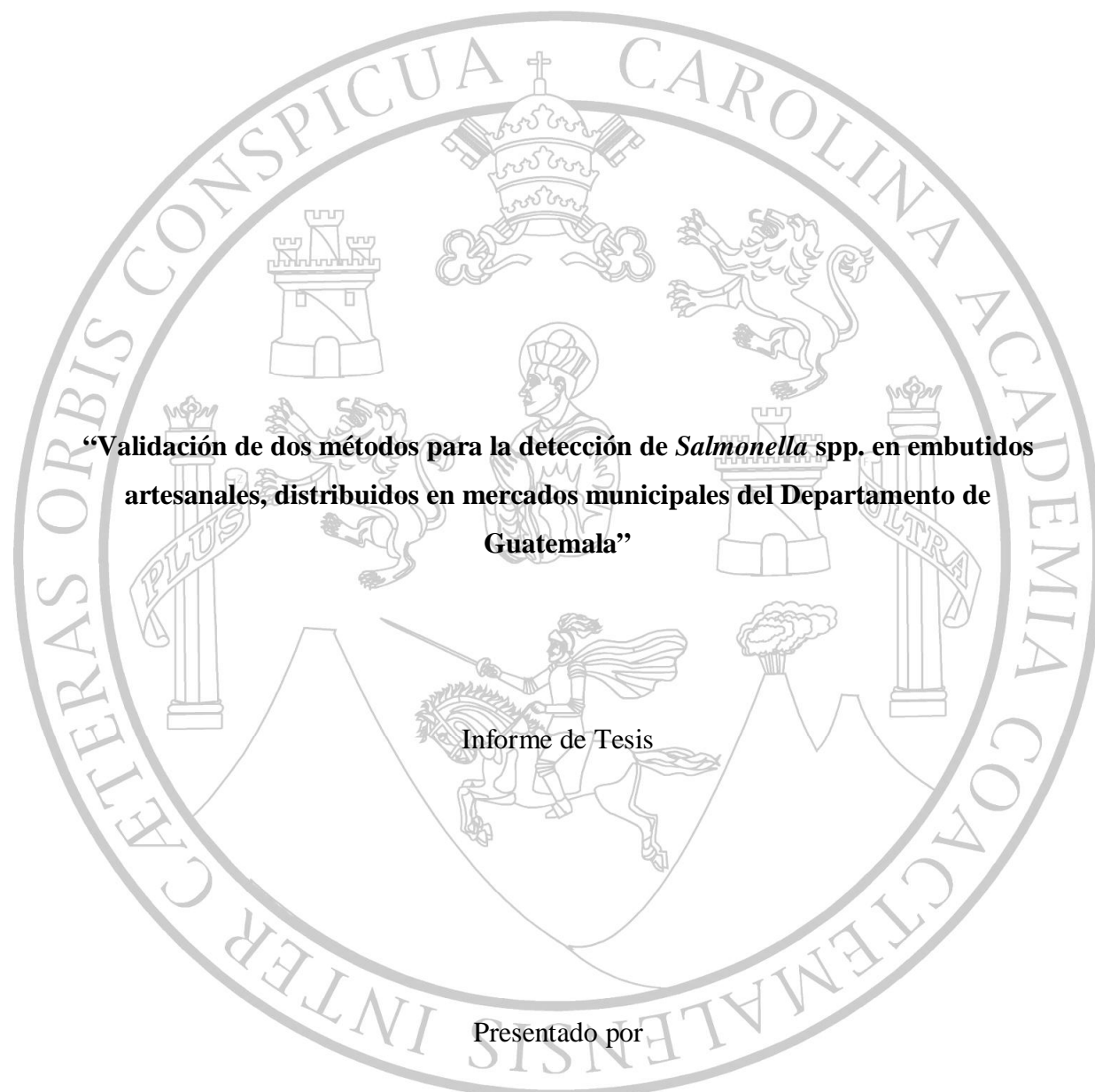


UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACIA



Heydee Carolina Alvarez Pinto
Química Bióloga

Guatemala, Febrero 2013

JUNTA DIRECTIVA

Oscar C3bar Pinto, Ph. D.	Decano
Lic. Pablo Ernesto Oliva Soto, M.A.	Secretario
Licda Liliana Vides de Urizar	Vocal I
Dr. Sergio Alejandro Melgar Valladares	Vocal II
Lic. Luis Antonio G3lvez Sanchinelli	Vocal III
Br. Fayver Manuel de Le3n Mayorga	Vocal IV
Br. Maily Graciela C3rdova Aud3n	Vocal V

ACTO QUE DEDICO A:

A Dios

A mi hijo

A mis padres y hermanos

A mi novio

A mis sobrinos

AGRADECIMIENTOS

A mi hijo por ser fuente de inspiración y hacer que todo este camino sea mucho más fácil.

A Mynor por estar siempre a mi lado, compartir y apoyarme en lo buenos y malos momentos.

A mis asesoras por su valiosa colaboración y por compartir sus conocimientos.

A mis amigos y compañeros de trabajo de la Unidad de Microbiología de Alimentos del Laboratorio Nacional de Salud, por apoyarme y por su colaboración.

Al Laboratorio Nacional de Salud, por permitirme realizar este estudio.

INDICE

1. Resumen	1
2. Introducción	3
3. Antecedentes	5
3.1. Generalidades	5
3.2. Clasificación	6
3.3. Distribución	6
3.4. Epidemiología	7
3.5. Patogenicidad	7
3.6. Salmonelosis	8
3.7. Detección e identificación de <i>Salmonella</i> spp en carne cruda	9
3.8. Instituciones encargadas del desarrollo y difusión de métodos para la detección de <i>Salmonella</i> spp	11
3.9. Embutidos	15
3.10. Estudios anteriores	18
3.11. Validación de métodos	19
4. Justificación	22
5. Objetivos	24
6. Hipótesis	25
7. Materiales y métodos	26
8. Resultados	35
9. Discusión de resultados	43
10. Conclusiones	48
11. Recomendaciones	49
12. Referencias	50
13. Anexos	55

1. RESUMEN

El proceso para la elaboración de embutidos artesanales es laborioso debido a la manipulación de la carne y la materia prima utilizada en su fabricación. El manufacturador debe amasar y embutir la carne en las vísceras o la funda, para darle su forma característica, adicionado a esto la falta de higiene y la poca calidad de la materia prima hacen que sea más fácil la contaminación por microorganismos, especialmente por aquellos que son patógenos. Todos estos son factores que influyen en la inocuidad del producto final. Uno de los parámetros que se evalúa en el control microbiológico de los embutidos es la presencia de *Salmonella*.

La detección de este patógeno a lo largo del tiempo se ha realizado por una diversidad de métodos, los cuales deben garantizar la recuperación, detección e identificación de este microorganismo. De aquí radica la importancia de que los laboratorios encargados del análisis de embutidos, apliquen métodos validados y acordes a las condiciones del laboratorio.

En Guatemala el monitoreo de alimentos lo hace principalmente el Laboratorio Nacional de Salud, entidad que necesitaba métodos validados adicionales a los que poseía, dichos métodos fueron adaptados a las condiciones del laboratorio para que estos pudieran ser ejecutados sin complicaciones (disponibilidad de medios de cultivo y tiempo de entrega de resultados).

Por las razones anteriormente mencionadas, se hizo necesario la realización de este estudio, el cual tenía por objetivos: validar dos métodos microbiológicos para la detección de *Salmonella* spp en embutidos artesanales, los cuales son el método referido por el Departamento de Agricultura de los Estados Unidos (USDA por sus siglas en inglés) “Aislamiento e Identificación de *Salmonella* en carne, productos lácteos y huevos”, cuyo principio es el enriquecimiento de la bacteria en los caldos Rappaport Vassiliadis (RV) y caldo Tetracionato (TT). Además de su aislamiento en el medio Xilosa Lisina Tergitol-4 (XLT4) y agar Sulfa Verde Brillante (el cual no fue utilizado en este estudio), y el método

referido por la Organización Internacional de Estandarización (ISO por sus siglas en inglés) “Detección de *Salmonella* en productos cárnicos ISO 6579” el cual, tiene como principio el enriquecimiento de la bacteria en los caldos Rappaport Soya (RVS) y caldo Tetracionato Mueller-Kauffman (MKTT), además de su aislamiento en los medios Xilosa Lisina D-Tergitol (XLD) y Agar Verde Brillante (VB). Ambos métodos fueron validados en el Laboratorio Nacional de Salud. El estándar de oro que se utilizó para la validación fue el método del Departamento de Salud y Servicios Humanos de Estados Unidos (FDA/CFSAN, BAM Capítulo 5).

Este estudio fue realizado en dos fases: la primera consistió en muestrear embutidos artesanales, en ocho mercados municipales del departamento de Guatemala. En esta fase se analizaron los embutidos por los dos métodos validados, se obtuvo un valor de kappa igual a 0.9760 (IC 95% = 0.9291 a 1%), una sensibilidad del 100% y una especificidad del 98.59%, para ambos métodos. En la segunda fase del estudio se muestrearon embutidos comerciales, los cuales fueron analizados por los tres métodos con lo que se aseguró la inocuidad de los mismos, posteriormente se les inoculó la cepa de *Salmonella* ATCC 13076, estas muestras fueron utilizadas para determinar el límite de detección (6 UFC/ml), la repetibilidad y la reproducibilidad, las cuales fueron mayores a un 90% con un valor $p = 0.9097$.

Con los resultados obtenidos en la validación de los dos métodos, se pudo concluir que los cambios introducidos por el Laboratorio Nacional de Salud, no fueron significativos ($p = 0.9097$). Los métodos son repetibles y reproducibles, además de presentar una buena sensibilidad y especificidad.

2. INTRODUCCION

Actualmente en Guatemala se ha ido incrementando la producción de embutidos elaborados de forma artesanal, esto debido al aumento poblacional y las necesidades económicas de la misma, por lo que la elaboración de estos embutidos se convierte en una forma de ingreso económico; a su vez la demanda de este tipo de alimentos crece cada día más ya que estos son de consumo popular. El procedimiento para la elaboración de estos alimentos es crítico porque requiere de mucha manipulación por parte del trabajador, lo cual hace que sea más fácil la contaminación por microorganismos, especialmente por aquellos que son patógenos, tal es el caso de *Salmonella* spp. Las posibilidades de contaminación se elevan si hay falta de prácticas de higiene por parte de los trabajadores.

Tanto las características de los embutidos artesanales, como la presencia de otros microorganismos adquiridos durante el proceso de elaboración y la manipulación de estos, hacen difícil la recuperación y detección de *Salmonella* spp, por lo que se requiere la aplicación de métodos que aseguren la detección e identificación de este microorganismo.

El presente estudio pretende validar dos métodos microbiológicos para la identificación y detección de *Salmonella* spp en embutidos artesanales. Los métodos a validar son: El método de la Organización Internacional de Estandarización, Detección de *Salmonella* en productos cármicos (ISO 6579) y el método del Departamento de Agricultura de los Estados Unidos (USDA), Aislamiento e Identificación de *Salmonella* en carne, productos lácteos y huevos. Ambos métodos presentaron modificaciones introducidas por el Laboratorio Nacional de Salud (LNS), con el propósito de adecuarlos a las condiciones manejadas por dicha institución. De esta manera se proporcionarían métodos validados adicionales a los que posee la institución. Para dicha validación se utilizó como referencia el método estándar para la detección de *Salmonella* spp del Departamento de Salud y Servicios Humanos de Estados Unidos (FDA /CFSSAN, BAM capítulo 5).

Para alcanzar los objetivos del estudio, se obtuvo para cada método los siguientes parámetros: Especificidad del método, sensibilidad del método, repetibilidad,

reproducibilidad y límite de detección. Estos parámetros se basaron en la guía para validación de ensayos de laboratorio, elaborada por la Organización Guatemalteca de Acreditación (OGA), y que es utilizada por los laboratorios para la obtención de lineamientos que ayuden a la selección del método adecuado según las condiciones y necesidades de estos.

Los resultados obtenidos a través de este estudio brindaron, como primer punto: La validación de dos métodos. Segundo: con la validación de los dos métodos se logró proporcionar los servicios de análisis en el laboratorio para aquellos usuarios que necesitaban comercializar a nivel regional y/o exportar sus productos, los cuales debían cumplir con los estándares internacionales y americanos para la calidad de los mismos, a su vez se obtuvieron métodos validados que brindaron resultados confiables y certeros. Por último se pudo inferir que las modificaciones efectuadas en los métodos no afectaron la recuperación del microorganismo en comparación con el método estándar de oro.

3. ANTECEDENTES

3.1 Generalidades

En el año 1874, Budd fue el primero en relacionar que las fiebres tifoideas habían sido transmitidas por el agua y los alimentos. *Salmonella typhi*, agente etiológico de la enfermedad, fue descubierta en el año 1880 por Eberth (James, 2000). Daniel E. Salmon en 1885 reportó y aisló por primera vez *Salmonella*, de un cerdo y nombro al microorganismo como *Bacterium choleraesuis* (comúnmente conocida como *Salmonella entérica* serovar *Choleraesuis*) (James, 2000). El nombre del género fue acuñado por Lignieres en el año 1900 en honor a los trabajos realizados por el doctor D. E. Salmon, bacteriólogo americano que caracterizó los bacilos causantes del cólera del cerdo (Quilez M, 2002)

Salmonella es un género que pertenece a la familia *Enterobacteriaceae*, que agrupa a los bacilos gram negativo; móviles (algunas especies son inmóviles), aerobios y anaerobios facultativos, catalasa positivo, oxidasa negativo. Utilizan los azúcares por fermentación con producción de gas, usualmente citrato de Simmons positivo (*S.typhi* es una excepción importante porque no produce gas y es citrato de Simons negativo) (Koneman E., Washington J., Stephen A., William J., Procop G.,...Woods G., 2006). Esta bacteria es capaz de duplicarse en 25 minutos a la temperatura del cuerpo humano (36.5 a 37.2°C), crece en un rango de actividad de agua de 0.945 a 0.999, no soporta el pH menor de 4, puede sobrevivir congelado, incluso hasta tres semanas en refrigeración (Aleman, 2002). Su amplia distribución en el ambiente se debe a la existencia de numerosos reservorios a partir de los cuales se pueden contaminar los alimentos y el agua. Este microorganismo es el agente causal de varias enfermedades infecciosas entre las que se encuentran las fiebres entéricas, gastroenteritis, toxiinfecciones alimentarias y la fiebre tifoidea (Koneman E. y otros, 2006).

3.2 Clasificación

La nomenclatura de clasificación para *Salmonella*, se ha basado en los lugares de origen de su aislamiento, por ejemplo; este sistema de clasificación se ha descontinuado y se ha clasificado a esta bacteria basándose en la susceptibilidad hacia diferentes bacteriófagos, características bioquímicas (biovares o biotipos), su resistencia hacia los antibióticos o metales pesados, y por su sensibilidad a las bacteriocinas o por la producción de bacteriocinas. Todas estas características son dependientes del ADN extra cromosómico que normalmente se mantiene estable durante todo el período que dura un brote infeccioso (Quilez M, 2002).

La clasificación más importante del género *Salmonella*, se basa en las características serológicas de la bacteria de acuerdo al esquema de Kauffman-White, el cual fue concebido por White y desarrollado por Kauffman. La serología se basa en los antígenos: somático (O), flagelar (H) y capsular (Vi), existen más de 2463 serotipos de *Salmonella*, los cuales están divididas en dos especies: *Salmonella entérica* y *Salmonella bongori*; *S. entérica* contiene 2443 serotipos y *S. bongori* contiene 20 serotipos, *S. entérica* ahora contiene seis subespecies, las cuales se han designado con números romanos: I (*entérica*), II (*salamae*), IIIa (*arizonae*), IIIb (*diarizanae*), IV (*houtenae*), y VI (*indica*) (Bhunja, 2008).

3.3 Distribución

El hábitat primario de *Salmonella*, es el tracto intestinal de animales, como las aves, reptiles, animales de granja, humanos y ocasionalmente insectos, sin embargo, puede encontrarse en otras partes del cuerpo. En la forma intestinal, el microorganismo puede ser excretado en las heces de donde puede ser transmitido por insectos o por otras criaturas que pueden portarlo a un gran número de lugares, cuando el agua y los alimentos han sido contaminados por un vector, estos son ingeridos nuevamente por otros animales y los humanos, los cuales se contagian y se vuelven portadores, continuando el ciclo de contaminación e infección para otros organismos (James, 2000).

Salmonella puede permanecer viable en el material fecal, fuera del huésped y transmitirse a los humanos a través del contacto de las manos con los animales o con todo aquello que haya sido contaminado por las heces. La contaminación puede extenderse a

todo un rebaño de animales durante el transporte al matadero, o bien en las cuadras del mismo durante el período de descanso de los animales antes del sacrificio (James, 2000).

3.4 Epidemiología

Durante el período de 1983 a 1992 en Canadá, los serovares de *Salmonella* más comúnmente aislados en humanos fueron *S. typhimurium* y *S. hadar*. Desde 1989 hasta 1994 en España, *S. enteritidis* ha estado implicada en el 80% de las intoxicaciones alimenticias descritas y provocadas por este microorganismo (Carramiñana, 1997).

Recientemente un reporte del Centro de Control de Enfermedades (CDC) indica que la incidencia de *Salmonella* entérica serovar *Typhimurium* ha decrecido significativamente (declinación del 42%) desde 1996-1998 hasta el 2005; sin embargo la incidencia de otros serotipos se sigue manteniendo tal es el caso de *S. entérica* serovar *Enteritidis* y *S. entérica* serovar *Heidelberg*, cada una de estas a aumentando en un 25% mientras que *S. entérica* serovar *Javiana* ha incrementado en un 82%. La distribución ubicua de *Salmonella* en el medio ambiente, su prevalencia en la cadena alimentaria global, su adaptabilidad fisiológica para cambiar según el ambiente, su resistencia a las condiciones adversas, su virulencia, la impredecible patogenicidad de sus cepas invasivas, la prevalencia de los biotipos resistentes a antibióticos, el continuo incremento global de los casos de salmonelosis humana y su impacto económico en la industria alimentaria, hacen necesaria la continuidad de la vigilancia y el control estricto, a todos los niveles, de la producción de alimentos (Bhunia, 2008).

