



Universidad de San Carlos de Guatemala
Facultad de Ingeniería
Escuela de Ingeniería Química

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

Allan Francis Hernández Guerra

Asesorado por la MSc. Licda. Vera Lucia Paredes

Guatemala, abril de 2022

UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA



FACULTAD DE INGENIERÍA

**DISEÑO DE INVESTIGACIÓN SOBRE 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

ALLAN FRANCIS HERNÁNDEZ GUERRA
ASESORADO POR LA MSC. LICDA. VERA LUCIA PAREDES

AL CONFERÍRSELE EL TÍTULO DE

INGENIERO QUÍMICO

GUATEMALA, ABRIL DE 2022

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

DECANO	Ing. Sydney Alexander Samuels Milson
EXAMINADOR	Ing. Federico Guillermo Salazar Rodríguez
EXAMINADOR	Ing. Rodolfo Francisco Espinosa Smith
EXAMINADOR	Ing. Victor Herbert de León Morales
SECRETARIO	Ing. Pedro Antonio Aguilar Polanco

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:

**DISEÑO DE INVESTIGACIÓN SOBRE 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 Escuela de Estudios de Postgrado con fecha 16 de octubre de 2021.

Allan Francis Hernández Guerra



EEPFI-PP-0045-2022
Guatemala, 12 de enero de 2022

Director
Williams G. Álvarez Mejía
Escuela De Ingeniería Química
Presente.

Estimado Ing. Álvarez

Reciba un cordial saludo de la Escuela de Estudios de Postgrado de la Facultad de Ingeniería.

El propósito de la presente es para informarle que se ha revisado y aprobado el Diseño de Investigación titulado: **DISEÑO DE INVESTIGACIÓN BENEFICIOS DE LA IMPLEMENTACIÓN DE TECNOLOGÍA QPCR PARA LA DETECCIÓN DE SALMONELLA SPP EN MUESTRAS DE SUPERFICIES EN CONTACTO DIRECTO CON LOS ALIMENTOS**, el cual se enmarca en la línea de investigación: **Todas las áreas - Diseño de sistemas de inocuidad en lugares donde se preparen alimentos**, presentado por el estudiante **Allan Francis Hernandez Guerra** carné número **199911067**, quien optó por la modalidad del "PROCESO DE GRADUACIÓN DE LOS ESTUDIANTES DE LA FACULTAD DE INGENIERÍA OPCIÓN ESTUDIOS DE POSTGRADO". Previo a culminar sus estudios en la Maestría en ARTES en Ciencia Y Tecnología De Los Alimentos.

Y habiendo cumplido y aprobado con los requisitos establecidos en el normativo de este Proceso de Graduación en el Punto 6.2, aprobado por la Junta Directiva de la Facultad de Ingeniería en el Punto Décimo, Inciso 10.2 del Acta 28-2011 de fecha 19 de septiembre de 2011, firmo y sello la presente para el trámite correspondiente de graduación de Pregrado.

Atentamente,

"Id y Enseñad a Todos"

Mtro. Vera Lucia Paredes Barrios
Asesor(a)

Licda. Vera Lucia Paredes
Química Bióloga
Colegiada No. 3999

Mtra. Hilda Piedad Palma Ramos
Coordinador(a) de Maestría



Mtro. Edgar Darío Álvarez Cotí
Director
Escuela de Estudios de Postgrado
Facultad de Ingeniería





EEP.EIQ.0045.2022

El Director de la Escuela De Ingenieria Quimica de la Facultad de Ingeniería de la Universidad de San Carlos de Guatemala, luego de conocer el dictamen del Asesor, el visto bueno del Coordinador y Director de la Escuela de Estudios de Postgrado, del Diseño de Investigación en la modalidad Estudios de Pregrado y Postgrado titulado: **DISEÑO DE INVESTIGACIÓN 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 el estudiante universitario **Allan Francis Hernandez Guerra**, procedo con el Aval del mismo, ya que cumple con los requisitos normados por la Facultad de Ingeniería en esta modalidad.

ID Y ENSEÑAD A TODOS

Ing. Williams G. Álvarez Mejía
Director
Escuela De Ingenieria Quimica

Guatemala, enero de 2022

LNG.DECANATO.OI.242.2022

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 Ingeniería Química, al Trabajo de Graduación titulado: **DISEÑO DE INVESTIGACIÓN SOBRE 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: **Allan Francis Hernández Guerra**, después de haber culminado las revisiones previas bajo la responsabilidad de las instancias correspondientes, autoriza la impresión del mismo.

IMPRÍMASE:



Ing. Aurelia Anabela Cordova Estrada

Decana

Guatemala, abril de 2022

AACE/gaoc

ACTO QUE DEDICO A:

- Dios** Por haberme permitido 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 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	Por haberme acompañado durante la carrera.
Mi asesor	MSc. Licda. Vera Lucia Paredes, por haberme guiado durante el trabajo de graduación.

ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE DE ILUSTRACIONES.....	V
LISTA DE SÍMBOLOS	VII
GLOSARIO	IX
RESUMEN.....	XI
1. INTRODUCCIÓN	1
2. ANTECEDENTES	3
3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	7
4. JUSTIFICACIÓN	9
5. OBJETIVOS	11
5.1. General.....	11
5.2. Específicos	11
6. NECESIDADES POR CUBRIR Y ESQUEMA DE SOLUCIÓN	13
7. MARCO TEÓRICO.....	15
7.1. Generalidades de la <i>Salmonella</i>	15
7.1.1. Características	15
7.1.2. Clasificación.....	16
7.1.3. Patogenicidad	17
7.1.4. Prevención y control	18

