



Universidad de San Carlos de Guatemala
Facultad de Ingeniería
Escuela de Estudios de Postgrado
Maestría en Ciencia y Tecnología de los Alimentos

**BENEFICIOS DE LA IMPLEMENTACIÓN DE TECNOLOGÍA qPCR PARA LA DETECCIÓN
DE *SALMONELLA SPP* EN MUESTRAS DE SUPERFICIES EN CONTACTO DIRECTO CON
LOS ALIMENTOS**

Ing. Allan Francis Hernández Guerra
Asesorado por la Mtra. Vera Lucia Paredes Barrios

Guatemala, mayo de 2023

UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA



FACULTAD DE INGENIERÍA

**BENEFICIOS DE LA IMPLEMENTACIÓN DE TECNOLOGÍA qPCR PARA LA DETECCIÓN
DE *SALMONELLA SPP* EN MUESTRAS DE SUPERFICIES EN CONTACTO DIRECTO CON
LOS ALIMENTOS**

TRABAJO DE GRADUACIÓN

PRESENTADO A LA JUNTA DIRECTIVA DE LA
FACULTAD DE INGENIERÍA
POR

ING. ALLAN FRANCIS HERNÁNDEZ GUERRA
ASESORADO POR LA MTRA. VERA LUCIA PAREDES BARRIOS

AL CONFERÍRSELE EL TÍTULO DE
MAESTRO EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE LOS ALIMENTOS

GUATEMALA, MAYO DE 2023

UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
FACULTAD DE INGENIERÍA



NÓMINA DE JUNTA DIRECTIVA

DECANA	Inga. Aurelia Anabela Cordova Estrada
VOCAL I	Ing. José Francisco Gómez Rivera
VOCAL II	Ing. Mario Renato Escobedo Martínez
VOCAL III	Ing. José Milton de León Bran
VOCAL IV	Br. Kevin Vladimir Cruz Lorente
VOCAL V	Br. Fernando José Paz González
SECRETARIO	Ing. Hugo Humberto Rivera Pérez

TRIBUNAL QUE PRACTICÓ EL EXAMEN GENERAL PRIVADO

DECANA	Inga. Aurelia Anabela Cordova Estrada
DIRECTOR	Ing. Edgar Darío Álvarez Coti
EXAMINADORA	Mtra. Hilda Piedad Palma Ramos
EXAMINADOR	Mtro. David Fernando Cabrera García
SECRETARIO	Ing. Hugo Humberto Rivera Pérez

HONORABLE TRIBUNAL EXAMINADOR

En cumplimiento con los preceptos que establece la ley de la Universidad de San Carlos de Guatemala, presento a su consideración mi trabajo de graduación titulado:

BENEFICIOS DE LA IMPLEMENTACIÓN DE TECNOLOGÍA qPCR PARA LA DETECCIÓN DE *SALMONELLA SPP* EN MUESTRAS DE SUPERFICIES EN CONTACTO DIRECTO CON LOS ALIMENTOS

Tema que me fuera asignado por la Dirección de la Escuela de Estudios de Postgrado, con fecha 12 de enero de 2022.

Ing. Allan Francis Hernández Guerra

LNG.DECANATO.OI.491.2023

La Decana de la Facultad de Ingeniería de la Universidad de San Carlos de Guatemala, luego de conocer la aprobación por parte del Director de la Escuela de Estudios de Posgrado, al Trabajo de Graduación titulado: **BENEFICIOS DE LA IMPLEMENTACIÓN DE TECNOLOGÍA qPCR PARA LA DETECCIÓN DE SALMONELLA SPP EN MUESTRAS DE SUPERFICIES EN CONTACTO DIRECTO CON LOS ALIMENTOS**, presentado por: **Ing. Allan Francis Hernández Guerra**, que pertenece al programa de Maestría en artes en Ciencia y tecnología de alimentos después de haber culminado las revisiones previas bajo la responsabilidad de las instancias correspondientes, autoriza la impresión del mismo.

IMPRÍMASE:

Inga. Aurelia Anabela Cordova Estrada
Decana

Guatemala, mayo de 2023

AACE/gaoc



Guatemala, mayo de 2023

LNG.EEP.OI.491.2023

En mi calidad de Director de la Escuela de Estudios de Postgrado de la Facultad de Ingeniería de la Universidad de San Carlos de Guatemala, luego de conocer el dictamen del asesor, verificar la aprobación del Coordinador de Maestría y la aprobación del Área de Lingüística al trabajo de graduación titulado:

“BENEFICIOS DE LA IMPLEMENTACIÓN DE TECNOLOGÍA qPCR PARA LA DETECCIÓN DE SALMONELLA SPP EN MUESTRAS DE SUPERFICIES EN CONTACTO DIRECTO CON LOS ALIMENTOS”

presentado por **Ing. Allan Francis Hernández Guerra** correspondiente al programa de **Maestría en artes en Ciencia y tecnología de alimentos** ; apruebo y autorizo el mismo.

Atentamente,

“Id y Enseñad a Todos”



Mtro. Ing. Edgar Darío Álvarez Cotí
Director

Escuela de Estudios de Postgrado
Facultad de Ingeniería



Guatemala, 27 de septiembre de 2022

M.A. Ing. Edgar Dario Alvarez Coti
Director
Escuela de Estudios de Postgrado
Presente

Estimado M.A. Ing. Alvarez Coti

Por este medio informo a usted, que he revisado y aprobado el **INFORME FINAL y ARTÍCULO CIENTÍFICO** titulado: **BENEFICIOS DE LA IMPLEMENTACIÓN DE TECNOLOGÍA QPCR PARA LA DETECCIÓN DE SALMONELLA SPP EN MUESTRAS DE SUPERFICIES EN CONTACTO DIRECTO CON LOS ALIMENTOS** del estudiante **Allan Francis Hernandez Guerra** quien se identifica con número de carné **199911067** del programa de Ciencia Y Tecnologia De Los Alimentos.

Con base en la evaluación realizada hago constar que he evaluado la calidad, validez, pertinencia y coherencia de los resultados obtenidos en el trabajo presentado y según lo establecido en el **Normativo de Tesis y Trabajos de Graduación aprobado por Junta Directiva de la Facultad de Ingeniería Punto Sexto inciso 6.10 del Acta 04-2014 de sesión celebrada el 04 de febrero de 2014**. Por lo cual el trabajo evaluado cuenta con mi aprobación.

Agradeciendo su atención y deseándole éxitos en sus actividades profesionales me suscribo.



Msc. Inga. Hilda Piedad Palma Ramos
Coordinador
Ciencia Y Tecnologia De Los Alimentos
Escuela de Estudios de Postgrado

Guatemala, 27 de septiembre de 2022

M.A. Ing. Edgar Dario Alvarez Coti
Director
Escuela de Estudios de Postgrados
Presente

Estimado M.A. Ing. Alvarez Coti

Por este medio informo a usted, que he revisado y aprobado el Trabajo de Graduación y el Artículo Científico: **"BENEFICIOS DE LA IMPLEMENTACIÓN DE TECNOLOGÍA QPCR PARA LA DETECCIÓN DE SALMONELLA SPP EN MUESTRAS DE SUPERFICIES EN CONTACTO DIRECTO CON LOS ALIMENTOS"** del estudiante **Allan Francis Hernandez Guerra** del programa de **Ciencia Y Tecnologia De Los Alimentos** identificado(a) con número de carné 199911067.

Agradeciendo su atención y deseándole éxitos en sus actividades profesionales me suscribo.


*Licda. Vera Lucia Paredes
Química Bióloga
Colegiada No. 3999*

Msa. Vera Lucia Paredes Barrios
Colegiado No. 3999
Asesora de Tesis

ACTO QUE DEDICO A:

Dios	Por permitirme realizar una más de mis metas.
Mis padres	José Francisco Hernández Beza y Susana del Carmen Guerra de Hernández, mi eterno agradecimiento por su apoyo para hacer realidad este sueño.
Mi esposa e hijos	Cinthya Blest, Stefany Sofia y José Andrés Hernández, por ser mi inspiración día con día.
Mis hermanos	Ana Patricia y Jonathan Hernández Guerra, por sus sabias enseñanzas y consejos.

AGRADECIMIENTOS A:

Universidad de San Carlos de Guatemala	Por ser la <i>alma mater</i> que me permitió nutrirme de conocimientos.
Facultad de Ingeniería	Por proporcionarme los conocimientos que me han permitido realizar este trabajo de graduación.
Mis amigos	Ronald Rodriguez, Ronald Avalos, Alex de León, Renato Cuevas, Gerardo Molina, por la buena influencia para seguir creciendo.
Mi asesora	MSc. Vera Lucia Paredes, por guiarme durante el trabajo de graduación.
Mi revisor	José Rosal Ph.D., por su guía indispensable en la realización de este trabajo de graduación sin la cual no se hubiera podido realizar.

ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE DE ILUSTRACIONES	V
LISTA DE SÍMBOLOS	VII
GLOSARIO	IX
RESUMEN	XI
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	XIII
OBJETIVOS	XV
RESUMEN DEL MARCO METODOLÓGICO	XVII
INTRODUCCIÓN	XIX
1. MARCO TEÓRICO	1
1.1. Antecedentes	1
1.2. Generalidades de <i>Salmonella</i>	3
1.2.1. Características	3
1.2.2. Clasificación	4
1.2.3. Patogenicidad	5
1.2.4. Prevención y control	6
1.3. Métodos de detección de <i>Salmonella spp</i>	8
1.3.1. Características	8
1.3.2. Determinación de <i>Salmonella spp</i> según el método FDA/CFSAN, BAM capítulo 5	9
1.4. Métodos de detección de <i>Salmonella spp</i>	10
1.4.1. Ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA)	11
1.4.2. Ensayo de flujo lateral	12
1.5. Métodos basados en ácidos nucleicos	13

1.5.1.	Reacción en cadena de la polimerasa	13
1.5.2.	Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (qPCR)	14
1.6.	Monitoreo de <i>Salmonella</i> en superficies	15
1.6.1.	Programa de monitoreo ambiental en plantas de alimentos de baja humedad.....	16
1.6.2.	Zonificación y muestreo.....	17
1.6.3.	Acciones correctivas basadas en los resultados de análisis	20
2.	DESARROLLO DE LA INVESTIGACIÓN	23
2.1.	Muestreo y análisis microbiológico	23
2.1.1.	Muestreo	23
2.1.2.	Análisis microbiológico de <i>Salmonella</i> por método BAM, capítulo 5	25
2.1.3.	Análisis microbiológico método RapidChek® SELECT™ <i>Salmonella</i>	25
2.1.4.	Análisis microbiológico método MEMP-qPCR para detección de <i>Salmonella</i>	26
2.2.	Comparativo de métodos de ensayo	28
2.2.1.	Determinación del tiempo total por metodología	29
2.2.2.	Comparación de resultados	30
2.2.3.	Determinación de costos de implementación para cada metodología	31
3.	PRESENTACIÓN DE RESULTADOS.....	35
3.1.	Tiempo en obtención de resultados de <i>Salmonella</i> por metodología	35

3.2.	Análisis comparativo de resultados obtenidos por metodología.....	35
3.3.	Costo de implementación por metodología de análisis	37
4.	DISCUSION DE RESULTADOS	39
	CONCLUSIONES	41
	RECOMENDACIONES.....	43
	REFERENCIAS	45
	APÉNDICES.....	51
	ANEXOS	53

ÍNDICE DE ILUSTRACIONES

FIGURAS

1.	Zonificación para monitoreo ambiental	19
2.	Toma de muestras de superficie	24
3.	Ilustración de resultado positivo / negativo <i>RapidCheck SELECT™</i>	26
4.	Procedimiento de los ensayos MEMP	27
5.	Resultados MEMP-qPCR con el software MyGo Pro	28
6.	Procedimiento y toma de tiempo por metodología	29

TABLAS

I.	<i>Salmonella</i> especies, subespecies, serotipos y su hábitat	4
II.	Frecuencia y número de muestras por zona	20
III.	Hora inicial y hora final para obtención de resultados de <i>Salmonella</i> ...	30
IV.	Resultados análisis de <i>Salmonella</i>	30
V.	Costos de equipos necesarios por metodología	31
VI.	Costos de materiales y reactivos por metodología	32
VII.	Tiempo total para obtención de resultados de <i>Salmonella</i>	35
VIII.	Comparativo de resultados entre el método MEMP-qPCR y el método BAM	36
IX.	Comparativo de resultados entre el método RapidChek® SELECT™ y el método BAM	36
X.	Costo de equipos y costo de materiales	37

LISTA DE SÍMBOLOS

Símbolo	Significado
Cq	Ciclo de cuantificación
°	Grados
°C	Grados Celsius
g	Gramos
H	Horas
kg	Kilogramo
±	Más/menos
mL	Mililitro
%	Porcentaje
Q	Quetzales

GLOSARIO

Agente patógeno	Microorganismo que al estar presente en un alimento puede enfermar al consumidor.
BAM	Manual analítico de la FDA que incluye los procedimientos de laboratorio preferidos por la agencia para los análisis microbiológicos de alimentos y cosméticos.
Brote	Clasificación utilizada para referirse a la aparición repentina de una enfermedad debida a una infección en un lugar específico.
CFSAN	Centro para la seguridad alimentaria y la nutrición que ofrece diversos recursos e información a consumidores, profesionales de la salud, educadores y la industria sobre los procesos de seguridad de alimentos y bebidas.
ELISA	Técnica de inmunoensayo en la cual se detecta un antígeno mediante un anticuerpo enlazado a una enzima capaz de generar un cambio de color.
FDA	Agencia de gobierno de los Estados Unidos responsable de la regulación de alimentos, y medicamentos.

IAC	Control interno de amplificación para ensayos moleculares que ayuda a confirmar que la reacción de amplificación se llevó a cabo de forma adecuada.
Inocuo	Es todo aquello que no causa daño al consumidor.
pH	Medición de los iones hidronio de una muestra, que se relaciona a la acidez o basicidad de un alimento.
<i>Salmonella</i>	Es una bacteria patógena que se encuentra comúnmente en aves crudas, huevos, carne vacuna, frutas y vegetales.
Zonificación	Terminología utilizada en la industria de alimentos en donde se identifican y clasifican las áreas y superficies en base a la cercanía con los alimentos procesados.