“La ubicuidad de esta bacteria asegura la preeminencia de este patógeno en la cadena alimentaria global y su importancia como agente de toxicoinfecciones alimentarias” (D’Aoust, 1994, p.13). Este microorganismo es uno de los patógenos que se ingiere a través de alimentos y que ha causado mayor preocupación a nivel mundial tanto en países desarrollados como en los subdesarrollados (James, 2000).

3.5 Patogenicidad

Con base a diversas investigaciones, se puede afirmar que del 54% al 98% de las *Salmonellas* son enteropatógenicas y generalmente producen enterotoxinas y citotoxinas.

Como resultado de la acción de las citotoxinas: Se expone la glicoproteína subepitelial en la cual *Salmonella* se adhiere, constituyéndose un mecanismo de adherencia al tejido intestinal (Organización Panamericana de la Salud y Organización Mundial de la Salud, 1996).

La dosis infectiva suele ser variable, según el serovar, alimento involucrado y especie de *Salmonella* (especies adaptadas al hombre poseen dosis infectivas menores que las no adaptadas) en general, el número de células necesarias para desencadenar la sintomatología (nauseas, vómitos, dolores abdominales, cefaleas, escalofríos y diarreas) oscila entre 10^3 y 10^6 UFC/g de alimento para algunas especies, y entre 10^9 y 10^{11} para otras. Sin embargo, otros autores relatan haber constatado, a través de estudios epidemiológicos, que *Salmonella thyphimutium* fagotipo 10 puede presentar dosis infectivas de solamente una célula. La patogenicidad dependerá tanto de la cantidad de células infectivas presentes en el alimento como de las condiciones inmunológicas en que se encuentre la persona contagiada (OPS-OMS, 1996).

3.6 Salmonelosis

Es una infección intestinal causada por *Salmonella*, la cual ingresa al organismo por contaminación feco-oral, *Salmonellas* tíficas y paratíficas normalmente invaden la circulación, mientras que otras están limitadas a la mucosa intestinal, se multiplican dentro de vacuolas formadas en las células epiteliales. La invasión del epitelio intestinal se logra por la información codificada en el gen *invA* el cual es un operón que funciona como un gatillo de la invasividad de *Salmonella*. La virulencia y el crecimiento en las células hospederas pueden estar determinados por plásmidos de virulencia como el gen *spvC*, aunque la mayoría de las especies de *Salmonella* posee el gen *invA*, no todas las *Salmonellas* poseen el gen *spvC* (Valle P., Bernard L., 2000).

Los plásmidos de alto peso molecular son necesarios para que se dé la virulencia de varios tipos de *Salmonella enteritidis* capaces de producir enfermedad como: *S. enteritidis* var. *Typhimurium*, *S. enteritidis* var. *Dublin*, *S. enteritidis* var. *Pullorum* y *S. enteritidis* var. *Gallinarum*. La patogenicidad de *Salmonella* se ve aumentada por la producción de enterotoxinas y citotoxinas; las enterotoxinas actúan aumentando la permeabilidad vascular y están relacionadas con la membrana externa bacteriana. Existen dos tipos de

enterotoxinas: La termoestable que actúa rápidamente y la termolábil, cuya acción es más lenta (Valle P., Bernard L., 2000).

La salmonelosis humana (gastroenteritis por serovares de *Salmonella*, inespecíficos) presenta una destacada prevalencia a nivel mundial, y constituye una causa principal (en algunas regiones) del grupo de enfermedades de transmisión alimentaria con graves consecuencias económicas, sociales y sanitarias. Después de un período de incubación de 6 a 48 horas (18 a 36 horas promedio) la salmonelosis, cursa habitualmente en forma de gastroenteritis, con náuseas, vómitos, diarrea, dolor abdominal y fiebre. Sin embargo, la enfermedad invasiva, puede producir lesiones en múltiples órganos y ser mortal, o manifestarse en secuelas a largo plazo, de las que la más frecuente es la artritis reactiva, en forma de síndrome de Reiter, cuya incidencia ha sido estimada en el 5% de los casos (OPS-OMS, 1996).

3.7 Detección e identificación de *Salmonella* spp en carne cruda

Los medios de cultivo tradicionales para la detección de *Salmonella* en alimentos, incluyen un pre enriquecimiento en medio líquido, para facilitar la recuperación de la bacteria que ha sufrido daños o estrés al permanecer en alimentos crudos o procesados; un enriquecimiento selectivo, diseñado para inhibir el crecimiento de otros organismos diferentes a *Salmonella*, potenciando así su crecimiento. Posteriormente se realiza un aislamiento en medios sólidos (Quilez M, 2002).

3.7.1 Enriquecimiento no selectivo o pre-enriquecimiento

Esta etapa varía para cada tipo de alimento, ya que a partir de 1961 se inició el uso de Caldo Lactosado (CL), sin embargo, después de diversos estudios se concluyó que la composición de dicho medio no era tan crítica como se suponía, por lo cual se decidió el uso de Agua Peptonada Bufferada (BPW) como medio de cultivo para propósitos generales (Arévalo, 2003).

El objetivo del pre enriquecimiento es favorecer la reparación y el crecimiento de las células que han sido dañadas por las diferentes condiciones de tratamiento o almacenamiento al que pudo haber estado sometido el alimento previo al análisis (calor, congelación, desecación, presencia de preservantes, presión osmótica elevada o

fluctuaciones de temperatura). La importancia de esta fase radica en que si no se incluyera, no se detectarían células recuperables que pueden causar infección si el alimento es manipulado incorrectamente (Arévalo H, 2003).

El Departamento de Agricultura de los Estados Unidos (USDA por sus siglas en inglés), y la Administración de Alimentos y Medicamentos (FDA por sus siglas en inglés), recomiendan métodos que incluyen un pre enriquecimiento de 6 a 24 horas con Agua Peptonada Bufferada (Administración de Drogas y Alimentos de Estados Unidos (US FDA, 2010).

3.7.2 Enriquecimiento selectivo

En esta etapa se inocula el cultivo de pre-enriquecimiento en un medio de enriquecimiento con el fin de favorecer la proliferación de *Salmonella* al provocar una represión selectiva o inhibición del crecimiento de otros microorganismos competitivos tales como coliformes, *Proteus* y *Pseudomona*, que de estar presentes en el alimento analizado, superarían a *Salmonella*. Algunos procedimientos recomiendan más de un caldo selectivo y una temperatura igual a 43°C para garantizar el aislamiento de dicho patógeno.

El caldo Rappaport-Vassiliadis contiene agentes selectivos como el Verde de Malaquita y Cloruro de Magnesio que favorece el análisis de alimentos con una alta carga de microbiota competitiva, así como alimentos con baja carga microbiana. Como medios de cultivo se recomienda usar caldo Selenito-Cistina y Caldo Tetracionato. En los medios de enriquecimiento selectivo el Cloruro de Magnesio y el Verde de Malaquita favorecen el crecimiento de *Salmonella*, y provocan la represión de la microbiota competitiva (Arévalo H, 2003).

3.7.3 Aislamiento en medios sólidos selectivos y diferenciales

En esta fase también es usual emplear dos medios diferentes. Los agares selectivos poseen sustancias que inhiben el crecimiento de otros microorganismos, entre dichas sustancias están las sales biliares o el Desoxicolato (inhibidor de bacterias gram positivo), el Verde Brillante, etc. Estos medios también poseen indicadores que colorean las colonias o el medio que las rodea, para diferenciar caracteres bioquímicos de las unidades formadoras de colonias (UFC) que crezcan en él. Así, *Salmonella* generalmente es incapaz

de fermentar la lactosa y es capaz de producir Sulfuro de Hidrógeno, por lo que se recomienda el uso de dos medios sólidos selectivos y diferenciales distintos para evidenciar estas reacciones. Entre los medios sólidos empleados se encuentra el agar Sulfito Bismuto (BSA, en el que se observan colonias marrones o grises a negro a veces con brillo metálico, siendo el agar de elección para *Salmonella typhi*), el agar *Salmonella Shigella* (SS, en donde se observan colonias negras por la producción de sulfuro de hidrógeno que posteriormente reacciona con el hierro, formando sulfuro de hierro), el agar MacConkey (MK, donde se observan colonias incoloras, sin embargo, pueden presentarse biotipos lactosa positivo que aparecen de color rosado), el agar Verde Brillante (donde se observan colonias azul-verde a azules con o sin centro negro o completamente negras), el agar Rambach (colonias rojas brillantes, excepto *Salmonella typhi* que es incolora) entre otros medio (Arévalo H, 2003).

3.7.4 Confirmación bioquímica

Esta etapa consiste en inocular una colonia sospechosa de los aislamientos selectivos en los medios especiales para evidenciar características bioquímicas, tal es el caso de los medios TSI, LIA, Citrato, y las pruebas de Voges Proskauer, entre otros (US FDA, 2010).

3.7.5 Identificación serológica

Es una confirmación serológica de la bacteria aislada, la cual se basa en la capacidad de aglutinación de la bacteria frente a determinados antisueros específicos de los antígenos somáticos (O), flagelar (H) y capsular (Vi) (US FDA, 2010).

3.8 Instituciones encargadas del desarrollo y difusión de métodos para la detección de *Salmonella spp*

3.8.1 Administración de Drogas y Alimentos de Estados Unidos (FDA por sus siglas en inglés)

La FDA es la entidad internacional responsable de proteger la salud pública, asegurando la eficacia y seguridad de los medicamentos de consumo humano y veterinario, productos biológicos, dispositivos médicos, suministros de alimentos, cosméticos y productos que emiten radiación. La FDA se encarga de promover la salud pública,

ayudando a acelerar las innovaciones que fabrican las industrias farmacéuticas e industrias alimenticias, haciéndolos más seguros, eficaces y económicos. También brinda información sobre cómo utilizar medicamentos y alimentos para mejorar la salud del consumidor (US FDA, 2010)

3.8.1.1 Manual de Análisis Bacteriológicos (BAM por sus siglas en inglés)

El Manual de Análisis Bacteriológicos (BAM por sus siglas en inglés) de la Administración de Drogas y Alimentos de Estados Unidos (FDA por sus siglas en inglés) es una colección de procedimientos que suele ser preferido por los analistas de los laboratorios de la FDA, estos procedimientos son utilizados para la detección de patógenos (bacterias, virus, parásitos, levaduras y mohos) y toxinas bacterianas en una diversidad de productos cosméticos y alimenticios. Todos estos métodos han sido revisados previamente por científicos de la FDA así como por científicos fuera de la FDA (BAM, US FDA, 2010).

En un primer momento (1965, 1ra. Edición) el BAM, estaba destinado a ser solo un vehículo para la información y normalización dentro de la FDA. Sin embargo, la reputación del manual se propagó más allá de su utilidad dentro de la agencia. Las solicitudes de su copia aumentaron y se decidió hacer de disponibilidad general, se han realizado 8 ediciones del mismo habiendo revisiones entre cada una de ellas. Desde 1976 (4ª edición) el BAM ha sido publicado y distribuido por la AOAC, en 1998 (8ª edición) se decidió no solo crear la versión impresa sino también una versión en formato electrónico (versión en CD ROM). En el año 2000 se decidió publicar el manual en internet en el sitio de la FDA/CFSAN teniendo una versión del BAM online, cada sección del manual contiene las fechas de la última revisión tanto para el formato online como para el impreso el cual sigue siendo distribuido por la AOAC (US FDA, 2010).

3.8.1.2 Determinación de *Salmonella* spp según FDA/BAM capítulo 5

Fundamento del método: Este es un método utilizado y aprobado por los laboratorios de la FDA y sigue una serie de pasos fundamentales para la recuperación y detección de *Salmonella* en alimentos: Resucitación de las células microbianas estresadas, enriquecimiento de unas pocas células que puedan estar presentes en la muestra. El pre-

enriquecimiento en un medio no selectivo permite reparar el daño celular y diluir las sustancias tóxicas e inhibidoras, lo que proporciona factores nutricionales especialmente para el desarrollo de *Salmonella* spp posteriormente sigue la selección en cajas de agar que lleva a la obtención de cultivos puros, seguido de la identificación, la cual puede requerir de una serie de pruebas morfológicas, bioquímicas, serológicas e incluso pruebas moleculares (US FDA, 2010).

3.8.2 Departamento de Agricultura de Estados Unidos (USDA por sus siglas en inglés)

El 14 de marzo de 1977 se estableció el Servicio de la Calidad y Seguridad Alimentaria (FSQS por sus siglas en inglés). La APHIS le asignó al FSQS la responsabilidad e inspección de la inocuidad de la carne y los productos avícolas. El 17 de junio de 1981, el Servicio de Calidad y Seguridad Alimentaria (FSQS) fue rediseñada y nombrada como el Servicio de Inspección y Seguridad Alimentaria (FSIS) (Departamento de Agricultura (USDA), 2011).

La Guía del USDA contiene los protocolos actuales para las pruebas analíticas requeridas por el FSIS, las actividades de regulación en la carne, el pollo y productos avícolas. En concreto, los métodos microbiológicos del USDA se presentan para la preparación de muestras, aislamiento e identificación de los principales microorganismos patógenos transmitidos por los alimentos y sus toxinas, identificación de especies en tejido de carne, y la detección de materiales extraños y residuos de antimicrobianos (USDA, 2011). Los laboratorios del FSIS coordinan y realizan servicios de análisis de laboratorio para apoyar a los granjeros y agricultores, en las ramas de patología, química y microbiología, con el fin de asegurar que desde la granja hasta la mesa del consumidor los productos serán seguros, evaluándolos en los siguientes aspectos: Químico, microbiológico y patológico, para la seguridad alimentaria de la carne, las aves de corral y productos avícolas (USDA, 2011).

3.8.2.1 Aislamiento e identificación de *Salmonella* spp en carne, productos lácteos y huevos, USDA

Fundamento del método: El método para detección de *Salmonella* spp en alimentos y productos cárnicos del USDA, utiliza como primer paso el pre-enriquecimiento en un

medio no selectivo (Agua Peptonada Bufferada) que provee las condiciones adecuadas para recuperar células dañadas, debido a los diferentes procesos a los que fueron sometidos los alimentos, posteriormente el enriquecimiento selectivo es realizado en los medios Rappaport Vassiliadis (RV) y Caldo Tetrionato (TT), el pH bajo del medio RV combinado con el Verde Malaquita y su alta concentración de Cloruro de Magnesio le dan una característica selectiva para *Salmonella* spp y el medio TT inhibe a los microorganismos gram positivo además de poseer peptona, la que brinda soporte nutricional. Por último el aislamiento en medios sólidos selectivos permite aislar y diferenciar a la *Salmonella* de otros microorganismos. Al obtener colonias puras es posible realizar las pruebas bioquímicas confirmatorias (USDA, 2011).

3.8.3 Organización Internacional de Estandarización (ISO, por sus siglas en inglés)

La ISO es el mayor desarrollador mundial y editor de normas internacionales. ISO es una red de los institutos de normas nacionales de 163 países, un miembro por país, con una Secretaría Central en Ginebra, Suiza, que es la encargada de coordinar el sistema. ISO es una organización no gubernamental que forma un puente entre los sectores público y privado. Por otro lado, muchos de sus institutos miembros forman parte de la estructura gubernamental de sus países, o están obligados por su gobierno. Por otra parte, otros miembros tienen sus raíces únicamente en el sector privado, habiendo sido creada por las asociaciones nacionales de las asociaciones de la industria. Por lo tanto, ISO permite llegar a un consenso sobre las soluciones que satisfagan tanto las necesidades de negocio y las necesidades más amplias de la sociedad (Organización Internacional de Estandarización (ISO), 2010).

Las normas ISO poseen varios beneficios y utilidades: hacen que el desarrollo, fabricación y suministro de servicios y productos sean más eficientes, seguros y limpios. Facilitan el comercio entre países, proporciona a los gobiernos una base técnica para la evaluación de la conformidad en salud, seguridad y legislación medioambiental, protegen a los usuarios y consumidores de productos en general y permiten compartir avances tecnológicos (ISO, 2010).

3.8.3.1 Detección de *Salmonella* spp en productos cárnicos, norma ISO 6579

Fundamento del método: La norma ISO 6579:2002 describe un método horizontal para la detección de *Salmonella*, incluso para la detección de *Salmonella typhi* y *Salmonella paratyphi*. Este método es aplicable a los productos destinados al consumo humano y la alimentación de animales, y muestras ambientales en el ámbito de la producción de alimentos y manejo de alimentos (ISO, 2010). El método utiliza un pre-enriquecimiento en un medio no selectivo para recuperar las células dañadas y estresadas, siguiendo con un enriquecimiento selectivo el cual busca la inhibición de la microbiota acompañante (microorganismos gram positivo) y el aumento de células de *Salmonella*, el medio MKTT (Mueller Kauffman Tetratonato con Novobiocina) contiene Verde Brillante que inhibe el crecimiento de bacterias gram negativo, la Novobiocina inhibe el crecimiento de *Proteus* spp y la bilis estimula el crecimiento de *Salmonella* spp (CONDA, 2009). Por último se realiza el aislamiento de colonias en medios selectivos y la purificación de estas en agar nutritivo para su posterior confirmación bioquímica (Arévalo, 2003).

3.9 Embutidos

3.9.1 Definición

Los embutidos son los productos elaborados basados en una mezcla de carne animal permitida para el consumo humano, adicionado o no de complementos cárnicos, grasas comestibles, condimentos, especias y aditivos alimentarios, uniformemente mezclados, con agregado o no de sustancias aglutinantes y/o agua o hielo, introducida en vísceras naturales o en fundas artificiales y sometida o no a uno o más de los procesos tecnológicos de curado, cocción, deshidratación y ahumado (Comisión Guatemalteca de Normas, 1994, p. 2-3).

Durante la elaboración de embutidos se utilizan una gran variedad de condimentos: sal de cocina, ajo fresco, cebolla larga, laurel, tomillo, cerveza, etc. (Secretaría de Agricultura Ganadería Desarrollo Rural y Pesca, SAGARPA, 2000).

3.9.2 Clasificación

Los embutidos según su procesamiento serán clasificados como:

3.9.2.1 Embutidos cocidos: son los que en su procesamiento se someten a una temperatura interna mínima de 66°C por un mínimo de 15 minutos, en el caso de embutidos con diámetro no mayor de 60mm, y no menor de 70°C en el caso de embutidos con un diámetro mayor de 60 mm (COGUANOR, 1994, p.2)

3.9.2.2 Embutidos ahumados: es el embutido que ha sido expuesto a la acción del humo, procedente de la combustión, con el objeto de preservarlo y darle sabor, olor y color característico. El humo necesario para realizar el ahumado puede provenir de productos naturales como maderas no resinosas o de sustancias artificiales autorizadas (COGUANOR, 1994, p.2)

3.9.2.3 Embutidos cocidos y ahumados: son los embutidos que en su procesamiento combinan las dos técnicas anteriormente descritas (COGUANOR, 1994, p.3).

