



FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS

ESCUELA DE BIOQUÍMICA Y FARMACIA

**DETERMINACIÓN DE *Salmonella spp* EN MATERIA PRIMA CÁRNICA DE LA
EMPRESA ITALIMENTOS MEDIANTE LA TÉCNICA VISUAL INMUNOENSAYO
TECRA *SALMONELLA VIA***

Autores:

Lourdes Rocío Paucar Sánchez

Juan Carlos Tenecora Quito

Tesis previa a la obtención del título de Bioquímico Farmacéutico

Directora:

Dra. Mariana Elizabeth Saá Cruz

Cuenca-Ecuador

2013

RESUMEN

Muchas especies de *Salmonella* son consideradas patógenas para los seres humanos, siendo responsables de múltiples infecciones del tracto gastrointestinal.

Por tal razón el objetivo principal de esta investigación es determinar la presencia o ausencia de *Salmonella spp* en canales de carne de cerdo, res y pollos, y como complemento evaluar la eficacia de la mezcla de ácidos orgánicos utilizados para disminuir la carga microbiana de la materia prima cárnica.

La presente investigación es de tipo descriptivo, prospectivo, de diseño no experimental.

Este estudio fue realizado en la empresa ITALIMENTOS ubicada en la ciudad de Cuenca, para ello se analizó 45 muestras obtenidas de manera aleatoria de diferentes canales res, cerdo y pollo que ingresan a la empresa de los distintos proveedores. Para el cálculo del tamaño de la muestra se utilizó la tabla Militar Estándar; para canales de res y cerdo se utilizó el nivel de inspección general (Nivel II) y para las canales de pollo se utilizó el nivel de inspección riguroso (Nivel S4). Las muestras se procesaron durante 6 semanas.

Para la determinación de *Salmonella spp* en las diferentes canales se llevó a cabo un pre-enriquecimiento de la muestra en caldo lactosa, un enriquecimiento selectivo en caldo rappaport vassiliadis (RV [R10]), un post-enriquecimiento en caldo M, luego se procedió a realizar la determinación de *Salmonella spp* mediante la técnica visual inmunoensayo Tecra *Salmonella* VIA.

Los resultados obtenidos fueron analizados en forma cualitativa y se encontró que el 100 % de las muestras analizadas presentan ausencia de *Salmonella spp*.

PALABRAS CLAVE: *Salmonella spp*, Tecra *Salmonella* VIA, Ácidos orgánicos.

ABSTRACT

Many species of *Salmonella* are considered human pathogens, responsible for multiple infections of the gastrointestinal tract.

For this reason, the main purpose of this investigation is to determine the presence or absence of *Salmonella* spp in channels pork, beef and chicken, and complementary to evaluate the efficacy of the mixture of organic acids used to lower the microbial load of the material meat raw.

This research is a descriptive, prospective, non-experimental design.

This study was conducted in ITALIMENTOS company located in the city of Cuenca, for it was analyzed 45 samples taken at random from different channels beef, pork and chicken entering the business from different vendors. To calculate the size of the sample, using the Military Standard table, for beef and pork channels used general inspection level (Level II) and chicken carcasses was used rigorous inspection level (Tier S4). Samples were processed for 6 weeks.

For the determination of *Salmonella* spp in different channels are carried out a pre-enrichment broth sample lactose, a selective enrichment in Rappaport Vassiliadis (RV [R10]), a post-enrichment broth M, then proceeded to make the determination by *Salmonella* spp visual immunoassay technique Tecra *Salmonella* VIA.

The results were qualitatively analyzed and found to be 100% of the samples analyzed no *Salmonella* spp.

KEYWORDS: *Salmonella* spp, Tecra *Salmonella* VIA, organic acids.



ÍNDICE GENERAL

	pág.
INTRODUCCIÓN.....	20
CAPITULO 1: MARCO TEÓRICO	
1.1 Carne.....	21
1.1.1 <i>Definición</i>	21
1.1.2 <i>Clasificación</i>	21
1.1.3 <i>Valor nutricional</i>	21
1.1.4 <i>Calidad de la carne</i>	22
1.1.5 Control microbiológico de las carnes.....	23
1.1.6 Vías de contaminación de la carne.....	24
1.1.6.1 <i>Matadero</i>	24
1.1.6.2 <i>Animal</i>	24
1.1.6.3 <i>Otras fuentes</i>	24
1.1.7 <i>Deterioro de las carnes</i>	25



1.1.7.1	<i>Degradación por microorganismos aerobios</i>	25
1.1.7.2	<i>Degradación por microorganismos anaerobios</i>	26
1.1.8	<i>Conservación de la carne</i>	27
1.1.8.1	<i>Refrigeración y congelación</i>	27
1.1.8.2	<i>Ácidos orgánicos</i>	27
1.2	<i>Salmonella</i>	29
1.2.1	<i>Características del genero Salmonella</i>	29
1.2.2	<i>Estructura antigénica</i>	29
1.2.2.1	<i>Antígeno O</i>	29
1.2.2.2	<i>Antígeno H</i>	29
1.2.2.3	<i>Antígeno Vi</i>	29
1.2.3	<i>Nomenclatura</i>	32
1.2.4	<i>Epidemiología</i>	32
1.2.5	<i>Comportamiento de Salmonella en carne</i>	34
1.2.6	<i>Síndrome de infección alimenticia por Salmonella</i>	35
1.2.7	<i>Control de las salmonelosis transmitidas por alimentos</i>	36
1.2.7.1	<i>Temperatura</i>	36
1.2.7.2	<i>pH</i>	37
1.2.7.3	<i>Potencial de óxido reducción</i>	38



1.2.7.4 Actividad de agua (a_w).....	38
1.2.7.5 Altas presiones.....	38
1.3 Métodos para de determinación de <i>Salmonella</i> en alimentos.....	39
1.3.1 Método de cultivo tradicional.....	39
1.3.1.1 Pre-enriquecimiento no selectivo.....	40
1.3.1.2 Enriquecimiento selectivo.....	40
1.3.1.3 Medios de cultivo selectivos y diferenciales.....	41
1.3.1.4 Confirmación Bioquímica.....	42
1.3.2 Pruebas rápidas para la investigación de <i>Salmonella</i>	43
1.3.2.1 Inmunoensayos.....	43
1.3.2.2 Inmunoprecipitación.....	44
1.3.2.3 Enzimoimmunoensayo (ELISA).....	44
1.3.2.4 Separación inmunomagnética (IMS).....	45
1.3.2.5 Sistemas de aglutinación en porta.....	45
1.3.2.6 Inmunodifusión.....	45

CAPITULO 2: MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Tipo y diseño de investigación.....	46
2.2 Población de estudio.....	46



2.3 Muestreo.....	47
2.4 Toma de muestra.....	49
2.4.1 Canales de res y cerdo.....	49
2.4.2 Canales de pollos.....	50
2.5 Recursos Materiales.....	51
2.6 Fundamento de la técnica visual inmunoensayo Tecra Salmonella VIA.....	52
2.6.1 ELISA sándwich para detectar Salmonella.....	53
2.7 Preparación de las muestras para el análisis.....	53
2.8 Métodos de enriquecimiento de las muestras.....	54
2.8.1 Etapa de pre-enriquecimiento.....	55
2.8.2 Etapa de enriquecimiento selectivo.....	56
2.8.3 Etapa de post-enriquecimiento.....	56
2.9 Procedimiento del análisis.....	58
2.10 Controles positivos para <i>Salmonella spp</i>	59

CAPITULO 3: RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 Determinación de <i>Salmonella spp</i> en las muestras de cortes finos de carne de res inoculadas intencionalmente con <i>Salmonella tiphymurium</i> (Controles positivos).....	60
3.1.1 <i>Salmonella spp</i> en los controles positivos (Sin adición de la mezcla de ácidos orgánicos).....	60



3.1.2 <i>Salmonella spp</i> en los controles positivos (Con adición de la mezcla de ácidos orgánicos)...	62
3.2 Determinación de <i>Salmonella spp</i> en las muestras de las canales de cerdo...	64
3.2.1 <i>Salmonella spp</i> en las muestras de las canales de cerdo antes del proceso de desinfección.....	64
3.2.2 <i>Salmonella spp</i> en las muestras de las canales de cerdo después del proceso de desinfección.....	66
3.3 Determinación de <i>Salmonella spp</i> en las muestras de las canales de res.....	68
3.3.1 <i>Salmonella spp</i> en las muestras de las canales de res antes del proceso de desinfección.....	68
3.3.2 <i>Salmonella spp</i> en las muestras de las canales de res después del proceso de desinfección.....	70
3.4 Determinación de <i>Salmonella spp</i> en canales de pollos.....	72
3.4.1 <i>Salmonella spp</i> en las muestras de las canales de pollos.....	72
4. CONCLUSIONES.....	74
5. RECOMENDACIONES.....	75
6. BIBLIOGRAFÍA.....	76
7. ANEXOS.....	80

ÍNDICE DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1: Cronograma de trabajo para la determinación de <i>Salmonella spp.</i>	52
Tabla 2: <i>Salmonella spp</i> en los controles positivos (Sin adición de la mezcla de ácidos orgánicos).....	64
Tabla 3: <i>Salmonella spp</i> en los controles positivos (Con adición de la mezcla de ácidos orgánicos).....	66
Tabla 4: <i>Salmonella spp</i> en las muestras de las canales de cerdo antes del proceso de desinfección.....	68
Tabla 5: <i>Salmonella spp</i> en las muestras de las canales de cerdo después del proceso de desinfección.....	70
Tabla 6: <i>Salmonella spp</i> en las muestras de las canales de res antes del proceso de desinfección.....	72
Tabla 7: <i>Salmonella spp</i> en las muestras de las canales de res después del proceso de desinfección.....	74
Tabla 8: <i>Salmonella spp</i> en las muestras de pollos.....	76

ÍNDICE DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1: Morfología de Salmonella spp.....	33
Figura 2. Lugares de muestreo para canales de res.....	53
Figura 3: Lugares de toma de muestra para canales de cerdo.....	54
Figura 4: Toma de muestra de pollos.....	54
Figura 5: Lavado y desinfección de canales de res y cerdo.....	58
Figura 6: Medios de cultivo para el enriquecimiento de la muestra.....	58
Figura 7: Caldo de pre-enriquecimiento [Caldo Lactosa].....	59
Figura 8: Caldo de enriquecimiento [Rappaport Vassidialis R10].....	60
Figura 9: Caldo de post-enriquecimiento [Caldo M].....	61
Figura 10: Esquema del procedimiento.....	62



INDICE DE GRÁFICOS

Gráfico 1: *Salmonella spp* en los controles positivos
(Sin adición de la mezcla de ácidos orgánicos).....65

Gráfico 2: *Salmonella spp* en los controles positivos
(Con adición de la mezcla de ácidos orgánicos).....67

Gráfico 3: *Salmonella spp* en las muestras de las canales de cerdo
antes del proceso de desinfección.....70

Gráfico 4: *Salmonella spp* en las muestras de las canales de cerdo
después del proceso de desinfección.....72

Gráfico 5: *Salmonella spp* en las muestras de las canales de res
antes del proceso de desinfección.....73

Gráfico 6: *Salmonella spp* en las muestras de las canales de res
después del proceso de desinfección.....75

Gráfico 7: *Salmonella spp* en las muestras de pollos.....77

ÍNDICE DE ANEXOS

ANEXO A: Norma NTE INEN 2346:2010.....84

ANEXO B: Tabla Militar Estándar.....85

ANEXO C: Tabla de enriquecimiento.....87

ANEXO D: Ficha técnica Caldo de Lactosa.....88

ANEXO E: Ficha técnica Caldo RV R10.....89

ANEXO F: Ficha técnica Caldo M.....90

ANEXO G: Ficha técnica Tecra *Salmonella* VIA (Visual Inmunoensayo).....94

ANEXO H: Certificado de la realización de la tesis en las instalaciones
de la Empresa ITALIMENTOS CIA LTDA.....97



UNIVERSIDAD DE CUENCA

Fundada en 1867

Yo, Juan Carlos Tenecora Quito, autor de la tesis "DETERMINACIÓN DE *Salmonella spp* EN MATERIA PRIMA CÁRNICA DE LA EMPRESA ITALIMENTOS MEDIANTE LA TÉCNICA VISUAL INMUNOENSAYO TECRA *SALMONELLA VIA*", reconozco y acepto el derecho de la Universidad de Cuenca, en base al Art. 5 literal c) de su Reglamento de Propiedad Intelectual, de publicar este trabajo por cualquier medio conocido o por conocer, al ser este requisito para la obtención de mi título de Bioquímico Farmacéutico. El uso que la Universidad de Cuenca hiciere de este trabajo, no implicará afección alguna de mis derechos morales o patrimoniales como autor.



Cuenca, 08 de Julio del 2013

Juan Carlos Tenecora Quito
0105784151

Cuenca Patrimonio Cultural de la Humanidad. Resolución de la UNESCO del 1 de diciembre de 1999

Av. 12 de Abril, Ciudadela Universitaria, Teléfono: 405 1000, Ext.: 1311, 1312, 1316
e-mail cdjbv@ucuenca.edu.ec casilla No. 1103

Cuenca - Ecuador



UNIVERSIDAD DE CUENCA

Fundada en 1867

Yo, Juan Carlos Tenecora Quito,, autor de la tesis "DETERMINACIÓN DE *Salmonella spp* EN MATERIA PRIMA CÁRNICA DE LA EMPRESA ITALIMENTOS MEDIANTE LA TÉCNICA VISUAL INMUNOENSAYO TECRA *SALMONELLA VIA*", certifico que todas las ideas, opiniones y contenidos expuestos en la presente investigación son de exclusiva responsabilidad de su autor/a.

Cuenca, 08 de Julio del 2013



Juan Carlos Tenecora Quito
0105784151

Cuenca Patrimonio Cultural de la Humanidad. Resolución de la UNESCO del 1 de diciembre de 1999

Av. 12 de Abril, Ciudadela Universitaria, Teléfono: 405 1000, Ext.: 1311, 1312, 1316
e-mail cdjbv@ucuenca.edu.ec casilla No. 1103

Cuenca - Ecuador

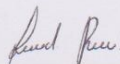


UNIVERSIDAD DE CUENCA

Fundada en 1867

Yo, Lourdes Rocío Paucar Sánchez, autora de la tesis "DETERMINACIÓN DE *Salmonella spp* EN MATERIA PRIMA CÁRNICA DE LA EMPRESA ITALIMENTOS MEDIANTE LA TÉCNICA VISUAL INMUNOENSAYO TECRA *SALMONELLA VIA*", reconozco y acepto el derecho de la Universidad de Cuenca, en base al Art. 5 literal c) de su Reglamento de Propiedad Intelectual, de publicar este trabajo por cualquier medio conocido o por conocer, al ser este requisito para la obtención de mi título de Bioquímico Farmacéutico. El uso que la Universidad de Cuenca hiciere de este trabajo, no implicará afección alguna de mis derechos morales o patrimoniales como autora.

Cuenca, 08 de Julio del 2013



Lourdes Rocío Paucar Sánchez
0104854211

Cuenca Patrimonio Cultural de la Humanidad. Resolución de la UNESCO del 1 de diciembre de 1999

Av. 12 de Abril, Ciudadela Universitaria, Teléfono: 405 1000, Ext.: 1311, 1312, 1316
e-mail cdjbv@ucuenca.edu.ec casilla No. 1103
Cuenca - Ecuador

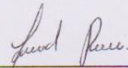


UNIVERSIDAD DE CUENCA

Fundada en 1867

Yo, Lourdes Rocío Paucar Sánchez, autora de la tesis "DETERMINACIÓN DE *Salmonella spp* EN MATERIA PRIMA CÁRNICA DE LA EMPRESA ITALIMENTOS MEDIANTE LA TÉCNICA VISUAL INMUNOENSAYO TECRA *SALMONELLA VIA*", certifico que todas las ideas, opiniones y contenidos expuestos en la presente investigación son de exclusiva responsabilidad de su autora.

Cuenca, 08 de Julio del 2013



Lourdes Rocío Paucar Sánchez
0104854211

Cuenca Patrimonio Cultural de la Humanidad. Resolución de la UNESCO del 1 de diciembre de 1999

Av. 12 de Abril, Ciudadela Universitaria, Teléfono: 405 1000, Ext.: 1311, 1312, 1316
e-mail cdjbv@ucuenca.edu.ec casilla No. 1103

Cuenca - Ecuador



DEDICATORIA

*Esta tesis le dedico a mi hijo
David por darme una sonrisa cada
día y fuerzas para seguir adelante
a mi Esposo Carlos por estar
siempre a mi lado a mi Madre
María gracias por el apoyo
brindado en todo momento a mi
Padre Luis que desde el cielo guía
mi camino y a todas las personas
que han influido en mi vida y me
han entregado su apoyo*

LOURDES

DEDICATORIA



A mis padres por brindarme su apoyo
incondicional desde el inicio de
mi carrera y ser ejemplo
de constancia y
superación.