RESUMEN

En la presente investigación se calculó el tiempo en que se obtienen resultados de análisis de *Salmonella* en muestras de superficies en contacto directo con los alimentos (zona 1) utilizando la tecnología qPCR. Se compararon los resultados de análisis obtenidos con el método MEMP-qPCR, el método tradicional BAM y el método rápido RapidChek® SELECT™. Se determinó el costo de implementación, el costo de materiales y el costo de análisis de *Salmonella* por muestra para cada una de las metodologías evaluadas.

El estudio se realizó en una planta que fabrica premezcla de harinas y como primer paso se definieron los puntos para la toma de muestra. Para ello, se identificaron los equipos y utensilios que tienen contacto directo con el producto. Posteriormente, se procedió con la toma de muestras de superficies utilizando la técnica de hisopado y estas fueron analizadas siguiendo cada una de las metodologías.

La metodología MEMP-qPCR resultó ser la más rápida para la detección de *Salmonella* y los resultados concuerdan con los obtenidos con el método de referencia. La concordancia de resultados para el método rápido RapidCheck® SELECT™ y el método de referencia no fue aceptable.

Se determinó que el costo de implementación de la tecnología qPCR es mayor comparado con las otras dos metodologías, sin embargo, esta diferencia puede ser compensada por el ahorro que las empresas alimenticias pueden obtener al reducir costos de almacenaje por retención de producto a la espera de

resultados microbiológicos por lo que se concluye que la industria de alimentos se vería beneficiada con su implementación.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Las plantas de producción de alimentos listos para consumir realizan muestreos en superficies de contacto directo (a lo que se le conoce como zona 1), para análisis de detección de *Salmonella spp.* Se requiere de una cantidad de tiempo específico para la obtención de los resultados de análisis de dichos muestreos, y el tiempo depende del método de análisis implementado.

Los métodos de ensayo tradicionales para la detección de *Salmonella* requieren de múltiples medios de cultivo, tiempos mínimos de incubación a temperaturas controladas y requieren más de 72 horas para brindar resultados.

Se pueden obtener resultados de *Salmonella* en 24 horas utilizando métodos de ensayo rápidos sin embargo aún es necesario el uso de medios de cultivo y tiempos de incubación a temperaturas controladas.

Las plantas de alimentos que no cuentan con ensayos que les permita obtener resultados de análisis de *Salmonella* en el menor tiempo posible tienen la probabilidad de producir grandes cantidades de alimentos potencialmente contaminados con dicho patógeno.

Si se realizan análisis de *Salmonella* en superficies de zona 1 se recomienda que los alimentos fabricados sean retenidos hasta obtener los resultados y que los mismos sean satisfactorios. Por lo que tiempos prolongados en la obtención de resultados de análisis puede repercutir en costos adicionales por almacenamiento de producto para la industria de alimentos.

Las plantas de alimentos que comercializan sus productos sin esperar los resultados de análisis de superficies de zona 1 pueden ser sometidas a retiros de producto en evidencia de resultados positivos para *Salmonella*.

Esto lleva a plantear la pregunta principal de este estudio ¿Podrá la tecnología qPCR reducir el tiempo de detección de *Salmonella* spp en superficies de zona 1, con resultados confiables? Para responder a esta interrogante se deberán contestar las siguientes preguntas auxiliares:

- ¿En cuánto tiempo se obtienen los resultados de análisis de *Salmonella* con la tecnología qPCR en superficies de zona 1?
- ¿Los resultados obtenidos con tecnología qPCR coincidirán con el método tradicional BAM y un método rápido?
- ¿Cuál es el costo de implementación de la tecnología qPCR, el método tradicional BAM y un método rápido para la detección de *Salmonella*?

OBJETIVOS

General

Evaluar la tecnología qPCR en la reducción del tiempo de detección de *Salmonella* spp en superficies de zona 1 (contacto directo).

Específicos

1. Calcular el tiempo en que se obtienen los resultados de análisis de *Salmonella* con la tecnología qPCR en superficies de zona 1.
2. Comparar los resultados obtenidos con tecnología qPCR con el método tradicional BAM y un método rápido.
3. Determinar el costo de implementación de la tecnología qPCR, el método tradicional BAM y un método rápido para la detección de *Salmonella*.

RESUMEN DEL MARCO METODOLÓGICO

El presente estudio es de tipo cuantitativo con un alcance descriptivo, se especifican las características del método propuesto para detección de *Salmonella* y mediante el análisis de datos se compararon con dos métodos de detección utilizados en la industria de alimentos.

Se realizó un diseño de tipo experimental, ya que se hizo una toma de datos a pequeña escala en muestras de superficies en contacto directo durante la producción de un alimento de baja humedad.

La toma de muestra de hisopados de superficies en contacto directo con los alimentos se realizó durante la fabricación de una harina para panqueques. Se tomaron 9 muestras de superficies ubicadas en las áreas de mezclado, llenado y pesado de producto terminado.

Para el análisis microbiológico se utilizaron las metodologías siguientes: Método para detección de *Salmonella* según FDA, capítulo 5 del Bacteriological Analytical Manual, Método rápido RapidChek® SELECT™ *Salmonella* Test System y Método MEMP-qPCR para detección de *Salmonella*. Para cada corrida de análisis, se incluyó 1 muestra de hisopo estéril como blanco y 2 muestras con cepas de *Salmonella* como controles positivos.

Se tabularon los resultados obtenidos por muestra y se determinó el tiempo total requerido para cada una de las metodologías. Finalmente, se determinó el costo de implementación por metodología, el costo de materiales requeridos y el costo de detección de *Salmonella* por muestra.

INTRODUCCIÓN

La implementación de sistemas de inocuidad, así como controles preventivos son indispensables para garantizar la producción segura de alimentos. Programas preventivos como el programa de monitoreo ambiental de patógenos permite detectar nichos de contaminación biológica que pueden poner en peligro la inocuidad de los alimentos elaborados. Para garantizar que no se están comercializando alimentos contaminados con patógenos es importante considerar la retención de producto terminado hasta obtener el resultado de análisis de superficies en contacto directo con los alimentos.

Debido a la necesidad de optimización de procesos muchas veces las plantas de alimentos no someten a retención el producto terminado a la espera de resultados de análisis microbiológico, debido a que esto puede repercutir en un incremento en el costo de almacenamiento, reducción de la vida útil de anaquel, pérdida de oportunidad de venta en mercado, entre otros.

La presente investigación demuestra que el método MEMP-qPCR reduce el tiempo en obtención de resultados de análisis de *Salmonella* en superficies de contacto directo con los alimentos con un nivel de efectividad comparable a un método de referencia, logrando así beneficiar a las industrias de alimentos que buscan liberar sus productos de forma rápida.

Por medio de hisopado de superficies se analizó la presencia de *Salmonella* en superficies de zona 1 utilizando las metodologías MEMP-qPCR, BAM. Capítulo 5 y RapidCheck® SELECT™. Se determinó el tiempo en que se obtienen resultados con cada metodología, los resultados obtenidos fueron

comparados con el método de referencia y se calculó el costo de implementación de cada una de las metodologías.

En el capítulo 1 se presenta el marco teórico de la investigación que incluye los antecedentes de esta. En el capítulo 2, se detalla el procedimiento de muestreo, el proceso de análisis de *Salmonella*, el tiempo que se obtuvieron los resultados, el análisis comparativo de estos, así como el costo de implementación para cada metodología evaluada.

En el capítulo 3, se presenta los resultados obtenidos en la investigación y su discusión se presenta en el capítulo 4. Al final, se presentan las conclusiones y recomendaciones de esta investigación.

1. MARCO TEÓRICO

1.1. Antecedentes

En Guatemala, se encontraron estudios sobre la tecnología qPCR, en la detección de contaminación de diferentes microorganismos, incluyendo *Salmonella* spp. A continuación, las publicaciones más sobresalientes.

En la publicación *Desarrollo de un PCR multiplex para identificar las principales Escherichia coli causantes de diarrea infantil en Guatemala*, Torres (2011), propone el uso de la tecnología PCR para la detección de *Escherichia Coli*. El método desarrollado utiliza un enfoque multiplex para la detección y diferenciación simultánea de 4 variantes de *E. coli*. Sus resultados demostraron el desarrollo exitoso de un ensayo PCR multiplex que permite la identificación y diferenciación simultánea de diferentes genes de *E. coli* en muestras de heces diarreicas.

Álvarez (2013) en su trabajo de graduación *Validación de dos métodos para la detección de Salmonella spp. en embutidos artesanales, distribuidos en mercados municipales del Departamento de Guatemala* indica que, en el año 2000, se encontraba entre las principales causantes de enfermedades transmitidas por alimentos. Sus resultados muestran que los 2 métodos referidos reflejaron una sensibilidad del 100 % y especificidad del 98.59 % al compararlos con el método referido por el BAM para la determinación de *Salmonella* spp.

En otros países se encontraron aplicaciones de la tecnología PCR para la detección de *Salmonella* spp en alimentos. A continuación, se presentan las más destacadas.

Gómez, Silva, Salvá y Elías (2019), utilizaron el método qPCR para evaluar la contaminación en carne de llama. Sus resultados demuestran que, de 32 muestras de carne de llama, el 53.13 % fueron positivas para *Salmonella* spp. Así mismo, la metodología qPCR fue utilizada para confirmar la presencia o ausencia de células de *Salmonella* en las muestras evaluadas.

La publicación *Técnicas moleculares para la detección e identificación de patógenos en alimentos: Ventajas y Limitaciones*, por Palomino y González (2014), evalúa las ventajas del uso de técnicas de diagnóstico molecular incluyendo la PCR. Su publicación concluye que las técnicas de diagnóstico molecular representan una alternativa prometedora en el campo de los alimentos, debido a su rapidez, elevada sensibilidad y eficiencia para la detección temprana de microorganismos patógenos.

Ventura, Parra, Toledo y Girón (2017), evaluaron la presencia de *Salmonella* spp por qPCR en carne de res procedente de rastros tipo inspección federal y no procedente de dichos rastros. Los resultados muestran que fue posible la detección de *Salmonella* por medio del uso de PCR tiempo real, en donde el 100 % de las muestras colectadas en locales populares de abastecimiento de carne dieron positivo para dicho patógeno.

En la publicación Comparison of Real-Time PCR, Reverse Transcriptase Real-Time PCR, Loop-Mediated Isothermal Amplification, and the FDA Conventional Microbiological Method for the Detection of *Salmonella* spp. in Produce, Zhang, Brown y González (2011), compararon la tecnología qPCR

contra el método convencional de microbiología de la FDA para la detección de *Salmonella* spp en vegetales. Los resultados reflejaron que la eficiencia del método qPCR fue equivalente al método convencional al obtener resultados negativos en todas las muestras control evaluadas (no inoculadas) y detectar la presencia de *Salmonella* en muestras de vegetales con diferentes niveles de inoculación (10^5 y $< 10^1$ UFC/25 g).

1.2. Generalidades de *Salmonella*

El objetivo de este capítulo es introducir al lector en aspectos generales del patógeno *Salmonella* y algunos métodos de detección.

1.2.1. Características

El género *Salmonella* se encuentra integrado por bacilos Gram negativos, no esporulados pertenecientes a la familia *Enterobacteriaceae*. Son de igual forma anaerobios facultativos con flagelos peritricos que le dan movilidad. Los parámetros de entorno para su crecimiento ideal son: Temperatura de 35 °C - 37 °C, pH 6.5 - 7.5 y actividad de agua de 0.94 - 0.99. Su crecimiento es inhibido a temperaturas menores a los 7 °C, pH menor a 3.8 y actividad de agua menor a 0.94. (González, Pereira, Soto, Hernández y Villarreal, 2014)

Para Hammack (2012), la *Salmonella* se encuentra ampliamente dispersa en la naturaleza. Puede colonizar el tracto intestinal de los vertebrados, incluidos el ganado, la vida silvestre, las mascotas domésticas y los humanos, y también puede vivir en entornos como los sedimentos de agua de estanques. Se transmite por vía fecal-oral y por contacto con agua contaminada. Puede, por ejemplo, contaminar la carne, el agua de riego de la granja (contaminando así los

productos en el campo), el suelo e insectos, equipo de fábrica, manos y superficies y utensilios de cocina.

En años anteriores, la *Salmonella* era asociada únicamente a productos de origen animal, sin embargo, en años recientes se han reportado brotes en productos vegetales frescos. En los últimos años también se han tenido brotes asociados con *Salmonella* en productos de baja humedad como las harinas y especias. Los ejemplos más comunes de alimentos asociados con la Salmonelosis incluyen carnes, aves, huevos, leche y productos lácteos, pescado, camarones, especias, chocolate, mantequilla de maní, cacao, frutas y verduras

1.2.2. Clasificación

“El género *Salmonella* se clasifica en dos grupos o especies: *Salmonella Bongori* y *Salmonella Entérica*, esta última compuesta por 6 subespecies” (Grimont y Weill, 2007, p. 6). Las cuales se describen en la tabla I.

Tabla I. ***Salmonella* especies, subespecies, serotipos y su hábitat**

Especie y subespecie de <i>Salmonella</i> (S.)	Número de serotipos dentro de la especie	Hábitat
S. entérica subsp. Entérica (I)	1,531	Animales de sangre caliente
S. entérica subsp. salamae (II)	505	Animales de sangre fría y caliente
S. entérica subsp. arizonae (IIIa)	99	Animales de sangre fría y caliente
S. entérica subsp. diarizonae (IIIb)	336	Animales de sangre fría y caliente

Continuación tabla I.

S. entérica subsp. diarizonae (IIIb)	73	Animales de sangre fría y caliente
S. entérica subsp. indica (VI)	13	Animales de sangre fría y caliente
S. entérica subsp. indica (VI)	22	Animales de sangre fría y caliente
Total	2,579	

Fuente: Grimont y Weill (2007). *Antigenic Formulae of the Salmonella Serovars*.