3.9.3 Elaboración

Antes de elaborar los embutidos es necesario calcular las cantidades adecuadas de cada componente (SAGARPA, 2000, p.2). La etapa de mayor riesgo de contaminación durante la elaboración de embutidos es el molido, ya que existe bastante manipulación y maniobras realizadas por parte de los operarios para depositar la carne en el embudo del molino, el cual puede ser de difícil acceso para su adecuada limpieza, es importante tener en cuenta que en la elaboración de embutidos, estos son sometidos a un proceso de secado, situación que propicia pérdida de peso por deshidratación y disminución del pH hasta 5.3, por otra parte, si se tiene en cuenta que las condiciones que favorecen el desarrollo de *Salmonella*, son pH mayor de 4.5 y actividad de agua (A_w) mayor a 0.95, se puede entender que estos productos constituyen un sustrato ideal para su supervivencia y probable proliferación de este microorganismo, más aun si se considera que si disminuye su A_w puede aumentar la resistencia de *Salmonella* (Salgado, 1999).

Los embutidos elaborados con víscera artificial y natural, deben ser sometidos a un proceso de cocción (fritura), ya que se ha descubierto que la temperatura necesaria para destruir a *S. tiphymurium* y otros serotipos se consigue a 60°C durante 30 minutos, siempre

que ésta temperatura se alcance en la parte interna del alimento (Organización Internacional de Especificaciones Microbiológicas para alimentos, 1983).

3.9.4 Embutidos artesanales

3.9.4.1 Chorizo y Longaniza

Se denomina chorizo a la mezcla de carne picada o troceada, de cerdo o cerdo y vacuna y tocino y/o grasa de cerdo, con adición de sal, pimienta y otras especias, condimentos y aditivos. La longaniza a diferencia del chorizo no contiene achiote.

La mezcla de todos los ingredientes es amasada y embutida en vísceras naturales o artificiales, que han sufrido un proceso de maduración o secado, con o sin ahumado. Estos embutidos se caracterizan por su coloración roja; los chorizos elaborados artesanalmente son de baja acidificación y la mayoría están madurados en frío y se caracterizan por no incorporar hidratos de carbono ni agentes curantes entre sus ingredientes. (Universidad Nacional Amazónica de Madre de Dios, 2010). La elaboración de chorizo y longaniza de manera artesanal, las materias primas contaminadas, la oportunidad de concurrencia de diversas fuentes y mecanismos de contaminación, las precarias condiciones de higiene en superficies y utensilios, la contaminación cruzada durante su preparación, expendio y el almacenamiento de los embutidos a temperatura ambiente o el cambio de temperaturas entre otras malas prácticas, pueden favorecer el ingreso y crecimiento de una diversidad de microorganismos; los chorizos y las longanizas suelen consumirse después de un tratamiento térmico terminal, sin embargo, si este no se aplica adecuadamente puede permitir la sobrevivencia de bacterias patógenas (Nacameh, Difusión vía Red de Computo semestral sobre Avances en Ciencia y Tecnología de la Carne, 2011).

3.9.4.2 Materia prima

La carne debe ser de fibra consistente bien coloreada y seca, la grasa empleada debe ser tocino fresco, para evitar un sabor rancio. La adición de sal es esencial, ya que influencia sobre las múltiples reacciones de los procesos de maduración y desecación, además reduce el valor de la aw, con lo que se restringe las condiciones de desarrollo de microorganismos indeseables (Ministerio de Agricultura Pesca y Alimentación (MAPA), 2004)

Las especias son ingredientes vegetales con carácter aromático que se utiliza en pequeñas cantidades para conferir sabor, aroma y color a los productos cárnicos. Además de sus propiedades aromáticas muchas especias son antioxidantes (como la pimienta negra y el jengibre) y antimicrobianas (como el ajo). Las vísceras sirven como envoltura en la fabricación de los embutidos. Estas pueden ser naturales o sintéticas; las naturales provienen del tracto digestivo de vacunos, ovinos y porcinos, antes de utilizarlas estas deben ser limpiadas y secadas, ya que pueden ser fuente de contaminación microbiana. Las fundas sintéticas pueden estar elaboradas de colágeno, celulosa y plástico, de estas las de colágeno son las más utilizadas (MAPA, 2004)

3.10 Estudios anteriores

Han sido pocos los estudios que se han enfocado hacia la comparación y validación de métodos tradicionales para la detección de *Salmonella* spp en este tipo de alimentos. En Guatemala durante el año 2000, *Salmonella* se encontraba entre los agentes microbianos principales identificados como causales de enfermedades de transmisión alimentaria, durante 1999 se reportaron 212 casos de Fiebre tifoidea por 17 áreas de salud. Seis de estas áreas aportaron el 80% del total de casos: Santa Rosa (21.4%), Suchitepéquez (20.4%), Sacatepéquez (11.7%), Quetzaltenango (9.2%) y Escuintla (9.2%) (Arévalo, 2003).

Las técnicas para el aislamiento de *Salmonella* están bien señaladas, sin embargo existen algunas combinaciones entre medios de cultivos de enriquecimiento y medios de cultivos selectivos que tiene mayor eficacia para la detección o aislamiento de microorganismos de este género (Velásquez, 2006).

Pérez C. realizó un estudio llamado “*Aislamiento de Salmonella en canales de aves y evaluación de la efectividad de diferentes medios de enriquecimiento y selectivos*” dicho estudio fue realizado por la Universidad de Zulia, Venezuela, dicho estudio demostró la efectividad de distintos medios de cultivo en diversas combinaciones, el mayor porcentaje de recuperación y positividad para *Salmonella* en el análisis de pollo lo obtuvo el medio Tetracionato, y la mejor combinación para medio de enriquecimiento y medio selectivo lo obtuvo el Caldo Selenito y el agar Salmonela Shigella (SS), en comparación con el Caldo Selenito y el agar Verde Brillante; los mayores casos de ocurrencia de positividad se encontraron para las combinaciones de medios de enriquecimiento y medios selectivos

Tetracionato y agar Bismuto sulfito (BSA) y Tetracionato con el agar Xilosa Lisina Desoxicolato (XLD). El análisis separado de los medios de cultivo selectivos, demostró un mejor desempeño y mayor positividad para los medios BSA y XLD (Pérez, 2004).

En el año de 1995 en la ciudad de México se realizó un estudio en tres tipos de chorizo demostrándose que más del 45% de las muestras analizadas dieron positivo para *Salmonella* spp y una muestra dio positivo para material fecal presente en las manos de los operarios (de un total de 109 muestras), utilizando el método para detección de *Salmonella* en productos cárnicos, ISO 6579, además se encontró una mayor recuperación de la bacteria en el caldo Mueller Kauffman sobre el Caldo Selenito; en cuanto a los medios selectivos se utilizó el agar VB, BSA y XLD, de estos tres se obtuvo mayor recuperación en el agar XLD (Salgado, 1999).

Un estudio realizado por Bello Pérez y colaboradores, demostró la influencia de la temperatura sobre el crecimiento de *Salmonella*, varias muestras de chorizo fueron recolectadas en mercados establecidos y mercados ambulantes, la temperatura de mantenimiento de las muestras era entre 25 a 28°C. De las 221 muestras de chorizos y longanizas analizados el 40.7% dio positivo para *Salmonella*, la mayor parte de las muestras fue recolectada en mercados donde los embutidos son elaborados a nivel artesanal o casero lo que no garantiza una excelente calidad (Pérez, 1991). Otro estudio realizado en México durante junio del 2008 a mayo del 2009 demostró la susceptibilidad de los embutidos artesanales frente a la contaminación por patógenos, se muestrearon 50 chorizos y 50 longanizas vendidos en diferentes carnicerías de Guadalajara, de las cuales 18 muestras de chorizo (36%) y 24 muestras de longaniza (24%) fueron positivas para *Salmonella*. La positividad global de *Salmonella* fue del 42%, estos hallazgos demostraron que el chorizo y la longaniza procedentes de carnicerías se encontraban fuera de norma con una alta positividad para *Salmonella*, constituyéndose los embutidos un vehículo para este patógeno (Nacameh, 2011).

3.11 Validación de métodos

Los métodos estándar tradicionales, usados para identificar grupos de organismos o géneros, se basan principalmente en la obtención de cultivos puros a partir de la habilidad de los microorganismos para crecer en un medio adecuado, estos son métodos bastantes

provechosos, aunque requieren una gran cantidad de tiempo, muestras y costos elevados (Ordoñez M., Rojas D., 2007).

Durante la validación y comparación de métodos es necesario medir una serie de parámetros que indicarán si el método es el adecuado o no, según sean las condiciones del laboratorio y los objetivos que este pretenda alcanzar. Los métodos de ensayo microbiológicos cualitativos, son métodos en los que el resultado se expresa en términos de ausencia/presencia; para este tipo de métodos, deberán medirse los siguientes parámetros, durante su comparación: Especificidad, sensibilidad, límite de detección, reproducibilidad y la repetibilidad. La especificidad, se define como la capacidad del método para diferenciar precisa y específicamente el compuesto de interés, en presencia de los demás componentes, que se espera estén presentes en la matriz de la muestra (Ordoñez M., 2007).

La especificidad también suele definirse como la fracción del número total de cultivos o colonias negativas que son asignados correctamente con el método utilizado (Oficina Guatemalteca de Acreditación (OGA), 2000).

La sensibilidad, se define como la fracción del número total de cultivos o colonias positivas que son asignados correctamente con el método utilizado (OGA, 2007, p.21). En cuanto al Límite de detección, este es un número expresado en unidades de concentración que describe el más bajo nivel de concentración de la sustancia o microorganismo que puede determinarse como estadísticamente diferente del blanco analítico (Ordoñez M., 2007, p.23). Otra definición se refiere a este como la concentración mínima del microorganismo en la matriz de una muestra que puede ser detectada, pero no necesariamente cuantificada, bajo condiciones analíticas específicas (OGA, 2007).

Un parámetro muy importante de evaluar en un método analítico es la Repetibilidad, esta es una medida de la precisión del método cuando éste se realiza por el mismo analista, el mismo día, mismos reactivos, mismo instrumento (precisión dentro del ensayo) (OGA, 2007). Este término incluye las contribuciones de cualquier parte del procedimiento que varía durante su ejecución, incluidas las contribuciones procedentes de errores gravimétricos y volumétricos conocidos, de la heterogeneidad del material de prueba y de la variación en las etapas de tratamiento del análisis (OGA, 2007).

El control de calidad es importante tanto en salud pública como en la industria. Con el desarrollo de técnicas microbiológicas de diagnóstico, ha sido posible realizar un control

apropiado de las características de inocuidad. La verificación de los métodos sirve como soporte de aseguramiento de la calidad en los laboratorios brindando confianza y solidez a los resultados emitidos por el mismo (Ordoñez, 2007). Los laboratorios de análisis tienen como principal objetivo reportar resultados altamente confiables, por eso deben controlar y asegurar la calidad de sus resultados. En los laboratorios de microbiología el control de calidad abarca el monitoreo de los medios de cultivo, reactivos, equipos y/o instrumentos, verificación de los procedimientos técnicos y del personal. La verificación y comparación de las pruebas microbiológicas es de vital importancia ya que por medio de esta se busca determinar las variaciones entre ensayos para disminuir las posibilidades de error en los resultados, haciéndolos de ésta forma confiables, así mismo se busca garantizar que las técnicas son compatibles con las condiciones en las que está trabajando (Ordoñez, 2007).

Para decidir si un método es apropiado o no, se debe tener en cuenta: si ese método es aplicable al microorganismo a analizar, la cantidad de muestra necesaria para el ensayo, si usando esta metodología se puede evaluar el cumplimiento de las exigencias requeridas para el microorganismo. La especificidad, sensibilidad, el límite de detección y la facilidad de uso, son características que deben tenerse en cuenta antes de seleccionar un determinado método de ensayo. El método que presenta la tasa de recuperación más elevada para el microorganismo buscado es obviamente el mejor (Ordoñez, 2007). Durante la validación y comparación de métodos se deben usar en paralelo un método estándar con el estudiado sobre las mismas muestras y en las mismas condiciones (ISO, 2000, p.3).

4. JUSTIFICACION

En Guatemala una gran parte de la población ingiere embutidos elaborados artesanalmente, siendo estos productos susceptibles a la contaminación por *Salmonella* spp durante el proceso de su elaboración. *Salmonella* ha sido la responsable de un gran número de brotes y casos de enfermedades transmitidas por alimentos, constituyendo los productos cárnicos un grupo vulnerable a la contaminación por su composición y características intrínsecas.

En este estudio se validaron dos métodos para la detección de *Salmonella* spp en embutidos artesanales, dichos métodos están normalizados por las entidades internacionales USDA e ISO. Ambos métodos fueron modificados por el Laboratorio Nacional de Salud del Ministerio de Salud Pública y Asistencial Social (LNS-MSPAS), lugar en donde se llevó a cabo este estudio, por ser el laboratorio de Referencia en Guatemala para el análisis de productos alimenticios. Tales modificaciones se realizaron a conveniencia de dicha entidad. El estándar de oro a utilizado fue el “Método para la detección de *Salmonella*”, BAM Capítulo 5, referido por la FDA/CFSAN (Departamento y Servicios Humanos de Estados Unidos).

La validación se realizó por medio de la determinación de la sensibilidad, especificidad, límite de detección, repetibilidad y reproducibilidad de los métodos; estos parámetros se basaron en la guía de validación de ensayos de laboratorio “Política de Selección y Validación de Métodos de Ensayo”, elaborada por la Oficina Guatemalteca de Acreditación (OGA).

La ejecución de este estudio se hizo necesaria para obtener procedimientos validados, adicionales a los que ya se emplean en el Laboratorio Nacional de Salud, a efecto de adecuarlos a las condiciones del Laboratorio y obtener resultados confiables y certeros. Así mismo, satisfacer las demandas de los usuarios que necesitaban comercializar sus productos en el mercado interno o externo, los cuales debían cumplir con estándares

nacionales e internacionales de calidad que exigen controles microbiológicos a través de métodos normalizados.

Por todo lo anteriormente mencionado, se hizo necesario la realización de este estudio y así mismo se aportó datos que beneficien futuras investigaciones.

5. OBJETIVOS

5.1 General

Validar dos métodos microbiológicos para la detección de *Salmonella* spp en embutidos artesanales distribuidos en mercados municipales del Departamento de Guatemala.

5.2 Específicos

5.2.1. Determinar la sensibilidad, especificidad, límite de detección, repetibilidad y reproducibilidad de los métodos para detección de *Salmonella* en embutidos, referidos por el USDA e ISO (modificados por el LNS).

5.2.2. Comparar la eficacia de los métodos USDA e ISO modificados, para la detección de *Salmonella* en embutidos, contra el método referido por el BAM.

6. HIPOTESIS

Por ser un estudio descriptivo no se hace necesario la formulación de una hipótesis.

7. MATERIALES Y METODOS

7.1 Universo y muestra

Embutidos artesanales distribuidos en distintos mercados municipales del Departamento de Guatemala. Se analizaron 100 muestras por conveniencia de chorizo y longaniza elaborados artesanalmente (50 de cada uno), y fueron utilizados para determinar la sensibilidad y especificidad de los métodos. Para garantizar la validación de los dos métodos se analizaron 20 muestras comerciales (10 chorizos y 10 longanizas) seleccionadas por conveniencia, se analizaron por el método de referencia para garantizar que estuvieran libres de *Salmonella*, y pudieran ser utilizadas para la medición del límite de detección, repetibilidad y reproducibilidad.

7.2 Materiales

7.2.1 Medios

- Agua peptonada bufferada (APB)
- Caldo lactosado (CLS)
- Medio Rappaport-Vassiliadis (RV)
- Medio Rappaport-Vassiliadis con soya (RVS)
- Medio Tetracionato novobiocina Mueller-Kauffmann (MKTT)
- Caldo Tetracionato (TT)
- Agar Xilosa Lisina Desoxicolato (XLD)
- Agar Bismuto Sulfito (BSA)
- Agar Hektoen Enteric (HE)
- Agar Xilosa Lisina TergitolTM4 (XLT4)
- Agar Verde Brillante (VB)
- Agar nutritivo (AN)
- Medio Tripticasa Soya en tubo (TSA)
- Agar Triple Azúcar Hierro (TSI)
- Agar Lisina Hierro (LIA)
- Agar para conteo en placa (PCA)

- Solución salina
- Caldo Infusión Cerebro y Corazón (BHI)

7.2.2 Reactivos

- Antisuero polivalente O
- Alcohol al 70%
- Alcohol al 95%
- Hidróxido de sodio 1M
- Acido clorhídrico 1M

7.2.3 Equipo

- Balanza semianalítica con capacidad para 600g y sensibilidad de 0.1g
- Incubadora a $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$
- Incubadora a $35^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$
- Incubadora a $41.5^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$
- Baño con agua circulante a $41.5^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$
- Baño con agua circulante a $43^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$
- Refrigeradora a $2 - 8^{\circ}\text{C}$
- Stomacher
- Vórtex

7.2.4 Microorganismos

- Cepa *Salmonella* ATCC 13076
- Cepa *Salmonella B*
- Cepa *Enterobacter aerogenes* ATCC 15038
- Cepa *Escherichia coli* ATCC 35218

7.2.5 Cristalería

- Probeta de 250 ml
- Pipetas serológicas de 1ml, 2ml, 5ml

7.2.6 Otros

- Pipetores
- Pipeta semiautomática de 1000 μ l
- Tijeras, pinzas y espátulas de acero inoxidable
- Cajas de petri
- Cuchillos
- Bolsas para stomacher estériles
- Frascos estériles de vidrio (500 ml)
- Canastas de aluminio para pesar
- Mechero
- Descartadores
- Asas en argolla y en punta
- Tiras de papel medidor de pH
- Palillos de madera
- Carreta de acero inoxidable para transporte de material
- Hielera
- Baterías para hielera
- Toallas de papel absorbente
- Algodón absorbente
- Redecilla
- Guantes de látex
- Tips descartables
- Marcadores
- Lapicero
- Cuaderno de apuntes

7.3 Preparación de la muestra

Las muestras deben mantenerse refrigeradas hasta el momento de iniciar el análisis. Se toman porciones representativas de la muestra, se homogenizan y se pesan $25 \text{ g} \pm 0.5\text{g}$ en una bolsa Whirl-Pak con filtro o bolsa para stomacher, se cierra la bolsa y se rotula. La

mesa, balanza y utensilios utilizados durante el pesado de muestras deben estar limpios, todos los utensilios de acero inoxidable se deben flamear previo al inicio del pesado (López, 2001).

