

**Análisis comparativo de *Enterobacteriaceae*,
prevalencia y cuantificación de *Salmonella* por el
sistema SalQuant para el biomapeo en
instalaciones comerciales de procesamiento
avícola**

Valeria Isabel Larios Carranza

Zamorano, Honduras

Noviembre, 2020

ZAMORANO
CARRERA DE AGROINDUSTRIA ALIMENTARIA

**Análisis comparativo de *Enterobacteriaceae*,
prevalencia y cuantificación de *Salmonella* por el
sistema SalQuant para el biomapeo en
instalaciones comerciales de procesamiento
avícola**

Proyecto especial presentado como requisito parcial para optar
al título de Ingeniera en Agroindustria Alimentaria en el
Grado Académico de Licenciatura

Presentado por

Valeria Isabel Larios Carranza

Zamorano, Honduras

Noviembre, 2020

Análisis comparativo de *Enterobacteriaceae*, prevalencia, y cuantificación de *Salmonella* por el sistema SalQuant para el biomapeo en instalaciones comerciales de procesamiento avícola

Valeria Isabel Larios Carranza

Resumen. En la industria avícola hoy en día se requiere conocer no solo la prevalencia de patógenos como *Salmonella*, sino también la concentración en la cual el patógeno está presente y su relación con otros microorganismos indicadores. En este experimento se trabajó con el sistema BAX® SalQuant para cuantificar *Salmonella* en diferentes etapas del proceso. Se recolectaron 214 enjuagues de canales pollo (400 mL) de dos plantas procesadoras en dos estaciones (Pre-enfriamiento y Post-enfriamiento). Se determinó la prevalencia y se estimó los Log₁₀ UFC/mL de *Salmonella* en enjuagues de canales de pollo. El método SalQuant obtuvo buenos resultados, 95.5% de sensibilidad, 96.9% de especificidad, comparado con el método oficial BAX System, utilizando tiempos de enriquecimiento menores que los métodos actuales. Se obtuvieron concentraciones medias de *Enterobacteriaceae* de 2 Log UFC/mL y concentraciones de *Salmonella* abajo de 2.5 Log UFC/mL. Se redujeron los niveles de *Salmonella* y *Enterobacteriaceae*, ambas plantas terminaron en 0.00 Log UFC/mL inmediatamente después de pasar por las zonas de enfriamiento y post-enfriamiento. Las zonas con mayor contaminación fueron las zonas después del eviscerado donde ocurren enjuagues solo con agua en rangos de 2 a 3.99 Log UFC/mL de *Enterobacteriaceae* con porcentajes de 81 a 87% de prevalencia de *Salmonella*. Se concluyó que el método SalQuant es eficiente y más rápido que los métodos actuales para la enumeración de *Salmonella*.

Palabras clave: Enjuagues de pollo, enumeración, sistema BAX.

Abstract. The poultry industry nowadays requires to know not only the prevalence of pathogens such as *Salmonella*, but also the concentration and its link with other indicator microorganisms. In this study, the BAX® SalQuant system was used to quantify *Salmonella* at different stages of the processing chain. 214 chicken carcass rinses (400 mL) were collected from two processing plants in two stations (Pre-chill and Post-chill). The prevalence was determined and *Salmonella* was estimated from chicken carcass rinses in Log₁₀ CFU/mL. The SalQuant method got good results, 95.5% sensitivity, 96.9% specificity, compared to the official BAX System method, using shorter enrichment times than current methods. Mean *Enterobacteriaceae* of 2 Log CFU/mL and *Salmonella* concentrations below 2.5 Log CFU/mL were obtained. *Salmonella* and *Enterobacteriaceae* levels were reduced, both plants finished at 0.00 Log CFU/mL immediately after passing through the chill and post-chill zones. The areas with the highest contamination were after evisceration where only occurs water rinses in ranges from 2 to 3.99 Log CFU/mL of *Enterobacteriaceae* with percentages of 81 to 87% of *Salmonella* prevalence. It was concluded that the SalQuant method is efficient and faster than current methods for the enumeration of *Salmonella*.

Key words: BAX® system, chicken rinses, estimation.

ÍNDICE GENERAL

Portadilla.....	i
Página de firmas.....	ii
Resumen.....	iii
Contenido.....	iv
Índice de Cuadros, Figuras y Anexos.....	v
1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. MATERIALES Y MÉTODOS.....	3
3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	8
4. CONCLUSIONES.....	19
5. RECOMENDACIONES.....	20
6. LITERATURA CITADA.....	21
7. ANEXOS.....	25

ÍNDICE DE CUADROS, FIGURAS Y ANEXOS

Cuadros Página

1.	Presencia de <i>Salmonella</i> en las plantas I y II	11
2.	Presencia de <i>Salmonella</i> en las plantas (I y II) por zonas (A-F) por medio de los métodos SalQuant y BAX®	12
3.	Falsos positivos y negativos por el método SalQuant en la planta I y II	12
4.	Resumen de concentración de <i>Enterobacteriaceae</i> (EB) en zonas de muestreo.....	13
5.	Resumen de muestras positivas a <i>Salmonella</i> según concentración de EB <i>Enterobacteriaceae</i> en zonas de muestreo	14

Figuras Página

1.	Diagrama de línea de procesamiento de aves. Las equis representan los puntos de muestreo	4
2.	Esquema de inoculación y diluciones de <i>Salmonella enteritidis</i> 13076	4
3.	Inoculación de <i>Salmonella enteritidis</i> 13076	5
4.	Esquema método de número más probable (NMP)	6
5.	Curva de regresión lineal para el nivel de inóculo y ciclos del umbral (CT Value).....	9
6.	Regresión lineal de valores inoculados y valores estimados con el modelo	10
7.	Relación de recuentos de <i>Enterobacteriaceae</i> y prevalencia de <i>Salmonella</i> en enjuagues de canal de las plantas I y II.....	14
8.	Relación de recuentos de <i>Enterobacteriaceae</i> y niveles de contaminación de <i>Salmonella</i> en enjuagues de canal de las plantas I y II.....	15
9.	Comparación de <i>Enterobacteriaceae</i> por zonas en las plantas I y II.....	16
10.	Comparación de niveles de <i>Salmonella</i> por el método SalQuant según de muestreo en las plantas I y II.....	17
11.	Comparación de porcentaje de prevalencia de SLM (<i>Salmonella</i>) por zonas en las plantas I y II.....	18

Anexos Página

1.	Separación de medias LSMEAN para EB (enterobacterias) por plantas y zonas.....	25
2.	Análisis de varianza (ANDEVA) para <i>Salmonella</i> de las dos plantas procesadoras.....	25
3.	Tabla de contingencia	26
4.	Separación de medias LSMEAN para <i>Salmonella</i> por plantas y zonas.....	26
5.	Análisis de correlación para EB (enterobacterias) y <i>Salmonella</i> (SalQuant).....	27
6.	Prueba de Mc Nemar en el programa estadístico SAS	27
7.	Prueba de chi-cuadrado en porcentajes de prevalencia de <i>Salmonella</i>	28
8.	Probabilidad de chi-cuadrado entre entre zonas (A-F) de las plantas I y II.....	29

1. INTRODUCCIÓN

Las enfermedades transmitidas por los alimentos (ETA) son de los riesgos principales con los que la industria alimentaria combate diariamente. En la industria de los alimentos para garantizar que los productos finales sean seguros para el consumo humano, constantemente se utilizan pruebas de rutina al igual que intervenciones antimicrobianas. La contaminación por patógenos en los alimentos causa mucha preocupación hacia los consumidores. *Salmonella*, perteneciente a la familia *Enterobacteriaceae*, es una de las principales causas bacterianas de enfermedades transmitidas por los alimentos en los Estados Unidos. Las aves de corral y los productos avícolas se asocian comúnmente con la *Salmonella* (Akil y Ahmad 2019).

Salmonella spp. es una bacteria común encontrada en el tracto gastrointestinal de las aves de corral que ha causado 1.2 millones de enfermedades, 23,000 hospitalizaciones y 450 muertes cada año en los Estados Unidos. Sin embargo, cabe recalcar que la mayoría de estas mismas enfermedades, hospitalizaciones y muertes son causadas por alimentos (Akil *et al.* 2019). *Salmonella* spp. causa una gran preocupación para la salud pública, por lo tanto, es necesario el control de esta bacteria (Bailey *et al.* 2020). Las intervenciones son necesarias en las líneas de procesamiento, para reducir la contaminación por este patógeno ya que estas controlan el riesgo de tener más personas infectadas con el patógeno debido al consumo de productos avícolas (Bailey *et al.* 2020).

La resistencia por parte de especies de *Salmonella* a antimicrobianos ha aumentado en todo el mundo (Aljindan *et al.* 2020). El aislamiento persistente de *Salmonella* entérica en muestras de canales de pollo se ha relacionado con un brote activo de salmonelosis en humanos (Nair *et al.* 2018). Según Painter, en el 2013 hubo alrededor de un 33% de casos de salmonelosis relacionados con los alimentos y el 58% de ellos provienen de productos avícolas (Painter *et al.* 2013).

Las técnicas moleculares, como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR “por sus siglas en inglés que significan Polymerase Chain Reaction”), son usadas para la detección de *Salmonella*. La técnica de PCR puede obtener resultados positivos o negativos en 24 horas a comparación con los métodos de cultivo tradicionales que requieren de 5 a 7 días, e implican enriquecimiento no selectivo, enriquecimiento selectivo, aislamiento selectivo y confirmación serológica y bioquímica (Koyuncu *et al.* 2010). A pesar de que los resultados de prevalencia (presencia o ausencia) son significativos, aún se desconoce los niveles de *Salmonella* en las canales de aves de corral. Este tipo de metodologías (prevalencia) no expone completamente la contaminación por el patógeno en las canales de pollo.

La industria avícola avanza impulsándose hacia métodos de cuantificación como la confirmación del cultivo. Sin embargo, estos métodos ya se están volviendo obsoletos. El sistema “BAX®” funciona amplificando o replicando fragmentos de ADN bacteriano para mejorar la detección, lo cual hace que el método sea simple y rápido para la detección de bacterias patógenas en los alimentos (Belete *et al.* 2014).

El sistema “BAX® SalQuant” es un nuevo método de enumeración para *Salmonella*, puede proporcionar resultados cuantitativos dentro de 6 horas posteriores a la incubación de los enjuagues de canales de aves de corral en todas las etapas de la cadena de procesamiento.