A Dios por llenarme de bendiciones
cada día y por ser el guía
de mi vida

JUAN CARLOS



AGRADECIMIENTOS

Agradecemos:

Agradecemos infinitamente a Dios por la vida que nos concede y las oportunidades que nos ofrece.

A la Dra. Mariana Saá por sus invaluable conocimientos aportados para culminar el presente trabajo.

A la Dra. Diana Astudillo por su comprensión y paciencia.

A la Dra. Miriam Calle “Bioquímica de ITALIMENTOS CIA LTDA” nos brindó sus conocimientos y amistad.

Al Ing. Javier Moscoso “Jefe de Aseguramiento de Calidad de ITALIMENTOS CIA LTDA” por abrirnos las puertas de tan prestigiosa empresa para la realización de este trabajo de investigación.

Al Sr. Lautaro Jetón, Gerente General y Propietario de la Industria de “ITALIMENTOS CIA LTDA” por permitir la realización de esta tesis.

INTRODUCCIÓN

Salmonella es una bacteria Gram negativa patógena, causante de muchas infecciones del tracto gastrointestinal, las cuales causan un deterioro muy severo de la salud de las personas infectadas; para eliminar la infección los pacientes deben ser sometidos a un tratamiento largo con antibióticos de un alto costo económico. (1)

Salmonella produce una enfermedad conocida como salmonelosis, siendo los alimentos una importante vía de infección, principalmente la carne. Por lo expuesto se realizó la presente investigación para determinar la presencia de este microorganismo en la carne de res, cerdo y pollo en la empresa ITALIMENTOS CIA LTDA, que produce y comercializa productos cárnicos crudos, cocidos y ahumados, muy reconocidos en el mercado local, con expansión a nivel nacional.

ITALIMENTOS cuenta con un método de desinfección de las canales cárnicas compuesta por una mezcla de ácidos orgánicos al 2.5% que sirve para garantizar la inocuidad de la carne que es empleada en la elaboración de los distintos productos; por ello se realizó la determinación de *Salmonella* antes y después del proceso desinfección y con ello evaluar la eficacia de la mezcla de ácidos orgánicos empleada.

En la actualidad en la empresa ITALIMENTOS no se realiza la determinación de *Salmonella* en la materia prima cárnica, por cuanto los métodos tradicionales conllevan mucho tiempo de análisis y por esa razón se ha visto la necesidad de implementar una técnica rápida para detección de *Salmonella* con resultados confiables y reproducibles.



CAPÍTULO 1

1. MARCO TEÓRICO

1.1 CARNE

1.1.1 Definición. Según la legislación vigente en la Unión Europea, la carne se define como todas las partes aptas para el consumo humano de animales domésticos de las especies bovina, porcina, ovina, caprina y aviar; y como carnes frescas se consideran aquellas que no hayan sufrido ningún tratamiento más que el frío (incluidas las envasadas al vacío o en atmósfera modificada) con el fin de asegurar su conservación. (2)

1.1.2 Clasificación. La carne se clasifica en dos categorías o tipos, carne roja y carne blanca. Las carnes rojas son aquellas que provienen de bovinos, ovinos, caprinos y porcinos, mientras que las carnes blancas se refieren principalmente a carne de aves domésticas. (3)

1.1.3 Valor nutricional. La carne está compuesta por un 70,4% de agua, 20,8% de proteínas, 7,2% de grasa y 1,2% de sales minerales. La mayor importancia de las proteínas de los alimentos, es su función como materias constitutivas de los tejidos blandos del organismo, pero al mismo tiempo sirven también de fuente de energía. Son necesarias además para la formación de enzimas, hormonas y hemoglobina (proteína que da el color rojo de la sangre). Las grasas desempeñan una función triple en la nutrición; constituyen una fuente de energía y son además



portadoras de vitaminas liposolubles, así como de ácidos grasos esenciales. Las sustancias minerales participan de múltiples maneras en los procesos fisiológicos del organismo, actuando como catalizadores en varios procesos biológicos y ejerciendo una acción estimulante sobre la actividad de muchas enzimas. (4)

El consumo de carne y productos cárnicos contribuye fundamentalmente a la provisión de proteína, hierro, zinc, vitamina A y vitamina B. También contribuye a la incorporación frecuentemente demasiado elevada, de grasa, sodio, purinas y colesterol. Sin embargo, las cantidades de sodio, purinas y colesterol en la carne y productos cárnicos no presentan ningún riesgo adicional para la salud de las personas con un metabolismo sano y peso normal. (5)

1.1.4 Calidad de la carne. Calidad es un término complejo del que no existe una única definición que sea válida para todos los niveles de la producción cárnica. Todas las definiciones de la calidad de la carne implican características de composición de la canal como determinantes del valor en el mercado y las más recientes consideran sus propiedades nutritivas, organolépticas, tecnológicas e higiénicas sanitarias. (6)

La calidad organoléptica de la carne viene determinada por las propiedades de la misma que son percibidas por los sentidos como color, textura, jugosidad y sabor, que son los atributos de calidad más importantes en el momento del consumo. La obtención de estos parámetros de calidad está determinada por todos y cada uno de los eslabones que intervienen en la producción de la carne, como son el ganadero, el matadero, la comercialización y el consumidor. (7)

1.1.5 Control microbiológico de las carnes. La carne es uno de los alimentos más perecederos, debido a sus características de composición, pH y actividad acuosa (a_w); constituye un medio muy favorable para la mayor parte de las contaminaciones microbianas. La profundidad del músculo de un animal recién sacrificado contiene una flora muy escasa, del orden de un germen por gramo. Esta micro flora procede generalmente del intestino y es transportada al músculo por la sangre. La parte superficial de la carne, especialmente en la canal, está mucho más contaminada por una flora muy diversa, que depende de las condiciones higiénicas de la manipulación, así como del ambiente del matadero. (8)

La contaminación de la carne comienza durante el sacrificio, continúa en otras dependencias del matadero y lugares de venta para terminar en el hogar del consumidor. En el momento del sacrificio, algunos gérmenes pueden atravesar la barrera intestinal (por falta de un ayuno previo a la matanza, en el caso de animales fatigados o cuando se trata de animales enfermos), para llegar a los músculos por vía sanguínea. Durante el desuello, evisceración y despiece, resulta fácil la contaminación de las canales con gérmenes procedentes del intestino, suelo, ambiente o personas que manipulan las canales o las piezas de carne. (8)

La carne preparada adecuadamente también está sujeta a nuevas contaminaciones por los instrumentos utilizados en el despiece y otras manipulaciones. La contaminación en el frigorífico es muy importante, al entrar en contacto unas carnes con otras. En el caso de largos períodos de almacenamiento en frío, puede proliferar la contaminación psicrófila debida a cierta flora que incluso se puede desarrollar a temperaturas cercanas a los 0 °C. (8)

Prosigue la contaminación durante el transporte de canales o piezas de carne a los lugares de industrialización o de venta, donde puede seguir contaminándose durante su almacenamiento si las condiciones higiénicas son desfavorables. (8)

1.1.6 Vías de contaminación de la carne

1.1.6.1 Matadero

- Mala salud de los manipuladores.
- Falta de higiene de los manipuladores.
- Insectos y roedores. (8)

1.1.6.2 Animal

- **Piel:** (*Micrococcus*, *Pseudomonas* y otros gramnegativos, *Staphylococcus*, *Lactobacillus*).
- **Contenido intestinal:** (coliformes, *E. coli*, *Clostridium*, *Streptococcus* y, a veces *Salmonella*). (8)

1.1.6.3 Otras fuentes

En el almacenamiento y manipulación posterior hay gérmenes del suelo, aire, manipuladores y agua (*Pseudomonas*, *B. cereus*, *Cl. perfringens* y, a veces *Cl. Botulinum*, *Enterobacteriaceae*, *E. coli* *Salmonella*, *Staphylococcus*, *Sporotrichum*, *Mucor*, *Penicillium*, *Alternaria*, levaduras, entre otros). (8)



1.1.7 Deterioro de las carnes. En el proceso de maduración de la carne se pueden producir alteraciones como consecuencia de su degradación, según sus características físico químicas que son originadas por microorganismos: (8)

1.1.7.1 Degradación por microorganismos aerobios

- **Viscosidad:** Se manifiesta por la aparición de una capa viscosa, acompañada de un olor desagradable, cuando la tasa de gérmenes que causan la alteración sobrepasa la cifra de 10^7 gérmenes por centímetro cuadrado.
- **Decoloración:** Se debe a los fenómenos de oxidación.
- **Pigmentación:** Alteración producida por *Pseudomonas*.
- **Enranciamiento:** Alteración de la grasa producida por mohos y levaduras.
- **Enmohecimiento:** Se debe a la presencia de flora micótica variada.
- **Olores y sabores anormales:**
 - ✓ Olor y sabor agrio, por la producción de ácidos volátiles, al crecer bacterias y levaduras acidificantes.
 - ✓ Sabor a tierra, por crecimiento de actinomicetos.
 - ✓ Sabor a humedad, por crecimiento de mohos. (8)

1.1.7.2 Degradación por microorganismos anaerobios. Las alteraciones por microorganismos anaerobios se producen siempre y cuando haya condiciones anaerobias.

- **Agriado:** se debe a la presencia de ácidos volátiles y no volátiles, como consecuencia de la acción enzimática de la carne, procesos de fermentación microbiana y proteólisis microbiana. Se debe principalmente a varias especies de *Bacillus* y *Clostridium*.
- **Putrefacción:** Alteración que indica descomposición anaeróbica de las proteínas con formación de compuestos de olor nauseabundo (amoníaco, ácido sulfhídrico, indol, mercaptano, etc.). Las carnes que presentan esta alteración están repletas de gas, tienen un color gris-verdoso y despiden un olor desagradable. La alteración se presenta en carnes no refrigeradas o mal refrigeradas, puesto que las bacterias que la originan se inhiben a temperaturas inferiores a los 20 °C. Las carnes de pH superior a 6,2 son las más afectadas. Este fenómeno se debe principalmente a varias especies de *Proteus* y *Clostridium*.
- **Hueso hediondo:** Alteración que se caracteriza por la producción de un olor pútrido en las partes profundas de la carne, sobre todo cerca del hueso. La alteración se presenta por la mala refrigeración de carnes con pH elevado. Se debe principalmente a varias especies de *Clostridium*.

En la carne, además de los microorganismos propios de su alteración, se pueden encontrar gérmenes perjudiciales para la salud del hombre, procedentes de animales enfermos o de malas manipulaciones durante su preparación o industrialización: *Salmonella*, *Staphylococcus aureus*, *Yersinia enterocolitica*, *Campylobacter jejuni/coli*, *Listeria monocytogenes*, *Clostridium perfringens*, *Clostridium botulinum*. (8)



1.1.8 Conservación de la carne. Los cambios que determinan la pérdida de calidad de la carne son de todos los tipos, tanto físicos, químicos y microbiológicos, pero los que revisten mayor gravedad y se producen más rápidamente son los microbiológicos. Por esto una vez obtenida la canal debe inmediatamente aplicarse un método de conservación que permita prolongar el tiempo de vida útil del producto, posibilitando el mayor aprovechamiento del mismo. (9)

1.1.8.1 Refrigeración y congelación. La carne es un producto fácilmente alterable, por lo que resulta necesario que todas las manipulaciones posteriores al sacrificio se realicen en un ambiente refrigerado. Con la refrigeración se inhibe el desarrollo de la flora microbiana en general, excepto la psicrófila y algunos mohos y levaduras. La congelación puede destruir algunas bacterias o inhibir el crecimiento de otras. Durante la descongelación del producto, si es lenta, puede proliferar abundantemente la flora psicrófila que se ha mantenido inhibida cuando el alimento estaba congelado. Algunos patógenos como la *Salmonella*, son inhibidos a temperatura de congelación, pero sobreviven y se hacen, incluso, más resistentes. (8)

1.1.8.2 Ácidos orgánicos. La actividad antimicrobiana de un ácido orgánico o su éster se debe a las moléculas no disociadas del compuesto. Algunos ácidos orgánicos en su estado no disociado son muy solubles en las membranas celulares. Únicamente los ácidos orgánicos, lipófilos muestran actividad antimicrobiana. Según una hipótesis, estos compuestos inhiben el crecimiento de los microorganismos, o los matan, por interferir con la permeabilidad de la membrana celular al producir un desacoplamiento en el transporte de sustratos y en la fosforilación oxidativa del sistema transportador de electrones. Los ácidos orgánicos saturados, como el ácido sórbico y los ésteres del ácido

parahidroxibenzoico, también inhiben el sistema de transporte de electrones. Este fenómeno da lugar a la acidificación del contenido celular, que es probablemente la principal causa de la inhibición y muerte de los microorganismos. (10)

Los ácidos orgánicos han sido investigados por su actividad bactericida y porque todos ellos son generalmente reconocidos como seguros; por ello, pueden ser utilizados como conservantes en muchos alimentos. El ácido acético y el propiónico se han encontrado como los que tienen mayor efecto inhibitor de *Salmonella*. El ácido málico y el ácido láctico han presentado una actividad intermedia, y el ácido tartárico y el cítrico tienen una menor actividad inhibitora. (11)

En general, concentraciones $\geq 2\%$ de ácido producen reducción de la carga bacteriana del alimento. (12)

1.2 SALMONELLA



Figura 1: Morfología de *Salmonella spp* (Fuente: foodpoisonjournal)

1.2.1 Características del género *Salmonella*. *Salmonella spp* pertenece a la familia *Enterobacteriaceae*, su hábitat principal es el tracto intestinal del hombre y los animales. Los miembros de este género destacan por su gran capacidad de adaptación, lo que les permite infectar a un amplio rango de hospedadores. Al igual que otros miembros de la familia *Enterobacteriaceae* se caracterizan por ser bacilos Gram-negativos, anaerobios facultativos, catalasa positivos, oxidasa negativos, no fermentadores de lactosa, no formadores esporas y por poseer flagelos peritricos que les confieren movilidad, con excepción del serotipo *S. gallinarum* y las variantes inmóviles de otros serotipos. (13)

Las bacterias de este género pueden sobrevivir durante largos períodos de tiempo en el ambiente asociadas a substratos orgánicos, multiplicándose entre los 7 y los 45 °C y sobreviviendo a la refrigeración y congelación.



Salmonella esencialmente posee tres capas:

- Membrana citoplasmática.
- Espacio periplásmico.
- Membrana externa. (13)

La membrana citoplasmática está compuesta de fosfolípidos, es el sitio donde se lleva a cabo la fosforilación oxidativa y la síntesis de fosfolípidos, péptidoglicanos y lipopolisacáridos.

El espacio periplásmico es una capa delgada que está compuesta por residuos alterantes de ácido N-acetil murámico y N- acetilglucosamina. Esta capa le confiere rigidez y forma a la célula bacteriana.

La membrana externa está compuesta por una bicapa de lípidos que rodea la capa de péptidoglicano y protege al periplasma del medio ambiente externo, también previene la pérdida de proteínas periplásmicas provenientes de la membrana citoplásmica. (13)

Las *Salmonellas*, toleran elevadas concentraciones de ácidos biliares y su crecimiento no resulta inhibido por la presencia de colorantes como el azul de metileno, el cristal violeta o el verde brillante, propiedades que se utilizan para la preparación de medios de cultivos selectivos y diferenciales. (14)

Salmonella es agente etiológico de diferentes enfermedades selectivamente llamadas *salmonelosis*. La *salmonelosis* en humanos puede ser dividida en cuatro síndromes: fiebre entérica (tifoidea), gastroenteritis (contaminación de alimentos), bacteriemia con o sin gastroenteritis y el estado de portador asintomático. (14)



1.2.2 Estructura antigénica. La estructura antigénica de la *Salmonella* es similar a la de otras Enterobacterias, con dos clases de antígenos principales presentes: Antígenos O (somáticos) y Antígenos H (flagelares).

