negativo y móvil a temperaturas de 20 a 25°C gracias a flagelos peritricos (Adams y Moss, 2008). Está diseminada por todo el mundo y se encuentra ampliamente distribuida en la naturaleza (Acha y Szyfres, 2001). *L. monocytogenes* es una bacteria psicrótrofa, capaz de crecer entre 0 y 45°C, siendo su temperatura óptima de 30 a 37°C. En cuanto al pH, al igual que muchas otras bacterias, crece fácilmente en valores cercanos a 7 y se ha registrado crecimiento entre 4 y 9,8. La actividad de agua ideal para esta bacteria es $>0,97$ (Lado y Yousef, 2007; Adams y Moss, 2008).

Listeriosis

L. monocytogenes puede ser transmitida al humano, por contacto directo con la bacteria en el entorno, por contacto con animales infectados o a través de alimentos contaminados, siendo ésta última la principal vía de infección (Jewell *et al.*, 2004). La listeriosis corresponde a la infección provocada por *L. monocytogenes* debido al consumo de alimentos contaminados (Ching Chai *et al.*, 2013). Hoy en día, se considera que *L.monocytogenes* es la bacteria que causa más muertes por enfermedades de origen alimentario en Estados Unidos (Alcayaga y Hott, 2008.). El Centro para el Control y la Prevención de Enfermedades (CDC) estima que en EE.UU, cada año, 1591 personas se enferman de listeriosis y 255 de ellas mueren (Angulo *et al.*, 2011). Esta enfermedad tiene un periodo de incubación de 30 días y puede cursar de dos formas, como gastroenteritis o mediante una forma invasora. Ésta última, se puede presentar en grupos susceptibles de la población, que corresponde a mujeres embarazadas, recién nacidos, adultos mayores y personas debilitadas o inmunocomprometidas. La forma invasora en embarazadas puede causar aborto, muerte fetal o nacimiento prematuro. En los recién nacidos, puede desarrollar septicemia, granulomatosis diseminada, enfermedades respiratorias o

meningitis. En adultos mayores y en personas inmunocomprometidas puede producir meningitis o meningoencefalitis (Anón, 2007).

Los brotes de listeriosis se han asociado a productos cárnicos, productos lácteos, mariscos, frutas y hortalizas. Las investigaciones epidemiológicas de los grandes brotes de listeriosis que se han producido desde 1981 demuestran que se asocian principalmente a alimentos listos para consumo (LPC), siendo considerada *L. monocytogenes* como un patógeno de alto riesgo en este tipo de alimentos (Orsi y Wang, 2013). En Chile, el año 2008 se notificaron 165 casos de *Listeria monocytogenes*, de los cuales se reportaron 14 fallecidos, lo que corresponde a una tasa de letalidad del 8%. En el año 2009 se notificaron 73 casos, de los cuales se reportaron 17 fallecidos, es decir, una tasa de letalidad del 25% (MINSAL, 2010). Hasta la SE (semana epidemiológica) 36 del año 2014, se habían confirmado en Chile 42 casos de *L. monocytogenes* por el Instituto de Salud Pública de Chile (ISP). El mayor número de casos notificados fue de 16 en la región Metropolitana, seguido de la región de Valparaíso con cinco casos, y la región de Los Lagos también con cinco casos (MINSAL, 2014).

Se han reportado brotes de listeriosis asociados a productos hidrobiológicos listos para el consumo, como mejillones ahumados, trucha ahumada y salmón ahumado. Dentro de los retiros de productos (“*recalls*”) realizados por la FDA debido a contaminación con *L. monocytogenes* entre 1986 y 2006, los productos hidrobiológicos presentan la proporción más alta. Los productos hidrobiológicos que tienen alto riesgo de contaminación con *L. monocytogenes*, en general son consumidos sin cocción adicional (LPC). Dentro de estos se encuentran los pescados ahumados, tanto en frío como en caliente, productos ligeramente salados, caviar, camarones en salmuera, y productos hidrobiológicos marinados. La contaminación de pescados y mariscos con *Listeria* spp., podría ocurrir desde el mismo medio acuoso, ya que en estos sistemas la bacteria está casi siempre presente. Sin embargo, la vía de transmisión principal corresponde a la contaminación cruzada durante su proceso desde fuentes ambientales (Orsi y Wang, 2013).

Sector pesquero en Chile

Las exportaciones chilenas desde el sector pesquero han sufrido un importante crecimiento en los últimos 50 años, especialmente desde los años 80, debido al mayor desarrollo de la acuicultura. El volumen de exportación total de los productos pesqueros chilenos en 1960 fue de 28.927 toneladas, mientras que el 2013 fue de 1.163.177 toneladas (Bravo y Cox, 2014). De esta forma Chile, se encuentra dentro de los 10 principales exportadores de pescado y productos pesqueros del mundo (FAO, 2012). Hasta Noviembre de 2013 hubo 126 tipos de recursos pesqueros exportados, el Salmón del Atlántico representó el 43,4% del valor total de las exportaciones pesqueras y acuícolas. Hasta noviembre del 2013 el número de mercados registrados fue de 109 destinos. Los nueve principales destinos representan el 77,6% del valor total exportado. El principal destino corresponde a Estados Unidos con un 25,5% del valor total, seguido de Japón, Brasil, China y Rusia (Subpesca, 2014). Además del Salmón, los productos elaborados a partir de moluscos bivalvos son una de las principales exportaciones pesqueras desde Chile a la Unión Europea. Destaca dentro de estos el Chorito (*Mytilus chilensis*). En el primer trimestre del año 2012, representó el 88,79 % de las exportaciones. Éste recurso, es exportado a variados países de la U.E, siendo el principal España (44,4%), seguido por Francia (25,2%) e Italia (12,4%) (Sernapesca, 2012).

En Chile la entidad competente y responsable de garantizar la calidad sanitaria de los productos pesqueros y de la acuicultura de exportación, y de dar cumplimiento a los requisitos sanitarios de países importadores, es el Servicio Nacional de Pesca y Acuicultura (Sernapesca). Para esto, cuenta con diferentes programas dentro de los cuales se encuentra el Programa de Aseguramiento de Calidad (PAC), el cual es de carácter obligatorio para aquellas empresas autorizadas para exportar a la Comunidad Europea y a Estados Unidos. Este, corresponde a un programa de certificación, basado en el análisis de peligros y control de puntos críticos (HACCP). El programa cuenta con verificaciones, dentro de las cuales se incluye un control del producto final. Parte de estas verificaciones deben ser derivadas a laboratorios de verificación de Sernapesca, como procedimiento de supervisión (Sernapesca, 2014a; Sernapesca, 2014b). Dichos laboratorios forman parte del sistema de laboratorios autorizados por Sernapesca, que pertenecen al Programa de

Laboratorios (LAB), los cuales deben cumplir con ciertos requisitos, como estar acreditados bajo la norma ISO 17.025. Los procedimientos de muestreo y análisis se realizan según técnicas oficiales acorde a métodos normalizados reconocidos internacionalmente y a partir de normas nacionales (Normas Chilenas, NCh) (Sernapesca, 2014c).

Métodos estandarizados y su verificación en un laboratorio

Las normas mencionadas anteriormente, describen métodos estandarizados, es decir, desarrollados por un organismo internacional de estandarización. Los métodos normalizados describen de forma clara y exacta las condiciones de realización del ensayo. Sus características de funcionamiento deben ser acordes con el uso previsto. Estos, son considerados métodos de referencia ya que pueden ser utilizados con el fin de evaluar otros métodos desarrollados para la misma determinación (ENAC, 2012). Dentro de los métodos internacionales normalizados para el aislamiento de *L. monocytogenes* desde alimentos, se encuentran, el método del Manual de Análisis Bacteriológico (BAM) de la FDA, el método oficial de la Asociación Oficial de Químicos Analistas (AOAC), las normas ISO 11290 (OIE, 2004). Éstos, cuentan con validación internacional, la cual de acuerdo a la AOAC consiste en determinar las características de funcionamiento de los métodos, a través de la evaluación de determinados parámetros (AOAC, 2012). Por otra parte, de acuerdo a la norma ISO/WD 16.140-3, para implementar un método de análisis estandarizado en un laboratorio, es necesario realizar un proceso de verificación. Este, tiene como objetivo evaluar el rendimiento de un método en un laboratorio específico, contra las especificaciones del método establecidas durante la validación, y evaluar el rendimiento del método en las matrices incluidas en su alcance y probadas rutinariamente en el laboratorio. A través del proceso de verificación, el laboratorio demuestra que es capaz de realizar el método y que este se realiza de manera satisfactoria en las matrices probadas. En un proceso de verificación se evalúan las características del método que dependen del laboratorio en donde este se va a implementar y del tipo de método. Para un método cualitativo, la característica de rendimiento relevante para la verificaciónes el nivel de detección. Por otra parte, las características de rendimiento, relevantes, para la verificación

del método cuantitativo son reproducibilidad intralaboratorio, incertidumbre de la medición, repetibilidad y exactitud.

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Implementar y verificar un método cualitativo y un método cuantitativo para el análisis de *Listeria monocytogenes* en productos hidrobiológicos.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Implementación y verificación de un método de detección de *Listeria monocytogenes* en Salmón del Atlántico y Chorito.
2. Implementación y verificación de un método de enumeración de *Listeria monocytogenes* en Salmón del Atlántico y Chorito.