1.2.3. Patogenicidad

Según Sakugawa, *et al.*, (2008), la *Salmonella spp.*, es conocido como uno de los causantes más comunes de brotes de intoxicaciones alimentarias que afecta a varios países incluyendo a los desarrollados como los que se encuentran en vías de desarrollo. Se ha visto que estos brotes pueden causar sobrepoblación en la red hospitalaria debido a la irregularidad de su sintomatología que lleva muchas veces a un mal diagnóstico. Gran parte de serotipos de este género causan enfermedades en el ser humano, con diferencias en la sintomatología como resultado de la variación en el mecanismo de patogenicidad, además de la edad y la respuesta inmune del paciente.

De acuerdo con el serotipo implicado, la *Salmonella* puede causar dos tipos de enfermedades, la fiebre tifoidea, causada por los serotipos *Salmonella Typhi* y *Salmonella Paratyphi* y la Salmonelosis no tifoidea, causada por serotipos distintos a *Salmonella Typhi* y *Salmonella Paratyphi*. De las dos, la más seria es la fiebre tifoidea ya que presenta un nivel más alto de mortalidad que la salmonelosis no tifoidea. (Hammack, 2012)

Los brotes de enfermedades causadas por *Salmonella* se encuentran asociados a contaminación cruzada de alimentos crudos con cocidos, temperatura de cocción no adecuada, así como temperaturas de almacenamiento inadecuadas. (Carrasco, Morales y García, 2012)

No se ha determinado la dosis infecciosa específica ya que la misma depende de la especie de *Salmonella*, el serovar y del alimento en la que se encuentra presente. La dosis infecciosa puede variar entre 10^3 y 10^6 UFC/g de alimento para algunas especies, y entre 10^9 y 10^{11} UFC/g para otras, en las que al estar presente desencadena la sintomatología general (diarreas, escalofríos, dolores abdominales, náuseas y vómitos). “Sin embargo, otros autores relatan haber constatado, a través de estudios epidemiológicos, que *Salmonella typhimurium* fagotipo 10 puede presentar dosis infectivas de solamente una célula” (Álvarez, 2013, p. 8).

1.2.4. Prevención y control

Codex Alimentarius (2018) indica que:

La implementación de un programa de vigilancia ambiental es una herramienta importante para la prevención y control de *Salmonella* en las plantas procesadoras de alimentos, en especial las plantas que procesan alimentos con baja humedad. El programa debe incluir el muestreo y análisis de superficies en contacto y no contacto con los alimentos. Estas actividades son críticas para comprobar que las medidas de control de la instalación son efectivas. (p. 11)

La implementación de sistemas que controlen y garanticen la inocuidad de los alimentos desde la selección de materias primas, proveedores, áreas

de elaboración adecuadas, manejo adecuado de producto terminado, todos enfocados en la prevención de contaminación por microorganismos en especial los patógenos, los cuales no solo pueden alterar las propiedades sensoriales de los alimentos, sino que pueden causar enfermedades a los consumidores. Al mismo tiempo, es importante considerar las pérdidas económicas que representa la industria de alimentos por la eliminación de un producto contaminado. (Robledo, 2015, p. 22)

Según Carrasco *et. al.*, (2012), la principal causa de contaminación de *Salmonella* en los alimentos de baja humedad es la contaminación cruzada o recontaminación originada por malas prácticas de saneamiento y de personal, instalaciones deficientes, diseño no adecuado de los equipos y el mantenimiento deficiente de los equipos e instalaciones.

En la industria de alimentos de baja humedad, el control de *Salmonella* es uno de los mayores retos. Se han publicado documentos que sugieren elementos de control para la prevención de contaminación por *Salmonella*, como lo son:

- Prevenir el ingreso a las instalaciones de proceso
- Incrementar las buenas prácticas de personal
- Diseño de equipos con la aplicación de principios higiénicos
- Prevención y reducción de nichos que propicia el crecimiento de patógenos en la instalación
- Desarrollo e implementación de programas para el control de materias primas / ingredientes
- Validación de todas las medidas de control y prevención de *Salmonella*
- Implementación de procedimientos de verificación de los controles y documentación de acciones correctivas.

1.3. Métodos de detección de *Salmonella* spp

En los siguientes apartados se mencionan los métodos de referencia más utilizados en la industria de alimentos para detección de *Salmonella*.

1.3.1. Características

Los métodos para la detección de *Salmonella* no se enfocan en la cuantificación de la bacteria sino a su detección cualitativa, determinando si está presente o ausente en las muestras analizadas. La detección se realiza utilizando medios de cultivo selectivos. (González *et. al.*, 2014, p. 75)

Si bien existen varios métodos relativamente sencillos para la recuperación de células bacterianas no lesionadas, no se puede decir lo mismo de las células con lesiones subletales que sobreviven a un tratamiento de procesamiento. Se necesitan métodos más sensibles para la recuperación de las células de *Salmonella* dañadas, especialmente de alimentos secos o con poca humedad. Factores, incluida la eliminación de oxígeno, la rehidratación gradual, el enriquecimiento del caldo, los medios de cultivo en placa, el tiempo y la temperatura de incubación y la adición de solutos (es decir, glicerol, glucosa) pueden contribuir a una mejor recuperación de las células dañadas por calor o desecación. (Podolak, Enache, Stone, Black y Elliott, 2010, p. 192)

1.3.2. Determinación de *Salmonella* spp según el método FDA/CFSAN, BAM capítulo 5

La administración de Alimentos y Drogas de los Estados Unidos de América (FDA por sus siglas en inglés), es la entidad responsable de proteger la salud pública asegurando que los alimentos sean seguros, saludables, sanitarios y estén debidamente etiquetados. Se exceptúan los productos cárnicos, aves de corral y algunos productos de huevo, los cuales son regulados por el Departamento de Agricultura de los Estados Unidos de América. (U.S. Food and Drug Administration, 2018, párr. 1)

El método menciona el mantenimiento del hisopo con que se tomó la muestra de superficie utilizando un medio neutralizante, suficiente para cubrir todo el hisopo. El transporte hacia el laboratorio se debe realizar utilizando medios que garanticen mantener fría la muestra. Si las muestras no son procesadas de manera inmediata se pueden mantener en refrigeración en un rango de temperatura de 4 ± 2 °C y el análisis se debe realizar en menos de 48 horas posterior a la toma de la muestra. El procedimiento incluye las etapas de enriquecimiento no selectivo o preenriquecimiento, enriquecimiento selectivo e identificación utilizando placas con agar selectivo. (U.S. Food and Drug Administration, 2018)

El preenriquecimiento tiene como objetivo recuperar células dañadas por diferentes condiciones de manejo y/o almacenamiento del alimento o superficie previo al análisis. Altas temperaturas, presencia de desinfectantes, elevada presión osmótica y presencia de preservantes son algunos factores que pueden dañar las células de *Salmonella* (González *et. al.*, 2014).

La función de la etapa de enriquecimiento selectivo es de proveer los nutrientes necesarios para el crecimiento selectivo de *Salmonella* inhibiendo al mismo tiempo el crecimiento de otros microorganismos que compiten bajo el mismo medio. El efecto de inhibición se puede propiciar al incubar las muestras en el rango de temperatura más adecuado. Para muestras con baja carga microbiana se recomienda una temperatura de incubación de 35 °C mientras que para muestras con alta carga microbiana se recomienda incubar a una temperatura de 43 °C.

Según González *et. al.* (2014), los medios de cultivo selectivos contienen componentes que brindan condiciones especiales para incrementar la tasa de crecimiento de *Salmonella*, como, por ejemplo, el tetracionato contenido en el caldo bilis tetracionato verde brillante inhibe el crecimiento de bacterias intestinales como los coliformes y el verde brillante inhiben el desarrollo de bacterias grampositivas.

El aislamiento e identificación en placas con agar selectivo de igual forma inhiben el crecimiento de otros microorganismos y contienen indicadores que colorean las bacterias por medio de reacciones bioquímicas y por consiguiente se pueden diferenciar las unidades formadoras de colonia (UFC) que crezcan en la placa.

1.4. Métodos de detección de *Salmonella spp*

Los métodos serológicos brindan una solución rápida en la detección de *Salmonella* en alimentos y superficies, en los siguientes apartados se detallan las características y sus ventajas.

1.4.1. Ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA)

El ensayo ELISA utiliza como sus siglas lo indican una enzima como marcador para mediar la formación de complejos antígeno-anticuerpo. Casi todas las pruebas ELISA son ensayos en fase sólida en los cuales se absorbe un antígeno o un anticuerpo sobre un soporte sólido. Algunos de los protocolos se basan en reacciones de enlace competitivo y otras en reacciones de enlace no competitivo, pero en todas las pruebas ELISA se requiere de un paso de separación para eliminar el conjugado enzimático libre antes de proceder a determinar la cantidad de conjugado enzimático enlazado. Para lo cual se añade sustrato enzimático y se mide la reacción catalítica entre la enzima y el sustrato. (Guzmán, 2004, p. 48)

Para Guzmán (2004):

Por sus características catalíticas las enzimas son marcadores muy sensibles y versátiles. Una sola proteína enzimática puede transformar en algunos minutos gran número de moléculas de sustrato en una cantidad igualmente abundante de producto final, produciendo un cambio de color amplificado y que se detecta con facilidad.

La prueba ELISA se basa en varias teorías: primero el antígeno y anticuerpo pueden enlazarse a una superficie portadora insoluble y retener su reactividad inmunológica; segundo, las enzimas tienen actividad específica alta y convierten una cantidad relativamente grande de sustrato en producto detectable, lo que permite detectar concentraciones muy bajas del ligando; tercero, la actividad enzimática o reactividad inmunológica de los conjugados se preserva y permanece estable durante

el análisis y el almacenamiento; y cuarta, las enzimas no están presentes en el líquido biológico que se va a analizar. (p. 48)

1.4.2. Ensayo de flujo lateral

El principio detrás de los ensayos de flujo lateral (LFA) es simple, una muestra líquida (o su extracto) que contiene el analito de interés se mueve sin la ayuda de fuerzas externas (acción capilar) a través de varias zonas de tiras poliméricas, sobre las cuales se unen moléculas que pueden interactuar con el analito. Una tira de prueba de flujo lateral típica consiste en membranas superpuestas que están montadas en una tarjeta de respaldo para una mejor estabilidad y manejo.

La muestra se aplica en un extremo de la tira, sobre la almohadilla de muestra absorbente, que está impregnada con sales y tensioactivos que hacen que la muestra sea adecuada para interactuar con el sistema de detección. La almohadilla de muestra asegura que el analizador presente en la muestra será capaz de unirse a los reactivos de captura de conjugados y en la membrana. La muestra va migrando a través de la almohadilla de liberación conjugada, que contiene anticuerpos que son específicos del analizador objetivo y se conjugan con partículas coloreadas o fluorescentes, más comúnmente microesferas de oro coloidal.

La muestra, junto con el anticuerpo conjugado unido al analito diana, se mueve a lo largo de la tira hacia la zona de detección. Se trata de una membrana porosa (normalmente compuesta de nitrocelulosa) con componentes biológicos específicos (en su mayoría anticuerpos o

antígenos) inmovilizados en líneas. Su función es reaccionar con el analito unido al anticuerpo conjugado.

El reconocimiento de los análisis de muestra da como resultado una línea de prueba en la zona asignada como prueba, mientras que una línea en la zona asignada como de control indica el flujo de líquido adecuado a través de la tira. La lectura, representada por las líneas que aparecen con diferentes intensidades, se puede desafiar visualmente o con un lector dedicado. Para analizar varios analitos simultáneamente en las mismas condiciones, se pueden inmovilizar líneas de prueba adicionales de anticuerpos específicos para diferentes analitos en un formato de matriz. (p. 112)

1.5. Métodos basados en ácidos nucleicos

Los métodos moleculares basados en ácidos nucleicos han sido aplicados en la industria de alimentos con éxito debido al nivel de sensibilidad comparado con métodos tradicionales de ensayo. En los siguientes apartados se mencionan dos métodos de común aplicación en la industria de alimentos.

1.5.1. Reacción en cadena de la polimerasa

Para Palomino y González (2014):

La PCR o reacción en cadena de la polimerasa, así como como la reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (qPCR) tienen como objetivo la multiplicación de uno o varios segmentos de ADN por la acción de una enzima ADN polimerasa. Una de las técnicas de diagnóstico más utilizada

ya que se pueden desarrollar protocolos sencillos y de fácil uso para los usuarios.

La literatura reciente reporta un número significativo de técnicas moleculares, alternativas, sensibles y selectivas para la detección, enumeración e identificación de microorganismos patógenos en alimentos, siendo la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) la plataforma más popular, mientras que la secuenciación de alto rendimiento se perfila como una técnica de gran aplicabilidad a futuro. (p. 535)

1.5.2. Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (qPCR)

Debido al alto costo del sistema de PCR (Termociclador, cámara de electroforesis, sistema de fotodocumentación, entre otros.) y la contaminación por arrastre asociada con la mala manipulación y uso de los reactivos antes y después de la amplificación, surgió una nueva tecnología de PCR que emplea fluorómetros/fotómetros para la detección de amplicones fluorescentes denominada PCR en tiempo real (qPCR). Este nuevo desarrollo tecnológico eliminó la contaminación por arrastre al desarrollar toda la reacción y cuantificación en el tubo de PCR sin necesidad de abrirse. (González *et. al.*, 2014, p. 84)

Aunque la PCR en tiempo real eliminó la contaminación por arrastre, el principal inconveniente de este método es que detecta la acumulación de productos de PCR tanto específicos como no específicos. Este inconveniente se soluciona empleando sondas marcadas con fluorocromos que detectan específicamente el producto deseado, entre las más conocidas están las sondas TAQMAN y las sondas moleculares Beacon. (Maurer, 2011, p. 262)

1.6. Monitoreo de *Salmonella* en superficies

Cuando existe retención de bacterias en superficies de contacto con los alimentos se incrementa el riesgo de contaminación cruzada de estos microorganismos con los alimentos. En bajas humedades o superficies secas, se ha considerado que el riesgo de contaminación es bajo ya que la supervivencia de bacterias es reducida. Sin embargo, algunas bacterias como la *Salmonella* pueden sobrevivir en superficies bajo condiciones de baja humedad por un tiempo prolongado. (Kusumaningrum, Riboldi, Hazeleger y Hazeleger, 2003)

El modo de supervivencia más común de las bacterias es la formación de *biofilms*, el cual es bien conocido ya que protege a las bacterias de condiciones ambientales adversas como lo son los sanitizantes durante la limpieza. (Reuter, Mallet, Pearson y Van, 2010)

Para estos autores el riesgo de una infección causada por contaminación cruzada es directamente proporcional al nivel de contaminación de la superficie. *Salmonella enteritidis* puede estar presente y viable en superficies de acero inoxidable aun inclusive luego de varias horas o días posterior a su contaminación dependiendo del nivel de inoculación inicial presente en la superficie.