7.4 Métodos

7.4.1 Detección de *Salmonella* según la FDA, capítulo 5 del BAM (estándar de oro)

Se prepara la mesa de trabajo y se desinfecta con alcohol al 70%, se utiliza material estéril y se trabaja frente al mechero. Se agrega 225ml de Caldo Lactosado a la muestra pesada. Se homogeniza la muestra durante 2 minutos, utilizando un stomacher. Se transfiere asépticamente la mezcla homogenizada a frascos de boca ancha estériles (capacidad de 500 ml), se cierra el frasco y se deja reposar por 60 ± 5 minutos a temperatura ambiente (Andrews W., Hammack T., 2006).

Transcurrido el tiempo se homogeniza la muestra, y se determina el pH con papel medidor de pH. Si es necesario se ajusta la muestra entre un rango de pH de 6.8 ± 0.2 . Se incuba a 35°C por 24 ± 2 horas. Completado el tiempo de incubación, se transfiere 0.1 ml de mezcla a 10 ml de medio RV y 1ml de mezcla a 10 ml de caldo TT. Se incuba en baño con agua circulante controlada a una temperatura de $43 \pm 0.2^{\circ}\text{C}$ durante 24 ± 2 horas.

Se mezclan los tubos con la muestra y el medio (caldo RV y TT) en vórtex (10 a 15 segundos), se toma una asada y se estría con un asa de 10 μl de la siguiente manera: para los tubos incubados con caldo TT estriar una caja de BSA, una caja de XLD y una caja de HE. Se repite el mismo procedimiento para los tubos de RV. Se incuban los medios inoculados a una temperatura de 35°C por 24 ± 2 horas (Andrews , 2006).

Pasado el tiempo de incubación se examinan las cajas y se busca colonias típicas.

XLD: Las colonias de *Salmonella*, se muestran de color rosado con o sin centro negro. Muchas colonias pueden presentarse como colonias grandes, centro negro o completamente negras.

HE: Las colonias típicas de *Salmonella* son de color azul verdoso con o sin centro negro. Muchas colonias pueden presentarse como colonias grandes, con centro negro o completamente negras.

BS: Se buscan colonias cafés, grises o negras, algunas veces presentan brillo metálico. El medio alrededor de las colonias puede presentar una coloración café al inicio, pero pueden tornarse negras al aumentar el tiempo de incubación. (Andrews, 2006).

Si existen colonias sospechosas se selecciona una que este bien aislada y se pica, se transfiere a tubos de TSI, LIA y TSA. Se incuba por 24 horas a 35°C. Transcurrido el tiempo de incubación se leen los tubos con la tabla de interpretación para baterías, si existe una imagen sospechosa en los tubos, se realiza la confirmación serológica (Andrews, 2006).

7.4.2 Aislamiento e identificación de *Salmonella* en carne, productos lácteos y huevos.

Método referido por el USDA (Departamento de Agricultura de Estados Unidos),

Modificado por el LNS

Se agrega 225 ml de BPW. Se homogeniza la bolsa con la muestra más el diluyente en el stomacher durante 2 minutos. Se homogeniza bien la mezcla y se traslada el contenido de la muestra de la bolsa a un frasco de vidrio estéril, se tapa el frasco. Se incuba a $35 \pm 2^\circ\text{C}$ por 20 a 24 horas. Transcurrido el tiempo de incubación, se homogeniza el frasco con la muestra, se transfiere 0.5 ± 0.05 ml de la mezcla a un tubo con 10 ml de caldo TT y 0.1 ± 0.02 ml de la mezcla a un tubo con 10 ml de caldo RV.

Se incuba en baño maría a una temperatura de $42 \pm 0.5^\circ\text{C}$ durante 18 a 24 horas. Pasado el tiempo de incubación se homogenizan los tubos con la muestra en el vórtex. Se estría con asas en cajas de XLT4 y agar SVB (Sulfito Verde Brillante). **(En este paso solamente se estría en placas de XLT4, se omite el paso de estriar en SVB).** Se incuba a $35 \pm 2^\circ\text{C}$ (USDA, 2008, p.7,8).

Se examinan las cajas a las 18 o 24 horas. Se re-incuba por otras 18 horas si no existieran colonias. Si existen colonias sospechosas picar para realizar la confirmación. Se guarda en la refrigeradora las cajas con las colonias que fueron picadas, estas pueden servir para futuras confirmaciones (USDA, 2008).

Las colonias se observaron así:

XLT4: seleccione las colonias negras o colonias rojas con o sin centro negro. Para la confirmación, se selecciona las colonias sospechosas e inoculan en los medios TSI y LIA,

con un asa en punta se toma una colonia bien aislada de la superficie tratando de no tocar el medio, se inocula el TSI introduciendo el asa de manera recta hacia el fondo y posteriormente se estría el slant, luego sin flamear se inocula el medio LIA introduciendo dos veces el asa en punta hacia el fondo del tubo y por último se estría el slant. Se incuban los tubos a $35 \pm 2^\circ\text{C}$ durante 24 ± 2 horas. Se recomienda inocular un tubo de TSA (USDA, 2008). Se leen los tubos utilizando la tabla de lectura para baterías, si existe imagen sospechosa se realiza la confirmación mediante pruebas bioquímicas o serológicas (USDA, 2008).

7.4.3 Detección de *Salmonella* en productos cárnicos, ISO 6579. (Modificado por LNS)

Se pesa asépticamente 25 gramos de muestra en bolsa para stomacher, se agregan 225 ml de agua peptonada bufferada (a temperatura ambiente), se homogeniza la muestra en stomacher. Se transfiere la mezcla a un recipiente estéril, y se tapa el frasco. Se incuba por 18 ± 2 horas a $37^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$.

Transcurrido el tiempo de incubación, se transfiere 0.1ml de la mezcla a un tubo con 10 ml de caldo RVS y 0.1ml muestra a 10 ml de caldo MKTT, se incuban ambos tubos por 24 ± 3 horas a $41.5^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$. Completado el tiempo de incubación se transfiere una asada de medio RVS a una caja de XLD y una asada a otra caja de BGA (se estrían ambas cajas) se repite el procedimiento para el caldo MKTT. Se incuban las cajas a $41.5^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$ durante 24 ± 3 horas. Finalizado el período de incubación, se examinan las cajas y se buscan colonias sospechosas, si es así, se seleccionan las colonias bien aisladas, se transfieren a agar nutritivo (**El paso de transferir a agar nutritivo es omitido por el LNS**), incubar por 24 ± 3 horas a $41.5^\circ \pm 1^\circ\text{C}$. Se realizan las pruebas confirmatorias (ISO, 2002).

XLD: las colonias de *Salmonella*, se muestran de color rosado con o sin centro negro. Muchas colonias pueden presentarse como colonias grandes, centro negro o completamente negras. BGA o AVB: las colonias típicas de *Salmonella*, son de color rosado, poseen un diámetro de 1 a 2 mm. Producen un cambio de coloración en el medio a rojo.

Para la confirmación bioquímica, se pican colonias bien aisladas, se inocula una asada en medio TSI y LIA y se incuban los medios por 24 ± 3 horas a $41.5^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$ (**En este paso se modificó la temperatura de incubación a $35 \pm 1^\circ\text{C}$**) Pasado el tiempo de incubación se

leen las baterías e interpretan, se realiza la confirmación serológica de las colonias partiendo del agar nutritivo (**la batería se realiza a partir de los medios selectivos, modificación introducida por el LNS**).

7.5 Límite de detección, repetibilidad y reproducibilidad

Se prepara con la cepa de *Salmonella* ATCC 13076 una solución concentrada de *Salmonella* suspendiendo una asada de la cepa en un tubo con 9 ml de caldo BHI, se incuba por 24 horas a 35°C, se preparan diluciones partiendo del tubo concentrado, se toma 1 ml de éste y se agrega a otro tubo con 9ml de BHI, se vortexea por 15 segundos, se toma un 1ml del segundo tubo y se agrega a otro tubo con BHI, se repite el mismo procedimiento hasta llegar a la dilución 10⁹. Se cuantifica el número de microorganismo presente en todas las diluciones, sembrando 1ml de cada una de estas en cajas de petri (se hace por duplicado), se agrega 20 ml de medio PCA, se homogeniza y se deja que solidifique, se incuba a 35°por 48 horas. Pasado el tiempo de incubación, se realiza el conteo de las colonias utilizando para ello una cámara cuenta colonias.

Se selecciona dos diluciones anteriores a la que presentó crecimiento nulo y se toma 1 ml de cada una de las diluciones, se inoculan a las muestras de chorizo y longaniza (previamente se pesa 25 gramos de cada muestra); después de haber contaminado los embutidos los cuales ya deben estar cortados y pesados, se siembra la muestras siguiendo el mismo procedimiento descrito en cada uno de los métodos. Se repite diez veces este procedimiento, para cada método.

Una vez determinado el límite de detección, se selecciona la dilución que permite la recuperación de la bacteria en las muestras de chorizo, se contamina nuevamente 1 muestra y se realizan 10 repeticiones del análisis para cada método bajo las mismas condiciones (repetibilidad) de igual forma se contamina una 1 muestra y se realizan 20 repeticiones de ésta (10 serán procesadas por un analista y 10 por otro analista) se realiza este procedimiento por los tres métodos (reproducibilidad).

7.6 Diseño del estudio

El estudio se dividió de dos fases: en la primera se determinó el límite de detección, la repetibilidad y la reproducibilidad de los dos métodos validados, para ello se utilizaron 10 muestras de chorizo y 10 muestras de longaniza ambas de origen comercial seleccionadas por conveniencia, estas se analizaron por el método de referencia y fueron negativas para *Salmonella* (inocuas). En la segunda fase se determinó la sensibilidad y especificidad de los métodos, para este fin se utilizaron 100 muestras de embutidos artesanales seleccionados por conveniencia y se analizaron por los dos métodos comparándolos contra los métodos de referencia (estándar de oro).

Primera fase:

7.6.1 Límite de detección: fue un análisis de tipo semicuantitativo, se hizo por medio de diluciones progresivas de base 10. El objetivo era detectar aquella dilución en donde se obtuviera 1 UFC/ml o “0 UFC/ml”.

7.6.1.1 Sin inocular en la matriz (*Salmonella* “pura”), se hizo 10 veces cada dilución que presentó un recuento no mayor a 300 UFC/ml. Para cada dilución se planteo una prueba de hipótesis binomial en la que:

Ho (hipótesis nula): $p \leq 0.05$ indicaba que el evento era aleatorio o que no proporcionaban resultados consistentes ni significativos.

Ha (hipótesis alterna): $p > 0.05$ indicaba que el evento no era aleatorio y los resultados eran consistentes y significativos.

En base a los resultados del recuento en placa de las diluciones, se detuvo en la dilución en la que los 10 ensayos dieron el mismo resultado (no crecimiento), la Ho se rechazaba a un nivel $\alpha = 0.01$

7.6.1.2 Con la dilución encontrada y la inmediata anterior se probaron sobre las matrices de longaniza y chorizo 10 réplicas para los métodos validados. Se esperaba que los resultados obtenidos fueran iguales a los de la primera fase (sin inocular en la matriz). El

análisis para H_0 y H_a era igual al inciso anterior. El cambio del límite de detección ya en las matrices se estableció con este ensayo.

7.6.2 Repetibilidad: se analizó la misma muestra 10 veces, fueron procesadas por dos analistas, cada uno con sus propias condiciones de análisis (balanza, forma de realizar el ensayo). Las muestras se inocularon con la cepa de *Salmonella* ATCC 13076, agregándole 1ml de la dilución anterior al límite de detección para que se garantizara el crecimiento de la bacteria en las matrices analizadas. La respuesta esperada fue de carácter binomial (recuperación o no recuperación de la bacteria, para cada analista). El análisis se realizó con estadística binomial, se esperaba la recuperación de la bacteria en las 10 repeticiones, el valor de probabilidad asociada a 10 éxitos en 10 ensayos era igual a 0.001, lo que quiere decir que había un 0.1% de probabilidad que fallara la repetibilidad (se utilizó una certeza del 99.9%), de esta forma se analizaron los datos para ambos analista.

7.6.3 Reproducibilidad: se analizó utilizando la prueba de hipótesis binomial, pero comparando los resultados de los dos analistas.

$H_0: p_{A1} = p_{A2}$ y $H_a: p_{A1} \neq p_{A2}$, donde p_{A1} era igual al valor p del analista 1 y p_{A2} era igual al valor p del analista 2. Si las proporciones del resultado eran diferentes a un 100% se analizaba con la prueba de Chi cuadrado, se esperaba que ambos resultados (dos analistas) coincidieran en el 100% de recuperación para inferir que existía reproducibilidad de los métodos.

Segunda Fase:

7.6.4 Sensibilidad y Especificidad: se analizaron 100 muestras de embutidos artesanales escogidos por conveniencia y se compararon contra el método de referencia (estándar de oro), la sensibilidad y especificidad se determinaron por medio de la construcción de tablas 2X2, calculando el índice Kappa (el cual indicaba el grado de concordancia entre los métodos). Los resultados se analizaron utilizando los criterios de interpretación según Azzimonti (Azzimonti, 2005, p.2).

8. RESULTADOS

En la primera fase de la parte experimental de este estudio se recolectaron 50 muestras de chorizos y 50 muestras de longanizas artesanales, expendidos en ocho mercados municipales dentro del departamento de Guatemala, todas las muestras fueron analizadas por los tres métodos y se recolectaron en intervalos de 5, 10 y 15 muestras en cada muestreo.

Durante el primer muestreo se recolectaron 10 muestras de embutidos artesanales, al momento de ser analizadas por los tres métodos, se obtuvo crecimiento de colonias sospechosas en varias de las muestras, solamente la muestra No.10 no reportó algún tipo de crecimiento bacteriano detectado por los métodos validados, de igual manera se obtuvo el mismo resultado con el métodos estándar.

La muestra control fue analizada de la misma forma que el resto de las muestras con la diferencia que al inicio del análisis se tomaron los 225 ml de los caldos de pre-enriquecimiento y a estos se les agrego 1 gota de cepa de *Salmonella* ATCC 13076, la marcha analítica se realizó de la misma forma que las muestras, para control negativo se utilizaron cepas de *Enterobacter aerogenes* ATCC 15038 y *Escherichia coli* ATCC 35218.

Tanto en el segundo muestreo (anexo 6, cuadro 2), como en el tercer muestreo (anexo 6, cuadro 3) se obtuvieron colonias sospechosas en las muestras para cada uno de los métodos validados, por lo que se procedió a realizar la confirmación bioquímica, los resultados de estas confirmaciones se presentan en el anexo 7.

En el tercer muestreo se pudo observar que en las muestras número 27 y 32, para el método estándar (BAM, Capítulo 5) no se logró la recuperación de algún tipo de colonia sospechosa, mientras que en ambos métodos validados si se obtuvo crecimiento bacteriano.

Durante el quinto muestreo se recolectaron 15 muestras (anexo 6, cuadro 5), cabe resaltar que para las muestras 54, 55, 57 y 58 no se obtuvo crecimiento en ninguno de los medios selectivos para el método estándar, mientras que para los métodos USDA e ISO, si

se obtuvo crecimiento y se detectaron varias colonias sospechosas, al momento de realizarles la confirmación ninguna fue positiva para *Salmonella* spp.

El sexto muestreo reveló resultados positivos para *Salmonella* en las muestras 66, 71, 74 y 75, para los tres métodos.

En el anexo 6, cuadro 7 se presentan los resultados para el séptimo muestreo, durante el análisis de las 15 muestras se obtuvieron un total de 3 muestras positivas para *Salmonella* spp por los tres métodos (muestras 88, 89 y 95), estas fueron confirmadas. Finalmente el octavo muestreo, no reflejo resultados positivos en las muestras de embutidos.

En el cuadro 1 se presenta el resumen de los resultados obtenidos durante la primera fase de este estudio.

Cuadro 1. Muestras de chorizo y longaniza artesanal, analizadas por tres métodos

Método	BAM	USDA	ISO
Número de muestras con colonias sospechosas de <i>Salmonella</i> spp	58	84	72
Muestras de chorizo positivas para <i>Salmonella</i> spp	17	14	15
Muestras de longaniza positivas para <i>Salmonella</i> spp	13	15	14
Número de muestras negativas	70	71	71
Número de muestras positivas	30	29	29
Total de muestras analizadas	100	100	100

Fuente: Datos experimentales, Área de Microbiología de Alimentos, LNS. 2010-2011.

En el caso de las muestras de longaniza artesanal, para el método ISO se detectaron un total de 14 (28%) muestras positivas, mientras que para el método USDA se detectó un total de 15 (30%) muestras positivas, para el método estándar se detectó un total de 13 (26%) muestras positivas.

Para las 50 muestras de chorizo artesanal analizadas por los tres métodos, se detectaron 15 (30%) muestras positivas con el método ISO, 14 (28%) muestras positivas con el métodos USDA y 17 (34%) muestras positivas con el método estándar.

En total, de las 100 muestras de embutidos artesanales, en 30 muestras se detectó *Salmonella* spp con el método estándar lo que representa un 30% de positividad, y 29 muestras fueron encontradas positivas con ambos métodos validados, para dar un total de 29%.

Como se observa en el cuadro 1, se obtuvo mayor número de muestras con colonias sospechosas para los métodos USDA e ISO, en comparación con el estándar. (Estos datos se pueden observar el anexo 6, cuadros 1-8).

Concluida la primera fase del estudio se construyeron tablas de 2x2 y se analizaron los datos con el Software Epidat Versión 3.1. para la obtención de la sensibilidad y especificidad de los métodos validados.