MATERIALES Y MÉTODOS

La implementación y verificación de los métodos para el análisis de *Listeria monocytogenes* en productos hidrobiológicos se realizó en el Laboratorio de Inocuidad de los Alimentos de la Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias de la Universidad de Chile. En este laboratorio se trabaja bajo un sistema de gestión basado en la norma ISO 17025 (Requisitos generales para la competencia de los laboratorios de ensayo y calibración).

1.Cepa bacteriana

La cepa que se utilizó para contaminar las muestras, corresponde a una cepa nativa de *Listeria monocytogenes*, proveniente del cepario del Laboratorio de Inocuidad de Alimentos. La cepa fue identificada para género y especie por la técnica de espectrometría de masas MALDI-TOF (Matrix-assisted laser desorption/ionization- Time of Flight Mass Spectrometry). La identificación se basa en el análisis de proteínas, a través de la creación de un espectro de masas, el que es específico para cada bacteria. Este análisis fue realizado por la unidad de Bacteriología del Instituto de Salud Pública de Chile.

2. Normas de bioseguridad

El Laboratorio de Inocuidad de los Alimentos de la Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias de la Universidad de Chile tiene las condiciones necesarias para trabajar con un nivel 2 de bioseguridad (ANEXO 1). Según el Manual de Bioseguridad en el Laboratorio, de la Organización Mundial de la Salud (versión 2005), dicho nivel es el adecuado para trabajar con *L. monocytogenes*.

3. Matrices alimentarias

Se utilizaron dos matrices alimentarias las cuales corresponden a Salmón del Atlántico (*Salmo salar*) y Chorito (*Mytilus chilensis*). Las muestras que se utilizaron corresponden a contra muestras del Programa de Aseguramiento de Calidad de Sernapesca, provenientes del Laboratorio de Farmacología Veterinaria de la Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias de la Universidad de Chile (FARMAVET), las cuales llegaron procesadas, en

bolsas individuales y en condiciones de congelación (-20°C), y fueron mantenidas así hasta su uso.

4. Implementación de metodologías analíticas

Se implementaron dos metodologías de análisis de *L. monocytogenes* en productos hidrobiológicos.

4.1 Metodología Cualitativa: se realizó según la norma ISO 11290-1:1996/FDAM 1:2004(E), la cual especifica un método horizontal para la detección de *Listeria monocytogenes*. Se comenzó realizando un enriquecimiento primario de 25 g muestra agregando 225 ml de un medio de enriquecimiento selectivo (caldo Half fraser) y luego se incubó a 30°C por 24 h. Después, se realizó un enriquecimiento secundario transfiriendo 0,1 ml del cultivo obtenido, a un tubo de ensayo con 10 ml de un medio de enriquecimiento selectivo (caldo Fraser), el cual se incubó por 48 h a 37°C. Una vez realizado esto, se sacó parte del cultivo obtenido en el enriquecimiento primario y secundario, para inocular en superficie en Agar Listeria según Ottaviani y Agosti (ALOA) y en agar OXFORD, de manera de obtener colonias aisladas. Ambos medios de cultivo se incubaron a 37°C y se examinaron después de 24 h para ver la presencia de colonias presuntivas de *Listeria* spp. Luego, se realizó la confirmación de las colonias presuntivas mediante reacción de catalasa, tinción gram y prueba de motilidad. En agar ALOA, dichas colonias son verde azuladas, rodeadas de un halo opaco. En agar OXFORD son pequeñas (1 mm), grisáceas y rodeadas de un halo negro. Finalmente, se confirmó *L. monocytogenes* con la prueba de hemólisis, la utilización de carbohidratos (ramnosa positiva y xilosa negativa) y la prueba CAMP (ANEXO 2)

4.2 Metodología Cuantitativa: se realizó según la norma ISO 11290-2:1998/FDAM 1:2004(E), la cual especifica un método horizontal para la enumeración de *Listeria monocytogenes*. Se comenzó diluyendo 25 g de muestra en 225 ml de agua peptonada tamponada y se dejó durante 1 hora a 20°C para permitir la revitalización de los microorganismos estresados. Luego, se realizaron las diluciones necesarias y se traspasaron 0.1 ml de las diluciones a analizar, a placas con Agar Listeria según Ottaviani y Agosti (ALOA) y se incubaron a 37°C. Después de 24 horas de incubación se examinaron las

placas para ver la presencia de colonias de *Listeria* spp., se identificaron y enumeraron. Después, se realizó su confirmación mediante reacción de catalasa, tinción gram y prueba de motilidad. Finalmente, se confirmó *L. monocytogenes* con la prueba de hemólisis, la utilización de carbohidratos (ramnosa positiva y xilosa negativa) y la prueba CAMP (ANEXO 3)

4.3 Procedimiento para la contaminación artificial de las muestras

Las muestras de alimentos se contaminaron con la cepa *L. monocytogenes* previamente identificada. Para el análisis cualitativo las muestras se contaminaron con 1 mililitro de un inóculo de 10^1 unidades formadoras de colonia (ufc) por mililitro, el cual contenía menos de 30 ufc. Para el análisis cuantitativo, se utilizaron tres niveles de contaminación, correspondientes a 10^2 , 10^3 y 10^4 ufc por mililitro.

4.4 Preparación del inóculo

Para la preparación del inóculo se utilizaron criotubos que contenían cepa pura de *L. monocytogenes* y caldo glicerol, los cuales se mantuvieron almacenados a -20°C . Se descongeló el criotubo y se pasó el contenido a un tubo de ensayo que contenía 3 ml de caldo infusión cerebro corazón (BHI). Se incubó a 35°C por 24 h. Luego, se sembró por estría el contenido en un tubo de ensayo que contenía 9 ml de agar Tripticasa soya (TSA) preparado previamente de forma inclinada y se incubó a 35°C por 24 h.

De este último tubo, se sacó a través de un asa, el crecimiento superficial de las bacterias y se introdujo en un tubo de ensayo con 9 ml de agua peptonada, se puso en un agitador tipo vortex para homogeneizar el contenido. Después, se verificó la absorbancia mediante un espectrofotómetro a 625 nm, la cual debía ser de 0.06 a 0.09, lo que corresponde a una concentración de 10^8 unidades formadoras de colonia de *L. monocytogenes* por mililitro. Una vez hecho esto, se realizaron diluciones decimales traspasando 1 ml de cada tubo a otro que contenía 9 ml de agua peptonada. Se realizó este procedimiento hasta llegar a las diluciones necesarias para cada metodología. Paralelamente se sembró en profundidad y en duplicado en placas Petri con agar para recuento en placa, 1 ml de la dilución 10^1 . Estas se incuban a 37°C por 24 horas con el fin de verificar que el crecimiento sea menor a 30

ufc/ml. Si hay un crecimiento mayor al esperado no se consideran válidas esas muestras. Lo mismo se realizó con las diluciones 10^2 , 10^3 y 10^4 para poder calcular la exactitud de la metodología cuantitativa.

Para determinar la absorbancia en la cual existen 10^8 ufc de *L. monocytogenes* por mililitro, se realizaron 10 suspensiones en tubos de ensayo con la cepa, ajustadas a un patrón estándar de turbidez 0,5 McFarland. Luego se midió la absorbancia de cada uno de los tubos en un espectrofotómetro a 625 nm, se calculó el promedio y luego la desviación estándar. Además, se midió la absorbancia de un tubo que contenía sólo agua peptonada para saber si su absorbancia era o no significativa.(ANEXO 4)

5. Verificación de metodologías analíticas

La verificación de los métodos analíticos se realizó en base a la norma ISO/WD 16140-3; Microbiology of the food chain-Method validation-Part 3: Protocol for the verification of reference and alternative methods implemented in a single laboratory.

RESULTADOS

1. Verificación Metodología Cualitativa

Se evaluó si el método descrito en la norma ISO 11290-1:1996/FDAM 1:2004(E) puede detectar un nivel suficientemente bajo de *L. monocytogenes* en ambas matrices. Para determinar esto, se utilizó un cultivo preparado en el Laboratorio de Inocuidad de los Alimentos con la cepa previamente identificada por MALDI-TOF. A partir de este se obtuvo el inóculo de acuerdo a lo descrito. Se utilizaron 10 muestras contaminadas y 2 controles negativos por matriz evaluada.

El criterio de aceptación para cada matriz corresponde a la detección positiva de *L. monocytogenes* en un 100% de las muestras inoculadas.

1.1 Verificación Metodología Cualitativa en Salmón del Atlántico (*Salmo salar*)

Los resultados obtenidos en Salmón del Atlántico (*Salmo salar*) analizados bajo la norma ISO 11290-1:1996/FDAM 1:2004(E) se detallan en las Tablas 1 y 2.

Tabla 1. Resultados obtenidos en las muestras de Salmón del Atlántico (*Salmo Salar*) inoculadas con menos de 30 ufc.

Salmón del Atlántico (<i>Salmo salar</i>)	
Número de muestra	Resultado (Presencia/Ausencia en 25 gramos)
1	Presencia
2	Presencia
3	Presencia
4	Presencia
5	Presencia
6	Presencia
7	Presencia
8	Presencia
9	Presencia
10	Presencia

Tabla 2. Resultados obtenidos en los dos controles negativos de Salmón del Atlántico (*Salmo salar*).

Salmón del Atlántico (<i>Salmo salar</i>)	
Control negativo	Crecimiento <i>L. monocytogenes</i>
1	No existe crecimiento
2	No existe crecimiento

Lectura: (N° de positivos)/(N° de repeticiones) x 100

Entones, 10/10 x 100 = 100%

1.2 Verificación Metodología Cualitativa en Chorito (*Mytilus chilensis*)

Los resultados obtenidos en Chorito (*Mytilus chilensis*) analizados bajo la norma ISO 11290-1:1996/FDAM 1:2004(E) se detallan en las Tablas 3 y 4.