7.2.	Métodos de detección de <i>Salmonella spp</i>	19
7.2.1.	Métodos de cultivo estándar o tradicionales.....	20
7.2.2.	Determinación de <i>Salmonella spp</i> según el método FDA/CFSAN, BAM capítulo 5.....	20
7.3.	Métodos serológicos	22
7.3.1.	Ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA).....	22
7.3.2.	Ensayo de flujo lateral	23
7.4.	Métodos basados en ácidos nucleicos.....	25
7.4.1.	Reacción en cadena de la polimerasa	25
7.4.2.	Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (qPCR)	26
7.5.	Monitoreo de <i>Salmonella</i> en superficies.....	26
7.5.1.	Programa de monitoreo ambiental en plantas de alimentos de baja humedad	27
7.5.2.	Zonificación y muestreo.....	28
7.5.3.	Acciones correctivas basadas en los resultados de análisis	31
8.	PROPUESTA DE ÍNDICE DE CONTENIDOS	35
9.	METODOLOGÍA	37
9.1.	Tipo de estudio.....	37
9.2.	Diseño de investigación	37
9.3.	Variables del estudio	37
9.4.	Fase 1: Exploración bibliográfica	38
9.5.	Fase 2: Muestreo	38
9.6.	Fase 3: Análisis microbiológico	39
9.7.	Fase 4: Comparativo de métodos de análisis	48

9.8.	Fase 5: Análisis de costo.....	49
9.9.	Fase 6: Presentación y discusión de resultados.....	51
10.	TÉCNICAS DE ANÁLISIS DE LA INFORMACIÓN	53
11.	CRONOGRAMA.....	55
12.	FACTIBILIDAD DEL ESTUDIO	57
13.	REFERENCIAS.....	59
14.	APÉNDICES.....	65
15.	ANEXO.....	67

ÍNDICE DE ILUSTRACIONES

FIGURAS

1.	Zonificación para monitoreo ambiental.....	30
2.	Diagrama de flujo método FDA para detección de <i>Salmonella</i> , capítulo 5.....	39
3.	Ilustración de resultado positivo / negativo <i>RapidCheck SELECT</i>	43
4.	Procedimiento de los ensayos MEMP	47

TABLAS

I.	<i>Salmonella</i> especies, subespecies, serotipos y su hábitat.....	16
II.	Frecuencia y número de muestras por zona	31
III.	Descripción de variables	38
IV.	Resultados de tiempo requerido para obtención de resultados de hisopados de superficies.....	48
V.	Resultados de análisis de <i>Salmonella</i> en muestras de hisopados de superficies de contacto directo con alimentos.....	49
VI.	Lista de equipos requerido por metodología y su costo	50
VII.	Lista de materiales requeridos por metodología y su costo por análisis	51
VIII.	Cronograma de la investigación.....	55
IX.	Gastos del estudio.....	57

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

ABC	Consejo de las Almendras en California (<i>Almond Board of California</i>).
AOAC	Asociación de Químicos Analíticos Oficiales (<i>Association of Official Analytical Chemists</i>).
BAM	Manual Analítico Bacteriológico (<i>Bacteriological analytical manual</i>).
CFSAN	Centro para la Seguridad Alimentaria y la Nutrición Aplicada (<i>Center for Food Safety and Applied Nutrition</i>).
ELISA	Ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (<i>Enzyme-Linked immunosorbent assay</i>).
FDA	Administración de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos (<i>Food and Drug Administration</i>).
IAC	Control interno de amplificación (<i>Internal amplification control</i>).
Inocuo	Es todo aquello que no causa daño al consumidor.

LAFYM	Laboratorio de Análisis Físicoquímico y Microbiológico.
MEMP	Programa de Monitoreo Ambiental Molecular (<i>Molecular environmental monitoring program</i>).
pH	Medición de los iones hidronio de una muestra, que se relaciona a la acidez o basicidad de un alimento.
qPCR	Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa (<i>Quantitative polymerase chain reaction</i>).

RESUMEN

El presente diseño 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. Se determinará el tiempo total que requiere dicha metodología desde la toma de la muestra hasta la obtención de resultados y se comparará con el tiempo total requerido utilizando un método rápido y el método tradicional FDA BAM.

Para la determinación del tiempo total se realizará toma de muestras en equipos y superficies en contacto con el alimento en una planta que realiza mezcla de harinas para consumo. Posteriormente las muestras serán analizadas siguiendo cada metodología para determinar la presencia o ausencia de *Salmonella*.

Se determinará el costo requerido para la implementación de cada una de las metodologías, los materiales necesarios, así como el costo por muestra analizada.

Se espera que la metodología reduzca el tiempo para la obtención de resultados de *Salmonella* en superficies siendo entonces un aporte importante para el programa de monitoreo ambiental aplicado en la industria de los alimentos.

1. INTRODUCCIÓN

La implementación de sistemas de inocuidad es indispensable para garantizar la producción segura de alimentos. Programas como el monitoreo ambiental de patógenos permite detectar nichos de contaminación biológica que pueden poner en peligro la inocuidad de los productos elaborados. Para garantizar que no se están comercializando alimentos contaminados con patógenos es importante considerar la retención de los productos hasta obtener el resultado de análisis para aquellas muestras 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 los alimentos procesados 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.

Se propone por medio de esta investigación evaluar una metodología qPCR para el análisis de *Salmonella spp.* en muestras de hisopados de superficies en contacto con los alimentos, para la reducción en el tiempo en que se obtienen los resultados posteriores a la toma de muestra.

Los datos que serán obtenidos en los análisis darán a conocer el tiempo que se puede reducir al implementar la metodología qPCR para detectar *Salmonella* en una muestra de superficies cuando se compara con un método rápido inmunocromatográfico el método tradicional.

Se presentarán los antecedentes de la investigación que resumen investigaciones previas sobre el tema. Se hará una exploración bibliográfica de los temas que sirva como base teórica de la aplicación propuesta. Se evaluará el costo de los materiales requeridos para su implementación y la factibilidad del estudio.

2. 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).

3. 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), con los 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*?

4. JUSTIFICACIÓN

La realización del presente trabajo se justifica en la línea de investigación de diseño de sistemas de control de inocuidad en lugares donde se preparen alimentos de la Maestría en Ciencia y Tecnología de los Alimentos.

En la actualidad, plantas de alimentos someten a cuarentena los productos listos para consumir a la espera de resultados microbiológicos satisfactorios. La presente investigación aportará información de tecnología qPCR que permite reducir el tiempo para la obtención de resultados de *Salmonella spp.* en superficies de contacto directo con los alimentos.