En algunas cepas se halla un tercer antígeno que se relaciona con la virulencia, este antígeno se denomina Antígeno Vi (*Serovar typhi, dublin y paratyphi C*). (15)

1.2.2.1 Antígeno O. Significa sin movimiento, están compuestos por complejos de fosfolípidos y polisacáridos. Son los antígenos de la pared bacteriana. Son termoestables y alcohol-resistente. (15)

1.2.2.2 Antígeno H. Su nombre deriva del alemán Hauch, por el halo producido en un medio de cultivo a raíz del movimiento; según este, las *Salmonellas* pueden ser monofásicas, cuando contienen siempre el mismo antígeno flagelar, generalmente específico (*S. typhi, S. paratyphi*), o difásicas. (16)

En estos, el antígeno flagelar puede aparecer de forma alternativa en fase 1, llamada también específica y que es característica de cada serotipo o en fase 2, que es menos específica. Una cepa de *Salmonella* solo expresa un tipo de antígeno flagelar en un determinado momento. Está constituido por una proteína termolábil, la flagelina, cuya composición de aminoácidos es constante para un tipo antigénico determinado. (15)

1.2.2.3 Antígeno Vi. Llamado así por ser el que determina la virulencia de la bacteria, ya que confiere resistencia contra la respuesta inmune celular y humoral del huésped. (16)

La expresión de este factor depende de al menos dos genes (ViA + ViB), que deben existir ambos en la bacteria para que dicha expresión tenga lugar. (15)

1.2.3 Nomenclatura. Por lo menos 2500 diferentes serovares de *Salmonella spp* son conocidos y pueden ser integrados en 2 especies *S. entérica* y *S. bongori*. *S. enterica* es dividida en 6 subespecies: *entérica* (I), *salamae* (II), *arizonae* (IIIa), *diarizonae* (IIIb), *houtenae* (IV) *indica* (VI). (17)

S. bongori (Subespecie V): No constituye un patógeno para los humanos pero si ha sido implicada en ciertas patologías animales. (17)

También puede hacerse una clasificación de las *Salmonellas* desde el punto de vista epidemiológico en tres grupos:

- Sin ninguna afinidad por hospedador.
- Afectan únicamente al ser humano.
- Adaptadas a un hospedador animal únicamente. (18)

1.2.4 Epidemiología. La epidemiología de la *Salmonella* está directamente relacionada a la ingesta de agua y alimentos contaminados por desechos humanos y animales. La *Salmonella* que causa la fiebre tifoidea, *S. typhi*, se transmite únicamente de humano a humano porque su único reservorio es el ser humano. En cambio en el resto de los serotipos de *Salmonella* el reservorio animal es tan significativo como el humano. (19)

Las fuentes humanas pueden ser individuos quienes excretan el organismo por un corto tiempo durante o inmediatamente después de un ataque de enterocolitis o portadores crónicos que excretan el organismo durante años. La fuente animal más común es el pollo y los huevos de gallina, pero los productos de carne que no son cocidos adecuadamente también constituyen una fuente significativa. (19)



Un factor importante en la transmisión de *Salmonella* entre los humanos y las aves de corral es la habilidad de la *S. enteritidis* de causar infecciones ováricas en las gallinas que se utilizan para la producción comercial de huevos, causando la contaminación de interior del huevo mientras que el cascarón permanece intacto. La *Salmonella* puede sobrevivir en alimentos congelados o deshidratados y por esta razón no es solo un problema del mundo en desarrollo, sino también de los países industrializados. (19)

Para los cerdos la vía oral es la más común pues su entorno es potencialmente contaminado con heces, se ha reportado que del 38 al 75% de los rebaños de Unión Europea (EU) están infectados con *Salmonella*. La contaminación por *Salmonella* puede producirse en cualquier etapa de la cadena cárnica: desde las materias primas para alimentación animal, la fabricación del pienso, la granja, la planta de sacrificio, la sala de despiece, los centros de elaboración. (20)

Las heces de las personas manipuladoras de alimentos con enfermedad subclínica no sospechosas constituyen la fuente más importante de contaminación. Muchos animales, entre ellos el ganado bovino, porcino, roedores y aves, presentan infección natural con varios tipos de *Salmonella* y poseen bacterias en sus tejidos (carne), excreta o huevos.

En los Estados Unidos, la frecuencia de aislamientos en canales de cerdo es muy variable (0 - 48%). (21)

En España se ha descrito que entre el (3 - 12.6%) de la carne de cerdo dan lugar al aislamiento de *Salmonella*. (22)

La contaminación de las canales con *Salmonella* durante el proceso de sacrificio se produce a partir de las heces de animales portadores, a partir del ambiente y de los equipos de la planta y a través de inadecuadas prácticas de los operarios. Se ha estimado que el 70% de las canales contaminadas proceden de animales portadores y el 30% restante se contamina con *Salmonella* a través de contaminaciones cruzadas a partir de los portadores. (21)

Los animales más frecuentemente implicados son las gallinas. Los huevos se contaminan a su paso por el oviducto de gallinas infectadas. Un estudio realizado sobre los alimentos implicados en todo tipo de infecciones alimentarias sitúa a los alimentos con huevo en primer lugar (55%) seguido de repostería (11%), pescados y mariscos (11%) carnes (7%) lácteos (4%) y otros (13%). (21)

Las carnes de todos los animales de abasto que son portadores de *Salmonella* (aves, bóvidos, cerdos) se pueden contaminar a partir del tubo digestivo durante el sacrificio en las plantas de beneficio animal, aunque esta vía de infección es menos frecuente. (21)

La leche cruda también puede ser una fuente importante de contaminación, así como los derivados de este producto, quesos y helados, que también se han visto implicados en brotes de *Salmonella*.

Esta bacteria es incapaz de crecer en leche desecada, pero es capaz de sobrevivir y reanudar el crecimiento cuando se reconstituye la leche, causando brotes de *Salmonella*.

Otros alimentos como vegetales, frutas, cereales, zumos, piensos animales, especias, etc., pueden ser también causantes de infección por *Salmonella*, aunque en menor grado. (23)

1.2.5 Comportamiento de *Salmonella* en la carne. Las enfermedades producidas por *Salmonella* y asociadas a la carne son una carga elevada para la sociedad, produciendo sufrimientos y pérdida de productividad, además de los costes de producción de los alimentos y de la salud pública. El riesgo está influenciado por las fuentes de este patógeno para los animales, por el riesgo de invasión en masa durante el procesado, por la propagación y supervivencia de *Salmonella* en las granjas, en las plantas de procesado y en los ambientes de cocinas domésticas. (24)

Los principales factores que contribuyen a las toxiinfecciones alimentarias provocadas por *Salmonella* a través de los alimentos derivados de la carne son:

- a) La refrigeración o congelación incorrecta de los alimentos.
- b) La elaboración inadecuada o proceso térmico inadecuado.
- c) La contaminación de los alimentos por un manipulador enfermo.
- d) La contaminación cruzada entre diferentes alimentos.
- e) La limpieza inadecuada de los utensilios en contacto con los alimentos.
- f) La ingestión de alimentos crudos. (24)

1.2.6 Síndrome de infección alimenticia por *Salmonella*. Este síndrome es causado por la ingestión de alimentos que contienen un número significativo de especies y serotipos del género *Salmonella*. A partir del momento de ingestión del alimento, los síntomas aparecen a las 12-14 horas, aunque se han señalado periodos de tiempo más cortos y también más largos. Se presentan síntomas como náuseas, vómitos, dolor abdominal, cefalalgia, escalofríos y diarrea. Generalmente estos síntomas se acompañan de postración, debilidad muscular, decaimiento, fiebre moderada, inquietud y somnolencia. Comúnmente los síntomas persisten de 2 a 3 días. El índice de mortalidad es de un 4.1%, variando desde el 5.8% durante el primer año de vida, 2% entre 1 y 50 años y el 15% en personas de más edad. Aunque estos organismos desaparecen rápidamente del tracto intestinal, en algunas ocasiones los pacientes pueden ser portadores durante meses o incluso años después de la fase de convalecencia dependiendo del tipo de infección. (25)

Para producir la infección alimenticia por *Salmonellas* se precisan cantidades del orden de varios millones o billones/g, siendo la *S. enteritidis* y *S. anatum* más infectivas que la *S. pollorum*. Para la presentación de este síndrome parece necesaria la ingestión de células viables, aunque ciertos investigadores sostienen que la ingestión de células muertas puede dar lugar a los síntomas. Existen sin duda diversas razones que explican el fuerte aumento de las infecciones alimenticias por *Salmonellas*:

- Métodos inapropiados para almacenar los alimentos, que a causa de las condiciones de vida moderna se acumulan a veces en excesivas cantidades.
- La costumbre; que aumenta progresivamente, de comer los alimentos crudos o insuficientemente cocinados, en parte por la confianza del consumidor en la labor de inspección de los alimentos.
- Aumento del comercio internacional de alimentos.
- La disminución de la resistencia a las infecciones como consecuencia del mejoramiento de las condiciones generales de higiene. (25)

1.2.7 Métodos de control de *Salmonella* en alimentos

1.2.7.1 Temperatura. La capacidad de crecimiento de *Salmonella* se reduce sustancialmente si la temperatura es inferior a los 15 °C, mientras que el crecimiento de la mayoría de las *Salmonellas* se evita si la temperatura es inferior a los 7 °C. Así, el almacenamiento de los alimentos perecederos debe mantenerse por debajo de la temperatura mínima de crecimiento del microorganismo. Se ha descrito la capacidad de *Salmonella* para crecer a temperaturas inferiores a los 5 °C, pero en muchos casos no se ha confirmado. (26)



La muerte de *Salmonella* es mayor durante el proceso de congelación que durante el tiempo que puede permanecer congelado un alimento. El descenso de la viabilidad de las *Salmonellas* es mucho mayor en el intervalo de temperaturas entre 0 °C y -10 °C que entre -17 °C a -20 °C. (27)

Aunque la congelación puede afectar muy seriamente a la supervivencia de *Salmonella*, no garantiza su destrucción total de los alimentos. Así, durante este proceso, *Salmonella* quedará muy dañada y por este motivo, en el momento de analizar los alimentos almacenados en congelación se recomienda realizar un proceso de pre-enriquecimiento.

La muerte de la bacteria se producirá si se excede la temperatura máxima de crecimiento, 49.5 °C. Valores situados por encima de esta serán los adecuados para almacenar los alimentos en condiciones de temperaturas elevadas, evitándose el crecimiento de *Salmonella*. (27)

Salmonella es muy sensible al calor y la resistencia a este parámetro es muy rara. La resistencia al calor viene influenciada por la actividad de agua, por la naturaleza de los solutos y por el pH del medio. (27)

1.2.7.2 pH. El pH mínimo de crecimiento es de 3.8 y el máximo de 9.5. El tipo de ácido presente es muy importante. Los ácidos inorgánicos como el ácido clorhídrico (ClH) y el ácido cítrico, permiten el crecimiento de *Salmonella* hasta valores de pH cercanos a 4, mientras que el ácido acético, el ácido propiónico y el ácido butírico, tienen un mayor poder bacteriostático impidiendo el crecimiento de *Salmonella* a pH inferiores a 5. (27)

En general, la actividad bactericida de todos los ácidos se incrementa linealmente con la concentración del mismo. De esta forma, concentraciones $\geq 4\%$ de ácido son necesarias para reducir ≥ 2 log el número de células de *Salmonella*. (11)



1.2.7.3 Potencial de óxido reducción. El potencial de óxido-reducción es otro factor importante que afecta al crecimiento de esta bacteria. Aunque *Salmonella* puede crecer en condiciones de aerobiosis y anaerobiosis, este crecimiento puede verse inhibido por potenciales de óxido-reducción inferiores a 30Mv (milivoltios). (27)

1.2.7.4 Actividad de agua (a_w). La actividad de agua es uno de los factores que más afecta al crecimiento de *Salmonella*. El límite inferior se sitúa en valores de 0.945, pero *Salmonella* puede sobrevivir durante un año o más en alimentos que tengan actividades de agua inferiores, tales como el chocolate, la pimienta negra, las gelatinas o la manteca de cacahuete. (27)

Las sales presentes en los alimentos o añadidas para conservarlos tienen un efecto bacteriostático, ya que las sales captan el agua presente en el alimento haciendo disminuir la actividad de agua e impidiendo el crecimiento de la bacteria. El crecimiento de *Salmonella* en los alimentos se ve inhibido por la presencia de un 3-4% de ClNa. También se inhibe el crecimiento de *Salmonella* si existen concentraciones de sal en carne del orden del 5.3%. (27)

1.2.7.5 Altas presiones. Presiones con valores de 500-700 MPa (Mega pascal) matan rápidamente las células vegetativas de bacterias, levaduras y hongos, aunque las esporas son mucho más resistentes. Ciertas enzimas son inactivadas y algunas proteínas solubles desnaturalizadas, pero los compuestos responsables del sabor no se ven afectados. Los tratamientos a altas presiones pueden inactivar los microorganismos a temperatura ambiente sin la utilización de conservante, permitiendo que se mantengan las características organolépticas. (28)

1.3 Métodos para de determinación de *Salmonella* en alimentos

Existe un gran número de métodos de diagnóstico diferentes que pueden utilizarse para la determinación de *Salmonella*, sin embargo, según la mayor parte de estudios realizados, el estudio bacteriológico es la prueba más comúnmente realizada para la identificación de la bacteria a partir de tejidos, alimentos y excrementos. Este método de cultivo convencional necesita máximo 5 días para obtener los resultados. (29)

1.3.1 Método de cultivo convencional. Para el aislamiento de *Salmonella* en los alimentos que se realiza por el método convencional descrito por la Food and Drug Administration, básicamente, se pesan 25 g de cada muestra de alimento y se inoculan en 225 ml de los medios de pre-enriquecimiento, agua peptonada y caldo infusión cerebro corazón, los cuales se incuban a 37 °C durante 24 horas; a partir de estos, se inocula 1ml de cada muestra en 9 ml de caldo Rappaport y Tetrionato, posteriormente se subcultivan en agar SS, Mackonkey, Hektoen, XLD y Bismuto Sulfito, se incuban a 37°C por 24 horas, las colonias sospechosas de *Salmonella* se identifican con pruebas bioquímicas convencionales y se confirman con antisueros polivalentes y monovalentes para *Salmonella*. (30)

En el laboratorio se deben considerar todos los factores que permitan recuperar de manera eficiente la *Salmonella*, es por esto que se deben realizar los procesos de pre-enriquecimiento, enriquecimiento, siembra en agares selectivos, pruebas bioquímicas y serotipificación.

1.3.1.1 Pre-enriquecimiento no selectivo. En la etapa de pre-enriquecimiento no selectivo se logra la estimulación de las *Salmonellas*, se incrementa su vitalidad y se adquieren las condiciones fisiológicas adecuadas para su perfecto desarrollo; el medio de elección es el agua de peptona tamponada que, al mantener un pH



constante, favorece el desarrollo de las *Salmonellas*, por otra parte, la peptona y los fosfatos revitalizan el germen. Se utiliza cuando la muestra en estudio ha sufrido un proceso de desecación o irradiación, cuando ha estado congelada por mucho tiempo o si el pH del medio es muy bajo. (31)

1.3.1.2 Enriquecimiento selectivo. Durante el enriquecimiento selectivo existe una estimulación en el crecimiento de bacterias compatibles con *Salmonella spp*, y se inhibe el desarrollo de bacterias intestinales y coliformes. Entre los caldos mayormente usados para el enriquecimiento selectivo de *Salmonella spp* se encuentran:

- **Caldo Rappaport-Vassiliadis:** Medio para el enriquecimiento selectivo de *Salmonellas* con excepción de *S. typhi* y *S. paratyphi A*, en alimentos u otros materiales. El medio cuenta con una baja concentración de verde de malaquita, cloruro de magnesio, y harina de soya para así obtener un mayor porcentaje de recuperación de *Salmonella spp*. (32)
- **Caldo tetrionato:** Medio que junto con el tiosulfato excedente, inhibe de igual forma coliformes y otras bacterias acompañantes, sin alterar las bacterias reductoras de tetrionato como *Salmonella spp* y *Proteus ssp*. Adicionalmente, las sales biliares que contiene inhiben considerablemente a todos los microorganismos de presencia obligatoria en el intestino. (32)



1.3.1.3 Medios de cultivo selectivos y diferenciales

a) **Medios de cultivo selectivos:** Son aquellos que permiten seleccionar ciertos microorganismos deteniendo el desarrollo de otros; esto se logra con el agregado de sustancias inhibitorias como antibióticos, ciertos colorantes, sales biliares, etc.