Para el control de *Salmonella* en instalaciones avícolas, las nuevas regulaciones requieren que se controlen las operaciones de procesamiento, implementando procedimientos escritos para asegurar que las canales de aves contaminadas con materia fecal visible no ingresen al enfriador (9 CFR 381.65 inciso (f)). Los establecimientos oficiales para aves de corral hacen muestreos frecuentes por cada 22,000 canales y como mínimo una vez durante cada semana. Los reportes diarios de estas actividades son exigidos en inspecciones y requeridos para el mantenimiento y control del estado microbiológico de la canal (9 CFR 381.65 inciso (g)). Actualmente, en los establecimientos de procesamiento de aves de corral se realizan biomapeos de *E. coli* genérica, muestreando distintos sitios a lo largo de la cadena de procesamiento, ya que este organismo indicador rastrea la contaminación fecal (9 CFR 381.65 inciso (g)). Existen otros microorganismos que se pueden utilizar para el biomapeo dentro de la cadena de procesamiento, como los coliformes, y las enterobacterias.

Es necesario conocer los niveles de *Salmonella* en productos terminados de aves de corral destinados a los supermercados. La estimación de los niveles de *Salmonella* sería beneficiosa para examinar la cadena de procesamiento e identificar áreas problemáticas. Los objetivos de este estudio fueron:

- Crear un modelo de ajuste lineal utilizando el sistema BAX® SalQuant que pueda estimar la cantidad de *Salmonella* por mL de enjuague.
- Evaluar el modelo con enjuagues de canales de pollo a lo largo de la cadena de procesamiento de aves de corral y su relación con los niveles de enterobacterias como grupo indicador.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

Ubicación del estudio

El proyecto se llevó a cabo en el mes de enero, en el Laboratorio del Centro Internacional de Excelencia en Seguridad Alimentaria (ICFIE sus siglas en inglés) en la Universidad de Texas Tech, ubicada en la ciudad de Lubbock, Texas, Estados Unidos.

Descripción de proceso y zonas de muestreo

Las plantas procesadoras de aves de corral cuentan con una línea de proceso efectiva. El procesamiento de las aves de corral comienza con la recepción de materia prima, que en este caso es el animal vivo y entero. Al ave se le corta la vena yugular y la arteria carótida para que se desangre durante un periodo de tiempo estipulado, dependiendo del tamaño y especie del pollo. El ave es sometida a temperaturas de 50 °C de agua caliente, que suaviza la piel del animal para facilitar el desplumado (Koyuncu *et al.* 2010). Las patas del ave se remueven al igual que la cabeza y luego proceden a extraer las vísceras. Cabe recalcar que este proceso es inspeccionado por el departamento de agricultura de los Estados Unidos (USDA, por sus siglas en inglés). Al terminar, después que la canal de pollo ha sido limpiada se pre-enfría y entra por último a la fase de post-enfriamiento.

Para realizar este proyecto, dos plantas (I y II) procesadoras de aves de corral fueron seleccionadas. Estas procesadoras cuentan con un proceso dividido en ocho etapas o estaciones por las que pasa el pollo antes de ser comercializado y disponible para la venta. Sin embargo, este proyecto se enfoca solo en dos etapas pre-enfriamiento y post-enfriamiento. En la etapa de pre-enfriamiento se dividió en cuatro zonas designadas **A** (enjuague con agua), **B** (previo al ácido peracético), **C** (después del ácido peracético), y **D** (enjuague con agua por dentro y fuera). La etapa de post-enfriamiento se dividió en dos zonas **E** (enfriamiento 1.5-4.4 °C) y **F** (re-colgado 4.4 °C) (Figura 1).

Toma de muestras

Para este estudio se recolectaron 214 muestras de dos procesadoras de canales de pollo. En la planta I se recolectaron 154 muestras y en la planta II 60, debido a que la planta I procesa una mayor cantidad de canales a comparación de la planta II. Las canales de aves fueron escogidas al azar por el personal y luego colocadas en bolsas estériles (37.5 × 50 cm) para enjuagar con 400 mL de agua de peptona tamponada (BPW sus siglas en inglés). Las muestras de enjuague se depositaron en frascos de plástico estériles de aproximadamente 1000 mL, que luego fueron transportados al laboratorio.

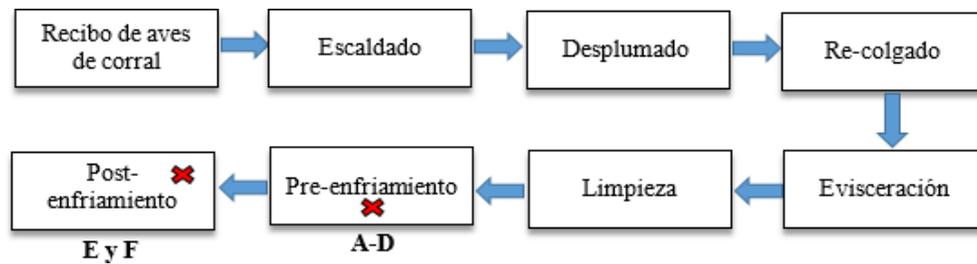


Figura 1. Diagrama de línea de procesamiento de aves. Las equis representan los puntos de muestreo.

Zonas: **A** (enjuague con agua), **B** (previo al ácido peracético), **C** (después del ácido peracético), **D** (enjuague con agua por dentro y fuera), **E** (enfriamiento 1.5 - 4.4 °C) y **F** (re-colgado 4.4 °C).

Desarrollo de la curva SalQuant para cuantificación de *Salmonella* en enjuagues de canal de pollo

Preparación del inóculo. Se utilizó la cepa *Salmonella enteritidis* 13076, esta se inoculó en un tubo con 9 mL de BHI (“Brain Heart Infusion en inglés”), se incubó a 37 °C durante un periodo de 24 horas para obtener aproximadamente 9 Log₁₀ UFC/mL en el tubo. Luego, se hicieron ocho diluciones de 1mL (10⁻⁹-10⁻¹ Log₁₀ UFC/mL) en tubos de 9 mL con BPW (Figura 2).

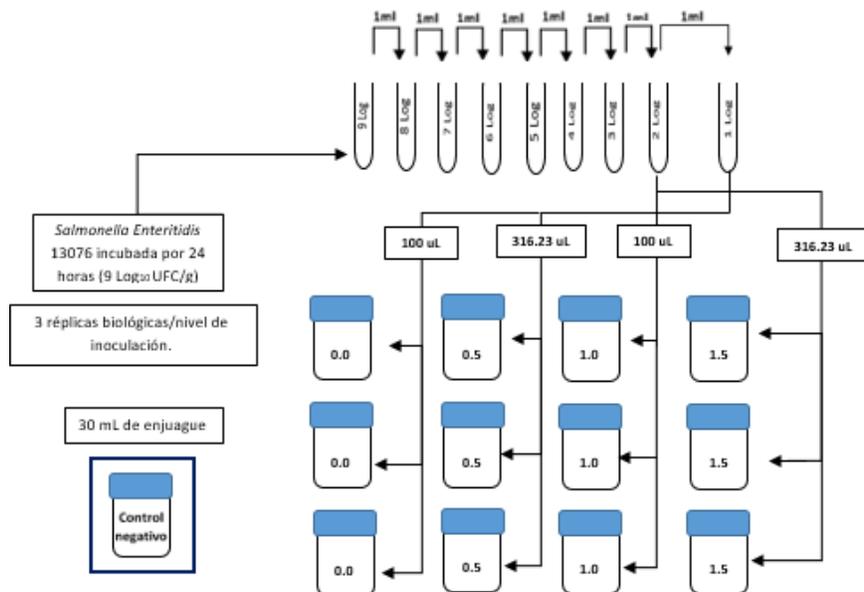


Figura 2. Esquema de inoculación y diluciones de *Salmonella enteritidis* 13076. Se inoculó de los dos últimos tubos (1 Log-2 Log).

Inoculación de enjuagues para SalQuant. Se utilizaron los enjuagues de canales (400 mL) del punto de muestreo de post-enfriamiento (Zonas E - F) de la planta II, considerando que son los

puntos con menor contaminación de *Salmonella*. Se mezclaron todos los enjuagues en un frasco de vidrio esterilizado de 2000 mL. Luego se colocaron porciones de 30 mL de esa misma mezcla en 13 bolsas estériles de “Whirl-Pak®” con filtro (tres repeticiones por cada nivel de inóculo y un control negativo). En cada una de las bolsas con enjuague, se añadió una proporción de 100 µL ó 317 µL dependiendo del nivel del inóculo (Figura 3). Se agregó 30 mL de caldo BAX MP con novobiocina (40 mg/L) a todas las muestras ya inoculadas y se mezclaron agitándolas manualmente.

Concentración deseada del inóculo (Log UFC/30mL)	Volumen a inocular en 30 mL de enjuague
0.0	100 µL de 1 Log UFC/30 mL
0.5	317 µL de 1 Log UFC/30 mL
1.0	100 µL de 2 Log UFC/30 mL
1.5	317 µL de 2 Log UFC/30 mL

Figura 3. Inoculación de *Salmonella enteritidis* 13076.

Cuantificación de *Salmonella* por SalQuant. Usando ya las muestras homogenizadas (enjuague con medio BAX MP con novobiocina), se incubaron a 42 °C durante 10 y 12 horas. Cada hora estipulada (10 y 12 horas) tiene un control negativo. Previo a correr las muestras en BAX®, se transfirieron 5 µL de estas (cinco lisados) en pequeños tubos de plástico con 200 µL del reactivo de lisis. Los tubos se calentaron a 37 °C por 20 minutos, pasaron a una temperatura más alta de 95 °C por 10 minutos y al final se dejaron enfriando por 5 minutos en un bloque frío. Al finalizar este proceso las muestras son corridas en el sistema BAX®. Al terminar, se registraron y analizaron los valores positivos del ciclo umbral. Los resultados se expresaron en células/30 mL de enjuague.

Cuantificación de *Salmonella* por el Número Más Probable (NMP). Se colocaron 40 mL de mezcla de enjuagues de las canales de pollo en cinco tubos de plástico estériles de 50 mL, uno por cada nivel de inoculación (Figura 3) más un control negativo. De cada tubo inoculado se utilizaron nueve tubos (tres vacíos y seis con 9 mL de BPW) para cada nivel de inoculación (0.0, 0.5, 1.0 y 1.5 Log₁₀ UFC/30 mL) y un control negativo con muestras no inoculadas del enjuague mezclado. A los tubos vacíos se les agregó 10 mL del enjuague y a los restantes 1 mL y 0.1 mL (Figura 4). Esta enumeración se condujo bajo la técnica del Número Más Probable para combinaciones de series de tres tubos por dilución usando cantidades de 10, 1 y 0.1 mL (Tabla 1, de la Guía de Laboratorio de Microbiología Apéndice 2.05 (USDA y FSIS 2014). Se incubaron a 37 °C durante 24 horas, después se corrió en el sistema BAX® para determinar presencia o ausencia.

Análisis de datos. Se elaboró una curva de regresión lineal en JMP® v.14.3.0. La curva lineal se comparó por cada nivel de inoculación. Se crearon curvas de regresión lineal para cada tiempo de incubación (10 y 12 h). Se estimó R-Cuadrado (R²) y el Error cuadrático medio de cada tiempo de incubación.