En la presente investigación se realizarán análisis de detección de *Salmonella spp.* en hisopados de superficies en contacto directo con alimentos. Se determinará el costo de implementación y el tiempo en que se obtienen los resultados con la tecnología qPCR y se comparará con el costo de implementación y tiempo requerido para obtener resultados cuando se utiliza una metodología de referencia y una metodología rápida.

Los resultados mostrarán los beneficios que una empresa que elabora mezclas de harinas para consumo puede obtener al implementar tecnología qPCR para la detección de *Salmonella* en superficies de contacto directo, lo cual puede beneficiar también a todas las empresas de alimentos que tienen implementados protocolos de retención de producto terminado a la espera de resultados de análisis de *Salmonella*. Así mismo, los datos mostrarán que los resultados obtenidos con la tecnología qPCR son similares a los obtenidos con el método tradicional BAM y el método rápido *Rapid Check*.

La importancia de esta investigación radica en que se dará a conocer una tecnología poco utilizada por los laboratorios de análisis en Guatemala. Cada año son más las empresas de alimentos que realizan muestreos para detección de *Salmonella* en superficies por lo que el conocimiento de nuevas tecnologías que permitan incrementar la productividad en sus operaciones es importante.

5. OBJETIVOS

5.1. General

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

5.2. Específicos

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

6. NECESIDADES POR CUBRIR Y ESQUEMA DE SOLUCIÓN

La industria de Alimentos en Guatemala no ha aprovechado el uso de tecnología qPCR para la detección de patógenos en superficies y alimentos, debido a la falta de conocimiento en la aplicación de esta tecnología en los laboratorios de análisis. La tecnología qPCR puede ser utilizada como una alternativa a los métodos tradicionales de ensayo para detección de patógenos debido a la facilidad operativa de uso y su alta confiabilidad.

Se propondrá un método de ensayo que utiliza la tecnología qPCR para la detección de *Salmonella spp.* el cual sea rápido y confiable. El método propuesto se podrá utilizar para el análisis en superficies de contacto directo y puede ser aplicado en la industria de alimentos en general ya que su metodología de análisis así lo permite.

La aplicación del método qPCR es relativamente desconocida en los laboratorios que realizan análisis de *Salmonella* en superficies y alimentos. Existe una tendencia en las empresas de alimentos en reducir el tiempo para obtener resultados de ensayos microbiológicos ya que impacta en retención de producto terminado por lo que esta tecnología puede ser de gran interés a la industria de alimentos.

El método propuesto brindará una solución innovadora a las empresas de alimentos en el mercado local, ya que permite reducir el tiempo para obtener resultados, optimizando los tiempos de liberación de producto terminado y brindando resultados confiables.

7. MARCO TEÓRICO

7.1. Generalidades de la *Salmonella*

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

7.1.1. 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 (Hammack, 2012).

7.1.2. 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. enterica subsp. salamae (II)	505	Animales de sangre fría y caliente
S. entérica subsp. arizonae (IIIa)	99	Animales de sangre fría y caliente
S. enterica subsp. diarizonae (IIIb)	336	Animales de sangre fría y caliente
S. enterica subsp. diarizonae (IIIb)	73	Animales de sangre fría y caliente
S. enterica subsp. indica (VI)	13	Animales de sangre fría y caliente
S. enterica subsp. indica (VI)	22	Animales de sangre fría y caliente
Total	2,579	

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

7.1.3. Patogenicidad

Según Sakugawa, Bezerra, Castro, Lima, Fireman y De Lima (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 Paratyph* 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).

7.1.4. 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.

7.2. Métodos de detección de *Salmonella spp*

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

7.2.1. Métodos de cultivo estándar o tradicionales

“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. 1927)

7.2.2. 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.

7.3. Métodos serológicos

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.

7.3.1. 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)

7.3.2. 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. (Koczula y Gallotta, 2016, p. 112)

Para Koczula y Gallotta (2016):

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)

7.4. 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.

7.4.1. 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)

7.4.2. 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 molecular Beacon. (Maurer, 2011, p. 262)

7.5. 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 Kusumaningrum *et. al.* (2003), 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.

7.5.1. 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 el mismo. 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)

7.5.2. Zonificación y muestreo

Para Beuchat, Komitopoulou, Beckers, Betts, Bourdichon, Fanning, Joosten y Ter (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. vigilancia. 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.

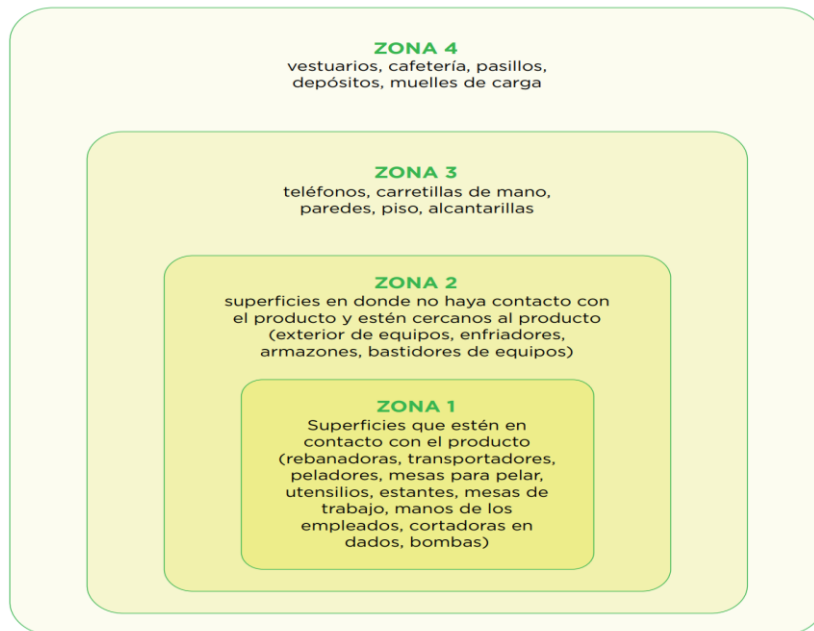
Dependiendo del tipo de producción, el muestreo puede enfocarse en las zonas de higiene básica y media donde es más probable que se detecte al ingresar por primera vez a la instalación, mejorando así la vigilancia proactiva. El muestreo en la zona de alta higiene confirma la relevancia del programa de 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>.