- **Agar MacConkey (McK):** Las sales biliares y el cristal violeta ejercen una inhibición significativa sobre las bacterias gram-positivas. La lactosa y el indicador rojo neutro permiten comprobar la degradación de ese disacárido, las colonias lactosa positivas (*E. coli*) aparecen rojas con halo turbio; las lactosa negativas (*Salmonella spp*) son incoloras. (18)

- **Agar Desoxicolato:** Es un medio altamente efectivo por el desoxicolato sódico supresor del crecimiento de coliformes y gram-positivos. Las colonias típicas de la *Salmonella spp* son pequeñas, incoloras, elevadas y opacas; algunas cepas producen precipitado negro en el centro. (18)

b) **Medios de cultivo diferenciales:** Permiten diferenciar bioquímicamente las bacterias por su actividad metabólica. Poseen un sustrato, sobre el cual actúa o no la bacteria, y esa actividad se revela por variación del pH del medio o por alguna actividad enzimática que modifica su aspecto en el proceso de recuperación de *Salmonella spp*.



- **Agar Xilosa Lisina Desoxicolato (XLD):** Medio para el aislamiento y diferenciación de enterobacterias patógenas, especialmente especies de *Shigella spp* y *Salmonella spp*. El efecto inhibitor de este de cultivo es débil, el desoxicolato genera la inhibición de bacterias coliformes y permite la dispersión de cepas de *Proteus* que puede llegar a confundirse con las colonias producidas por *Salmonella*. Las colonias de *Salmonella spp* se observan con pigmentación rosa o roja, algunas veces transparentes con o sin centro negro y/o completamente negras. (33)

- **Agar Salmonella – Shigella:** Es un medio selectivo y diferencial. La selectividad está dada por las sales biliares y el verde brillante, que inhiben el desarrollo de bacterias gram-positivas, de la mayoría de coliformes y el desarrollo invasor de *Proteus spp*. Es diferencial debido a la fermentación de la lactosa y la formación de ácido sulfhídrico a partir del tiosulfato de sodio. *Salmonella spp*, desarrolla colonias translucidas ocasionalmente opacas, algunas con centro negro a causa de la producción de ácido sulfhídrico. (33)

1.3.1.4 Confirmación Bioquímica

- **TSI (Triple azúcar hierro):** Es un agar diferencial basado en la fermentación de azúcares y la producción de H₂S y gas. Contiene glucosa, sacarosa y lactosa; estas últimas en una concentración 10 veces mayor que la glucosa. El indicador de pH es rojo fenol, el cual vira a amarillo por formación de ácido a partir del carbohidrato. *Salmonella* da como resultado de esta prueba una reacción alcalina/ácido con producción de H₂S que se evidencia por el fondo negro del tubo. (34)



- **LIA (agar lisina hierro):** El fundamento de esta prueba es que los procesos de descarboxilación en el medio de cultivo tienen lugar con la previa fermentación del carbohidrato que contiene el medio (glucosa) y la acidez producida por esta reacción. *Salmonella spp* por lo general da como resultado tendido púrpura y fondo púrpura, con producción de H₂S y gas, es decir posee la enzima descarboxilasa. (34)
- **Sulfuro de Hidrógeno – Indol - Motilidad (SIM):** Es un medio que se usa para determinar la formación de sulfuro de hidrógeno, la producción de indol y la movilidad en el diagnóstico de enterobacterias. (34)

1.3.2 Pruebas rápidas para la investigación de Salmonella. Se han desarrollado distintos procedimientos nuevos para detectar *Salmonella* más rápido. Aunque estas pruebas son más cortas que las convencionales, todas requieren pre-enriquecimiento y/o enriquecimiento del alimento antes de ser aplicadas. (8)

1.3.2.1 Inmunoensayos. Los inmunoensayos se basan en la unión específica de antígenos con anticuerpos. El factor determinante de estos métodos es la elección de un anticuerpo apropiado. Los resultados positivos que se obtengan con estos métodos siempre son considerados como presuntos positivos, por lo tanto, siempre requieren confirmación. El límite de detección se encuentra entre 10⁴ - 10⁵ ufc/ml. Existen diferentes métodos inmunológicos aplicables al diagnóstico alimentario. (35)



1.3.2.2 Inmunoprecipitación. Estos métodos son rápidos, de uso sencillo y de fácil interpretación. Normalmente están compuestos por una membrana, habitualmente de nitrocelulosa, donde está inmovilizado el anticuerpo que específicamente une y captura el antígeno específico de la bacteria si está presente en la muestra, formándose una línea visible debida por ejemplo a la utilización de partículas de látex coloreadas. (35)

1.3.2.3 Enzimoimmunoensayo (ELISA). En el ELISA (Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay), que es uno de los formatos basados en anticuerpos más utilizados para el análisis de patógenos en alimentos, se utiliza un anticuerpo unido a una matriz sólida que captura los antígenos presentes en el cultivo enriquecido. Un segundo anticuerpo conjugado con una enzima es el que se utiliza para realizar la detección. En presencia del sustrato la enzima catalizará una reacción colorimétrica. Las paredes de los pocillos de las placas de microtitulación son el soporte sólido más utilizado en este tipo de ensayos. Existen gran variedad de kits en formato ELISA para la detección de *Salmonella*. (35)

Hoy en día muchos de estos test se proporcionan como sistemas automatizados y robotizados que ahorran tiempo gracias a la disminución del trabajo manual, pero además, aumentan la reproducibilidad y la estandarización de cada paso. Ejemplos de estos sistemas para *Salmonella* son el RayAL *Salmonella* (RayAI, Nottinghamshire, UK), los sistemas 3M™ Tecra™ (3M, St. Paul, Minnesota, USA) o el TRANSIA® PLATE *Salmonella* Gold (BioControl). (35)

Los métodos anteriormente mencionados se basan en la utilización de sustratos cromogénicos para realizar la detección, pero la enzima puede también catalizar una reacción fluorescente. (35)



1.3.2.4 Separación inmunomagnética (IMS). Este método está diseñado para separar el organismo diana directamente de una suspensión compleja como es por ejemplo una muestra de alimento. A la suspensión se le añaden partículas magnéticas las cuales están recubiertas de un anticuerpo específico del microorganismo que se va a detectar. Se incuba para facilitar la unión de las células de interés a los anticuerpos y se aíslan los complejos del resto de la muestra mediante magnetismo. Los complejos se pueden utilizar después para hacer más pruebas, como por ejemplo inocular otro cultivo, transferir a medios selectivos, o pueden ser utilizados en reacciones de PCR o en ensayos de ELISA. En los métodos de detección de *Salmonella* la IMS se utiliza normalmente para reemplazar el paso de enriquecimiento selectivo, ganando de este modo 24 h. (35)

1.3.2.5 Sistemas de aglutinación en porta. Son uno de los métodos inmunológicos más sencillos. El más utilizado es la aglutinación en látex (LA), en el que las partículas de látex son unidas a los anticuerpos específicos que en contacto con los antígenos específicos del microorganismo diana produce una reacción de aglutinación que es detectada visualmente. Normalmente estos test son utilizados en la última fase del método tradicional de detección de *Salmonella*, es decir, en la confirmación serológica. (35)

1.3.2.6 Inmunodifusión. La inmunodifusión es una técnica de precipitación que se basa en el movimiento de las proteínas en una agarosa en la cual está presente el anticuerpo específico. Si al añadir la muestra el antígeno específico está presente en ésta, se formarán complejos antígeno-anticuerpo generando una línea de precipitación. Para *Salmonella* existe el 1-2 Test de BioControl, en el cual el anticuerpo utilizado es específico para el antígeno flagelar de *Salmonella*, por lo que no se detectarán *Salmonellas* no móviles. (35)

CAPITULO 2

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Tipo y diseño de investigación

- **Tipo de investigación:** Descriptivo-prospectivo.
- **Planteamiento del diseño:** No Experimental.

2.2 Población de estudio

Las muestras fueron tomadas de las canales de res, cerdo y pollos en la empresa ITALIMENTOS ubicada en la Av. Octavio Chacón # 4-103 y Vía Patamarca (Parque Industrial) (Anexo H). Se recogió muestras de los distintos proveedores con el fin de determinar *Salmonella spp* en la materia prima cárnica mediante la técnica visual inmunoensayo Tecra *Salmonella* VIA y comprobar el cumplimiento de la NTE INEN 2346:2010. (Anexo A)

La materia prima que ingresa a la planta de carnes de la empresa ITALIMENTOS proviene de proveedores calificados; los parámetros que deben cumplir son temperatura de transporte, pH, peso y color. Antes de ser aceptadas hay un proceso de recepción durante el cual se realiza una minuciosa inspección, el personal de calidad mide la temperatura con la que llega la canal, el pH, eliminan cualquier cuerpo extraño, constatan el peso de la canal e inmediatamente se realiza un proceso de lavado y desinfección de la canal con ácidos orgánicos al 2.5% v/v (Ácido láctico 66,5% v/v; Tarisolfresh® 16.6% v/v y Lactato de sodio 16.6% v/v).



2.3 Muestreo

La empresa "ITALIMENTOS" recibe alrededor de 2000 pollos, 150 canales de res, 100 canales de cerdo a la semana.

El cálculo del tamaño de la muestra se realizó con la tabla Militar Estándar (1989); para canales de res y cerdo se utilizó el nivel de inspección general (Nivel II) y para las canales de pollo se utilizó el nivel de inspección riguroso (Nivel S4), y se obtuvieron los siguientes valores. (Anexo B)

- Pollos: 13 muestras
- Canales de res: 16 muestras (8 antes y 8 después del proceso de desinfección).
- Canales de cerdo: 16 muestras (8 antes y 8 después del proceso de desinfección).

La recolección de las muestras se realizó de forma aleatoria con una frecuencia de 2 veces por semana, durante 6 semanas. Se analizó un total de 45 muestras cada una por duplicado para dar un total de 90 análisis.

Tabla 1: Cronograma de trabajo para la determinación de *Salmonella spp*

Muestra	Número de muestras				Total de análisis	Semana
	Antes de la desinfección		Después de la desinfección			
	M1	M1.1 (Duplicado)	M2	M2.1 Duplicado		
Canales de cerdo	4	4	4	4	16	I
	4	4	4	4	16	II
Canales de res	4	4	4	4	16	III
	4	4	4	4	16	IV
	M1		M1.1 (Duplicado)			
Pollos *	7		7		14	V
	6		6		12	VI
* En los pollos no se realiza el proceso de desinfección.						

2.4 Toma de muestra

2.4.1 Canales de res y cerdo. Las muestras fueron tomadas abarcando la mayor parte de la canal, se tomó de cuatro localizaciones de cada canal (cadera, falda, pecho y cuello). Se realizó dos muestreos, el primero cuando las canales ingresan a la fábrica, donde cada muestra fue tomada con su respectivo duplicado; las muestras y el duplicado fueron identificadas como M1 y M1.1 respectivamente y el segundo muestreo se realizó después del proceso de desinfección es decir luego de 24 horas, donde cada muestra fue tomada con su respectivo duplicado; las muestras y el duplicado fueron identificadas como M2 y M2.1 respectivamente.

.Cada muestra fue rotulada con fecha de recolección, hora y nombre del proveedor.



Figura 2: Lugares de muestreo para canales de res (**Fuente:** Manual de Procedimientos para el Muestreo Microbiológico Oficial en Carnes Faenadas en Mataderos de Exportación, Chile, 2007)

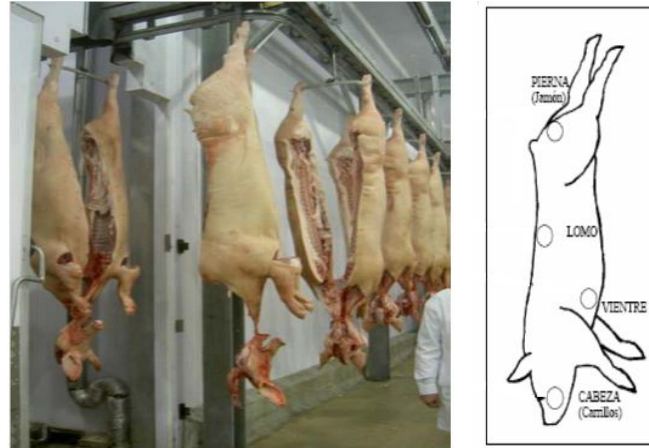


Figura 3: Lugar de toma de muestras para canales de cerdo (**Fuente:** Manual de Procedimientos para el Muestreo Microbiológico Oficial en Carnes Faenadas en Mataderos de Exportación, Chile, 2007)

2.4.2 Muestras de pollos. Los pollos fueron llevados enteros al laboratorio de una manera aséptica evitando que ocurra cualquier contaminación durante su traslado. Una vez en el laboratorio se procedió a tomar las muestras abarcando la mayor parte del pollo. Se realizó un muestreo, cuando las canales ingresan a la fábrica; donde cada muestra fue tomada con su respectivo duplicado. Las muestras y el duplicado fueron identificadas como M1 y M1.1 respectivamente.

Cada muestra fue rotulada con fecha de recolección, hora y nombre del proveedor.



Figura 4: Toma de muestra de pollos (**Fuente:** Los autores)

2.5 Recursos Materiales

- Bolsas whirl pak estériles.
- Cuchillo.
- Alcohol 70%.
- Guantes.
- Papel toalla.
- Balanza analítica.
- Pinzas.
- Mecheros.



- Refrigerador.
- Estufa (37 °C – 42 °C).
- Frascos homogenizadores con capacidad para 300 ml.
- Tubos tapa rosca.
- Pipetas de 10 ml.
- Pipeta automática de 1 ml.
- Autoclave.
- Caldo de Lactosa
- Caldo Rappaport Vassiliadis (RV R10)
- Caldo M
- Agua destilada
- Kit tecra *Salmonella* VIA

2.6 Fundamento de la técnica visual inmunoensayo Tecra *Salmonella* VIA

Tecra *Salmonella* VIA es un ensayo inmunoenzimático (ELISA) ligado a enzimas, realizado en una configuración "sándwich".



2.6.1 ELISA sándwich para detectar *Salmonella*.

- Los anticuerpos específicos para *Salmonella* están adsorbidos en la superficie de los pocillos.
- Si los antígenos de *Salmonella* están presentes en la muestra, son capturados por los anticuerpos. Todos los otros materiales en la muestra son lavados.
- El sándwich se completará con la adición de anticuerpos marcados con enzimas (Conjugado) específicos para *Salmonella*.
- La presencia de *Salmonella* en la muestra se indica cuando el conjugado unido convierte el substrato a un color verde. Alternativamente, la ausencia de *Salmonella* no da color verde.

2.7 Preparación de las muestras para el análisis.

Las muestras tomadas para determinación de *Salmonella spp* en canales de res, canales de cerdo y pollos fueron recolectadas mediante método destructivo de forma aséptica. Se utilizó un cuchillo previamente desinfectado con una solución de alcohol al 70% y se procedió a recolectar la muestra de la canal en una bolsa whirl pak estéril con un peso no menor a 100 g. Una vez obtenido la muestra fue sellada y trasladada al laboratorio de control de calidad de la empresa ITALIMENTOS lo más rápido posible para la determinación de *Salmonella spp*.

En el laboratorio se procedió a pesar 25 g de muestra en una bolsa whirl pak estéril con la ayuda de una pinza y un cuchillo flameados en alcohol al 70%.



Figura 5: Lavado y desinfección de canales de res y cerdo (**Fuente:** Empresa ITALIMENTOS)

2.8 Métodos de enriquecimiento de las muestras

Para el enriquecimiento de la muestra se siguió el método aprobado AOAC 998.09 con los medios de cultivo recomendados por la FDA. (Anexo C)



Figura 6: Medios de cultivo para el enriquecimiento de la muestra (**Fuente:** Los autores)

Para determinación de *Salmonella spp* por TECRA *Salmonella* VIA se realizó una etapa de pre-enriquecimiento, una etapa de enriquecimiento selectivo y por último se realizó una etapa de post-enriquecimiento.

2.8.1 Etapa de pre-enriquecimiento. El medio de elección para esta etapa es el Caldo de Lactosa que por sus características permite revivir cualquier *Salmonella spp* sub-letalmente dañada. (Anexo D)

De una manera totalmente aséptica se procedió a transferir los 25 g de muestra previamente pesada a un frasco con 225 ml de caldo lactosa precalentado a la temperatura de incubación. Por último se procedió a incubar en una estufa a 35 - 37 °C, durante 18 a 22 horas.