Tabla 3. Resultados obtenidos en las muestras de Chorito (*Mytilus chilensis*) inoculadas con menos de 30 ufc.

Chorito (<i>Mytilus chilensis</i>)	
Número de muestra	Resultado (Presencia/Ausencia en 25 gramos)
1	Presencia
2	Presencia
3	Presencia
4	Presencia
5	Presencia
6	Presencia
7	Presencia
8	Presencia
9	Presencia
10	Presencia

Tabla 4. Resultados obtenidos en los dos controles negativos de Chorito (*Mytilus chilensis*).

Chorito (<i>Mytilus chilensis</i>)	
Control negativo	Crecimiento <i>L. monocytogenes</i>
1	No existe crecimiento
2	No existe crecimiento

Lectura: (N° de positivos)/(N° de repeticiones) x 100

Entones, 10/10 x 100 = 100%

2. Verificación Metodología Cuantitativa

En ambas matrices, Salmón del Atlántico (*Salmo salar*) y Chorito (*Mytilus chilensis*), se evaluaron los siguientes parámetros de verificación: reproducibilidad intralaboratorio, incertidumbre, repetibilidad y exactitud del método descrito en la norma ISO 11290-2:1998/FDAM 1:2004(E).

- Repetibilidad: Precisión en condiciones de repetibilidad, es decir, condiciones en las que se obtienen resultados de análisis con el mismo método en muestras de ensayo idénticos, en el mismo laboratorio, por el mismo analista, utilizando el mismo equipo, en intervalos de tiempo cortos (ISO/DTS 21748).
- Reproducibilidad intralaboratorio: Precisión en condiciones de reproducibilidad, es decir, condiciones donde los resultados de los análisis se obtienen con el mismo método en elementos de ensayo idénticos, en condiciones diferentes, ya sea, distintos analistas o utilizando equipos diferentes (ISO/DTS 21748).
- Incertidumbre de la medición: parámetro asociado al resultado de una medición, que caracteriza la dispersión de los valores que razonablemente pueden ser atribuidos al mensurado (ISO/DTS21748).
- Exactitud: grado de concordancia entre el valor medio obtenido de una gran serie de resultados de ensayos y un valor de referencia aceptado (ISO/DTS 21748).

a. Número de muestras por matriz y replicas probadas

Se analizaron 10 muestras de cada matriz, cada una de ellas contaminadas con tres niveles de contaminación.

b. Determinación de la repetibilidad y de la reproducibilidad intralaboratorio

La muestra fue dividida en dos submuestras. Luego, cada submuestra fue analizada según lo descrito en la norma ISO 11290-2:1998/FDAM 1:2004(E). Una de las submuestras fue realizada en duplicado por un analista y la otra submuestra sólo una vez, por otro analista.

2.1 Cuantificación en Salmón del Atlántico (*Salmo salar*)

Los resultados obtenidos en Salmón del Atlántico (*Salmo salar*) analizados bajo la norma ISO 11290-2:1998/FDAM 1:2004(E) se detallan en la Tabla 5.

Tabla 5. Resultados obtenidos en las muestras de Salmón del Atlántico (*Salmo salar*) inoculadas con tres niveles contaminación.

Salmón del Atlántico (<i>Salmo salar</i>)						
Nivel de contaminación	Código muestra	Resultados (ufc/gr)			Recuento en placa (ufc/ml)	
		Analista 1	Analista 1	Analista 2	An. 1	An.2
10 ²	1a	50	40	65	60	80
	2a	45	60	50	60	65
	3a	40	45	40	60	70
	4a	40	50	35	60	75
	5a	50	50	40	70	80
	6a	35	45	25	70	45
	7a	45	35	45	70	90
	8a	60	60	20	75	65
	9a	45	55	35	75	80
	10a	65	50	55	75	80
	1b	460	580	440	610	535
	2b	490	460	460	610	585
	3b	500	470	590	610	655
	4b	480	450	400	610	535

10 ³	5b	510	680	600	685	665
	6b	470	570	600	685	770
	7b	550	640	540	685	710
	8b	530	470	430	640	500
	9b	400	500	530	640	595
	10b	590	610	500	640	710
10 ⁴	1c	1600	1500	1300	1615	1225
	2c	1400	1500	1300	1615	1325
	3c	1600	1600	1300	1615	1330
	4c	1500	1600	1500	1615	1360
	5c	1600	1600	1600	1510	1425
	6c	1500	1500	1400	1510	1215
	7c	1500	1400	1600	1510	1485
	8c	1500	1600	1200	1530	1165
	9c	1400	1400	1600	1530	1455
	10c	1500	1500	1400	1530	1435

2.2 Cuantificación en Chorito (*Mytilus chilensis*)

Los resultados obtenidos en Chorito (*Mytilus chilensis*) analizados bajo la norma ISO 11290-2:1998/FDAM 1:2004(E) se detallan en la Tabla 6.

Tabla 6. Resultados obtenidos en las muestras de Chorito (*Mytilus chilensis*) inoculadas con tres niveles contaminación.

Chorito (<i>Mytilus chilensis</i>)						
Nivel de contaminación	Código muestra	Resultados (ufc/gr)			Recuento en placa (ufc/ml)	
		Analista 1	Analista 1	Analista 2	An. 1	An.2
10 ²	1a	35	50	60	65	70
	2a	45	35	65	65	75
	3a	50	45	40	65	70
	4a	50	40	55	65	60
	5a	40	35	80	70	90
	6a	45	40	35	70	65
	7a	35	50	80	70	50
	8a	65	45	35	75	75
	9a	60	65	75	75	85

	10a	50	70	40	75	50
10 ³	1b	510	400	460	720	510
	2b	440	630	600	720	575
	3b	550	590	640	720	670
	4b	570	420	460	720	535
	5b	440	590	690	650	715
	6b	550	500	640	650	725
	7b	500	580	530	650	625
	8b	430	430	520	745	550
	9b	460	580	550	745	590
	10b	660	550	500	745	660
10 ⁴	1c	1800	1500	1400	1630	1280
	2c	1600	1500	1500	1630	1395
	3c	1500	1500	1300	1630	1420
	4c	1500	1600	1400	1630	1260
	5c	1500	1600	1600	1680	1480
	6c	1600	1400	1400	1680	1315
	7c	1500	1500	1200	1680	1165
	8c	1500	1400	1400	1545	1250
	9c	1700	1500	1700	1545	1550
	10c	1400	1300	1500	1545	1250

2.3 Repetibilidad y reproducibilidad intralaboratorio del método cuantitativo

La repetibilidad se midió a través de la desviación estándar y del coeficiente de variación de los resultados obtenidos en condiciones de repetibilidad. La reproducibilidad se midió a través de la desviación estándar y del coeficiente de variación de los resultados obtenidos bajo condiciones de reproducibilidad, como se señala en las Directrices sobre la terminología analítica, del Codex Alimentarius (FAO y OMS, 2009). Tanto la repetibilidad, como la reproducibilidad, deben ser menor a 30%. Estos criterios de aceptación, se establecieron en base a la “Guía para la evaluación del desempeño de métodos de prueba microbiológicos”, de la Secretaría de Salud, de México (CCAYAC, 2011). Además, se calculó el límite de repetibilidad y el límite de reproducibilidad, que corresponde al valor por debajo del cual se encuentra, con una probabilidad del 95%, la diferencia entre dos resultados, obtenidos bajo ya sea condiciones de repetibilidad o de reproducibilidad (FAO Y OMS, 2009).

Los resultados de repetibilidad obtenidos en Salmón del Atlántico (*Salmo salar*) y en Chorito (*Mytilus chilensis*) analizados bajo la norma ISO 11290-2:1998/FDAM 1:2004(E) se detallan en la Tabla 7 y 8. El desarrollo de los resultados se especifica en el ANEXO 5.

Tabla 7. Repetibilidad en Salmón del Atlántico (*Salmo salar*) inoculado con 10^2 , 10^3 y 10^4 ufc/g y analizado bajo la norma ISO 11290-2:1998/FDAM 1:2004(E).

Repetibilidad en Salmón del Atlántico (<i>Salmo Salar</i>)			
Nivel de Contaminación			
	10^2	10^3	10^4
Desviación Estándar (S_r)	0,055811496	0,04391898	0,01018323
Coefficiente de Variación (%)	3,327762309	1,61904804	0,320236551
Límite de repetibilidad	0,15627219	0,12297314	0,02851304

Tabla 8. Repetibilidad en Chorito (*Mytilus chilensis*) inoculado con 10^2 , 10^3 y 10^4 ufc/g y analizado bajo la norma ISO 11290-2:1998/FDAM 1:2004(E).

Repetibilidad en Chorito (<i>Mytilus chilensis</i>)			
Nivel de Contaminación			
	10^2	10^3	10^4
Desviación Estándar (S_r)	0,07151334	0,05922828	0,023883587
Coefficiente de Variación (%)	4,290041694	2,185068568	0,750873905
Límite de repetibilidad	0,200237351	0,165839183	0,066874045

Los resultados de reproducibilidad intralaboratorio obtenidos en Salmón del Atlántico (*Salmo salar*) y en Chorito (*Mytilus chilensis*) analizado bajo la norma ISO 11290-2:1998/FDAM 1:2004(E) se detallan en la Tabla 9 y 10. El desarrollo de los resultados se especifica en el ANEXO 6.