El enfoque principal en el monitoreo, no solo de *Salmonella* sino de cualquier patógeno, en superficies de contacto con los alimentos debe estar basado hacia la prevención proactiva de cualquier posible contaminación que se pudiera dar en los alimentos que se están procesando. Para lograr esto, el diseño, implementación y mantenimiento de un programa de monitoreo ambiental es indispensable.

1.6.1. Programa de monitoreo ambiental en plantas de alimentos de baja humedad

Debido a que se encuentra en muchos ambientes, es muy común detectar presencia de *Salmonella* en productos crudos, sin embargo, estudios han demostrado que esta bacteria es capaz de sobrevivir también en alimentos de baja humedad y piensos por largos intervalos de tiempo. (Podolak *et al.*, 2010)

El objetivo del plan de un plan de monitoreo debe establecerse antes de ser definido este. Cuando asegurar la inocuidad de los alimentos es el principal objetivo del plan de monitoreo será más fácil lograr definir los puntos de muestreo. Posterior a ello, se puede determinar el rigor del plan de muestreo con los criterios de aceptación y rechazo. Cuando se define el plan de muestreo se deben tomar en cuenta la fuente potencial del problema y la población a muestrear. También es importante considerar la herramienta o método adecuado para la recolección de las muestras, así como el método de análisis.

Varios autores reportan que la reducción en la actividad del agua tiene un efecto protector frente a la inactivación de *Salmonella* en diferentes productos alimenticios, como mezcla para pasteles, mantequilla de maní, chocolate, jarabe de chocolate, leche desnatada, sopa de cebolla, harina, chips de calamar deshidratado, leche deshidratada. y cacao en polvo. Si bien la actividad del agua es un factor de control importante del crecimiento y la supervivencia microbianos, otros factores como la composición del medio (es decir, los solutos utilizados para disminuir la actividad del agua) o la distribución microscópica de aire y agua en los alimentos, puede ser tan o más importante como la actividad del agua en sí. (Podolak *et. al.*, 2010, p. 1924)

1.6.2. Zonificación y muestreo

Para Beuchat, *et al.*, (2012)

La verificación de la efectividad de la zonificación en plantas que producen alimentos de baja actividad de agua puede lograrse mediante observaciones obtenidas por análisis ambientales. Para que el programa sea más eficaz, se deben identificar los sitios de muestreo críticos y los patógenos de interés. Esto requiere un conocimiento detallado del producto y el proceso, así como una zonificación detallada en la fábrica, antes de establecer un plan de muestreo significativo.

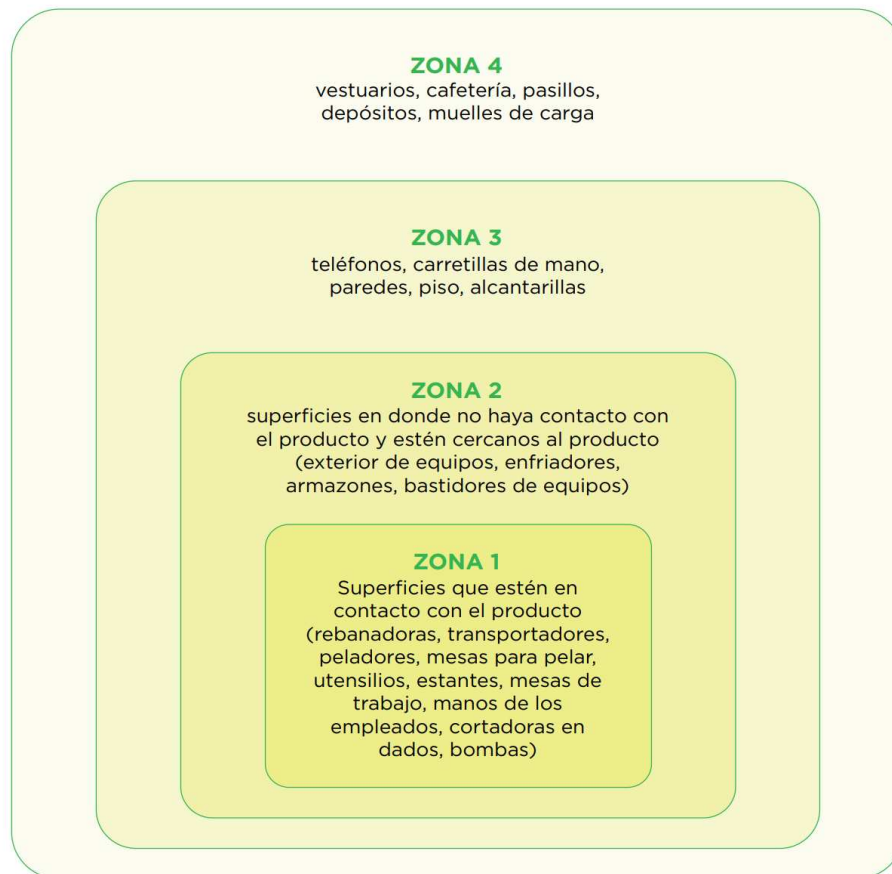
Dependiendo del tipo de producción, el muestreo puede enfocarse en las zonas de higiene básica y media donde es más probable que se detecte al ingresar por primera vez a la instalación, mejorando así la vigilancia proactiva. El muestreo en la zona de alta higiene confirma la relevancia del programa de monitoreo, pero no es el área para enfocar la investigación cuando la presión ambiental se limita a áreas menos críticas. Si un patógeno se encuentra en múltiples ubicaciones, se recomiendan métodos de tipificación molecular para determinar el nivel de parentesco. (p. 166)

Para Masri (2013), el plan de monitoreo ambiental se debe diseñar para optimizar la detección y control de microorganismos patógenos. El plan de monitoreo deberá considerar la inclusión de información con respecto a cantidad de muestras, puntos de muestreo, cantidad de muestras, metodología de análisis entre otras. Es indispensable controlar cualquier condición que puede generar la creación de biopelículas así mismo es importante considerar: Un programa eficiente que pueda detectar cualquier contaminación patógena de manera

oportuna, evaluación a corto plazo de los resultados y revisión de tendencias y resultados a largo plazo como por ejemplo datos con frecuencia trimestral o anual. Una forma de diseñar un programa de muestreo ambiental es dividir la línea de proceso por zonas.

- Zona 1: todas aquellas superficies que tienen contacto directo con los alimentos.
- Zona 2: área de no contacto con los alimentos pero que es la más próxima a los mismos, la cual puede incluir, equipos cercanos, ventiladores, herramientas, entre otras.
- Zona 3: área de no contacto con los alimentos más lejana de la zona 2. Estas pueden ser: pisos, paredes, drenajes, pediluvios, entre otros.
- Zona 4: son áreas y equipos lejanos al área de proceso, como pasillos, zonas de ingreso, baños, entre otros.

Figura 1. **Zonificación para monitoreo ambiental**



Fuente: Almond Board of California [ABC] (2007). *Pathogen Environmental Monitoring*. Consultado el 25 de mayo de 2021. Recuperado de <https://www.almonds.com/almond-industry/processors-and-suppliers/processing-safe-product/pem>.

Posterior a que las zonas de muestreo fueron debidamente identificadas, se debe implementar un programa de muestreo. Inicialmente se sugiere realizar un estudio intensivo con el objetivo de identificar nichos en donde se pueda encontrar el patógeno objetivo. En esta fase inicial, adicional a la cantidad de muestras, el muestreo se debe realizar de manera frecuente para confirmar la ausencia del patógeno. Es importante incluir como criterio la experiencia del

equipo de inocuidad, así como de expertos investigadores incluidos en el desarrollo del programa. Se debe considerar planes de muestreo que incluya no menos de 25 muestras o más por cada zona al inicio de la implementación del programa. Es muy importante considerar la inclusión de otros microorganismos como enterobacterias u otros indicadores adicionales a la *Salmonella*.

Tabla II. **Frecuencia y número de muestras por zona**

Zona	Análisis microbiológico	Frecuencia de muestreo	Cantidad de muestras
I	<i>Salmonella</i>	Semanal	Según la línea
II	<i>Salmonella</i>	Semanal	10 – 15
III	<i>Salmonella</i>	Semanal	10 – 15
IV	<i>Salmonella</i>	Mensual	5 – 10

Fuente: Almond Board of California [ABC] (2007). *Pathogen Environmental Monitoring*. Consultado el 25 de mayo de 2021. Recuperado de <https://www.almonds.com/almond-industry/processors-and-suppliers/processing-safe-product/pem>.

1.6.3. Acciones correctivas basadas en los resultados de análisis

Es muy importante documentar las acciones correctivas que se deben implementar en caso de detectar la presencia de *Salmonella* para cada muestra y zona. Para muestras tomadas en zona 1 es importante considerar la retención del lote producto terminado elaborado en el mismo periodo de tiempo en que fue realizado el muestreo:

- Para la zona 1, las acciones correctivas deben incluir la disposición del producto. No se recomienda realizar pruebas microbiológicas al producto

terminado como criterio para la liberación del producto. El paro de actividades de producción de alimentos y realizar actividades de limpieza de choque es recomendado. La toma de muestras adicionales para análisis microbiológico es importante para verificar que la acción correctiva fue aplicada de forma correcta.

- Para zona 2, se debe incluir como acción correctiva la aplicación de limpiezas de choque y el incremento de muestras para análisis microbiológico. El equipo de inocuidad debe establecer el criterio adecuado para definir la disposición del producto elaborado.

Para zona 3 y 4, el equipo de inocuidad debe establecer acciones correctivas a implementar en el caso de detectar *Salmonella*. Cada hallazgo debe atenderse con la misma prioridad que un hallazgo en las otras zonas con el objetivo de prevenir el ingreso del patógeno en las instalaciones de procesamiento de alimentos.

Los resultados de análisis por zona deben revisarse acorde a la frecuencia que defina el equipo de inocuidad. Se debe incorporar un análisis de frecuencia de hallazgos por punto y por zona como herramienta para detectar nichos que ayuden a la proliferación de *Salmonella*. Así mismo, se debe revisar cada acción correctiva implementada en cada caso de manera individual para confirmar que las mismas siguen siendo efectivas.

“Todas las acciones correctivas, incluidos los resultados de muestras adicionales, deben ser debidamente documentados. Es muy útil tener una hoja de cálculo en computadora para seguir los resultados y documentar acciones correctivas” (ABC, 2007, p. 38).

Cuando se tiene una alta frecuencia de hallazgos con relación a muestras positivas de *Salmonella* en superficies, esto es un indicativo que los programas de saneamiento de la planta no son efectivos y que existe una alta probabilidad que los alimentos sean contaminados con dicho patógeno. Por lo anterior, se deben considerar planes de acciones correctivas inmediatas, incluyendo la disposición del producto producido cuando se dan eventos de resultados positivos en muestras de superficies.

Tomando en consideración que son varios los puntos que son definidos en un plan de monitoreo de superficies, la selección de una herramienta que permite visualizar e identificar tendencias y puntos de recurrencia es un punto importante de considerar, así como la frecuencia en que serán revisados los resultados por el equipo responsable, todo con el fin de poder implementar las acciones preventivas o correctivas en caso estas sean necesarias.

2. DESARROLLO DE LA INVESTIGACIÓN

2.1. Muestreo y análisis microbiológico

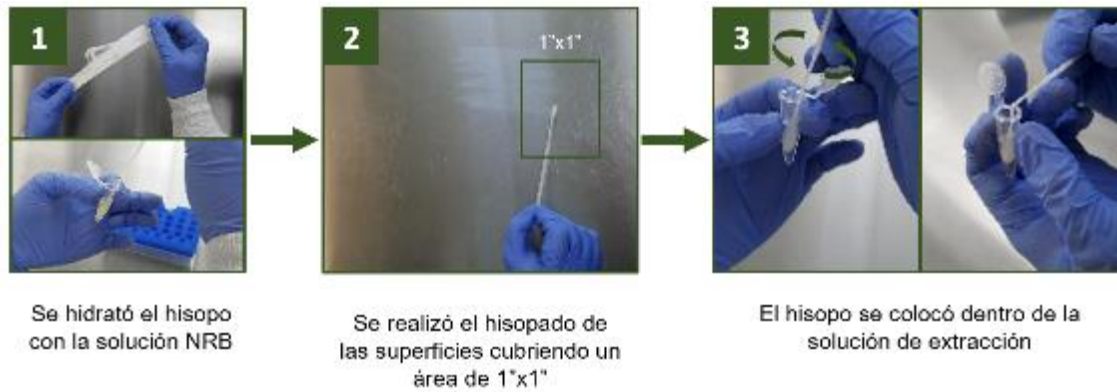
En el siguiente apartado se detalla cómo fue realizada la toma de muestras y el análisis de estas siguiendo cada una de las metodologías evaluadas.