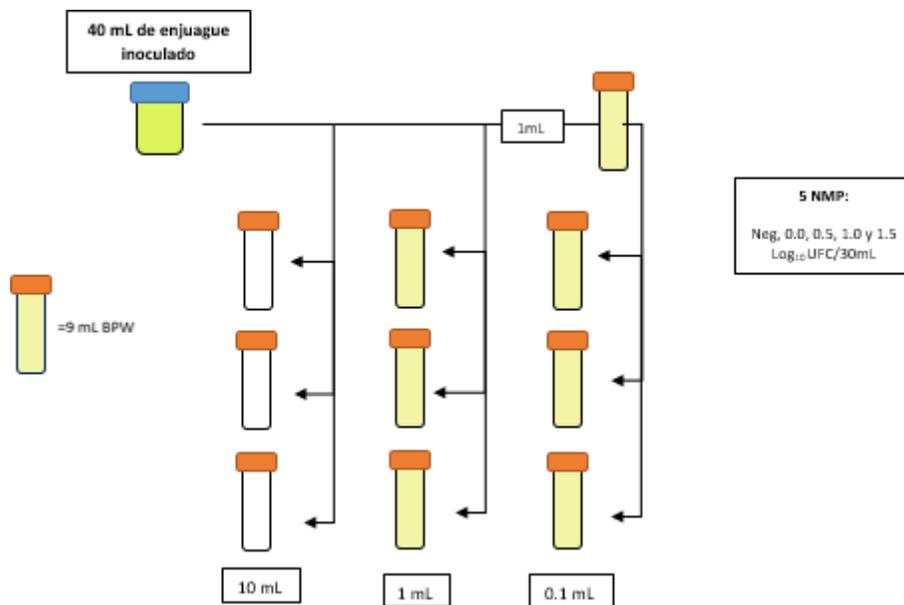


Figura 4. Esquema método de número más probable (NMP).

Validación de la curva de SalQuant en muestras de enjuague de pollo

Se utilizaron 214 muestras de enjuague (400 mL) de las estaciones de pre-enfriamiento (Zonas A-D) y post-enfriamiento (Zonas E-F) de las plantas I y II. A cada muestra de enjuague se le determinó: cuantificación de *Salmonella* usando la curva de SalQuant; Presencia/ausencia de *Salmonella* por BAX[®]; cuantificación de *Salmonella* por el NMP; y recuentos de enterobacterias.

Cuantificación de *Salmonella* usando la curva de SalQuant. Se inició agregando 30 mililitros de los enjuagues de cada zona en una bolsa “Whirl-Pak[®]” mezclada después con 30 mL de “BAX MP” precalentado a 42 °C con 40 mg/L de novobiocina e incubadas a 42 °C durante 6 y 18 horas. Después de cada tiempo de incubación se corrieron las muestras por el sistema “BAX[®]” para *Salmonella*. Las muestras de 6 horas de incubación se procesaron a través de la ecuación de ajuste lineal del desarrollo de la curva para estimar *Salmonella* y después corridas en el sistema BAX[®] para determinar presencia/ausencia. Los resultados se expresaron en Log UFC/mL mediante la ecuación.

Para el NMP, se realizó como se describió previamente, serie de tres tubos con porciones de muestras de 10, 1 y 0.1 mL. Las muestras se incubaron a 37 °C hasta cumplir las 24 horas, para realizar la prueba de prevalencia con el sistema BAX. Cada muestra tiene su recuento por el método de número más probable (NMP) para evaluar los niveles de *Salmonella*.

Recuentos de enterobacterias. En cada enjuague se determinó el recuento de enterobacterias, utilizando diluciones decimales del enjuague y sembrando en 3M[™] placas petri (Conteos para *Enterobacteriaceae*) con el medio Rojo Bilis Violeta más glucosa. Se incubaron a 37 °C por 24 horas, se contaron los datos, y fueron registrados.

Diseño experimental y análisis estadístico

Se realizaron dos regresiones lineales, utilizando el método de cuantificación SalQuant y los ciclos positivos del umbral en el PCR. Se estimó el R-Cuadrado (R^2) y el Error cuadrático medio por cada tiempo de incubación a través del programa estadístico JMP® v.14.3.0. Para el análisis microbiológico en los diferentes puntos de muestreo se utilizó un Diseño Completamente al Azar (DCA) tomando en cuenta dos factores (Dos plantas procesadoras y seis zonas de muestreo). Se hizo una separación de medias LSMEAN según los niveles de enterobacterias y cuantificación de *Salmonella* de las muestras positivas entre plantas y zonas usando el programa estadístico SAS® versión 9.4. Para comparar la diferencia entre métodos (SalQuant y BAX®) se realizó también la prueba de Mc Nemar en SAS®. Las prevalencias de *Salmonella* en cada planta se compararon mediante una prueba de Chi cuadrado y para determinar la relación entre *Salmonella* y *Enterobacteriaceae* de las muestras se hizo un análisis de correlación. En todos los análisis se usó un nivel de significancia de 0.05.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Desarrollo de la curva SalQuant para cuantificación de *Salmonella* en enjuagues de canal de pollo

La detección de *Salmonella* spp. es realizada por métodos convencionales y automatizados, son distintos en cuanto al tiempo de emisión de los resultados (Burgos y Alberti 2018). El modelo de ajuste lineal con el método de cuantificación SalQuant, comparó exitosamente la diferencia entre tiempos de incubación (10 y 12 horas), considerando los siguientes factores: el número de ciclos que se dieron por valores positivos en el sistema BAX® y el nivel de inoculación de las muestras. El sistema BAX® para *Salmonella* está certificado por la metodología oficial e internacional AOAC 2013.02 (AOAC) para detectar *Salmonella* en diversos alimentos y en ambientales superficies.

En la Figura 5 se muestran las curvas de cuantificación entre los dos tiempos de incubación del enriquecimiento de la muestra (10 y 12 horas). El ajuste del modelo fue muy bueno, ya que en la línea de regresión de 12 horas se obtuvo un R^2 de 0.82, expresando que el 82% de los datos se ajustaron al modelo lineal. El cuadrado medio del error del modelo fue de 0.93 y demostró la diferencia entre los valores. El 64% de las observaciones en la regresión lineal de 10 horas se ajustaron al modelo y se obtuvo un RMSE de 0.98 que indica la dispersión de mis datos con respecto a la curva.

Entre más alto son los valores positivos del ciclo umbral en el PCR menor es la concentración del inóculo y viceversa, entre más bajos sean los valores positivos del ciclo, mayor es la concentración del patógeno. El equipo realizó más ciclos con muestras incubadas por 10 horas que con las de 12 horas, ya que la concentración de la bacteria era menor y requería más tiempo para llegar al umbral de detección durante ese período de incubación (Figura 5).

En estudios previos de pollo molido crudo no reportaron diferencia significativa entre lotes con los métodos de detección para *Salmonella*: el sistema BAX® y el método de NMP con un nivel de referencia de < 0.03 UFC/g por el total de lotes (Silbernagel *et al.* 2003). La contaminación de *Salmonella* en las plantas avícolas se controla a medida las canales cruzan por las estaciones de lavado y desinfección con antimicrobianos. Sin embargo, algunos autores sugieren que los antimicrobianos no sean utilizados para controlar la infección de *Salmonella* en las canales de ave de corral debido a que el tratamiento es limitado y puede enmascarar la bacteria en muestreos (Guillon 2019).

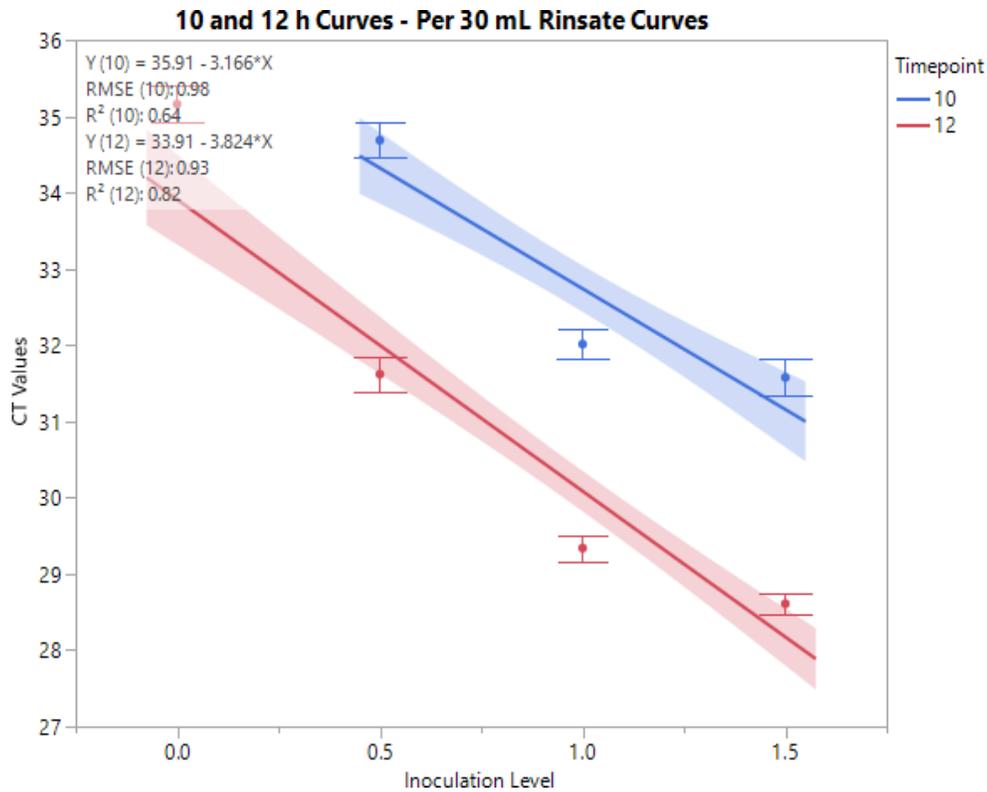


Figura 5. Curva de regresión lineal para el nivel de inóculo y ciclos del umbral (CT Value). Comparación de los tiempos (10 y 12 horas) según los ciclos del sistema BAX[®] por nivel de inoculación. El nivel de inoculación está expresado en Log UFC/30mL.

RMSE (Error cuadrático medio en español) es una medida de dispersión que indican que tan concentrados están los datos alrededor de la línea de regresión.

CT Values (valor del ciclo umbral en español) es el número de ciclos en que la fluorescencia que genera el sistema BAX[®] cruza el umbral y la muestra da positivo.

En la Figura 6 se reporta el estimado de concentración de *Salmonella* que se obtuvo por medio de la ecuación del método SalQuant en cada nivel de inoculación con la comparación de regresión lineal que se obtuvo de acuerdo a los tiempos (10 y 12 horas). La bacteria llegó a ser detectada por el equipo en menos tiempo, cuando la concentración del inóculo era mayor (1.5 Log UFC/30mL). Los dos tiempos de incubación obtuvieron un R² de 0.66 en 10 horas y 0.69 en 12 horas por lo tanto, demuestran que el 66 y 69% de los datos se ajustaron al modelo lineal. Estos resultados evidencian que no hay una diferencia elevada entre tiempos de incubación. El RMSE midió la cantidad de error entre los datos, siendo a las 10 horas de 0.31, obteniendo después una reducción a las 12 horas con 0.24 lo que significa que los valores son mas cercanos entre sí.