Figura 7: Caldo de pre-enriquecimiento [Caldo Lactosa] (**Fuente:** Los autores)

2.8.2 Etapa de enriquecimiento selectivo. El medio de elección para esta etapa es el Caldo Rappaport Vassiliadis (RV R10) que permite asegurar que cualquier *Salmonella spp* presente en la muestra se multiplique a niveles detectables. (Anexo E)

Pasado el tiempo de incubación de manera totalmente aséptica se procedió a transferir 0.1 ml de Caldo de Lactosa a 9.9 ml de Caldo Rappaport Vassiliadis R10 precalentado a la temperatura de incubación. Por último se procedió a incubar en una estufa a 41 - 43 °C por 16 - 20 horas.

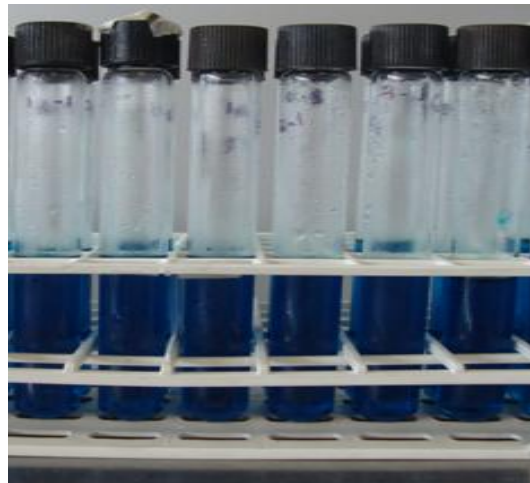


Figura 8: Caldo de enriquecimiento [Rappaport Vassiliadis R10] (Fuente: Los autores)

2.8.3 Etapa de post-enriquecimiento. El medio de elección para esta etapa es el Caldo M, que favorece el incremento de la antigenicidad de cualquier *Salmonella spp* al estimular el crecimiento de los flagelos, adicionalmente ayuda en la clarificación de la muestra y favorece su migración a través de la unidad de detección. (Anexo F)

Pasado el tiempo de incubación de manera totalmente aséptica se procedió a transferir 1 ml de Caldo Rappaport Vassiliadis R10 a 10 ml de Caldo M precalentado a la temperatura de incubación. Por último se procedió a incubar en una estufa a 35 - 37 °C por 6 - 8 horas.



Figura 9: Caldo de post-enriquecimiento [Caldo M] (**Fuente:** Los autores)

2.9 Procedimiento del análisis

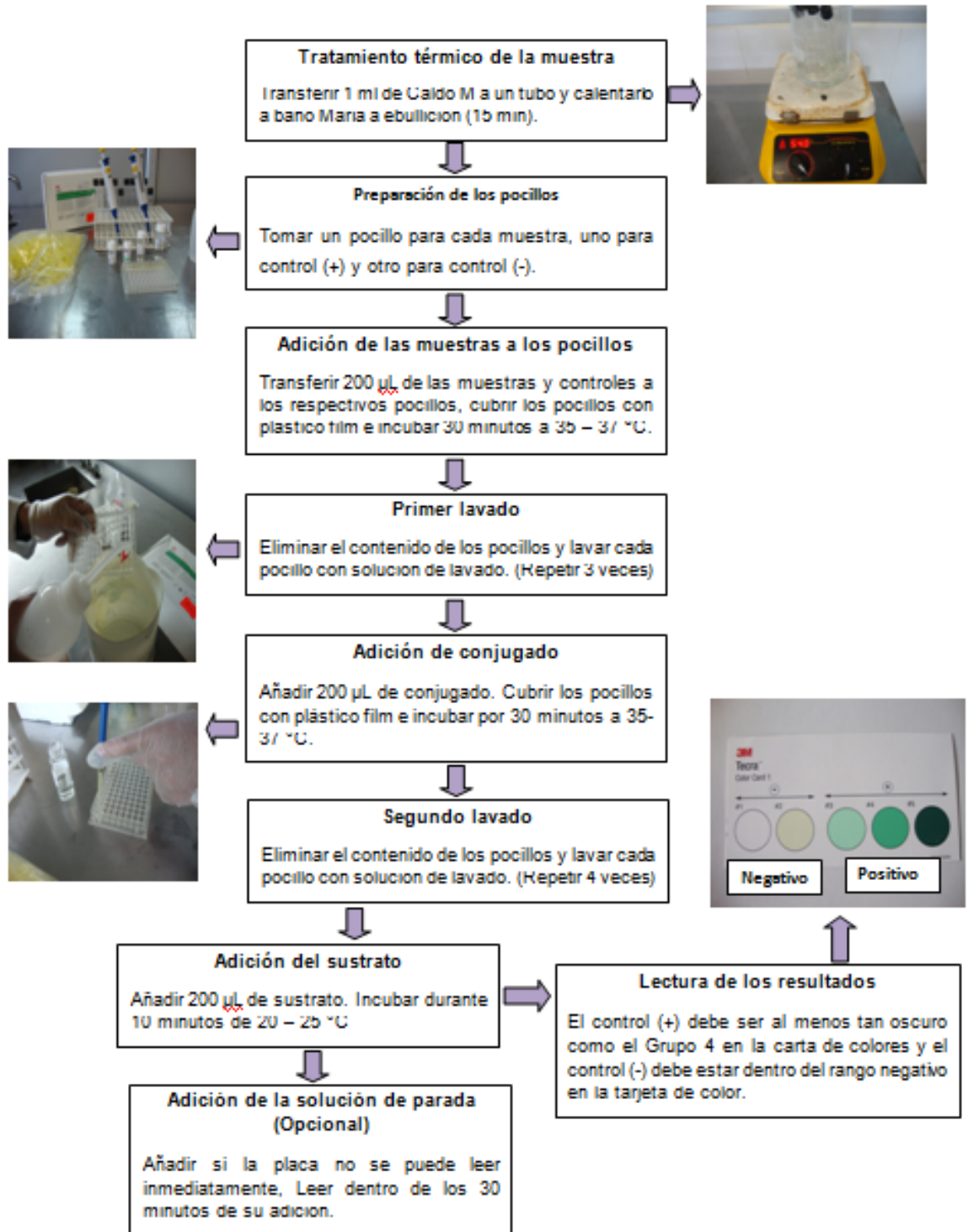


Figura 10: Esquema del procedimiento (Tecra *Salmonella* VIA)

2.10 Controles positivos para *Salmonella spp*

Se trabajó con muestras de carne inoculadas intencionalmente con una cepa activada de *Salmonella tiphymurium*, ATCC 14028, la cual se obtuvo del Laboratorio de Microbiología del Programa VLIR-IUC de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad de Cuenca y fue llevada al laboratorio de la empresa ITALIMENTOS en caldo de lactosa, medio que garantiza la supervivencia y multiplicación de todos los serotipos de *Salmonella*.

Se determinó la presencia o ausencia de *Salmonella spp* en cortes finos de carne de res inoculadas intencionalmente con *Salmonella tiphymurium*, con el propósito de realizar el control de calidad del kit Tecra *Salmonella* VIA y la eficacia de la mezcla de ácidos orgánicos. Se trabajaron todos los controles por duplicado

En el laboratorio se procedió a pesar 25 g de carne de res en cajas petri estériles, luego se inoculó 1 ml de la suspensión de *Salmonella tiphymurium*. Adicionalmente a la mitad de los controles se procedió a rociar con 5 ml de la mezcla de ácidos orgánicos (desinfectante). Se incubó en una estufa por 24 horas a 42 °C.

Todos los controles una vez realizados los procesos de enriquecimiento fueron analizadas mediante la técnica visual inmunoensayo Tecra *Salmonella* VIA. (Anexo G)

CAPÍTULO 3

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 Determinación de *Salmonella spp* en las muestras de cortes finos de carne de res inoculadas intencionalmente con *Salmonella tiphymurium* (Controles positivos)

Los resultados fueron analizados de forma cualitativa, es decir, por observación de cambio de color o no en los pocillos de kit Tecra *Salmonella* VIA y se obtuvieron los siguientes datos.

3.1.1 *Salmonella spp* en los controles positivos (Sin adición de la mezcla de ácidos orgánicos)

Tabla 2: *Salmonella spp* en los controles positivos (Sin adición de la mezcla de ácidos orgánicos)

<i>Salmonella spp</i> en los controles positivos (Sin adición de la mezcla de ácidos orgánicos)		
Muestra	M 1	M 1.1
	* P/A en 25 g	* P/A en 25 g
1	Presencia	Presencia
2	Presencia	Presencia
* P/A: Presencia/Ausencia		

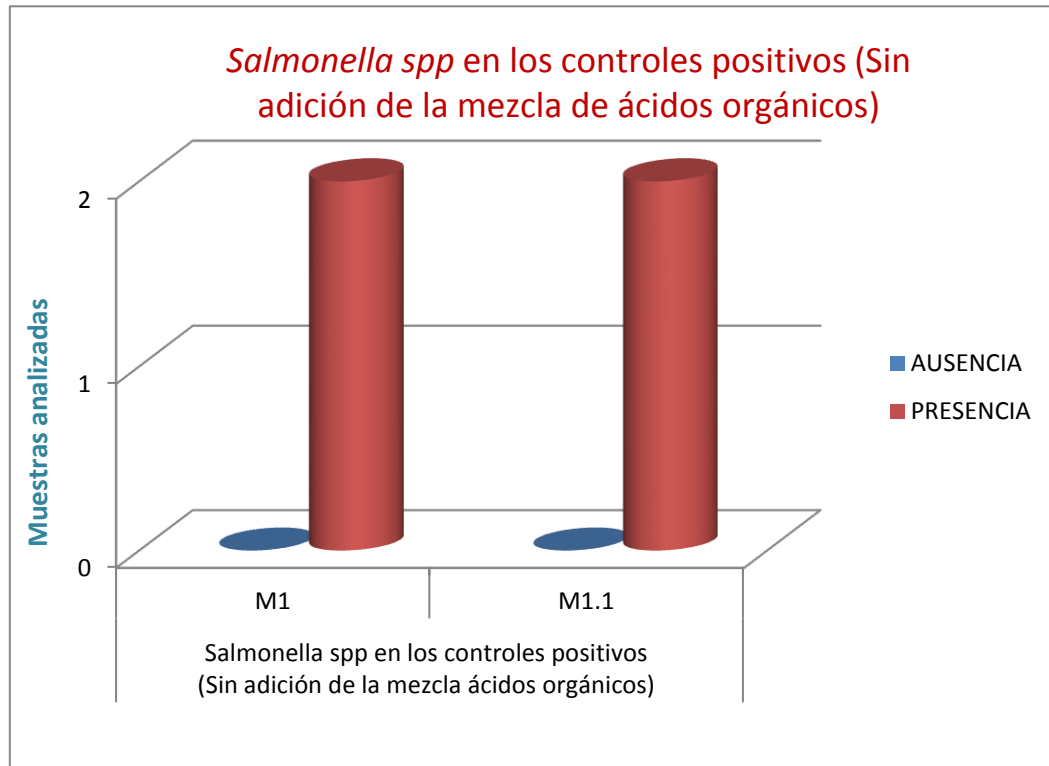


Gráfico 1: *Salmonella spp* en los controles positivos (Sin adición de la mezcla de ácidos orgánicos)

El análisis de *Salmonella spp* mediante la técnica visual inmunoensayo Tecra *Salmonella* VIA en los controles positivos sin la adición de la mezcla ácidos orgánicos de la empresa ITALIMENTOS, presentó un 100 % de presencia de *Salmonella* en 25 g de muestra. Por lo tanto se pudo verificar la efectividad del kit Tecra *Salmonella* VIA.

3.1.2 Salmonella spp en los controles positivos (Con adición de la mezcla de ácidos orgánicos)

Tabla 3: *Salmonella spp* en los controles positivos (Con adición de la mezcla de ácidos orgánicos)

Salmonella spp en los controles positivos (Con adición de la mezcla de ácidos orgánicos)		
Muestra	M 1	M 1.1
	* P/A en 25 g	* P/A en 25 g
1	Ausencia	Ausencia
2	Ausencia	Ausencia
* P/A: Presencia/Ausencia		

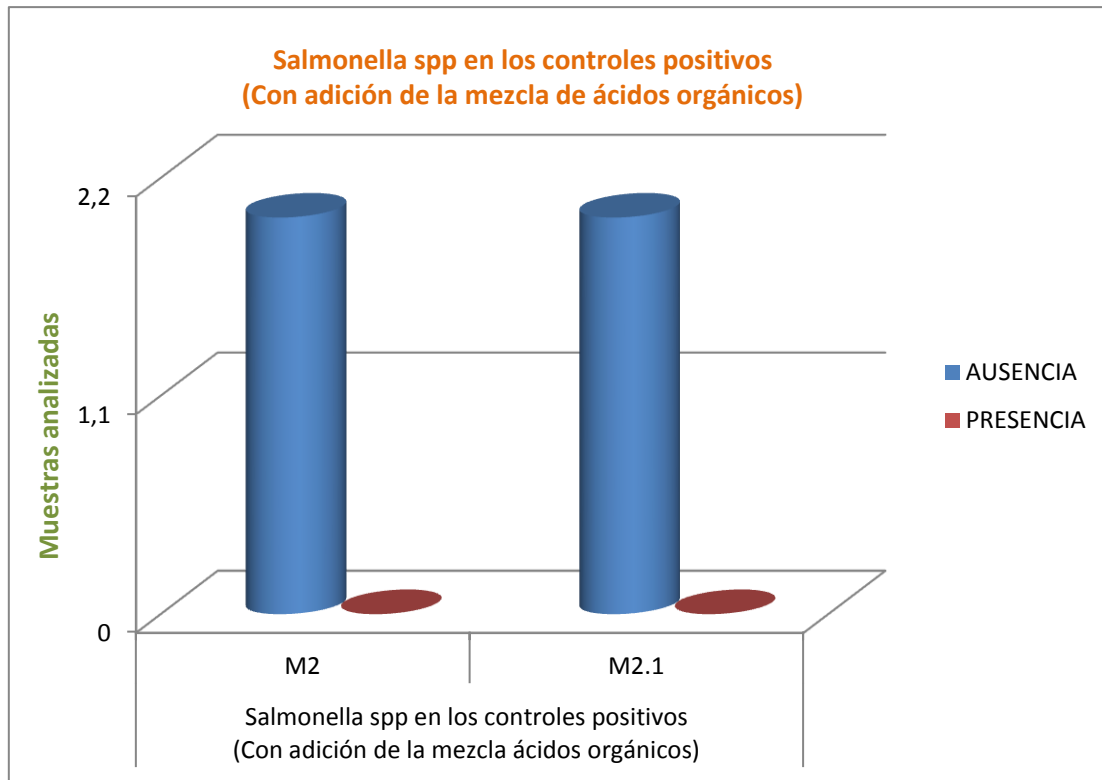


Gráfico 2: *Salmonella spp* en los controles positivos (Con adición de la mezcla de ácidos orgánicos)

El análisis de *Salmonella spp* mediante la técnica visual inmunoensayo Tecra *Salmonella* VIA en los controles positivos con la adición de la mezcla ácidos orgánicos de la empresa ITALIMENTOS, presentó un 100 % de ausencia de *Salmonella* en 25 g de muestra. Por lo tanto se pudo verificar la efectividad de la mezcla de ácidos orgánicos utilizada por la empresa para disminuir la carga microbiana inicial de las canales de cerdo y res.

3.2 Determinación de *Salmonella spp* en las muestras de las canales de cerdo

Los resultados fueron analizados de forma cualitativa, es decir, por observación de cambio de color o no en los pocillos de kit Tecra *Salmonella* VIA y se obtuvieron los siguientes datos.