2.1.1. Muestreo

El muestreo se realizó en una planta de premezclas durante el proceso de fabricación de una base de harina para panqueques. Para la toma de muestras se utilizó el kit para hisopado MEMP el cual incluye caldo neutralizante y de recuperación (NRB), el hisopo y la solución de extracción.

Las muestras de superficies se recolectaron por medio de hisopo previamente humedecido con medio NRB cubriendo un área aproximada de 1 x 1 pulgadas. Posteriormente los hisopos se colocaron dentro de los tubos con solución de extracción tal como se muestra en la figura 2.

Figura 2. Toma de muestras de superficie



Fuente: AFD (2019). *Inserto del kit MEMP Salmonella.*

Se realizó el hisopado en 9 superficies de equipos y utensilios en contacto directo con la base para panqueques (zona 1) las cuales se encontraban ubicadas en las áreas de proceso de mezclado, llenado, pesado y empaque. Posteriormente las muestras fueron trasladadas al laboratorio de análisis fisicoquímico y microbiológico (LAFYM). El traslado de las muestras se realizó cuidando la cadena de frío desde el punto donde se realizó el muestreo hasta el laboratorio.

Dentro de las muestras evaluadas, se incluyó 1 muestra con solución de extracción estéril como muestra de control o blanco y 2 muestras inoculadas con colonias de *Salmonella* como controles positivos, las cuales fueron proporcionadas por LAFYM. Las 12 muestras fueron homogenizadas y divididas en 3 partes para su posterior análisis.

2.1.2. Análisis microbiológico de *Salmonella* por método BAM, capítulo 5

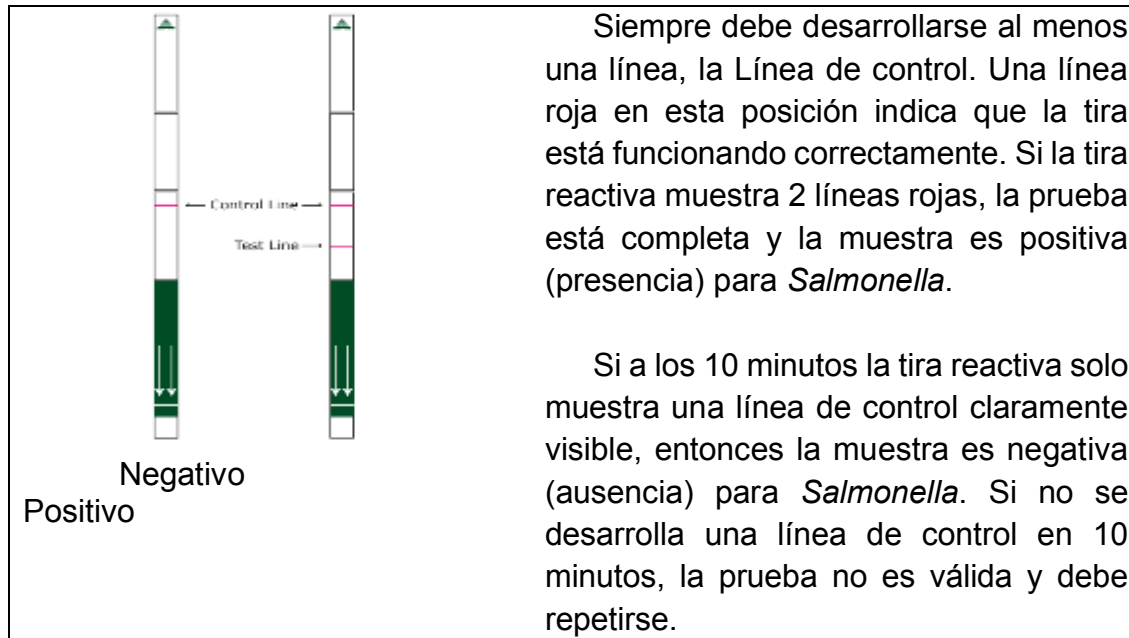
El análisis de las muestras por medio de la metodología BAM fue realizado y reportado por LAFYM.

2.1.3. Análisis microbiológico método RapidChek® SELECT™ *Salmonella*

El análisis de las muestras se llevó a cabo siguiendo las instrucciones detalladas en el inserto del kit RapidCheck® SELECT™ *Salmonella*.

Las muestras se incubaron por 18 horas a 42 °C para el enriquecimiento primario y por 6 horas a 42 °C para el enriquecimiento secundario. Posterior a los enriquecimientos, se colocaron las tiras reactivas en sus respectivos recipientes por 10 minutos y se procedió con la interpretación de resultados según se muestra en la figura 3.

Figura 3. **Ilustración de resultado positivo / negativo *RapidCheck®* *SELECT™***



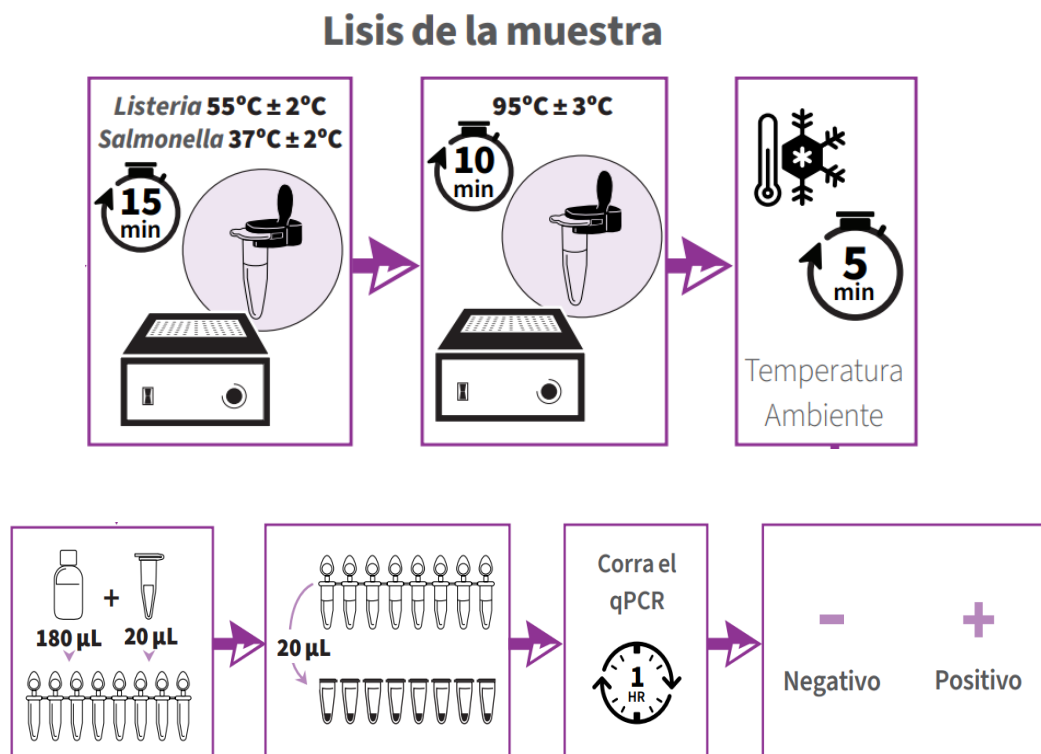
Fuente: Romer Labs Technology Inc. (2019). *Inserto del kit RapidCheck® SELECT™ Sistema de Prueba de Salmonella.*

2.1.4. **Análisis microbiológico método MEMP-qPCR para detección de *Salmonella***

Se procedió con el ensayo molecular MEMP-qPCR acorde a las instrucciones del kit. Se colocaron 500 μL de la muestra dentro del tubo de centrifuga y se procedió con la lisis a 37 °C por 15 minutos y la lisis a 95 °C por 10 minutos. Posteriormente los tubos se enfriaron a temperatura ambiente por 5 minutos. Se mezclaron 180 μL de buffer de lisis con 20 μL de la muestra lisada. De esa mezcla se pipeteó 20 μL dentro de los tubos de PCR, se taparon y se colocaron dentro del termociclador qPCR acorde a la plantilla generada en el Software MyGo Pro y se inició con el ensayo.

En la figura 4 se muestra gráficamente el flujo de trabajo utilizado para el ensayo MEMP-qPCR.

Figura 4. Procedimiento de los ensayos MEMP-qPCR



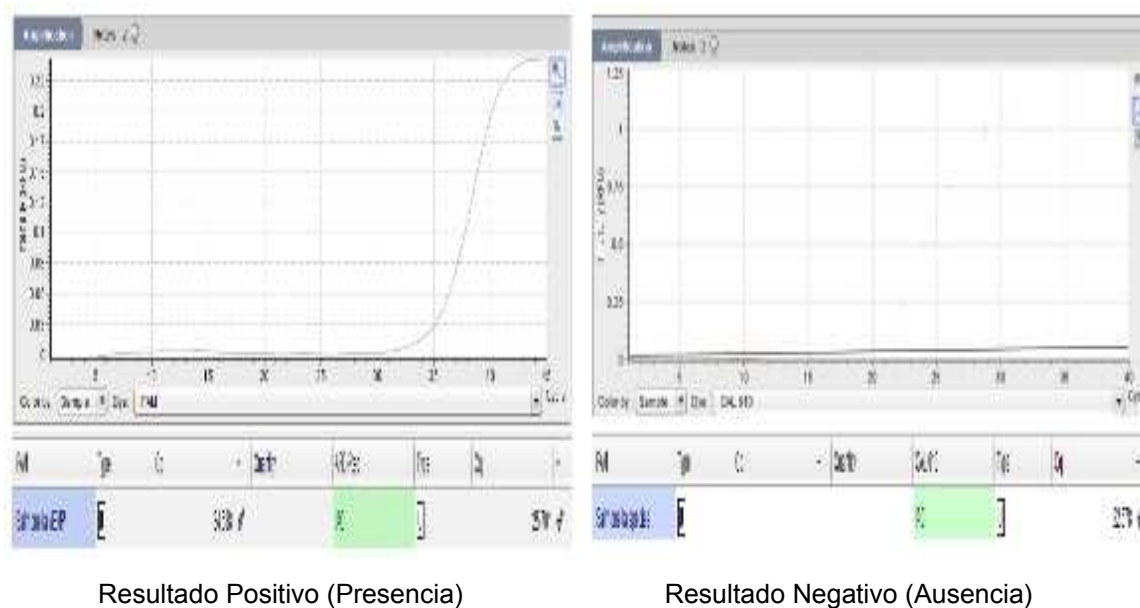
Fuente: AFD (2019). Inserto del kit MEMP *Salmonella*.

La interpretación de resultados se realizó utilizando el software MyGo Pro- acorde a los criterios establecidos en el inserto del kit MEMP-qPCR *Salmonella*.

El software analiza cualquier dato de amplificación de ADN y mostrará un valor Cq para cualquier muestra que se amplifique. Un valor Cq que tenga una curva sigmoideal típica o el inicio de la curva se considera positivo o presencia para *Salmonella*. Cuando no se obtiene un valor Cq, el resultado es negativo o ausencia para *Salmonella* siempre que haya un valor Cq presente en el canal CAL Fluor Red 610 para el IAC (control interno de amplificación). (AFD, 2019)

En la figura 5 se ejemplifica un resultado positivo (presencia) y un resultado negativo (ausencia) para *Salmonella* utilizando el software MyGo Pro.

Figura 5. **Resultados MEMP-qPCR con el software MyGo Pro**



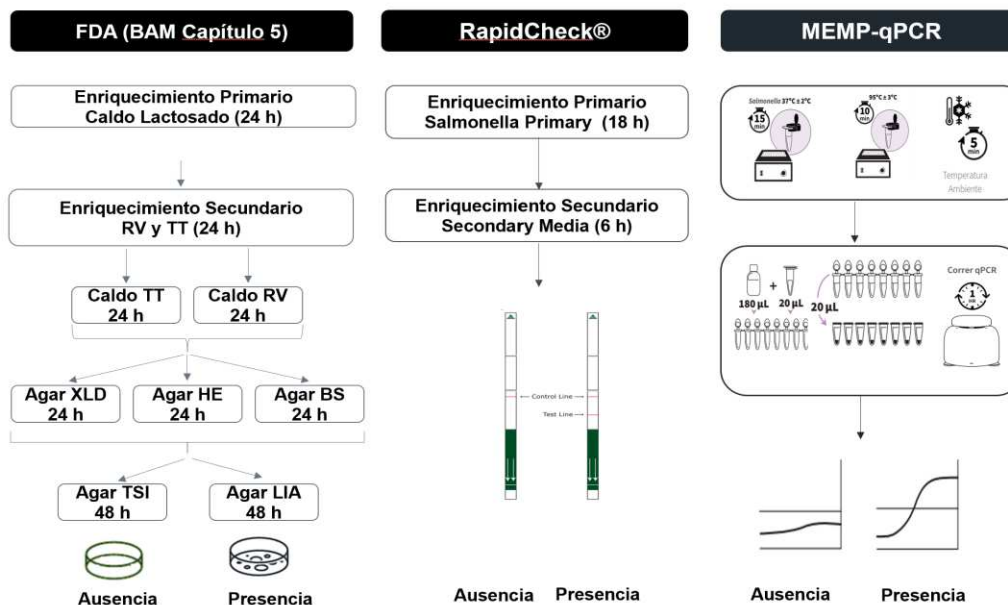
Fuente: elaboración propia, empleando software MyGo Pro.

2.2. Comparativo de métodos de ensayo

En el siguiente apartado se detalla cómo se determinó el tiempo total de ensayo, el comparativo de los resultados obtenidos, así como el costo de implementación por metodología.

En la figura 6 se muestran los pasos realizados para obtener los resultados de análisis de *Salmonella* para cada metodología.

Figura 6. Procedimiento y toma de tiempo por metodología



Fuente: elaboración propia, empleando software Microsoft Power Point.

2.2.1. Determinación del tiempo total por metodología

Para cada metodología se anotó la fecha y hora a la que se inició con los ensayos (hora inicial) así como la fecha y hora en que los resultados obtenidos fueron reportados (hora final). En la tabla III se muestran las fechas y horas en que se realizaron los análisis.