El experimento basado en el tiempo de incubación de 12 horas fue más efectivo en cuanto a la cuantificación de niveles bajos de *Salmonella*, ya que pudo alcanzar la detección y el estimado de *Salmonella* en la muestra con una concentración de 0.0 Log UFC/30mL con menos ciclos por parte del equipo a comparación del de 10 horas. Sin embargo, el tiempo de incubación de 10 horas fue más eficiente en tiempo con las otras concentraciones (0.5, 1.0, 1.5 Log UFC/30mL) ya que detectó la bacteria y obtuvo un estimado de estas en menos tiempo.

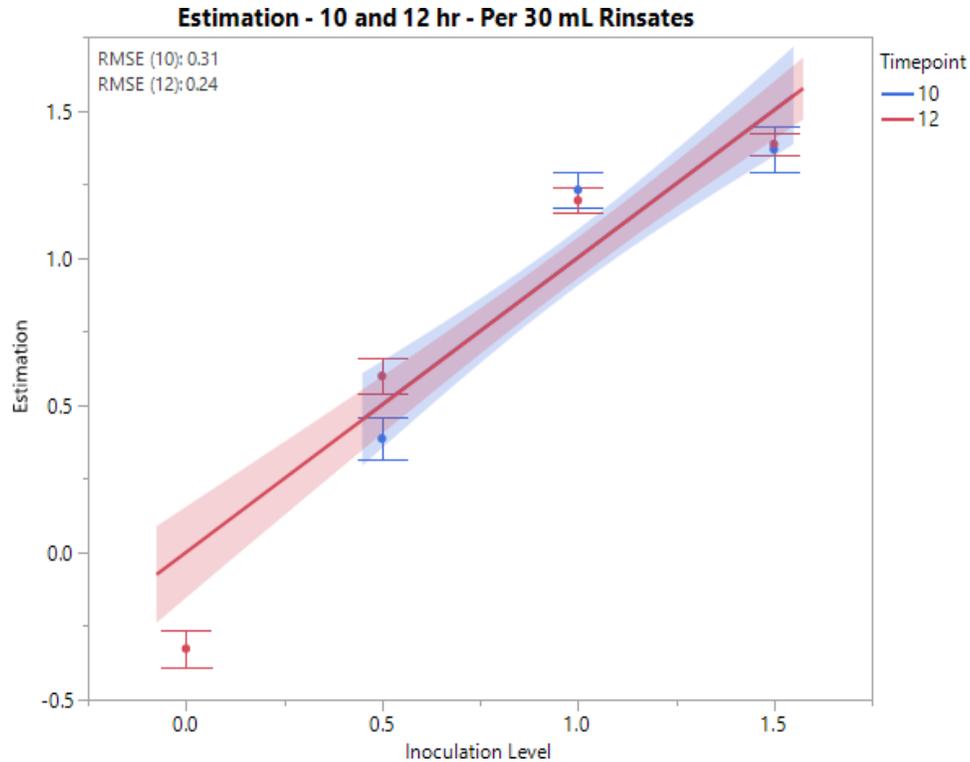


Figura 6. Regresión lineal de valores inoculados y valores estimados con el modelo. Comparación de los tiempos (10 y 12 horas) por la ecuación del método SalQuant y el nivel de inoculación (expresado en Log UFC/30 mL). $R^2(10)$: 0.66 y $R^2(12)$: 0.69.

Los resultados rápidos de estos métodos son necesarios e importantes para la salud pública. Así mismo, estudios mencionan que los métodos de detección rápida mantienen el enfoque de identificar metabolitos, genes y reacciones específicas de la bacteria, de esa manera reducen el tiempo de espera en comparación a métodos convencionales, con un periodo de tiempo mayor (Burgos *et al.* 2018).

Validación de la curva de SalQuant en muestras de enjuague de pollo

Existen diferentes metodologías para evaluar el estado microbiológico de las aves de corral durante su procesamiento. Los métodos convencionales para detección de bacterias se basan en el desarrollo del microorganismo en medios de cultivo (Burgos *et al.* 2018). La Guía de Laboratorio de Microbiología del USDA, MLG 4.10 (USDA y FSIS, 2014) son las regulaciones oficiales que se utilizaron para la recolección de muestras de este estudio al igual, que la guía del FSIS (Food Safety and Inspection Service) para pruebas microbianas (USDA-FSIS 2015). La identificación bioquímica de *Salmonella* se realiza generalmente junto con una confirmación serológica (Burgos *et al.* 2018). En las dos plantas procesadoras de canales de aves se obtuvieron 81 muestras positivas y 127 muestras negativas por medio de los resultados de prevalencia en BAX[®]. Así mismo, se obtuvieron 62 muestras positivas por el método SalQuant y 152 negativas (Cuadro 1). Según estudios además de las intervenciones o antimicrobianos utilizados en las canales de pollo entero las buenas prácticas de manufactura (BPM) y los procesos operativos estandarizados de

sanitización (POES) permiten obtener un producto final que cumple los requisitos de higiene (NACMCF 2014).

Cuadro 1. Presencia de *Salmonella* en las plantas I y II.

Planta	# Positivas SalQuant 6 horas	# Positivas BAX®	# Negativas SalQuant 6 horas	# Negativas BAX®
I	56	57	98	97
II	28	31	32	29
Total	84	88	130	126

El método SalQuant es mejor que los métodos convencionales y comparándolo con el PCR se obtuvieron buenos resultados, tomando en cuenta que son cercanos a los valores predictivos 95.5% (+) y 96.9% (-) con 100% de sensibilidad, 96.9% de especificidad, 32.5% de tasa de falsos positivos y un 0% de falsos negativos. Al evaluar los datos y aplicar la prueba de Mc Nemar se determinó que no existe diferencia significativa entre los métodos evaluados ($P \leq 0.05$) por lo tanto, no se rechaza la hipótesis nula e indica que las sensibilidades de las pruebas son iguales. Experimentos previos similares a la metodología demuestran que el método “Assurance GDS System” obtuvo sensibilidad de 85 a 81% de especificidad, 19% tasa de falsos positivos y un 15% en la tasa de falsos negativos y no presentó diferencia estadística (Burgos *et al.* 2018). Según los resultados este tipo de método completa, pero aún no reemplaza el sistema BAX® o métodos oficiales.

En el Cuadro 2 se interpretó de forma breve los resultados del método SalQuant y las pruebas de presencia o ausencia por zonas de las dos plantas procesadoras. Las dos últimas zonas (E y F) poseen una cantidad menor de positivos de acuerdo que están más desinfectadas y limpias debido a las intervenciones del sistema HACCP (Análisis de Peligros y puntos Críticos de Control) por las que pasa la canal en la línea de producción (FSIS 2015). Altas cargas de contaminación por microorganismos, pueden ser la causa de problemas gastrointestinales en los consumidores finales (Rosas *et al.* 2012). Las cargas microbianas altas atribuyen a que los programas de limpieza, sanitización y manejo de procedimientos no están siendo aplicados correctamente (Cetin *et al.* 2006).

El método SalQuant resultó ser muy eficiente y preciso ya que no se diferencia mucho de los resultados que obtuvo el sistema BAX®. Romero y colaboradores en el 2014 realizaron un estudio comparativo en el que se concluyó que el PCR en tiempo real es una prueba muy útil en el tamizaje para la detección de *Salmonella* spp. en carne molida ya que obtuvo los mismos valores de sensibilidad y valor predictivo positivo que el método convencional ISO 6579 (Romero *et al.* 2014). Según los resultados obtenidos (Cuadro 2) el método SalQuant obtuvo el mismo porcentaje de positivos en cada zona de las dos plantas a comparación del BAX®.

Cuadro 2. Presencia de Salmonella en las plantas (I y II) por zonas (A-F) por medio de los métodos SalQuant y BAX®.

Zonas (PI+PII)	# Positivas SalQuant 6 horas	# Positivas BAX®	# Negativas SalQuant 6 horas	# Negativas BAX®
A	23	23	2	2
B	22	22	4	4
C	13	14	8	7
D	24	26	9	7
E	1	1	26	26
F	1	2	81	80
Total	84	88	130	126
% Positivos	(39%)	(41%)	(61%)	(59%)

Planta I: 154 muestras recolectadas debido a un mayor procesamiento de canales de ave.

Planta II: 60 muestras recolectadas debido a un menor procesamiento de canales de ave.

Zonas: **A** (enjuague con agua), **B** (previo al ácido peracético), **C** (después del ácido peracético), **D** (enjuague con agua por dentro y fuera), **E** (enfriamiento 1.5 - 4.4 °C) y **F** (re-colgado 4.4 °C).

El análisis de contaminación por BAX® y SalQuant en las dos plantas reportó un total de cuatro falsos negativos que desmintió el sistema BAX®. Sin embargo, se debe recalcar que la diferencia entre el total de muestras positivas por ambos métodos fue diferente en solo una muestra, resultando positiva en el BAX® y negativa en SalQuant. Así mismo, el sistema BAX® pudo aclarar y desmentir los falsos negativos para confirmar la presencia de bacteria en las muestras (Cuadro 3). Las cuatro muestras negativas por SalQuant presentaron niveles de enterobacterias de 2.34, 2.82, 1.70 y 0.0 Log UFC/mL las cuales fueron de las zonas C, D y F. Sin embargo, estas mismas muestras presentaron una concentración de 0.0 Log UFC/mL para *Salmonella*.

Cuadro 3. Falsos positivos y negativos por el método SalQuant en la planta I y II.

Planta	Falsos positivos	Falsos negativos
I	0	1
II	0	3
Total	0	4

Los puntos de muestreo con mayor contaminación de *Enterobacteriaceae* fueron las zonas A y D en la estación de pre-enfriamiento (Cuadro 4) con rangos de enterobacterias de 2 a 2.99 Log y 3 a 3.99 Log/mL. En la línea de procesamiento la contaminación compromete la inocuidad del producto final es por eso, que las plantas procesadoras informan el estado microbiológico de todas las canales dentro de la producción.

Cuadro 4. Resumen de concentración de *Enterobacteriaceae* (EB) en zonas de muestreo.

EB Log/mL	Total muestras						
	(%)	A	B	C	D	E	F
<1	108 (50.5%)	1	0	0	0	26	81
1 a 1.99	24 (11.2%)	0	8	2	13	1	0
2 a 2.99	48 (22.4%)	8	8	14	17	0	1
3 a 3.99	30 (14.0 %)	15	8	4	3	0	0
≥4	4 (1.9 %)	1	2	1	0	0	0
Total	214	25	26	21	33	27	82

Planta I: 154 muestras recolectadas debido a un mayor procesamiento de canales de ave.