7.5.3. **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/o 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

8. PROPUESTA DE ÍNDICE DE CONTENIDOS

ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE DE ILUSTRACIONES

LISTA DE SÍMBOLOS

GLOSARIO

RESUMEN

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

OBJETIVOS

RESUMEN DEL MARCO TEÓRICO

INTRODUCCIÓN

1. MARCO TEÓRICO

1.1. Generalidades de *Salmonella*

1.1.1. Características

1.1.2. Clasificación

1.1.3. Patogenicidad

1.1.4. Prevención y control

1.2. Métodos de detección de *Salmonella spp*

1.2.1. Métodos de cultivo estándar o tradicionales

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

1.3. Métodos serológicos

1.3.1. Ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA)

1.3.2. Ensayo de flujo lateral

1.4. Métodos basados en ácidos nucleicos

1.4.1. Reacción en cadena de la polimerasa

- 1.4.2. Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (qPCR)
- 1.5. Monitoreo de *Salmonella* en superficies
 - 1.5.1. Programa de monitoreo ambiental en plantas de alimentos de baja humedad
 - 1.5.2. Zonificación y muestreo
- 2. MUESTREO Y ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO
 - 2.1. Toma de muestras
 - 2.2. Análisis microbiológico de *Salmonella* por método BAM, capítulo 5
 - 2.3. Análisis microbiológico método RapidChek SELECT *Salmonella*
 - 2.4. Análisis microbiológico método MEMP-qPCR para detección de *Salmonella*
- 3. ANÁLISIS DE COSTO
 - 3.1. Costo de implementación de cada metodología
- 4. PRESENTACIÓN DE RESULTADOS
- 5. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

CONCLUSIONES

RECOMENDACIONES

REFERENCIAS

APÉNDICES

ANEXOS

9. METODOLOGÍA

9.1. Tipo de estudio

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 comparará con dos métodos de detección utilizados en la industria de alimentos.

9.2. Diseño de investigación

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

9.3. Variables del estudio

En la tabla III, se presenta la descripción de las variables que serán evaluadas en el presente estudio.

Tabla III. Descripción de variables

Variables	Definición conceptual	Definición operacional
Tiempo	Período determinado durante el que se realiza una acción o se obtiene un resultado	Se medirá en horas, desde el inicio del ensayo hasta el momento en que se obtienen resultados.
Presencia / Ausencia de <i>Salmonella</i>	Se refiere a la detección o no de la bacteria objetivo	Se documentará si el método detectó (presencia) o no detectó (ausencia) <i>Salmonella spp</i> en la muestra analizada.
Costo	Cantidad de dinero que se va a pagar por algo	Costo necesario para implementar y realizar los ensayos utilizando cada metodología, tomando en cuenta equipos, insumos, mano de obra.

Fuente: elaboración propia, empleando Microsoft Excel.

9.4. Fase 1: Exploración bibliográfica

Se hará una exploración general sobre *Salmonella*, sus características, patogenicidad y clasificación. La exploración abordará el programa de monitoreo ambiental en plantas de alimentos de baja humedad como herramienta para el control de patógenos en la industria de alimentos, así como los diferentes métodos para la detección de *Salmonella* en alimentos y en los ambientes de producción.

9.5. Fase 2: Muestreo

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

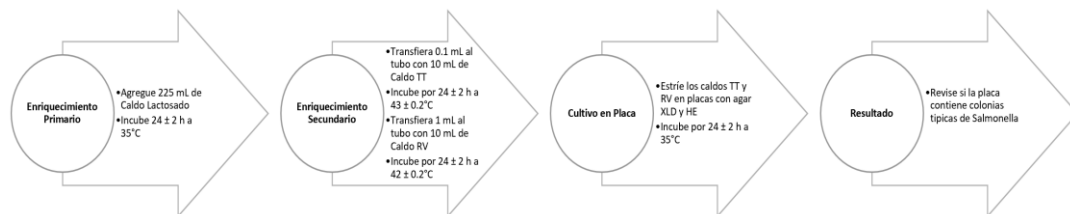
9.6. Fase 3: Análisis microbiológico

- Método para detección de *Salmonella* según FDA, capítulo 5 del *Bacteriological Analytical Manual*

Los análisis serán realizados por el laboratorio de análisis fisicoquímico y microbiológico (LAFYM), de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia de la Universidad de San Carlos de Guatemala.

La figura 2 muestra los pasos de enriquecimiento y obtención de resultados según el capítulo 5 del *Bacteriological Analytical Manual*.

Figura 2. Diagrama de flujo método FDA para detección de *Salmonella*, capítulo 5



Fuente: elaboración propia, empleando Microsoft Word.

- Método rápido para detección de *Salmonella RapidChek SELECT Salmonella Test System*: Instrucciones acorde al inserto del kit
 - Preparación de los medios primarios