Cuadro 2. Tabla de contingencia, comparación de los valores positivos y negativos obtenidos con el método estándar contra los valores obtenidos por el método USDA

USDA	BAM		Total
	valores positivos*	valores negativos*	
valores positivos	29	1	30
valores negativos	0**	70***	70
Total de muestras	29	71	100

Fuente: Datos experimentales, Área de Microbiología de Alimentos, LNS. 2010-2011; * valores positivos en ambos métodos y valores negativos en discordancia; ** valores negativos no detectados en el segundo método, *** valores negativos en ambos métodos.

Como se puede observar los valores positivos y negativos para el método estándar en comparación con los métodos validados (USDA e ISO) son los mismos, solo obtuvo una discordancia del 1% en los valores negativos (Cuadro 2,3).

Cuadro 3. Tabla de contingencia, comparación de los valores positivos y negativos obtenidos con el método estándar contra los valores obtenidos por el método ISO

ISO	BAM		Total
	valores positivos*	valores negativos*	
valores positivos	29	1	30
valores negativos	0**	70***	70
Total de muestras	29	71	100

Fuente: Datos experimentales, Área de Microbiología de Alimentos, LNS. 2010-2011; * valores positivos en ambos métodos y valores negativos en discordancia; ** valores negativos no detectados en el segundo método, *** valores negativos en ambos métodos.

Con los datos de las tablas de contingencia se calcularon la sensibilidad y especificidad de los métodos. Para los dos métodos la sensibilidad fue del 100% (IC 95% = 98.28 a 100%) y la especificidad fue del 98.59% (IC del 95% = 95.15 a 100%). El nivel de concordancia entre los métodos validados y el método estándar fue determinado por el valor del índice Kappa que fue igual a 0.9760.

Cuadro 4. Sensibilidad y Especificidad de los métodos validados USDA e ISO

Parámetro/método	Sensibilidad	Especificidad
	(IC 95%= 98.28 a 100%)	(IC 95%= 95.15 a 100%)
USDA	100%	98.59%
ISO	100%	98.59%
Valor Kappa	0.9760*	0.9760*
Chi cuadrado	0.9097**	0.9097**

Fuente: Datos experimentales, Área de Microbiología de Alimentos, LNS. 2010-2011. Donde: IC: intervalo de confianza; * valor kappa obtenido para ambos métodos; ** valor Chi cuadrado obtenido para ambos métodos.

En la segunda fase de este estudio se realizaron las pruebas de límite de detección, repetibilidad y reproducibilidad. Para ello, fue necesario establecer el límite de detección de los métodos USDA e ISO. El primer paso fue realizar diluciones de la cepa de *Salmonella*, posteriormente se realizaron recuentos en placa de las diluciones 10^7 , 10^8 y 10^9 ya que estas

reflejaron una carga microbiana cuantificable en placas de agar. Mientras que para diluciones inferiores la carga fue MNPC/ml (muy numeroso para contar por mililitro).

Se realizaron varios recuentos en placa, obteniéndose un promedio de 60 UFC/ml para la dilución 10^7 , 6 UFC/ml en la dilución 10^8 y 1 UFC/ml en la dilución 10^9 . A continuación se presentan los resultados obtenidos para los recuentos.

Cuadro 5. Recuento total en placa de *Salmonella* ATCC 13076, preparada en diluciones seriadas en el orden de 10^7 , 10^8 y 10^9

Número de recuentos en placa, para las diluciones de la cepa de <i>Salmonella</i> , realizadas en agar PCA, por duplicado	Dilución / número de UFC/ml obtenidos en cada recuento		
	1.0000E+07	1.00E+08	1.00E+09
1	61	6	1
	70	8	0
2	58	5	2
	61	5	0
3	60	6	1
	51	5	1
promedio UFC/ml	60.17	5.83	0.83

Fuente: Datos experimentales, Área de Microbiología de Alimentos, LNS.2010-2011. Donde: UFC/ml: unidades formadoras de colonia por mililitro; PCA: abreviatura para plate count agar.

En el cuadro 6 se observan los resultados para el límite de detección de los tres métodos; al realizar la contaminación con *Salmonella* de las muestras comerciales (inocuas) en una cantidad no mayor a 60 UFC/ml, se logró la recuperación total del patógeno en ambos métodos validados. Por lo que fue necesario inocular mas muestras con menor cantidad de cepa de *Salmonella* ATCC 13076. De igual forma sucedió para la siguiente dilución 10^8 (promedio de 6 UFC/ml), se logró la recuperación total en las 10 repeticiones de los análisis para los tres métodos. Los resultados de las muestras inoculadas con una 1UFC/ml de cepa de *Salmonella*, fueron del 60% de recuperación del total de las 10 repeticiones.

Cuadro 6. Límite de detección. Número de muestras de chorizo positivas en un total de 10 repeticiones, que fueron inoculadas con *Salmonella* ATCC 13076

Muestras de chorizo analizadas por los tres métodos			
Dilución de <i>Salmonella</i> /UFC/ml	BAM	USDA	ISO
10 ⁷ (60 UFC/ml)	10	10	10
10 ⁸ (6 UFC/ml)	10	10	10
10 ⁹ (1 UFC/ml)	6	6	6
Límite de Detección	6 UFC/ml		

Fuente: Datos experimentales, Área de Microbiología de Alimentos, LNS.2010-2011. Donde: UFC/ml: unidades formadoras de colonia por mililitro.

En el cuadro 7 se presentan los resultados del límite de detección para las muestras de longaniza por los tres métodos. Los resultados obtenidos fueron similares a los resultados del límite de detección para el chorizo, existió una recuperación del 100% en las diluciones 10⁷ y 10⁸. En las repeticiones para la dilución 10⁹, se obtuvo una recuperación del 60% para el método ISO y una recuperación del 70% para el método USDA.

Cuadro 7. Límite de detección. Número de muestras de longaniza positivas en un total de 10 repeticiones y que fueron inoculadas con *Salmonella* ATCC 13076.

Muestras de longaniza analizadas por los tres métodos			
Dilución de <i>Salmonella</i> /UFC/ml	BAM	USDA	ISO
10 ⁷ (60 UFC/ml)	10	10	10
10 ⁸ (6 UFC/ml)	10	10	10
10 ⁹ (1 UFC/ml)	7	7	6
Límite de Detección	6 UFC/ml		

Fuente: Datos experimentales, Área de Microbiología de Alimentos, LNS.2010-2011. Donde: UFC/ml: unidades formadoras de colonia por mililitro.

Para las pruebas de repetibilidad y reproducibilidad se decidió inocular las muestras de chorizo y longaniza comercial con cepa de *Salmonella* ATCC 13076. Se utilizó la

dilución anterior a la obtenida para el límite de detección de los métodos utilizados (dilución 10^7).

Se realizaron un total de 10 repeticiones para cada uno de los métodos, los ensayos se desarrollaron por dos analistas distintos. Los resultados para las muestras de chorizo y longaniza se presentan en el cuadro 8.

Cuadro 8. Repetibilidad. Muestras de chorizo y longaniza positivas inoculadas con un promedio de 60 UFC/ml de *Salmonella* ATCC 13076, que fueron analizadas simultáneamente por dos analistas utilizando los tres métodos

Muestra inoculada con <i>Salmonella</i> dilución 10^7	Analista 1			Analista 2		
	BAM	USDA	ISO	BAM	USDA	ISO
Chorizo	10	10	9	10	10	10
Longaniza	10	10	10	10	9	10

Fuente: Datos experimentales, Área de Microbiología de Alimentos, LNS.2010-2011.

La repetibilidad del analista 1 para las muestras de chorizo fue satisfactoria, se obtuvo un total de 10 muestras positivas para el método USDA y 9 positivas de las 10 réplicas, para el método ISO. En el caso de la repetibilidad del analista 1 para las muestras de longaniza, el total de recuperación para ambos métodos validados fue del 100%.

La repetibilidad para el analista 2, tanto en muestras de chorizo como muestras de longaniza fue satisfactoria, se obtuvo un total de 10 muestras positivas para ambos métodos en el caso de los chorizos; para las muestras de longanizas los resultados fueron de un 90% de recuperación con el método USDA y 100% de recuperación con el método ISO.

Cuadro 9. Reproducibilidad de los tres métodos para muestras de chorizo y longaniza.

Muestra inoculada con <i>Salmonella</i> dilución 10^7	Analista 1			Analista 2		
	BAM	USDA	ISO	BAM	USDA	ISO
Chorizo	10	10	9	10	10	10
Longaniza	10	10	10	10	9	10

Fuente: Datos experimentales, Área de Microbiología de Alimentos, LNS.2010-2011

La reproducibilidad entre los dos analistas para los métodos USDA e ISO, fue satisfactoria. Para el método USDA se obtuvo una reproducibilidad del 100%, en el caso de los chorizos mientras que para las muestras de longaniza el analista 2 obtuvo una recuperación en 9 de 10 muestras. En el caso de las longanizas por el método ISO ambos analistas obtuvieron un 100% de reproducibilidad, y 9 de 10 muestras positivas para el analista 1 en comparación con el analista 2 para el análisis de chorizos (cuadro 9). Al analizar los datos con la prueba de Chi cuadrado se obtuvo un valor $p = 0.9097$, lo que revela que hay una buena concordancia entre los resultados y no existe una diferencia significativa entre ellos.

9. DISCUSION DE RESULTADOS

Durante la primera fase del estudio se muestrearon un total de 100 embutidos artesanales (chorizos y longanizas), los cuales fueron analizados por los métodos USDA e ISO y el método estándar de oro (BAM). En cada muestreo se corrieron controles positivos con cepa de *Salmonella B* y *Salmonella* ATCC 13076. La confirmación de las colonias se realizó utilizando pruebas bioquímicas y serológicas, no fue necesario realizar una tipificación ya que para fines prácticos de este estudio solamente era necesario la detección del patógeno en las muestras. Los resultados de las confirmaciones se presentan en el anexo 7.

En el primer muestreo, se realizó la confirmación serológica 4 de las 10 muestras, con resultados positivos para *Salmonella* spp. de un total de 10 muestras recolectadas. En el caso del segundo muestreo, se obtuvieron un total de 5 muestras positivas para el método USDA, en relación con el método BAM y 2 muestras detectadas por el método ISO. Existió una variante en ambos métodos, lo cual puede significar un error al momento de desarrollar el análisis o durante el paso de selección y confirmación de las colonias sospechosas. Debido a que no era posible repetir las muestras, no se puede afirmar con certeza que pudo haber causado dichas discrepancias.

Los resultados obtenidos para el tercer muestreo fueron de 7 muestras positivas para *Salmonella* spp detectadas por los métodos USDA e ISO. Mientras que en el siguiente muestreo se detectaron 5 muestras positivas en los tres métodos.

En el quinto muestreo se obtuvieron 4 muestras positivas en el método ISO, 2 con el método USDA y solamente 1 con el método BAM (anexo 6, cuadro 5). Se observó discrepancia en los resultados obtenidos y revisando las bitácoras de trabajo, se detectó que en los tubos con caldo Rappaport Vassiliadis existía un viraje del color en el medio poco característico, el cual no se había observado en las muestras anteriores, ni en el control de medio o en los controles positivos. Esto pudo deberse a una mala preparación del medio o un problema en el pH del mismo, o a un error al trasvasar las muestras al medio, mala homogenización de la muestra o fallas de la incubadora causadas por interrupción eléctrica, por lo cual se cree que no fue posible recuperar a las *Salmonellas* presentes en las

muestras. Los controles positivos y negativos durante las corridas en este muestreo y a lo largo del ensayo, arrojaron resultados satisfactorios, por lo que no fue posible definir la causa de la discrepancia obtenida en los resultados de este muestreo.

Para los últimos dos muestreos (cuadros 7 y 8), no se obtuvo ningún resultado positivo por lo que en esta etapa se concluyó la primera fase del estudio. A lo largo del desarrollo de este estudio se pudo observar la alta selectividad que los medios de aislamiento del método BAM presentaban en relación con el medio XLT4 utilizada en el método USDA. Al observar los resultados por muestreo (anexo 6) se puede ver que existe una gran cantidad de colonias reportadas como sospechosas mientras que para los demás métodos no. Al momento de realizar las confirmaciones bioquímicas (anexo 7) solamente 29 de las 84 muestras sospechosas fueron encontradas como positivas para *Salmonella* spp. Para el método ISO se detectaron 29 muestras positivas de las 30 detectadas por el método de referencia (cuadro 1).

Posteriormente se construyeron tablas de 2 x 2 con los resultados obtenidos durante los ocho muestreo (cuadro 2), al comparar el método estándar de oro contra el método USDA se detectaron un total de 29 muestras positivas para *Salmonella* en relación a las 30 detectadas con el método estándar (BAM). Al realizar el análisis estadístico en el software Epidat versión 3.1 se obtuvo para el método USDA, una sensibilidad del 100% (IC 95% = 98.28 a 100%) y una especificidad del 98.59% (IC 95%= 95.15 a 100%) (cuadro 4).

De igual forma se analizaron las tablas de 2 x 2 para los resultados del método ISO (cuadro 3), se encontraron 29 muestras detectadas como positivas para *Salmonella* spp. La sensibilidad obtenida fue de 100% (IC 95%=98.28 a 100%) y especificidad del método del 98.59% (IC 95% = 95.15 a 100%). Para determinar si existía una buena concordancia entre el método USDA e ISO en relación con el BAM se determinó el valor del índice Kappa utilizando Epidat versión 3.1, el valor obtenido para Kappa fue de 0.9760 (IC 95% = 0.9291 a 1.0000%). Esto significa que la relación entre ambos métodos con el método estándar es excelente, ya que se espera que el valor para el índice Kappa sea cercano a 1, lo cual indica una excelente concordancia entre los métodos.

La segunda fase del estudio tuvo por objetivos establecer el límite de detección, la repetibilidad y la reproducibilidad de los dos métodos. El límite de detección fue calculado en base a una serie de diluciones en caldo BHI con la cepa de *Salmonella* ATCC 13076, a estas diluciones se les realizaron recuentos en placa, las diluciones menores a 10^6 no fueron utilizadas para dicho propósito ya que los recuentos en placa fueron mayores (>300 UFC/ml y MNPC/ml). Se obtuvieron resultados más favorables en las diluciones 10^7 , 10^8 y 10^9 (cuadro 5), por lo que se decidió utilizar las mismas para contaminar artificialmente las muestras de embutidos comerciales (inocuas), las cuales fueron previamente analizadas y se verificó la ausencia de *Salmonella* en las mismas (anexo 8).

Las muestras contaminadas con la cepa fueron analizadas por los tres métodos, en series de 10 repeticiones por muestra para cada dilución. El resultado del límite de detección para los chorizos, utilizando las diluciones 10^7 (equivalente a un promedio de 60 UFC/ml) y 10^8 (equivalente a un promedio de 6 UFC/ml), fue de crecimiento de la bacteria en las 10 repeticiones ($p = 0.001$). En la dilución 10^9 solamente se obtuvo crecimiento en 6 de las 10 repeticiones (cuadro 6), por lo que se pudo inferir que el límite de detección para *Salmonella* spp por el método USDA y el método ISO en chorizo fue de 6 UFC/ml (10^7).

De igual forma, se estableció el límite de detección para los dos métodos, en muestras de longaniza. En las diluciones 10^9 para el método ISO se obtuvo crecimiento en 6 de las 10 repeticiones y para el método USDA existió crecimiento en 7 de las 10 repeticiones. Para las diluciones 10^7 y 10^8 el crecimiento fue exitoso en las 10 repeticiones (cuadro 7), con estos resultados se pudo concluir que el límite de detección para *Salmonella* spp en longaniza fue para los dos métodos de 6 UFC/ml.

La repetibilidad de un método se mide comparando una misma muestra con un valor conocido analizada varias veces por un analista y en las mismas condiciones de trabajo (OGA, 2007). En este estudio se tomó una muestra de chorizo y una de longaniza comercial del mismo lote (muestras inocuas) y se contaminaron artificialmente con 60 UFC/ml (dilución 10^7). Esta dilución fue seleccionada para garantizar la existencia de *Salmonella* ATCC 13076 en las muestras y así poder evaluar el desempeño del método. Se realizaron un total de 10 repeticiones para la muestra de chorizo (cuadro 8) y 10 repeticiones de la muestra de longaniza, las muestras fueron analizadas con los tres métodos por el analista 1.

Para las muestras de chorizo analizadas por el método USDA se obtuvieron 10 muestras positivas ($p=0.001$) mientras que para el método ISO se obtuvieron 9 muestras positivas, del total de las 10 repeticiones realizadas ($p=0.0107$). La probabilidad de error del analista 1 es igual a 0.107% por lo que no es estadísticamente significativo para un valor $\alpha = 0.05$ con lo que se puede inferir que el método es repetible.

En el caso de la repetibilidad de los métodos en muestras de chorizo analizadas por el analista 2, en las 10 repeticiones existió una recuperación total de la bacteria, mientras que para el caso de las muestras de longaniza únicamente en el método USDA hubo una recuperación de 9 muestras de un total de 10. Con estos resultados se puede inferir de igual forma que en el caso del analista 1 para el método ISO, el porcentaje de error en la recuperación de la bacteria fue de 0.107% y en los casos en que la bacteria fue recuperada totalmente el porcentaje de error para el analista fue del 0.1%, estos resultados reflejaron una buena repetibilidad de los métodos USDA e ISO.

Por último se determinó la reproducibilidad de los métodos, para esto se emplearon dos analistas, con el propósito de aportar resultados adicionales a los del analista 1 y obtener resultados significativos. Se utilizó la misma muestra de chorizo y longaniza (mismo lote), las muestras fueron analizadas el mismo día con diferentes equipos (balanzas, vórtex, etc.). Como primer punto se pesaron las muestras en 10 repeticiones (muestras de chorizo y longaniza por cada analista), posteriormente se contaminaron con cepa de *Salmonella* ATCC 13076 usando la dilución 10^7 (60 UFC/ml). Cada analista procesó las muestras y reportó sus resultados.

Los resultados de la reproducibilidad para los dos métodos se observan en el cuadro 9. En el caso de los chorizos analizados por el método ISO, existió una diferencia de 10 muestras positivas para el analista 2 y 9 positivas para el analista 1, lo mismo sucedió para las longanizas con el método USDA, en el cual el analista 2 obtuvo 9 de 10 muestras positivas.

Para estos resultados fue necesario realizar un análisis estratificado por la prueba de Chi cuadrado con el programa Epidat versión 3.1. Se obtuvo un valor de $p = 0.9097$ lo cual

indica que no hay una diferencia significativa en los resultados entre ambos métodos y entre los analistas.