Tabla 9. Reproducibilidad en Salmón del Atlántico (*Salmo salar*) inoculado con 10^2 , 10^3 y 10^4 ufc/g y analizado bajo la norma ISO 11290-2:1998/FDAM 1:2004(E).

Reproducibilidad en Salmón del Atlántico (<i>Salmo Salar</i>)			
Nivel de Contaminación			
	10^2	10^3	10^4
Desviación Estándar (S_R)	0,07916394	0,04718632	0,03220129
Coefficiente de Variación (%)	4,85765001	1,748453685	1,017630821
Límite de repetibilidad	0,22165904	0,1321217	0,09016362

Tabla 10. Reproducibilidad en Chorito (*Mytilus chilensis*) inoculado con 10^2 , 10^3 y 10^4 ufc/g y analizado bajo la norma ISO 11290-2:1998/FDAM 1:2004(E).

Reproducibilidades Chorito (<i>Mytilus chilensis</i>)			
Nivel de Contaminación			
	10^2	10^3	10^4
Desviación Estándar (S_R)	0,124729994	0,064041139	0,033385442
Coeficiente de Variación (%)	7,339320643	2,350983166	1,051759537
Límite de repetibilidad	0,349243984	0,179315188	0,093479239

2.4 Incertidumbre del método cuantitativo

La incertidumbre (U) se midió en base a la desviación estándar de la reproducibilidad, como se indica en la Nch 3084.Of 2007.

$U=S_R \times k$, considerando un factor de cobertura de 2 con un nivel de confianza de 95%.

Los resultados de incertidumbre obtenidos en Salmón del Atlántico (*Salmo salar*) y en Chorito (*Mytilus chilensis*) analizado bajo la norma ISO 11290-2:1998/FDAM 1:2004(E) se detallan en la Tabla 11 y 12.

Tabla 11. Incertidumbre en Salmón del Atlántico (*Salmo salar*) inoculado con 10^2 , 10^3 y 10^4 ufc/g y analizado bajo la norma ISO 11290-2:1998/FDAM 1:2004(E).

Incertidumbre Salmón del Atlántico (<i>Salmo salar</i>)	
Nivel de contaminación	$U=S_R \times k$
10^2 ufc/g	0,158327888
10^3 ufc/g	0,094372642
10^4 ufc/g	0,064402589
Promedio	0,10570104

Tabla 12. Incertidumbre en Chorito (*Mytilus chilensis*) inoculado con 10^2 , 10^3 y 10^4 ufc/g y analizado bajo la norma ISO 11290-2:1998/FDAM 1:2004(E).

Incertidumbre Chorito (<i>Mytilus chilensis</i>)	
Nivel de contaminación	$U=S_R \times k$
10^2 ufc/g	0,249459988
10^3 ufc/g	0,128082277
10^4 ufc/g	0,064402589
Promedio	0,147314951

2.5 Exactitud del método cuantitativo

Se determinó mediante el porcentaje de recuperación, es decir, la cantidad de microorganismos que se recontaron en placa en comparación a la cantidad obtenida desde la muestra inoculada analizada con el método cuantitativo. Para el recuento en placa se utilizaró agar Plate count. La exactitud se calculó con los datos obtenidos por el Analista N°1, utilizando la media del crecimiento obtenido en la primera repetición con la segunda repetición.

El criterio de aceptación para la exactitud se estableció en base a la “Guía para la evaluación del desempeño de métodos de prueba microbiológicos”, de la Secretaría de Salud, de Mexico. Según esto, la exactitud debe ser entre 90% y 110% (CCAYAC, 2011).

Los resultados de exactitud obtenidos en Salmón del Atlántico (*Salmo salar*) y Chorito (*Mytilus chilensis*) analizados bajo la norma ISO 11290-2:1998/FDAM 1:2004(E) se detallan en las Tablas 13 y 14. El desarrollo de los resultados se especifica en el ANEXO 7.

Tabla 13. Exactitud en Salmón del Atlántico (*Salmo salar*) inoculado con 10^2 , 10^3 y 10^4 ufc/g y analizado bajo la norma ISO 11290-2:1998/FDAM 1:2004(E).

		Exactitud en Salmón del Atlántico (<i>Salmo salar</i>)
Nivel de contaminación	10^2	91,93%
	10^3	96,70%
	10^4	99,61%

Tabla 14. Exactitud en Chorito (*Mytilus chilensis*) inoculado con 10^2 , 10^3 y 10^4 ufc/g y analizado bajo la norma ISO 11290-2:1998/FDAM 1:2004(E).

		Exactitud en Chorito (<i>Mytilus chilensis</i>)	
Nivel de contaminación	10^2	90,71%	
	10^3	95,26%	
	10^4	99,13%	

3. Resumen resultados y promedios

Tabla 15. Resumen de resultados y promedios de la verificación del método cuantitativo en Salmón del Atlántico (*Salmo salar*).

Verificación Método Cuantitativo en Salmón del Atlántico (<i>Salmo salar</i>)						
Nivel de contaminación	Repetibilidad		Reproducibilidad		Exactitud	Incertidumbre
	S_r	CV%	S_R	CV%	%	U=S_R x k
10²	0,055811496	3,327762309	0,07916394	4,85765001	91,928593	0,158327888
10³	0,04391898	1,61904804	0,04718632	1,748453685	96,69975	0,094372642
10⁴	0,01018323	0,320236551	0,03220129	1,017630821	99,614494	0,064402589
Promedios	0,036637902	1,7556823	0,052850517	2,541244839	96,080946	0,10570104

Tabla 16. Resumen de resultados y promedios de la verificación del método cuantitativo en Chorito (*Mytilus chilensis*).

Verificación Método en Cuantitativo Chorito (<i>Mytilus chilensis</i>)						
Nivel de contaminación	Repetibilidad		Reproducibilidad		Exactitud	Incertidumbre
	S_r	CV%	S_R	CV%	%	U=S_R x k
10²	0,07151334	4,290041694	0,124729994	7,339320643	90,71117402	0,249459988
10³	0,05922828	2,185068568	0,064041139	2,350983166	95,2615437	0,128082277
10⁴	0,023883587	0,750873905	0,033385442	1,051759537	99,13185656	0,064402589
Promedios	0,051541736	2,408661389	0,074052192	3,580687782	95,0348581	0,147314951

DISCUSIÓN

Las enfermedades transmitidas por alimentos (ETA), constituyen un problema creciente en salud pública, cuya magnitud real se desconoce. Algunas de las causas que contribuyen a este aumento son, la emergencia y reemergencia de patógenos, cambios poblacionales, cambios en sistemas productivos, de procesamiento y consumo de los alimentos (Olea, 2007). Además, la globalización de los mercados y la complejidad de la cadena alimentaria hacen que la entrega de alimentos seguros sea cada vez más difícil (Díaz *et al.*, 2012).

En Chile, el sector pesquero ha aumentado considerablemente sus exportaciones en los últimos años, llegando a diferentes mercados, los cuales tienen requisitos sanitarios que se deben cumplir. Es por esto, que Sernapesca cumple un rol importante con el Programa de Aseguramiento de Calidad, ya que a través de éste, se garantiza la calidad sanitaria de los productos. Sin embargo, para cumplir con esto, los laboratorios que trabajan en dicho programa, deben utilizar métodos validados internacionalmente por organismos de acreditación internacional.

La validación puede definirse como el conjunto de procesos desarrollados para la confirmación mediante examen y la aportación de evidencias objetivas que demuestren el cumplimiento de ciertos requisitos para el uso específico previsto de los procedimientos analíticos. Los métodos normalizados, al ser desarrollados por un organismo de normalización, son aceptados generalmente por el sector técnico en cuestión y son considerados como métodos de referencia. Para ser aplicados en un laboratorio, no se requiere realizar una validación del método, pero sí la confirmación de su correcta aplicación (Camaró *et al.*, 2015). Esto se debe a que en cada laboratorio existen condiciones diferentes, y dicha confirmación se realiza mediante el proceso de verificación. Es por esto que es importante realizar la verificación de los métodos con el fin de evaluar el rendimiento de estos en el laboratorio donde se quiera implementar. Así, a través de este proceso, el laboratorio puede definir y establecer con qué precisión, exactitud e incertidumbre trabaja, en el caso de los métodos cuantitativos. Y asegurar que puede detectar un nivel bajo de bacterias, en el caso de los métodos cualitativos.

En este estudio se demostró con objetividad que los métodos descritos en las normas ISO 11290-1 e ISO 11290-2, implementados y verificados en Chorito y Salmon del Atlántico en el Laboratorio de Inocuidad de los Alimentos del Departamento de Medicina Preventiva Animal de la Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias de la Universidad de Chile, cumplen con los requisitos para ser verificados según la norma ISO/WD 16140-3, otorgándole al laboratorio un valor adicional.

Es importante el proceso de verificación, ya que a través de este, se evalúan parámetros que indican la calidad de las mediciones que realiza el laboratorio y además le sirve a este como un control de calidad interno. Los laboratorios son un componente esencial del sistema de control de los alimentos, por lo que es relevante en el área de análisis microbiológico de los alimentos, la entrega de resultados confiables, ya que en base a estos se toman decisiones acerca de la inocuidad y calidad sanitaria de los alimentos. De esta manera, constituyen una forma de aportar al control de las enfermedades transmitidas por alimentos, contribuyendo a la salud pública.