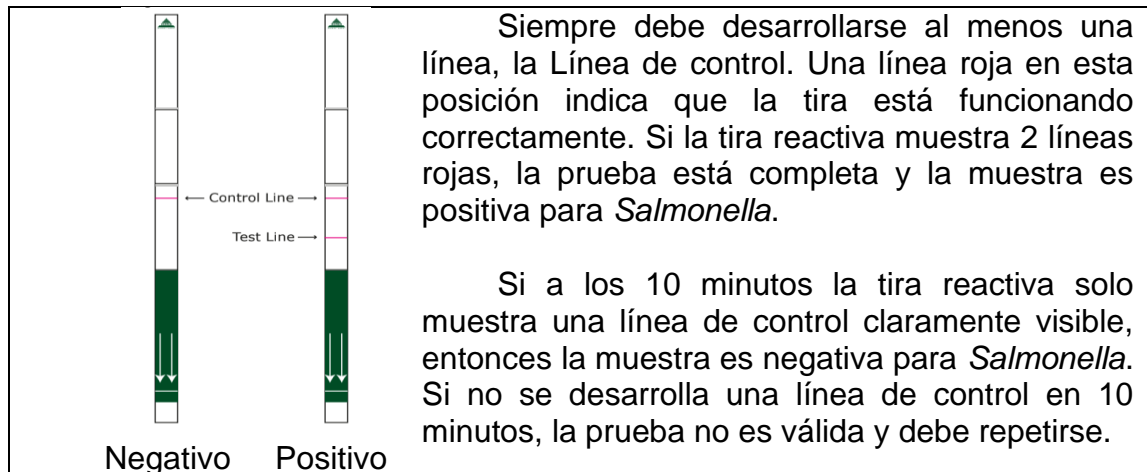
- Pese 20.0 ± 0.2 g de *RapidChek SELECT Salmonella Primary Media* y agregue a 1 litro de agua desionizada. Agitar vigorosamente hasta que se disuelva el medio.
 - Autoclave durante 15 minutos a $121\text{ }^{\circ}\text{C}$ o esterilice con filtro (tamaño de poro de $0.2\text{ }\mu\text{m}$) los medios rehidratados.
 - Alternativamente, rehidrate los medios en un litro de agua esterilizada y desionizada. De esta manera, los medios rehidratados deben usarse dentro de las 3 horas de la preparación. Para obtener los mejores resultados, use los medios tan pronto como esté preparado.
 - Justo antes de usar: agregue 10 ml de suplemento por 1 litro de medio base. Agite para mezclar. Usar dentro de las 3 horas de preparación.
- Preparación de los medios secundarios
 - Pese 7.4 ± 0.2 g de *RapidChek SELECT Salmonella Secondary Media* y agregue a 100 ml de agua desionizada. Agitar vigorosamente hasta que se disuelva el medio.
 - Poner a hervir mientras revuelves. Después de hervir, los medios se pueden almacenar durante 2 semanas a $2 - 8\text{ }^{\circ}\text{C}$.
 - Método alternativo: En lugar de hervir el medio, agregue 7.4 gramos de medio a 100 ml de agua desionizada estéril. De esta manera, los medios rehidratados deben usarse dentro

de las 3 horas de la preparación. Para obtener los mejores resultados, use los medios tan pronto como esté preparado.

- Dispense 1 ml por muestra analizada de los medios secundarios *RapidChek SELECT* preparados en los tubos suministrados. Se necesita un tubo por enriquecimiento probado.
- Enriquecimiento
 - Pre humedezca un hisopo con punta de algodón estéril (*Fisher Scientific*) con caldo DE u otro tampón neutralizante.
 - Muestre un cuadrado de una pulgada de la superficie frotando el hisopo en un movimiento hacia atrás y hacia adelante durante 30 segundos.
 - Coloque el hisopo en una bolsa o tubo estéril para transportarlo al laboratorio o para enriquecer la muestra.
 - Agregue 10 ml de *RapidChek SELECT Salmonella Primary Media* con suplemento. Asegúrese de que el medio cubra completamente la punta del hisopo.
 - Coloque la bolsa de muestra en un dispositivo *Stomacher* y el estómago durante 30 segundos, dé un masaje a mano en la parte inferior de la bolsa o agite el tubo con un vórtice.

- Cierre la bolsa sin apretar e incube durante 16 a 22 horas a 42 ± 2 °C.
 - Transfiera 0.1 ml de muestra enriquecida a un tubo que contenga 1.0 ml de *RapidChek SELECT Secondary Media*.
 - Cubra ligeramente los tubos y vuelva a la incubadora a 42 °C e incube durante 6 a 8 horas adicionales. Después de la incubación agitar suavemente los tubos.
 - Continúe con el procedimiento de detección de *Salmonella RapidChek SELECT*.
- Procedimiento de detección de *Salmonella RapidCheck SELECT*
- Retire el número requerido de tiras reactivas del recipiente e inserte la tira con las flechas hacia abajo en el tubo.
 - Deje que la tira se desarrolle durante 10 minutos.
 - La aparición de una línea roja (control) en la tira indica un resultado negativo.
 - La aparición de dos líneas rojas en la tira indica un resultado positivo.
 - Utilice la figura 3 como referencia de un resultado positivo / negativo.

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.*

- Método MEMP-qPCR para detección de *Salmonella*: Instrucciones acorde al inserto del kit
 - Preparación de muestras ambientales de superficies
 - Hidrate el hisopo estéril con la solución neutralizante y de recuperación.
 - Hisope la superficie a ser analizada con un lado del hisopo en dirección horizontal (aproximadamente 1 pulgada) y con el otro lado del hisopo en dirección vertical (aproximadamente 1 pulgada), una vez hacia adelante y una vez hacia atrás cubriendo toda el área.

- Abra el tubo para muestras de hisopado con la solución de extracción y coloque dentro el hisopo. Rote varias veces el hisopo dentro de la solución de extracción para suspender cualquier célula en la solución.
- Con el hisopo sumergido en la solución de extracción, quiebre el hisopo dentro del tubo para muestras a 30 mm del borde y cierre el tubo.
- Si no se procede con el ensayo dentro de 2 a 3 horas, el hisopado se puede mantener en refrigeración hasta por 30 horas.
- Preparación del ensayo
 - Después de colocar el hisopo en la solución de extracción proceda con el protocolo de Lisis.
 - La configuración del qPCR y el ingreso de datos deben completarse antes de transferir las muestras.
- Prepare el equipo
 - Encienda y programe un bloque de calentamiento a 37 ± 2 °C. Verifique la temperatura con un termómetro calibrado.
 - Encienda y programe el segundo bloque de calentamiento a 95 ± 3 °C. Verifique la temperatura con un termómetro calibrado.