Tabla III. **Hora inicial y hora final para obtención de resultados de *Salmonella***

Método	Fecha y hora inicial	Fecha y hora final
FDA-BAM	07/07/2021; 10:00 am	12/07/2021; 12:00 pm
RapidCheck® SELECT™	07/07/2021; 11:00 am	08/07/2021; 01:00 pm
MEMP-qPCR	07/07/2021; 10:00 am	07/07/2021; 12:00 pm

Fuente: LAFYM (2021). *Datos experimentales.*

El tiempo total en horas se determinó por medio del cálculo de la diferencia entre la hora final y la hora inicial para cada una de las metodologías evaluadas.

2.2.2. Comparación de resultados

El listado de las muestras evaluadas y los resultados obtenidos por metodología se muestran en la tabla IV.

Tabla IV. **Resultados análisis de *Salmonella***

Método	FDA-BAM	RapidCheck®	MEMP-qPCR
Tolva de Alimentación	Ausencia	Ausencia	Ausencia
Tolva de llenado	Ausencia	Ausencia	Ausencia
Salida de llenadora	Ausencia	Ausencia	Ausencia
Cucharón de llenadora	Ausencia	Ausencia	Ausencia
Bandeja de rebalse	Ausencia	Ausencia	Ausencia
Cucharón de rebalse	Ausencia	Ausencia	Ausencia
Tapa #1 de mezcladora	Ausencia	Ausencia	Ausencia
Salida de mezcladora	Ausencia	Ausencia	Ausencia
Tapa #2 de mezcladora	Ausencia	Ausencia	Ausencia
Blanco	Ausencia	Ausencia	Ausencia
Control positivo #1	Presencia	Ausencia	Presencia
Control positivo #2	Presencia	Presencia	Presencia

Fuente: LAFYM (2021). *Datos experimentales.*

Los resultados obtenidos con la metodología MEMP-qPCR y el método rápido RapidChek® SELECT™ fueron comparados con el método de referencia BAM utilizando tablas de contingencia. Se calculó el valor del índice Kappa para determinar la concordancia de cada uno de los métodos al compararlo con el método de referencia.

2.2.3. Determinación de costos de implementación para cada metodología

Para determinar el costo de implementación se enlistaron los equipos requeridos por metodología los cuales se detallan en la tabla V.

Tabla V. Costos de equipos necesarios por metodología

Equipos	FDA-BAM	RapidCheck®	MEMP-qPCR
Tubos de ensayo	Q 0.25	N/A	N/A
Incubadora a 35 °C	Q 10,200.00	N/A	N/A
Baño térmico a 49 °C	Q 12,500.00	Q 12,500.00	N/A
Autoclave	Q 9,000.00	Q 9,000.00	N/A
Frascos para autoclave de 1 L	Q 29.17	Q 29.17	N/A
Balanza	Q 3,200.00	Q 3,200.00	N/A
Probeta de 100 mL	Q 175.00	Q 175.00	N/A
Incubador a 42 °C	Q 10,200.00	Q 10,200.00	N/A
Refrigerador estándar	Q 28,500.00	N/A	Q 28,500.00
Pipeta monocal de 1,000 µL	Q 850.00	Q 850.00	Q 850.00
Pipeta monocal de 200 µL	N/A	N/A	Q 850.00
Pipeta monocal de 20 µL	N/A	N/A	Q 850.00

Continuación tabla V.

Rack para tubos de 1.5 mL	N/A	N/A	Q 110.00
Rack para tubos de 0.1 mL	N/A	N/A	Q 110.00
Bloque de calentamiento	N/A	N/A	5,800.00
Termociclador qPCR	N/A	N/A	Q 230,105.00
Laptop	N/A	N/A	Q 7,800.00

Fuente: elaboración propia.

Para determinar el costo por prueba se calculó el costo por material en base al precio y rendimiento cotizado para cada material los cuales se muestran en la tabla VI.

Tabla VI. **Costos de materiales y reactivos por metodología**

Materiales	Precio	Rendimiento	Costo por material
Caldo Lactosado	Q 575.00	2,130	Q 0.27
Caldo D/E	Q 1,750.00	810	Q 2.16
Medio Rappaport-Vassiliadis	Q 500.00	1,040	Q 0.48
Caldo tetracionato	Q 550.00	600	Q 0.92
Agar bismuto sulfito	Q 950.00	530	Q 1.79
Agar xylose lisina desoxycholate	Q 975.00	500	Q 1.95
Agar entérico Hektoen	Q 875.00	365	Q 2.40
Asa microbiológica	Q 1,000.00	1,000	Q 1.00
Cajas Petri	Q 22.50	50	Q 0.45
Bolsas estériles de 18 onzas	Q 1,200.00	500	Q 2.40
Tips para pipeta de 1,000 µL	Q 96.00	96	Q 1.00

Continuación tabla VI.

Kit RapidCheck® SELECT™ <i>Salmonella</i>	Q 9,500.00	50	Q 190.00
Kit MEMP-qPCR para <i>Salmonella</i>	Q 4,000.00	32	Q 125.00
Swabbing kit MEMP qPCR	Q 1,600.00	32	Q 50.00
Tips para pipeta de 200 µL	Q 96.00	96	Q 1.00
Tips para pipeta de 20 µL	Q 96.00	96	Q 1.00

Fuente: elaboración propia.

3. PRESENTACIÓN DE RESULTADOS

A continuación, se presentan los resultados que respaldan la presente investigación cumpliendo con cada uno de los objetivos planteados:

3.1. Tiempo en obtención de resultados de *Salmonella* por metodología

En la tabla VII se muestra el tiempo total en horas requerido para la obtención de resultados para cada metodología evaluada.

Tabla VII. **Tiempo total para obtención de resultados de *Salmonella***

Método	Tiempo total
FDA-BAM	122 horas
RapidCheck® SELECT™	26 horas
MEMP-qPCR	2 horas

Fuente: LAFYM (2021). *Datos experimentales.*

3.2. Análisis comparativo de resultados obtenidos por metodología

En la tabla II se muestra el nivel de concordancia entre el método MEMP-qPCR y el método de referencia BAM para el cual se obtuvo un valor Kappa igual a 1.000.

Tabla VIII. **Comparativo de resultados entre el método MEMP-qPCR y el método BAM**

Índice Kappa = 1.000		BAM		
		Valores positivos	Valores negativos	Total
MEMP-qPCR	Valores positivos	2	0	2
	Valores negativos	0	10	10
	Total	2	10	12

Fuente: LAFYM (2021). *Datos experimentales.*

El nivel de concordancia entre el método RapidChek® SELECT™ y el método BAM se muestra en la tabla III en donde se obtuvo un valor Kappa igual a 0.625.

Tabla IX. **Comparativo de resultados entre el método RapidChek® SELECT™ y el método BAM**

Índice Kappa = 0.625		BAM		
		Valores positivos	Valores negativos	Total
RapidChek®	Valores positivos	1	1	2
	Valores negativos	0	10	10
	Total	1	11	12

Fuente: LAFYM (2021). *Datos experimentales.*

3.3. Costo de implementación por metodología de análisis

El costo total de equipos y de materiales necesarios para realizar un ensayo de detección de *Salmonella* utilizando cada uno de los métodos evaluados se muestran en la tabla X.

Tabla X. Costo de equipos y costo de materiales

Método	Equipos	Materiales por ensayo
FDA-BAM	Q 74,654.42	Q 14.82
RapidChek® SELECT™	Q 35,954.17	Q 193.40
MEMP-qPCR	Q 274,965.00	Q 178.00

Fuente: elaboración propia.

4. DISCUSION DE RESULTADOS

El presente trabajo de investigación busca evaluar el método de análisis MEMP-qPCR *Salmonella* para la reducción de tiempo en obtención de resultados para muestras de hisopados de superficies en contacto directo con alimentos.

La inspección física realizada en el área de proceso de premezclas permitió la identificación de 9 superficies que tienen contacto directo con el alimento (base de harina para panqueques) en los cuales se realizó la toma de muestra por medio del hisopado de la superficie.

Para la evaluación de la correcta detección de cada uno de los métodos se incluyó una muestra conteniendo únicamente medio estéril como blanco. Como muestra positiva se utilizó una muestra conteniendo *Salmonella Arizonae* y una muestra conteniendo *Salmonella Enteritidis*, ambas provenientes del banco de cepas de LAFYM.

Para el comparativo de los resultados obtenidos se utilizó el método BAM por ser un método de referencia. Se incluyó el método RapidCheck SELECT™ por ser el flujo lateral una de las metodologías utilizados con mayor frecuencia en los laboratorios de análisis en la industria de alimentos.

El método MEMP-qPCR fue validado por la asociación de comunidades analíticas AOAC (por sus siglas en inglés) de acuerdo con el programa Performance Tested Methods (PTM) para la detección de *Salmonella* en muestra de hisopado en diferentes superficies.

El comparativo de resultados entre el método MEMP-qPCR y el método BAM muestra una concordancia perfecta ya que se obtuvo un valor Kappa igual a 1.000. Se obtuvo un valor Kappa igual a 0.625 al comparar el método rápido RapidCheck® SELECT™ y el método BAM debido a la discrepancia en el resultado de una muestra control positiva, no siendo esta detectada por el método rápido (Ausencia).

Como se observa en la tabla VII, se logra una reducción de 120 horas para obtener resultados de análisis de *Salmonella* en muestras de superficies al utilizar el método MEMP-qPCR comparado con el método BAM y una reducción de 24 horas comparado con el método RapidCheck® SELECT™.

Acorde a la tabla X, se requiere una inversión de Q 274,965.00 para la implementación del método MEMP-qPCR lo cual representa una diferencia de Q 200,310.58 comparado con el costo de implementación del método tradicional BAM y una diferencia de Q 239,010.83 comparado con el costo de implementación del método RapidCheck SELECT™.

Según la tabla X, el costo de análisis por muestra utilizando el método MEMP-qPCR es mayor si se compara con el método BAM sin embargo es menor si se compara con el método rápido RapidCheck® SELECT™ lo cual puede generar un ahorro en el costo por análisis a métodos alternativos que actualmente utiliza la industria de alimentos en sus laboratorios.

Se considera que el costo de inversión y el costo de análisis por muestra utilizando el método MEMP-qPCR no es significativo si se compara con el monto que representa la retención de cada lote de producto producido a la espera de resultados de análisis.

CONCLUSIONES

1. Se calculó que el tiempo en que se obtienen resultados de análisis de *Salmonella* en superficies de zona 1 con la tecnología qPCR fue de 2 horas lo que representa una reducción de 120 horas comparado con el método tradicional BAM y 24 horas comparado con el método rápido RapidCheck® SELECT™.
2. Se compararon los resultados obtenidos con la tecnología qPCR y el método tradicional BAM obteniendo una concordancia significativa y aceptable. La concordancia entre el método BAM y el método rápido RapidCheck® SELECT™ no fue aceptable.
3. Se determinó que el costo de implementación de la tecnología para detección de *Salmonella* por el método qPCR es de Q 274,965.00, el del método tradicional BAM es de Q 74,654.42 y el del método RapidCheck® SELECT™ es de Q 35,954.17.

RECOMENDACIONES

1. Implementar la tecnología qPCR empleada en la presente investigación en superficies de no contacto directo con los alimentos (zonas 2, 3 y 4) como complemento del programa de monitoreo ambiental de patógenos en plantas de producción de alimentos.
2. Utilizar el procedimiento de evaluación propuesto en este trabajo de investigación para otros microorganismos de interés en la industria de alimentos (como por ejemplo *Listeria monocytogenes*) y así conseguir una optimización de recursos y cumplimiento en normativas de inocuidad.
3. A la academia, el seguir proponiendo metodologías alternativas para el análisis microbiológico de superficies, materias primas y producto terminado que se adapten a las modernas prácticas de producción de alimentos en la reducción de tiempos y costos asociados.
4. La industria de alimentos en general puede utilizar la información del presente estudio para la implementación de métodos moleculares que permitan la reducción de tiempo en obtención de resultados y con ello puedan optimizar la disponibilidad de su producto en el mercado.

REFERENCIAS

1. Almond Board of California. (14 de junio, 2007). *Pathogen Environmental Monitoring*. [Mensaje de un blog]. Recuperado de <https://www.almonds.com/almond-industry/processors-and-suppliers/processing-safe-product/pem>.
2. Álvarez, H. (2013). *Validación de dos métodos para la detección de Salmonella spp. en embutidos artesanales, distribuidos en mercados municipales del departamento de Guatemala* (Tesis de licenciatura). Universidad de San Carlos de Guatemala, Guatemala. Recuperado de <https://biblioteca-farmacia.usac.edu.gt/Tesis/QB1051.pdf>.
3. Applied Food Diagnostics. (15 de octubre, 2019). *Inserto del kit Molecular Environmental Monitoring Program (MEMP) for Salmonella Detection*. [Mensaje de un blog]. Recuperado de <https://www.prnewswire.com/news-releases/applied-food-diagnostics-memp-salmonella-assays-receives-aoac-ptm-validations-301153515.html>.
4. Beuchat, L., Komitopoulou, E., Beckers, H., Betts, R., Bourdichon, F., Fanning, S., Joosten, H. y Ter, B. (agosto, 2012). Low–water activity foods: increased concern as vehicles of foodborne pathogens. *Journal of Food Protection*, 76(1), 150-172. Recuperado de https://www.academia.edu/7774093/Low_water_activity_foods_increased_concern_as_vehicles_of_foodborne_pathogens.