3.2.1 *Salmonella* spp en las muestras de las canales de cerdo antes del proceso de desinfección

Tabla 4: *Salmonella* spp en las muestras de las canales de cerdo antes del proceso de desinfección

<i>Salmonella</i> spp antes del proceso de desinfección (Canales de cerdo)		
Muestras	M1	M1.1
	* P/A en 25 g	* P/A en 25 g
1	Ausencia	Ausencia
2	Ausencia	Ausencia
3	Ausencia	Ausencia
4	Ausencia	Ausencia
5	Ausencia	Ausencia
6	Ausencia	Ausencia
7	Ausencia	Ausencia
8	Ausencia	Ausencia
* P/A: Presencia/Ausencia		

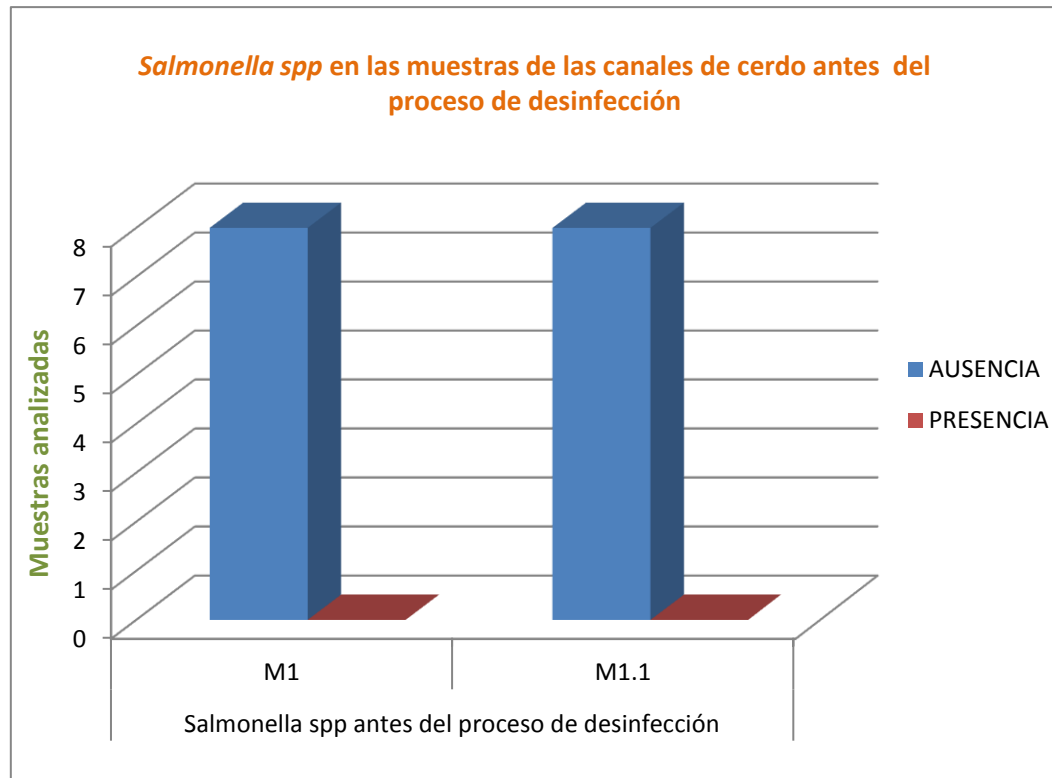


Gráfico 3: *Salmonella spp* en las muestras de las canales de cerdo antes del proceso de desinfección

El análisis de *Salmonella spp* mediante la técnica visual inmunoensayo Tecra *Salmonella* VIA en las muestras y duplicados de las canales de cerdo antes del proceso de desinfección con ácidos orgánicos de la empresa ITALIMENTOS, presentó un 100 % de ausencia de *Salmonella* en 25 g de muestra. Por lo tanto cumple el criterio microbiológico establecido en la NTE INEN 2346:2010.

3.2.2 *Salmonella spp* en las muestras de las canales de cerdo después del proceso de desinfección

Tabla 5: *Salmonella spp* en las muestras de las canales de cerdo después del proceso de desinfección

<i>Salmonella spp</i> después del proceso de desinfección (Canales de cerdo)		
Muestras	M2	M2.1
	* P/A en 25 g	* P/A en 25 g
1	Ausencia	Ausencia
2	Ausencia	Ausencia
3	Ausencia	Ausencia
4	Ausencia	Ausencia
5	Ausencia	Ausencia
6	Ausencia	Ausencia
7	Ausencia	Ausencia
8	Ausencia	Ausencia
* P/A: Presencia/Ausencia		

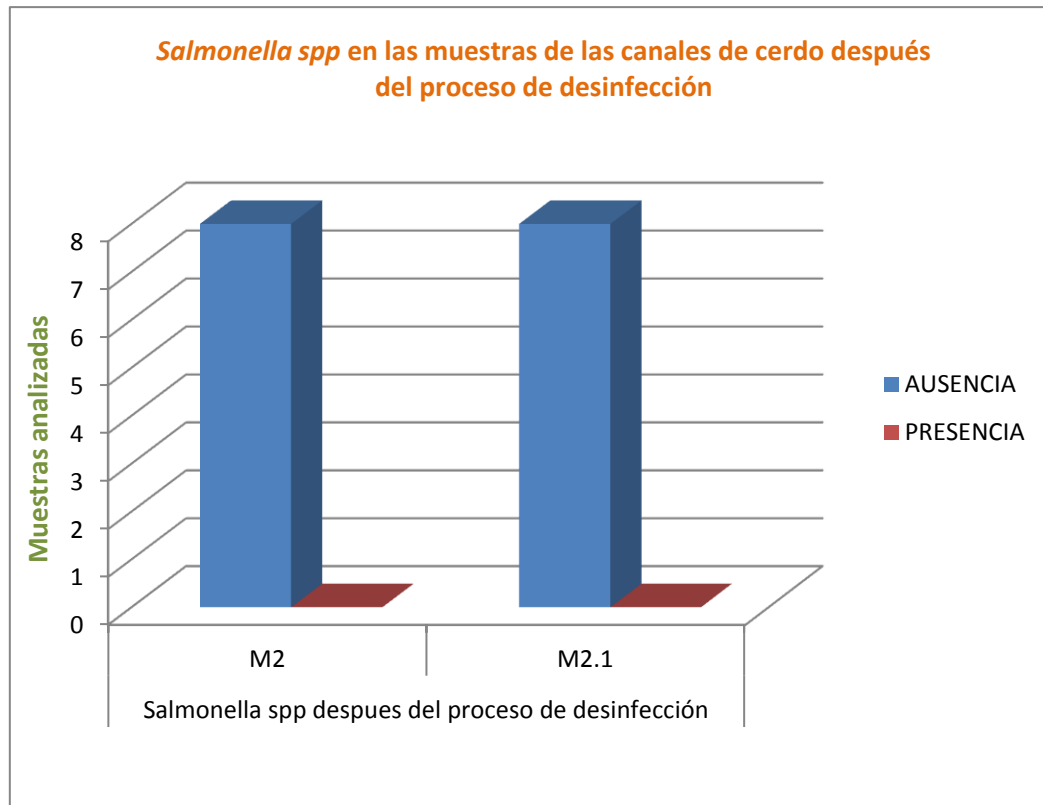


Gráfico 4: *Salmonella spp* en las muestras de las canales de cerdo después del proceso de desinfección

El análisis de *Salmonella spp* mediante la técnica visual inmunoensayo Tecra *Salmonella* VIA en las muestras y duplicados de las canales de cerdo después del proceso de desinfección con ácidos orgánicos de la empresa ITALIMENTOS, presentó un 100 % de ausencia de *Salmonella* en 25 g de muestra. Por lo tanto cumple el criterio microbiológico establecido en la NTE INEN 2346:2010.

3.3 Determinación de *Salmonella spp* en las muestras de las canales de res

Los resultados fueron analizados de forma cualitativa, es decir, por observación de cambio de color o no en los pocillos de kit Tecra *Salmonella* VIA y se obtuvieron los siguientes datos.

3.3.1 *Salmonella spp* en las muestras de las canales de res antes del proceso de desinfección

Tabla 6: *Salmonella spp* en las muestras de las canales de res antes del proceso de desinfección

<i>Salmonella spp</i> antes del proceso de desinfección (Canales de res)		
Muestra	M 1	M 1.1
	* P/A en 25 g	* P/A en 25 g
1	Ausencia	Ausencia
2	Ausencia	Ausencia
3	Ausencia	Ausencia
4	Ausencia	Ausencia
5	Ausencia	Ausencia
6	Ausencia	Ausencia
7	Ausencia	Ausencia
8	Ausencia	Ausencia
* P/A: Presencia/Ausencia		

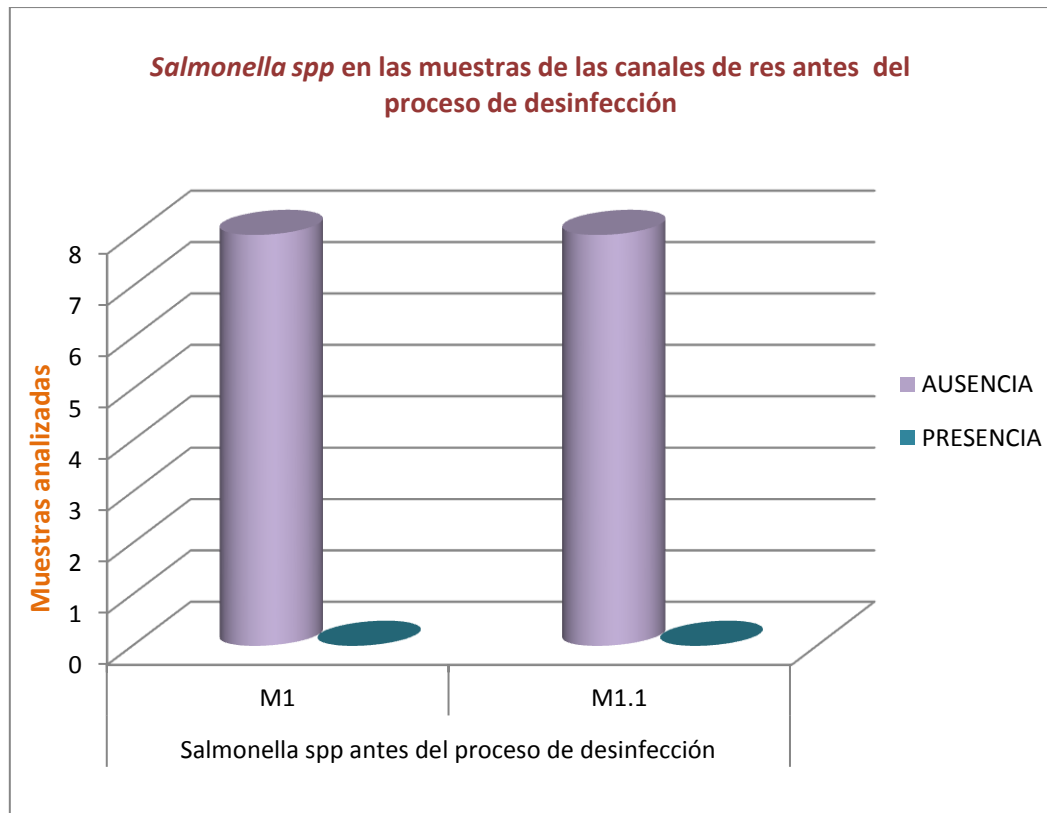


Gráfico 5: *Salmonella spp* en las muestras de las canales de res antes del proceso de desinfección

El análisis de *Salmonella spp* mediante la técnica visual inmunoensayo Tecra *Salmonella* VIA en las muestras y duplicados de las canales de res antes del proceso de desinfección con ácidos orgánicos de la empresa ITALIMENTOS, presentó un 100 % de ausencia de *Salmonella* en 25 g de muestra. Por lo tanto cumple el criterio microbiológico establecido en la NTE INEN 2346:2010.

3.3.2 Salmonella spp en las muestras de las canales de res después del proceso de desinfección

Tabla 7: *Salmonella spp* en las muestras de las canales de res después del proceso de desinfección

Salmonella spp después del proceso de desinfección (Canales de res)		
Muestra	M 1	M 1.1
	* P/A en 25 g	* P/A en 25 g
1	Ausencia	Ausencia
2	Ausencia	Ausencia
3	Ausencia	Ausencia
4	Ausencia	Ausencia
5	Ausencia	Ausencia
6	Ausencia	Ausencia
7	Ausencia	Ausencia
8	Ausencia	Ausencia
* P/A: Presencia/Ausencia		

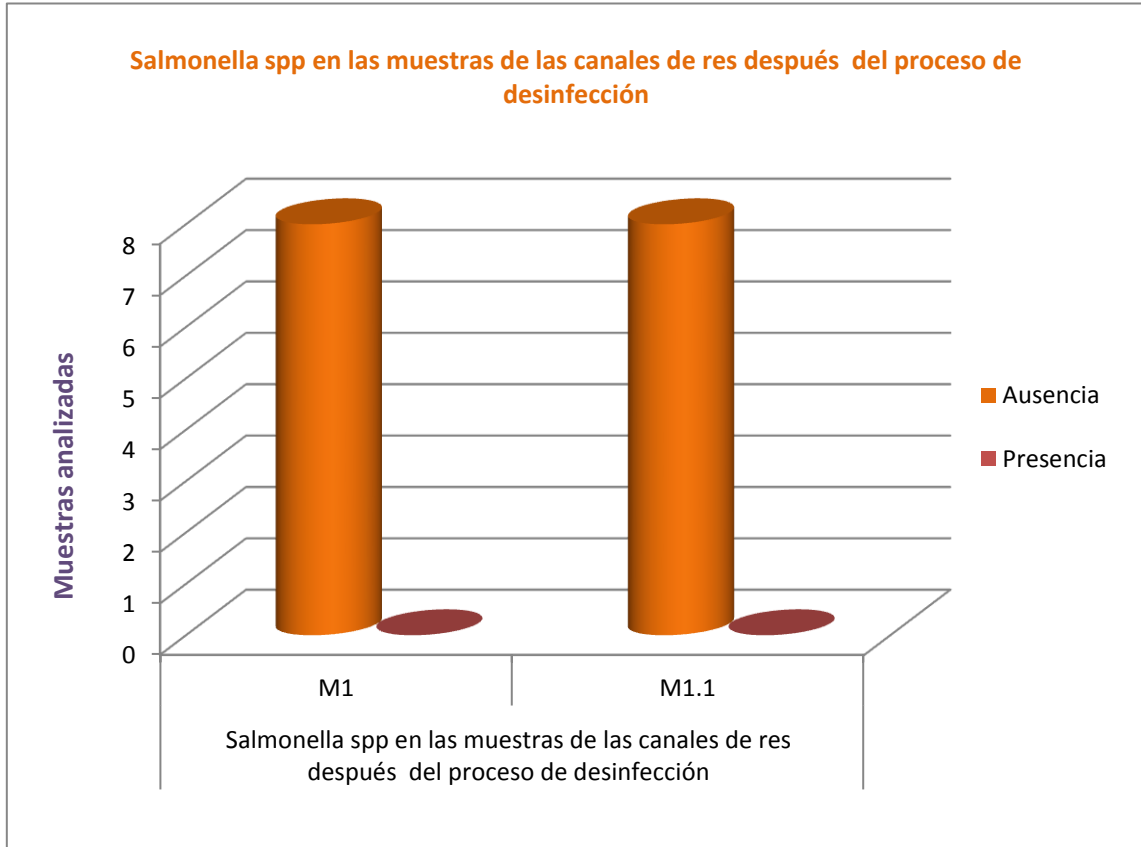


Gráfico 6: *Salmonella spp* en las muestras de las canales de res después del proceso de desinfección

El análisis de *Salmonella spp* mediante la técnica visual inmunoensayo Tecra *Salmonella* VIA en las muestras y duplicados de las canales de res después del proceso de desinfección con ácidos orgánicos de la empresa ITALIMENTOS, presentó un 100 % de ausencia de *Salmonella* en 25 g de muestra. Por lo tanto cumple el criterio microbiológico establecido en la NTE INEN 2346:2010.

3.4 Determinación de *Salmonella spp* en pollos

Los resultados fueron analizados de forma cualitativa, es decir, por observación de cambio de color o no en los pocillos de kit Tecra *Salmonella* VIA y se obtuvieron los siguientes datos.