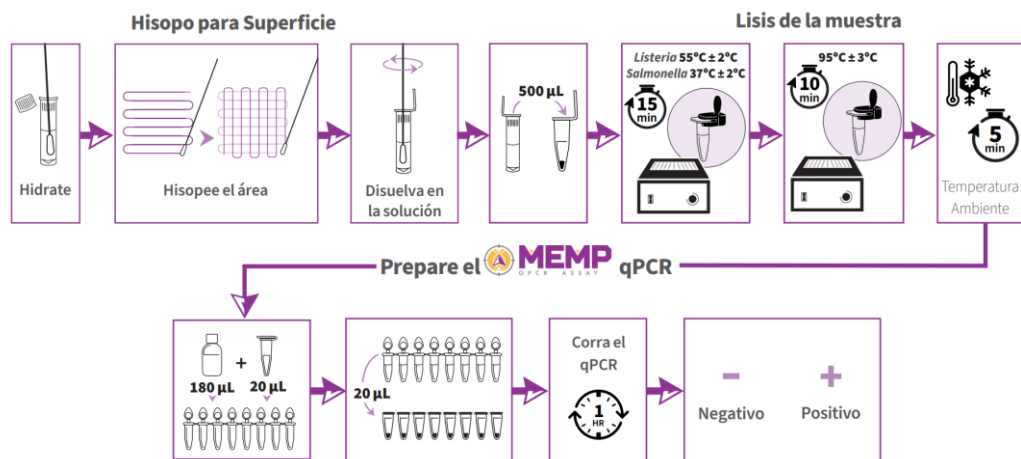
- Encienda el instrumento qPCR y cree el archivo de ejecución desde la plantilla MEMP-qPCR. La plantilla MEMP-qPCR contiene el ciclo requerido.
- Protocolo de Lisis
 - Identifique los tubos de lisis correspondientes a las muestras.
 - Asépticamente pipetee 500 μ L de la solución de extracción y coloque dentro del tubo de lisis y cierre el tubo. Guarde / retenga el remanente de la solución de extracción con el hisopo para confirmación.
 - Agite o mezcle la muestra para hidrolizar el pellet.
 - Coloque los tubos de lisis en el bloque de calentamiento e incube a 37 ± 2 °C por 15 minutos.
 - Coloque los tubos de lisis en el segundo bloque de calentamiento e incube a 95 ± 3 °C por 10 minutos.
 - Retire los tubos de lisis del bloque de calentamiento y deje enfriar a temperatura ambiente por 5 minutos.
 - Proceda inmediatamente con el ensayo o almacene en refrigeración (2-8 °C) hasta por 48 horas antes de proceder con el ensayo MEMP Salmonella.

- Organice los tubos de resuspensión y abra asépticamente las tapas.
- Pipetee 180 μL de la solución de resuspensión en los tubos de resuspensión.
- Pipetee 20 μL del lisado en los tubos de resuspensión.
- Configuración del ensayo MEMP
 - Organice las tiras de tubos de PCR de acuerdo con su archivo de ejecución.
 - Con precaución, retire las tapas de la tira de tubos.
 - Pipetee 20 μL de lisado en los tubos de las tiras para PCR, asegúrese que el pellet esté hidratado. Los pellets para PCR deben hidratarse y sellarse dentro de 10 minutos después de la apertura de las tapas de los tubos para PCR.
 - Coloque las tapas en cada tubo y presione hacia abajo para sellar cada tapa.
 - Asegúrese de que cada tapa esté bien asegurada antes de ejecutar la prueba.
 - Si hay burbujas de aire, mueva cuidadosamente los tubos de reacción hasta que no queden burbujas de aire.

- Gire brevemente los tubos de reacción en una mini centrífuga.
- Coloque los tubos en el instrumento qPCR e inicie el ensayo.

En la figura 4 se muestra el flujo de trabajo para los ensayos MEMP.

Figura 4. **Procedimiento de los ensayos MEMP**



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

- Interpretación de resultados del ensayo MEMP

Una vez que se complete el ensayo MEMP, el software analiza los datos automáticamente. El software analiza cualquier dato de amplificación de ADN y mostrará un valor Cq para cualquier muestra que se amplifique. La amplificación en el canal FAM indica *Salmonella*. Un valor Cq que tenga una curva sigmoideal típica o el inicio de la curva se considera positivo para el objetivo. Cuando no se obtiene un valor Cq, el resultado es negativo para el objetivo siempre que haya

un valor Cq presente en el canal CAL *Fluor Red 610* para el IAC (control interno de amplificación).

9.7. Fase 4: Comparativo de métodos de análisis

Se mostrarán los resultados de la medición de tiempo requerido en que se obtienen resultados de análisis para cada metodología, así como el comparativo de los resultados obtenidos para cada muestra analizada.

En la tabla IV, se presenta el formato en donde se documentará el tiempo requerido para brindar resultados para cada una de las metodologías evaluadas.

Tabla IV. **Resultados de tiempo requerido para obtención de resultados de hisopados de superficies**

Método	Tiempo
FDA-BAM, capítulo 5	XXX horas
<i>RapidChek SELECT Salmonella Test System</i>	XXX horas
MEMP-qPCR para detección de <i>Salmonella</i>	XXX horas

Fuente: elaboración propia, empleando Microsoft Excel.

En la tabla V se presenta el formato en donde se documentarán los resultados obtenidos para cada muestra evaluada en cada una de las metodologías evaluadas. Dentro del listado de muestras a analizar se incluirá una muestra blanco, la cual corresponde a un hisopo sin utilizar. Se incluirán dos controles positivos los cuales corresponden a cepas de *Salmonella* previamente enriquecidas y recuperadas en placa.

Tabla V. **Resultados de análisis de *Salmonella* en muestras de hisopados de superficies de contacto directo con alimentos**

Método	FDA-BAM, capítulo 5	RapidChek SELECT <i>Salmonella</i>	MEMP-qPCR para <i>Salmonella</i>
Muestra #1	XXXX	XXXX	XXXX
Muestra #2	XXXX	XXXX	XXXX
Muestra #3	XXXX	XXXX	XXXX
Muestra #4	XXXX	XXXX	XXXX
Muestra #5	XXXX	XXXX	XXXX
Muestra #6	XXXX	XXXX	XXXX
Muestra #7	XXXX	XXXX	XXXX
Muestra #8	XXXX	XXXX	XXXX
Muestra #9	XXXX	XXXX	XXXX
Blanco	XXXX	XXXX	XXXX
Muestra positiva #1	XXXX	XXXX	XXXX
Muestra positiva #2	XXXX	XXXX	XXXX

Fuente: elaboración propia, empleando Microsoft Excel.