5. Carrasco, E., Morales-Rueda, A. y García-Gimeno, R. (noviembre, 2012). Cross-contamination and recontamination by *Salmonella* in foods: A review. *Food Research International*, 45(2), 545-556. Recuperado de <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2011.11.004>.
6. Codex Alimentarius. (2018). *Código de prácticas de higiene para alimentos con bajo contenido de humedad*. Ginebra, Suiza: Organización Mundial de la Salud.
7. Gómez, M., Silva, M., Salvá, B. y Elías, C. (octubre, 2019). Detección y enumeración de *Salmonella* sp. en carne de llama (*Llama glama*) mediante qPCR. *Scientia Agropecuaria*, 10(3), 403-411.
8. González, J., Pereira, N., Soto, Z., Hernández, E. y Villarreal, J. (marzo, 2014). Aislamiento microbiológico de *Salmonella* spp. y herramientas moleculares para su detección. *Salud Uninorte*, 30 (1), 73-94.
9. Goodridge, L., Fratamico, P., Laurids, L., Hoorfar, J., Griffiths, M., Carter, M., Bhumia, A. y O'Kennedy, R. (noviembre, 2011). Strengths and Shortcomings of Advanced Detection Technologies. In *Rapid Detection, Characterization, and Enumeration of Foodborne Pathogens*. *National Food Institute*, 2(1), 15-46.
10. Grimont, P. y Weill, F. (2007). *Antigenic Formulae of the Salmonella Serovars*. *WHO Collaborating Centre for Reference and Research on Salmonella and Institut Pasteur*. Paris, Francia: Institut Pasteur.

11. Guzmán, E. (noviembre, 2004). Las pruebas de ELISA. *Gaceta Médica de México*, 140 (3), 48-49.
12. Hammack, T. (2012). *Bad Bug Book, Foodborne Pathogenic Microorganisms and Natural Toxins*. Estados Unidos: Food and Drug Administration.
13. International Commission on Microbiological Specifications for Foods [ICMSF]. (2011). *Milk and Dairy products, Ch. 23 In: Microorganisms in Foods 8: Use of Data for Assessing Process Control and Product Acceptance*. New York, Estados Unidos: ICMSF.
14. Koczula, A. y Gallotta, A. (junio, 2016). Lateral Flow Assays. *Essays in biochemistry*. 60(1), 2-10.
15. Kusumaningrum, H., Riboldi, G., Hazeleger, W. y Beumer, R. (agosto, 2003). Survival of foodborne pathogens on stainless steel surfaces and cross-contamination to foods. *International journal of food microbiology*, 85(3), 227-236.
16. Masri, H. (2013). *Optimizing sample plans to improve microbiological safety in a food processing plant*. (Tesis de maestría). Instituto Politécnico y Universidad Estatal de Virginia, Estados Unidos.
17. Maurer J. (junio, 2011). Rapid Detection and Limitations of Molecular Techniques. *Annual Review of Food Science and Technology*, 2, 259–279.

18. Palomino, C. y González, Y. (julio, 2014). Técnicas moleculares para la detección e identificación de patógenos en alimentos: ventajas y limitaciones. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Publica*, 31(3), 535-543.
19. Podolak, R., Enache, E., Stone, W., Black, D. G. y Elliott, P. (octubre, 2010). Sources and risk factors for contamination, survival, persistence, and heat resistance of *Salmonella* in low-moisture foods. *Journal of Food Protection*, 73(10), 1919-1936.
20. Reuter, M., Mallet, A., Pearson, B. y Van, A. (abril, 2010). Biofilm formation by *Campylobacter jejuni* is increased under aerobic conditions. *Applied and Environmental Microbiology*, 76(7), 2122–2128.
21. Robledo, A. (2015). *Investigación de Salmonella spp en alimentos mediante el método tradicional ISO 6579 y dos métodos inmunoenzimáticos*. (Tesis de licenciatura). Universidad Politécnica de Cataluña, España.
22. Romer Labs Technology Inc. (2019). *Inserto del kit RapidCheck SELECT Sistema de Prueba de Salmonella*. Estados Unidos: RLT, Inc.
23. Sakugawa, N., Bezerra, V., Castro, S., Lima, E., Fireman, R. y De Lima, J. (octubre, 2008). *Salmonella spp.*, importante agente patogênico veiculado em alimentos. *Ciência & Saúde Coletiva*, 13(5), 1675-1683.

24. Torres, O. (3 de mayo, 2011). *Desarrollo de un PCR multiplex para identificar las principales Escherichia coli causantes de diarrea infantil en Guatemala*. [Mensaje de un blog]. Recuperado de <https://fondo.senacyt.gob.gt/portal/index.php/catalogo/2-uncategorised/263-39-2006-biotecnologia>.
25. U.S. Food and Drug Administration. (28 de marzo, 2018). *Department of Health and Human Services*. [Mensaje de un blog]. Recuperado de <https://www.fda.gov/about-fda/what-we-do>.
26. Ventura, G., Parra, C. Toledo, R. y Girón, M. (noviembre, 2017). Determinación de Salmonella spp por qPCR en carne de res procedentes de rastros tipo inspección federal (TIF) y no TIF. *Bio Ciencias*, 4(5), 1-9.
27. Zhang, G., Brown, E. y González, N. (julio, 2011). Comparison of Real-Time PCR, Reverse Transcriptase Real-Time PCR, Loop-Mediated Isothermal Amplification, and the FDA Conventional Microbiological Method for the Detection of Salmonella spp. in Produce. *Applied and Environmental Microbiology*, 77(10), 6495-6501

APÉNDICES

Apéndice 1. Matriz de coherencia

Problema	Objetivos	Conclusiones	Recomendaciones
Pregunta Principal	Objetivo General		
¿Podrá la tecnología qPCR reducir el tiempo de detección de <i>Salmonella</i> spp en superficies de zona 1 con resultados confiables?	Evaluar la tecnología qPCR en la reducción del tiempo de detección de <i>Salmonella</i> spp en superficies de zona 1.		
Preguntas Auxiliares	Objetivos Específicos		
¿En cuánto tiempo se obtienen los resultados de análisis de <i>Salmonella</i> con la tecnología qPCR en superficies de zona 1?	Calcular el tiempo en que se obtienen los resultados de análisis de <i>Salmonella</i> con la tecnología qPCR en superficies de zona 1.	Se calculó que el tiempo en que se obtienen resultados de análisis de <i>Salmonella</i> en superficies de zona 1 con la tecnología qPCR fue de 2 horas lo que representa una reducción de 120 horas comparado con el método tradicional BAM y 24 horas comparado con el método rápido RapidCheck® SELECT™.	Utilizar el procedimiento de evaluación propuesto en este trabajo de investigación para otros microorganismos de interés en la industria de alimentos (como por ejemplo <i>Listeria monocytogenes</i>) y así conseguir una optimización de recursos y cumplimiento en normativas de inocuidad.
¿Los resultados obtenidos con tecnología qPCR coincidirán con el método tradicional BAM?	Comparar los resultados obtenidos con tecnología qPCR con el método tradicional BAM y un método rápido.	Se compararon los resultados obtenidos con la tecnología qPCR y el método tradicional BAM obteniendo una concordancia significativa y aceptable. La concordancia entre el método BAM y el método rápido RapidCheck® SELECT™ no fue aceptable.	Se recomienda a la academia, el seguir proponiendo metodologías alternativas para el análisis microbiológico de superficies, materias primas y producto terminado que se adapten a las modernas prácticas de producción de alimentos en la reducción de tiempos y costos asociados.
¿Cuál es el costo de implementación de la tecnología qPCR, el método tradicional BAM y un método rápido para la detección de <i>Salmonella</i> ?	Determinar el costo de implementación de la tecnología qPCR, el método tradicional BAM y un método rápido para la detección de <i>Salmonella</i> .	Se determinó que el costo de implementación de la tecnología para detección de <i>Salmonella</i> por el método qPCR es de Q 274,965.00, el del método tradicional BAM es de Q 74,654.42 y el del método RapidCheck® SELECT™ es de Q 35,954.17.	La industria de alimentos en general puede utilizar la información del presente estudio para la implementación de métodos moleculares que permitan la reducción de tiempo en obtención de resultados y con ello puedan optimizar la disponibilidad de su producto en el mercado.

Fuente: elaboración propia.

ANEXOS

Anexo 1. **Equipos necesarios para la implementación del método MEMP-qPCR para análisis de *Salmonella***



Fuente: AFD (2019). *Inserto del kit MEMP Salmonella.*

Anexo 2. Informe de resultados de *Salmonella* para muestras evaluadas reportadas por LAFYM según método BAM



USAC
TRICENTENARIA
Universidad del Sur Centro de Guatemala

**Laboratorio de Análisis Físicoquímicos
y Microbiológicos - LAFYM**
St. Calle 9-47, Zona 1
Ciudad Vieja, Guatemala Ciudad
Tel: 2253 1318
Email: lafym@usac.edu.gt

Empresa : ALLAN HERNANDEZ
N° de la muestra : 13818 (Protocolo firmado)
Temperatura : Refrigeración
Muestra : SUPERFICIE
Captación : Captado por personal ajeno a LAFYM en un envase que no es de LAFYM

Fecha de toma de la muestra : 06/07/2021 15:00
Fecha de recepción : 07/07/2021 11:52
Número de lote : TOLVA DE ALIMENTACIÓN

SUPERFICIES

ANÁLISIS	RESULTADO	Dimensional	Límites aceptados
Salmonella spp.	Ausencia	Ausencia/Presencia	Ausencia

*Límites de Referencia: APHA 16a. ed. Capítulos 36 - BAMFDA: Capítulo 5

Conclusión:
La muestra recibida y analizada es satisfactoria.


 Lidia Ana Pineda
 Analista


 Química Biológica
 DOL 2303

Este Resultado es referente únicamente a la muestra analizada.
El formato de envase no debe ser reproducido total o parcialmente, así la aprobación escrita del Laboratorio.

Anexo 3. Informe de resultados para llenadora



Laboratorio de Análisis Físicoquímicos
y Microbiológicos - LAFYM
36, Calle 6-47, Zona 1
Centro Histórico, Guatemala Ciudad
Tel: 2250 1219
Email: lafym@usac.edu.gt

Empresa : ALLAN HERNANDEZ
N° de la muestra : 11819 (Protocolo firmado)
Temperatura : Refrigeración
Muestra : SUPERFICIE
Captación : Captado por personal ajeno a LAFYM en un envase que no es de LAFYM

Fecha de toma de la muestra : 06/07/2021 15:00
Fecha de recepción : 07/07/2021 11:54
Número de lote : LLENADORA

SUPERFICIES

ANÁLISIS	RESULTADO	Dimensional	Limites aceptados
Salmonella spp.	Ausencia	Ausencia/Presencia	Ausencia

*Métodos de Referencia: APHA 54a. ed. Capítulos 26- BMMFA: capítulo 5

Conclusión:

La muestra recibida y analizada es satisfactoria.

Linda Ana Rangel de García, QB.
Firma

Linda Ana E. Rangel García
QUÍMICA BIOLÓGICA
COL 2323

Este Resultado se refiere únicamente a la muestra analizada.
El envase de ensayo no debe ser reutilizado total o parcialmente, sin la aprobación escrita del Laboratorio.

Anexo 4. Informe de resultados para tubo de salida de llenadora



Laboratorio de Análisis Físicoquímicos
y Microbiológicos - LAFYM
Su. Calle 8-47, Zona 5
Centro Histórico, Guatemala Ciudad
Tel: 2253 2313
Email: lafym@usacguate.com

Empresa : ALLAN HERNANDEZ
N° de la muestra : 11820 (Protocolo firmado)
Temperatura : Refrigeración
Muestra : SUPERFICIE
Captación : Captado por personal ajeno a LAFYM en un envase que no es de LAFYM

Fecha de toma de la muestra : 06/07/2021 15:00
Fecha de recepción : 07/07/2021 11:55
Número de lote : TUBO DE SALIDA LLENADORA

SUPERFICIES

ANÁLISIS	RESULTADO	Dimensional	Límites aceptados
Salmonella spp.	Ausencia	Ausencia/Presencia	Ausencia

*Métodos de Referencia: APHA 8ta. ed. Capítulo 38 - BAMTA: Capítulo 5

Conclusión:

La muestra recibida y analizada es satisfactoria.

Urd. Ana Rodríguez García, OS.
[Firma]

Urd. Ana E. Rodríguez
QUÍMICA BIÓLOGA
COL. 2323

Este Resultado se refiere únicamente a la muestra analizada.
El informe de ensayo no debe ser reproducido total o parcialmente, sin la aprobación escrita del Laboratorio.

Anexo 5. Informe de resultados para llenadora



Laboratorio de Análisis Físicoquímicos y Microbiológicos - LAFYM

2a. Calle 6-47, Zona 1
CENSO HISTÓRICO, PARANÁ, CABA
Tel: 2253-1319
Email: lafym@usac.edu.gt

Empresa : ALLAN HERNANDEZ
N° de la muestra : 11821 [Protocolo firmado]
Temperatura : Refrigeración
Muestra : SUPERFICIE
Captación : Captado por personal ajeno a LAFYM en un envase que no es de LAFYM

Fecha de toma de la muestra : 06/07/2021 15:00
Fecha de recepción : 07/07/2021 11:56
Número de lote : CUCHARON PARA LLENADORA

SUPERFICIES

ANÁLISIS	RESULTADO	Dimensional	Limites aceptados
<i>Salmonella</i> spp.	Ausencia	Ausencia/Presencia	Ausencia

*Métodos de Referencia: ALPHA 5ta. ed. Capítulos 38- BAWTDA, Capítulo 5.

Conclusión:
La muestra recibida y analizada es satisfactoria.

Linda Ana Reyes García, Q.B.
[Firma]

Linda Ana Reyes García
QUÍMICA BIÓLOGA
COL. 1323

Este Resultado se refiere únicamente a la muestra analizada.
El informe de ensayo no debe ser reproducido total o parcialmente, sin la aprobación escrita del Laboratorio.