CONCLUSIÓN

- El método cualitativo descrito en la norma ISO 11290-1:1996/FDAM 1:2004(E), implementado y verificado, tanto en Salmón del Atlántico (*Salmo salar*) como en Chorito (*Mytilus chilensis*) dio positivo en un 100% para ambas matrices. Es decir, el método, implementado en el Laboratorio de Inocuidad de los Alimentos, en ambas matrices es capaz de detectar un nivel suficientemente bajo del *Listeria monocytogenes*.
- El método cuantitativo descrito en la norma ISO 11290-2:1998/FDAM 1:2004(E), implementado y verificado, tanto en Salmón del Atlántico (*Salmo salar*) como en Chorito (*Mytilus chilensis*), cumplió con todos los criterios de aceptación para la verificación de un método cuantitativo según la norma ISO/WD 16.140-3.
- En relación al método cuantitativo, tiene una precisión adecuada tanto en condiciones de repetibilidad como en condiciones de reproducibilidad intralaboratorio. Es decir, la dispersión de los datos bajo ambas condiciones es aceptable, por lo tanto, el método cuantitativo implementado en el laboratorio tiene la capacidad de proporcionar resultados consistentes cuando se aplican diferentes condiciones. En ambas matrices, al aumentar el nivel de contaminación, aumentó la precisión. También fue mayor la precisión en condiciones de repetibilidad que en condiciones de reproducibilidad intralaboratorio para ambas matrices.
- La exactitud del método cuantitativo también es adecuada, por lo que los resultados obtenidos se acercan al valor esperado. Tanto en Salmón del Atlántico como en Chorito, al aumentar el nivel de contaminación se observó que aumentó también la exactitud.
- El rendimiento de ambos métodos en el Laboratorio de Inocuidad de los Alimentos, en las matrices estudiadas, dio resultados satisfactorios según los parámetros propuestos. Así, el laboratorio puede demostrar que es capaz de realizar ambos

método de manera satisfactoria en las matrices probadas. Es decir, el laboratorio es capaz de entregar resultados confiables, sean estos cualitativos o cuantitativos.

BIBLIOGRAFÍA

ACHA, P.; SZYFRES, B. 2001. Listeriosis. **In:** Zoonosis y enfermedades transmisibles comunes al hombre y a los animales. 3ra ed. Organización Panamericana de la Salud. Washington D.C, EUA. Vol 1.

ADAMS, M.; MOSS, M. 2008. Bacterial Agents of Foodborne Illness. **In:** Food Microbiology. 3ra ed. RSC publishing. Cambridge, Reino Unido. pp. 182-268.

ALCAYAGA, S.; HOTT, B. 2008. Listeria y listeriosis: un desafío de los nuevos tiempos. RevChil Salud Pública Vol 12 (3): 188-195.

ANGULO, F.; GRIFFIN, P.; HOEKSTRA, R.; JONES, J.; ROY, S.; SCALLAN, E.; TAUXE, R.; WIDDOWSON. 2011. Foodborne Illness Acquired in the United States—Major Pathogens. Emerging Infect. Dis. Vol. 17 (1): 7-15.

ANÓN. 2007. Listeriosis. Center for Food Security & Public Health, Universidad Estatal de Iowa. Ames, Iowa, Estados Unidos. [en línea]. <<http://www.cfsph.iastate.edu/Factsheets/pdfs/listeriosis.pdf>> [consulta: 15-06-2015].

AOAC. 2012. Appendix J: AOAC INTERNATIONAL Methods Committee Guidelines for Validation of Microbiological Methods for Food and Environmental Surfaces. [en línea]. <http://www.aoac.org/imis15_prod/AOAC_Docs/StandardsDevelopment/eoma_appendix_j.pdf> [consulta: 03-06-2015].

BRAVO, P.; COX, F. 2014. Sector pesquero: evolución de sus desembarques, uso y exportación en las últimas décadas. [en línea]. <http://www.odepa.cl/wp-content/files_mf/1392915533Sectorpesca201402.pdf> [consulta 02-07-15].

CAMARÓ, M.; CATALÁ, V.; GIMENO, C.; MARTÍNEZ, R.; OCETE, M.; OLOMOS, P. 2015. Validación y verificación analítica de los métodos microbiológicos. Enferm Infecc Microbiol Clin. 33(7):e31–e36.

CCAYAC. COMISIÓN DE CONTROL ANALÍTICO Y AMPLIACIÓN DE COBERTURA. 2011. Guía para la evaluación del desempeño de métodos de prueba microbiológicos. Mexico. Secretaría de Salud.14 p.

CHING CHAI, L.; JAMAL, H; THONG, K. 2013. Detection and isolation of *Listeria* spp. and *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat foods with various selective culture media. Food Control Vol32: 19–24.

DÍAZ, J.; FUENTES, R.; GARCÍA, M.; OLEA, A.; VAQUERO, A. 2012. Vigilancia de brotes de enfermedades transmitidas por alimentos en Chile. Rev Chilena Infetol 29(5): 504-510.

ENAC. ENTIDAD NACIONAL DE ACREDITACIÓN. 2012. Análisis microbiológico: Documento aclaratorio. [en línea]. <<http://www.enac.es/documents/7020/704de3a8-e6c0-48b1-a326-c6f96bbcbcd>> [consulta: 01-08-2015].

FAO. ORGANIZACIÓN DE LAS NACIONES UNIDAS PARA LA ALIMENTACIÓN Y LA AGRICULTURA. 2012. El estado mundial de la pesca y la acuicultura. FAO. Roma, Italia. pp. 32-78.

FAO.; OMS. 2009. Directrices sobre la terminología analítica. pp.12-13.

FAO.; OMS. 2013.Comisión del codex alimentarius. Manual de procedimientos. 21a ed. Roma, Italia. 82p.

ISO. INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARIZATION. ISO 11290-1:1996/FDAM 1:2004(E). Microbiology of food and animal feeding stuffs-Horizontal method for the detection and enumeration of *Listeria monocytogenes*-Part 1: Detection method. Suiza, 2004.

ISO. INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARIZATION. ISO 11290-2:1998/FDAM 1:2004(E). Microbiology of food and animal feeding stuffs-Horizontal method for the detection and enumeration of *Listeria monocytogenes*-Part 2: Enumeration method. Suiza, 2004.

ISO. INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARIZATION. ISO/WD 16140-3. Microbiology of the food chain- Method validation- Part 3: Protocol for the verification of reference and alternative methods implemented in a single laboratory. Suiza, 2014.

ISO. INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARIZATION. ISO/DTS 21748. Guide to the use of repeatability, reproducibility and trueness estimates in measurement uncertainty estimation. Suiza, 2002.

JEWELL, K.; MCLAUCHLIN, J.; MITCHELL, R.; SMERDON, W. 2004. *Listeria monocytogenes* and listeriosis: a review of hazard characterisation for use in microbiological risk assessment of foods. Int J FoodMicrobiol Vol92: 15– 33.

LADO, B.; YOUSEF, A. 2007.Characteristics of *Listeria monocytogenes* important to food processors. **In:** Marth, E.; Ryser, E. Listeria, Listeriosis, and Food Safety. 3ra ed. CRC press., Boca Raton, Estados Unidos. pp157-177.

MINSAL. MINISTERIO DE SALUD. 2010. Informe de Listeria, Chile 2010. [en línea]. <<http://epi.minsal.cl/epi/html/bolets/reportes/Listeriosis/InformeListeria2010.pdf>> [consulta: 29-09-2015].

MINSAL. MINISTERIO DE SALUD. 2014. Enfermedades transmitidas por los alimentos (ETA) <http://epi.minsal.cl/epi/html/bolets/reportes/Entericas/Informe_Entericas_SE402014.pdf#page=5> [consulta: 29-09-2015].

NCh. NORMA CHILENA OFICIAL. NCh 3084.Of2007. Microbiología de los alimentos de consumo humano y animal – Guía para la estimación de la incertidumbre de las mediciones para determinaciones cuantitativas.

NCh. NORMA CHILENA OFICIAL. NCh 3162/2.Of2008. Microbiología de los alimentos para consumo humano y animal - Guía para la preparación y producción de medios de cultivo – Parte 2: Guía práctica para los ensayos de rendimiento de medios de cultivo.

OIE. ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE SANIDAD ANIMAL. 2004. Manual de las pruebas de diagnóstico y de las vacunas para los animales terrestres (mamíferos, aves y abejas). Comisión de estándares biológicos de la OIE. Paris, Francia. Vol. 2

OLEA, A. 2007. Las Enfermedades Transmitidas por Alimentos: un fenómeno frecuente de magnitud real desconocida. El Vigía 25. Boletín de Vigilancia en Salud Pública. 41 p.

OMS. ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD. 2005. Manual de Bioseguridad en el Laboratorio. OMS. Ginebra, Suiza. pp. 9-20.

ORSI, R.; WANG, S. 2013. *Listeria*. **In:** Morris, G.; Potter, M. Foodborne Infections and Intoxications. 4ta ed. Elsevier. New York, USA. pp.199-216.

SERNAPESCA. SERVICIO NACIONAL DE PESCA Y ACUICULTURA. 2012. Exportación de moluscos bivalvos a la U.E Enero-Marzo 2012. [en línea]. <http://www.sernapesca.cl/index.php?option=com_remository&Itemid=246&func=download&id=5976&chk=a609a5169b4ce2e71176796730c246d8&no_html=1> [consulta: 28-07-2015].