La reproducibilidad de las muestras de chorizo analizadas por el método USDA fue del 100%, de igual forma sucedió para las muestras de longaniza por el método ISO.

Como se mencionó en el diseño de estudio, la reproducibilidad fue analizada por una prueba de hipótesis binomial en la cual la H_0 proponía que un valor $p \leq 0.5$ nos indicaba que los eventos obtenidos eran aleatorios y que no brindaban resultados consistentes ni significativos, mientras que H_a proponía un valor de $p > 0.5$ que indicaba que el evento no es aleatorio y los resultados son consistentes y significativos. Con estos resultados se rechaza H_0 y se pudo inferir que si existe reproducibilidad en ambos métodos.

Por último, al observar los resultados de este estudio, se pudo inferir que las modificaciones introducidas a los métodos USDA e ISO, no afectaron el desempeño de los mismos y que los resultados obtenidos en el laboratorio para ambos son aceptables. Existiendo una sensibilidad, especificidad, repetibilidad y reproducibilidad satisfactoria, con lo cual quedan validados ambos métodos.

10. CONCLUSIONES

1. Se validaron los métodos referidos por el USDA e ISO (modificados), para la detección de *Salmonella* spp en muestras de embutidos artesanales, para su utilización en el Laboratorio Nacional de Salud.
2. La sensibilidad y especificidad de los métodos USDA e ISO modificados para la detección de *Salmonella* spp en muestras de embutidos artesanales, fue del 100 % (IC 95% = 98.28 a 100%) y 98.59 % (IC 95% = 95.15 a 100%) por lo que se puede concluir que son satisfactorias.
3. El límite de detección para los métodos USDA e ISO modificados para la detección de *Salmonella* spp en el análisis de embutidos artesanales fue de 6 UFC/25 gramos.
4. La concordancia entre ambos métodos en relación con el método estándar fue de un valor kappa igual a 0.9760, siendo significativa y aceptable.
5. Ambos métodos son repetibles y reproducibles, para la detección de *Salmonella* spp en embutidos artesanales.
6. Las modificaciones introducidas por el Laboratorio Nacional de Salud a los métodos referidos por el USDA e ISO no interfirieron en la recuperación de *Salmonella*, por lo que ambos métodos son equivalentes en eficacia con el método referido por el BAM.

11. RECOMENDACIONES

1. Analizar las variables posibles que ocasionaron los errores presentados a lo largo del desarrollo de los ensayos y evaluar sus efectos en los resultados.
2. Usar las herramientas para la detección de problemas, como el diagrama de Ishikawa.
3. Debido a que no existen datos de estudios en Guatemala donde se hayan validado métodos para embutidos y cárnicos, se hace necesario la realización de más estudios y proyectos que contemplen la validación de métodos microbiológicos para la detección de *Salmonella* spp.
4. Derivado de este estudio, se pudo observar el alto índice de la presencia de *Salmonella* existente en los embutidos artesanales que son distribuidos en los mercados municipales del Departamento de Guatemala. Se obtuvo un 30% de muestras positivas para *Salmonella* spp, por lo que se recomienda un monitoreo constante de este microorganismos en estos tipos de alimentos.
5. Contar con cepas de referencia o tipificadas, que sirvan como controles positivos y negativos, esto con el fin de avalar los resultados obtenidos y tener un comparador a lo largo del desempeño de un método.
6. Para establecer la presencia de *Salmonella* spp. es necesario contar con pruebas químicas y serológicas, como mínimo para su confirmación, debido que algunas colonias sospechosas no necesariamente son *Salmonella*.
7. Se recomienda la capacitación constante a los embutidores locales, para evitar la contaminación de sus productos, ya que el consumo de embutidos artesanales posee una alta demanda en nuestro país.

12. REFERENCIAS

1. Alemán W Z. (2002). Recobrado de *Salmonella* sp en alimentos. INHEM. Recuperado de <http://www.bvv.sld.cu/vaccimonitor/Vm2003/a10.pdf> . 3-5.
2. Andrews WH, Hammack TS. (2006.) *Manual bacteriológico analítico; Salmonella*. (8a ed.) Estados Unidos: Departamento de Salud y Servicios Humanos de Estados Unidos, Administración de Drogas y Alimentos de Estados Unidos, Centro para la Seguridad de Alimentos y Nutrición. 27p.
3. Arévalo H. (2003). *Determinación de Salmonella spp. y Shigella spp. en carne y vegetales crudos empleados como materia prima en las cafeterías de la ciudad universitaria*. (Tesis de graduación). Universidad de San Carlos de Guatemala, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia. Guatemala.
4. Azzimonti JC. (2005). *La concordancia entre dos tests clínicos para casos binarios: problemas y solución*. Estadística Clínica. Vol. 39 (4), 435-444.
5. Bello Pérez. (1991). *Incidencia de Salmonella en carnes crudas, un estudio en localidades del estado de Guerrero*. México: Ministerio de Salud Pública. 178-183.
6. Bhunia A. (2008). *Food borne microbial pathogens; Mechanisms and Pathogenesis*. USA, Indiana: Springer. 290 p.
7. Carramiñana J. (1997). *Salmonella incidence and distribution of serotypes throughout processing in Spanish poultry slaughterhouse*. Journal of Food Protection, Vol 60(11). 1312-1317.
8. Comisión Guatemalteca de Normas (COGUANOR). (1994). *Carne y productos cárnicos; Embutidos cocidos, ahumados y cocidos y ahumados, generalidades*. Guatemala: Ministerio de Economía, Guatemala, C.A.

9. CONDA.Pronadisa. (2009). *Culture media ISO 6579*. Recuperado de:http://www.condalab.com/pdf/conda_iso6579_guide.pdf?utm_source=newsjunio&utm_medium=email&utm_campaign=newsexpjulio
10. CULTIMED. (2002). *Manual de Medios de cultivo*. Recuperado de:
<http://www.scribd.com/doc/8614574/Manualdemediosdecultivo>
11. D'Aoust J. (1994). *Salmonella and the international food trade*. Journal of Food Protection, Vol 24. 11-31.
12. International Commission on Microbiological Specifications for Foods. (1983). *Microorganismos del los alimentos 1. Técnicas de análisis microbiológico*. Zaragoza, España: Acribia.
13. International Organization for Standardization (ISO). (2010). *About ISO*. Recuperado de: <http://www.iso.org/iso/about.htm>
14. International Organization for Standardization (ISO). (2009). *ISO 6579:2002*. Recuperado de:
http://www.iso.org/iso/iso_catalogue/catalogue_tc/catalogue_detail.htm?csnumber=29315
15. International Organization for Standardization (ISO). *Water quality- Guidance on validation of microbiological methods ISO/TR 13843:2000*. Suiza.
16. James M. (2000). *Modern Food Microbiology*. (6a ed.). Gaithersburg, Maryland; Las Vegas: Aspen Publishers. 790 p.
17. Koneman E., Washington J., Stephen A., William J., Procop G.,...Woods G. (2006). *Diagnóstico microbiológico*. (6a ed.) Estados Unidos: Panamericana.

18. Laboratory Quality Assurance Division. (2008). *Isolation and Identification of Salmonella from meat, poultry and egg products*. MLG 4.04. Estados Unidos: United States Department of Agriculture, Food Safety and Inspection Service, Office of Public Health Science.
19. López N. (2001) *Determinación de Salmonella en carne de res expendida en la ciudad capital de Guatemala*. (Trabajo de tesis). Universidad de San Carlos de Guatemala, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia. Guatemala.
20. Ministerio de Agricultura Pesca y Alimentación. (2004). Principios básicos de elaboración de embutidos. Recuperado de: http://www.marm.es/ministerio/pags/biblioteca/hojas/hd_1989_04.pdf
21. Murali D. (2009). *Control de calidad en los laboratorios clínicos*. Recuperado de: <http://books.google.com.gt/books?id= mRiyyuEmd4>
22. Nacameh (Difusión via Red de Computo semestral sobre Avances en Ciencia y Tecnología de la Carne) (2011). Prevalencia de *Salmonella* y *Staphylococcus aureus* en chorizo y longaniza. Recuperado de: http://cbs.izt.uam.mx/nacameh/v5s1/Nacameh-v5s1_096-107TorresVitela-et al.pdf
23. Oficina Española de Patentes y Marcas. Procedimiento de fabricación de embutidos curados con baja acidez y propiedades sensoriales típicas de los productos artesanales. (2004). Recuperado de: http://digital.csic.es/bitstream/10261/6724/1/2173799_B1.pdf
24. Oficina Guatemalteca de Acreditación (OGA). (2007). *Política de Selección y Validación de Métodos de Ensayo* OGA-GEC-01. Guatemala: Oficina de Acreditación Guatemala CA. 28 p.

25. Ordoñez M, Rojas D. (2007). *Diseño y elaboración de una guía preliminar y para la validación de métodos microbiológicos*. (Trabajo de tesis). Universidad Pontificia Javeriana Facultad de Ciencias. Bogotá.
26. Organización Panamericana de la Salud, Organización Mundial de la Salud. (1996). *Contaminación microbiana de los alimentos vendidos en la vía pública, en ciudades de América Latina y características socio-económicas de sus vendedores y consumidores*. Latinoamerica.
27. Pérez C. (2004). *Aislamiento de Salmonella en canales de aves y evaluación de la efectividad de diferentes medios de enriquecimiento y selectivos*. FCV-LUZ 2. Vol. 14. 1-6
28. Quilez M. (2002). *Incidencia y comportamiento de Salmonella y Listeria en pechugas de pavo curadas*. (Tesis de graduación). Universidad Autónoma de España Facultad de Veterinaria. [CD-ROM]. España.
29. Salgado J, Jaramillo C. (1999). *Salmonella sp en tres tipos de chorizos, como peligro dentro de un sistema de análisis de riesgos e identificación de puntos críticos de control (HACCP), en una empacadora de la ciudad de México*. Vet Mex. México: 1999, 1-8
30. Secretaría de Agricultura Ganadería Desarrollo Rural y Pesca (SAGARPA). (2000). *Elaboración de productos cárnicos*. Recuperado de: http://silbn.files.wordpress.com/2008/unidad_iii_intro_agroin_sesion4.pp
31. United States Department of Agriculture (USDA). Food Safety and Inspection Service. (2009). *About FSIS*. Recuperado de: http://www.fsis.usda.gov/About_FSIS/Agency_History/index.asp

32. United States Department of Agriculture (USDA). (2009). *Laboratory Guidebook. MLG 4.04*. Recuperado de: http://www.fsis.usda.gov/PDF/MLG_4_04.pdf
33. United States Food and Drug Administration. United States. Department of Health and Human Services. (2010). *About the Bacteriological Analytical Manual*. Recuperado de: <http://www.fda.gov/Food/ScienceResearch/LaboratoryMethods/BacteriologicalAnalyticalManualBAM/UCM071363>
34. United States. Food and Drug Administration. United States Department of Health and Human Services. (2010). "About FDA". Recuperado de: <http://www.fda.gov/AboutFDA/CentersOffices/default.htm>
35. United States Food and Drug Administration. United States Department of Health and Human Services. (2010). *Bacteriological Analytical Manual (BAM)*. Recuperado de: <http://www.fda.gov/Food/ScienceResearch/LaboratoryMethods/BacteriologicalAnalyticalManualBAM/default.htm>
36. Universidad Nacional Amazónica de Madre de Dios. (2010). Embutidos Crudos y Cocidos. Recuperado de: <http://es.scribd.com/doc/52278631/embutidos-crudos-y-cocidos>
37. Valle P, Bernard L. (2000). *Toxicología de alimentos*. México D.F.: Instituto Nacional de Salud Pública.
38. Velásquez E. (2006). *Determinación de Salmonella sp. en carne de pollo que se vende en los mercados de la ciudad de Guatemala*. (Trabajo de tesis). Universidad de San Carlos de Guatemala Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia. Guatemala.

13. ANEXOS

Anexo 1. Medios de cultivo

Caldo Rappaport Vassiliadis (RV)

Es un medio líquido usado para el enriquecimiento selectivo de *Salmonella*, este medio fue formulado por Rappaport y modificado por Vassiliadis. Su uso ha sido aprobado para productos lácteos, productos cárnicos, alimentos con alto nivel de contaminación y alimentos para animales. Este medio contiene triptona que es una fuente de carbono y nitrógeno para los requisitos generales de crecimiento, el Cloruro de Magnesio eleva la presión osmótica en el medio, el Verde de Malaquita inhibe los organismos diferentes de *Salmonella*. El pH bajo del medio (5.1 ± 0.2), combinado con la presencia de Verde Malaquita y la alta concentración de Cloruro de Magnesio le dan un carácter selectivo para *Salmonella* spp. (CULTIMED, 2002).

Caldo Tetracionato (TT)

Mueller inicio con la formulación de este medio y posteriormente Kauffman modificó el medio, obteniendo un mayor número de crecimientos positivos que con el medio original. La formulación está reconocida por la USP (CULTIMED, 2002, P.11).

Fundamento: debido a la presencia de las sales biliares se inhibe el crecimiento de los microorganismos gram positivo. El Tetracionato se produce a partir del Tiosulfato, cuando después de esterilizar el medio se agrega asépticamente la solución yodurada; el Tetracionato tiene un efecto inhibitor sobre los coliformes y la mayor parte de las bacterias intestinales. El caldo mantiene el pH del medio al neutralizar el Acido Sulfúrico producido por la reducción del Tetracionato, de lo contrario el medio se iría acidificando y se detendría el crecimiento de todos los microorganismos. La mezcla de peptonas constituye el soporte nutritivo. La USP aconseja la adición de Verde Brillante que inhibe principalmente la microbiota gram positivo, sin embargo a veces se desaconseja la adición de este compuesto porque el medio es muy inhibitor (CULTIMED, 2002).

Agar Sulfito Bismuto (BSA)

Se emplea como medio altamente selectivo para el aislamiento de *S. typhi* en heces, aguas y productos alimenticios muy contaminados. Este medio es una modificación de la formulación de Wilson y Blair, quienes pusieron de manifiesto la superior aptitud de este medio en relación a otros para aislamiento de *S. typhi*, a los que además superaba en estabilidad y sensibilidad. El interés de este medio se ha puesto de manifiesto con las recomendaciones que se hacen de su empleo tanto en publicaciones de prestigio internacional como por organismos oficiales (USP, APHA) (CULTIMED, 2002, P.126). El bismuto sulfito inhibe a las bacterias gram positivo y Coliformes, no restringiendo en absoluto el crecimiento de *Salmonella*. A su vez por la presencia de azufre en el medio, los microorganismos capaces de producir Sulfuro de Hidrógeno precipitan Sulfuro Hierro (III), que da lugar a tonalidades marrones más o menos oscuras e incluso negras, también se puede reducir el bismuto a metal dando un brillo alrededor de las colonias correspondientes (CULTIMED, 2002).

XLD (xilosa lisina desoxicolato)

El medio fue formulado por Taylor con la finalidad de mejorar el crecimiento de microorganismos entéricos patógenos exigentes. La formulación corresponde a las recomendaciones de la USP, la FDA entre otras entidades. Su fundamento se basa en que el Desoxicolato inhibe el crecimiento de la microbiota contaminante gram positiva. La mayoría de las *Enterobacteriaceas* patógenas a excepción de la *Shigella*, fermentan la D (+)-Xilosa. El ácido producto de la fermentación de la D (+)-Xilosa, de la lactosa o de sacarosa produce un viraje a amarillo del Rojo de Fenol contenido en el medio. La *Salmonella* descarboxila la lisina produciendo colonias rojo-anaranjadas debido al aumento del pH que provoca en el medio y consecuente viraje del Rojo de Fenol; las bacterias productoras de Sulfuro de hidrógeno se presenta con colonias ennegrecidas debido a la presencia de Tiosulfato de sodio y Amonio Hierro(III) en el medio (CULTIMED, 2002).

Agar HE (Hektoen Enteric)

Este medio selectivo se emplea para el aislamiento y diferenciación de las Enterobacterias patógenas. Fue formulado por King y Metzger. Su fundamento se basa en la presencia de dos indicadores para diferenciar bacterias lactosa positivo de las lactosa negativo, las bacterias que fermentan la lactosa y salicina toman un color amarillo anaranjado, la presencia de sales biliares inhibe el crecimiento de una gran parte de la microbiota acompañante y el Tiosulfato de Sodio con el Amonio Hierro (III) detectan las bacterias productoras de Sulfuro de Hidrógeno por el precipitado negro del Sulfuro de Hierro producido (CULTIMED, 2002).