9.8. Fase 5: Análisis de costo

El análisis de costo incluye el detalle de costo de equipos, materiales y recursos necesarios para la correcta implementación de cada metodología en un laboratorio de análisis microbiológico de alimentos.

En la tabla VI, se presenta la lista de equipos requeridos en cada metodología y su costo en base a cotizaciones recolectadas de las diferentes casas comerciales.

Tabla VI. **Lista de equipos requerido por metodología y su costo**

Método	FDA-BAM, capítulo 5	RapidChek SELECT Salmonella	MEMP-qPCR para Salmonella
Tubos de ensayo de 10 mL	Q 0.00	N/A	N/A
Incubador a 35 °C	Q 0.00	N/A	N/A
Baño térmico a 49 ± 1 °C	Q 0.00	Q 0.00	N/A
Autoclave	Q 0.00	Q 0.00	N/A
Frascos para autoclave de 1 L	Q 0.00	Q 0.00	N/A
Balanza	Q 0.00	Q 0.00	N/A
Probeta de 100 mL	Q 0.00	Q 0.00	N/A
Incubador a 42 °C	Q 0.00	Q 0.00	N/A
Refrigerador a 4 ± 2 °C	Q 0.00	Q 0.00	Q 0.00
Pipeta monocal de 1,000 µL	Q 0.00	Q 0.00	Q 0.00
Pipeta monocal de 200 µL	N/A	N/A	Q 0.00
Pipeta monocal de 20 µL	N/A	N/A	Q 0.00
Rack para tubos de 1.5 mL	N/A	N/A	Q 0.00
Rack para tubos de 0.1 mL	N/A	N/A	Q 0.00
Bloque de calentamiento	N/A	N/A	Q 0.00
Termociclador qPCR	N/A	N/A	Q 0.00
Laptop	N/A	N/A	Q 0.00
SUMA	Q 0.00	Q 0.00	Q 0.00

Fuente: elaboración propia, empleando Microsoft Excel.

En la tabla VII, se presenta la lista de materiales requeridos en cada metodología y su costo en base a cotizaciones recolectadas de las diferentes casas comerciales.

Tabla VII. **Lista de materiales requeridos por metodología y su costo por análisis**

Método	FDA-BAM, capítulo 5	RapidChek SELECT Salmonella	MEMP-qPCR para <i>Salmonella</i>
Caldo Lactosado	Q 0.00	N/A	N/A
Caldo D/E	Q 0.00	N/A	N/A
Medio Rappaport-Vassiliadis	Q 0.00	N/A	N/A
Caldo tetrionato	Q 0.00	N/A	N/A
Agar bismuto sulfito	Q 0.00	N/A	N/A
Agar xylose lisina desoxycholate	Q 0.00	N/A	N/A
Agar entérico Hektoen	Q 0.00	N/A	N/A
Asa microbiológica	Q 0.00	N/A	N/A
Cajas Petri	Q 0.00	N/A	N/A
Agua estéril, 1 Litro	Q 0.00	Q 0.00	N/A
Bolsas estériles de 18 onzas	Q 0.00	Q 0.00	N/A
Tips para pipeta de 1,000 µL	Q 0.00	Q 0.00	Q 0.00
Kit <i>RapidChek SELECT Salmonella</i>	N/A	Q 0.00	N/A
Kit MEMP-qPCR para <i>Salmonella</i>	N/A	N/A	Q 0.00
Swabbing kit MEMP qPCR	N/A	N/A	Q 0.00
Tips para pipeta de 200 µL	N/A	N/A	Q 0.00
Tips para pipeta de 20 µL	N/A	N/A	Q 0.00
SUMA	Q 0.00	Q 0.00	Q 0.00

Fuente: elaboración propia, empleando Microsoft Excel.

9.9. Fase 6: Presentación y discusión de resultados

En base al análisis presentado en las fases anteriores se procederá a discutir los resultados obtenidos.

10. TÉCNICAS DE ANÁLISIS DE LA INFORMACIÓN

Para el análisis de la información se utilizan las siguientes herramientas para su recolección y posteriormente los resultados obtenidos se analizan en forma comparativa entre las 3 diferentes metodologías de análisis utilizadas.

- Lista de herramientas de recolección:
 - Listado de puntos de muestreo
 - Tabla para registro de toma de tiempos
 - Tabla para registro de resultados de análisis de *Salmonella*
 - Tabla para registro de costo de equipos e insumos requeridos

- Lista de herramientas de estadística descriptiva
 - Comparativo de tiempo requerido en obtener resultados por método
 - Comparativo de resultados de análisis de cada muestra evaluada por método
 - Comparativo de costo de equipos e insumos por método

11. CRONOGRAMA

A continuación, se presenta en la tabla IX, un cronograma de la ejecución de la investigación a desarrollar. Este se presenta de acuerdo con las fases definidas en la metodología.

Tabla VIII. **Cronograma de la investigación**

Actividad	2022																								
	Enero			Febrero			Marzo			Abril			Mayo			Junio									
Fase 1: Exploración bibliográfica	■	■	■																						
Fase 2: Muestreo				■																					
Fase 3: Análisis microbiológico				■	■																				
Fase 4: Comparativo de métodos de análisis							■	■																	
Fase 5: Análisis de costo									■	■	■	■	■												
Fase 6: Presentación y discusión de resultados																						■	■	■	■

Fuente: elaboración propia, empleando Microsoft Excel.

12. FACTIBILIDAD DEL ESTUDIO

Los hisopados de superficies para el estudio se realizarán en una planta de mezcla de harinas ubicada en Santa Catarina Pinula. Los análisis microbiológicos se llevarán a cabo en las instalaciones del laboratorio de análisis fisicoquímico y microbiológico (LAFYM), de la facultad de ciencias químicas y farmacia de la Universidad de San Carlos de Guatemala. Se cuenta con el permiso para realizar los ensayos y evaluaciones.

A continuación, en la tabla IX se presenta un detalle de los gastos que se proyectan para la realización del estudio.