SERNAPESCA. SERVICIO NACIONAL DE PESCA Y ACUICULTURA. 2014a. Programa de aseguramiento de calidad. Manual de procedimientos, sección 1. [en línea]. <http://www.sernapesca.cl/index.php?option=com_remository&Itemid=246&func=download&id=219&chk=df404b198735eb5e8c065dc7d2856786&no_html=1> [consulta: 01-08-2015].

SERNAPESCA. SERVICIO NACIONAL DE PESCA Y ACUICULTURA. 2014b. Programa de aseguramiento de calidad. Norma técnica, sección 1. [en línea]. <http://www.sernapesca.cl/index.php?option=com_remository&Itemid=246&func=startdown&id=232> [consulta: 01-08-2015].

SERNAPESCA. SERVICIO NACIONAL DE PESCA Y ACUICULTURA. 2014c. Programa de laboratorios. Manual de procedimientos, sección 1. <http://www.sernapesca.cl/index.php?option=com_remository&Itemid=246&func=startdown&id=193> [consulta: 01-08-2015].

SUBPESCA. SUBSECRETARIA DE PESCA Y ACUICULTURA. 2014. Informe Sectorial de Pesca y Acuicultura Enero 2014. [en línea]. <http://www.subpesca.cl/publicaciones/606/articles-82312_documento.pdf> [consulta: 03-08-2015].

ANEXOS

ANEXO 1



CERTIFICADO N° 66

Santiago, 21 de diciembre de 2015

El Comité de Bioseguridad de la Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias de la Universidad de Chile, ha revisado proyecto de memoria de título: "IMPLEMENTACIÓN Y VERIFICACIÓN DE UN MÉTODO CUALITATIVO Y UNO CUANTITATIVO PARA EL ANÁLISIS DE *Listeria monocytogenes* EN PRODUCTOS HIDROBIOLÓGICOS", de la Srta. Catalina Martínez H., cuya profesora guía es la Dra. Javiera Cornejo K.

En el proyecto se estipulan entre otras, las siguientes medidas de Bioseguridad:

- 1.- El estudiante recibirá una inducción en normas de bioseguridad. Se utilizará vestimenta adecuada para realizar el trabajo en el laboratorio, delantal, gafas, guantes etc. Restricción de acceso al laboratorio.
- 2.- La manipulación de las bacterias se efectuará en un gabinete de bioseguridad
- 3.- Todos los materiales, cultivos contaminados serán descontaminados y autoclavados para ser eliminados.

El proyecto fue revisado por el comité en base a las especificaciones contenidas en el "Manual de Bioseguridad en el Laboratorio, de la Organización Mundial de la Salud (versión 2005)" y que previenen los riesgos para las personas, los animales y el medioambiente.

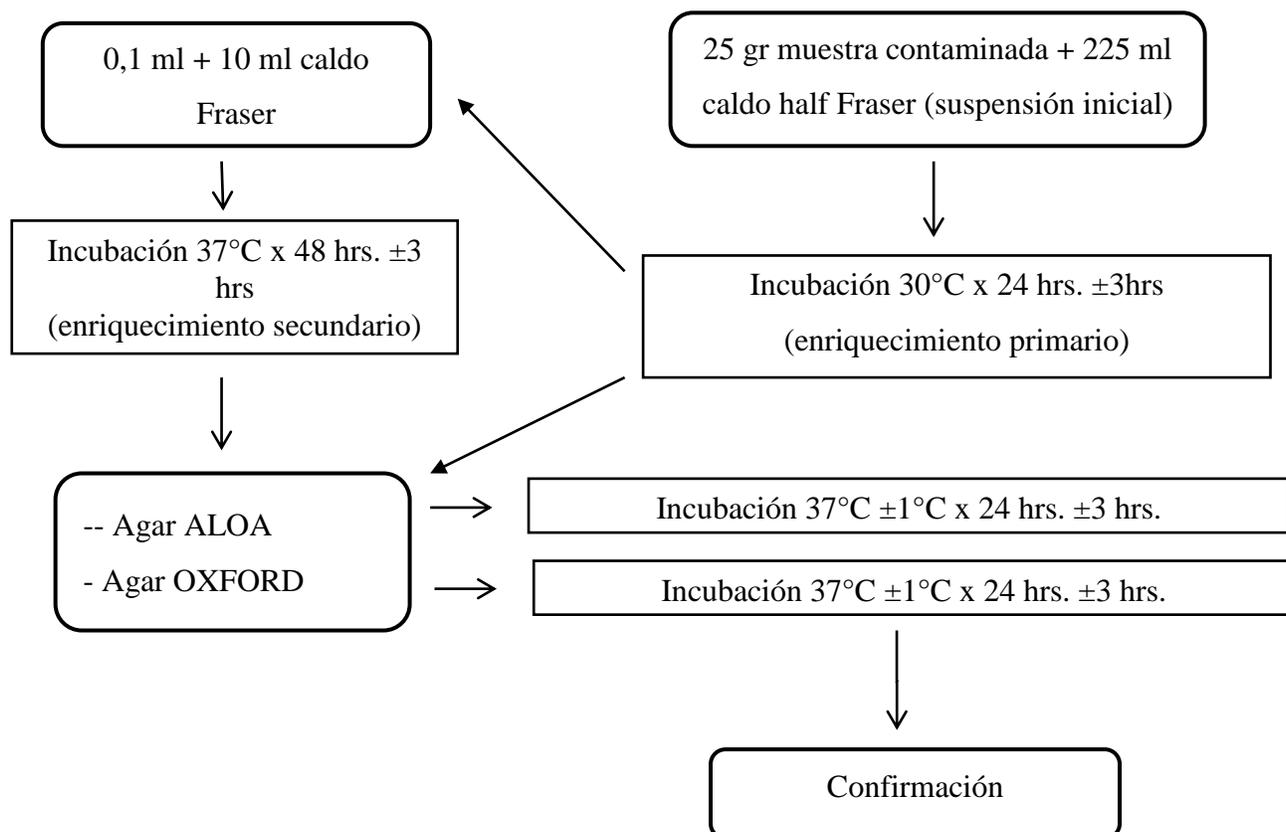


LISETTE LAPIERRE ACEVEDO

Coordinadora
Comité de Bioseguridad

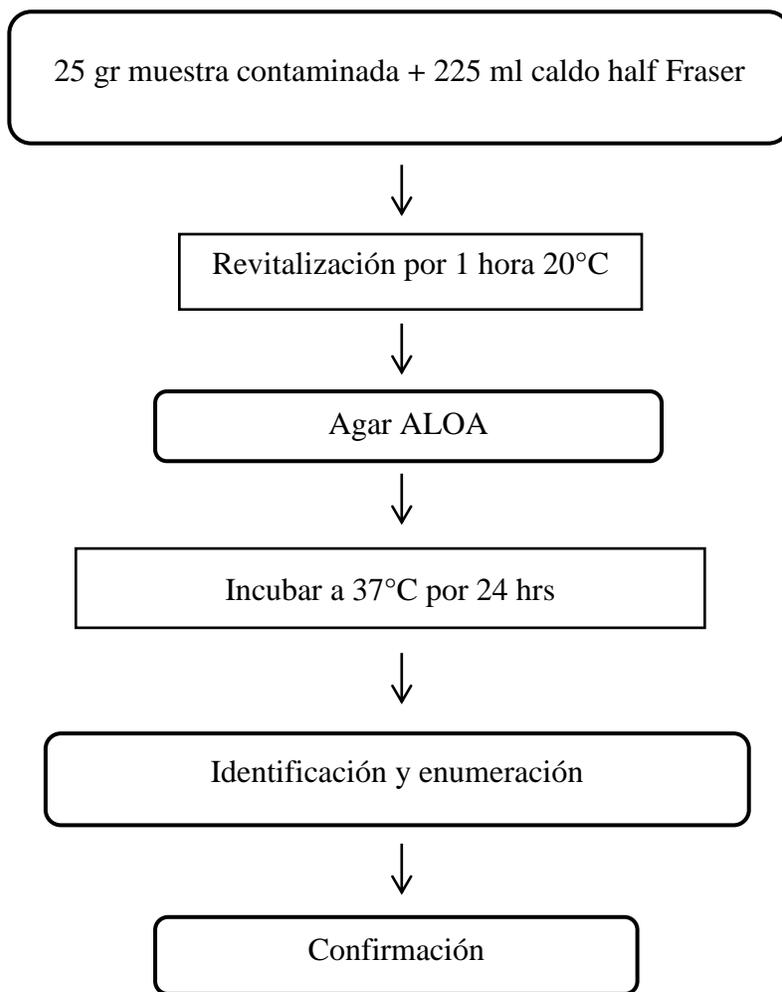
ANEXO 2

Esquema de la metodología cualitativa, según la norma ISO 11290-1:1996/FDAM 1:2004(E)



ANEXO 3

Esquema de la metodología cuantitativa, según la norma ISO 11290-2:1998/FDAM 1:2004(E).



ANEXO 4

Promedio y desviación estándar de las absorvancias en espectrofotómetro a 625 nm, de 10 suspensiones de *L. monocytogenes* ajustadas a un patrón estándar de turbidez 0,5 McFarland.