Hierro lisina Agar (LIA)

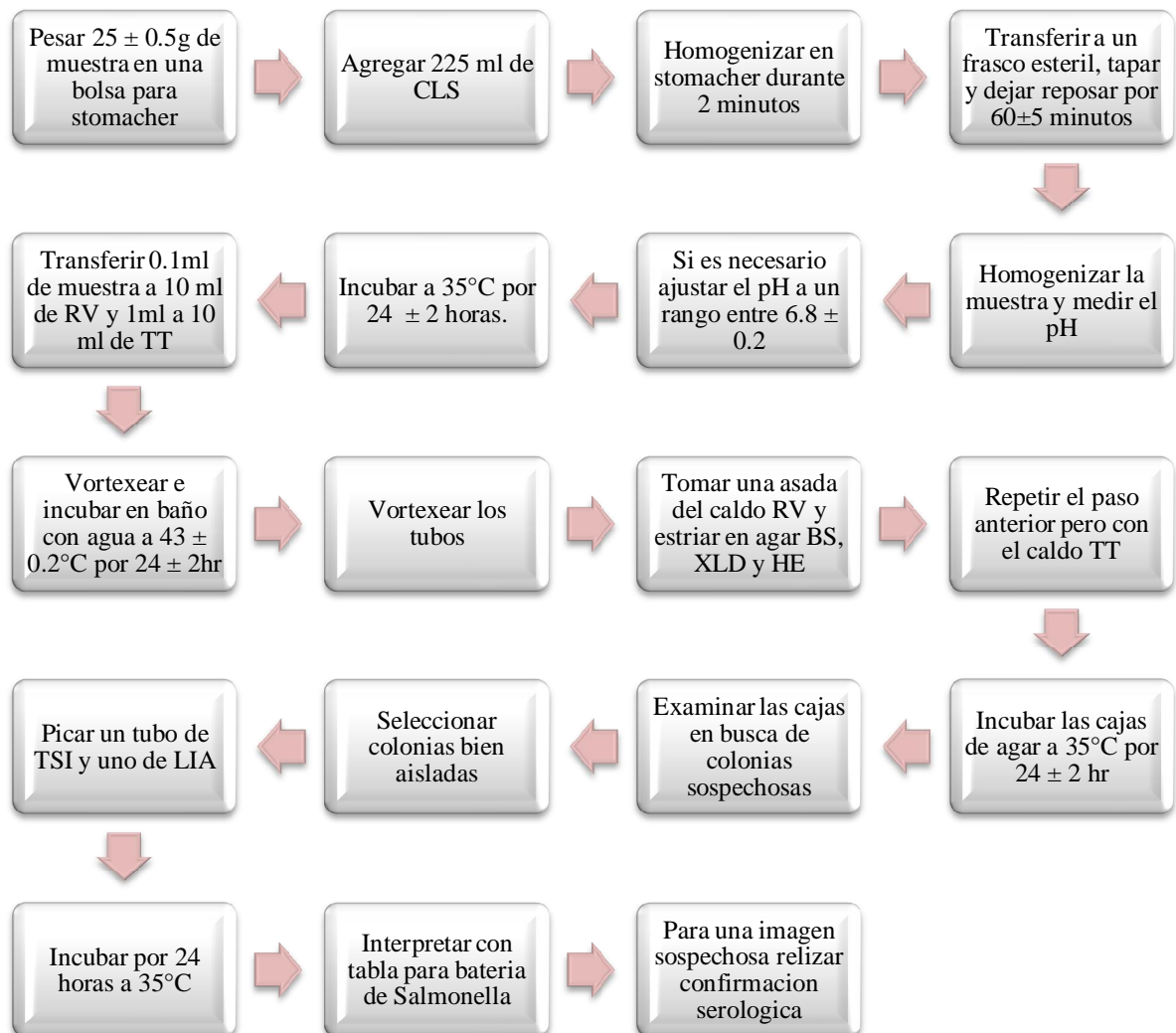
Este medio se emplea como medio diferencial para *Salmonella* basado en la descarboxilación de la lisina. El agar LIA permite determinar los microorganismos capaces de descarboxilar la lisina, produciendo un cambio de color el púrpura de bromocresol. Sin embargo, esta descarboxilación solo se puede hacer en un medio ligeramente ácido, que se consigue con la fermentación de glucosa, por ello esta prueba está limitada a los microorganismos capaces de utilizar la glucosa. Cuando el pH del medio baja, el indicador vira a amarillo, al alcalinizar el medio debido a la descarboxilación de la lisina, el indicador (púrpura de bromocresol) vira a rojo purpura. Los cultivos que contienen microorganismos capaces de formar Hierro III, precipitan el sulfuro lo cual se observa en el medio como un precipitado negro. Además pueden aparecer burbujas de gas, que pueden incluso desplazar el medio (CULTIMED, 2002).

Hierro triple azúcar (TSI)

El medio hierro triple se emplea para identificar Enterobacterias. Russelkll fue el primero que demostró su utilización (CULTIMED, 2002, P.12).

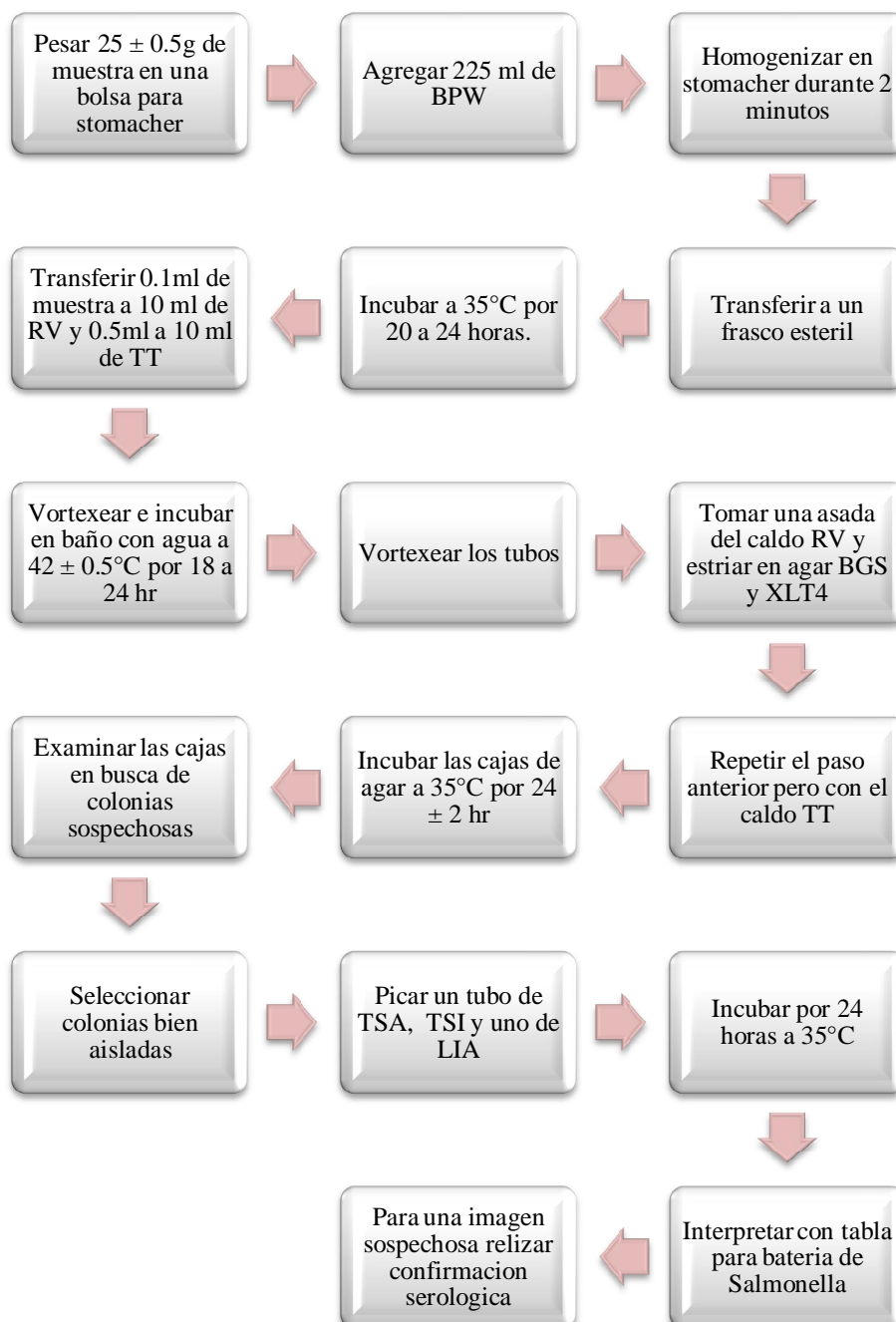
Anexo 2. Diagrama de flujo

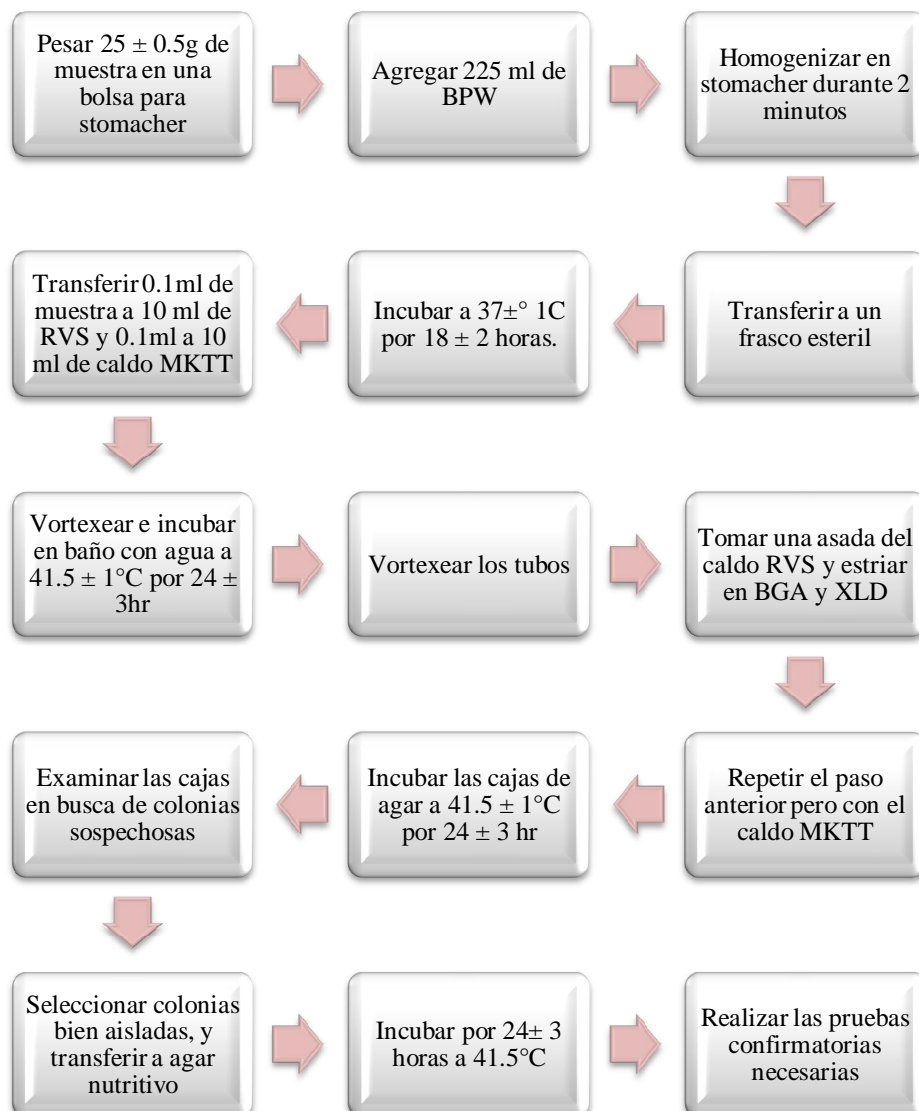
Determinación de *Salmonella* spp. por el metodo de la FDA (BAM capitulo 5)



Anexo 3. Diagrama de flujo

Aislamiento e identificación de *Salmonella* spp. en carne, productos lácteos y huevos por el método del USDA



Anexo 4. Diagrama de flujo**Detección de *Salmonella* spp. en productos carnicos, norma ISO 6579**

Anexo 5. Cuadro comparativo

Comparación de los métodos BAM, USDA e ISO para la detección de *Salmonella* spp

Parámetros	FDA (BAM Cap.5)	USDA	ISO 6579
Cantidad de muestra requerida	25 ± 0.5 g	25 ± 0.5 g	25 ± 0.5 g
Pre-enriquecimiento	En medio caldo lactosado	En agua peptonada bufferada	En agua peptonada bufferada
Ajuste de pH	Si es necesario ajustar entre 6.8 ± 0.2	No se realiza	No se realiza
Tiempo y temperatura de incubación	24 ± 2 horas a 35°C	20- 24 horas a 35 ± 2°C	18 ± 2 horas a 37 ±1°C
Enriquecimiento selectivo	Caldo Rappaport Vasiliadis y Caldo Tetracionato	Caldo Rappaport Vasiliadis y Caldo Tetracionato	Caldo Rappaport Vasiliadis soya y Caldo Tetracionato Mueller Kauffman
Tiempo y temperatura de incubación	24 ± 2 horas a 43 ± 0.2°C	18-24 horas a 42 ± 0.5°C	24 ± 3 horas a 41.5 ±1°C
Aislamiento en medios selectivos	BSA, XLD y HE	XLT4	XLD y BGA
Tiempo y temperatura de incubación	24 ± 2 horas a 35°C	18 a 24 horas a 35 ± 2°C, si es necesario reincubar 18 horas	24 ± 3 horas a 41.5 ±1°C
Confirmación	Bioquímica, serológica	Bioquímica, serológica	Bioquímica, serológica

Fuente: FDA (BAM, Capítulo 5), United States Department of Agriculture (USDA). (2009). *Laboratory Guidebook. MLG 4.0*. . International Organization for Standardization (ISO). (2009). *ISO 6579:2002*.

Anexo 6. Resultados obtenidas en cada uno de los muestreos realizados, mostrando en detalle la obtención de colonias sospechosas para cada método.

Cuadro 1 Primer muestreo realizado en el mercado La Reformita zona 12.

Recolección de muestras de chorizo y longaniza artesanal, analizadas por los tres métodos.

Método	BAM						USDA		ISO			
	Caldo Rappaport			Caldo Tetracionato			Caldo Rappaport	Caldo Tetracionato	Caldo Rappaport Soya	Caldo MKTT		
No. Muestra	XLD	HK	BSA	XLD	HK	BSA	XLT4	XLT4	XLD	AVB	XLD	AVB
1	ca	ca	cv	cs	cs	cv	cs	cs	ca	cv	cr	sc
2	ca	ca	cs	cs	cs	cs	cs	cs	ca	cv	cr	cv
3	ca	cr	cv	ca	cr	cv	cs	cs	ca	cv	cr	cs
4	ca	cr	ca	ca	cr	cs	ca	cs	cs	cv	sc	sc
5	ca	cv	sc	sc	cr	sc	cs	cs	cs	cv	sc	cr
6	cs	cs	cs	cs	cs	cs	cs	cs	cs	cs	cs	cs
7	sc	sc	sc	cr	cv	cv	cs	cs	ca	cv	sc	sc
8	ca	cr	cv	ca	ca	cv	cs	cs	sc	cv	cs	sc
* 9	cs	cs	cs	cs	cs	cs	cs	cs	ca	sc	sc	cs
10	sc	sc	sc	sc	sc	sc	cs	sc	ca	cv	sc	sc
mc	cs	cs	cs	cs	cs	cs	cs	cs	cs	cs	cs	cs
c+	cs	cs	cs	cs	cs	cs	cs	cs	cs	cs	cs	cs
control de medio	sc	sc	sc	sc	sc	sc	sc	sc	sc	sc	sc	sc

Fuente: Datos experimentales, Área de Microbiología de alimentos. LNS 2010-2011. Donde*: muestra control; c+: control positivo; ca: colonias amarillas; cv: colonias verdes; cr: colonias rosadas; sc: sin crecimiento; cs: colonias sospechosas.

Cuadro 2. Segundo muestreo, realizado en el mercado Central zona 1. Recolección de muestras de chorizo y longaniza artesanal, analizadas por los tres métodos.

Método	BAM						USDA		ISO			
	Caldo Rappaport			Caldo Tetracionato			Caldo Rappaport	Caldo Tetracionato	Caldo Rappaport Soya	Caldo MKTT		
No. Muestra	XLD	HK	BSA	XLD	HK	BSA	XLT4	XLT4	XLD	AVB	XLD	AVB
11	ca	ca	cs	cs	cs	cs	cs	cs	cs	cv	ca	cv
12	ca	ca	cs	cs	cs	cs	ca	cs	ca	cv	cs	sc
13	cs	cs	cs	ca	cs	cv	ca	cs	ca	cv	ca	cv
14	ca	ca	cv	cs	cs	cv	ca	ca	ca	cv	ca	cv
15	ca	ca	cv	ca	cs	cv	ca	cs	ca	cv	ca	sc
16	cs	cs	cv	cs	cs	cv	cs	cs	cs	cs	cs	cs
17	cs	cs	cv	cs	cs	cs	ca	cs	ca	cv	ca	cv
18	sc	sc	sc	sc	sc	sc	ca	cs	cs	cv	cs	sc
19	cs	cs	cs	cs	cs	cs	cs	cs	ca	cs	cs	cv
20	cs	cs	cv	cs	cs	cs	cs	cs	ca	cs	cs	cs
21	cs	ca	cs	cs	cs	cv	ca	cs	ca	cv	cs	cv
22	ca	ca	cv	ca	cs	cv	cs	cs	ca	cs	sc	cv
23	ca	ca	cv	cs	ca	cs	cs	cs	cs	cs	ca	sc
24	ca	ca	cs	ca	cs	cs	ca	cs	cs	cv	cs	cv
25	cs	cs	cv	cs	cs	cs	ca	cs	ca	cs	cs	cv
mc	cs	cs	cs	cs	cs	cs	cs	cs	cs	cs	cs	cs
c+	cs	cs	cs	cs	cs	cs	cs	cs	cs	cs	cs	cs
control de medio	sc	sc	sc	sc	sc	sc	sc	sc	sc	sc	sc	sc

Fuente: Datos experimentales, Área de Microbiología de alimentos. LNS 2010-2011. Donde*: muestra control; c+: control positivo; ca: colonias amarillas; cv: colonias verdes; cr: colonias rosadas; sc: sin crecimiento; cs: colonias sospechosas.

Cuadro 3. Tercer muestreo, realizado en el mercado Colón zona 1. Recolección de muestras de chorizo y longaniza artesanal, analizadas por los tres métodos.

Método	BAM						USDA		ISO			
	Caldo Rappaport			Caldo Tetrionato			Caldo Rappaport	Caldo Tetrionato	Caldo Rappaport Soya	Caldo MKTT		
	XLD	HK	BSA	XLD	HK	BSA	XLT4	XLT4	XLD	AVB	XLD	AVB
No. Muestra												
26	sc	sc	cv	ca	cr	cv	cs	cs	cs	cv	cs	cv
27	sc	sc	sc	sc	sc	sc	cs	cs	ca	cv	ca	cv
28	cs	cs	cs	cs	cs	cs	cs	cs	cs	cs	cs	cs
29	cs	cs	cs	cs	cs	cs	cs	cs	cs	cv	ca	cv
30	cs	cs	cv	cs	cs	cv	cs	cs	cs	cv	cr	cr
31	cs	cs	cv	cs	cs	cv	cs	cs	cs	cv	ca	cs
32	sc	sc	sc	sc	sc	sc	cs	cs	ca	cv	cs	cv
33	ca	ca	sc	ca	ca	sc	ca	cs	cs	cv	ca	cv
34	ca	ca	cv	cs	cs	cv	ca	cs	ca	cv	cs	cv
35	ca	ca	cv	ca	cs	cv	cr	cs	cs	cs	cs	cs
36	cs	cs	cs	cs	cs	cs	cs	cs	cs	cs	cs	cv
37	cs	cs	cs	cs	cs	cs	cs	cs	cs	cv	cs	cv
38	ca	cs	cv	ca	ca	cv	ca	cs	ca	cv	cs	cv
39	cs	ca	cv	ca	cs	cv	ca	cs	cr	cv	ca	cs
40	ca	cs	cv	cs	cs	cv	cs	cs	ca	cv	cs	cv
mc	cs	cs	cs	cs	cs	cs	cs	cs	cs	cs	cs	cs
c+	cs	cs	cs	cs	cs	cs	cs	cs	cs	cs	cs	cs
control de medio	sc	sc	sc	sc	sc	sc	sc	sc	sc	sc	sc	sc

Fuente: Datos experimentales, Área de Microbiología de alimentos. LNS 2010-2011. Donde*: muestra control; c+: control positivo; ca: colonias amarillas; cv: colonias verdes; cr: colonias rosadas; sc: sin crecimiento; cs: colonias sospechosas.