3.4.1 *Salmonella spp* en las muestras de pollos

Tabla 8: *Salmonella spp* en las muestras de pollos

<i>Salmonella spp</i> en las muestras de pollos de pollos		
Muestra	M 1	M 1.1
	* P/A en 25 g	* P/A en 25 g
1	Ausencia	Ausencia
2	Ausencia	Ausencia
3	Ausencia	Ausencia
4	Ausencia	Ausencia
5	Ausencia	Ausencia
6	Ausencia	Ausencia
7	Ausencia	Ausencia
8	Ausencia	Ausencia
9	Ausencia	Ausencia
10	Ausencia	Ausencia
11	Ausencia	Ausencia
12	Ausencia	Ausencia
13	Ausencia	Ausencia
* P/A: Presencia/Ausencia		

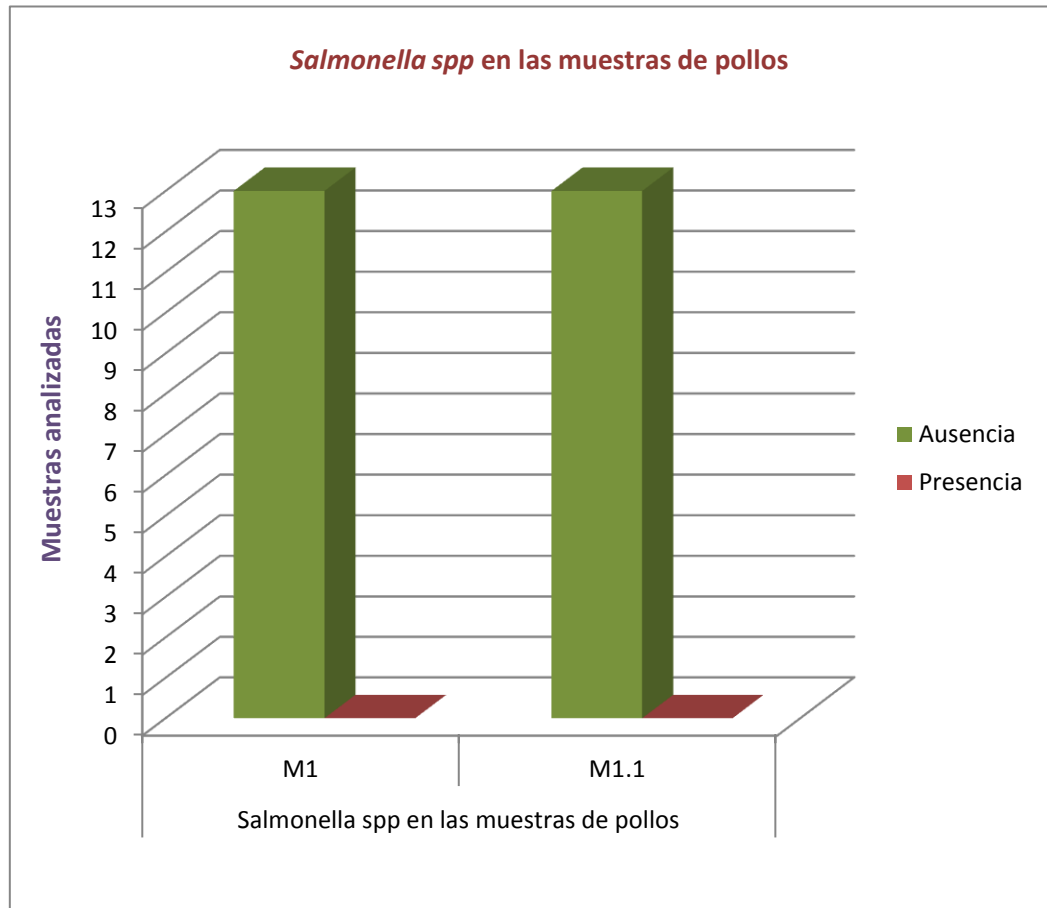


Gráfico 7: *Salmonella spp* en las muestras de pollos

El análisis de *Salmonella spp* mediante la técnica visual inmunoensayo Tecra *Salmonella* VIA en las muestras y duplicados de las muestras de pollos de la empresa ITALIMENTOS, presentó un 100 % de ausencia de *Salmonella* en 25 g de muestra. Por lo tanto cumple el criterio microbiológico establecido en la NTE INEN 2346:2010.

4. CONCLUSIONES

- Se determinó la ausencia de *Salmonella spp* en canales de cerdo y res en la empresa ITALIMENTOS, mediante la técnica Visual Inmunoensayo Tecra *Salmonella* VIA antes y después del proceso de desinfección con la mezcla de ácidos orgánicos, lo que cumple con el criterio microbiológico de la NTE INEN 2346:2010.
- Se determinó la ausencia de *Salmonella spp* en canales de pollo en la empresa ITALIMENTOS, mediante la técnica Visual Inmunoensayo Tecra *Salmonella* VIA, lo que cumple con el criterio microbiológico de la NTE INEN 2346:2010.
- Se verificó la efectividad del kit Visual Inmunoensayo Tecra *Salmonella* VIA mediante controles positivos por inoculación intencional en carne de res de una cepa activada de *Salmonella tiphyurium*
- Se instauró en la Empresa ITALIMENTOS la técnica Visual Inmunoensayo Tecra *Salmonella* VIA para la determinación de *Salmonella spp* en la materia prima cárnica.
- Se pudo verificar la efectividad de la mezcla de ácidos orgánicos utilizada por la Empresa ITALIMENTOS para disminuir la carga microbiana de las canales de cerdo y res.

5. RECOMENDACIONES

- Se recomienda el empleo de la técnica Visual Inmunoensayo Kit Tecra *Salmonella* VIA, para el análisis de materia prima cárnica ya que es un método rápido y confiable para la determinación de *Salmonella* y que puede ampliarse su uso en las distintas etapas de la cadena de producción y producto terminado.
- Se recomienda al laboratorio de la Empresa ITALIMENTOS la implementación de una cámara de flujo para que el trabajo sea optimizado de manera que se evite la contaminación cruzada por aerosoles que se forman al manipular los microorganismos.
- Se recomienda realizar este estudio con otro tipo de productos elaborados por la empresa con el fin de garantizar el cumplimiento de la NTE INEN 2346:2010.



6. BIBLIOGRAFÍA

1. **Cano F., Quan N.** *Técnicas de Análisis Microbiológico de Alimentos y Aguas.* Guatemala : INCAP doc Tec., 40 p., 1995.
2. **RANKEN, M. D.** *Manual de Industrias de la Carne.* Madrid (España) : AMV Ediciones, 2003. 201 p.
3. **EICHENBERGER, C., K. HOOVER, A. JOHNSEN Y J. MENK.** Sheep Processing Start to Finish. Univeristy of Purdue, Animal Sciences Department. [En línea] 2006. [Citado el: 15 de 12 de 2012.]
<http://ag.ansc.purdue.edu/sheep/ansc442/Semprojs/2004/process/index.htm..>
4. **SENER, F. y SCHERZ, H.** *Tabla de composición de Alimentos.* Zaragoza, España : Acrabia, 1999. 215 p.
5. **SEUB, I.** *Valor nutricional de la carne y de los productos cárnicos.* España : s.n., 1991. 50 p.
6. **OLIETE, B., MORENO, T., CARBALLO, J., MONSERRAT, L. y SÁNCHEZ, L.** *Estudio de la calidad de la carne de ternera de raza rubia gallega.* s.l. : Archivos zootecnia, 2006. Vol. 55. 3 - 14 p.
7. **HARGREAVES, A., BARRALES, L., PEÑA, I., LARRAÍN, R., y L. ZAMORANO.** *Factores que Influyen en el pH Ultimo e Incidencia de Corte.* s.l. : Ciencia e Investigación Agraria, 2006. 3: 155 - 166 p.
8. **PASCUAL, M., CALDERON, V.** *Microbiología Alimentaria, Metodología Analítica para Alimentos y Bebidas.* Madrid (España) : Diaz de Santos, Segunda edicion, 1999.
9. **Claudia, ARANGO y Diego, RESTREPO.** es.scribd. [En línea] 2009. [Citado el: 2013 de 03 de 2013.] es.scribd.com/doc/15554808/cap3-conservacion-de-la-carne.
10. **VON DE BECKE, Carlos.** Aprende en linea. [En línea] 19 de 05 de 199. [Citado el: 07 de 02 de 2013.]
http://aprendeonline.udea.edu.co/lms/moodle/file.php/424/Conservantes_en_alimentos.pdf.



11. **BAUTISTA, D. A., SILVESTER, N., BARBUT, S. Y GRIFFITHS M. W.** *The determination of efficacy of antimicrobial rinses on turkey carcasses using response surface designs.* s.l. : International Journal of Food Microbiology, 1997. 34, 279-292.
12. **TAMBLYN, K. C. y CONNER, D. E.** *Bactericidal activity of organic acids against Salmonella typhimurium attached to broiler chicken skin.* s.l. : Journal of Food Protection, 1997. Vol 60, No. 6, 629-633 p.
13. **WRAY, C., WRAY, A.** *Salmonella in Domestic Animals.* Oxon, (UK) : CABI Publishing, 2000.
14. **NAIR, S., KWAI LIN TANG, T. y ABWEEGG, M.** *Characterization of salmonella serovars.* 2002. 40, 2346-2351.
15. **PARRA, M., DURANGO, J., MATTAR, S.** *Microbiología, patogénesis, epidemiología, clínica y diagnóstico de las infecciones producidas por Salmonella.* Córdoba : MVZ, 2002.
16. **ZUÑIGA, A.** *Reacción de Widal- interpretación clínica.* s.l. : RevPanamInfectol, 2006.
17. **EFSA.** *The First Community Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses, Zoonotic Agents and Antimicrobial Resistance in the European Union in 2004.* [En línea] 2005. [Citado el: 15 de 12 de 2012.] http://www.efsa.europa.eu/en/science/monitoring_zoonoses/reports/1277.html.
18. **STANCHI, O.** *Microbiología Veterinaria.* Buenos Aires (Argentina) : Primera Edición. Editorial Intermedica, 2007.
19. **MANDELL, G. L., DOUGLAS, R. G., BENNETT, J. E.** *Principles and practice of infectious diseases.* New York : s.n., 2000. 2344-2357 p.
20. **JENSEN, A., LODAL, J., BAGGESEN, D.** *High diversity of Salmonella serotypes found in an experiment with outdoor pigs.* s.l. : Journal of Life Sciences, 2004.
21. **SCHWARTZ, K.** *Diseases of swine.* Iowa State University Press Ames : Edición octava, 1999.
22. **USERA, M., ALAUDEÑA, A., DÍAZ, R., DE LA FUENTE, M., CERDAN, P., GUTIERREZ, R., ECHEITA, A.** *Análisis de las cepas de Salmonella spp. aisladas de muestras de origen no humano en España en el año 2000.* España : s.n., 2001.



23. **GANTOIS, I., R., DUCATELLE, F., PASMANS, F., HAESEBROUCK, R., GAST, T. J., HUMPHREY, and VAN IMMERSEEL, F.** *Mechanisms of egg contamination by Salmonella Enteritidis.* . s.l. : FEMS Microbiology Reviews, 2009.
24. **BRYAN, F. L. and DOYLE, M.** *Health risks and consequences of Salmonella and Campylobacter jejuni in in raw poultry.* s.l. : Journal of Food, 1988. Vol. 3. 326 - 344 pag.
25. **JAY, James M.** *Microbiología Moderna de los Alimentos.* Zaragoza (España) : Acribia, 1988. 319 p.
26. **D´Aoust, J-Y.** *Salmonella and the international food trade.* s.l. : International Journal of food Microbiology, 1994. 24, 11-31.
27. **ICMSF, (International Commission on Microbiological Specifications for Foods of the International Union of Biological Societes).** *Salmonellae. Microorganisms in foods.* Inc. Gaithersburg, Maryland. U.S.A. : Microbiological specifications of food pathogens. Blackie Academic and Professional, 1996.
28. **THOLOZAN, J. L., RITZ, M., JUGIAU, F., FEDERIGHI, M. y TISSIER, J. P.** *Physiological effects of high hydrostatic pressure treatments on Listeria monocytogenes and Salmonella typhimurium.* s.l. : Journal of Applied Microbiology, 2000. Vol 88, No. 2, 202-212 p.
29. **DE MEDICI, D., PEZZOTTI, G., CACIOLO, D., FOSCHI, G., OREFICE, L.** *Comparison between ICS-Vidas, MSR/V and standard cultural method for Salmonella recovery in poultry meat.* s.l. : Int Journal Food Microbiology, 1998.
30. Food and drug administration. Bacteriological analytical manual. Chapter 5 Salmonella. [En línea] [Citado el: 20 de 12 de 2012.] www.fda.gov/Food/ScienceResearch/LaboratoryMethods/BacteriologicalAnalyticalManualBAM/ucm070149.htm..
31. **HURTADO, F.** *Obtención de un hidrolizado proteico utilizando excedentes de la industria pesquera y Agrícola. Ingeniero de Alimentos.* . s.l. : Escuela Superior Politécnica del Litoral. Facultad de Ingeniería Mecánica y Ciencias de la Producción, 2001.
32. **IVESON, J., KIVACS, N., LAURIE, W.** *An improved method of isolating Salmonella from contaminated desiccated coconut.* s.l. : Journal of Clinical Pathology, 1994.



33. **MURRAY, P., SSHAE, Y.** *Pocket Guide to Clinical Microbiology*. s.l. : 3rd edition. ASM Press, 2004.

34. **Instituto Nacional de Salud, Laboratorio Nacional de Referencia, Red Nacional de Laboratorios,**. *Manual de Procedimientos para el diagnóstico bacteriológico de Enfermedad Diarreica Bacteriana Aguda. Identificación de Salmonella, Shigella y Vibrio cholerae*. 2003.

35. **FENG, P.** *Appendix 1: Rapid methods for detecting foodborne pathogens*. En *Bacteriological Analytical Manual (BAM)*. FDA, Food and Drug Administration. : s.n., 2001.

7. ANEXOS

Anexo A

NORMA TÉCNICA ECUATORIANA (NTE INEN 2 346:2010)

CARNE Y MENUDENCIAS COMESTIBLES DE ANIMALES DE ABASTO.
REQUISITOS

Requisitos microbiológicos para la carne, aves y sus menudencias
comestibles

	n	C	m	M	Método
<i>Aerobios mesófilos</i> ufc/g	5	3	$1,0 \times 10^6$	$1,0 \times 10^7$	NTE INEN 1529-5
<i>Escherichia coli</i> ufc/g	5	2	$1,0 \times 10^2$	$1,0 \times 10^3$	NTE INEN 1529-8
<i>Stapilococcus aureus</i> ufc/g	5	1	$1,0 \times 10^2$	$5,0 \times 10^2$	NTE INEN 1529-14
<i>Clostridium sulfito reductores</i> ufc/g	5	1	$3,0 \times 10^1$	$1,0 \times 10^2$	NTE INEN 1529-18
<i>Salmonella</i> /25g	5	---	Ausencia	---	NTE INEN 1529-15

Donde:

n = número de unidades de la muestra

c = número de unidades defectuosas que se acepta

m = nivel de aceptación

M = nivel de rechazo

Criterios de aceptación y rechazo

Si la muestra ensayada no cumple con uno o más de los requisitos indicados en esta norma, se rechazará el lote.