Planta II: 60 muestras recolectadas debido a un menor procesamiento de canales de ave.

Zonas: **A** (enjuague con agua), **B** (previo al ácido peracético), **C** (después del ácido peracético), **D** (enjuague con agua por dentro y fuera), **E** (enfriamiento 1.5 - 4.4 °C) y **F** (re-colgado 4.4 °C).

Al realizar la separación de medias, en los recuentos de *Enterobacteriaceae* para las dos instalaciones de Estados Unidos se encontraron diferencias significativas entre plantas y zonas con una reducción de 2.9 Log UFC/mL en la planta 1 y en la planta 2 se obtuvo 3.5 Log UFC/mL desde la primera estación a la última. Investigaciones previas con metodologías similares indicaron tener niveles 2.99 ± 0.38 y 0.12 ± 0.30 Log UFC/mL en las estaciones de re-colgado y post-enfriamiento (Handley *et al.* 2018) Así mismo, comparando los niveles de enterobacterias con estudios previos, se reportó diferencia significativa con medias de 5.57 ± 0.93 y 4.27 ± 0.58 Log UFC/mL en Estados Unidos y Honduras en el área de re-colgado con reducción de 5.24 Log UFC/mL y 2.25 Log UFC/mL (Pulinario 2019).

En el Cuadro 5 se muestra que durante el procesamiento la mayoría de las muestras de enjuague de canal positivas a *Salmonella* spp. tienen concentraciones de más de 2 Log UFC/mL al igual, que mayor contaminación en la estación de pre-enfriamiento. Sin embargo, también se encontraron muestras positivas a *Salmonella* spp. con recuentos de <1 UFC/mL. Los mataderos para aves se considera un punto crítico de contaminación en la carne de pollo cruda que recae en el procesamiento de canales de pollo. De acuerdo con estudios previos, la contaminación fecal durante la evisceración es muy congruente. Sin embargo, investigaciones han demostrado resultados de enterobacterias de 2 Log UFC/canal después del enfriamiento (Projahn *et al.* 2018)

Las *Enterobacteriaceae* comúnmente se encuentran en aves como parte de su microflora, hacen los microambientes intestinales más resistentes (Ray 2004). Sin embargo, este microorganismo también puede adherirse al alimento posterior al proceso tal como demuestra en la zona D.

La Figura 7 representa la cantidad de muestras positivas y concentración que se obtuvo de enterobacterias, promediadas de cada zona por las dos plantas. El recuento de enterobacterias muestra una mayoría de muestras positivas arriba de los 2 Log. La contaminación visible en aves previo al matadero es de mucha importancia, ya que influye de manera continua en el procesamiento. Estudios independientes desarrollaron un equipo para cepillar las plumas del pollo previamente al escaldado y reducir la contaminación (Projahn *et al.* 2018).

Cuadro 5. Resumen de muestras positivas a *Salmonella* según concentración de *Enterobacteriaceae* (EB) en zonas de muestreo.

Cuadro 5. Resumen de muestras positivas a *Salmonella* según concentración de EB *Enterobacteriaceae* en zonas de muestreo

EB Log/mL	Total muestras	Muestras positivas <i>Salmonella</i> total (%)	A	B	C	D	E	F
<1	108	4 (3.7%)	1	0	0	0	1	2
1 a 1.99	24	15 (62.5%)	0	5	1	9	0	0
2 a 2.99	48	39 (81.25%)	8	7	10	14	0	0
3 a 3.99	30	26 (86.67%)	13	8	2	3	0	0
≥4	4	4 (100 %)	1	2	1	0	0	0
Total	214	88 (%)	25	23	14	26	1	2

Planta I: 154 muestras recolectadas debido a un mayor procesamiento de canales de ave.

Planta II: 60 muestras recolectadas debido a un menor procesamiento de canales de ave.

Zonas: **A** (enjuague con agua), **B** (previo al ácido peracético), **C** (después del ácido peracético), **D** (enjuague con agua por dentro y fuera), **E** (enfriamiento 1.5 - 4.4 °C) y **F** (re-colgado 4.4 °C).

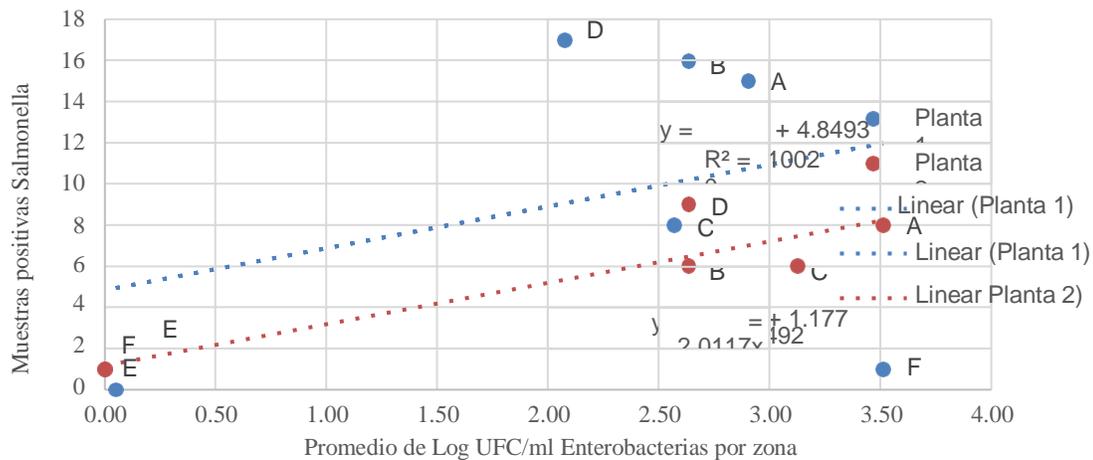


Figura 7. Relación de recuentos de *Enterobacteriaceae* y prevalencia de *Salmonella* en enjuagues de canal de las plantas I y II.

Planta I: 154 muestras recolectadas debido a un mayor procesamiento de canales de ave.

Planta II: 60 muestras recolectadas debido a un menor procesamiento de canales de ave.

Zonas: **A** (enjuague con agua), **B** (previo al ácido peracético), **C** (después del ácido peracético), **D** (enjuague con agua por dentro y fuera), **E** (enfriamiento 1.5 - 4.4 °C) y **F** (re-colgado 4.4 °C).

La Figura 8 demuestra los resultados de *Salmonella* y *Enterobacteriaceae* de las dos plantas avícolas, mostrando las concentraciones de bacteria por cada zona de las estaciones (pre-enfriamiento y post-enfriamiento). Las instalaciones de aves de corral pueden reducir la contaminación por patógenos durante el muestreo determinando áreas de impacto microbiológico

a lo largo de la cadena (FSIS 2015). Al tratarse de un alimento como pollo crudo entero, es sumamente importante que al pasar la etapa de enfriamiento los niveles de *Enterobacteriaceae* sean inferiores al límite máximo permitido (<10,000 UFC/mL) y en este caso supera el límite las zonas de la estación de pre-enfriamiento (NACMCF 2014).

La parte de enfriamiento en el procesamiento se considera como punto crítico de control para la industria avícola. La etapa de post-enfriamiento se considera un punto crítico de control para la reducción de enterobacterias (Kim *et al.* 2017). En estudios previos se han analizado canales de pollo fresco y sus niveles microbiológicos dentro de la etapa de post-enfriamiento y debido al uso de concentraciones de cloro en los tanques la flora bacteriana disminuye grandemente (Rothrock *et al.* 2016). El análisis de correlación fue significativo y determinó una correlación positiva baja para enterobacterias y SalQuant de 0.36, entre mayor sea la concentración de enterobacterias mayor es la concentración de *Salmonella* (Figura 8).

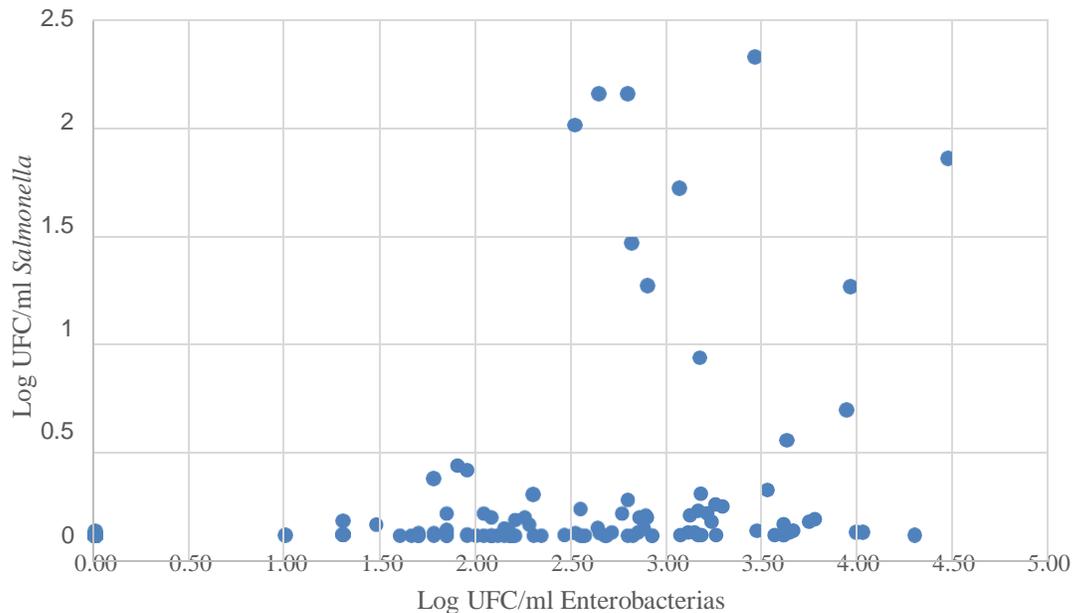


Figura 8. Relación de recuentos de *Enterobacteriaceae* y niveles de contaminación de *Salmonella* en enjuagues de canal de las plantas I y II.

Enterobacteriaceae constituye una familia diversa de bacterias Gram negativas y entre estas se encuentra la *Salmonella*. Las enterobacterias se reproducen de forma rápida bajo condiciones aerobias y anaerobias. A pesar de que estas bacterias se pueden hallar en diferentes tipos de alimentos se encuentran principalmente en productos derivados de la carne ya que forman parte de su microbiota intestinal (Ruiz *et al.* 2018).

En la Figura 9 se determinó que la contaminación de las canales de ave por enterobacterias disminuye en las dos plantas a medida pasan por cada zona. Sin embargo, la planta II presentó mayor contaminación por la bacteria al principio tomando en cuenta que esta planta procesa una menor cantidad de canales de ave y que se tomaron una menor cantidad de muestras que la planta I. Según el análisis estadístico de separación de medias LSMEAN se demostró diferencia significativa entre plantas (I y II) y zonas (A-F). Análisis de experimentos pasados con carne de cerdo, res y pollo reportaron que la familia *Enterobacteriaceae* abarca 14 de 17 géneros bacterianos. Aunque cabe destacar que el género bacteriano más frecuente en muestras de pollo es *Escherichia* con un 95.3% (Ruiz *et al.* 2018).