Suspensiones ajustadas a estándar de turbidez de 0,5 McFarland	Absorvancia a 625 nm	Diferencia entre absorvancia de la suspensión y el tubo con agua destilada
1	0,08	0,079
2	0,066	0,065
3	0,062	0,061
4	0,09	0,089
5	0,105	0,104
6	0,098	0,097
7	0,08	0,079
8	0,067	0,066
9	0,088	0,087
10	0,091	0,09
		Promedio 0,0817
		Desviación Estándar 0,014337596

Absorvancia a 625 nm del tubo de ensayo con agua destilada: 0,001

ANEXO 5

Repetibilidad en Salmón del Atlántico (*Salmo salar*) inoculado con 10^2 ufc/g y analizado bajo la norma ISO 11290-2:1998/FDAM 1:2004(E).

Código muestra	Repetición 1 (ufc/g)	Repetición 2 (ufc/g)	log (repetición 1)	log (repetición 2)	Desviación Estándar	Sr	Sr x 2,8
1a	50	40	1,698970004	1,602059991	0,068525727	0,055811496	0,15627219
2a	45	60	1,653212514	1,77815125	0,088345028		
3a	40	45	1,602059991	1,653212514	0,036170295		
4a	40	50	1,602059991	1,698970004	0,068525727		
5a	50	50	1,698970004	1,698970004	0		
6a	35	45	1,544068044	1,653212514	0,077176794		
7a	45	35	1,653212514	1,544068044	0,077176794		
8a	60	60	1,77815125	1,77815125	0		
9a	45	55	1,653212514	1,740362689	0,06162448		
10a	65	50	1,812913357	1,698970004	0,080570117		

Repetibilidad en Salmón del Atlántico (*Salmo salar*) inoculado con 10^3 ufc/g y analizado bajo la norma ISO 11290-2:1998/FDAM 1:2004(E).

Código muestra	Repetición 1 (ufc/g)	Repetición 2 (ufc/g)	log (repetición 1)	log (repetición 2)	Desviación Estándar	Sr	Sr x 2,8
1b	460	580	2,662757832	2,763427994	0,071184554	0,04391898	0,12297314
2b	490	460	2,69019608	2,662757832	0,019401771		
3b	500	470	2,698970004	2,672097858	0,019001477		
4b	480	450	2,681241237	2,653212514	0,019819301		
5b	510	680	2,707570176	2,832508913	0,088345028		
6b	470	570	2,672097858	2,755874856	0,059239283		
7b	550	640	2,740362689	2,806179974	0,046539848		
8b	530	470	2,72427587	2,672097858	0,036895426		
9b	400	500	2,602059991	2,698970004	0,068525727		
10b	590	610	2,770852012	2,785329835	0,010237367		

Repetibilidad en Salmón del Atlántico (*Salmo salar*) inoculado con 10^4 ufc/g y analizado bajo la norma ISO 11290-2:1998/FDAM 1:2004(E).

Código muestra	Repetición 1 (ufc/g)	Repetición 2 (ufc/g)	log (repetición 1)	log (repetición 2)	Desviación Estándar	Sr	Sr x 2,8
1c	1600	1500	3,204119983	3,176091259	0,019819301	0,01018323	0,02851304
2c	1400	1500	3,146128036	3,176091259	0,021187198		
3c	1600	1600	3,204119983	3,204119983	0		
4c	1500	1600	3,176091259	3,204119983	0,019819301		
5c	1600	1600	3,204119983	3,204119983	0		
6c	1500	1500	3,176091259	3,176091259	0		
7c	1500	1400	3,176091259	3,146128036	0,021187198		
8c	1500	1600	3,176091259	3,204119983	0,019819301		
9c	1400	1400	3,146128036	3,146128036	0		
10c	1500	1500	3,176091259	3,176091259	0		

Repetibilidad en Chorito (*Mytilus chilensis*) inoculado con 10^2 ufc/g y analizado bajo la norma ISO 11290-2:1998/FDAM 1:2004(E).

Código muestra	Repetición 1 (ufc/g)	Repetición 2 (ufc/g)	log (repetición 1)	log (repetición 2)	Desviación Estándar	Sr	Sr x 2,8
1a	35	50	1,544068044	1,698970004	0,109532226	0,07151334	0,20023735
2a	45	35	1,653212514	1,544068044	0,077176794		
3a	50	45	1,698970004	1,653212514	0,032355432		
4a	50	40	1,698970004	1,602059991	0,068525727		
5a	40	35	1,602059991	1,544068044	0,041006499		
6a	45	40	1,653212514	1,602059991	0,036170295		
7a	35	50	1,544068044	1,698970004	0,109532226		
8a	65	45	1,812913357	1,653212514	0,112925549		
9a	60	65	1,77815125	1,812913357	0,024580521		
10a	50	70	1,698970004	1,84509804	0,103328125		

Repetibilidad en Chorito (*Mytilus chilensis*) inoculado con 10^3 ufc/g y analizado bajo la norma ISO 11290-2:1998/FDAM 1:2004(E).

Código muestra	Repetición 1 (ufc/g)	Repetición 2 (ufc/g)	log (repetición 1)	log (repetición 2)	Desviación Estándar	Sr	Sr x 2,8
1b	510	400	2,707570176	2,602059991	0,074606967	0,05922828	0,16583918
2b	440	630	2,643452676	2,799340549	0,110229372		
3b	550	590	2,740362689	2,770852012	0,021559206		
4b	570	420	2,755874856	2,62324929	0,093780437		
5b	440	590	2,643452676	2,770852012	0,090084934		
6b	550	500	2,740362689	2,698970004	0,029269048		
7b	500	580	2,698970004	2,763427994	0,045578681		
8b	430	430	2,633468456	2,633468456	0		
9b	460	580	2,662757832	2,763427994	0,071184554		
10b	660	550	2,819543936	2,740362689	0,055989596		

Repetibilidad en Chorito (*Mytilus chilensis*) inoculado con 10^4 ufc/g y analizado bajo la norma ISO 11290-2:1998/FDAM 1:2004(E).

Código muestra	Repetición 1 (ufc/g)	Repetición 2 (ufc/g)	log (repetición 1)	log (repetición 2)	Desviación Estándar	Sr	Sr x 2,8
1c	1800	1500	3,255272505	3,176091259	0,0559896	0,02388359	0,06687404
2c	1600	1500	3,204119983	3,176091259	0,0198193		
3c	1500	1500	3,176091259	3,176091259	0		
4c	1500	1600	3,176091259	3,204119983	0,0198193		
5c	1500	1600	3,176091259	3,204119983	0,0198193		
6c	1600	1400	3,204119983	3,146128036	0,0410065		
7c	1500	1500	3,176091259	3,176091259	0		
8c	1500	1400	3,176091259	3,146128036	0,0211872		
9c	1700	1500	3,230448921	3,176091259	0,03843667		
10c	1400	1300	3,146128036	3,113943352	0,02275801		

ANEXO 6

Reproducibilidad en Salmón del Atlántico (*Salmo salar*) inoculado con 10^2 ufc/g y analizado bajo la norma ISO 11290-2:1998/FDAM 1:2004(E).

Código muestra	Analista 1 (ufc/g)	Analista 2 (ufc/g)	log analista 1	log analista 2	Desviación Estándar	Sr	Sr x 2,8
1a	50	65	1,698970004	1,812913357	0,080570117	0,07916394	0,22165904
2a	45	50	1,653212514	1,698970004	0,032355432		
3a	40	40	1,602059991	1,602059991	0		
4a	40	35	1,602059991	1,544068044	0,041006499		
5a	50	40	1,698970004	1,602059991	0,068525727		
6a	35	25	1,544068044	1,397940009	0,103328125		
7a	45	45	1,653212514	1,653212514	0		
8a	60	20	1,77815125	1,301029996	0,337375675		
9a	45	35	1,653212514	1,544068044	0,077176794		
10a	65	55	1,812913357	1,740362689	0,051301069		

Reproducibilidad en Salmón del Atlántico (*Salmo salar*) inoculado con 10^3 ufc/g y analizado bajo la norma ISO 11290-2:1998/FDAM 1:2004(E).

Código muestra	Analista 1 (ufc/g)	Analista 2 (ufc/g)	log analista 1	log analista 2	Desviación Estándar	Sr	Sr x 2,8
1b	460	440	2,662757832	2,643452676	0,013650806	0,04718632	0,1321217
2b	490	460	2,69019608	2,662757832	0,019401771		
3b	500	590	2,698970004	2,770852012	0,050828255		
4b	480	400	2,681241237	2,602059991	0,055989596		
5b	510	600	2,707570176	2,77815125	0,049908356		
6b	470	600	2,672097858	2,77815125	0,074991073		
7b	550	540	2,740362689	2,73239376	0,005634884		
8b	530	430	2,72427587	2,633468456	0,064210538		
9b	400	530	2,602059991	2,72427587	0,086419676		
10b	590	500	2,770852012	2,698970004	0,050828255		

Reproducibilidad en Salmón del Atlántico (*Salmo salar*) inoculado con 10^4 ufc/g y analizado bajo la norma ISO 11290-2:1998/FDAM 1:2004(E).

Código muestra	Analista 1 (ufc/g)	Analista 2 (ufc/g)	log analista 1	log analista 2	Desviación Estándar	Sr	Sr x 2,8
1c	1600	1300	3,204119983	3,113943352	0,063764507	0,03220129	0,09016362
2c	1400	1300	3,146128036	3,113943352	0,022758008		
3c	1600	1300	3,204119983	3,113943352	0,063764507		
4c	1500	1500	3,176091259	3,176091259	0		
5c	1600	1600	3,204119983	3,204119983	0		
6c	1500	1400	3,176091259	3,146128036	0,021187198		
7c	1500	1600	3,176091259	3,204119983	0,019819301		
8c	1500	1200	3,176091259	3,079181246	0,068525727		
9c	1400	1600	3,146128036	3,204119983	0,041006499		
10c	1500	1400	3,176091259	3,146128036	0,021187198		

Reproducibilidad en Chorito (*Mytilus chilensis*) inoculado con 10^2 ufc/g y analizado bajo la norma ISO 11290-2:1998/FDAM 1:2004(E).