Tabla IX. **Gastos del estudio**

Rubro	Costo	Observación
Asesor	Q 2,500.00	
Kits de prueba	Q 6,000.00	Método MEMP y Método Rápido
Consumibles de laboratorio	Q 2,500.00	Puntas de pipeta, tubos y micropipetas
Análisis microbiológico	Q 1,800.00	Método BAM
Papelería	Q 100.00	
TOTAL	Q 12,900.00	

Fuente: elaboración propia, empleado Microsoft Excel.

Los gastos serán sufragados en su totalidad por el estudiante. Dado que la cantidad es asequible, la realización de estudio es posible.

13. 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., Komitopoullou, 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.

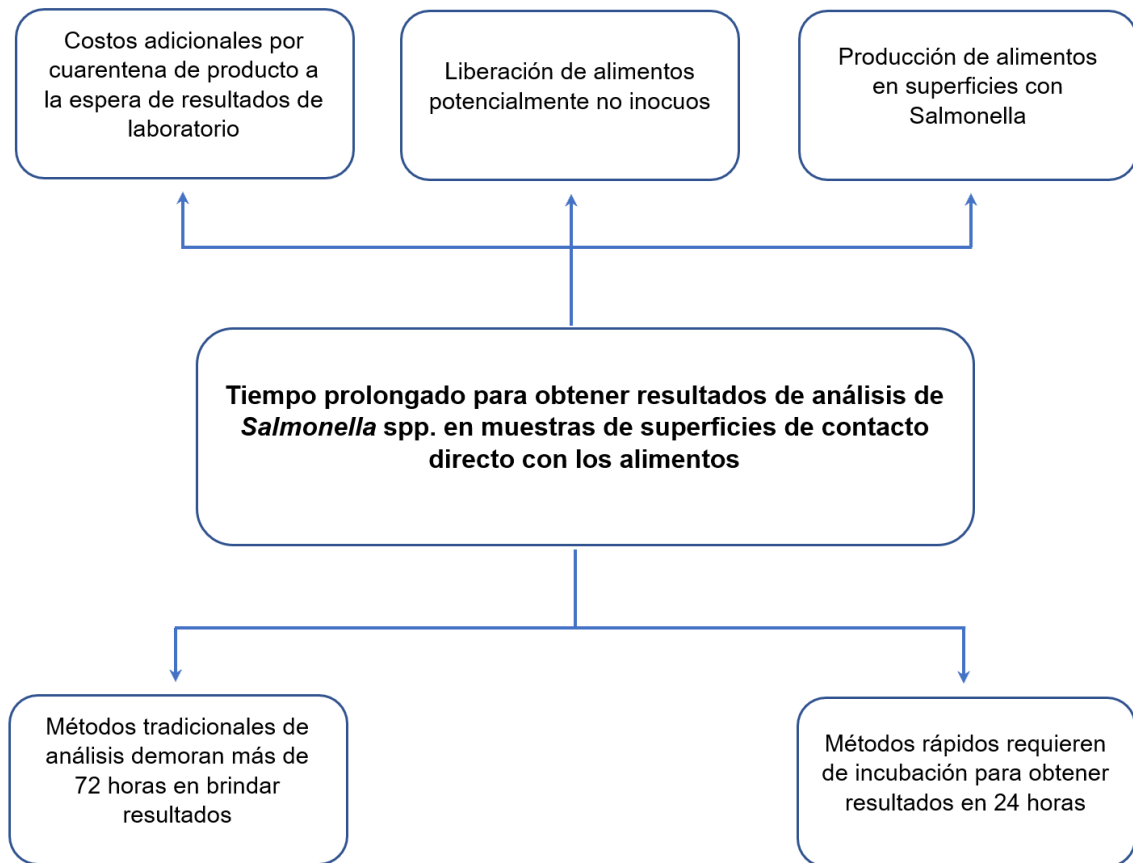
18. Palomino, C. y González, Y. (julio, 2014). Técnicas moleculares para la detección e identificación de patógenos en alimentos: ventajas y limitaciones. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Publica*, 31(3), 535-543.
19. Podolak, R., Enache, E., Stone, W., Black, D. G. y Elliott, P. (octubre, 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 Colectiva*, 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. Department of Health and Human Services. (28 de marzo, 2018). [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.

14. APÉNDICES

Apéndice 1. **Árbol del problema**



Fuente: elaboración propia, empleando Microsoft Word.

Apéndice 2. Matriz de coherencia

Problema	Objetivos	Variables	Metodología	Plan de acción
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		Muestreo de superficies	Selección de puntos de muestreo (1 día)
1. ¿En cuánto tiempo se obtienen los resultados de análisis de <i>Salmonella</i> con la tecnología qPCR en superficies de zona 1?	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.	<ul style="list-style-type: none"> • Tiempo • <i>Salmonella</i> spp 	Análisis microbiológico de las 3 metodologías en laboratorio: <ul style="list-style-type: none"> • MEMP qPCR para <i>Salmonella</i> • Método (FDA/CFSSAN, BAM Capítulo 5) • Método rápido de flujo lateral de Romer labs 	Toma de muestras (1 día) Realizar análisis microbiológico de muestras utilizando las 3 metodologías (5 días) Realizar medición de tiempos para obtener resultados para las 3 metodologías (5 días)
2. ¿Los resultados obtenidos con tecnología qPCR coincidirán con el método tradicional BAM?	2. Comparar los resultados obtenidos con tecnología qPCR con el método tradicional BAM y un método rápido.	Resultado microbiológico o de la muestra Presencia/Ausencia de <i>Salmonella</i>	Medición de tiempo Tabla comparativa con resultados obtenidos en cada metodología	Ordenar y estructurar los resultados obtenidos (1 día)
3. ¿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> ?	3. Determinar el costo de implementación de la tecnología qPCR, el método tradicional BAM y un método rápido para la detección de <i>Salmonella</i> .	Cantidad de dinero necesario	Análisis comparativo de costo de implementación de cada metodología	Realizar exploración de mercado y determinar costo de equipos y reactivos para cada metodología (10 días) Realizar cuadro comparativo con los costos determinados (1 día)

Fuente: elaboración propia, empleando Microsoft Word.

15. ANEXO

Anexo 1. Sistema qPCR para kits MEMP



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