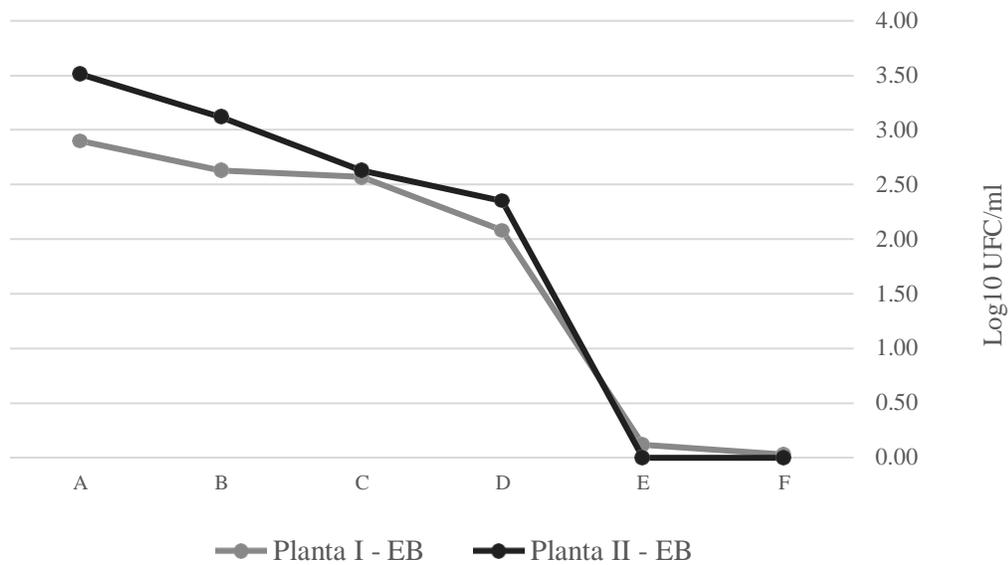


Figura 9. Comparación de *Enterobacteriaceae* por zonas en las plantas I y II.

Planta I: 154 muestras recolectadas debido a un mayor procesamiento de canales de ave.

Planta II: 60 muestras recolectadas debido a un menor procesamiento de canales de ave.

Zonas: **A** (enjuague con agua), **B** (previo al ácido peracético), **C** (después del ácido peracético), **D** (enjuague con agua por dentro y fuera), **E** (enfriamiento 1.5- 4.4 °C) y **F** (re-colgado 4.4 °C).

En la Figura 10 se observó que el proceso, ya finalizado llega a reducir las concentraciones de *Salmonella* en ambas plantas. Las plantas I y II presentaron niveles de contaminación similares según las zonas a excepción de las zonas en la estación de pre-enfriamiento (Zonas A, B y C) ya que la planta II mostró mayor contaminación de *Salmonella* al inicio de la cadena. Sin embargo, gradualmente se redujo la cantidad de bacterias en las dos plantas logrando alcanzar un 0.00 Log UFC/mL por parte del método SalQuant lo cual cumplió con la descontaminación prevista por parte del proceso. Se demostró por parte del análisis estadístico de separación de medias LSMEAN que hubo una diferencia significativa en la contaminación de *Salmonella* en las plantas I y II al principio del proceso (zonas A y B), al igual, que entre las zonas por planta.

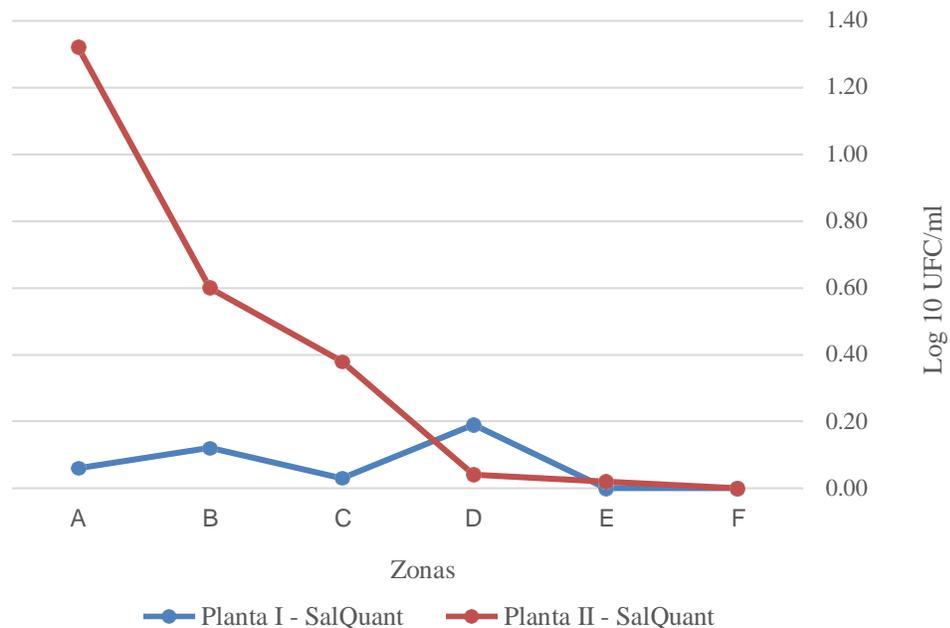


Figura 10. Comparación de niveles de *Salmonella* por el método SalQuant según la zona de muestreo en las plantas I y II (214 muestras).

Planta I: 154 muestras recolectadas debido a un mayor procesamiento de canales de ave.

Planta II: 60 muestras recolectadas debido a un menor procesamiento de canales de ave.

Zonas: **A** (enjuague con agua), **B** (previo al ácido peracético), **C** (después del ácido peracético), **D** (enjuague con agua por dentro y fuera), **E** (enfriamiento 1.5 - 4.4 °C) y **F** (re-colgado 4.4 °C).

La planta I obtuvo una reducción completa de *Salmonella* en las últimas zonas a diferencia de la planta II que todavía posee de 5-10% de *Salmonella* numéricamente (Figura 11). Se reportó un porcentaje más alto del patógeno en la planta II con un porcentaje inicial de 100% de prevalencia y la planta I con 87% según la gráfica. Estos porcentajes altos se mantuvieron (Zonas A-D), hasta llegar a la estación de post-enfriamiento (Zonas E y F). En la planta I ocurrió un rebrote de *Salmonella* del 50% en la zona D, el cual se interpretó indicando un punto de contaminación en la estación de pre-enfriamiento.

Las intervenciones se han utilizado ampliamente en muchos países como parte de los programas nacionales de control para *Salmonella*, ya que se han asociado con reducciones significativas en la prevalencia de patógenos (FAO 2009). Ácido cítrico (9000 ppm), Agua clorada (25 ppm), Dióxido de cloro (5ppm; Hipoclorito de sodio e hipoclorito de calcio), Ácido láctico, Clorito de sodio acidificado (750ppm) y Fosfato trisódico (Expertos consideran no utilizarlo porque es raramente usado en procesamiento de aves de corral) son los antimicrobianos utilizados en la industria avícola (FAO 2009). La diferencia en descontaminación que obtuvieron las dos plantas puede ser debido a que no detectaron la bandada de pollos con *Salmonella* previo al proceso de evisceración provocando un nivel mayor de bacteria en la estación.

Investigadores federales creen que la *Salmonella* se ha extendido a instalaciones de evisceración y procesamiento, quiere decir que pueden ser persistentes en poblaciones grandes de aves, en sus entornos y alimentos (González *et al.* 2019). Rodríguez y colaboradores (2016) determinaron en su estudio que el porcentaje de *Salmonella* es mayor en pollo congelado (54%) que en pollo fresco (46%). La carne de pollo ha sido identificada como uno de los vehículos alimenticios para *Salmonella* spp. por lo tanto, la herramienta HACCP es implementada en las operaciones donde se conoce normalmente el aumento de contaminación como; escaldado, desplumado, y evisceración. Estas representan un gran riesgo de la ruptura intestinal (Figura 11).

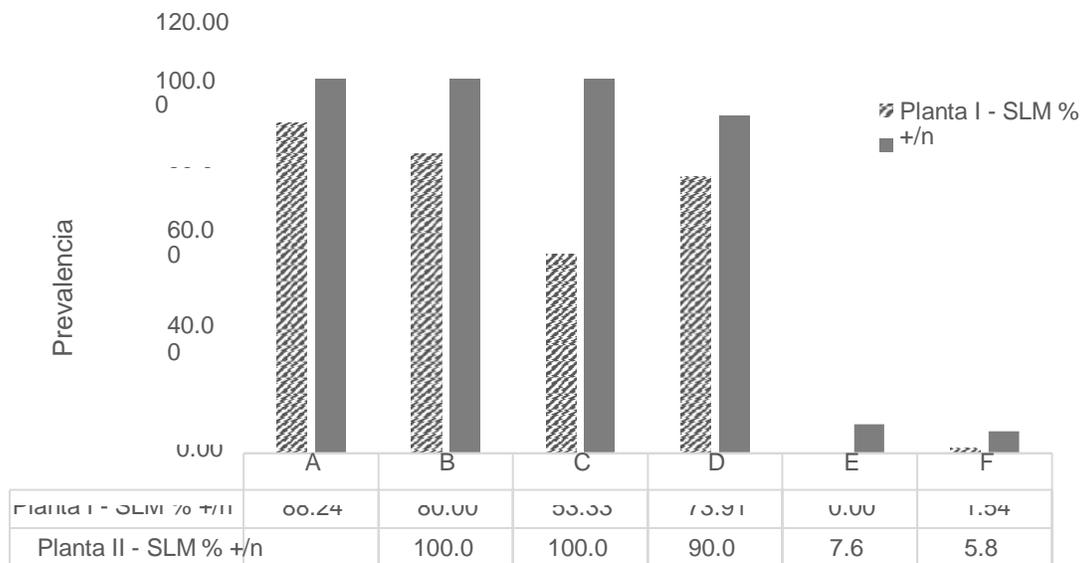


Figura 11. Comparación de porcentaje de prevalencia de SLM (*Salmonella*) por zonas en las plantas I y II.

Planta I: 154 muestras recolectadas debido a un mayor procesamiento de canales de ave.

Planta II: 60 muestras recolectadas debido a un menor procesamiento de canales de ave.

Zonas: **A** (enjuague con agua), **B** (previo al ácido peracético), **C** (después del ácido peracético), **D** (enjuague con agua por dentro y fuera), **E** (enfriamiento 1.5 - 4.4 °C) y **F** (re-colgado 4.4 °C).