Código muestra	Analista 1 (ufc/g)	Analista 2 (ufc/g)	log analista 1	log analista 2	Desviación Estándar	Sr	Sr x 2,8
1a	35	60	1,544068044	1,77815125	0,165521822	0,12472999	0,34924398
2a	45	65	1,653212514	1,812913357	0,112925549		
3a	50	40	1,698970004	1,602059991	0,068525727		
4a	50	55	1,698970004	1,740362689	0,029269048		
5a	40	80	1,602059991	1,903089987	0,212860351		
6a	45	35	1,653212514	1,544068044	0,077176794		
7a	35	80	1,544068044	1,903089987	0,25386685		
8a	65	35	1,812913357	1,544068044	0,190102343		
9a	60	75	1,77815125	1,875061263	0,068525727		
10a	50	40	1,698970004	1,602059991	0,068525727		

Reproducibilidad en Chorito (*Mytilus chilensis*) inoculado con 10^3 ufc/g y analizado bajo la norma ISO 11290-2:1998/FDAM 1:2004(E).

Código muestra	Analista 1 (ufc/g)	Analista 2 (ufc/g)	log analista 1	log analista 2	Desviación Estándar	Sr	Sr x 2,8
1b	510	460	2,707570176	2,662757832	0,031687113	0,06404114	0,17931519
2b	440	600	2,643452676	2,77815125	0,095246275		
3b	550	640	2,740362689	2,806179974	0,046539848		
4b	570	460	2,755874856	2,662757832	0,065843679		
5b	440	690	2,643452676	2,838849091	0,13816613		
6b	550	640	2,740362689	2,806179974	0,046539848		
7b	500	530	2,698970004	2,72427587	0,017893949		
8b	430	520	2,633468456	2,716003344	0,058360979		
9b	460	550	2,662757832	2,740362689	0,054874921		
10b	660	500	2,819543936	2,698970004	0,085258644		

Reproducibilidad en Chorito (*Mytilus chilensis*) inoculado con 10^4 ufc/g y analizado bajo la norma ISO 11290-2:1998/FDAM 1:2004(E).

Código muestra	Analista 1 (ufc/g)	Analista 2 (ufc/g)	log analista 1	log analista 2	Desviación Estándar	Sr	Sr x 2,8
1c	1800	1400	3,255272505	3,146128036	0,077176794	0,03338544	0,09347924
2c	1600	1500	3,204119983	3,176091259	0,019819301		
3c	1500	1300	3,176091259	3,113943352	0,043945206		
4c	1500	1400	3,176091259	3,146128036	0,021187198		
5c	1500	1600	3,176091259	3,204119983	0,019819301		
6c	1600	1400	3,204119983	3,146128036	0,041006499		
7c	1500	1200	3,176091259	3,079181246	0,068525727		
8c	1500	1400	3,176091259	3,146128036	0,021187198		
9c	1700	1700	3,230448921	3,230448921	0		
10c	1400	1500	3,146128036	3,176091259	0,021187198		

ANEXO 7

Exactitud en Salmón del Atlántico (*Salmo salar*) inoculado con 10^2 ufc/g y analizado bajo la norma ISO 11290-2:1998/FDAM 1:2004(E).

Código muestra	Recuento ALOA analista 1 (ufc/g)	Recuento en placa (ufc/ml)	log ALOA	log RP	log ALOA/log RP *100
1a	45	60	1,65321251	1,77815125	92,9736721
2a	52,5	60	1,7201593	1,77815125	96,7386381
3a	42,5	60	1,62838893	1,77815125	91,5776388
4a	45	60	1,65321251	1,77815125	92,9736721
5a	50	70	1,69897	1,84509804	92,0802021
6a	40	70	1,60205999	1,84509804	86,827906
7a	40	70	1,60205999	1,84509804	86,827906
8a	60	75	1,77815125	1,87506126	94,8316348
9a	50	75	1,69897	1,87506126	90,608773
10a	57,5	75	1,75966784	1,87506126	93,8458854
Promedio:					91,9285929

Exactitud en Salmón del Atlántico (*Salmo salar*) inoculado con 10^3 ufc/g y analizado bajo la norma ISO 11290-2:1998/FDAM 1:2004(E).

Código muestra	Recuento ALOA analista 1 (ufc/g)	Recuento en placa (ufc/ml)	log ALOA	log RP	log ALOA/log RP *100
1b	520	610	2,71600334	2,78532984	97,5110132
2b	475	610	2,67669361	2,78532984	96,0996998
3b	485	610	2,68574174	2,78532984	96,4245493
4b	465	610	2,66745295	2,78532984	95,7679381
5b	595	685	2,77451697	2,83569057	97,8427263
6b	520	685	2,71600334	2,83569057	95,7792564
7b	595	685	2,77451697	2,83569057	97,8427263
8b	500	640	2,69897	2,80617997	96,1795049
9b	450	640	2,65321251	2,80617997	94,5489077
10b	600	640	2,77815125	2,80617997	99,0011787
Promedio:					96,6997501

Exactitud en Salmón del Atlántico (*Salmo salar*) inoculado con 10^4 ufc/g y analizado bajo la norma ISO 11290-2:1998/FDAM 1:2004(E).

Código muestra	Recuento ALOA analista 1 (ufc/g)	Recuento en placa (ufc/ml)	log ALOA	log RP	log ALOA/log RP *100
1c	1550	1615	3,1903317	3,20817253	99,4438944
2c	1450	1615	3,161368	3,20817253	98,5410846
3c	1600	1615	3,20411998	3,20817253	99,8736806
4c	1550	1615	3,1903317	3,20817253	99,4438944
5c	1600	1510	3,20411998	3,17897695	100,790916
6c	1500	1510	3,17609126	3,17897695	99,9092259
7c	1450	1510	3,161368	3,17897695	99,4460814
8c	1550	1530	3,1903317	3,18469143	100,177106
9c	1400	1530	3,14612804	3,18469143	98,789101
10c	1500	1530	3,17609126	3,18469143	99,7299527
				Promedio	99,6144936

Exactitud en Chorito (*Mytilus chilensis*) inoculado con 10^2 ufc/g y analizado bajo la norma ISO 11290-2:1998/FDAM 1:2004(E).

Código muestra	Recuento ALOA analista 1 (ufc/g)	Recuento en placa (ufc/ml)	log ALOA	log RP	log ALOA/log RP *100
1a	42,5	65	1,62838893	1,81291336	89,8216632
2a	40	65	1,60205999	1,81291336	88,3693633
3a	47,5	65	1,67669361	1,81291336	92,4861414
4a	45	65	1,65321251	1,81291336	91,190928
5a	37,5	70	1,57403127	1,84509804	85,3088147
6a	42,5	70	1,62838893	1,84509804	88,2548729
7a	42,5	70	1,62838893	1,84509804	88,2548729
8a	55	75	1,74036269	1,87506126	92,8163108
9a	62,5	75	1,79588002	1,87506126	95,7771382
10a	60	75	1,77815125	1,87506126	94,8316348
				Promedio:	90,711174

Exactitud en Chorito (*Mytilus chilensis*) inoculado con 10^3 ufc/g y analizado bajo la norma ISO 11290-2:1998/FDAM 1:2004(E).

Código muestra	Recuento ALOA analista 1 (ufc/g)	Recuento en placa (ufc/ml)	log ALOA	log RP	log ALOA/log RP *100
1b	455	720	2,6580114	2,8573325	93,0242245
2b	535	720	2,72835378	2,8573325	95,4860446
3b	570	720	2,75587486	2,8573325	96,4492183
4b	495	720	2,6946052	2,8573325	94,3049226
5b	515	650	2,71180723	2,81291336	96,4056437
6b	525	650	2,7201593	2,81291336	96,7025627
7b	540	650	2,73239376	2,81291336	97,1375017
8b	430	745	2,63346846	2,87215627	91,689595
9b	520	745	2,71600334	2,87215627	94,5632161
10b	605	745	2,78175537	2,87215627	96,8525077
				Promedio:	95,2615437

Exactitud en Chorito (*Mytilus chilensis*) inoculado con 10^4 ufc/g y analizado bajo la norma ISO 11290-2:1998/FDAM 1:2004(E).

Código muestra	Recuento ALOA analista 1 (ufc/g)	Recuento en placa (ufc/ml)	log ALOA	log RP	log ALOA/log RP *100
1c	1650	1630	3,21748394	3,2121876	100,164883
2c	1550	1630	3,1903317	3,2121876	99,3195943
3c	1500	1630	3,17609126	3,2121876	98,8762691
4c	1550	1630	3,1903317	3,2121876	99,3195943
5c	1550	1680	3,1903317	3,22530928	98,9155278
6c	1500	1680	3,17609126	3,22530928	98,4740061
7c	1500	1680	3,17609126	3,22530928	98,4740061
8c	1450	1545	3,161368	3,18892848	99,1357448
9c	1600	1545	3,20411998	3,18892848	100,476383
10c	1350	1545	3,13033377	3,18892848	98,1625579
				Promedio	99,1318566