Cuadro 4. Cuarto muestreo, realizado en el mercado Cervantes zona 3. Recolección de muestras de chorizo y longaniza artesanal, analizadas por los tres métodos.

Método	BAM						USDA		ISO			
	Caldo Rappaport			Caldo Tetrionato			Caldo Rappaport	Caldo Tetrionato	Caldo Rappaport Soya	Caldo MKTT		
	XLD	HK	BSA	XLD	HK	BSA	XLT4	XLT4	XLD	AVB	XLD	AVB
No. Muestra												
41	ca	cr	sc	cs	cs	cv	cs	cs	cs	cv	cs	cv
42	ca	cs	cv	cs	cs	cv	cs	cs	ca	cv	ca	cv
43	cs	cs	sc	cs	cs	cv	cs	cs	cs	cs	cs	cs
44	ca	cs	sc	cs	cs	cv	cs	cs	cs	cv	ca	cv
45	ca	cr	sc	ca	cs	cv	cs	cs	cs	cv	cr	cr
46	ca	cr	sc	ca	cs	cv	ca	cs	cs	cv	ca	cs
47	ca	cs	cv	cs	cr	cv	cs	cs	ca	cv	cs	cv
48	ca	cr	cv	ca	cr	cv	cs	cs	cs	cv	ca	cv
49	ca	cs	cv	ca	cr	sc	ca	ca	ca	cv	cs	cv
50	ca	cs	sc	cs	cr	sc	ca	ca	cs	cs	cs	cs
mc	cs	cs	cs	cs	cs	cs	cs	cs	cs	cs	cs	cs
c+	cs	cs	cs	cs	cs	cs	cs	cs	cs	cs	cs	cs
control de medio	sc	sc	sc	sc	sc	sc	sc	sc	sc	sc	sc	sc

Fuente: Datos experimentales, Área de Microbiología de alimentos. LNS 2010-2011. Donde*: muestra control; c+: control positivo; ca: colonias amarillas; cv: colonias verdes; cr: colonias rosadas; sc: sin crecimiento; cs: colonias sospechosas.

Cuadro 5. Quinto muestreo, realizado en el mercado San José zona 7. Recolección de muestras de chorizo y longaniza artesanal, analizadas por los tres métodos.

Método	BAM						USDA		ISO			
	Caldo Rappaport			Caldo Tetrionato			Caldo Rappaport	Caldo Tetrionato	Caldo Rappaport	Soya	Caldo MKTT	
	XLD	HK	BSA	XLD	HK	BSA	XLT4	XLT4	XLD	AVB	XLD	AVB
No. Muestra												
51	cs	ca	cv	ca	cs	cs	ca	cs	cs	cs	cs	cs
52	ca	sc	cv	ca	sc	cv	ca	cs	cs	cv	cr	cv
53	ca	ca	cv	ca	ca	cv	ca	cs	ca	cv	ca	cv
54	sc	sc	sc	sc	ca	cv	ca	ca	ca	cv	ca	cv
55	sc	sc	sc	sc	sc	sc	cs	cs	ca	cv	cs	sc
56	sc	sc	sc	sc	ca	cv	cs	cs	ca	cv	cs	sc
57	sc	sc	sc	sc	sc	sc	sc	sc	ca	cv	cs	cv
58	sc	sc	sc	sc	sc	sc	cs	cs	ca	cv	sc	cv
59	sc	sc	cv	sc	ca	cv	cs	ca	cs	cv	cs	cs
60	sc	sc	sc	sc	sc	cv	cs	cs	ca	cv	cs	cv
61	sc	sc	cv	sc	sc	cv	ca	cs	cs	cv	cs	cs
62	ca	cs	cs	ca	cs	cs	cs	cs	ca	cv	cr	cv
63	ca	ca	sc	sc	sc	cv	ca	cs	ca	cv	cs	cv
64	ca	cr	cv	ca	ca	cv	ca	cs	ca	cv	cs	cs
65	ca	ca	cv	cs	ca	cs	cs	cs	cs	cs	cs	cs
mc	cs	cs	cs	cs	cs	cs	cs	cs	cs	cs	cs	cs
c+	cs	cs	cs	cs	cs	cs	cs	cs	cs	cs	cs	cs
control de medio	sc	sc	sc	sc	sc	sc	sc	sc	sc	sc	sc	sc

Fuente: Datos experimentales, Área de Microbiología de alimentos. LNS 2010-2011. Donde*: muestra control; c+: control positivo; ca: colonias amarillas; cv: colonias verdes; cr: colonias rosadas; sc: sin crecimiento; cs: colonias sospechosas.

Cuadro 6. Sexto muestreo, realizado en el mercado La Presidenta zona 1. Recolección de muestras de chorizo y longaniza artesanal, analizadas por los tres métodos.

Método	BAM						USDA		ISO			
	Caldo Rappaport			Caldo Tetrionato			Caldo Rappaport	Caldo Tetrionato	Caldo Rappaport Soya		Caldo MKTT	
	XLD	HK	BSA	XLD	HK	BSA	XLT4	XLT4	XLD	AVB	XLD	AVB
No. Muestra												
66	cs	cs	cs	cs	cs	cs	cs	ca	ca	cr	cs	cs
67	ca	cr	cs	cs	cr	cs	cs	cs	cs	cv	cs	cv
68	ca	ca	cv	ca	ca	cv	ca	cs	ca	cv	cs	cv
69	cr	cr	cv	cs	cr	cv	cs	cs	ca	cs	ca	cv
70	ca	ca	cv	ca	ca	cs	cs	cs	ca	cv	ca	cv
71	cs	cs	cs	cs	cs	cs	ca	cs	cs	cv	cr	cr
72	ca	cs	cv	cs	ca	cs	cs	cs	ca	cv	cs	cv
73	ca	ca	cv	ca	ca	cv	ca	cs	ca	cv	ca	cv
74	cs	cs	cv	cs	ca	cs	cs	cs	cs	cv	cs	cv
75	cs	cs	cs	cs	cs	cs	cs	cs	cs	cs	cs	cs
76	ca	ca	cv	ca	ca	cv	ca	cs	cs	cr	cs	cr
77	ca	ca	cv	ca	ca	cv	ca	cs	ca	cv	cs	cv
78	sc	sc	sc	sc	sc	sc	cs	cs	cs	cs	cs	cs
79	cs	cs	cs	cs	cs	cs	cs	cs	cs	cs	cs	cs
80	cr	sc	sc	cr	sc	sc	ca	ca	ca	cv	cs	cv
mc	cs	cs	cs	cs	cs	cs	cs	cs	cs	cs	cs	cs
c+	cs	cs	cs	cs	cs	cs	cs	cs	cs	cs	cs	cs
control de medio	sc	sc	sc	sc	sc	sc	sc	sc	sc	sc	sc	sc

Fuente: Datos experimentales, Área de Microbiología de alimentos. LNS 2010-2011. Donde*: muestra control; c+: control positivo; ca: colonias amarillas; cv: colonias verdes; cr: colonias rosadas; sc: sin crecimiento; cs: colonias sospechosas.

Cuadro 7. Séptimo muestreo, realizado en el mercado La Palmita zona 5. Recolección de muestras de chorizo y longaniza artesanal, analizadas por los tres métodos.

Método	BAM						USDA		ISO			
	Caldo Rappaport			Caldo Tetrionato			Caldo Rappaport	Caldo Tetrionato	Caldo Rappaport Soya		Caldo MKTT	
	XLD	HK	BSA	XLD	HK	BSA	XLT4	XLT4	XLD	AVB	XLD	AVB
No. Muestra												
81	ca	sc	sc	sc	sc	sc	ca	sc	ca	cv	sc	sc
82	ca	ca	cv	ca	ca	cv	sc	sc	sc	sc	sc	sc
83	ca	ca	cv	ca	ca	cv	ca	sc	sc	sc	sc	sc
84	sc	sc	sc	sc	sc	sc	ca	sc	ca	sc	ca	sc
85	sc	sc	sc	sc	sc	sc	sc	sc	sc	sc	sc	sc
86	ca	ca	cs	cs	cs	cs	ca	cs	sc	cv	ca	sc
87	ca	ca	cs	cs	cs	cs	sc	cs	cs	cs	cs	cs
88	ca	ca	cv	ca	ca	cv	cs	cs	ca	cv	cs	cs
89	ca	ca	cv	cs	cs	cs	ca	cs	ca	cv	cs	cv
90	cs	ca	cs	cs	cs	cs	ca	cs	cs	cv	cs	sc
91	ca	cs	cv	sc	cv	cv	ca	cs	ca	cv	cs	cv
92	ca	sc	sc	sc	ca	sc	cs	cs	ca	cv	ca	cv
93	ca	ca	cs	cs	ca	cs	cs	cs	cs	cv	cs	cs
94	ca	ca	cv	ca	ca	cv	ca	cs	cs	cv	cs	cv
95	cs	ca	cv	ca	cs	cs	ca	cs	cs	cv	cs	cv
mc	cs	cs	cs	cs	cs	cs	cs	cs	cs	cs	cs	cs
c+	cs	cs	cs	cs	cs	cs	cs	cs	cs	cs	cs	cs
control de medio	sc	sc	sc	sc	sc	sc	sc	sc	sc	sc	sc	sc

Fuente: Datos experimentales, Área de Microbiología de alimentos. LNS 2010-2011. Donde*: muestra control; c+: control positivo; ca: colonias amarillas; cv: colonias verdes; cr: colonias rosadas; sc: sin crecimiento; cs: colonias sospechosas.

Cuadro 8. Octavo muestreo, realizado en el mercado Primero de Julio zona 19.
Recolección de muestras de chorizo y longaniza artesanal, analizadas por los tres métodos.

Método	BAM						USDA		ISO			
	Caldo Rappaport			Caldo Tetrionato			Caldo Rappaport	Caldo Tetrionato	Caldo Rappaport Soya		Caldo MKTT	
No. Muestra	XLD	HK	BSA	XLD	HK	BSA	XLT4	XLT4	XLD	AVB	XLD	AVB
96	sc	sc	sc	sc	sc	sc	sc	sc	sc	sc	sc	sc
97	sc	sc	sc	sc	sc	sc	sc	sc	sc	sc	sc	sc
98	sc	sc	sc	sc	sc	sc	sc	sc	sc	sc	sc	sc
99	ca	cr	sc	ca	cr	sc	sc	sc	ca	sc	sc	sc
100	ca	cr	sc	ca	cr	sc	ca	ca	sc	sc	sc	sc
mc	cs	cs	cs	cs	cs	cs	cs	cs	cs	cs	cs	cs
c+	cs	cs	cs	cs	cs	cs	cs	cs	cs	cs	cs	cs
control de medio	sc	sc	sc	sc	sc	sc	sc	sc	sc	sc	sc	sc

Fuente: Datos experimentales, Área de Microbiología de alimentos. LNS 2010-2011. Donde*: muestra control; c+: control positivo; ca: colonias amarillas; cv: colonias verdes; cr: colonias rosadas; sc: sin crecimiento; cs: colonias sospechosas.

Anexo 7. Pruebas bioquímicas realizadas a las muestras.

Cuadro 9. Resultados de las reacciones bioquímicas de los medios TSI y LIA, para las muestras que presentaron colonias sospechosas, resultados de la prueba de antisuero Polivalente O realizado a las muestras que presentaron una reacción bioquímica característica para *Salmonella*.

No. muestra	TSI	g/H ₂ S	LIA	g/H ₂ S	Antisuero Poli O
1B	K/K	++	R/A	+ -	+
2B	K/K	++	K/A	+ -	+
6B	K/K	++	K/K	++	+
8B	K/K	++	K/K	++	+
9B	K/K	++	K/K	++	+
1U	K/K	++	K/N	++	+
2U	K/K	++	R/A	--	+
3U	K/K	++	R/A	--	+
4U	K/K	++	R/A	--	+
5U	K/K	++	R/A	--	+
6U	K/K	++	R/A	--	+
7U	K/K	++	R/A	--	+
8U	K/K	++	R/A	--	+
9U	K/K	++	K/K	++	+
4I	A/A	++	K/K	++	+
5I	K/K	++	K/K	++	+
6I	K/A	- +	R/A	+ -	+
6I	K/K	++	K/K	++	+
8I	K/K	++	R/A	--	+
9I	K/N	--	K/N	--	+
11B	K/K	++	K/A	- +	+
16B	K/K	++	K/A	--	+
17B	A/A	++	K/A	++	+

No. Muestra	TSI	g/H ₂ S	LIA	g/H ₂ S	Antisuero Poli O
19B	TSI	g/H ₂ S	LIA	g/H ₂ S	+
20B	K/K	+ +	K/K	+ +	+
25B	K/K	- +	K/N	- +	+
11U	K/K	+ +	K/A	- -	+
16U	K/A	+ +	N/N	- +	-
17U	K/K	+ +	K/K	+ +	+
19U	K/K	+ +	K/A	- +	+
20U	K/K	+ +	K/K	- +	+
25U	K/K	- +	K/A	- -	+
11I	K/K	+ +	K/N	- +	+
16I	K/K	+ +	K/K	+ +	+
19I	K/N	- -	K/N	- -	-
28B	K/K	+ +	K/N	+ +	+
29B	K/K	+ +	K/N	+ +	+
30B	K/K	+ +	K/K	+ +	+
31B	K/K	+ +	R/A	+ +	+
36B	K/K	+ +	K/K	+ +	+
37B	K/K	+ +	K/K	- +	+
40B	K/K	+ +	K/A	- +	+
28 U	K/K	+ +	K/K	- +	+
29U	K/K	+ +	K/N	- +	+
31U	K/K	+ +	K/K	- +	+
35U	K/K	+ +	K/K	- +	+
36U	K/K	+ +	K/N	+ +	+
37U	K/K	+ +	K/K	+ +	+
40U	K/K	+ +	K/K	- +	+
28I	K/K	+ +	K/K	+ +	+
29I	K/A	+ +	K/K	+ +	+

No. muestra	TSI	g/H ₂ S	LIA	g/H ₂ S	Antisuero Poli O
30I	K/A	++	K/K	- +	+
31I	K/K	++	K/N	- +	+
36I	K/K	++	K/K	- +	+
37I	K/K	++	K/K	- +	+
40I	K/K	- +	K/A	++	+
41B	K/K	++	K/K	++	+
42B	K/K	- +	R/A	+ -	+
43B	K/K	++	K/N	++	+
44B	K/K	++	K/N	- +	+
47B	A/A	++	K/K	- +	+
41U	K/K	++	K/K	++	+
42U	K/K	- +	K/N	- +	+
43U	K/K	++	K/K	++	+
44U	K/K	- +	K/N	- +	+
47U	K/K	++	K/K	- +	+
41I	K/K	++	K/K	+ -	+
42I	K/K	++	K/K	- +	+
43I	K/A	++	K/N	- +	+
44I	K/K	++	K/K	- +	+
51B	K/A	++	K/N	- +	+
51U	A/A	++	R/A	- -	+
61U	K/K	++	R/A	- +	+
51I	K/K	++	K/K	- +	+
52I	K/A	++	N/N	- +	+
61I	K/A	++	K/K	- +	+
65I	K/K	- +	K/K	- +	+
66B	K/A	++	K/K	++	+
71B	K/K	++	K/N	- +	+

No. Muestra	LIA	g/H ₂ S	TSI	g/H ₂ S	Antisuero
					Poli o
72B	K/A	- +	K/N	- +	+
74B	K/K	+ +	R/A	- -	+
75B	K/K	+ +	K/N	- +	+
66U	K/K	+ +	K/N	- +	+
71U	K/N	- +	K/N	- +	+
72U	K/K	- +	R/A	- -	+
74U	K/K	+ +	R/A	- -	+
75U	K/N	- +	K/N	- +	+
66I	K/K	+ +	K/N	+ +	+
71I	K/K	+ +	K/N	- -	+
72I	K/N	+ +	K/N	- +	+
74I	K/A	+ +	R/A	- -	+
75I	K/K	+ +	K/K	- +	+
88B	K/A	- +	K/A	- +	+
89B	K/N	- -	K/N	- -	+
95B	K/K	+ +	R/A	- +	+
88U	K/N	- +	K/N	- +	+
89U	K/N	- +	K/N	- +	+
95U	K/N	- +	K/N	- +	+
88I	K/K	+ +	R/N	- +	+
89I	K/A	+ +	R/A	+ -	+
95I	K/N	- +	K/N	- +	+

Fuente: Datos experimentales, Área de Microbiología de alimentos. LNS 2010-2011. Donde: B: BAM; U: USDA; I: ISO; K: alcalino; A: ácido; N: neutro; R: rojo; g: gas; H₂S: Ácido Sulfhídrico; (+) reacción positiva; (-) reacción negativa.

Anexo 8. Resultados de las muestras comerciales analizadas para la detección de *Salmonella* spp.

Cuadro 10. Tamizaje realizado con los tres métodos, a las muestras de chorizo y longaniza comerciales, las cuales fueron utilizadas posteriormente para la contaminación artificial con *Salmonella* spp con el objetivo de medir el límite de detección, repetibilidad y la reproducibilidad de los métodos validados.

Número de repeticiones de la muestra	BAM	USDA	ISO
1	a	a	a
2	a	a	a
3	a	a	a
4	a	a	a
5	a	a	a
6	a	a	a
7	a	a	a
8	a	a	a
9	a	a	a
10	a	a	a

Fuente: Datos experimentales, Área de Microbiología de alimentos. LNS 2010-2011. Donde: a: ausencia de *Salmonella* en 25 g de muestra