La aplicación de ácido peracético (PAA sus siglas en inglés) se usa comúnmente a niveles de 500 a 700 ppm (Walsh *et al.* 2018). En la planta II, zona C no disminuyó la contaminación numéricamente después de la aplicación del antimicrobiano a comparación de la planta I (Figura 11). Sin embargo, se comprobó por la prueba de chi-cuadrado que, si hubo diferencia significativa entre las dos plantas reportando las zonas A, B y C estadísticamente diferentes y las zonas D, E y F estadísticamente iguales. Estudios han documentado los resultados posteriores a la aplicación del ácido peracético en solución de 2000 ppm por 30 segundos obteniendo una reducción significativa en la canal (Lillard *et al.* 1983). Se mostró que los establecimientos seleccionados necesitan un mejor control en la capacitación de los operarios ya que las canales de ave en las zonas finales no alcanzan el 0% de prevalencia. El problema en la contaminación de pollos es que las canales no son del todo uniformes en tamaño y algunas pueden ser dañadas por la maquinaria de evisceración presentando altos porcentajes de prevalencia (FAO 2009). Conocer los niveles exactos de *Salmonella* en la industria avícola es fundamental y beneficioso ya que puede prevenir con mayor seguridad la infección del patógeno y de esa manera evitar posibles demandas hacia la empresa.

4. CONCLUSIONES

- El método SalQuant obtuvo buenos resultados ya que detectó la presencia y ausencia de *Salmonella* y el estimado en 214 muestras de acuerdo con la curva de regresión lineal de enjuagues inoculados.
- El nuevo modelo predictivo funcionó y es aplicable a las condiciones normales de operación. *Salmonella* spp. está presente en las canales de pollo independientemente de la concentración de *Enterobacteriaceae* que contengan.
- Se determinó que los niveles más altos de *Salmonella* se encontraron en la zona A debido a que la canal se ha lavado solo con agua hasta ese punto y el antimicrobiano todavía no ha sido aplicado y la otra zona es la D, ya que la canal todavía no entra a la sala de enfriado para detener la multiplicación de patógenos.

5. RECOMENDACIONES

- Evaluar previamente el efecto de intervenciones en la cadena de procesamiento para que la empresa conozca el porcentaje de *Salmonella* en la planta y de esa forma permitir resultados más claros a futuro.
- Monitorear las zonas de proceso para evitar la contaminación cruzada y que esta repercuta en el producto final afectando los análisis microbiológicos.

6. LITERATURA CITADA

- Akil L, Ahmad HA. 2019. Quantitative risk assessment model of human salmonellosis resulting from consumption of broiler chicken. *diseases*. 7(1): 607-625. eng. doi:10.3390/diseases7010019.
- Aljindan RY, Alkharsah KR. 2020. Pattern of increased antimicrobial resistance of *Salmonella* isolates in the eastern province of ksa. *J Taibah Univ Med Sci*. 15(1):48–53. eng.http://www.elika.net/datos/pdfs_agrupados/Documento82/1.Salmonella.pdf. doi:10.1016/j.jtumed.2019.12.004.
- Bailey M, Taylor R, Brar J, Corkran S, Velásquez C, Novoa-Rama E, Oliver HF, Singh M. 2020. Prevalence and antimicrobial resistance of *Salmonella* from antibiotic-free broilers during organic and conventional processing. *J Food Prot*. 83(3):491–496. eng. doi:10.4315/0362-028X.JFP-19-269.
- Belete T, Crowley E, Bird P, Gensic J, Wallace FM. 2014. A comparison of the bax system method to the U.S. food and drug administration's bacteriological analytical manual and international organization for standardization reference methods for the detection of *Salmonella* in a variety of soy ingredients. *J Food Prot*. 77(10):1778–1783. eng. doi:10.4315/0362-028X.JFP-14-063.
- Burgos JT, Alberti CL. 2018. Comparación de dos métodos rápidos para la detección de *Salmonella spp.* con un método convencional – Alerta – Revista Electrónica. [sin lugar]: Revista Electronica; consultado el 28 de jul. de 2020].<https://alerta.salud.gob.sv/comparacion-de-dos-metodos-rapidos-para-la-deteccion-de-Salmonella-spp-con-un-metodo-F>
- Cetin Ö, Kahraman T, Büyükcinal SK. 2006. Microbiological evaluation of food contact surfaces at red meat processing plants in istanbul, Turkey. *Italian journal of animal science*; [consultado 9/10/20]. 5(3):277–283. <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.4081/ijas.2006.277>. doi:10.4081/ijas.2006.277.
- [CFR] Code of Federal Regulations. 1996. 9 CFR § 381.65-Operations and procedures, generally. [sin lugar]: [sin editorial]; [actualizado el 4 de oct. de 2020.000Z; consultado el 10 de oct. de 2020.079Z]. <https://www.law.cornell.edu/cfr/text/9/381.65>.
- [FAO] Food and Agriculture Organization of the United Nations, [WHO] World Health Organization. 2009. Food and Agriculture Organization of the United Nations: *Salmonella* and *Campylobacter* in chicken meat; [consultado el 31 de jul. de 2020]. <http://www.fao.org/3/a-i1133e.pdf/>.
- [FSIS] Food Safety and Inspection System. FSIS. 2018. MLG 4.10 Isolation and identification of *Salmonella* from meat, poultry, pasteurized egg, and siluriformes (fish) products and carcass and environmental sponges. [consultado el 21 de jun. de 2020]. <https://www.fsis.usda.gov/wps/wcm/connect/700c05fe-06a2-492a-a6e1-3357f7701f52/MLG-4.pdf?MOD=AJPERES>.
- [FSIS] Food Safety and Inspection System. FSIS U. 2015. FSIS Compliance Guideline: Modernization of poultry slaughter inspection microbiological sampling of raw poultry.

- <https://www.fsis.usda.gov/wps/wcm/connect/a18d541e-77d2-40cf-a045-b2d2d13b070d/Microbiological-Testing-Raw-Poultry.pdf?MOD=AJPERES>.
- González RJ, Sampetro F, Feirtag JM, Sánchez-Plata MX, Hedberg CW. 2019. Prioritization of chicken meat processing interventions on the basis of reducing the *Salmonella* residual relative risk. *J Food Prot.* 82(9):1575–1582. eng. doi:10.4315/0362-028X.JFP-19-033.
- Guillon A. 2019. Prevention, detection and control of *Salmonella* in poultry; [consultado el 23 de jun. de 2020]. 3–4. https://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahc/current/chapitre_prevent_Salmonella.pdf.
- Handley John A, Si Park Hong, Kim Sun Ae, and Ricke Steven C. 2018. Microbiome profiles of commercial broilers through evisceration and immersion chilling during poultry slaughter and the identification of potential indicator microorganisms. *Front Microbiol.* 9(345):1–11. DOI:10.3389/fmicb.2018.00345
- Kim S, Park S, Lee S, Owens CM, Ricke SC. 2017. Assessment of chicken carcass microbiome responses during processing in the presence of commercial antimicrobials using a next generation sequencing approach. *Scientific reports*; [consultado el 13 de ago. de 2020]. 7:43354. eng. https://www.researchgate.net/publication/313945537_Assessment_of_Chicken_Carcass_Microbiome_Responses_During_Processing_in_the_Presence_of_Commercial_Antimicrobials_Using_a_Next_Generation_Sequencing_Approach. doi:10.1038/srep43354.
- Koyuncu S, Andersson MG, Häggblom P. 2010. Accuracy and sensitivity of commercial pcr-based methods for detection of *Salmonella enterica* in feed. *appl environ microbiol.* 76(9):2815–2822. eng. doi:10.1128/AEM.02714-09.
- Lilard HS, Thomson JE. 1983. Efficacy of hydrogen peroxide as a bactericide in poultry chiller water. *J Food Science.* 48(1):125–126. doi:10.1111/j.1365-2621.1983.tb14804.x.
- [NACMCF] National Advisory Committee on Microbiological Criteria for Foods. 2014. Response to questions posed by the dod regarding microbiological criteria as indicators of process control or insanitary conditions. https://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahc/current/chapitre_prevent_salmonella.pdf.
- Nair D, Venkitanarayanan K, Kollanoor Johny A. 2018. Antibiotic-resistant *Salmonella* in the food supply and the potential role of antibiotic alternatives for control. *Foods.* 7(10): 316-325. eng .doi:10.3390/foods7100167.
- Painter JA, Hoekstra RM, Ayers T, Tauxe RV, Braden CR, Angulo FJ, and Griffin PM. 2013. Attribution of foodborne illnesses, hospitalizations, and deaths to food commodities by using outbreak data, United States, 1998–2008. United States: Center for Disease Control and Prevention. <https://wwwnc.cdc.gov/eid/article/19/3/11-1866-t1>
- Projahn M, Pacholewicz E, Becker E, Correia-Carreira G, Bandick N, Kaesbohrer A. 2018. Reviewing interventions against *Enterobacteriaceae* in broiler processing: using old techniques for meeting the new challenges *Escherichia coli* *Biomed Res Int.* eng. doi:10.1155/2018/7309346.
- Pulinario Lorenzo IM. 2019. Estudio de comparación de líneas base de grupos indicadores en dos plantas procesadoras de pollo en Estados Unidos y Honduras: Escuela Agrícola