Anexo B

Militar Standard

MTL STD-105F

(see 4.9.1 and 4.9.2)

TABLE I—Sample size code letters

Lot or batch size	Special inspection levels				General inspection levels		
	S-1	S-2	S-3	S-4	I	II	III
2 to 8	A	A	A	A	A	A	B
9 to 15	A	A	A	A	A	B	C
16 to 25	A	A	B	B	B	C	D
26 to 50	A	B	B	C	C	D	E
51 to 90	B	B	C	C	C	E	F
91 to 150	B	B	C	D	D	F	G
151 to 280	B	C	D	E	E	G	H
281 to 500	B	C	D	E	F	H	J
501 to 1200	C	C	E	F	G	I	K
1201 to 3200	C	D	E	G	H	K	L
3201 to 10000	C	D	F	G	J	L	M
10001 to 35000	C	D	F	H	K	M	N
35001 to 150000	D	E	G	J	L	N	P
150001 to 500000	D	E	G	J	M	P	Q
500001 and over	D	E	H	K	N	Q	R

CODI
LETTER:



MIL-STD-105E

TABLE II-C—Single sampling plans for reduced inspection (Master table)

(see 4.9.3 and 4.9.4)

Sample size ratio	Acceptable Quality Levels (indicated inspection)																										
	0.010	0.015	0.025	0.040	0.060	0.10	0.15	0.25	0.40	0.60	1.0	1.5	2.5	4.0	6.5	10	15	25	40	65	100	150	250	400	650	1000	
A	Ac	Ac	Ac	Ac	Ac	Ac	Ac	Ac	Ac	Ac	Ac	Ac	Ac	Ac	Ac	Ac	Ac	Ac	Ac	Ac	Ac	Ac	Ac	Ac	Ac	Ac	Ac
B	Ac	Ac	Ac	Ac	Ac	Ac	Ac	Ac	Ac	Ac	Ac	Ac	Ac	Ac	Ac	Ac	Ac	Ac	Ac	Ac	Ac	Ac	Ac	Ac	Ac	Ac	Ac
C	Ac	Ac	Ac	Ac	Ac	Ac	Ac	Ac	Ac	Ac	Ac	Ac	Ac	Ac	Ac	Ac	Ac	Ac	Ac	Ac	Ac	Ac	Ac	Ac	Ac	Ac	Ac
D	Ac	Ac	Ac	Ac	Ac	Ac	Ac	Ac	Ac	Ac	Ac	Ac	Ac	Ac	Ac	Ac	Ac	Ac	Ac	Ac	Ac	Ac	Ac	Ac	Ac	Ac	Ac
E	Ac	Ac	Ac	Ac	Ac	Ac	Ac	Ac	Ac	Ac	Ac	Ac	Ac	Ac	Ac	Ac	Ac	Ac	Ac	Ac	Ac	Ac	Ac	Ac	Ac	Ac	Ac
F	Ac	Ac	Ac	Ac	Ac	Ac	Ac	Ac	Ac	Ac	Ac	Ac	Ac	Ac	Ac	Ac	Ac	Ac	Ac	Ac	Ac	Ac	Ac	Ac	Ac	Ac	Ac
G	Ac	Ac	Ac	Ac	Ac	Ac	Ac	Ac	Ac	Ac	Ac	Ac	Ac	Ac	Ac	Ac	Ac	Ac	Ac	Ac	Ac	Ac	Ac	Ac	Ac	Ac	Ac
H	Ac	Ac	Ac	Ac	Ac	Ac	Ac	Ac	Ac	Ac	Ac	Ac	Ac	Ac	Ac	Ac	Ac	Ac	Ac	Ac	Ac	Ac	Ac	Ac	Ac	Ac	Ac
I	Ac	Ac	Ac	Ac	Ac	Ac	Ac	Ac	Ac	Ac	Ac	Ac	Ac	Ac	Ac	Ac	Ac	Ac	Ac	Ac	Ac	Ac	Ac	Ac	Ac	Ac	Ac
J	Ac	Ac	Ac	Ac	Ac	Ac	Ac	Ac	Ac	Ac	Ac	Ac	Ac	Ac	Ac	Ac	Ac	Ac	Ac	Ac	Ac	Ac	Ac	Ac	Ac	Ac	Ac
K	Ac	Ac	Ac	Ac	Ac	Ac	Ac	Ac	Ac	Ac	Ac	Ac	Ac	Ac	Ac	Ac	Ac	Ac	Ac	Ac	Ac	Ac	Ac	Ac	Ac	Ac	Ac
L	Ac	Ac	Ac	Ac	Ac	Ac	Ac	Ac	Ac	Ac	Ac	Ac	Ac	Ac	Ac	Ac	Ac	Ac	Ac	Ac	Ac	Ac	Ac	Ac	Ac	Ac	Ac
M	Ac	Ac	Ac	Ac	Ac	Ac	Ac	Ac	Ac	Ac	Ac	Ac	Ac	Ac	Ac	Ac	Ac	Ac	Ac	Ac	Ac	Ac	Ac	Ac	Ac	Ac	Ac
N	Ac	Ac	Ac	Ac	Ac	Ac	Ac	Ac	Ac	Ac	Ac	Ac	Ac	Ac	Ac	Ac	Ac	Ac	Ac	Ac	Ac	Ac	Ac	Ac	Ac	Ac	Ac
O	Ac	Ac	Ac	Ac	Ac	Ac	Ac	Ac	Ac	Ac	Ac	Ac	Ac	Ac	Ac	Ac	Ac	Ac	Ac	Ac	Ac	Ac	Ac	Ac	Ac	Ac	Ac
P	Ac	Ac	Ac	Ac	Ac	Ac	Ac	Ac	Ac	Ac	Ac	Ac	Ac	Ac	Ac	Ac	Ac	Ac	Ac	Ac	Ac	Ac	Ac	Ac	Ac	Ac	Ac
Q	Ac	Ac	Ac	Ac	Ac	Ac	Ac	Ac	Ac	Ac	Ac	Ac	Ac	Ac	Ac	Ac	Ac	Ac	Ac	Ac	Ac	Ac	Ac	Ac	Ac	Ac	Ac
R	Ac	Ac	Ac	Ac	Ac	Ac	Ac	Ac	Ac	Ac	Ac	Ac	Ac	Ac	Ac	Ac	Ac	Ac	Ac	Ac	Ac	Ac	Ac	Ac	Ac	Ac	Ac

Use first sampling plan unless otherwise specified. If sample size equals or exceeds lot or batch size, do 100 percent inspection.
 Ac = Acceptance number.
 Re = Rejection number.
 If the acceptance number has been exceeded, but the rejection number has not been reached, accept the lot, but initiate normal inspection. (see 4.9.4)

SINGLE REDUCED

Anexo C

Protocolo 2 - RV [R10] - Aprobado Método AOAC (998.09) Opción 2

Productos de alta carga microbiana por ejemplo, los alimentos crudos

Pre-Enriquecimiento

Añadir 25 g de la muestra a 225 ml de caldo lactosa.

Incubar a 35-37 °C durante 18-22 horas.

Lleve a cabo un Enriquecimiento Selectivo

Transferir 0,1 ml de pre-enriquecimiento (caldo Lactosa) en 9,9 ml de caldo rappaport vassiliadis (RV [R10]) precalentado.

Incubar a 41-43 °C durante 16-20 horas.

Lleve a cabo un post-Enriquecimiento

Transferir 1 ml de caldo rappaport vassiliadis (RV [R10]) en 10 ml de caldo M precalentado

Incubar a 35-37 °C durante 6-8 horas.

Realizar ELISA

Anexo D

Caldo Lactosa

Composición:

Peptona Gelatina.....	5,0 g
Polvo de extracto de carne.....	2,5 g
Peptona de carne.....	0,5 g
Lactosa.....	5,0 g

Preparación:

Disolver 13 g del medio en 1 L de agua destilada. Mezclar a fondo. Distribuir en los volúmenes requeridos y esterilizar en tratamiento en autoclave a 121 °C durante 15 minutos.

El pH final es de 6.7 - 7.1 a 25 °C.



Anexo E

Caldo Rappaport Vassiliadis R10 (RV [R10])

Composición:

Peptona caseína.....	4,54 g
Cloruro de magnesio (anhidro).....	13,4 g
Cloruro de sódico.....	7,2 g
Fosfato dihidrogenado de potasio.....	1,45 g
Verde de malaquita oxalato.....	0,036 g

Preparación:

Disolver los ingredientes en 1 L de agua destilada. Calentar ligeramente para disolver. Dispensar 9.9 ml en tubos y esterilizar durante 15 minutos a 115 °C.

El pH finales de 4.9-5.3 a 25 °C.

Anexo F

Caldo M

Composición:

Peptona caseína.....	12,5 g
Extracto de levadura.....	5,0 g
D-Manosa.....	2,0 g
Citrato de sodio.....	5,0 g
Cloruro de sódico.....	5,0 g
Fosfato de hidrógeno dipotásico (K ₂ HPO ₄).....	5,0 g
Cloruro de manganeso.....	0,14 g
Sulfato de magnesio.....	0,8 g
Sulfato ferroso.....	0,04
Polisorbato 80.....	0,75 g

Preparación:

Disolver el 36.2 g del medio en 1 L de agua destilada. Mezclar y calentar para disolver completamente. Distribuir en Alícuotas de 10 ml en tubos y esterilizar en autoclave a 121 °C durante 15 minutos.

El pH final es de 6.8 - 7.2 a 25 °C.

Anexo G

Ficha técnica (Tecra *Salmonella* VIA)

7. REAGENT PREPARATION FOR IMMUNOASSAY

Before using the TECRA SALMONELLA VIA, preparation of reagents is necessary.

⚠ Avoid cross-contamination of reagents. Ensure that caps for the reagent bottles are not inadvertently exchanged.

Wash Solution

Dilute the Wash Concentrate[1] to 2L with distilled or deionised water. For washing wells, a plastic squeeze bottle with a wide nozzle is recommended. Store the wash solution at 4°C when not in use. Ensure containers used for storing wash solution are thoroughly cleaned each time they are used. Where microbial contamination of water is a problem, the use of sterilised water is recommended.

Positive Control

In one step, transfer 3mL of the Control Diluent[3] to the Positive Control[2] vial. Replace the red stopper, screw the cap on firmly and then mix thoroughly.

Negative Control

The Control Diluent[3] remaining after reconstitution of the Positive Control[2] is used as the negative control.

Conjugate

Two sets of Conjugate[4] and Conjugate Diluent[5] are provided. Reconstitute only one set initially. Add all of the contents of the Conjugate Diluent[5] vial to the Conjugate[4] vial. Replace the red stopper and screwcap. Allow the Conjugate[4] to dissolve completely at room temperature.

- DO NOT SHAKE THE CONTENTS OF THE CONJUGATE VIAL VIGOROUSLY.
- RECORD THE DATE OF RECONSTITUTION ON THE BOTTLE LABEL.
- DISCARD RECONSTITUTED CONJUGATE AFTER 1 MONTH.

Substrate

Add the Substrate Diluent[7] to the Substrate[6]. Ensure that the contents have dissolved completely. The Reconstituted Substrate will appear colorless to pale green.

Stop Solution

The Stop Solution[8] is ready to use.

8. PERFORMING THE IMMUNOASSAY

Ensure all kit components are at room temperature (20-25°C) before use.

Step 1: Sample Heat Treatment

Single Selective Enrichment

Transfer 1mL of the M Broth sample into a labelled tube. Perform heat treatment as outlined below.

Other Enrichment

Transfer 0.5mL from each of the two M Broth tubes for that sample into a labelled tube. Perform heat treatment as outlined below.

Heat Treatment

Heat the M Broth for 15 minutes in a boiling water bath. Alternatively, place tubes in flowing steam in an autoclave (100°C) for 15 minutes. (DO NOT PLACE THE TUBES UNDER PRESSURE.) Cool the heated M Broths to room temperature.



Refrigerate the remaining unheated M Broth cultures as well as the selective enrichment cultures. These cultures can be used for confirmation of ELISA positive samples using standard plating methods.

Step 2: Preparing the Sample Wells

Open the pouch and remove the required number of wells from the sealing film, allowing one well for each sample, one for the positive control and one for the negative control. Press the wells firmly into place in the holder provided.

Replace unused wells in the foil pouch and reseal.

Step 3: Addition of Samples

Using a new pipette tip for each sample, transfer 200µL aliquots of the controls and samples into individual wells, recording the position of each sample on the Sample Record Sheet provided. Cover the wells with plastic cling wrap film and incubate for 30 minutes at 35-37°C.

Step 4: First Washing

⚠ Thorough washing of the wells is a critical step and is essential for a clear interpretation of results.

Emptying the Wells

To ensure the wells are not dislodged during washing, push them firmly into the holder.

Quickly invert the holder, emptying its contents into a waste container.

Remove residual liquid by striking the holder firmly several times face down on a thick pile of absorbent paper towels. This is important for effective removal of sample residue.

Filling the Wells with Wash Solution

Using a wide nozzle squeeze bottle held above the plate and a heavy stream of wash solution, completely fill each well, taking care not to trap air bubbles in the bottom of the wells.

⚠ Wash and completely empty the wells a total of three (3) times as outlined above.

Automatic ELISA plate washers can be used instead of manual washing. However, for satisfactory results it is essential that washers are programmed for use with this TECRA VIA.

CONSULT YOUR TECRA REPRESENTATIVE FOR SPECIFIC RECOMMENDATIONS ON AUTOMATIC WASHERS.

Step 5: Adding the Conjugate

Ensure the wells are empty before proceeding.

Add 200µL of Conjugate[4] to each well. Cover the holder with plastic cling wrap film and incubate for 30 minutes at 35-37°C.

Step 6: Second Washing

Empty the wells and wash them thoroughly a total of four (4) times (not three) using the sequence previously described in Step 4.

Step 7: Adding the Substrate

Ensure the wells are empty before proceeding.

Add 200 μ L of Substrate[6] to each well. Incubate at 20-25°C (room temperature). Do not incubate wells next to air-conditioning or in other locations where the temperature may vary from the acceptable range.

Color development tends to concentrate around the sides of the wells. Tap the holder gently to distribute the color evenly before reading the result.

Incubate for 10 minutes, then read the results.

⚠ At 10 minutes the Positive Control should be equivalent to either Panel 4 on the Color Card or at least 1.0 using a plate reader. Only extend the incubation beyond 10 minutes if the Positive Control has not yet reached Panel 4 or 1.0 as per Step 8.

Step 8: Reading the Results

Results can be read visually using the Color Card provided or with a plate reader.

Using the Color Card

⚠ Before proceeding, ensure that you are using Color Card 1.

Place the holder onto a white background, then compare individual wells with the Color Card.

After 10 minutes, if the color of the Positive Control[2] well is equivalent to Panel 4 on the Color Card, then proceed to Steps 9 and 10. Continue the substrate incubation only until the Positive Control[2] has reached an absorbance equivalent to Panel 4, then proceed to Steps 9 and 10.

If the absorbance has not reached a color equivalent to Panel 4 after 30 minutes, the test result cannot be used. Refer to the Trouble-shooting Guide before repeating test.

Using a Plate Reader

The absorbance of the samples can be read at 414 \pm 10nm using a plate reader.



Dual wavelength readers should be blanked against air and the second "reference" wavelength should be set at $490 \pm 10 \text{nm}$.

A single wavelength instrument should be blanked either on a well containing 200 μL of Substrate or water, or on the negative control well immediately after the addition of the Substrate to this well.

After 10 minutes, if the color of the Positive Control[2] well has a reading of at least 1.0, then proceed to Steps 9 and 10. Continue the substrate incubation only until the Positive Control[2] has reached an absorbance of 1.0, then proceed to Steps 9 and 10.

If the absorbance has not reached 1.0 after 30 minutes, the test result cannot be used. Refer to the Trouble-shooting Guide before repeating the test.

Step 9: Adding the Stop Solution

The addition of Stop Solution[8] is optional, but it should be added if a plate cannot be read immediately. Stop Solution[8] will slow the reaction rate down, however, results should be read within 30 minutes of its addition.

Add 20 μL of Stop Solution[8] to each well. Tap the sides of the holder gently to mix the contents, then read the result within 30 minutes.

Step 10: Interpreting the Results

Using the Color Card

FOR THE TEST TO BE VALID:

- the positive control must be at least as dark as Panel 4 on the Color Card AND ...
- the negative control must be within the negative range on the Color Card.

If these criteria have not been met the results cannot be used. Consult the Trouble-shooting Guide before repeating the test.

A sample is considered **NEGATIVE** when the test is valid and the sample well has a color within the negative range on the Color Card.

A sample is considered **POSITIVE** when the test is valid and the color in the sample well is greater than or equal to Panel 3 on the Color Card.



Using a Plate Reader

FOR THE TEST TO BE VALID:

- the positive control must have reached an absorbance of at least 1.0 AND ...
- the negative control must have an absorbance of less than 0.2.

If these criteria have not been met the results cannot be used. Consult the Trouble-shooting Guide before repeating the test.

A sample is considered **NEGATIVE** when the test is valid and the sample well has a reading less than 0.3.

A sample is considered **POSITIVE** when the test is valid and the sample well has a reading greater than or equal to 0.3.

Step 11: Confirming Positive Samples

Samples positive by the TECRA SALMONELLA VIA should be confirmed by streaking the retained M Broth and selective enrichment cultures (if appropriate) on standard identification media and by performing the standard biochemical and serological tests. This is especially important in situations such as product recalls.

Step 12: Disposal

When testing is completed, autoclave the wells at 121°C for at least 30 minutes or incinerate as special waste. Other kit components and the wells can then be sent for recycling or disposed of in accordance with local regulatory requirements.

elaborados por ITALIMENTOS Cia. Ltda.

alimentos
LA ITALIANA

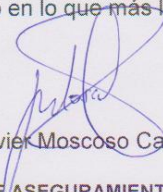
Cuenca, a 13 de junio de 2013

Yo, Ing. Javier Moscoso Calle, Jefe de Aseguramiento de Calidad de Alimentos La Italiana, en calidad de tutor

CERTIFICO

Que la señorita Lourdes Rocío Paucar Sánchez, con cédula de identidad 0104854211 y el señor Juan Carlos Tenecora Quito, con cédula de identidad 0105784151, estudiantes egresados de la Universidad de Cuenca, Facultad de Ciencias Químicas, Escuela de Bioquímica y Farmacia, realizaron en las instalaciones de ITALIMENTOS CIA, LTDA., la parte práctica de la tesis denominada **“Determinación de Salmonella spp en Materia Prima Cárnica de la Empresa Italimentos Cia Ltda, mediante la Técnica Visual Inmunoensayo Tecra Salmonella Via”**, cumpliendo satisfactoriamente los objetivos planteados inicialmente

Es todo lo que puedo afirmar en razón a la verdad, pudiendo los estudiantes tesistas dar uso en lo que más le convenga.


Ing. Javier Moscoso Calle

JEFE DE ASEGURAMIENTO DE CALIDAD