Anexo 6. Informe de resultados para bandeja de rebalse



Laboratorio de Análisis Físicoquímicos
y Microbiológicos - LAFYM
Dr. Calle 8-47, Cero 1
Centro Histórico, Guatemala Ciudad
Tel: 2253 1319
Email: lafymusac@gmail.com

Empresa : ALLAN HERNANDEZ
N° de la muestra : 11822 (Protocolo firmado)
Temperatura : Refrigeración
Muestra : SUPERFICIE
Captación : Captado por personal ajeno a LAFYM en un envase que no es de LAFYM

Fecha de toma de la muestra : 06/07/2021 15:00
Fecha de recepción : 07/07/2021 11:57
Número de lote : BANDEJA DE REBALSE

SUPERFICIES

ANÁLISIS	RESULTADO	Dimensional	Límites aceptados
Salmonella spp.	Ausencia	Ausencia/Presencia	Ausencia

*Métodos de Referencia: APHA 5ta. ed. Capítulos 36 - BAMPTA; Capítulo 5

Conclusión:

La muestra recibida y analizada es satisfactoria.

Linda Ana Hernández García, OD.
Firma

Linda Ana Hernández García
QUÍMICA BIÓLOGA
ODL 3103

Este resultado se refiere únicamente a la muestra analizada.
El informe de ensayo no debe ser reproducido total o parcialmente, sin la aprobación escrita del Laboratorio.

Anexo 7. Informe de resultados para cucharón de rebalse



Laboratorio de Análisis Físicoquímicos
y Microbiológicos - LAFYM
Av. Calles 47, Zona 1
Centro Histórico, Guatemala Ciudad
Tel: 2253-1339
Email: lafymsac@gmail.com

Empresa : ALLAN HERNANDEZ
N° de la muestra : 11823 (Protocolo firmado)
Temperatura : Refrigeración
Muestra : SUPERFICIE
Captación : Captado por personal ajeno a LAFYM en un envase que no es de LAFYM

Fecha de toma de la muestra : 06/07/2021 15:00
Fecha de recepción : 07/07/2021 11:59
Número de lote : CUCHARON DE REBALSE

SUPERFICIES

ANÁLISIS	RESULTADO	Dimensional	Limites aceptados
Salmonella spp.	Ausencia	Ausencia/Presencia	Ausencia

*Métodos de Referencia: APHA 5a. ed. Capítulos 36 - BAMITA: Capítulo 5

Conclusión:

La muestra recibida y analizada es satisfactoria.

Licda. Ana Beatriz García, QM.
Analista

Licda. Ana E. Salazar
QUÍMICA BIÓLOGA
CGL 2123

Este Resultado se refiere únicamente a la muestra analizada.
El informe de ensayo no debe ser reproducido total o parcialmente, sin la aprobación escrita del Laboratorio.

Anexo 8. Informe de resultados para muestra blanco



Laboratorio de Análisis Físicoquímicos
y Microbiológicos - LAFYM
Bx. Calle 9-47, Zona 1
Centro Histórico, Guatemala Ciudad
Tel: 2253-1338
Email: lafymsac@gmail.com

Empresa : ALLAN HERNANDEZ
N° de la muestra : 11824 [Protocolo firmado]
Temperatura : Refrigeración
Muestra : SUPERFICIE
Captación : Captado por personal ajeno a LAFYM en un envase que no es de LAFYM

Fecha de toma de la muestra : 06/07/2021 15:00
Fecha de recepción : 07/07/2021 11:59
Número de lote : BLANCO

SUPERFICIES

ANÁLISIS	RESULTADO	Dimensional	Limites aceptados
Salmonella spp.	Ausencia	Ausencia/Presencia	Ausencia

*Métodos de Referencia: APHA 5a. ed. Capítulos 39- BAKTERIA Capitulo 5.

Conclusión:

La muestra recibida y analizada es satisfactoria.

Licda. Ana Patricia García, Q.B.
Analista

Licda. Ana P. Rodríguez
QUÍMICA BIOLÓGICA
COL 2323

Este Resultado se refiere únicamente a la muestra analizada.
El informe de ensayo no debe ser reproducido total o parcialmente, sin la aprobación escrita del Laboratorio.

Anexo 9. Informe de resultados para tapa 1 mezcladora



Laboratorio de Análisis Físicoquímicos
y Microbiológicos - LAFYM
3a. Calle 6-47, Zona 1
Centro Histórico, Guatemala Ciudad
Tel: 2253-1319
Email: lafym.usac@gmail.com

Empresa : ALLAN HERNANDEZ
N° de la muestra : 11825 (Protocolo firmado)
Temperatura : Refrigeración
Muestra : SUPERFICIE
Captación : Captado por personal ajeno a LAFYM en un envase que no es de LAFYM

Fecha de toma de la muestra : 06/07/2021 15:00
Fecha de recepción : 07/07/2021 12:01
Número de lote : TAPA 1 DE MEZCLADORA

SUPERFICIES

ANÁLISIS	RESULTADO	Dimensional	Límites aceptados
Salmonella spp.	Ausencia	Ausencia/Presencia	Ausencia

*Métodos de Referencia: APHA 56a. ed. Capítulo 35: BACTERIA Capítulo 8

Conclusión:
La muestra recibida y analizada es satisfactoria.

Licda. Ana Hernández García, QG.
Firma

Licda. Rocío Espinoza
QUÍMICA BIOLÓGICA
CGL 2323

Este Resultado se debe únicamente a la muestra analizada.
El informe de ensayo no debe ser reproducido total o parcialmente, sin la aprobación escrita del Laboratorio.

Anexo 10. Informe de resultados para salida de mezcladora



Laboratorio de Análisis Físicoquímicos y Microbiológicos - LAFYM

3a. Calle 6-47, Zona 1
Centro Histórico, Guatemala Ciudad
Tel: 2252-1018
Email: lafymusac@gmail.com

Empresa : ALLAN HERNANDEZ
N° de la muestra : 11826 (Protocolo firmado)
Temperatura : Refrigeración
Muestra : SUPERFICIE

Fecha de toma de la muestra : 06/07/2021 15:00
Fecha de recepción : 07/07/2021 12:02
Número de lote : SALIDA DE MEZCLADORA

Captación : Captado por personal ajeno a LAFYM en un envase que no es de LAFYM

SUPERFICIES

ANÁLISIS	RESULTADO	Dimensional	Límites aceptados
Salmonella spp.	Ausencia	Ausencia/Presencia	Ausencia

*Método de Referencia: APHA 51a. ed. Capítulo 35 - 6448FDA, Capítulo 5

Conclusión:

La muestra recibida y analizada es satisfactoria.

Uda. Ana Patricia García, Q.S.
Firma

Lda. Ana E. Spala García
QUÍMICA BIÓLOGA
COL. 2303

Este Análisis no refiere únicamente a la muestra analizada.
El informe de ensayo no debe ser reproducido total o parcialmente, sino la aprobación escrita del Laboratorio

Fuente: LAFYM (2021). *Datos experimentales.*

Anexo 11. Informe de resultados para tapa 2 de mezcladora



Laboratorio de Análisis Físicoquímicos
y Microbiológicos - LAFYM
3a. Calle 8-47, Zona 1
Centro Histórico, Guatemala Ciudad
Tel: 2253-1333
Email: lafym@usac.guatemala.com

Empresa : ALLAN HERNANDEZ
N° de la muestra : 11827 (Protocolo firmado)
Temperatura : Refrigeración
Muestra : SUPERFICIE
Captación : Captado por personal ajeno a LAFYM en un envase que no es de LAFYM

Fecha de toma de la muestra : 06/07/2021 15:00
Fecha de recepción : 07/07/2021 12:03
Número de lote : TAPA 2 DE MEZCLADORA

SUPERFICIES

ANÁLISIS	RESULTADO	Dimensional	Límites aceptados
<i>Salmonella</i> spp.	Ausencia	Ausencia/Presencia	Ausencia

*Métodos de Referencia: APHA 18a. ed. Capítulos 36- RAWPDA Capítulo 9

Conclusión:
La muestra recibida y analizada es satisfactoria.

Linda Ana Rodríguez García, Q.B.
Firma

Linda Ana Rodríguez García
QUÍMICA BIÓLOGA
COL. 2323

(Este Resultado se refiere únicamente a la muestra analizada.
El informe de ensayo no debe ser interpretado como o por sí mismo, sin la aprobación escrita del Laboratorio)

Anexo 12. Informe de resultados para control positivo 1



Laboratorio de Análisis Físicoquímicos
y Microbiológicos - LAFYM
3a. Calle 4-47, Zona 1
Centro Histórico, Guatemala Ciudad
Tel: 2253-1319
Email: lafym.usac@gmail.com

Empresa : ALLAN HERNANDEZ
N° de la muestra : 11828 (Protocolo firmado)
Temperatura : Refrigeración
Muestra : SUPERFICIE
Captación : Captado por personal ajeno a LAFYM en un envase que no es de LAFYM

Fecha de toma de la muestra : 06/07/2021 15:00
Fecha de recepción : 07/07/2021 12:04
Número de lote : CONTROL POSITIVO 1 ARIZONAE

SUPERFICIES

ANÁLISIS	RESULTADO	Dimensional	Limites aceptados
Salmonella spp.	Presencia	Ausencia/Presencia	Ausencia

*Métodos de Referencia: APHA 5ta. ed: Capítulos 35- BARRIDA; Capítulo 5

Licda. Ana Beatriz García, Q.B.
Firma

Licda. Ana E. Kuhn García
QUÍMICA BIOLÓGICA
COL 3323

Este Resultado se refiere únicamente a la muestra analizada.
El Informe de ensayo no debe ser reproducido total o parcialmente, sin la aprobación escrita del Laboratorio.

Anexo 13. Informe de resultados para control positivo 2



Laboratorio de Análisis Físicoquímicos
y Microbiológicos - LAFYM
3a. Calle 6-47, Zona 1
Centro Histórico, Guatemala Ciudad
Tel: 2253-1333
Email: lafym@usac.edu.gt

Empresa : ALLAN HERNANDEZ
N° de la muestra : 11829 (Protocolo firmado)
Temperatura : Refrigeración
Muestra : SUPERFICIE
Captación : Captado por personal ajeno a LAFYM en un envase que no es de LAFYM

Fecha de toma de la muestra : 06/07/2021 15:00
Fecha de recepción : 07/07/2021 12:21
Número de lote : CONTROL POSITIVO 2 ENTERITIDIS

SUPERFICIES

ANÁLISIS	RESULTADO	Dimensional	Límites aceptados
Salmonella spp.	Presencia	Ausencia/Presencia	Ausencia

*Métodos de Referencia: APHA 56a. ed: Capítulos 36- salmon; Capitulo 5

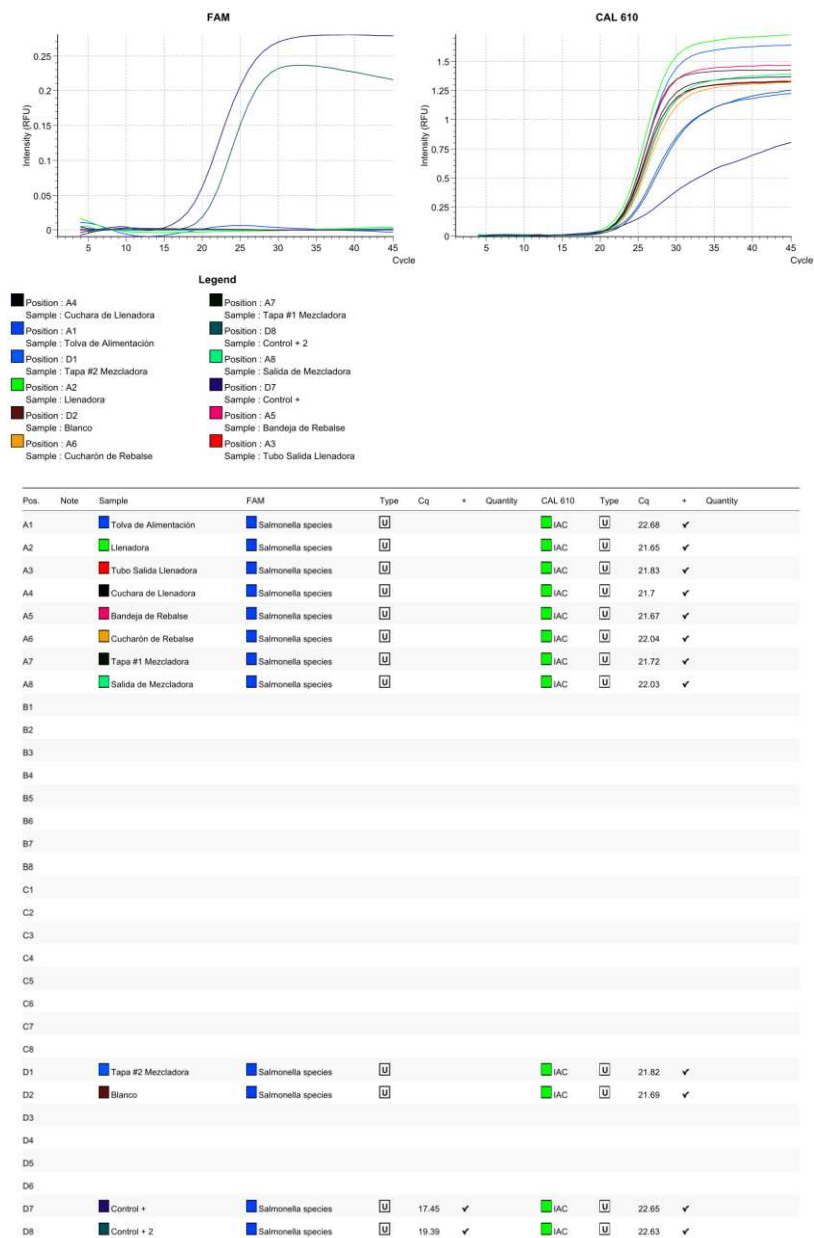
Licda. Ana Rodríguez García, Q.B.
Firma

Licda. Ana E. Rodríguez
QUÍMICA BIÓLOGA
DDL 7523

Este Resultado se refiere únicamente a la muestra analizada.
El informe de ensayo no debe ser reproducido total o parcialmente, sin la aprobación escrita del Laboratorio.

Anexo 14. Informe de resultados de *Salmonella* para muestras evaluadas con método MEMP-qPCR

Resultados método MEMP-qPCR



Fuente: Software MyGo Pro. (2022). Informe de resultados.