- Panamericana Zamorano [Tesis]; [consultado el 18 de may. de 2020]. 13–16. <http://www.veterinaryworld.org/Vol.11/August-2018/13.pdf>.
- Ray B. 2004. *Fundamental food microbiology*. 3rd ed. Boca Raton [Fla.]: CRC Press. 608 p. ISBN: 0-8493-1610-3. [consultado el 21 de jun. de 2020]. <http://nuristianah.lecture.ub.ac.id/files/2014/09/fundamental-food-microbiology.pdf>
- Regenstein JM, Singh RP. 2018. Poultry processing | equipment, steps, & facts: food processing technology: principles and practices. <https://www.britannica.com/technology/poultry-processing>.
- Rodríguez Cenicerós R, Gómez Hernández F, Vázquez Sandoval H, Corona Medina, José Luis, Mendoza Ramos MY. 6, junio, 2016. Redalyc.Presencia de *Campylobacter* y *Salmonella* en pollo a la venta en Gómez Palacio Durango, México; 17.
- Romero Quintero MI, Sánchez Pavón EA, López Aburto JV. 2014 Análisis de la comparación del método estándar ISO 6579-2002 con PCR tiempo real como prueba de tamizaje para la detección de *Salmonella spp* en carne molida, cndrmins. es. [consultado el 13 de ago. de 2020] <https://repositorio.unan.edu.ni/1024/>.
- Rosas, M., F. Solís, C. Cervantes, C. Ortega y E. Romero. 2012. Control sanitario en la preparación de alimentos en el centro de internamiento especial para adolescentes (CIEPA), de la población de Palmasola Municipio de Alto Lucero Veracruz México. Rev Med UV. [consultado el 5 de jun. de 2020]. <https://www.medigraphic.com/pdfs/veracruzana/muv-2012/muv121e.pdf>
- Rothrock MJ, Locatelli A, Glenn TC, Thomas JC, Caudill AC, Kiepper BH, & Hiett K L.(2016). Assessing the microbiomes of scalding and chiller tank waters throughout a typical commercial poultry-processing day. *Poultry Science*. 95(10);2372–2382. DOI:10.3382/ps/pew234
- Ruiz-Roldán L, Martínez-Puchol S, Gomes C, Palma N, Riveros M, Ocampo K, Durand D, Ochoa TJ, Ruiz J, Pons MJ. 2018. Presencia de *Enterobacteriaceae* y *Escherichia coli* multirresistente a antimicrobianos en carne adquirida en mercados tradicionales en Lima [Presence of multidrug resistant *Enterobacteriaceae* and *Escherichia coli* in meat purchased in traditional markets of Lima]. *Revista peruana de medicina experimental y salud pública*; [consultado el 13 de ago. de 2020]. 35(3):425–432. spa. https://www.researchgate.net/publication/328335314_Presencia_de_Enterobacteriaceae_y_Escherichia_coli_multirresistente_a_antimicrobianos_en_carne_adquirida_en_mercados_tradicionales_en_Lima. doi:10.17843/rpmesp.2018.353.3737.
- Silbernagel K, Jechorek R, Carver C, Barbour WM, Mrozinski P. 2003. Evaluation of the BAX® system for detection of *Salmonella* in selected foods: Collaborative study. [sin lugar]: [sin editorial]; [actualizado el 10 de oct. de 2020]. [consultado el 10 de oct. de 2020.671Z]. https://www.researchgate.net/publication/5290994_Evaluation_of_the_BAXR_system_for_detection_of_Salmonella_in_selected_foods_Collaborative_study.
- USDA. United States Department of Agriculture. FSIS. Food Safety and Inspection System. FSIS U. 2014. MLG Appendix 2.05. Most probable number procedure and tables; [consultado el

- 5 de jun. de 2020]. 6–8. <https://www.fsis.usda.gov/wps/wcm/connect/8872ec11-d6a3-4fcf-86df-4d87e57780f5/MLG-Appendix-2.pdf?MOD=AJPERES>.
- USDA. United States Department of Agriculture. 2016. FSIS Directive 6420.5 - Verifying poultry slaughter establishments maintain adequate procedures for preventing contamination with Feces and Enteric Pathogens. [consultado el 5 de jun. de 2020]. <https://www.fsis.usda.gov/wps/wcm/connect/a41f8a7c-a4c8-4a7a-b4bf-3ad1afae1578/6420.5.pdf?MOD=AJPERES>.
- Wallace FM. 2020. Detection of Salmonella species in a variety of foods by the DuPont™ bax system real-time PCR assay for Salmonella - AOAC 2013.02; [consultado el 17 de ago. de 2020]. <https://doi.org/10.5740/jaoacint.13-407>
- Walsh RJ, White B, Hunker L, Leishman O, Hilgren J and Klein D. 2018. Food Protection Trends: Peracetic acid and hydrogen peroxide post-dip decay kinetics on red meat and poultry. 38:96–103.; [consultado el 21 de jun. de 2020]. <http://www.foodprotection.org/files/food-protection-trends/mar-apr-18-walsh.pdf>

7. ANEXOS

Anexo 1. Separación de medias LSMEAN para enterobacterias por plantas y zonas.

Zona	Planta I	Planta II
	Media ± DE	Media ± DE
A	2.9 ± 0.84 ^{Aw}	3.5 ± 0.49 ^{Bw}
B	2.6 ± 0.82 ^{Awx}	3.1 ± 0.79 ^{Awx}
C	2.5 ± 0.66 ^{Ax}	2.6 ± 0.39 ^{Axy}
D	2.1 ± 0.59 ^{Ay}	2.3 ± 0.64 ^{Ay}
E	0.1 ± 0.43 ^{Az}	0.0 ± 0.00 ^{Az}
F	0.0 ± 0.27 ^{Az}	0.0 ± 0.00 ^{Az}

^{AB} Las medias con diferentes letras presentan diferencias significativas entre plantas ($P < 0.05$).
^{wxyz} Las medias con diferentes letras presentan diferencia estadística entre las zonas de cada planta ($P < 0.05$).

Zonas: **A** (enjuague con agua), **B** (previo al ácido peracético), **C** (después del ácido peracético), **D** (enjuague con agua por dentro y fuera), **E** (enfriamiento 1.5- 4.4 °C) y **F** (Re-colgado 4.4 °C).

Anexo 2. Análisis de varianza (ANDEVA) para *Salmonella* de las dos plantas procesadoras.

The SAS System

The GLM Procedure

Dependent Variable: LOG

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	11	372.3223037	33.8474822	118.55	<.0001
Error	202	57.6728888	0.2855094		
Corrected Total	213	429.9951925			

R-Square	Coeff Var	Root MSE	LOG Mean
0.865876	41.09646	0.534331	1.300187

Source	DF	Type I SS	Mean Square	F Value	Pr > F
PLANTA	1	1.5190832	1.5190832	5.32	0.0221
ZONA	5	388.0403276	73.6080655	257.81	<.0001
PLANTA*ZONA	5	2.7628929	0.5525786	1.94	0.0900

Source	DF	Type III SS	Mean Square	F Value	Pr > F
PLANTA	1	1.6470223	1.6470223	5.77	0.0172
ZONA	5	306.0203749	61.2040750	214.37	<.0001
PLANTA*ZONA	5	2.7628929	0.5525786	1.94	0.0900

Anexo 3. Tabla de contingencia.

Count		BA X		Total
		Bpos	Bneg	
SalQuant	Spos	84	0	84
	Sneg	4	126	130
Total		88	126	214

$$\text{Sensibilidad} = \frac{\text{Verdaderos positivos}}{\text{Verdaderos positivos} + \text{Falsos negativos}}$$

$$\text{Especificidad} = \frac{\text{Verdaderos negativos}}{\text{Verdaderos negativos} + \text{Falsos positivos}}$$

Anexo 4. Separación de medias LSMEAN para *Salmonella* por plantas y zonas.

Zona	Planta I	Planta II
	Media ± DE	Media ± DE
A	0.0 ± 0.05 ^{Aw}	1.3 ± 0.73 ^{Bw}
B	0.1 ± 0.32 ^{AwX}	0.6 ± 0.48 ^{Bx}
C	0.0 ± 0.04 ^{Ax}	0.3 ± 0.72 ^{Axy}
D	0.1 ± 0.44 ^{Axy}	0.0 ± 0.04 ^{Ay}
E	0.1 ± 0.00 ^{Az}	0.0 ± 0.01 ^{Ayz}
F	0.0 ± 0.00 ^{Az}	0.0 ± 0.00 ^{Az}

^{AB} Las medias con diferentes letras presentan diferencias significativas entre plantas ($P < 0.05$).

^{wxyz} Las medias con diferentes letras presentan diferencia estadística entre las zonas de cada planta ($P < 0.05$).

Zonas: **A** (enjuague con agua), **B** (previo al ácido peracético), **C** (después del ácido peracético), **D** (enjuague con agua por dentro y fuera), **E** (enfriamiento 1.5- 4.4 °C) y **F** (Re-colgado 4.4 °C).

Anexo 5. Análisis de correlación para EB (enterobacterias) y *Salmonella* (SalQuant).

The SAS System

The CORR Procedure

2 Variables: EB SALQUANT

Simple Statistics						
Variable	N	Mean	Std Dev	Sum	Minimum	Maximum
EB	214	1.30019	1.42083	278.24000	0	4.48000
SALQUANT	214	0.10659	0.37725	22.81000	0	2.32000

Pearson Correlation Coefficients, N = 214		
Prob > r under H0: Rho=0		
	EB	SALQUANT
EB	1.00000	0.36159 <.0001
SALQUANT	0.36159 <.0001	1.00000

Anexo 6. Prueba de Mc Nemar en el programa estadístico SAS.

The FREQ Procedure

Frequency Percent Row Pct Col Pct	Table of salquant by bax			
	salquant	bax		Total
		neg	pos	
neg	126 58.88 96.92 100.00	4 1.87 3.08 4.55	130 60.75	
pos	0 0.00 0.00 0.00	84 39.25 100.00 95.45	84 39.25	
Total	126 58.88	88 41.12	214 100.00	

Statistics for Table of salquant by bax

McNemar's Test	
Statistic (S)	4.0000
DF	1
Asymptotic Pr > S	0.0455
Exact Pr >= S	0.1250

Simple Kappa Coefficient	
Kappa	0.9611
ASE	0.0192
95% Lower Conf Limit	0.9234
95% Upper Conf Limit	0.9988

Sample Size = 214

Anexo 7. Prueba de chi-cuadrado en porcentajes de prevalencia de *Salmonella*.

The SAS System

The FREQ Procedure

Frequency Row Pct	Table of planta by zona							
	planta	zona						Total
		A	B	C	D	E	F	
1	88 29.63	80 26.94	53 17.85	74 24.92	0 0.00	2 0.67	297	
2	100 24.75	100 24.75	100 24.75	90 22.28	8 1.98	6 1.49	404	
Total	188	180	153	164	8	8	701	

Statistics for Table of planta by zona

Statistic	DF	Value	Prob
Chi-Square	5	12.9566	0.0238
Likelihood Ratio Chi-Square	5	16.0177	0.0068
Mantel-Haenszel Chi-Square	1	2.8844	0.0894
Phi Coefficient		0.1360	
Contingency Coefficient		0.1347	
Cramer's V		0.1360	
WARNING: 33% of the cells have expected counts less than 5. Chi-Square may not be a valid test.			

Sample Size = 701

The SAS System

The FREQ Procedure

Frequency Row Pct	Table of planta by zona							
	planta	zona						Total
		A	B	C	D	E	F	
1	88 29.63	80 26.94	53 17.85	74 24.92	0 0.00	2 0.67	297	
2	100 24.75	100 24.75	100 24.75	90 22.28	8 1.98	6 1.49	404	
Total	188	180	153	164	8	8	701	

Statistics for Table of planta by zona

Statistic	DF	Value	Prob
Chi-Square	5	12.9566	0.0238
Likelihood Ratio Chi-Square	5	16.0177	0.0068
Mantel-Haenszel Chi-Square	1	2.8844	0.0894
Phi Coefficient		0.1360	
Contingency Coefficient		0.1347	
Cramer's V		0.1360	
WARNING: 33% of the cells have expected counts less than 5. Chi-Square may not be a valid test.			

Sample Size = 701

Anexo 8. Probabilidad de chi-cuadrado entre zonas (A-F) de las plantas I y II.

Chi-cuadrado	
Zonas (Planta I + Planta II)	Probabilidad
A	0.0169
B	0.0257
C	0.0404
D	0.2989
E	0.2903
F	0.2951